

Surface plasmon resonance 바이오센서를 이용한 제조합 B형 간염 표면항원의 정량분석

안 상 점 · ¹유 창 훈 · ¹류 강 · ²전 준 영 · ²이 현 익 · ³최 성 철 · 이 영 식 · ¹이 은 규
한양대학교 생화학 및 분자생물학과, ¹한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ²디아이버바이오텍(주), ³(주)녹십자백신 GE팀
(접수 : 2001. 10. 17., 게재승인 : 2002. 2. 20.)

Quantitative Assay of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen by Using Surface Plasmon Resonance Biosensor

S. J. Ahn, C. H. Yoo¹, K. Ryu¹, J. Y. Jeon², H. I. Lee², S. C. Choi³, Y. S. Lee, and E. K. Lee^{†1}
Department of Biochemistry and Molecular Biology

¹Department of Chemical Engineering Bioprocessing Research Laboratory Hanyang University Ansan, Korea
425-791 and ²DI Biotech, Ltd. Seoul, Korea and ³Greencross Vaccine Corp., GE Team Yongin, Korea
(Received : 2001. 10. 17., Accepted : 2002. 2. 20.)

We performed a basic experiment for rapid, on-line, real-time measurement of HBsAg by using a surface plasmon resonance biosensor to quantify the recognition and interaction of biomolecules. We immobilized the anti-HBsAg polyclonal antibody to the dextran layer on a CM5 chip surface which was pre-activated by N-hydroxysuccinimide for amine coupling. The binding of the HBsAg to the immobilized antibody was measured by the mass increase detected by the change in the SPR signal. The binding characteristics between HBsAg and its antibody followed typical monolayer adsorption isotherm. When the entire immobilized antibody was interacted, there was no additional, non-specific binding observed, which suggested the biointeraction was very specific as expected and independent of the ligand density. No significant steric hindrance was observed at 17.6 nm/mm² immobilization density. The relationship between the HBsAg concentration in the sample solution and the antigen bound to the chip surface was linear up to ca. 40 µg/mL, which is much wider than that of the ELISA method. It appeared the antigen-antibody binding was increased as the immobilized ligand density increased, but verification is warranted. This study showed the potential of this biosensor-based method as a rapid, simple, multi-sample, on-line assay. Once properly validated, it can serve as a more powerful method for HBsAg quantification replacing the current ELISA method.

Key Words : biosensor, HBsAg, virus assay, SPR

서 론

HBV(hepatitis B virus)에 의해 전염되는 B형 간염은 아시아 지역에 광범위하게 퍼져있는 감염성 질병이다. HBV의 envelope는 바이러스 막의 주 단백질인 S 항원과 두 개의 소수 단백질인 M, L 항원으로 구성되어 있다. S 항원은 HBV에 감염된 환자의 혈청으로부터 분리되어 높은 면역원성을 갖는 입자로 조합된 polypeptide의 형태로서 다양한 숙주세포

에서 성공적으로 발현되어 왔으며, 1986년도부터 유전자 재조합 HBsAg(hepatitis B surface antigen)가 간염백신으로 상업화되어 왔다.

전통적인 바이러스 정량분석방법은 동물세포에 바이러스를 감염시켜 세포 병원성 효과를 측정하는 in vitro 배양 방법이었으나 근래에는 정제된 항원을 이용하는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)가 널리 이용되고 있는 추세이며, HBsAg의 정량분석에도 유용하게 이용되고 있다.

최근 들어 SPR(surface plasmon resonance) 현상을 이용하여 물질간의 결합 및 분리 과정을 실시간으로 읽어낼 수 있다(1-3). 프리즘을 통해 조사된 광원이 센서 칩 위의 박막에 고정화되어 있는 리간드에 결합한 물질의 질량, 형상 등에 따라 공명각(resonance angle)이 변화하는 원리를 이용한 것이다. 통상 센서 칩은 유리 판 위에 50 nm 두께로 입혀진 금 박

[†]Corresponding Author : Department of Chemical Engineering
Bioprocessing Research Laboratory Hanyang University Ansan,
Korea
Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779
E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

