

비육우에서 이식형 bovine somatotropin 지속성 제형의 blood profile test

김 남 중*

혜천대학 애완동물과
(게재승인: 2009년 03월 23일)

Blood profile test of sustained release formula of implantable bovine somatotropin in steers

Nam Joong Kim*

Department of Companion Animal, Hyecheon College, Daejeon 302-715, Korea
(Accepted: March 23, 2009)

Abstract : The present study was carried out to examine the sustained release effect of the implantable bovine somatotropin (SRI-BST) formula. In the blood profile test in steers, the bovine somatotropin concentration in serum by radioimmunoassay showed the peak concentration on the first day after the implantation of the SRI-BST formula, and concentration proceeded for 5 days ($p < 0.05$). The insulin-like growth factor-1 concentration showed the peak concentration on the seventh day after implantation of the SRIF-BST formula, and concentration proceeded for 10 days ($p < 0.05$). The glucose showed the peak concentration on the first day after implantation of the SRI-BST formula, and concentration continued for 3 days ($p < 0.05$). The blood urea nitrogen showed the lowest concentration on the third day after implantation of the SRI-BST formula, and concentration continued for 7 days ($p < 0.05$). These results proved that the SRIF-BST formula was the sustained release effects in steers.

Keywords : bovine somatotropin (BST), IGF-1, implantable, sustained release

서 론

Somatotropin은 약 190개 정도의 아미노산으로 이루어져 있으며, 약 22,000 dalton의 큰 분자량을 갖는 단백질 호르몬의 일종이다 [26]. 재조합 DNA 기술의 발달로 somatotropin을 효모나 대장균과 같은 미생물을 이용하여 발효 및 정제 과정을 통해 대량 생산이 가능하게 되었다 [18, 19, 25]. 그러나 somatotropin은 반감기가 짧아 원하는 효과를 얻으려면 대상 동물에 빈번하게 투여해야 한다. 그러므로 somatotropin을 지속성 제형으로 제조하여 동물에 투여하므로 약물의 편리성을 추구하고자 많은 연구들이 진행되었다 [2, 3, 6, 8-10]. 본 연구는 일전에 보고된 “somatotropin 이식 제형 개발과 지속적 방

출 효과” [1]의 연속적인 연구로서 이전 연구에서는 *in vitro* test와 랫드의 weigh gain assay를 이용하여 지속 효과를 검증하였으나, 본 연구에서는 이식형 bovine somatotropin(BST) 지속성 제형의 투여 대상 동물인 소를 사용하여 혈액 내 somatotropin의 지속 효과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

이식형 BST 지속성 제형의 제조

BST 용액을 동결 건조하여 분말 형태로 제조하였다. 분말 형태로 제조된 BST는 polyethylene glycol 8000 (PEG)과 4 : 1 비율로 혼합하였다. 이렇게 혼합된 BST-

*Corresponding author: Nam Joong Kim
Department of Companion Animal, Hyecheon College, Daejeon 302-715, Korea
[Tel: +82-42-580-6216, Fax: +82-42-580-6320, E-mail: njkim@hu.ac.kr]

PEG 분말 5 g을 50 ml의 conical tube에 넣고, 두 분말을 균질하게 혼합시키고 물성을 치밀하게 할 목적으로 직경 3 mm의 stainless steel ball 을 사용하여 vortex mixer 에서 혼합과 분쇄 과정을 수행하였다. 제조된 혼합물 25 mg을 정량하여 타정기(EK-0; Erweka, Germany)를 이용하여 직경이 3 mm, 길이가 3.5 mm인 펠렛을 직타법으로 제조하였다. 이렇게 제조된 펠렛은 poly L-lactide(Inherent viscosity 0.99 dl/g in CHCl₃)와 pluronic F-68로 코팅 용액을 제조하여 Hi-coater(HCT-30; Freund, USA)를 사용하여 코팅하였다.

