

Some Statistical Considerations on $2 \times k$ Crossover Designs for Bioequivalence Trial

So-young Noh^a · Sang-Gue Park^{a,1}

^aDepartment of Applied Statistics, Chung-Ang University

(Received June 5, 2013; Revised June 17, 2013; Accepted June 17, 2013)

Abstract

The Korea Food and Drug Administration(KFDA) recommends the use of a 2×2 crossover design to assess the bioequivalence of generic drugs. However, a standard 2×2 crossover design for bioequivalence trials is often considered problematic due to ethical and economic issues as highly variable drugs are usually required by large numbers of subjects when designing the trial. To overcome this problem a 2×4 crossover design has been a recommended option as per US regulations; in addition, a 2×3 crossover design has also recently drawn special attention as an efficient alternative. The current KFDA regulation requires an ANOVA table for every bioequivalence study; however, ANOVA tables of 2×4 and 2×3 crossover designs have never been published in the literature. This study shows the derivation of tables of analysis of variance for a 2×4 cross-over design and a 2×3 cross-over design. We also suggest a sample size formulas for 2×2 , 2×4 and 2×3 crossover designs to provide information on the selection of efficient designs for highly variable drugs.

Keywords: Bioequivalence, Highly variable drugs, 2×2 cross-over design, 2×4 cross-over design, 2×3 cross-over design, sample size.

1. 서론

최근 20여 년간 의약품시장에서는 의료 및 건강관련 비용이 크게 증가되면서 특허를 가지고 있는 오리지널(original) 의약품과 약효가 동등한 제네릭(generic) 의약품을 개발하려는 노력이 커지고 있다. 특히 세계적으로 가장 큰 시장규모를 가지고 있는 미국의 경우 2008년 전체 처방의 62.7%가 제네릭 의약품이다 (IMS Health, 2011).

제네릭 의약품이란 기존 시장에 존재하는 오리지널 의약품의 특허가 만료된 후, 용량, 복용방법, 안전성, 용도, 품질 등을 똑같이 만들어 낸 복제의약품을 말한다. 제네릭 의약품이 시장에 진입하기 위해서는 오리지널 제제와 약효가 동등하다는 생물학적 동등성(이하 ‘생동성’이라 한다)시험을 통과해야만 한다.

미국의 경우, USFDA에서 1977년부터 생동성에 대한 기준을 마련하여 오리지널 의약품과 제네릭 의약품의 효능이 동등함을 입증하도록 하였다 (Chow와 Liu, 2008). 우리나라에서도 1988년 10월 국립보건안전연구원 고시 제1988-1호에서 생동성 기준이 처음 제정된 이래로 현재 식품의약품안전청(이하 KFDA) 고시 제2012-103호에 따라 생동성 시험을 시행하고 있다.

This research was supported by the Chung-Ang University Graduate Student Scholarship Grants in 2011.

¹Corresponding author: Professor, Department of Applied Statistics, Chung-Ang University, 221 Heukseok-Dong, Dongjak-Gu, Seoul 156-756, Korea. E-mail: spark@cau.ac.kr

제약회사에서 개발하려고 하는 제네릭 의약품이 생동성 시험을 통해 인정받기 위해서는 2×2 교차시험을 통한 오리지널 의약품과 제네릭 의약품의 생체이용률 지표의 비가 (80%, 125%) 사이에 존재함을 통계적으로 입증하여야 한다. 여기서 생체이용률(bioavailability)이라는 것은 의약품의 효능을 나타내는 척도의 하나로 ‘주성분 또는 그 활성대사체가 제제로부터 전신순환혈로 흡수되는 속도와 양의 비율’로 정의되어진다. 시험을 통해 얻어진 두 제제의 생체이용률 지표 중 AUC_t (혈중농도-시간곡선 하 면적, Area Under Concentration-time curve)와 C_{max} (최고혈중농도, the peak concentration)의 로그 변환값의 차이에 대한 90% 신뢰구간이 ($\log(0.8), \log(1.25)$)안에 포함되면 두 제제는 생물학적으로 동등한 것으로 판단된다.

현행 KFDA에서 채택하고 있는 생동성 평가방법은 두 제제의 평균에 기초하고 있다. 통계적으로 두 제제의 동등성을 입증하기 위해 피험자 크기를 크게 하면 표준오차가 작아지기 때문에 채택 가능성이 높아진다. 그러나 피험자의 크기가 너무 크면 다수의 사람을 약물에 노출시키는 윤리적 문제 및 시간과 비용이 많이 소요되는 경제적 문제를 가진다. 특히 변동성이 큰 제제의 경우 실제로 안정성과 약효가 문제가 되는 경우가 크게 없다는 것이 알려져 있음에도 불구하고 (Benet, 2006), 많은 피험자를 통해 생동성 시험이 진행되는 것은 문제가 있다고 인식되어 왔다. 고변동성 제제(Highly Variable Drugs; HVD)란 피험자 내 변동(within-subject variability)이 큰 제제를 뜻하고, 통계적으로는 제제의 생체이용률 지표의 변동계수(Coefficient of Variation; CV)가 30% 이상인 경우를 의미한다. 많은 피험자를 통해 생동성 시험이 진행되는 것이 문제가 있다고 해서 고변동성 제제를 소수의 피험자로 생동성 시험을 할 경우 두 제제의 생동성을 입증하기 어렵기 때문에 최근 대부분 국가의 FDA에서는 고변동성 제제를 위한 생동성 평가에 다양한 기준 및 고차 교차설계법을 고려하고 있다 (Endrenyi와 Tothfalusi, 2009; Baek 등, 2009; Jeong과 Park, 2011).