막(gold film) 으로 구성되어 있으며 이 위에 dextran 층이 도포 되어 있다. 이 칩이 시스템에 장착되면 여러 개의 유로(flow cell)가 형성되어 있는 통합미세유로장치(integrated μ -fluidic cartridge)와 결합되어 microvalve에 의한 조절을 통해 각 flow cell을 독립적으로 혹은 연속적으로 사용할 수 있게 된다. Flow cell로 sample이 흘러가면서 리간드가 고정화된 칩 위에서 두 물질 간의 결합 및 분리과정은 공명각의 변화를 야기하고 이는 sensorgram을 통해 실시간으로 확인할 수 있다(2,6). 이 SPR 신호의 단위는 response unit(RU)을 사용하고, 1000 RU의 변화는 1 ng/mm^2 (0.1도의 SPR angle의 변화)의 질량 변화를 의미한다(4).

이 SPR 분석법은 스크리닝 목적의 분자인식(molecular recognition)에 관한 연구에 널리 쓰여 왔다. 일반적으로 비교적 큰 분자를 리간드로 고정화하고 저분자들의 결합 반응 여부를 연구하는데 많이 이용되었고, 항체와 항원 같은 큰 분자들 사이의 결합 반응 연구에는 많이 쓰이지 않았다. ELISA 방법과 비교 시 SPR 분석법은 여러 장점들이 있을 수 있다. 약 20 ng의 시료 만을 요구하며, 100회 이상의 반복 실험이 가능하며, 실시간, on-line 측정이 가능하고, 형광이나 발색 같은 labeling이 필요 없다는 장점을 기대할 수 있다(2, 7-8). 또한 항체 시료를 직접 분석할 수 있기 때문에 HBsAg 제조 공정 중 또는 보관 중의 바이러스 활성 변화 등을 즉시 분석할 수 있으며, 각 batch별 활성 비교도 가능하게 한다. Tung 등은 재조합 HBsAg를 고정화 리간드로 사용하여 항체와의 epitope mapping을 통해 항원의 characterization 연구를 성공적으로 수행하였다(7). 따라서 본 실험에서는 항체를 고정화시킨 후 재조합 HBsAg 시료를 분석함으로써 정량분석에 대한 기초실험을 수행하여 ELISA 대체 가능성 및 타당성을 검토하였다.

재료 및 방법

HBsAg 및 anti-HBsAg 항체

분석대상물질인 재조합 *Hansenula polymorpha* 유래 HBsAg(분자량 22 kD)와 리간드로 이용된 anti-HBsAg 항체(polyclonal IgG from goat)는 (주)녹십자백신으로부터 제공받았다. Reference ligand는 anti-IFN- α -2 항체(polyclonal IgG from rabbit, Sigma)를 이용하였다.

리간드 항체 고정화 과정

BIACORE AB사(Uppsala, Sweden)의 BIACORE 3000 시스템을 이용하였다. 센서 칩으로는 CM5 칩을 이용하였다. 이 칩 표면은 carboxymethyl dextran 층으로 도포되어 있으며 4개의 flow cell을 이용할 수 있다. 음전하를 띠고 있는 dextran 층에 리간드의 고정화 효율을 증가시키기 위한 양전하의 coupling buffer를 이용하여 정전기력을 유도한다(preconcentration test). pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5의 10 mM sodium acetate를 리간드와 혼합하여 주입하여 최대로 결합하는 최적의 pH 조건을 결정하였다. Dextran 층의 carboxyl 기를 활성화시켜 항체 표면의 amine 기와 공유결합을 촉진시키기 위해(5), 0.2 M EDC(N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbodiimide)와 0.05 M NHS(N-hydroxysuccinimide)를 10분 동안 흘려주어 반응성이

좋은 NHS ester로 활성화 시켰다(7).

