

## 합성기질 및 응고시간을 이용한 혈액응고 제 8 인자 역가측정법

강혜나<sup>#</sup> · 김순남 · 허숙진\* · 홍성화

식품의약품안전청 생물학평가부, \*경인지방청 식품의약품안전청 시험분석실

(Received June 26, 2001; Revised September 1, 2001)

### Potency Assay of Factor VIII : C Concentrates using the Chromogenic and Clotting Assay

Hye Na Kang<sup>#</sup>, Soon Nam Kim, Sook Jin Hur\* and Seung Hwa Hong  
*Biologics Evaluation Development, Korea Food and Drug Administration 5 Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul, 122-704, Korea*  
*\*Test & Analytical Laboratory, Kyung-in Regional KFDA 7-241 3Ga Shinhung-dong, Chung-gu, Incheon, 400-712, Korea*

**Abstract** — The clotting assay was replaced by the chromogenic substrate assay which is recommended by the European Pharmacopoeia (EP) and the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis based on the reliability, convenience and simplicity of the chromogenic assay. A correlation study was carried out with a one-stage factor VIII : C clotting assay and the performance of the chromogenic assay was evaluated using two test kits that fulfilled the requirements of EP for factor VIII concentrates test. Although chromogenic assay has partly differences in measurement principle and standardization, this assay has a high correlation with clotting assay in various types of factor VIII concentrates and factor VIII standard. We conclude that the chromogenic assay for factor VIII : C concentrates correlates well with the clotting assay and shows good analytical performance.

**Keywords** □ Chromogenic substrate assay, clotting assay, coagulation factor VIII

혈액응고의 기전은 비활성화된 혈액응고 물질이, 대부분 serine protease로서 작용하는 활성화된 다른 혈액응고 인자들에 의해 순차적으로 활성화된 후 최종적으로 fibrin clot을 생성하는 복잡한 과정이다. 이러한 혈액응고 과정에는 여러 가지 응고인자들이 관여하고 있는데 이 중 혈액응고 8인자(FVIII)는 내인계에 위치하며, FVIII : C와 VIII : R로 이루어진 당단백 복합체이다. FVIII : C의 경우 분자량 285,000의 당단백질로 C-말단의 light chain과 vWF(von Willebrand factor)가 결합하여 heterodimer를 형성하여 체내를 순환한다.<sup>1)</sup> 활성화된 FVIII(FVIIIa)는 인지질과 칼슘이온 존재하에 혈액응고 9인자(FIX)의 활성을 증가시키고 혈

액응고 10인자(FX) activator를 구성해 FX를 활성화시킨다.<sup>2)</sup>

고전적 혈우병인 혈우병 A는 가장 흔한 선천성 혈액응고장애로 FVIII : C 결핍에 의해 발병하며 성염색체 열성 방식으로 유전되는 것으로 X 염색체에 존재하는 유전자의 결함에 기인한다. 실험실적인 역가 측정은 정상 사람 혈장내의 mL당 단위 수(1IU/mL=100%)를 기준으로 나타내게 되며,<sup>3)</sup> FVIII : C 활성 측정은 이러한 혈우병의 분류 뿐 아니라 치료 평가에도 중요하다. 혈우병에 대한 처치는 부족한 FVIII를 보충해 주는 방식에 기초를 두고 있으며 지금까지는 대부분 사람 혈장 유래의 제제에 의존하고 있다.

혈장이나 혈액응고인자 제제에서 FVIII : C 활성 측정은 혈우병 A형 환자의 진단, 제제내 역가측정, 투약

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-380-1765 (팩스) 02-383-8322

후 환자의 모니터링을 위해 필수적이다.<sup>4)</sup> 지금까지 가장 널리 사용되어진 방법으로는 기질로서 FVIII 결핍 혈장을 사용하는 응고시간측정법(clotting assay)이었다. 이 방법은 모든 조건이 충족되었을 때 FVIII 결핍 혈장의 응고가 FVIII 제제의 역가에 의해 조절됨에 착안한 것으로 기질로서의 FVIII 결핍 혈장, 희석된 검체, 체내에서 응고인자와 상호작용하는 활성화된 혈소판 표면을 위한 대체물로서의 인지질과 활성화 시약을 동일량 반응시킨 후, 칼슘 이온을 첨가하면 응고 기작이 시작된다. 이 시점부터 fibrin이 형성되어 응고가 끝나는 시간까지를 측정하고, 역가를 알고 있는 표준품이나 표준혈장의 용량-반응곡선과 비교하여 제제내 FVIII : C 역가를 구해낼 수 있다.<sup>5,6)</sup>