본 연구에서는 고변동성 제제의 생동성 시험에 활용될 수 있는 고차 교차설계법의 통계적 고려사항에 대해 논의하고자 한다. 2×4 혹은 2×3 교차설계법이 이미 알려져 있긴 하지만 생동성 모형과 연계되어 있는 분산분석표 유도는 아직 문헌에 존재하지 않는다. 생동성 시험의 분산분석표는 제제변동 및 CV의 추정치를 제공하는 것뿐만 아니라 생동성 모형의 각종 효과를 추론할 수 있는 정보를 제공할 수 있기 때문에 생동성 평가의 기초자료 역할을 한다. 특히 KFDA에서는 의약품 동등성 규정에서 생동성 시험의 분산분석표를 반드시 요구하고 있어 본 연구는 앞으로 활발해질 고변동성 제제의 생동성 시험에 참고문헌으로 활용될 수 있는 의의가 있다고 생각한다. 또한 2×4 교차설계법이 2×2 교차설계법을 두 번 반복한 형태라 사용상에 편의가 있지만 한 피험자가 4기간 동안 지나치게 많은 채혈 등에 노출되어 있어 윤리적인 문제가 발생할 수 있어 최근 들어 2×3 교차설계법의 관심이 증가하고 있다. 2×4 혹은 2×3 교차설계법이 2×2 교차설계법 보다는 피험자에게 반복 측정되고 있어 윤리적으로 더 큰 문제를 발생시킬 수 있다는 우려에 있어 KFDA를 비롯한 대부분 국가의 보건당국에서는 약물의 성격에 따라 시험대상의 선정 및 보호 규정, 시험방법 및 운영 규정을 두어 적절한 시험 방법을 사용할 수 있도록 규정하고 있다(KDFA No.2012-103). 본 연구에서는 2×4 및 2×3 교차설계법과 2×2 교차설계법의 피험자 크기를 비교하여 생동성 연구자가 적절한 설계를 선택할 수 있도록 피험자 크기 공식을 제시한다.

2. 2×2 교차설계법(2×2 crossover design)을 이용한 생동성 평가

KFDA의 의약품 동등성 시험기준 제14조에서 생동성 시험은 원칙적으로 2×2 교차설계법에 의하여 수행하도록 되어 있고, 교차시험을 수행할 시에 제15조 제2항 제4호에 따라 충분한 휴약기간을 두도록 명시하고 있다. 따라서 본 논문에서는 충분한 휴약기간을 거쳐 잔류효과(carryover effect)가 존재하지 않는다는 가정 하에 통계적 모형을 설정한다. 또한 의약품동등성시험기준 제17조에서는 제제간 생동성 평가에 90% 신뢰구간을 사용하고, 시험을 설계할 때는 순서 군당 최소 12명 이상으로 해야 하며, 분산분

Table 2.1. Analysis of variance table for 2×2 crossover design

요인	자유도	제곱합	평균 제곱합의 기대값
시험자간 변동			
순서효과	1	SS_{Seq}	$\sigma_e^2 + 2\sigma_s^2 + \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} (G_1 - G_2)^2$
시험자간 잔차	$n_1 + n_2 - 2$	SS_{Inter}	$\sigma_e^2 + 2\sigma_s^2$
시험자내 변동			
제제효과	1	SS_{Drug}	$\sigma_e^2 + \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} (F_T - F_R)^2$
기간효과	1	SS_{Period}	$\sigma_e^2 + \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} (P_1 - P_2)^2$
시험자내 잔차	$n_1 + n_2 - 2$	SS_{Intra}	σ_e^2
총변동	$2(n_1 + n_2) - 1$		

석표를 제시하여야 한다는 등 제제간의 생동성 평가 방법을 명시하고 있다. 이 규정의 통계적인 관심은 분산분석표 유도 및 신뢰구간 추정 문제와 2×2 교차설계를 고려할 때 시험자 크기 결정 등이다. 이미 생동성 시험을 통해 제제간의 신뢰구간 추정 등은 충분한 통계적 논의가 이루어져있어, 본 연구와 크게 관련 있는 분산분석표 유도와 시험자 크기 계산을 고려한다.