Preconcentration test를 통해 결정된 pH의 10 mM sodium acetate에 리간드(anti-HBsAg 항체) 및 reference ligand(anti-IFN- α -2 항체)를 각각 최종농도 $50 \mu\text{g/mL}$ 이 되도록 첨가한 후에 활성화된 4개의 flow cell 위로 흘려주었다. 이 때, 1, 3번 flow cell (Fc #1, Fc #3)에는 anti-IFN- α -2 항체를, 2, 4번 flow cell (Fc #2, Fc #4)에는 anti-HBsAg 항체를 고정화하였다. 이 항체를 저밀도(Fc #2)와 고밀도(Fc #4)로 각각 다른 농도로 공유결합시킴으로써, 고밀도 고정화에 의한 steric hindrance 영향이 있는지 또는 고정화된 리간드 항체의 단위 질량 당 결합되는 HBsAg의 비율에 차이가 있는지 확인하고자 하였다.

리간드와 결합하지 않은 센서 칩 표면의 NHS 활성화 부위에 HBsAg의 amine기와 공유결합되지 않도록 하고, 비공유결합된 리간드를 세척하기 위하여 1 M ethanolamine을 8분 동안 흘려주어 불활화 또는 blocking 시켰다. 그 후 running buffer로 1X PBS (pH 7.4)를 $30 \mu\text{L/min}$ 의 유속으로 계속하여 흘려주었다.

Biorecognition에 의한 HBsAg의 결합반응 분석

HBsAg를 여러 농도(1,370, 685.5, 342.8, 171.4, 87.6, 42.9, 21.4, $10.7 \mu\text{g/mL}$)로 희석하여 저밀도 고정화된 칩 (Fc #1, Fc #2) 위로, 548.2, 274.1, 137.1, 68.6, 34.3, 17.1, 4.3, 2.1, 1.06, $0.53 \mu\text{g/mL}$ 로 각각 희석하여 고밀도 고정화 칩 (Fc #3, Fc #4) 위로 흘려주어 결합되는 HBsAg를 RU 값으로 측정하였다. 이 때 각 flow cell로부터 측정된 RU 값은 anti-HBsAg 항체가 고정화되어 있는 Fc #2와 Fc #4에서 HBsAg와 결합력이 없는 anti-IFN- α -2 항체가 고정화되어 있는 Fc #1, Fc #3의 RU 값을 각각 제하여 줌으로써 bulk response 및 비특이적 결합 값을 배제하였다(1). 또한 각 농도에서의 sensorgram으로부터 항원-항체 반응한 항원의 질량을 구하여 calibration curve를 작성한 뒤 correlation coefficient 값이 0.95 이상인 구간을 이 분석법의 선형 범위로 선정하였다(10,11). 또한 이 calibration curve로부터 항체와 항원 사이의 최대 결합도를 구한 뒤(11) 이 결합반응의 몰 비율을 결정하였다(12).

칩 표면의 재생을 위한 최적조건 결정

센서 칩을 반복 사용하기 위해서는 HBsAg가 결합된 센서 칩으로부터 HBsAg만을 제거하여 칩 표면의 리간드를 재생시켜야 한다. 결합된 항체의 질량에 무관하게 재현성 있는 최적 재생조건을 결정하기 위하여 별도의 센서 칩에 anti-HBsAg 항체를 고정화시키고 그 위에 HBsAg를 흘려주어 최대로 결합시킨 후, 서로 다른 조성을 가진 재생용 완충액을 흘려주어 RU 값이 감소하는 경향을 살펴보았다. 재생 완충액은 glycine (10 mM, pH 2.2, 1.7), HCl (50, 100 mM, with 1M NaCl), NaOH (1, 5, 10, 25, 50 mM, with 1 M NaCl) 등을 평가하였다(9).