FXa가 작용할 수 있는 합성기질의 개발과 내인성 FX activator(FVIIIa, FIXa, 인지질, 칼슘 이온의 복합체)내 FVIII의 역할에 대한 연구로 합성기질측정법(chromogenic substrate assay)이 새로운 FVIII : C 역가 측정 방법으로 임상 적용이 가능하게 되었고<sup>2)</sup> 1994년에는 유럽약전에도 게재되었다(Fig. 1). 이 측정법의 원리는 FX을 FXa로 활성화시키는 FIXa에 cofactor로 작용하는 FVIII에 착안하고 있다. FVIII의 농도에 비례적인 관계로 FX의 활성화 정도는 변하게 되고, FXa는 serine protease로서 특이적으로 합성기질에 작용하여 기질 가수분해로 p-nitroaniline(p-NA)를 생성해 결국 FVIII의 활성을 분광학적으로 측정할 수 있게 한다.<sup>7)</sup>

응고시간측정법에 의한 FVIII : C 역가 측정에서 가장 중요한 문제중 하나는 재현성이 부족해 표준화가 어렵다는 것이고, 이것은 서로 다른 실험실의 결과를 상호 비교하기 어렵게 한다.<sup>4,8,9)</sup> 또한 fibrin 형성시간으로 역가를 측정하게 되므로, FVIII가 FXa 형성에

작용하는 것을 직접 측정하는 합성기질측정법에 비해 여러 방해 인자(예 : fibrin polymerization에 대한 억제제를 가지고 있는 중증 혈우병의 경우 응고시간측정법 사용시 실제보다 낮은 역가를 얻게됨)의 간섭에 의하여 측정치의 오차가 발생할 가능성을 지니고 있다.<sup>10)</sup> 반면 합성기질측정법은 재현성이 뛰어나고 kit화된 시약을 사용하여 표준화와 자동화가 가능하다.<sup>4)</sup> 또한 감도가 우수하고(1%이하의 FVIII : C까지 검출가능) 넓은 측정범위(혈장내 0~200% FVIII 범위에서 직선성)를 나타내며 시약이 안정하고 시간 및 온도에 의한 변이가 적다.<sup>2)</sup> 또한 소나 돼지로부터 얻은 응고인자를 사용하므로 공급이 원활하여 가격이 저렴하고 간편하여 사람유래 바이러스 오염 위험을 감소시킨다.<sup>11)</sup>

본 연구는 여러 검체를 신속, 간편하게 처리할 수 있고 재현성이 우수한 합성기질측정법을<sup>11)</sup> 유럽약전에 수제되어 있는 시험법에 적합한 두 kit를 이용하여 기존의 응고시간측정법과 비교, 검토하였다.

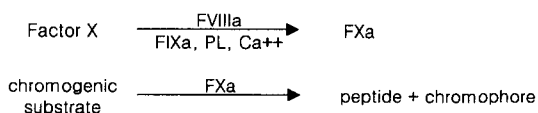
### 실험 재료 및 방법

#### 시약

정상 사람 표준혈장(normal human standard plasma)은 독일 Dade Behring사의 것을, FVIII : C 표준품으로는 WHO 6차 국제표준품(8.5 IU/vial)을 NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control)로부터 제공받아 사용하였다.

응고시간측정용 시약으로 FVIII 결핍혈장, pathromtin, 그리고 0.025M 염화칼슘 용액은 독일 Dade Behring사의 것을, Owren's 완충액(Diethylbarbiturate buffer, pH 7.6)은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

합성기질측정용 시약은 유럽약전에 수제되어 있는 시험법에 적합한 이탈리아 Chromogenix AB사의 두 kit(Coamatic<sup>®</sup> FVIII, Coatest<sup>®</sup> FVIII)를 사용하였다. Coamatic<sup>®</sup> FVIII kit는 합성기질(S-2765 : N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA)과 thrombin 억제제(S-2581), factor reagent로서 bovine FIXa, FX, thrombin(염화칼슘, 인지질과 함께 동결건조됨), 그리고 완충용액(Tris/BSA, pH 7.9)으로 구성되어 있다. Coatest<sup>®</sup> FVIII kit는 합성기질(S-2222 : Bz-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA)과 thrombin 억제제(S-2581), factor reagent로서 bovine FIXa, FX, 그리고 인지질, 0.025M 염화칼슘과 완충용액(Tris/BSA, pH 7.3)으로 구성되어 있다.