2×2 교차설계법을 기반으로 한 생동성 시험의 통계적 모형은 (2.1)과 같다.

$$Y_{ijk} = \mu + G_k + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + \epsilon_{ijk}, \tag{2.1}$$

$$S_{ik} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma_s^2), \quad \epsilon_{ijk} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma_e^2), \quad i = 1, 2, \dots, n_k, \quad j, k = 1, 2.$$

모형에서 $i = 1, 2, \dots, n_k$ 이며, 여기서 n_k 는 k 번째 순서에 약물을 투여 받는 피험자의 수이고, 기간은 $j = 1, 2$, 순서는 $k = 1, 2$ 이다. Y_{ijk} 는 i 번째 피험자가 j 번째 기간, k 번째 순서의 jk 번째 제제를 투여 받았을 때의 AUC_t 또는 C_{max} 등의 로그변환 된 생체이용률의 값을 의미한다. μ 는 전체 생체이용률 값에 대한 평균을 나타내고, G_1, G_2 는 순서효과, P_1, P_2 는 기간효과, F_R, F_T 는 제제효과를 나타내는 모수들이며, 이것은 다음과 같은 조건 (2.2)를 만족한다.

$$\sum_{k=1}^2 G_k = 0, \quad \sum_{j=1}^2 P_j = 0, \quad \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^2 F_{(j,k)} = 0, \quad F_{(j,k)} = \begin{cases} F_{R(j,k)} = (1, 1), (2, 2), \\ F_{T(j,k)} = (1, 2), (2, 1). \end{cases} \tag{2.2}$$

또한 S_{ik} 는 k 번째 순서집단에 속한 i 번째 피험자에게 관측되는 피험자의 변동성을 의미하는 확률변수이며, ϵ_{ijk} 는 k 번째 순서, j 번째 기간, i 번째 피험자에게서 관측되는 제제의 변동성을 의미하는 확률변수이다. 여기서 S_{ik} 와 ϵ_{ijk} 는 통계적으로 독립임을 가정한다. σ_s^2 은 S_{ik} 의 분산으로 피험자에 기인한 변동을 의미하고, σ_e^2 은 ϵ_{ijk} 의 분산으로 제제에 기인한 변동을 의미한다.

생동성 모형 (2.1)에 대응되는 분산분석표는 Table 2.1과 같다. 분산분석표 유도와 관련된 보다 자세한 내용은 Chow와 Liu (2008)를 참고하기 바란다. 평균 제곱합은 제곱합을 자유도로 나누어 얻어진 값이며, 평균 제곱합의 기댓값은 제곱합이 지니는 통계적 의미와 F -검정의 의미를 파악할 수 있는 정보를 제공한다. 분산분석표에서 제공되는 시험자내 잔차 σ_e^2 는 제제의 변동성을 의미하는 CV와 $\sigma_e^2 = \log(1 + CV^2) \approx CV^2$ 의 관계가 있으며 (Jeong과 Park, 2011), KFDA에서는 모든 생동성 시험에서 CV를 보고하도록 하고 있다.

우리나라 및 미국을 비롯한 대부분의 국가에서 일반적으로 제제간의 생동성을 평가하는데 90% 신뢰구간을 이용하고 있다. 즉, 시험제제와 대조제제의 차이 $F_T - F_R$ 에 대한 90% 신뢰구간이 생동성 기준인 $(\log(0.8), \log(1.25))$ 에 포함되면 시험제제는 대조제제와 동등한 것으로 인정된다.

Table 3.1. Experiment structure of 2×4 crossover design

		기간						
		1	휴약	2	휴약	3	휴약	4
순서	1	R	-	T	-	R	-	T
		Y_{i11}	-	Y_{i21}	-	Y_{i31}	-	Y_{i41}
	2	T	-	R	-	T	-	R
		Y_{i12}	-	Y_{i22}	-	Y_{i32}	-	Y_{i42}

제제간의 생동성 시험을 설계할 때 각 군당 피험자 수를 정하는 것은 매우 중요하다. KFDA의 의약품 동등성 시험기준 제13조에서도 “시험예수는 적절한 통계처리가 가능한 예수로서 주성분의 특성에 따라 적절히 가감하며, 최소 군당 12명 이상을 원칙으로 한다”라고 명시 되어있다. 2×2 교차설계법의 통계적 모형 식 (2.1)에 기반한 유의수준 α 에서 검정력 $1 - \beta$ 를 확보할 수 있는 피험자의 크기는 신뢰구간 방법과 동등한 것으로 알려진 Schuirmann (1987)이 제안한 TOST(Two One-Sided Test)의 검정력 함수를 이용하여 계산될 수 있으며 식 (2.3)과 같다. 식의 유도과 관련한 자세한 내용은 Park (2007)을 참고한다.

$$n \geq \{t(\alpha, 2n - 2) + t(\beta, 2n - 2)\}^2 \left(\frac{\sigma_e}{\log 1.25 - |F_T - F_R|} \right)^2. \quad (2.3)$$

위 식을 이용해 주어진 검정력을 만족하는 최소의 n 을 찾게 된다. 일반적으로 2×2 교차설계법을 이용하여 생동성 시험을 설계할 때 $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.05$ 를 많이 활용하고, $F_T - F_R$ 과 σ_e^2 는 임상 혹은 예비실험에서 얻은 값을 사용한다.

3. 2×k 설계법을 이용한 생동성 평가

3.1. 2×4 교차설계법의 통계적 모형

생동성 시험을 비롯한 많은 임상시험에서 교차 교차설계법은 많이 활용되어 왔지만 (Jones과 Kenward, 2003), 분산분석표는 아직 문헌상에 제시되고 있지 않다. 특히 KFDA는 생동성 시험 관리 규정에서 분산분석표를 요구하고 있기 때문에 이와 관련된 내용은 매우 필요한 실정이다.

