

## Estimation of Relative Potency with the Parallel-Line Model

Taewon Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Information and Mathematics, Korea University

(Received April 16, 2012; Revised May 25, 2012; Accepted June 25, 2012)

---

### Abstract

Biological methods are described for the assay of certain substances and preparations whose potency cannot be adequately assured by chemical or physical analysis. The principle applied through these assays is of a comparison with a standard preparation to determine how much of the examined substance produces the same biological effects as a given quantity (the *Unit*) of the standard preparation. In these dilution assays, to estimate the relative potencies of the unknown preparations to the standard preparations, it is necessary to compare dose-response relationships of standard and unknown preparations. The dose-response relationship in the dilution assay is non-linear and sigmoid when a wide range of doses is applied. The parallel line model (applied to the dose region with the steepest slope) is used to estimate the relative potency. In this paper, the statistical theory in the parallel line model is explained with an application to a dilution assay data. The parallel line method is implemented in a SAS program and is available at the author's homepage(<http://cafe.daum.net/go.analysis>).

Keywords: Relative potency, dilution assay, parallel line model, SAS program.

---

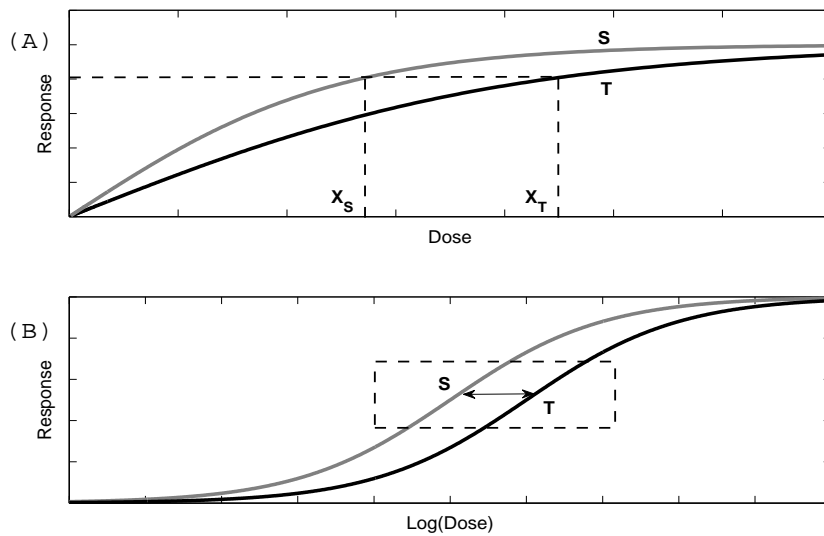
### 1. 서론

역가(potency)는 같은 약물효과를 나타내는데 필요한 약물의 양을 의미하는 용어로 약물 간의 효과를 비교할 때 기준으로 사용되고 있다 (식품의약품안전청, 식품의약품등 용어사전). 예를 들어 항생물질이 세균의 증식을 억제하거나 소멸시킬 수 있는 힘, 즉 항균력을 역가라고 하고 이 역가를 측정하는 시험을 역가시험이라고 한다. 화학적 또는 물리적 분석으로 그 역가가 명확하게 확인될 수 없는 특정 물질과 제품의 역가는 표준품(standard, reference)에 대한 상대역가(relative potency)로 나타낸다. 여기에서 표준품이란 일정한 순도 또는 생물학적 작용을 갖게 만들어진 물질이며, 의약품등의 생물학적 또는 이화학적 시험을 할때 사용하는 상용표준품의 역가를 정하기 위한 표준이 되는 물질이다. 그리고, 상대역가는 표준품의 정해진 단위(the *Unit*)에서 나타나는 생물학적 효과와 동일한 효과를 나타내기 위한 조사물질(test)의 양으로 그 역가를 추정한다. 앞으로 어떠한 시험품의 표준품에 대한 상대 역가는 동일한 효과를 나타내는 표준품의 양의 시험품의 양에 대한 비율, 즉 역가비(potency ratio)를 의미한다.

---

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (No. 2011-0015128).

