Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 24, No. 3, 193-199, 2011

Recombinant protein A의 short-term stability에 관한 연구

김유곤★ · 이우종 · 원찬희[1] · 김용희[2] · 윤지선[2] · 홍민선[2] · 신철수[2]
한국생산기술연구원, [1]전북대학교 환경공학과,
[2]Advanced Protein Technologies(Co.)
(2011. 5. 2. 접수, 2011. 6. 7. 승인)

A study on short-term stability of recombinant protein A

Kim Yoo Gon★, Lee Woo Jong, Won Chan Hee[1], Kim Yong Hee[2], Yun Ji Sun[2], Hong Min Seon[2] and Shin Chul Soo[2]
Korea Institute of Industrial Technology 7th floor GyeongGi Bio-Center, 864-1, Lui-Dong, Yeongtong-Gu, Suwon-City, Gyeonggi-Do 443-766, Korea
[1]Department of Environmental Engineering, Chonbuk National University 664-14
[2]Advanced Protein Technologies(Co.)
(Received May 2, 2011; Accepted June 7, 2011)

요 약: 본 실험은 AP Tech사에서 생산된 rProtein A의 단기 안정성실험을 통하여 저장방법 및 사용기간 설정과 경시변화에 따른 품질의 안정성을 평가를 목적으로 한다. 즉, 생산된 rProtein A의 보관조건인 -20 ºC에서 냉동시킨 시료를 사용 혹은 실험 후 냉장보관(4 ºC) 했을 때 얼마의 시간동안 안정성을 확보하는가를 보자고 하였으며, 실험기간은 초기부터 8주간에 걸쳐 실험을 수행 하였고 6개 지점을 실험 point로 설정하였다. 실험방법은 시료의 보관조건 -20 ºC로 보관하여 냉동시킨 후 실온에 꺼내어 녹인 다음 4 ºC에서 보관 하였다. 그리고 실험항목은 엔도톡신, 미생물한도, HPLC순도, 농도 등의 실험을 진행하였다. 실험결과 엔도톡신은 초기 0.5 EU/mg이하에서 최종 8주차에서도 0.5 EU/mg이하의 결과를 보였으며, 미생물한도에서도 불검출로 나타났고 순도는 210 nm에서 99.23~99.90%로 RSD% 0.23%, 280 nm에서는 100%의 결과를 나타내어 다른 물질로의 변화나 물질 분해특성이 없는 것으로 나타났다. 그리고 농도에서는 최초 55.15 mg/mL에서 최종 55.55 mg/mL로 RSD% 0.55%로 안정된 결과임을 알 수 있었다. 상기의 실험결과로 rProtein A의 4 ºC에서의 8주간의 보관조건은 미생물 발생이나 물질분해 특성이 없이 안정성이 확보 되었다는 결론을 얻을 수 있었다.

Abstract: The purpose of this experiment is to evaluate the stability of products according to the storage methods, the period of use, and the diurnal variations through the short term stability experiment of recombinunt protein A (rProtein A) produced in AP Tech Co. That is, we investigated how long the stability of the products would last, when we used the samples frozen at -20 ºC, which is one of the storage conditions of the produced rProtein A and then kept them refrigerated at 4 ºC. The experiment was conducted for 8 weeks and 6 experiment points were established. The experiment was done by thawing the samples frozen at -20 ºC at room temperature, and then refrigerating them at 4 ºC. In addition, experiments for endotoxin, bioburden, HPLC purity, and

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)10-8237-8239 Fax : +82-(0)31-888-6247
E-mail : kyg00789@hanmail.net

www.kci.go.kr

concentration were conducted. As a result of the experiment, 0.5 EU/mg endotoxin was detected both at the beginning and at the 8th week and bioburden was not analyzed. In the case of purity, it showed 99.23~99.90% at 210 nm (RSD% 0.23%) and 100% at 280 nm, which meant the change into other materials didn't happen and there was no material degradation characteristics. Finally, we also found the fact that the concentration stayed stable at 55.15 mg/mL (RSD% 0.55%) both at the beginning and at the end. From the experiment results, we were able to conclude that the stability at the condition to store rProtein A at 4 °C for 8 weeks was procured without producing microorganisms or having material degradation characteristics.