2×4 교차설계법은 2×2 교차설계법을 두 번 반복한 형태로 실험 구조는 Table 3.1과 같으며 통계적 모형은 (2.1)에 기반하며 기간이 $j = 1, \dots, 4$ 가 된다. 식에 대한 조건은 (3.1)와 같다.

$$\sum_{k=1}^2 G_k = 0, \quad \sum_{j=1}^4 P_j = 0, \quad \sum_{j=1}^4 \sum_{k=1}^2 F_{(j,k)} = 0, \quad F_{(j,k)} = \begin{cases} F_{R(j,k)} = (1, 1), (3, 1), (2, 2), (4, 2), \\ F_{T(j,k)} = (2, 1), (4, 1), (1, 2), (3, 2). \end{cases} \quad (3.1)$$

2×4 교차설계법을 기반으로 한 생동성 모형에 대한 분산분석표는 다음의 식 (3.2)의 분해를 통해 얻어질 수 있다.

$$\begin{aligned} SS_{Total} &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{...})^2 = \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{i.k} + \bar{Y}_{i.k} - \bar{Y}_{...})^2 \\ &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{i.k})^2 + 4 \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (\bar{Y}_{i.k} - \bar{Y}_{...})^2 \\ &= SS_{within} + SS_{between}. \end{aligned} \quad (3.2)$$

Table 3.2. Contrasts sum of square and coefficient of $\overline{Y_{.jk}}$ for 2×4 crossover design

순서	SS_{P_1}				SS_{P_2}				SS_{P_3}				SS_D			
	기간				기간				기간				기간			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1	-1	0	0	-1	-1	2	0	1	1	1	-3	1	-1	1	-1
2	1	-1	0	0	-1	-1	2	0	1	1	1	-3	-1	1	-1	1

피험자 간 변동 $SS_{between}$ 은 순서집단에 의한 변동(sequence effect variability) SS_{seq} 와 피험자 간 잔차(inter-subject residual) SS_{inter} 로 분해되며 식 (3.3)과 같다.

$$\begin{aligned}
 SS_{between} &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (\overline{Y_{i.k}} - \overline{Y_{...}})^2 \\
 &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (\overline{Y_{.k}} - \overline{Y_{...}})^2 + \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (\overline{Y_{i.k}} - \overline{Y_{.k}})^2 \\
 &= SS_{seq} + SS_{inter}.
 \end{aligned}
 \tag{3.3}$$

피험자 내 변동 SS_{within} 은 기간효과에 의한 변동(period effect variability) SS_{period} , 제제효과에 의한 변동(drug effect variability) SS_{drug} , 제제에 따른 피험자 내 잔차(intra-subject residual) SS_{intra} 로 분해되며 식 (3.4)와 같다.

$$\begin{aligned}
 SS_{within} &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \overline{Y_{i.k}})^2 \\
 &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (\overline{Y_{.j}} - \overline{Y_{...}})^2 + \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \overline{Y_{.j}} - \overline{Y_{i.k}} + \overline{Y_{...}})^2 \\
 &= SS_{period} + (SS_{drug} + SS_{intra}).
 \end{aligned}
 \tag{3.4}$$

SS_{period} 와 SS_{drug} 는 Table 3.2에 제시된 직교대비(orthogonal contrast)를 이용해서 얻어질 수 있다.

$$\begin{aligned}
 SS_{period} &= \frac{n_1 n_2}{16(n_1 + n_2)} \left[(\overline{Y_{11}} + \overline{Y_{21}} - \overline{Y_{31}} - \overline{Y_{41}} + \overline{Y_{12}} + \overline{Y_{22}} - \overline{Y_{32}} - \overline{Y_{42}})^2 \right. \\
 &\quad + (-\overline{Y_{11}} + \overline{Y_{21}} + \overline{Y_{31}} - \overline{Y_{41}} - \overline{Y_{12}} + \overline{Y_{22}} + \overline{Y_{32}} - \overline{Y_{42}})^2 \\
 &\quad \left. + (\overline{Y_{11}} - \overline{Y_{21}} + \overline{Y_{31}} - \overline{Y_{41}} + \overline{Y_{12}} - \overline{Y_{22}} + \overline{Y_{32}} - \overline{Y_{42}})^2 \right], \\
 SS_{drug} &= \frac{n_1 n_2}{4(n_1 + n_2)} \left[(\overline{Y_{.11}} - \overline{Y_{.21}} + \overline{Y_{.31}} - \overline{Y_{.42}}) + (-\overline{Y_{.12}} + \overline{Y_{.22}} - \overline{Y_{.32}} + \overline{Y_{.42}}) \right]^2.
 \end{aligned}$$

또한 제제에 따른 피험자 내 잔차는 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$\begin{aligned}
 SS_{intra} &= SS_{within} - SS_{period} - SS_{drug} \\
 &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}^2 - 4 \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} \overline{Y_{i.k}}^2 - \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^4 n_k \overline{Y_{.jk}}^2 + \sum_{k=1}^2 4n_k \overline{Y_{.k}}^2.
 \end{aligned}$$

이를 정리하면 Table 3.3과 같은 분산분석표를 얻을 수 있다.