Blood collection for assay

체중이 350-450 kg 홀스타인 비육우 4마리를 사용하여 마리 당 이식형 BST 지속성 제형 250 mg(제형 내 포함된 BST 용량 200 mg)을 내경이 3.4 mm, 외경이 4.5 mm, 길이 55 mm인 주사침이 부착된 implant gun(Revarol gun, Australia)을 사용하여 견갑골 위쪽 피하에 삽입하였다. 혈액 샘플 채취는 투여 직전, 투여 후 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 18일, 21일에 혈청 분리용 6 ml Vacutainer(Becton Dickinson, USA)와 21 G 1.5 inch blood collection needle 및 needle holder(Becton Dickinson, USA)를 사용하여, 보정틀에 비육우를 보정하고 미정맥에서 혈액 약 6 ml을 채취하였다. 채취된 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 분석 전까지 냉동하여 보관하였다.

혈청 내 BST 농도 분석

BST의 ¹²⁵Iodine 표지

1 mg/ml BST standard sample(UCLA Medical Center, USA) 1 tube를 꺼내 녹여 준비하고, 깨끗한 0.5 ml microcentrifuge tube에 정제수 7 µl를 가하고 여기에 준비된 1 mg/ml의 3 µl BST stock을 가했다. 이 tube에 0.5 M phosphate buffer를 20 µl를 첨가하였다. 50 µl micro-syringe를 사용해 ¹²⁵Iodine(Amersham Pharmacia, UK)를 5 µl 취하여 이 tube에 넣었다. 이 tube에 0.4 mg/ml chloramine-T(Sigma, USA) 10 µl를 넣고 45초 동안 반응시켰다. 여기에 1 mg/ml sodium metabisulfite(Sigma, USA) 20 µl를 넣고 조심스럽게 혼합하여 반응시켰다.

¹²⁵Iodine이 표지된 BST의 분리

Sephadex G-25 prepacked PD-10 column(Amersham Pharmacia, UK)에 0.1% bovine serum albumin, 150 mM NaCl, 25 mM Tris buffer(pH 7.5)을 흘려주어 column 내부 채워준 후, 표지 반응이 끝난 용액을 이 column에 전량 가하여 주었다. 그런 다음 150 mM NaCl, 25 mM Tris buffer(pH 7.5)를 지속적으로 가해, 1 ml의 0.1%

bovine serum albumin, 150 mM NaCl, 25 mM Tris buffer가 채워져 있는 50개의 10 ml짜리 borosilicate glass tube(Corning, USA)에 10방울씩 fraction을 받았다. 이 tube를 진탕 혼합한 후, 10 µl씩 취해 automatic gamma counter(1470 Wizard; Wallac, USA)로 측정하였으며, radioactivity가 높은 몇 개의 fraction을 골라 20 µl씩을 취해 1.5 ml microcentrifuge tube에 각각 넣었고, 여기에 1% bovine serum albumin 용액 20 µl를 첨가하였으며, 다시 여기에 10% trichloroacetic acid 용액 40 µl를 가하여 진탕 혼합한 후 ice bath에서 30분 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전물과 상층액을 분리해 각각 gamma counter로 radioactivity를 측정하여 침전물의 측정값이 95% 이상의 radioactivity를 나타내는 것만을 분석에 사용하였다.