Key words: recombinant protein A (rProtein A), stability, endotoxin, bioburden, HPLC

1. 서 론

1.1. 연구목적

본 실험의 목적은 rProtein A의 단기 안정성실험을 목적으로 한다. 즉, 본 시료의 보관조건 -20 °C로 보관하여 냉동시킨 후 실온에 꺼내어 녹인 다음 4 °C에서 보관 하여 8주간에 걸쳐 실험을 수행 하였다. 그리고 보관 시료 하나씩 꺼내어 엔도톡신, 미생물한도, 순도, 농도 등의 실험을 진행하여 항체친화성 리간드(antibody affinity ligand)인 rProtein의 보관조건인 -20 °C에서 냉동시킨 시료를 사용 혹은 실험 후 냉장보관(4 °C) 했을때 얼마의 시간동안 안정성을 확보 하는가를 알기 위함이 본 연구의 목적이다.

1.2. 재조합 단백질

두 개 혹은 그 이상의 DNA를 유전자 재조합 기술로 이어 붙여 만든 recombinant DNA에서 만들어지는 단백질을 지칭한다. 이러한 recombinant DNA기술의 발전으로 과거 자연상태부터 미량으로 밖에 얻을 수 없던 의료용 단백질이나 산업용 효소도 오랜 연구 개발 끝에 박테리아(*E. coli*등)와 동물세포 등을 이용해서 대량생산이 가능하게 되었으며, 박테리아(*E. coli*등)를 이용한 재조합 단백질의 가장 큰 장점은 대량생산으로 인한 가격 경쟁력에 있습니다. 하지만, 박테리아(*E. coli*등)를 생산 공장으로 사용하기 때문에, glycosylation 등과 같은 post-translational modification이 필요한 단백질이나 구조가 복잡한 단백질의 대량 생산은 어렵다. 이러한 단점에도 불구하고 세계적으로 박테리아를 이용, 대량생산에 성공한 재조합 단백질로는 hGH (Human Growth hormone), INS (Insulin), Interleukine 등이 있으며, 재조합 단백질은 세계 의약품 시장을 필두로 화장품, 식품시장에서 새로운 원료로서 크게 주목받고 있는 실정이다.

1.3. 재조합 단백질 A

Protein A는 *Staphylococcus aureus* 유래의 천연형(natural)부터 다양한 재조합형태(recombinant)가 제품화되어 있으며 원천특허에 해당하는 “리플리젠(Repligen)”사의 DNA 를 포함하는 재조합형이 미국에서 2009년 까지 보호되어 천연형 프로테인에이 이외 다른 단백질은 독점적 지위를 유지했으나 최근 특허가 만료되었고 단클론항체 시장 확대와 함께 다른 참여자의 등장이 예상되고 있으며, 항체시장 성장과 함께 소재단백질의 중요성이 부각되면서 프로테인에이의 표준화가 요구되어 4종이 미국약전(USP)에 등제되어 널리 이용되고 있다.

단클론항체(monoclonal antibody)는 유전자 조작된 동물세포의 배양 시, 배지 중으로 분비 생산되며, 세포가 분비하는 다른 단백질들과 배지내의 성분 등이 섞여 매우 낮은 농도로 존재한다. 따라서 목적 단클론항체 이외의 불순물 제거가 항체생산에서 중요한 단계이며, 단클론항체 분리정제공정은 배지로부터 단클론항체만 선택적으로 포획하기 위하여 항체친화성 리간드(antibody affinity ligand)인 protein A를 이용한 크로마토그래피(chromatography)가 표준으로 채택되고 있고 protein A를 이용할 경우 정제 첫 단계에서 세포배양액으로부터 목적 항체를 95% 이상의 순도로 분리가 가능하고 농축효과도 얻을 수 있다.

항체친화성 리간드로는 protein A, G, L등이 있으며, 프로테인에이와 지는 각각 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* sp.에서 유래하며 친화도의 차이가 있지만 모두 다양한 종의 Immunoglobulin G, IgG의 Constant region, Fc에 친화성을 가지는 반면 프로테인 엘은 *Peptostreptococcus magnus*에서 유래하며 Immunoglobulin G의 kappa light chain에 친화성을 보이고 특히 카파라이트사슬 I, III, IV에 강하게 흡착하며 다양한 종류의 Immunoglobulin과 반응이 가능하며 scFv나

www.kci.go.kr

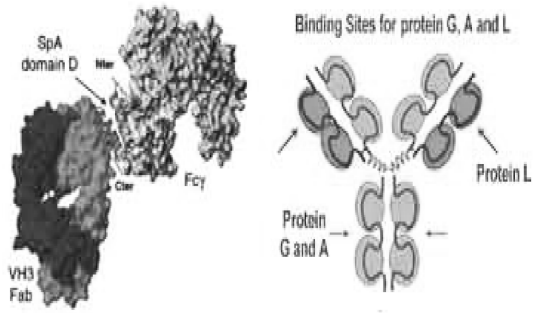


Fig. 1. Structure of antibody domain and affinity ligand.