Table 3.3. Analysis of variance table for 2×4 crossover design

요인	자유도	제곱합	평균 제곱합의 기대값
피험자간 변동 순서효과	1	SS_{Seq}	$3(\sigma_e^2 + 4\sigma_s^2) + \frac{4n_1n_2}{n_1+n_2}(G_1 - G_2)^2$
피험자간 잔차	$n_1 + n_2 - 2$	SS_{Inter}	$\sigma_e^2 + 4\sigma_s^2$
피험자내 변동 제제효과	1	SS_{Drug}	$\sigma_e^2 + \frac{4n_1n_2}{n_1+n_2}(F_R - F_T)^2$
기간효과	3	SS_{Period}	$\sigma_e^2 + \frac{n_1n_2}{12(n_1+n_2)} [(P_1 - P_2)^2 + (P_1 - P_3)^2 + (P_1 - P_4)^2 + (P_2 - P_3)^2 + (P_2 - P_4)^2 + (P_3 - P_4)^2]$
피험자내 잔차	$3(n_1 + n_2) - 4$	SS_{Intra}	σ_e^2
총변동	$4(n_1 + n_2) - 1$		

Table 3.4. Experiment structure of 2×3 crossover design

		기간				
		1	휴약	2	휴약	3
순서	1	R	-	T	-	T
		Y_{i11}	-	Y_{i21}	-	Y_{i31}
	2	T	-	R	-	R
		Y_{i12}	-	Y_{i22}	-	Y_{i32}

생동성 시험에 대한 순서집단 간 피험자 수 n_1, n_2 를 동일하게 n 이라 하고, 2×4 교차설계법에 적용하면 식 (3.5)와 같다. 유도과정은 Park (2007)에 제시된 내용과 유사하게 유도될 수 있다.

$$n \geq [t(\alpha, 6n - 4) + t(\beta, 6n - 4)]^2 \left(\frac{\hat{\sigma}_e}{\sqrt{2n} \times (\log 1.25 - |F_T - F_R|)} \right)^2. \quad (3.5)$$

3.2. 2×3 교차설계법

앞서 설명한 2×4 교차설계법의 경우 결과적으로 생동성을 입증하는데 피험자 수가 줄어든다는 장점이 있지만 한 피험자 당 4기간 동안의 관측값이 필요하게 되므로 시험기간이 길어지고, 시험비용도 증가하는 단점이 있다. 이와 같은 비용 및 피험자 관리 측면의 단점을 보완하기 위하여 US FDA의 2001 FDA 가이드라인에서는 대안으로 2×3 교차설계법을 제안하고 있다.

2×3 교차설계법은 2×2 교차설계법에서 대조약 혹은 시험약을 한번 씩 더 복용하는 실험 구조로 세 번의 기간과 두 번의 순서를 갖는 설계이다. (RTT, TRR) 혹은 (RTR, TRT)의 실험순서의 실험 설계법으로 대조약과 시험약의 복용수가 동일하다. 이 절에서는 (RTT, TRR)의 실험순서에 기반 한 통계적 모형을 살펴본다.

2×3 교차설계법에 대한 실험 구조는 Tabel 3.4와 같다. 이 실험구조에 대한 통계적 모형은 (2.1)과 같으며, $j = 1, \dots, 3$ 이 된다. 식에 대한 조건은 식 (3.6)과 같다.

$$\sum_{k=1}^2 G_k = 0, \quad \sum_{j=1}^3 P_j = 0, \quad \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^2 F_{(j,k)} = 0,$$

$$F_{(j,k)} = \begin{cases} F_{R(j,k)} = (1, 1), (2, 2), (3, 2), \\ F_{T(j,k)} = (2, 1), (3, 1), (1, 2). \end{cases} \quad (3.6)$$

Table 3.5. Contrasts sum of square and coefficient of $\overline{Y}_{.jk}$ for 2 × 3 crossover design

순서	SS_{P_1}			SS_{P_2}			SS_D		
	기간			기간			기간		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	-1	0	-1	-1	2	2	-1	-1
2	1	-1	0	-1	-1	2	-2	1	1

Table 3.6. Analysis of variance table for 2 × 3 crossover design

요인	자유도	제곱합	평균 제곱합의 기대값
시험자간 변동			
순서효과	1	SS_{Seq}	$\sigma_e^2 + 3\sigma_s^2 + \frac{3n_1n_2}{n_1+n_2} (G_1 - G_2)^2$
시험자간 잔차	$n_1 + n_2 - 2$	SS_{Inter}	$\sigma_e^2 + 3\sigma_s^2$
시험자내 변동			
제제효과	1	SS_{Drug}	$\sigma_e^2 + \frac{8n_1n_2}{3(n_1+n_2)} (F_R - F_T)^2$
기간효과	2	SS_{Period}	$\sigma_e^2 + \frac{n_1n_2}{3(n_1+n_2)} [(P_1 - P_2)^2 + (P_1 - P_3)^2 + (P_2 - P_3)^2]$
시험자내 잔차	$2(n_1 + n_2) - 3$	SS_{Intra}	σ_e^2
총변동	$3(n_1 + n_2) - 1$		

2 × 3 교차설계법에 대응되는 분산분석표는 2 × 4 교차설계법과 유사하게 얻어질 수 있다. 다만 기간효과와 제제효과는 다음과 같이 Table 3.5에 제시된 직교대비와 그 나머지로 분해 될 수 있다.