혈청 분석 방법

Total count tube와 blank tube를 준비하여 radioimmunoassay(RIA) buffer(정제수 1 l에 5 g bovine serum albumin, 100 mM Tris buffer-100 ml, 4 M NaCl-37.5 ml, 10% Tween-20 5 ml, 10% sodium azide-2 ml)이 포함된 용액) 200 µl를, 그리고 zero standard tube에는 100 µl를 채웠다. Reference standard tube에는 1 mg/ml sodium metabisulfite 용액을 100~0.2 ng/ml을 각각 100 µl씩 넣었으며, 분석할 혈청도 100 µl씩 분주하여 넣어 주었다. ¹²⁵Iodine으로 표지된 BST를 RIA buffer로 100 µl당 15,000-20,000 cpm이 되도록 희석시킨 용액을 모든 tube에 100 µl씩 채워주었다. Monkey anti-BST antiserum(UCLA Medical Center, USA) 1 vial을 RIA buffer로 150,000배 희석한 용액을 total count와 blank tube를 제외한 모든 tube에 100 µl씩 채워주었다. 모든 tube를 진탕 혼합하여 실온에서 24시간 반응시켰다. 그런 다음 total count tube를 제외한 모든 tube에 goat anti-money IgG antiserum(Cappel, USA) 1 vial을 RIA buffer로 100배 희석시킨 용액 100 µl과 normal money whole serum(Cappel, USA) 1 vial을 1,000배 희석시킨 용액 100 µl 각각 채워주었다. 진탕 혼합 후 실온에서 다시 24시간 반응시킨 후, total count tube를 제외하고, 모든 tube에 6% polyethylene glycol 8000, 150 mM NaCl 용액을 500 µl씩 채워주었다. 진탕 혼합 후 4°C에서 1시간 반응 후, total count tube를 제외한 모든 tube를 3,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 total count tube를 포함해서 gamma counter로 radioactivity를 측정하였다.

결과 분석 방법

Zero standard, reference standard와 혈청의 평균 cpm

값을 계산하여, 계산된 blank의 cpm 값을 빼주었고, zero standard의 cpm값으로 나누어 % specific binding 값을 계산하였다. 각 reference standard의 % specific binding을 y축으로, 각 standard의 농도를 x축으로 하여 표준 곡선을 그리고, 선형 회기 분석 방법으로 fitting하여 calibration curve를 그렸다. 이 calibration curve를 이용해 혈청 sample의 % specific binding에 해당되는 농도를 구하였고, 혈청의 농도가 reference standard농도보다 높으면 혈청을 RIA buffer로 희석하여 standard 농도 구간에 포함되도록 하였으며, 희석 배수를 곱하여 해당 농도를 구하였다. 이렇게 구해진 혈청 BST 농도는 이식형 BST 지속성 제형 투여 전과 투여 후 각 시점의 혈청 내 BST 농도에 유의성 검정을 위해 t-test를 실시하였다.

혈청 내 insulin-like growth factor-1(IGF-1) 농도 분석

IGF-1의 ¹²⁵Iodine 표지

10 µg lyophilized IGF-1 sample(receptor grade; GroPep, Australia) 1 tube를 꺼내어 100 µl의 10 mM HCl에 완전히 녹여 준비하고, 깨끗한 0.5 ml microcentrifuge tube에 IGF-1 용액 10 µl를 취하였다. 이 tube에 0.5 M phosphate buffer를 20 µl를 첨가하였다. 50 µl microsyringe를 사용해 ¹²⁵Iodine(Amersham Pharmacia, UK)를 5 µl 취하여 이 tube에 넣었다. 이 tube에 0.4 mg/ml chloramine-T(Sigma, USA) 10 µl를 넣고 45초 동안 반응시켰다. 여기에 1 mg/ml sodium metabisulfite(Sigma, USA) 20 µl를 넣고 조심스럽게 혼합하여 반응시켰다.

¹²⁵Iodine이 표지된 IGF-1의 분리

Sephadex G-25 prepacked PD-10 column(Amersham Pharmacia, UK)에 정제수 1 l에 1% bovine serum albumin, 4 M NaCl 37.5 ml, 1 M phosphate buffer 10 ml이 포함된 용액을 흘려주어 column 내부를 채워준 후, 표지 반응이 끝난 용액을 이 column에 전량 가하여 주었다. 그런 다음 phosphate buffer saline을 지속적으로 가해, 1 ml의 0.1% bovine serum albumin, 150 mM NaCl, 25 mM Tris buffer가 채워져 있는 50개의 10 ml짜리 borosilicate glass tube(Corning, USA)에 10방울씩 fraction을 받았다. 이 tube를 진탕 혼합한 후, 10 µl씩 취해 automatic gamma counter(1470 Wizard; Wallac, USA)로 측정하였으며, radioactivity가 높은 몇 개의 fraction을 골라 20 µl씩을 취해 1.5 ml microcentrifuge tube에 각각 넣었고, 여기에 1% bovine serum albumin 용액 20 µl를 첨가하였으며, 다시 여기에 10% trichloroacetic acid 용액 40 µl를 가하여 진탕 혼합한 후 ice bath에서 30분 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심 분

리하여 침전물과 상층액을 분리해 각각 gamma counter로 radioactivity를 측정하여 침전물의 측정값이 95% 이상의 radioactivity를 나타내는 것만을 분석에 사용하였다.