**Fig. 1** - Schematic diagram of chromogenic assay for the detection of factor VIII activity. The chromogenic assay consists of two consecutive steps: the factor VIII-dependent activation of factor X in a coagulation factor reagent composed of purified components, and the enzymatic cleavage of a chromogenic factor Xa substrate to yield a chromophore that can be quantified spectrophotometrically

### 검체

FVIII 제제로는 중순도 제제(그린에이트 250 IU/vial, Green Cross PD Co.)와 고도로 정제된 제제(그린모노 250 IU/vial, Green Cross PD Co.)를 사용하였다.

### 응고시간측정법

현재 FVIII 제제의 역가를 평가하는 생물학적제제 기준 시험법<sup>5,6)</sup>에 수재되어 있는 시험방법으로서 검체와 표준품을 FVIII 역가가 1 IU/mL이 되도록 용해하여, 일정한 농도비율의 세가지 이상의 농도를 포함하도록 각각 duplicate로 준비한 후 Owren's 완충액으로 적당히 희석하여 FVIII 결핍 혈장, pathromtin을 각각 100  $\mu$ L씩 넣어 혼합하여 6분간 반응시킨다. 0.025M 염화칼슘용액 100  $\mu$ L를 가하여 이 첨가시점을 시작으로 fibrin이 형성되어 응고가 끝나는 시간까지를 혈액응고분석기로 측정된 후 표준곡선을 이용해 역가를 구한다. 이 때 모든 반응은 37°C를 유지하였다.

### 합성기질측정법

Coamatic<sup>®</sup> FVIII kit법<sup>3)</sup> - 검체와 표준품을 FVIII 역가가 1 IU/mL이 되도록 용해하여 농도차가 일정한 세가지 이상의 농도를 포함하도록 각각 duplicate로 준비한 후 완충액으로 적당히 희석하여 flat bottomed microtitre plate의 well에 50  $\mu$ L씩 넣어 4분간 항온한 후 동일량의 factor reagent와 2분간 반응시킨다. 합성기질용액 50  $\mu$ L를 가해 다시 2분 반응시킨 후 20% 아세트산 용액 50  $\mu$ L로 반응을 정지시킨다. 발색정도를 405 nm 파장(참조파장 490 nm)에서 ELISA reader로 측정하였다. 이 때 모든 반응은 37°C를 유지하였다.

Coatest<sup>®</sup> FVIII kit법<sup>11,12)</sup> - 인지질과 factor reagent를 1:5로 혼합하여 flat bottomed microtitre plate의 well에 60  $\mu$ L씩 넣고 Coamatic<sup>®</sup> FVIII kit법에서와 같이 준비된 30  $\mu$ L의 검체 또는 표준품과 5분간 반응시킨다. 30  $\mu$ L 염화칼슘을 가하여 5분간 더 반응시킨 후 합성기질용액 60  $\mu$ L를 가해 다시 5분간 반응시킨 후 20% 아세트산 용액 30  $\mu$ L로 반응을 정지시킨다. 발색정도를 405 nm 파장(참조파장 490 nm)에서 ELISA reader로 측정하였다. 이 때 모든 반응은 37°C를 유지하였다.

### 통계학적 분석

각 시험의 적합성은 유럽약전의 통계분석방법을 이용하여 검증하였다. 응고시간측정법의 경우 평행선 검정법을 적용하여 각 시험에서의 회귀성, 직선성 그리고 평행성을 평가인자로 선정하여 시험방법의 적합성을 검증하였다. 합성기질측정법의 경우 slope-ratio model을 사용하여 각 시험에서의 직선성과 intersection p-value를 평가인자로 적합성을 검증하였다.<sup>13)</sup>

각각의 시험방법에서의 재현성, 정확성, 직선성 비교와 제제에서의 역가 비교시에는 EXCEL을 이용하여 편차(CV %), 평균(Mean  $\pm$  SD %), 상관계수(r-value, coefficient of correlation)등을 산출하였으며, 유의성 비교시에는 SAS를 이용한 ANOVA와 EXCEL을 이용한 회귀분석, Student t-test를 사용하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다(Null hypothesis : slope=1 intercept=0 혹은 recovery rate =100%).<sup>14)</sup>

### 실험결과

#### 측정일간 재현성<sup>1,3,4)</sup>

정상사람표준혈장을 FVIII 역가가 1 IU/mL이 되도록 용해하여 분주, -70°C에서 보관하여 5일 동안 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 IU/mL로 희석한 각 농도별 FVIII:C 역가를 구하였다. 각 농도별 변이계수(coefficients of variation, CV)는 서로간의 유의한 차이가 없었다 (Table I).