Table 1. Affinity ligand of monoclonal antibody used on purification

Ligand	Origin microbe	Binding domain
Protein A	*Staphylococcus aureus*	Fc region of IgG
Protein G	*Streptococcus* sp.	Fc region of IgG
Protein L	*Peptostreptococcus magnus*	kappa light chain of IgG

Fab과 같은 항체단편(antibody fragment)들과도 흡착할 수 있다(*Fig.* 1, *Table* 1).[1] 그리고 AP Tech사에서 생산된 rProtein A의 분자량은 34 KDalton이다.

1.4. 안정성 실험

의약품 및 의약외품의 안정성시험 수행을 위해서는 '의약품의 안정성 시험 기준'을 준수해야 하며 생물의약품의 경우에도 일반적인 사항은 이 기준을 적용하고 있다. 그러나 생물의약품의 경우 온도변화, 산화, 광선(빛)과 같은 환경적 요인에 매우 민감하므로, 생물학적 활성을 유지하고 변성을 방지하기 위해 엄격한 조건에서 보관하는 것이 필수적으로 요구된다. 또한 제품의 유효성과 순도 등 품질에 영향을 미칠 수 있는 외적 조건을 충분히 고려하여 사용(유효)기간 및 보관조건을 설정해야 한다.

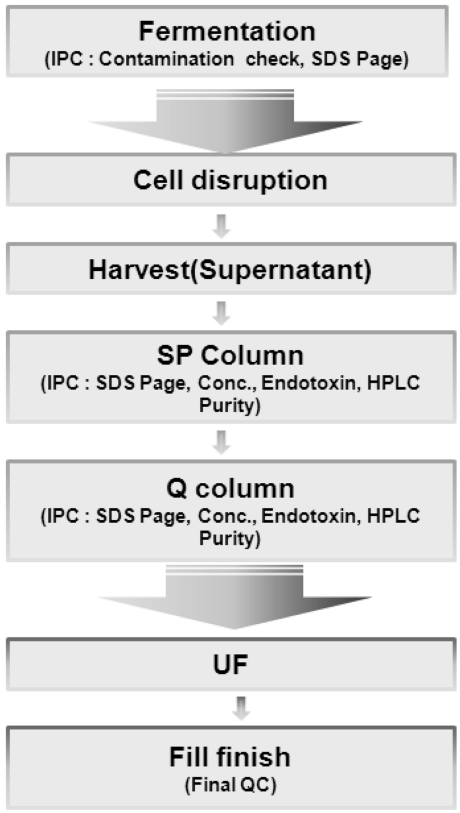
의약품등의 저장방법 및 사용 기간 등을 설정하기 위하여, 경시변화에 따른 품질의 안정성을 평가하는 시험을 말한다.

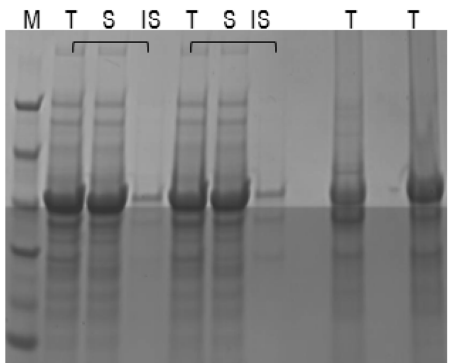
생물의약품 안정성시험 가이드라인에서 온도 보존조건은 별도의 저장온도가 설정된 경우에는 그 설정온도로 실험할 수 있다. 라고 언급하고 있으며 냉장보관의약품 5±3 °C, 냉동보관의약품 -20±5 °C로 규정하고 있다.[2-4]