<sup>1</sup>Assistant professor, Department of Information and Mathematics, Korea University, Jochiwon, Chungnam 339-700, Korea. E-mail: [taewon70@korea.ac.kr](mailto:taewon70@korea.ac.kr)



**Figure 1.1.** (A) Dose-response curves of Standard(S, grey) and Test(T, black), (B) Dose-response curves on the log-dose scale

시제품이 그 비율은 알지 못하지만 표준품과 동일한 활성 요소가 비활성 요소에 섞여있다면 이론적으로 표준품을 비활성 요소로 희석해 봄으로써 그 역가를 알 수 있다. 이러한 표준품(standard or reference)에 대한 시제품(test)의 상대역가를 추정하는 희석 시험(dilution assay)에서는 표준품과 시제품의 용량반응 관계(dose-response relationship)를 비교하는 것이 필요하다. 희석 시험에서 나타난 표준품과 시제품의 용량반응 관계를 해석할 때, Figure 1.1 (A)에서 보듯이 일정한 반응값을 나타낼때의 용량을 비교하는 방법보다, Figure 1.1 (B)에서처럼 용량을 로그 변환(log transform)을 하였을 때 전체 범위의 반응 곡선(response curve)이 경험적으로 sigmoid 곡선을 따름을 이용하는 방법을 일반적으로 사용한다. Figure 1.1 (B)에서 보듯이 시제품(T)의 용량반응 곡선은 용량축을 따라 평행이동하였을 때 표준품(S)의 용량반응 곡선에 일치하게 된다. 이 평행이동한 거리가 동일한 반응값을 나타낼때의 표준품의 시제품에 대한 용량의 비율, 즉 상대역가의 로그값이 된다. 특히 sigmoid 곡선이 직선 관계를 나타내는 용량 범위에서 두 곡선을 비교하는 방법이 앞으로 설명할 평행선 모형이다. 평행선 모형에 대응되는 기울기비 모형은 Figure 1.1 (A)에서 보듯이 작은 용량 범위에서 반응 곡선의 점근선들이 한점에서 만나는 직선임을 이용하여 기울기의 비율로 상대역가를 추정하는 모형이다 (Vølund, 1978).

생물의약품은 사람이나 다른 살아있는 기관에서 유래한 물질로부터 제조된 의약품으로서 백신, 혈액제제, 독신, 재조합의약품, 세포치료제 등을 포함한다. 일반적으로 품질관리의 일관성·적합성·신뢰성을 위해 표준품이 요구되고 있으며, 국제표준품, 국가표준품, 상용표준품 등 다양한 형태로 존재한다. 생물의약품 표준품의 경우, 생물학적 특성으로 인해 제조가 어렵고, 장기간 보관이 어려워 표준품 사용이 원활하지 않고 세계보건기구(WHO)에서는 국제표준품을 소량으로만 제조하여 공급하므로, 각 제조업체에서 품질 관리에 이용될 정도로 충분한 양으로 제공하기에는 어렵다. WHO에서는 각 나라의 국가기관에서 국제표준품을 1차 기준물질로 하여 교정된 국가표준품을 확립하도록 권고하고 있다. 식품의약품안전청(이하 식약청)에서는 2001년부터 본격적으로 국가표준품 제조·분양하는 사업을 시작하였다 (Korea Food and Drug Administration, 2009).

2012년 현재 우리나라는 생물의약품 국가표준품 36종을 지정하여 민간에 분양하고 있다 (2012 생물의

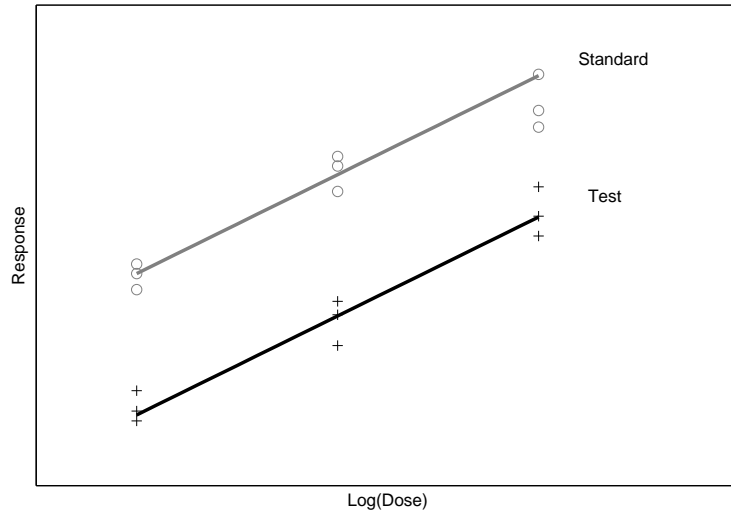


Figure 2.1. The parallel-line model for a 3 + 3 assay

약품 국가표준품 목록, 식품의약품안전청). 실시간 안정성을 평가하기 위하여 일정 기간마다 국제표준품 대비 국가표준품의 역가를 산정하고 있으며 B형간염바이러스표면항원, 혈액응고 8인자 등의 역가를 산정하는데 평행선 모형을 사용하고 있다 (Lee, 2011).