#### 측정일내 재현성<sup>1,3,4)</sup>

WHO 국제표준품을 FVIII 결핍혈장을 이용하여

Table I - Reproducibility of day-to-day assay for clotting and chromogenic assay

| Conc. (IU/mL)      | Method | Clotting FVIII    | Coamatic <sup>®</sup> FVIII | Coatest <sup>®</sup> FVIII |
|--------------------|--------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 0.25 <sup>a)</sup> |        | 6.0 <sup>b)</sup> | 5.1                         | 8.3                        |
| 0.5                |        | 4.4               | 5.2                         | 4.5                        |
| 0.75               |        | 6.6               | 6.6                         | 3.1                        |
| 1.0                |        | 9.5               | 4.5                         | 7.8                        |

Experiments were carried out for five different days

<sup>a)</sup>Standard human plasma was serially diluted with FVIII-deficient plasma

<sup>b)</sup>Results were expressed as a coefficient of variation (CV, %)

**Table II** – Reproducibility fo within-day assay for clotting and chromogenic assay

| Conc. (IU/mL)      | Method | Clotting FVIII    | Coamatic® FVIII | Coatest® FVIII |
|--------------------|--------|-------------------|-----------------|----------------|
| 0.25 <sup>a)</sup> |        | 1.1 <sup>b)</sup> | 3.5             | 1.9            |
| 0.5                |        | 0.6               | 0.5             | 1.9            |
| 0.75               |        | 4.9               | 1.7             | 2.1            |
| 1.0                |        | 4.5               | 5.4             | 2.8            |

<sup>a)</sup>International standard was serially diluted with FVIII-deficient plasma

<sup>b)</sup>Results were expressed as a coefficient of variation (CV, %)

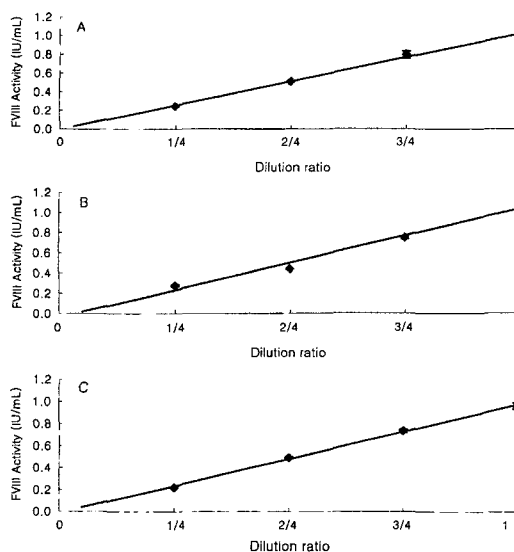
0.25, 0.5, 0.75, 1.0 IU/mL로 희석한 후 5회 측정한 FVIII:C 역가의 각 농도별 편차를 비교하였다. 각 농도별 CV는 서로간의 유의한 차이가 없었다(Table II).

**정확성** <sup>15)</sup>

WHO 국제표준품을 FVIII 결핍혈장을 이용하여 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 IU/mL로 준비하고 0.5 IU/mL의 첨가시료와 1:1로 혼합하여 FVIII:C 역가를 측정하였다. 응고시간측정법과 Coamatic® FVIII kit는 높은 회수율 및 정확성을 나타냈지만 Coatest® FVIII kit의 경우 p<0.01 범위에서 유의한 차를 보였다(Table III).

**직선성**

WHO 국제표준품을 1 IU/mL로 준비하고 FVIII 결핍혈장을 이용하여 4배씩 단계 희석하고, 희석 비율에 따른 측정 역가로 직선성을 비교하였다. Fig. 2에서 나타내 듯 응고시간측정법, Coamatic® FVIII kit 합성기질측정법 및 Coatest® FVIII kit 합성기질측정법에서 각각  $y=1.02348x-0.0016$ ,  $y=1.0746x-0.0368$ , 그리고  $y=0.983x-0.0101$ 의 직선방정식( $y$ =각 시험법으로 측정되어진 역가,  $x$ =희석비율)을 나타내었고, 상관



**Fig. 2** – Regression curve for assays for the detection of factor VIII activity. Results were obtained by using WHO standard diluted with factor VIII-deficient plasma and calculation factor VIII values of regression curves made from serial dilutions of WHO standard. Each point shows mean ± SD of estimated values. Each curve for clotting assay (A,  $y=1.0248x-0.0016$ ,  $r^2=0.9969$ ), Coamatic assay (B,  $y=1.0746x-0.0368$ ,  $r^2=0.9809$ ) and Coatest assay (C,  $y=0.983x-0.0101$ ,  $r^2=0.9983$ ) is represented as the activity of factor VIII vs dilution factor.

계수는 각각 0.998, 0.990와 0.999로 우수한 직선성을 나타내었다.