1.5. 엔도톡신

발열성물질 중에서 가장 강력한 발열물질이 그람음성간균 엔도톡신이다. 이는 그람음성간균의 엔도톡신으로 그람음성간균의 세포벽 성분 중 "리포다당질(lipopolysaccharide)"을 말한다. 즉 그람음성간균의 세포벽 표층에 있는 지질과 다당의 복합이다. 엔도톡신 실험은 발열성물질 중 그람음성간균에서 유래하는 엔도톡신이라는 불순물이 함유되었는지 여부를 검사하

Table 2. Product process of rProtein A





(M: Maker, T: Total, S: Soluble, IS: Insoluble)

Fig. 2. SDS-GEL of rProtein A.

www.kci.go.kr

는 시험법이며, 실험원리는 그람음성간균에서 유래하는 엔도톡신이 참게의 혈구추출성분을 활성화하여 겔화를 일으키는 반응에 기초하여 검출 또는 정량하는 방법이다. 또한 발열성 물질이 혈류에 유입하게 되면 면역반응을 기본으로 한 발열반응이 일어난다.

2. 실험장비 및 방법

2.1. 실험장비 및 시약

2.1.1. 장비 및 기구

HPLC system은 Waters HPLC를 사용하였으며, Column은 Phenomenex사의 300×7.80 mm (BioSep-Sec-S2000)을 사용하고 UV는 GE사의 GeneQuant를 사용하였다.

Bacteria plate는 3 M, Petrifilm™ Aerobic Count Plat (LOT No. : 2012-01 TA), 그리고 Fungi Plate는 3 M, Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate (LOT No.:2012-01 KD)를 사용하였으며, Endotoxin Gel Clot은 LONZA, Limulus Amebocyte Lysate PYROGENT Plus Single Test Kit를 사용 하였다.

그리고 autopipete (20~1000 μL), incubator, volumetric flask, pH meter, clean bench등의 실험 기구를 사용하였다.

2.1.2. HPLC기기조건

이동상 조건은 Sol. 1. 0.3 M Dibasic Anhydrous Sodium phosphate (21.3 g/500 mL water), Sol. 2. 0.3 M Monobasic anhydrous sodium phosphate (18.0 g/500 mL water) 각각을 만든 다음 Sol. 1. 400 mL를 1 L 비커에 넣고 pH가 7.0이 될 때 까지 Sol. 2.를 넣은 후 0.45 μm membrane filter로 filtering 한다.

Wave number는 214 nm, 280 nm (Mode:Dual), column은 L35 (BioSep-Sec-S2000), flow rate은 1 mL/min, injecction volume은 20 μL 그리고 run time은 20 min이다.

2.1.3. 시약 및 용매

본 연구에 사용된 시약 및 용매는 anhydrous sodium phosphate, monobasic anhydrous, sodium phosphate, 초순수 그리고 Lal water등을 사용 하였다.

2.2. 실험방법

제조된 rProtein A를 4 mL씩을 취하여 시험관 6개에 담은 후, -20 °C에서 얼린 시료를 실온에서 해동시킨 다음 4 °C에서 보관하여 정해진 시간에 꺼내어 실험을 수행하였으며, 시간대별 실험 point는 초기, 1일차, 3일차, 1주차, 2주차, 4주차, 8주차에 걸쳐 실험을 수행하였다.

실험항목은 순도, 농도, 미생물한도, 엔도톡신등 4개의 실험 항목에 대하여 실험을 수행하였다.

2.2.1. 순도 실험방법

본 실험은 rProtein A의 purity를 보는 실험으로서 214 nm, 280 nm에서 HPLC chromatogram의 purity를 확인하는 실험이다. 즉, chromatogram상에서 주 peak 이외에 다른 peak가 얼마정도의 %를 함유하는지 확인 하고자 하였다. 그리고 실험은 초기 즉, 생산된 제품의 실험결과를 초기라고 하였으며, 냉동(-20 °C)시킨 시료를 다시 녹인 후 냉장(4 °C)보관 시킨 시료 1일이 경과한 시료를 1일차 그리고 3일차, 1주차, 2주차, 4주차, 8주차에 걸쳐 실험을 수행하였다.

실험순서는 농도를 알고 있는 rProtein A의 시료를 1 mg/mL로 희석(희석액 이동상)후 Blank시료를 준비(이동상)하여 준비된 시료를 HPLC에 주입(주입 volume : 100 μL)하여 241 nm, 280 nm dual mode로 분석 하였다.