결과 및 고찰

리간드 고정화

리간드의 고정화를 위한 고정화 완충액(10 mM sodium

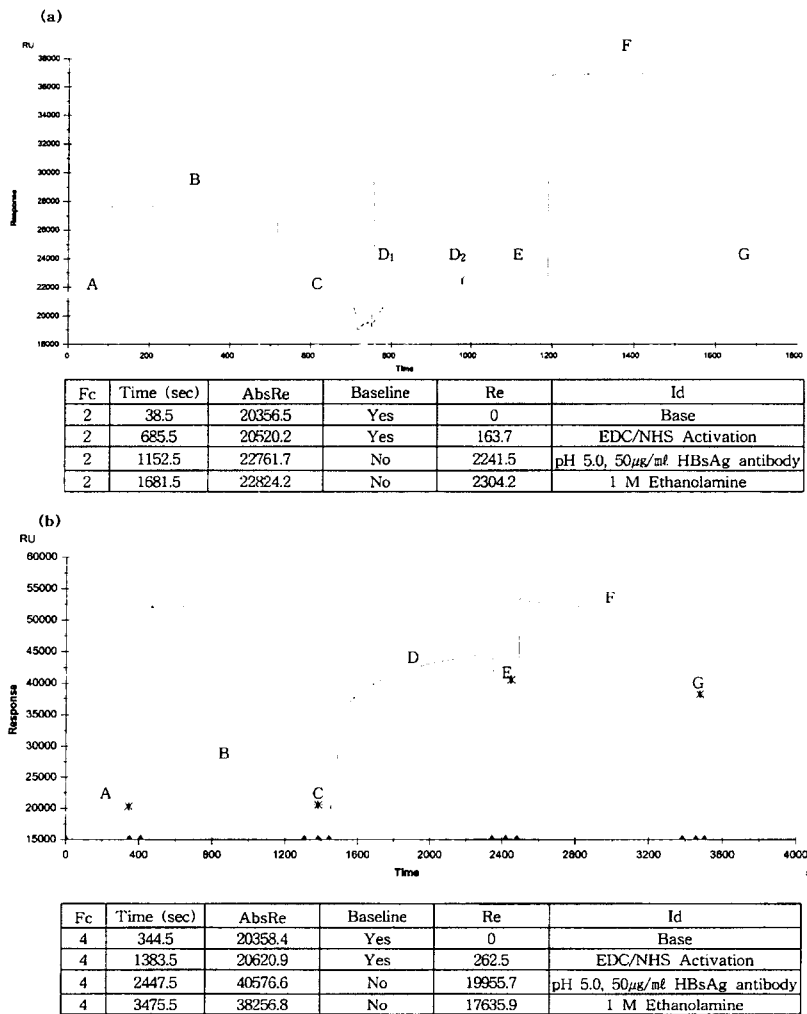


Figure 1. The sensorgram of anti-HBsAg polyclonal antibody immobilization. (a): low-density, (b): high-density immobilization. A: baseline, B: EDC/NHS activation, C: after activation, D: ligand binding, E: after ligand binding, F: deactivation, G: after deactivation.

acetate)의 최적 pH는 anti-HBsAg 항체의 경우 pH 5.0, anti-IFN- α -2 항체의 경우 pH 5.5에서 최적 조건이었다. Figure 1에 제시된 고정화 과정은 아래와 같다. Running buffer에 의해 평형된 dextran 층(Figure 1의 “A” 단계)을 EDC와 NHS로 활성화시키면 RU 값이 증가하게 되고 (“B” 단계), 다시 running buffer가 주입되면 RU는 감소한다 (“C” 단계). “A” 단계에 비해 증가된 “C” 단계의 RU 값은 dextran 층 표면이 NHS ester로 변환된 것에 기인한다. 리간드 항체가 함유된 시료를 주입하면 RU 값이 증가하고 (“D” 단계), 그 후 running buffer가 주입되면 RU 값은 약간 감소하게 된다. 이는 물리적으로 entrap되었던 항체가 세척되어 나오기 때문이다. “C”와 “E”의 차이는 고정화된 항체의 질량을 의미한다. 불활화 또는 blocking buffer가 주입되면 RU는 증가하고 (“F” 단계), 다시 running buffer에 의해 감소하게 된다 (“G” 단계). “E”와 “G”의 차이는 비특이적으로 결합되었던 항체가 탈착되는 것에 기인한 것으로 사료된다.

Anti-HBsAg 항체의 고정화 수준은 저밀도로 고정화시킨 경우 2,304 RU (Fc #2), 고밀도 고정화 경우 17,635 RU (Fc #4) 이었고, 이는 각각 2.3, 17.6 ng/mm²에 해당한다.