**측정방법 사이의 상관관계** <sup>3,4)</sup>

합성기질을 이용한 두 kit간에는 Fig. 3과 같이 높은 상관관계( $r=0.9840$ )를 나타내었으며, 응고시간측정법과 각 합성기질측정법 사이에서도 높은 직선성과 상

**Table III** – Accuracy of methods for clotting and chromogenic assay

| Conc.(IU/mL)                    | Method | Clotting FVIII | Coamatic® FVIII | Coatest® FVIII |
|---------------------------------|--------|----------------|-----------------|----------------|
| 0.0                             |        | 101.85 ± 8.7   | 98.7 ± 4.6      | 84.85 ± 3.9    |
| 0.5                             |        | 104.34 ± 4.7   | 105.9 ± 1.8     | 84.71 ± 3.2    |
| 1.0                             |        | 92.37 ± 7.3    | 99.55 ± 5.1     | 85.63 ± 2.0    |
| 1.5                             |        | 88.53 ± 5.8    | 99.08 ± 2.6     | 95.18 ± 1.1    |
| Mean recovery (%) <sup>a)</sup> |        | 96.89 ± 6.6    | 100.8 ± 3.5     | 87.6 ± 2.6*    |

0.5 IU/mL WHO international standard was spiked to test samples at 1:1 dilution

<sup>a)</sup>mean recovery of each spiked sample was expressed as mean ± SD (%)

\*significant at p<0.01

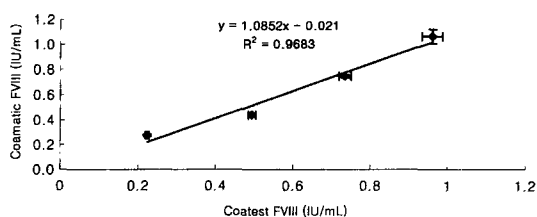


Fig. 3 – Correlation between Coamatic assay and Coatest assay on the activity of factor VIII.

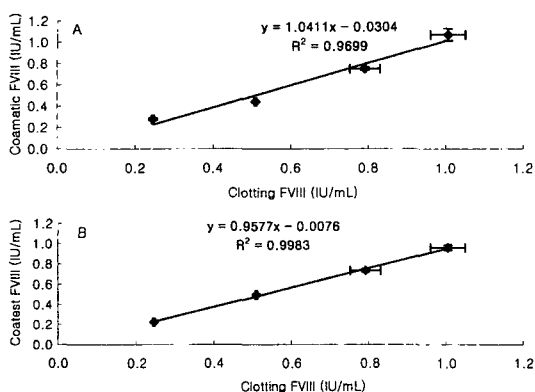


Fig. 4 – Correlation between clotting assay and chromogenic assay on factor VIII activity. The performance of chromogenic assay, Coamatic method (A) and Coatest method (B), was evaluated using clotting assay at the different factor VIII concentrates. Results were obtained by using WHO standard diluted with factor VIII-deficient plasma and calculating factor VIII values of regression curves made from serial dilutions of WHO standard. Each point shows mean  $\pm$  SD of estimated values.

관관계( $r=0.9848, 0.9992$ )를 보여 측정치 사이의 유의성은 인정되지 않았다(Fig 4).

#### 검체에의 적용<sup>16)</sup>

국내에서 사용되고 있는 FVIII 제제를 대상으로 각

Table IV – Ratios of potency estimates by each chromogenic assay to those of clotting assay in preparations

|   | Coamatic/<br>Clotting FVIII | Coatest/Clotting<br>FVIII |
|---|-----------------------------|---------------------------|
| Intermediated purity<br>FVIII concentrate | 1.004 $\pm$ 0.06            | 1.082 $\pm$ 0.06          |
| High-purity<br>FVIII:C concentrate        | 1.063 $\pm$ 0.03            | 1.086 $\pm$ 0.05          |

The mean activity with various purity of factor VIII concentrates determined by chromogenic assays was expressed as a ratio to that found by clotting method

시험방법에 따라 역가를 측정하였을 때 그 역가 비율 (Coamatic® FVIII kit/응고시간측정법, Coatest® FVIII kit/응고시간측정법)은 중순도 제제의 경우  $1.004 \pm 0.06$ ( $r=0.893$ )와  $1.063 \pm 0.03$ ( $r=0.893$ ), 고순도로 정제된 제제의 경우  $1.082 \pm 0.06$ ( $r=0.981$ ) 및  $1.086 \pm 0.05$ ( $r=0.964$ )로 일치함을 보였다(Table IV).