본 연구를 통하여 한 종류의 국가표준품의 국제표준품 대비 상대역가를 산정하기 위한 회석 시험 자료를 평행선 모형으로 분석한 경험을 공유하고자 한다. 그 자료는 유럽약전 (European Pharmacopoeia, 2007)에 규정된 생물학적 시험의 실험계획과 통계적 분석에 대한 지침에 따라 SAS 9.1의 GLM procedure (SAS Institute Inc., SAS/STAT, User's guide, Cary, NC)를 이용하여 회석 시험 자료를 분석하였다. 2장에서는 유럽약전의 평행선 모형과 통계학적 원리를 소개하고 3장에서는 실제 회석 시험 자료의 분석을 통하여 상대역가를 추정치와 신뢰구간을 구하는 과정을 단계적으로 설명하고, 다른 연구자들이 평행선 모형을 적용하여 상대역가를 추정할 수 있도록 SAS 프로그램을 제시할 것이다.

## 2. 회석 시험에서 평행선 모형

회석 시험의 결과 자료는 Figure 2.1과 같이 나타난다. 가로축( $x$ 축)은 로그변환한 용량값을 나타내며 오른쪽으로 갈수록 농도(concentration)가 높아진다. 세로축( $y$ 축)은 반응값을 나타낸다. 이러한 회석 시험 자료가 (1) 로그 변환한 용량값과 반응값 사이의 관계는 시험 용량의 범위에서 직선으로 나타나고 (2) 시험에서 시제품의 직선과 표준품의 직선은 서로 평행하다는 기본적인 조건을 충족한다면 평행선 모형을 적용할 수 있다.

European Pharmacopoeia (2007)에서 시험의 정밀도가 높고 분산분석을 위한 계산이 쉽도록 (1) 시험에서 표준품(S)과 시제품(T)의 회석 수준의 수( $d$ )는 동일하고, (2) 인접한 로그변환한 용량값들은 등간격이고, (3) 각 제품(Preparation), 각 용량마다 처리의 반복수( $n$ )가 같은 실험계획이 사용되었을 경우 상대역가를 구하고 타당성 검정을 하는 방법을 다음과 제시하고 있다.

우선 자료분석을 위하여 표준품과 시제품의 각 회석 수준에 대한 반응값의 평균과, 로그변환한 용량값과 반응값들의 선형관계를 나타내는 기울기에 대한 선형 대비(linear contrast)를 Table 2.1과 같이 구한다.

**Table 2.1.** Formulae for parallel-line assays with  $d$  doses of each preparation

	Standard (S)	Test sample (T)
Mean response (lowest dose)	$S_1$	$T_1$
Mean response (2nd dose)	$S_2$	$T_2$
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
Mean response (highest dose)	$S_d$	$T_d$
Total preparation	$P_S = S_1 + S_2 + \cdots + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + \cdots + T_d$
Linear contrast	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + \cdots + dS_d - \frac{1}{2}(d+1)P_S$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + \cdots + dT_d - \frac{1}{2}(d+1)P_T$

**Table 2.2.** Additional formulae for the construction of the analysis of variance

$H_P = \frac{n}{d}$	$H_L = \frac{12n}{d^3 - d}$	$K = \frac{n(P_S + P_T)^2}{2d}$
---------------------	-----------------------------	---------------------------------

**Table 2.3.** Formulae to calculate the sum of squares and degrees of freedom in the ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares
Preparations	1	$SS_{prep} = H_P(P_S^2 + P_T^2) - K$
Linear regression	1	$SS_{reg} = \frac{1}{2}H_L(L_S + L_T)^2$
Non-parallelism	1	$SS_{par} = H_L(L_S^2 + L_T^2) - SS_{reg}$
Non-linearity	$2(d-2)$	$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par}$
Treatments	$2d-1$	$SS_{treat} = n(S_1^2 + \cdots + S_d^2 + T_1^2 + \cdots + T_d^2) - K$
Residual error	$2d(n-1)$	$SS_{resid} = SS_{tot} - SS_{treat}$
Total	$2nd-1$	$SS_{tot} = \sum(y - \bar{y})^2$

그리고, 분산분석표를 구하는데 필요한 추가적인 값들을 Table 2.2와 같이 구한다. 반응값의 총변동은 각 요인에 의한 제곱합(sum of squares)와 잔차(residual error)의 제곱합으로 나누어지고 Table 2.3과 같이 분산분석표를 구성하기 위한 제곱합들을 계산할 수 있다. 이 Table에서  $\bar{y}$ 는 회석 시험에서 측정된 모든 반응값의 평균이다. 여기에서 3개 이상의 회석 수준이 있는( $d \geq 3$ ) 실험계획에서만  $SS_{reg}$ 가 계산된다.