Reference 단백질로 사용된 anti-IFN- α -2 항체 경우 저밀도는 2,657 RU (Fc #1)로 고밀도는 Fc 3에서 13,027 RU로 각각 측정되었다(Figure 1). Figure 1에서 보듯이 칩 표면을 NHS로 활성화시키는 시간이 길수록 리간드의 고정화 밀도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

항원-항체 결합반응 및 선형 범위의 결정

저밀도 고정화 칩 위로 1,370, 686, 343, 171, 87.6, 42.9, 21.4, 10.7 μ g/mL HBsAg를, 고밀도 고정화 칩 위로 548, 274, 137, 68.6, 34.3, 17.1, 4.3, 2.1, 1.06, 0.53 μ g/mL HBsAg를 각각 흘려주어 얻은 sensorgram을 Figure 2에 나타내었다. 각 sensorgram으로부터 결합도를 결정한 후 x축에 시료 용액 내 HBsAg의 농도, y축에 리간드와 결합된 HBsAg를 RU 단위로 나타내었다(Figure 3). 이 calibration curve에서 correlation coefficient가 0.95 이상인 선형 범위 구간을 확인한 결과 두 경우 모두 30-40 μ g/mL까지 HBsAg의 농도에 비례해 RU가 선형적으로 변화함을 볼 수 있었다. Guillou 등의 보고에 의하면 ELISA에 의한 HBsAg 분석법의 경우 선형범위는 100 ng/mL로 알려져 있다(13). 따라서 SPR을 이용한 분석법

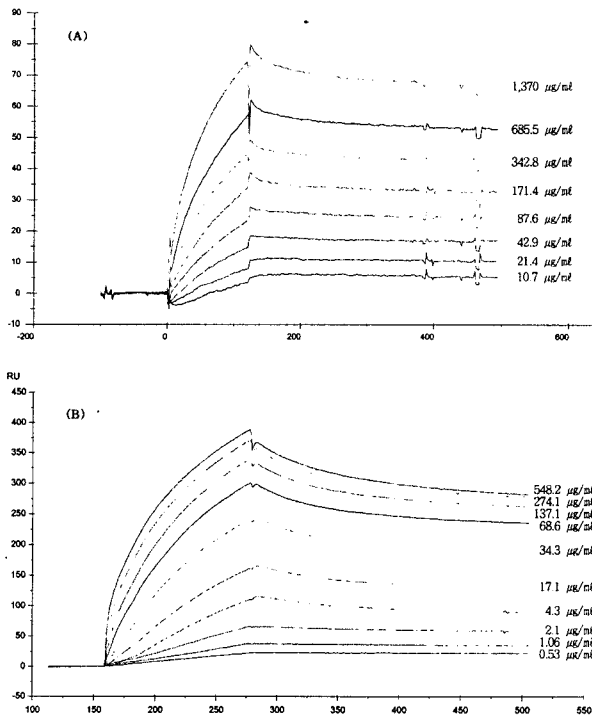


Figure 2. Time-course profiles of HBsAg and anti-HBsAg antibody interactions at various HBsAg concentrations. (A): low-density chip (Fc 2 - Fc 1), (B): high-density chip (Fc 4 - Fc 3).