## 고 찰

FVIII 제제에 의한 바이러스 감염의 위험이 효과적인 바이러스 불활화 공정의 도입으로 상당 부분 감소된 후에도 표준화되지 못한 FVIII 제제와 FVIII:C 역가측정법은 여전히 혈우병환자 치료에 있어 주요한 문제로 남아있다.<sup>17)</sup> 이러한 역가는 시약, 시험과정, 표준화 방법들에 따라 서로 다른 결과를 나타낼 수 있어 참조품이나 WHO 표준품 등을 사용하고 희석의 전처리제(prediluent)로서 FVIII 결핍혈장을 사용하는 것이 역가 측정의 신뢰성을 높일 수 있다.<sup>18)</sup> 1984년 이후 합성기질을 이용하여 FVIII:C 역가 측정이 가능해졌으나 그 활성측정을 위해 널리 사용되지는 않았다. 이는 대부분의 임상사들이 환자 혈장내 FVIII:C 역가 측정을 위해 응고시간측정법을 사용하고 있었기 때문이었다. 합성기질측정법은 최근 유럽약전에서 응고시간측정법을 대신하고 국제혈전지혈학회의 SSC (Scientific and Standardization Committee)에 의해 고순도 제제의 측정법으로 권고되고 있으며 NIBSC에서도 validation시 두 방법 모두를 사용하도록 권고하고 있으므로 임상사들을 포함한 관련 시험자들은 FVIII 제제의 역가 측정을 위해 합성기질측정법을 사용하고 환자치료를 위한 지침으로 두 방법 모두를 요구해야 할 것이다.<sup>3,7,18)</sup>

FVIII 제제에서의 역가측정을 위해 시도된 두 방법에서의 재현성 비교시 측정일간(Table I) 및 측정일내(Table II)에서 모두 좋은 재현성을 보였다(일반적으로 10% 이하).<sup>3)</sup> 이것은 1999년 Kleinvelde 등<sup>3)</sup>이 혈장내에서의 역가를 Coamatic® FVIII kit와 자동화된 기기로 측정하여 재현성을 비교한 결과(측정일간 재현성 CV=7.1~9.4%, 측정일내 재현성 CV=1.9~8.9%)나 van Dieijen 등<sup>1)</sup>의 결과(측정일간 및 측정일내 재현성에서 CV 값은 응고시간측정법의 경우 각각 28.4%, 17.5~21.0%, 합성기질측정법의 경우 각각 9.5%, 5.3~11.7%)에서 보다는 낮

은 CV값이다. 응고시간측정법에서의 낮은 재현성 보고들은 사용하는 시약, 방법, 장비 차이에서 오는 것으로 알려져 있고 이는 실험실간의 변이를 높여 표준화를 어렵게 하는 요인으로 작용한다.<sup>1)</sup> 상품화되지 않은 시약들을 사용하여 실험한 과거의 결과들은 더욱 낮은 재현성을 나타낸다.<sup>8,9)</sup>

WHO 국제표준품을 이용한 회수율시험(Table III)에서 각 농도별 및 시험법별 회수율 평균±SD(%)비교시, 응고시간측정법과 Coamatic<sup>®</sup> FVIII kit는 높은 정확성을 보인 반면, Coatest<sup>®</sup> FVIII kit는 100% 회수율과  $p < 0.01$  범위에서 유의한 차를 보였다. 이는 희석 비율에 따른 측정역가 비교시 각 시험법의 직선방정식으로 설정될 수 있다(Fig. 2). 응고시간측정법과 Coamatic<sup>®</sup> FVIII kit를 사용해 측정된 역가는 희석된 표준품의 역가보다 높게 나타난 반면, Coatest<sup>®</sup> FVIII kit를 사용해 측정된 역가는 오히려 낮게 나타나 회수율도 낮아진 것처럼 보였다.

한편 합성기질을 이용한 두 kit간에도 높은 상관관계와 직선성을 보였는데(Fig. 3) 이것은 Chromogenix사의 자료 (Coamatic FVIII=1.09×Coatest FVIII-0.11)와도 일치했다.<sup>19)</sup>