Table 2.1, 2.2, 2.3은 분산분석표를 컴퓨터 프로그램을 이용하여 구현하기 쉽도록 만들어진 것이다. Table 2.3에서 Residual error는 Total 제곱합에서 Preparations, Linear regression, Non-parallelism, Non-linearity의 제곱합들을 합한 값인 Treatments의 제곱합을 빼면 계산된다는 것을 알 수 있다.

분산분석표는 각 제곱합을 대응하는 자유도로 나누어 평균 제곱(mean square)을 구한 다음, 그것의 잔차의 평균 제곱( $s^2$ )에 대한 비율, 즉  $F$ 값( $F$ -ratio)을 구한다. 여기에서 잔차의 평균 제곱은 잔차 제곱합(residual sum of squares)을 잔차의 자유도로 나눈 값이고,  $F$ 값의 유의성은  $F$ 분포표나 컴퓨터 프로그램을 이용하여 구한다.

분산분석의 결과가 다음의 조건들을 만족한다면 시험 결과가 통계적으로 타당하다(statistically valid)고 판단한다. 타당성의 판별 기준( $p$ -value)으로 0.05 또는 0.01을 사용한다.

- 1) 선형회귀(linear regression)에 관한 변동이 유의하다. 즉  $p$ -value가 0.05 (또는 0.01)보다 작다.
- 2) 비평행성(non-parallelism)에 관한 변동이 유의하지 않다. 즉  $p$ -value가 0.05 (또는 0.01)보다 크다.
- 3) 비선형(non-linearity)에 관한 변동이 유의하지 않다. 즉  $p$ -value가 0.05 (또는 0.01)보다 크다.

회석 시험 자료의 분산분석 결과가 통계적 타당성을 충족할 때 다음과 같은 방법으로 상대역가와 신뢰구간을 구할 수 있다.  $d$ 개의 회석 수준을 사용한 시험에서  $I$ 가 인접한 로그 변환한 회석 수준 사이의 차이 이라면 표준품과 시제품의 공통의 기울기( $b$ )는 다음과 같다.

$$b = \frac{H_L(L_S + L_T)}{2In}$$

그리고, 시제품의 표준품에 대한 상대역가에 로그를 취한 값은

$$M'_T = \frac{P_T - P_S}{db}$$

이다. 이렇게 구한 역가는 평행선 모형을 이용한 참여가의 추정치이고, 그것의 신뢰구간은 Fieller의 정리 (1944)에 따르면  $C = SS_{reg}/(SS_{reg} - s^2t^2)$ 이고  $V = SS_{reg}/(b^2dn)$ 일 때 다음 식에 역로그(antilog)를 취하여 구할 수 있다.

$$CM'_T \pm \sqrt{(C - 1)(CM'^2_T + 2V)},$$

여기에서  $t$ 는 Table 2.3에서 계산된 잔차의 자유도를 갖는  $t$ 분포에서 신뢰구간의  $p$ -value에 해당하는 분위수이다.

### 3. 적용 사례

본 논문에서 사용한 회석 시험 자료는 우리나라에서 지정하여 민간에 분양하고 있는 생물의약품 국가표준품 36종 중 하나의 국제표준품 대비 상대역가를 산정하기 위하여, 하루에 처리당 반복수가 3회인 실험을 3일간 실시한 자료이다. Figure 3.1을 보면 회석 시험의 전체 시험 용량의 범위에서 용량반응 곡선은 sigmoid 곡선의 형태임을 알 수 있다. 그리고, 가운데의 일부 범위에서의 국가표준품(Test)과 국제표준품(Standard)의 용량반응 관계는 평행한 직선으로 나타남을 알 수 있다.