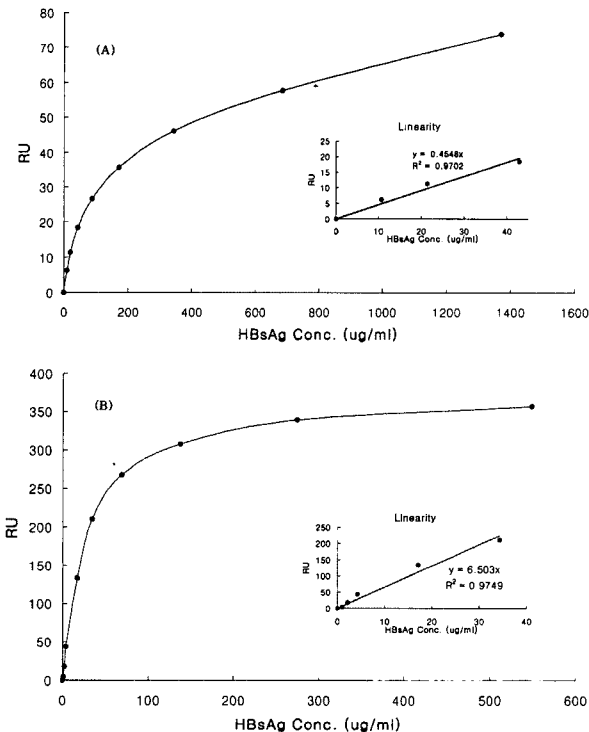


Figure 3. Relationship between HBsAg concentrations in the fluid phase and the HBsAg mass interacted to the immobilized antibody. (A) Low-density, and (B) High-density immobilization.

이 훨씬 광범위한 선형범위를 가짐을 확인하였다. 또한 선형범위에서의 기울기는 저밀도 경우 0.455, 고밀도

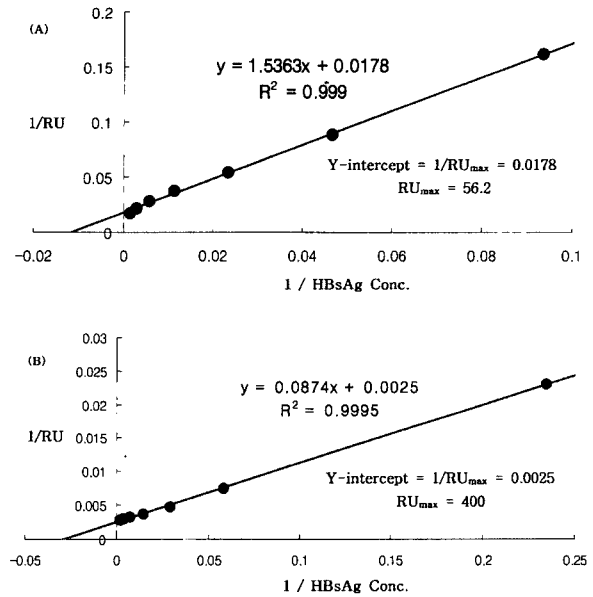


Figure 4. Double-reciprocal plots to determine the maximum mass of HBsAg interacted with the immobilized antibody. (A) Low-density, and (B) High-density immobilization.

경우 6.50 RU/μg/mL로, 일정한 항원 농도에서 단위 질량의 고정화된 polyclonal 항체 당 고밀도 칩이 저밀도 칩에 비해 약 14배의 항원 결합력을 보여 주었다. 이는 고밀도 칩에 고정되어 있는 리간드 항체의 밀도가 저밀도 칩의 약 7.5배라는 것을 감안하면 리간드 고정화 밀도에 따라 항원-항체 결합이 달라진다는 것을 의미한다. 그 이유는 확실치 않지만, 특히 항체의 농도가 낮은 경우 고밀도 리간드 칩에서의 결합 확률이나 affinity가 더욱 높은 것으로 사료된다. 이것은 고정화 밀도가 면역 결합에 미치는 영향에 대한 체계적인 추가 실험에 의해 규명될 것이다.

최대결합도 및 항원-항체 결합반응의 몰 비율

Figure 3의 calibration curve는 전형적인 Langmuir 단일층 흡착 거동을 보여 주었고 따라서 아래의 Langmuir 방정식을 적용시킬 수 있다.

$$A = A_{max} * c / (K + c)$$

여기서 A는 결합한 항원의 질량, A_{max}는 최대 질량, c는 시료 내 항원의 농도, 그리고 K는 상수이다. 이로부터 최대 결합도인 A_{max}를 RU 단위로 얻기 위해 Langmuir 방정식을 double-reciprocal plotting하여 1차 방정식으로 변환시켰다. 이로부터 y절편 값을 통해 A_{max} 값을 구한 결과 저밀도 칩에서 56.2 RU(0.056 ng), 고밀도 칩에서 400 RU(0.40 ng)로 계산되었다(Figure 4). 계산된 A_{max} 값과 각 flow cell에 고정화된 항체의 질량을 통해 항체-항원 결합반응의 질량 비율을 계산한 결과 저밀도 및 고밀도 칩에서 각각 0.024, 0.023으로 일정한 값을 얻었다. 따라서 이 항원-항체 반응의 stoichiometry는 리간드 항체의 고정화 밀도에 무관하게 동일함을 확인하였다. 또한 17.6 ng/mm²까지의 고밀도 칩에서의 결합 반응에 steric hindrance 영향은 없는 것으로 나타났다.