2.2.2. 함량 실험방법

본 실험에 사용된 UV는 GE, GeneQuant이며 측정파장은 280 nm이였다. 농도 기준은 50.0 mg/mL이상으로서, 제조된 rProtein A의 농도는 55.15 mg/mL 이였으며 초기 농도를 기준으로 1일차부터 8주차까지의 농도 변화가 있는지 여부를 측정 · 분석하였다. 또한 함량 실험은 미국약전(USP)에서 UV로 하게 되어 있다.

실험순서는 시료를 1 mg/mL로 제조(희석액 초순수)후 UV 280 nm에서 흡광도분석을 하였으며, 결과는 3번 측정 하였고 결과가 %CV, 5%이내 인지를 확인 하였다.

2.2.3. 미생물한도 실험방법

미생물 실험은 박테리아와 세균을 보았으며, 3 M, Petrifilm™을 사용하여 실험을 수행하였다. 또한 실험시에 Blank시험도 병행하여 수행하였으며, Blank시료로는 rProtein A 제조시에 사용되었던 UPW를 사용하였다. 또한 미생물 실험도 냉동(-20 °C)시킨 시료를 다시 녹인 후 냉장(4 °C)보관 시킨 시료 1일이 경과한 시료를 1일차 그리고 3일차, 1주차, 2주차, 4주차, 8주차에 걸쳐 실험을 수행하였다.

www.kci.go.kr

1) 세균시험방법

세균 실험을 위하여 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate를 사용 하였으며, 이 plate는 일반세균용 배지로는 검체 중에 존재하는 세균 중 일반세균의 검출이 가능하다. 일반 세균은 호기적인 조건에서 자라는 모든 박테리아를 지칭하며 일반적으로 신선도나 위생상태를 감별할 때 검사한다.

실험순서는 시료준비 후 시료 1 mL을 Petrifilm™ Aerobic Count Plat에 넣고 plate cover를 덮고 spreader로 누른 다음 incubation (35 °C, 2일)하여 결과를 확인한다.

2) 진균시험방법

진균 실험을 위하여 3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate를 사용 하였으며, 이 Plate는 3~5일 이내 효모 및 곰팡이 균체를 확인한다.

실험순서는 시료준비 후 시료 1 mL을 Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate에 넣고 plate cover를 덮고 spreader로 누른 다음 incubation (25 °C, 4days)후 결과를 확인 한다.

2.2.4. 엔도톡신 실험방법

본 실험에 사용된 rProtein A의 엔도톡신 기준은 0.5 EU/mg 이하이며, 본 실험에서는 0.25 EU/mg, 0.5 EU/mg, 1.0 EU/mg 농도에서 실험을 수행하였다. 또한 실험은 초기, 1일, 3일, 1주, 2주, 4주, 8주에 걸쳐 실험을 수행 하였고, 본 실험에 사용된 Gel clot은 LONZA, Limulus Amebocyte Lysate PYROGENT Plus Single Test Kit를 사용 하였다.

실험순서는 UV로 rProtein A의 농도결정(mg/mL)를 결정 후 희석(Target conc.: 0.25 EU/mg, 희석배수식 : 0.25 EU/mg × rProtein A Conc. (mg/mL)/0.125 EU/mL) 하여 serial dilution (Target conc.: 0.5, 1.0 EU/mg)을 하고 희석된 시료 250 μL를 엔도톡신 kit에 주입 한 후 incubation (37 °C, 60 min) 시킨 다음 결과를 확인 하였다.

3. 실험결과

3.1. 순도

실험결과 초기의 실험 data는 214 nm에서 99.90%, 1일차 99.81%, 3일차 99.88% 그리고 최종 8주차에서 99.72%로 전체범위 99.23~99.90%로서 RSD% 0.23%, 280 nm에서는 초기부터 최종결과까지 100.0%의 결과를 나타내어 순도에서는 다른 물질로의 변화나 물질