기간효과에 따른 변동과 제제효과에 의한 변동은 다음과 같이 얻어지며, 이를 통해 얻어진 기간효과에 따른 변동, 제제효과에 의한 변동은 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$\begin{aligned}
 SS_{period} &= \frac{n_1n_2}{3(n_1 + n_2)} \left[(\overline{Y}_{11} - \overline{Y}_{21} + \overline{Y}_{12} - \overline{Y}_{22})^2 + (\overline{Y}_{21} - \overline{Y}_{31} + \overline{Y}_{22} - \overline{Y}_{32})^2 \right. \\
 &\quad \left. + (\overline{Y}_{11} - \overline{Y}_{31} + \overline{Y}_{12} - \overline{Y}_{32})^2 \right], \\
 SS_{drug} &= \frac{n_1n_2}{6(n_1 + n_2)} [(2\overline{Y}_{.11} - \overline{Y}_{.21} - \overline{Y}_{.31}) - (2\overline{Y}_{.12} - \overline{Y}_{.22} - \overline{Y}_{.32})]^2, \\
 SS_{intra} &= SS_{within} - SS_{period} - SS_{drug} \\
 &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^3 \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}^2 - \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} 3\overline{Y}_{i.k}^2 - \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^3 n_k \overline{Y}_{.jk}^2 + \sum_{k=1}^2 3n_k \overline{Y}_{.k}^2.
 \end{aligned}$$

이를 정리하면 Table 3.6과 같은 2 × 3 교차설계법에 대한 분산분석표를 얻을 수 있다.

생동성 시험에 대한 순서집단 간 피험자 수 n_1, n_2 를 동일하게 n 이라 하고, 2 × 3 교차설계법에 적용하면 식 (3.7)과 같다. 유도과정은 Park (2007)에 제시된 내용과 유사하게 유도될 수 있다.

$$n \geq [t(\alpha, 4n - 3) + t(\beta, 4n - 3)]^2 \left(\frac{\sqrt{3}\sigma_e}{\sqrt{4n} \times (\log 1.25 - |F_T - F_R|)} \right)^2. \tag{3.7}$$

4. 2 × k 교차설계법에서 피험자 수 계산

제제간의 평균 생동성을 입증하기 위해 생동성 시험에 필요한 표본수를 계산한 결과는 Table 4.1과 같다. 각각의 교차설계법의 유의수준(α)은 0.05이고, 검정력($1 - \beta$)은 0.8과 0.9, 평균의 차이($\theta = F_T -$

Table 4.1. Minimum subject numbers of group for each experiment

σ_e	θ	$1 - \beta = 0.8$			$1 - \beta = 0.9$		
		2×2	2×4	2×3	2×2	2×4	2×3
		교차설계법	교차설계법	교차설계법	교차설계법	교차설계법	교차설계법
10	0	3	2	2	4	2	3
	5	4	2	3	4	2	3
	10	5	3	4	7	4	5
	15	13	7	10	17	9	13
20	0	8	4	6	10	5	8
	5	10	5	7	13	7	10
	10	18	9	13	24	12	18
	15	47	24	36	65	33	49
30	0	17	9	13	21	11	16
	5	20	10	15	27	14	20
	10	38	19	28	52	26	39
	15	106	53	79	145	73	109
40	0	29	15	22	36	18	27
	5	35	18	26	47	24	35
	10	67	33	50	92	46	69
	15	186	93	140	257	129	193
50	0	44	22	33	56	28	42
	5	54	27	41	73	37	55
	10	103	52	77	142	71	107
	15	290	145	218	401	201	301

F_R)는 수준 0에서 20%, 피험자 내 변동 σ_e 의 수준은 10%에서 50%까지로 하여 필요한 피험자의 수를 계산하였다.

Table 4.1을 살펴보면 전체적으로 제제간의 생동성 입증에 필요한 최소한의 피험자 수는 검정력의 크기, 평균의 차이, 피험자 내 변동계수가 클수록 증가하는 경향이 있음을 알 수 있다. 또한 변동(σ_e)이 커질수록 피험자의 수의 증가폭이 2×2 교차설계법에서 2×3 교차설계법, 2×4 교차설계법 순으로 커지는 것을 확인할 수 있다. 특히 변동이 작을 경우 큰 차이가 나지 않지만, 변동이 클 경우 생동성 입증에 위해 필요한 최소한의 피험자수가 2×2 교차설계법에 비해 2×3 교차설계법이나 2×4 교차설계법의 교차원 설계법을 이용할 경우 크게 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 즉, 고변동성 제제의 생동성을 입증하기 위해 2×2 교차설계법 보다 2× k 교차설계법을 이용하는 것이 효율적임을 알 수 있다. 또한 2× k 교차설계법 중에서는 2×4 교차설계법이 최소의 피험자를 요구하고 있기는 하지만 시험기간이 길다는 단점을 함께 가지고 있어 상황에 따라 2×3 교차설계법을 활용하는 것이 윤리적으로 타당할 수 있다는 것을 알 수 있다.