이 회석 시험 자료를 SAS를 이용하여 앞 장에 설명된 평행선 모형의 통계적 분석을 할 수 있었다. 평행선 모형의 통계적 유의성 분석은 다음의 SAS의 GLM procedure로 할 수 있었다.

```
proc glm ;
class preparation DoseLevel ;
model Response = Preparation LogDose Preparation*LogDose Preparation*DoseLevel/SS1 ;
run ;
```

여기에서 변수 Preparation은 국가표준품은 'Test'로 국제표준품은 'Standard'로 갖는 변수이고, 숫자형 변수인 LogDose는 analysis of covariance model의 공변량(covariate)로 사용되었고, DoseLevel은 LogDose와 같은 값을 갖고 회석 수준을 구분하는 범주형 자료로 사용되었다. Table 2.3을 보면 Non-linearity의 제곱합은 전체 treatments의 제곱합에서 Preparations, Linear regression, Non-parallelism의 제곱합들을 빼서 구할 수 있음을 알 수 있다. 따라서, 분산분석을 하기 위한 각 요인에 대한 제곱합을 구할 때 SS1(type I sum of squares)를 선택하여 모형(model)에서 앞에 나온 요인에 대한 제곱합을 제외한 제곱합과 자유도를 계산하였다.

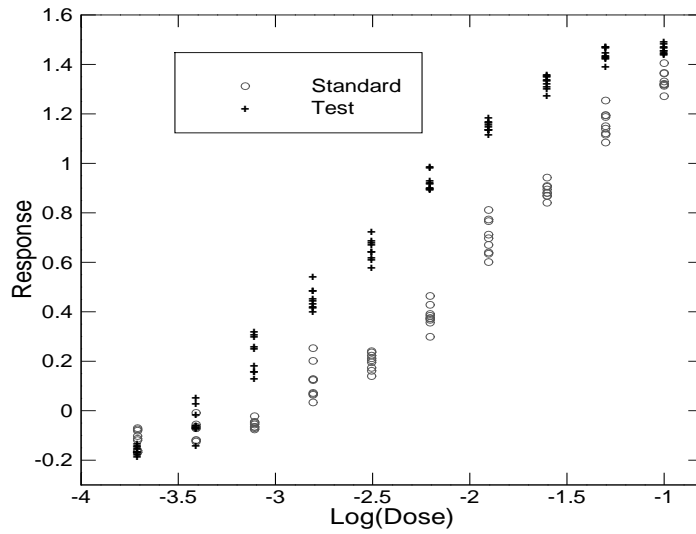


Figure 3.1. Dose-response curves of national standard(Test) and international standard(Standard)

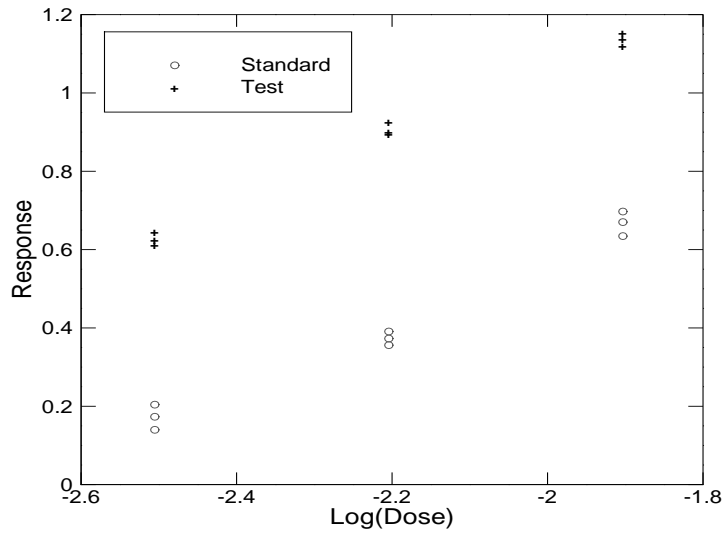


Figure 3.2. Dose-response curves in a range of doses where the curves are linear

SAS GLM procedure의 결과로 나타나는 분산분석표에서 요인 LogDose, LogDose\*Preparation, Preparation\*DoseLevel의 제곱항은 각각 Table 2.3의 Linear regression, Non-parallelism, Non-linearity의 제곱항을 나타낸다. Figure 3.1에 나타난 희석 시험의 전체 용량 범위에서 평행선 모형을 적용할 일부 용량 범위를 결정할 때, Linear regression에 대한  $p$ -value는 가장 작으면서 Non-parallelism, Non-linearity에 대한  $p$ -value는 가장 커지도록 하였다.