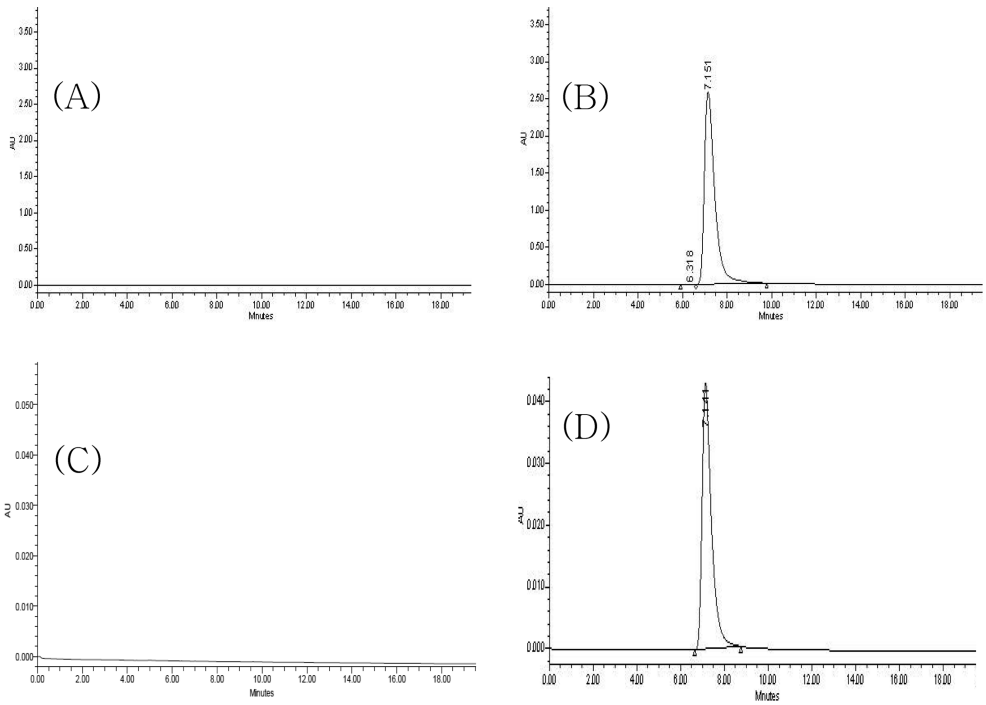


Fig. 3. Blank chromatogram of 214 nm (A), sample chromatogram of 214 nm (B), blank chromatogram of 280 nm (C) and sample chromatogram of 280 nm (D) using HPLC.

www.kci.go.kr

분해특성이 없는 것으로 나타났다.[5-8] <*Fig.* 3>에서 (A)는 214 nm에서 blank 크로마토그램이며, (B)는 214 nm에서 시료의 크로마토그램을 보여주고 있다. 그리고 (C)는 280 nm에서 blank 크로마토그램을 보여주고 있으며, (D)는 280 nm에서 시료의 크로마토그램을 나타내고 있다.

3.2. 미생물한도

실험결과 초기에는 박테리아, 진균에서 모두 검출되지 않았다. 그리고 1일차, 3일차에서도 검출되지 않았으며, 8주차에서도 검출되지 않음을 확인 할 수 있었다. <*Fig.* 4>에서는 8주차의 박테리아와 세균 시험결과를 보여주고 있다. 이 실험의 결과는 호기적인 조건에서 자라는 일반세균 즉, 박테리아의 발생이 없었으며, 효모 및 곰팡이 균체 즉, 진균에서도 검출이 되지 않았다. 그리고 <*Fig.* 4>에서는 Plate를 이용한 박테리아 및 진균 실험한 결과는 보여주고 있다.

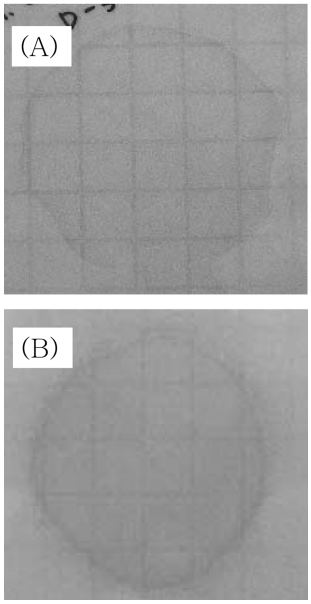


Fig. 4. Test result of bacteria using Petrifilm™ Aerobic Count Plate (A) & fungi using Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate (B).