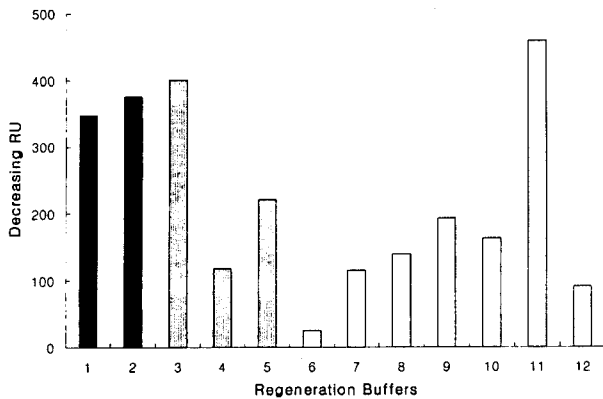


Figure 5. The effect of regeneration buffer compositions on removal of the bound HBsAg. 1: 10 mM glycine (pH 2.2), 2: 10 mM glycine (pH 1.7), 3: 50 mM HCl, 4: 50 mM HCl + 1M NaCl, 5: 100 mM HCl, 6: 1 mM NaOH, 7: 5 mM NaOH, 8: 10 mM NaOH, 9: 25 mM NaOH, 10: 25 mM NaOH + 1 M NaCl, 11: 50 mM NaOH, 12: 50 mM NaOH + 1 M NaCl.

재생조건의 결정

다양한 조성의 재생용 완충액을 HBsAg가 결합된 상태의 센서 칩 위로 흘려주어 RU 값이 감소하는 경향을 살펴본 결과 50 mM NaOH가 가장 큰 RU 감소율 (458.1 RU)을 보였다 (Figure 5). 1 M NaCl의 첨가는 재생에 효과적이지 못한 것으로 확인되었다. Glycine과 HCl도 비교적 큰 감소효과를 나타내었다. Tung 등은 결합된 HBsAg를 20 mM HCl을 사용하여 효과적으로 재생시켰으며(7), Takacs 등도 10 또는 20 mM HCl을 사용하여 결합된 anti-IFN 항체를 재현성 있게 제거하였다(14). NaOH의 농도를 증가시키에 따라 일정한 비율로 제거되므로 결합된 HBsAg의 질량에 따라 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM의 NaOH를 적절하게 사용하는 것이 가장 효과적인 것으로 판단되었다. 그러나 일정한 농도의 NaOH를 사용 시 RU의 감소 폭이 일정하지 않았으며 이로 인해 센서 칩의 반복사용에 문제가 있다고 사료되었다. 가혹한 완충액에 노출될 경우 고정화된 리간드 항체가 불활화될 수 있고, 너무 mild한 완충액의 경우 결합된 항원을 충분히 제거할 수 없을 것이다. 따라서 결합된 HBsAg 질량에 무관하게 칩 표면을 재현성 있게 재생시킬 수 있는 재생 조건을 찾는 것이 이 분석법이 정량분석법으로 사용되기 위한 필수조건이므로 이에 대한 실험이 진행 중이다.