또한 응고시간측정법과 각 합성기질측정법 사이에는 높은 직선성과 상관관계가 있었다. 반면 두 측정법의 표준화작업시 측정된 역가는 응고시간측정법이 합성기질측정법보다 최고 20%까지 낮게 측정되어진 보고가 있으며 이는 FII에 의한 fibrin 형성과 FXa에 의한 발색이라는 두 측정법의 최종 판정 기준 차이를 반영하는 것으로 판단된다.<sup>3,20)</sup> 다양한 실험실에서 측정된 표준 혈장내 FVIII:C 역가의 타당성을 모니터링하기 위해 Scottish National Blood Transfusion Service에서 3년 동안 실시한 실험결과에 따르면 두 방법은 Chromogenic FVIII=1.022×Clotting FVIII-0.01( $r=0.983$ )의 관계를,<sup>21)</sup> 또 다른 여러 보고들에서는 Chromogenic(Coatest) FVIII=0.982×Clotting FVIII+0.015( $r=0.9985$ ),<sup>22)</sup> Chromogenic FVIII=0.949×Clotting FVIII+0.0883( $r=0.82$ )<sup>1)</sup>등으로 다양하게 나타나고 있다. 이는 사용한 시료, kit, 시험방법 및 희석의 전처리제 차이에 의한 것으로 보인다. 희석의 전처리제 종류도 결과 차이의 원인이 될 수 있음을 보인 여러 보고들이 있는데<sup>20,23)</sup> 일반적으로 응고시간측정법에서 원충액 대신 FVIII 결핍혈장으로 희석했을 경우 응고시간이 짧아지고 희석에 따른 결과 차이는

2.7~85.7%까지 다양하며 결과 사이의 상관관계도 낮아지게 된다("FVIII:C enhancing effect" of FVIII-deficient plasma). 반면 합성기질측정법에서 희석에 따른 결과 차이는 0.7~30.5%로 결과 사이의 좋은 상관관계를 나타내 희석액은 응고시간측정법보다 합성기질측정법에 덜 영향을 미치며, 이는 합성기질측정법에 사용되는 원충액 중에 안정화제로 1.5%(w/v) 알부민이 존재하기 때문으로 판단된다.<sup>23,24)</sup> 이처럼 합성기질측정법은 희석액 차이에 의한 변이가 적을 뿐만 아니라 온도에 덜 민감해서 37°C의 반응시간을 엄격하게 유지하지 않고 실온에서 실험할 경우에도 정상혈장 중 15~150% 범위에서의 FVIII:C역가 측정시 CV 값이 3~4% 정도로 낮다.<sup>22)</sup>

한편 국내에서 사용되는 FVIII 제제에서의 역가를 각 시험법으로 측정하였을 때도 그 역가 비율 (Coamatic<sup>®</sup> FVIII kit/응고시간측정법, Coatest<sup>®</sup> FVIII kit/응고시간측정법)은 중순도제제와 고순도 정제된 제제 모두 일치함을 보였고 좋은 상관관계를 나타냈다.

시험 결과 두 시험법은 원리상의 약간의 차이에도 불구하고 높은 재현성, 정확성, 직선성을 보였고 표준품과 제제에서 모두 좋은 상관관계를 보였다. 응고시간측정법이 semi- 혹은 double logarithm 관계인 반면, 합성기질측정법은 분광학적 시험에서 FXa의 양과 그것에 의한 기질 가수분해 후 pNA양은 FVIII 활성과 직선적인 관계이며, thrombin에 의한 FVIII 전환성화에 덜 민감해 평가의 오류를 방지할 수 있다.<sup>10)</sup> 또한 신속, 정확하며 자동화가 가능한 FVIII:C 역가측정에 더욱 적합한 분석법으로<sup>3)</sup> 기존의 응고시간측정법과 함께 제제의 품질관리 방법으로, 또한 표준품등의 validation 방법으로 사용 가능하리라 판단된다.

## 결 론

1. 응고시간측정법과 합성기질측정법은 모두 높은 재현성, 정확성, 직선성을 보였다.
2. WHO 국제표준품을 이용한 두 시험법 비교시 우수한 상관관계를 나타냈다.
3. FVIII의 중순도와 고순도 제제에서도 각 시험법은 좋은 상관관계를 보였다.
4. 합성기질측정법은 응고시간측정법과 함께 제제의

품질관리 방법으로, 또한 표준품 등의 validation 방법으로 사용할 수 있다.