3.3. 농도

실험결과 1일차의 농도는 55.18 mg/mL, 3일차 55.73 mg/mL, 1주차 55.61 mg/mL, 그리고 마지막 8주차 55.55 mg/mL이였으며 전체적인 농도 변화는 일정한 것으로 판단되며 약간의 차이는 실험시 희석등의 차이로 기인된 것으로 사료된다. 또한 농도 실험시 기준 CV%가 5.0%이하인 점을 감안하면, 본 실험 초기에서 8주차까지의 CV% 즉, RSD%로서 0.55%의 결과를 나타내어 농도에서도 rProtein A가 변화하지 않음을 알 수 있었으며, 다시 말하면 rProtein A의 4°C 보관조건은 안정성이 확보되는 조건임을 알 수 있었다.

3.4. 엔도톡신

실험결과 초기 0.5 EU/mg 이하, 1일차 0.5 EU/mg 이하, 3일차 0.5 EU/mg 이하, 1주차 0.5 EU/mg 이하, 2주차 0.5 EU/mg 이하, 4주차 0.5 EU/mg 이하 그리고 최종 8주차에서도 0.5 EU/mg 이하를 나타내어 엔도톡신이 증가되지 않음을 알 수 있었다. 또한 <*Fig.* 5>에서는 엔도톡신 실험에 사용된 Gel clot을 보여주고 있다.[9]

Fig. 5. Test result of Endotoxin using LONZA Gel clot.

Table 3. Table of this experimental result <D : Day, W : Week, N.D : Not Detection, N=3>

Items \ Time		Initial	1D	3D	1W	2W	4W	8W	Average	RSD %
HPLC Purity	214 nm <Criteria : ≥ 98%>	99.90	99.81	99.88	99.75	99.78	99.71	99.23	99.72	0.23
	280 nm <Criteria : ≥ 95%>	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	-
Conc. <Criteria : ≥ 50 mg/mL>		55.15	55.18	55.73	55.61	55.24	55.94	55.55	55.49	0.55
Bioburden <Criteria : N.D>	Bacteria	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	-	-
	Fungi	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	-	-
Endotoxin <Criteria: ≤ 0.5 EU/mg>		≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	-	-

www.kci.go.kr

4. 결 론

rProtein A의 단기 안정성실험을 통하여 저장방법 및 사용기간 설정과 경시변화에 따른 품질의 안정성을 평가를 목적으로 수행된 본 실험은 보관조건인 -20 ºC에서 냉동시킨 시료를 사용 혹은 실험 후 냉장보관(4 ºC)했을 때 얼마의 시간동안 안정성을 확보하는가를 보고자 하였으며, 실험항목은 endotoxin, bioburden, HPLC purity, concentration등의 실험을 진행하여 얻은 결과는 다음과 같다.

실험결과 엔도톡신은 초기 0.5 EU/mg에서 최종 8주차에서도 0.5 EU/mg의 결과를 보였으며, 미생물한도에서도 불검출로 나타났고 순도는 210 nm에서 99.23~99.90%로 RSD% 0.23%, 280 nm에서는 100%의 결과를 나타내어 다른 물질로의 변화나 물질 분해 특성이 없는 것으로 나타났다. 그리고 농도에서는 최초 55.15 mg/mL에서 최종 55.55 mg/mL로 RSD% 0.55%로 안정된 결과임을 알 수 있었다.

상기의 실험결과로 rProtein A의 -20 ºC에서 꺼내어 해동시킨 시료를 4 ºC에서의 2개월간의 보관조건은 미생물 발생이나 물질분해 특성이 없고, 안정성이 확보 되었다는 결론을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. V. D. Marco, G. Stier, S. Blandin and A. Marco, *BBRC.*, **322**, 766-771 (2004).
2. Guideline on Stability Testing of Biological Product - *KFDA* (2008).
3. ICH guideline Q5C - Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.
4. ICH guideline Q1A(R2) - Stability Testing of New Drug Substance and Products.
5. ICH guideline Q1E - Evaluation for Stability Data.
6. T. Arakawaa, S. J. Prestrelskia, W. C. Kenneya and J. F. Carpenter, *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **46**, 307-326 (2001).
7. G. A. Eberlein, *J. Pharma and Biomed Anal.*, **13**, 1263-1271 (1995).
8. K. G. Moorhouse, W. Nashabeh, J. Deveney, N. S. Bjork, M. G. Mulkerrin and T. Ryskamp, *J. Pharma and Biomed Anal.*, **16**, 593-603 (1997).
9. S. Liu, R. Tobias, S. Mcclure, G. Styba, Q. Shi and G. Jackowski, *Clinical Biochem.*, **30**(6), 455-463 (1997).

www.kci.go.kr