결론

BIACORE 바이오센서를 이용하여 재조합 HBsAg를 정량 분석하기 위해 CM5 칩 위에 anti-HBsAg polyclonal 항체를 저밀도(2,304 RU)와 고밀도(17,639 RU)로 고정화한 후 다양한 농도의 HBsAg를 흘려주어 각 농도별 sensorgram을 얻었다. 각 sensorgram으로부터 결합된 HBsAg의 질량을 구하여 액체 시료 내의 HBsAg의 농도 대 칩에 결합된 HBsAg의 질량 사이의 상관관계를 구한 결과 Langmuir 단일층 흡착 등온선과 매우 유사한 형태의 calibration curve를 얻었다. 약 40 $\mu\text{g/mL}$ 까지 선형 관계가 유지되었다. 이 calibration curve를 double-reciprocal plotting 하여 최대 결합도를 각각 구한

뒤, 단위 질량의 고정화된 항체 당 결합된 HBsAg의 질량을 구한 결과 저밀도 칩에서 0.024, 고밀도 칩에서 0.023으로 거의 동일한 결과를 얻었다. 그러나 고정화된 리간드 항체의 밀도가 높은 경우 더욱 많은 항원이 결합함이 관찰되었다. 센서 칩의 재생에는 1~50 mM NaOH가 효과적이었으나 결합된 HBsAg의 질량에 따라 재생 성능이 변화함을 관찰하였고, 칩의 반복사용을 위하여 재현성 있는 최적 재생조건을 확인하는 작업이 필요한 것으로 사료되었다.

감사

본 연구는 2001년 식품의약품안전청 용역연구개발사업인 "혈액제제의 바이러스 validation 지침 제정을 위한 연구"의 연구비 지원으로 일부 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 연구비 지원에도 감사드립니다.

REFERENCES

- Rich, R. L. and D. G. Myszka (2000), Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 54-61.
- Myszka, D. G. and R. L. Rich (2000), Implementing Surface Plasmon Resonance Biosensors in Drug Discovery, *PSTT*, **3(9)**, 310-316.
- Bianchi, N., C. Rutigliano, M. Tomassetti, G. Feriotto, F. Zorzato and R. Gambari (1997), Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction, *Clinical and Diagnostic Virology*, **8**, 199-208.
- Nelson, R. W., D. Nedelkov and K. A. Tubbs (2000), BIACORE and Mass Spectrometry: Identification of Epitope-tagged Proteins in E. coli Lysates, *BIAjournal*, **7(1)**, 25-26.
- Dubs, M. C., D. Altschuh and M. H. V. V. Regenmortel (1991), Interaction between viruses and monoclonal antibodies studied by surface plasmon resonance, *Immunology Letters*, **31**, 59-64.
- Nice, E. C., T. L. McInerney, D. C. Jackson (1996), Analysis of the interaction between a synthetic peptide of influenza virus hemagglutinin and monoclonal antibodies using an optical biosensor, *Immunology*, **33**, 659-670.
- Tung, J. S., J. Gimenez, C. T. Przywiecki and G. Mark (1998), Characterization of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen Using Surface Plasmon Resonance, *J. Pharmaceutical Sciences*, **87(1)**, 76-80.
- Gomara, M. J., G. Ercilla, M. A. Alsina, I. Haro (2000), Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology, *J. Immunological Methods*, **246**, 13-24.
- Bazarsuren, A. and S. Panzner (1999), Re-use of Thiol Coupled Surfaces at Different Ligand concentrations, *BIAjournal*, **6(2)**, 25-26.
- Bruno, J. (1998), Validating BIACORE Assays, *BIAjournal*, **5(2)**, 9-11.
- Magnusson, R., B. Rosenbrand, M. Wouda and E. Mascher (1997), Quantitative Process Analysis of Pantarin Using BIACORE^R Probe, *BIAjournal, Special Issue*, 31-31.
- Karlsson, R., H. Roos, J. Bruno and L. Stolz (1997),

- Practical Aspects Concerning Direct Detection of Low Molecular Weight Analytes Using BIACORE 2000[®], *BIAjournal*, **Special Issue**, 18-21.
13. Haemaelaenen, M. and F. Markey (1998), Sorting the sheep from goats: screening for low molecular weight binders with BIACORE, *BIAjournal*, **5(2)**, 12-17.
 14. Takacs, M. A., S. J. Jacobs, R. M. Bordens and S. J. Swanson (1999), Detection and characterization of antibodies to PEG-IFN-2b using surface plasmon resonance, *J. Interferon and Cytokine Research*, **19**, 781-789.