5. 사례

다음은 2×2 교차설계법으로 수행된 생물학적 동등성 시험의 사례이다. 대부분 국가의 생동성 시험 자료가 공개되고 있는 경우가 드물어 군당 12명으로 실험된 2×2 교차설계법에서 제제간의 생동성 평가가 고변동성으로 인해 실패되고, 군을 추가했을 때 제제간의 생동성 평가가 어떻게 달라지는지를 살펴보고자 가상의 예제를 만들었다. 측정된 값은 생체일용량값 중 AUC로 가정한다.

우선 2×2 교차설계법으로 측정된 AUC값을 로그변환하여 생동성 평가를 한 결과 두 제제간의 90% 신

Table 5.1. AUC data of 2×2, 2×3, 2×4 crossover trials

순서	기간(2×2, 2×3, 2×4)				
	1	2	3	4	
1	87.43	158.14	67.04	65.19	
	87.36	51.25	66.27	87.42	
	110.45	131.69	139.99	125.87	
	98.84	145.80	146.13	86.08	
	67.06	126.26	97.95	108.04	
	99.55	93.94	97.55	67.63	
	153.21	87.92	61.05	95.57	
	69.53	104.59	123.88	64.21	
	54.07	167.19	158.53	52.34	
	53.71	92.21	75.42	54.21	
	128.54	157.85	79.88	135.99	
	156.70	53.18	130.64	114.84	
	2	122.12	85.17	59.98	84.87
		85.12	95.75	106.38	77.45
226.44		146.94	126.91	130.09	
71.90		130.83	157.31	97.06	
99.50		234.7	73.48	114.53	
138.26		148.59	86.16	68.44	
211.84		88.14	92.49	121.35	
161.78		127.48	63.03	108.21	
63.24		147.63	94.27	93.68	
108.61		58.25	47.17	58.50	
63.22		104.72	145.82	104.07	
206.58		74.61	205.86	83.94	

Table 5.2. ANOVA Table of 2×2 crossover design

요인	자유도	제곱합	평균제곱합	F통계량	Pr(> F)
피험자간 변동					
순서효과	1	0.2787	0.2787	2.214	0.151
피험자간 잔차	22	2.7694	0.1259		
피험자내 변동					
제제효과	1	0.120	0.1196	0.597	0.448
기간효과	3	0.035	0.0349	0.174	0.680
피험자내 잔차	68	4.410	0.2004		
총변동	95				

퇴구간 (-0.3217, 0.1221)이 생동성 기준인 (-0.2331, 0.2331)을 초과하여 제제간의 생동성이 인정되지 않았다. 2×2 교차설계법으로 수행된 자료의 분산분석표 Table 5.2을 분석하여 보면 피험자내 잔차에서 얻어지는 CV값이 약 44.7% 정도 얻어져 Table 4.1에 의하면 최소 군당 30명 이상으로 수행되는 교차설계법이 적절했음을 알 수 있다.

만약 두 군을 추가하여 2×4 교차설계법으로 수행되었다면 Table 5.3과 같은 분산분석표를 얻을 수 있고, 생동성 평가를 한 결과 두 제제간의 90% 신뢰구간 (-0.1382, 0.0997)이 생동성 기준인 (-0.2331, 0.2331)에 포함되어 제제간의 생동성을 인정할 수 있다. 참고자료로 사용될 수 있는 제제효과 및 순서효

Table 5.3. ANOVA table of 2×4 crossover design

요인	자유도	제곱합	평균제곱합	F통계량	Pr(> F)
시험자간 변동					
순서효과	1	0.220	0.00430	1.279	0.270
시험자간 잔차	22	3.782	0.14213		
시험자내 변동					
제제효과	1	0.009	0.00890	0.069	0.794
기간효과	3	0.629	0.20850	1.612	0.195
시험자내 잔차	68	8.794	0.12932		
총변동	95				

Table 5.4. ANOVA table of 2×3 crossover design

요인	자유도	제곱합	평균제곱합	F통계량	Pr(> F)
시험자간 변동					
순서효과	1	0.016	0.1597	1.108	0.304
시험자간 잔차	22	3.172	0.1442		
시험자내 변동					
제제효과	1	0.016	0.0156	0.092	0.763
기간효과	2	0.172	0.0860	0.510	0.604
시험자내 잔차	45	7.597	0.1688		
총변동	71				

과, 기간효과 등도 통계적으로 유의하지 않아 제제간의 생동성 판단을 지지하고 있다고 볼 수 있다.

만약 피험자들이 제제의 특성으로 인해 반복 측정되면서 발생할 수 있는 윤리적인 측면을 고려하여 한 군만 추가하여 2×3 교차설계법으로 수행되었다면 Table 5.4와 같은 분산분석표를 얻을 수 있고, 생동성 평가를 한 결과 두 제제간의 90% 신뢰구간 (-0.2041, 0.1417)이 생동성 기준인 (-0.2331, 0.2331)에 포함되어 제제간의 생동성을 인정할 수 있다. 역시 참고자료로 사용될 수 있는 제제효과 및 순서효과, 기간효과 등도 통계적으로 유의하지 않아 제제간의 생동성 판단을 지지하고 있다고 볼 수 있다.

6. 결론

KFDA가 최근 고변동성 제제를 위한 생동성 시험에서 2×4 교차설계법을 승인한 바가 있다. 이 과정에서 피험자 크기와 관련한 통계적 추론이 논의되었고, 시험 완료 후 통계자료 분석에서 분산분석표 제시 등이 이슈가 되었다고 한다.