혈청 시료의 acid-ethanol extraction

5 ml의 microcentrifuge tube에 혈청 시료와 RIA buffer (1 l 정제수에 0.2 g protamine sulfate, 1 M phosphate buffer 30 ml, 250 mM EDTA 40 ml, 10% Tween-20 5 ml, 10% sodium azide 2 ml이 첨가되어 있음)를 50 µl씩을 넣고 혼합하였다. Absolute ethanol과 2N HCl이 87.5 : 12.5의 비율(v/v)로 혼합된 용액 400 µl를 가하여 진탕 혼합하고 실온에서 30분간 방치하였다. 4°C에서 10,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였고, 상층액 250 µl와 0.855 M trizma base 100 µl를 혼합해 중화시켰다. 이 중화된 샘플을 14,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심 분리한 후, RIA buffer로 8배 희석하여 시료로 사용하였다.

시료 분석 방법

Total count tube와 blank tube를 준비하여 RIA buffer 200 µl를, 그리고 zero standard tube에는 100 µl를 채웠다. Reference standard tube에는 100 w/v % trichloroacetic acid 용액을 50-0.1 ng/ml을 각각 100 µl씩 넣었으며, 분석할 혈청도 100 µl씩 분주하여 넣어 주었다. ¹²⁵Iodine으로 표지된 IGF-1을 RIA buffer로 100 µl당 15,000-20,000 cpm이 되도록 희석시킨 용액을 모든 tube에 100 µl씩 채워주었다. Rabbit anti-human IGF-1 antiserum(GroPep, Australia) 1 vial을 RIA buffer로 40,000배 희석한 용액을 total count와 blank tube를 제외한 모든 tube에 100 µl씩 채워주었다. 모든 tube를 진탕 혼합하여 4°C에서 16시간 반응시켰다. 그런 다음 total count tube를 제외한 모든 tube에 goat anti-rabbit IgG antiserum(GroPep, Australia) 1 vial을 RIA buffer로 50배 희석시킨 용액 100 µl과 normal rabbit serum(Cappel, USA) 1 vial을 5배 희석시킨 용액 100 µl 각각 채워주었다. 진탕 혼합 후 4°C에서 다시 1시간 반응시킨 후, total count tube를 제외하고, 모든 tube에 6% polyethylene glycol 8000, 150 mM NaCl 용액을 500 µl씩 채워주었다. 진탕 혼합 후 4°C에서 1시간 반응 후, total count tube를 제외한 모든 tube를 3,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 total count tube를 포함해서 gamma counter로 radioactivity를 측정하였다.

결과 분석 방법

Zero standard, reference standard와 혈청의 평균 cpm 값을 계산하여, 계산된 blank의 cpm 값을 빼주었고, zero standard의 cpm값으로 나누어 % specific binding 값을

계산하였다. 각 reference standard의 % specific binding을 y축으로, 각 standard의 농도를 x축으로 하여 표준 곡선을 그리고, 선형 회기 분석 방법으로 fitting하여 calibration curve를 그렸다. 이 calibration curve를 이용해 혈청 sample의 % specific binding에 해당되는 농도를 구하였으며, 혈청의 농도가 reference standard농도보다 높으면 혈청을 RIA buffer로 희석하여 standard 농도 구간에 포함되도록 하였으며, 희석 배수를 곱하여 해당 농도를 구하였다. 이렇게 구해진 혈청 IGF-1 농도는 이식형 BST 지속성 제형 투여 전과 투여 후 각 시점의 혈청 내 IGF-1 농도에 유의성 검정을 위해 t-test를 실시하였다.