실험이 시행된 날짜에 따른 상대역가 추정치의 변동이 있으므로 3일에 해당하는 3개의 상대역가 추정치

를 앞에서 결정한 일부 용량 범위의 희석 시험 자료로 구하였다. 실험이 실시된 3일 중 하루의 자료에서 일부 용량 범위에서의 국가표준품과 국제표준품의 용량반응 관계는 Figure 3.2에 나타난 것과 같이 평행한 직선관계로 나타났다. 그리고, 모형의 타당성도 아래와 같이 유의 수준 0.01을 기준으로 만족하였다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	Pr > F
Preparation	1	1.06586753	1.06586753	2029.04	< .0001
LogDose	1	0.75735899	0.75735899	1441.75	< .0001
LogDose*Preparation	1	0.00016986	0.00016986	0.32	0.5801
Preparatio*DoseLevel	2	0.00564780	0.00282390	5.38	0.0215
Model	5	1.82904418	0.36580884	696.37	< .0001
Error	12	0.00630368	0.00052531		
Total	17	1.83534786			

Figure 3.2의 자료에서 Response를 설명하는 요인으로 Preparation과 LogDose를 갖는 SAS GLM procedure를 사용하여 두 평행한 직선의 공통 접선  $b$ 와 두 직선의  $y$ 절편,  $\alpha_T$ 와  $\alpha_S$ 를 구하였고, 국가표준품의 국제표준품에 대한 상대역가에 로그를 취한 값  $M_T$ 은  $(\alpha_T - \alpha_S)/b$ 로 구하였다. Figure 3.2에 나타난 자료에서 앞 절의 식과 분산분석표의 제곱합을 이용하여 계산한 상대 역가는 3.830였고 신뢰구간은 (3.477 4.256)였다. 희석 시험 자료와 모형 타당성 검증과 상대 역가를 계산하는 SAS 프로그램은 저자의 홈페이지(<http://cafe.daum.net/go.analysis>)에서 내려받을 수 있다.

#### 4. 결론 및 토의

본 논문에서는 시제품의 표준품에 대한 상대역가를 추정할 때 사용되는 평행선 모형의 통계학적 원리를 실제 희석 시험 자료의 분석 과정을 통하여 설명하였다. 연구자들이 희석 시험에서 평행선 모형을 이용하여 시험품의 표준품에 대한 상대역가와 신뢰 구간을 추정할 때 저자의 홈페이지에 있는 ParallelLine-Assay라는 SAS 프로그램을 사용하여 희석 시험 자료를 분석을 할 수 있다.

희석 시험의 전체 용량 범위에서 평행선 모형을 적용할 일부 용량 범위를 결정할 때, Linear regression에 대한  $p$ -value는 가장 작으면서 Non-parallelism, Non-linearity에 대한  $p$ -value는 가장 커지도록 하는 일부 용량 범위를 찾았다. 이것은 평행선 모형을 가장 잘 만족하는 일부 용량 범위에서 구한 상대역가가 주어진 자료로 가장 정확하게 추정할 수 있는 상대역가이기 때문이다. 적용 사례에 사용된 희석 시험자료의 분석에서 평행선 모형의 세가지 조건을 만족하는 관계가 선형인 일부 용량 구간을 구할 수 없는 경우도 있었다. 이것은 Figure 3.1에서처럼 표준품과 시험품의 용량반응 곡선이 서로 많이 떨어져 있기 때문이었다. 많은 경우 시험품의 표시역가가 미리 알려져 있고 정확한 상대역가의 추정을 위하여 희석시험을 한다. 이럴 경우, 실험 계획을 할 때 표준품과 시제품의 두 용량반응 곡선이 최대한 가깝게 놓이도록 희석의 배율을 결정하는 것이 좋다.

#### References

- Korea Food and Drug Administration (2009). *2009 Korean National Biological Reference Standards Annual Report*, Osong.
- Lee, T. (2011). *2011 Stability Analysis of Potency for Korean National Biological Reference Materials*, Osong.
- European Directorate for the Quality of Medicines (2007). *European Pharmacopoeia, 6th Edition*, Strasbourg.

- Fieller, E. C. (1944). A fundamental formula in statistics of biological assay, and some applications, *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **17**, 117–123.
- Finney, D. J. (1978). *Statistical Methods in Biological Assays. 3rd Edition*, Charles Griffin, London.
- Vølund, A. (1978). Application of the four-parameter logistic model to bioassay: Comparison with slope-ratio and parallel-line models, *Biometrics*, **34**, 357–365.