본 연구는 고변동성 제제의 생동성 시험에 2×k 교차설계법에 대한 통계적 모형에 대응되는 분산분석표 유도를 다루었다. 지금까지 고차 교차설계법에서 분산분석표를 유도하는 연구는 문헌에 찾아볼 수 없고, 현행 KFDA 생동성 평가 규정이 분산분석표 제시를 요구하고 있기 때문에 본 연구는 의미가 있다고 생각한다. 또한 2×2 교차설계법으로 이루어지는 생동성 시험에 비해 2×4 혹은 2×3 교차설계법으로 진행되었을 때 필요한 피험자 크기를 비교해볼 수 있어, 고변동성 제제의 생동성 시험에서 보다 적극적으로 2×4 혹은 2×3 교차설계법이 활용될 수 있는 근거를 제공한 의의가 있다고 생각한다.

Dangi 등 (2010)에서 제시된 바와 같이 향후 고변동성 제제의 생동성 시험이 많이 발생할 것으로 예상되는바 생동성 모형에 관한 통계적 가정을 확장하고 이를 뒷받침할 수 있는 2×3 혹은 2×4 교차설계법에 대한 보다 적극적인 연구가 제공될 필요가 있다고 생각한다.

References

- Baek, I., Seong, S. and Kwon, K. (2009). Bioequivalence approaches for highly variable drugs: Issue and solution, *Korean Journal of Clinical Pharmacy*, **19**, 50–60.
- Benet, L. (2006). Why highly variable drugs are safer, *Meeting of FDA Committee for Pharmaceutical Science*, <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/slides/2006-4241s22.ppt> (assessed 3/17/2011).
- Chow, S. C. and Liu, J. (2008). *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*, Third edition, Chapman & Hall.
- Dangi, Y. S., Soni, M. L. and Namdeo, K. P. (2010). Highly variable drugs: Bioequivalence requirements and regulatory perspectives, *Journal of Current Pharmaceutical Research*, **3**, 24–28.
- Endrenyi, L. and Tothfalusi, L. (2009). Regulatory conditions for the determination of bioequivalence of highly variable drugs, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **12**, 138–149.
- Jeong, G. and Park, S. (2011). On Evaluation of Bioequivalence for Highly Variable Drugs, *The Korean Journal of Applied Statistics*, **24**, 1055–1076.
- IMS Health (2011). IMS Health Report. IMS.
- Korea Food & Drug Administration (2012). *Regulations of Bioequivalence Trials*, Publication No.2012-103.
- Jones, B. and Kenward, M. G. (2003). *Design and Analysis of Cross-over Design*, Second Edition, Chapman & Hall.
- Park, S. (2007). On sample size determination of Bioequivalence Trials, *Journal of Korean Data & Information Science Society*, **18**, 365–373.
- Schuirmann, D. J. (1987). A comparison of two one-sided tests procedures and the power approach for assessing the bioequivalence trials, *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **15**, 657–680.

생물학적 동등성 시험을 위한 $2 \times k$ 교차설계법의 통계적 고려

노소영^a · 박상규^{a,1}

^a중앙대학교 응용통계학과

(2013년 6월 5일 접수, 2013년 6월 17일 수정, 2013년 6월 17일 채택)

요약

현재 우리나라 식품의약품안전청에서는 2×2 교차설계법을 기초로 제제간의 생물학적 동등성 평가를 수행하도록 규정하고 있다. 하지만 고변동성 제제의 생물학적 동등성 평가에서 2×2 교차설계법에 의한 시험은 지나치게 많은 피험자를 필요로 할 수 있어 윤리적이고 경제적인 고려가 필요하다는 논의가 이루어지고 있다. 2×2 교차설계법을 대체할 수 있는 대안으로 2×4 교차설계법은 미국 및 유럽 등에서는 생물학적 동등성 평가에 광범위하게 사용되는 설계 방법이고, 2×3 교차설계법도 2×2 와 2×4 교차설계법의 단점을 개선할 수 있는 효율적인 대안으로 관심이 많다. 본 연구에서는 2×4 와 2×3 교차설계법의 통계적 모형과 제시된 통계적 모형에 연계된 분산분석표를 유도한다. 현행 국내 생물학적 동등성 시험 규정에 의하면 2×4 와 2×3 교차설계법의 분산분석표는 반드시 제시되어야 하지만 아직 문헌상에 존재하지 않아 관련 연구에 기여할 것으로 생각된다. 또한 2×4 와 2×3 교차설계법에 기초한 피험자 계산을 2×2 교차설계법과 비교 제시하여 고변동성 제제의 생물학적 동등성 시험 연구에 적절한 시험 설계 선택에 정보를 제공한다.

주요용어: 2×2 교차설계법, 2×3 교차설계법, 2×4 교차설계법, 고변동성 제제, 생물학적 동등성, 시험 설계.

이 논문은 2011년도 중앙대학교 연구장학기금 지원에 의한 것임.

¹교신저자: (156-756) 서울시 동작구 흑석동 221, 중앙대학교 응용통계학과, 교수. E-mail: spark@cau.ac.kr