## 문 헌

- 1) van Diejjen, G., van Diejjen-Visser, M. P., Franssen, J. and Hemker, H. C. : Spectrophotometric method for the assay of human blood coagulation factor VIII. *Haemostasis*, **17**, 14 (1987).
- 2) Wagenvoord, R. J., Hendrix, H. H. and Hemker, H. C. : Development of a simple Chromogenic factor VIII assay for clinical use. *Haemostasis*, **19**, 196 (1989).
- 3) Kleinveld, H. A., Andersson, N.-E., van Voorhuizen, H., den Hartog, J. and de Groot, P. G. : Determination of coagulation factor VIII activity by a chromogenic substrate method on STA, an automated coagulation analyzer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **59**, 335 (1999).
- 4) Tripodi, A. and Mannucci, P. M. : Factor VIII activity as measured by an amidolytic assay compared with a one-stage clotting assay. *Am. J. Clin. Pathol.*, **86**, 341 (1986).
- 5) Over, J. : Methodology of the one-stage assay of factor VIII (VIII : C). *Scand. J. Haematol. Suppl.*, **41**, 13 (1984).
- 6) 생물학적제제 기준 및 시험방법, 397 (1999).
- 7) Assay of blood coagulation factor VIII. *European Pharmacopoeia supplement*, 79 (2000).
- 8) Elödi, S., Váradi, E. and Hollán, S. R. : Some sources of error in one-stage assay of factor VIII. *Haemostasis*, **7**, 1 (1978).
- 9) Kirkwood, T. B. L., Rizza, C. R., Snape, T. J., Rhymes, I. L. and Austen, D. E. G. : Identification of sources of inter-laboratory variation in Factor VIII assay. *British Journal of Haematology*, **37**, 559 (1997).
- 10) Rosen, S., Andersson, M., Blombäck, M., Hägglund, U., Larrieu, M. J., Wolf, M., Boyer, C., Rothschild, C., Nilsson, I. M., Sjörin, E. and Vinazzer, H. : Clinical Application of a chromogenic substrate method for determination of factor VIII activity. *Thrombosis and Haemostasis*, **54**, 818 (1985).
- 11) Carlebjörk, G., Oswaldsson, U. and Rosén, S. : A simple and accurate microplate assay for the determination of factor VIII activity. *Thrombosis Research*, **47**, 5 (1987).
- 12) Rosen, S. : Assay of factor VIII : C with a chromogenic substrate. *Scand. J. Haematol. Suppl.*, **33**, 139 (1984).
- 13) Statistical analysis of results of biological assays and tests. *European Pharmacopoeia supplement*, 263 (2000).
- 14) Cinotti, S., Longo, G., Messori, A., Morfini, M., Blombäck, M., Schimpf, K., Schumacher, K., Kjellman, H., Novakova-Banet, A. and Delves, U. : Reproducibility of one-stage, two-stage and chromogenic assay of factor VIII activity. *Thrombosis Research*, **61**, 385 (1991).
- 15) Note for guidance on validation of analytical procedures : Methodology. CPMP/ICH/281/95.
- 16) Hubbard, A. R., Curis, A. D., Barrowcliffe, T. W., Edward, S. J., Jennings, C. A. and Kembell-Cook, G. : Assay of factor VIII concentrates comparison of the chromogenic and two-stage clotting assay. *Thrombosis Research*, **44**, 887 (1986).
- 17) Hellstern, P., Kiehl, R., Miyashita, C., Schwerdt, H., von Blohn, G., Köhler, M., Büttner, M. and Wenzel, E. : Factor VIII : C (FVIII : C) recovery and half-life after infusion of steam-treated high purity factor VIII concentrate in severe hemophilia A - comparison of one stage assay, two-stage assay and a chromogenic substrate assay. *Thromb. Haemost.*, **56**, 353 (1986).
- 18) Lee, C., Barrowcliffe, T., Bray, G., Gomperts, E., Hubbard, A., Kembell-Cook, G., Lilley, P., Owens, D., Von Tilberg, L. and Pasi, J. : Pharmacokinetic in vivo comparison using 1-stage and chromogenic substrate assays with two formulations of Hemofil-M. *Thrombosis and Haemostasis*, **76**, 950 (1996).
- 19) Coamatic Factor VIII Inset. Art. No. 82 25 85. Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA.
- 20) Koops, K., Hoff, H. S., Heethuis, A., Das, P. C. and Smit Sibinga, C. Th. : Factor VIII : C assay : Influence of buffer component used in immunoaffinity chromatography for purification of factor VIII/von Willebrand factor. *Thrombosis Research*, **74**, 347 (1994).
- 21) Gabra, G. S., Prowse, C. V. and Boulton, F. E. : Importance of a quality assurance scheme for factor VIII assays in quality monitoring of human plasma destined for fractionation into factor VIII concentrate. *Vox Sang*, **56**, 65(1989).
- 22) Prowse, C., Hornsey, V., Mckay, G. and Waterston, Y.

- : Room temperature, microtray chromogenic assay of factor VIII : C. *Vox Sang*, **50**, 21 (1986).
- 23) Mazurier, C., Parquet-Gernez, A., and Goudemand, M. : Validation of a procedure for potency assessing of a high purity factor VIII concentrate comparison of different factor VIII coagulant assays and effect of prediluent. *Thrombosis and Haemostasis*, **64**, 251 (1990).
- 24) Franksen, H., Stender, S. and Scheibel, E. : An effect of predilution on VIII : C determination by the one-stage assay. *Thrombosis Research*, **48**, 195 (1987).