혈청 내 glucose 및 blood urea nitrogen(BUN) 농도 분석

혈청 내 BUN과 glucose의 농도 분석을 위하여 vitalab selectra 2 analyzer(Merck, USA)을 사용하여 glucose dehydrogenase method(Merck, Gluc-DH method, USA)와 glutamate dehydrogenase method(GIDH method; Merck, USA)로 분석하였다. 이렇게 구해진 혈청BUN과 glucose 농도는 이식형 BST 지속성 제형이 투여된 후, 각 시간에 구해진 혈청 내 BUN과 glucose 농도와 투여 전 혈청 내 BUN과 glucose 농도의 유의성 검정을 위해 t-test를 실시하였다.

결 과

Fig. 1은 이식형 BST 지속성 제형 투여 후 시간에 따른 혈청 내 BST 농도를 측정된 결과로서 투여 후 1일째 최고 농도에 도달하였다가 10일째에 투여 전 수준으로 복귀되었다. 그러나 투여 전 BST 농도의 값과 유의성 있는 차이는 투여 후 5일까지 나타났다($p < 0.05$).

Fig. 2는 이식형 BST 지속성 제형 투여 후 시간에 따른 혈청 내 IGF-1 농도를 측정된 결과로서, 투여 후 7일째 최고 농도에 도달하였다가 14일째 투여 전 수준으로 복귀되었다. 그러나 투여 전 IGF-1 농도의 값과 유의성 있는 차이는 투여 후 10일까지 나타났다($p < 0.05$).

Fig. 3은 이식형 BST 지속성 제형 투여 후 시간에 따른 혈청 내 glucose 농도를 측정된 결과로서, 투여 후 1일째에 최고 농도에 도달하였다가 7일째에 투여 전 수준으로 복귀되었다. 그러나 투여 전 glucose 농도의 값과 유의성 있는 차이는 투여 후 3일까지 나타났다($p < 0.05$).

Fig. 4는 이식형 BST 지속성 제형 투여 후 시간에 따른 혈청 내 BUN 농도를 측정된 결과로서, 투여 후 3일째에 최저 농도에 도달 후 10일째에 투여 전 수준으로

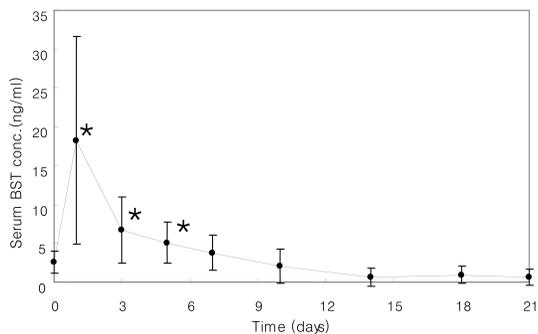


Fig. 1. Serum concentration of bovine somatotropin (BST) in steers receiving sustained release implantable formula of BST (200 mg/head). Results were expressed as the mean and standard deviation of 4 steers. *The values were significantly different from initial value ($p < 0.05$).

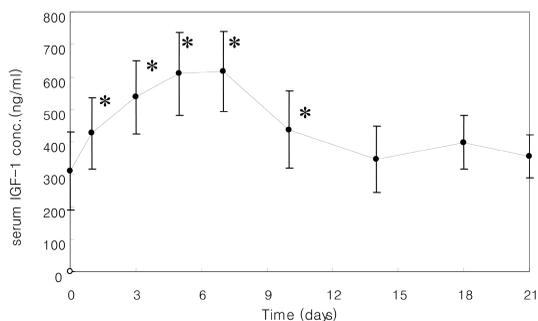


Fig. 2. Serum concentration of insulin-like growth factor-1 in steers receiving sustained release implantable formula of bovine somatotropin (200 mg/head). Results were expressed as the mean and standard deviation of 4 steers. *The values were significantly different from initial value ($p < 0.05$).

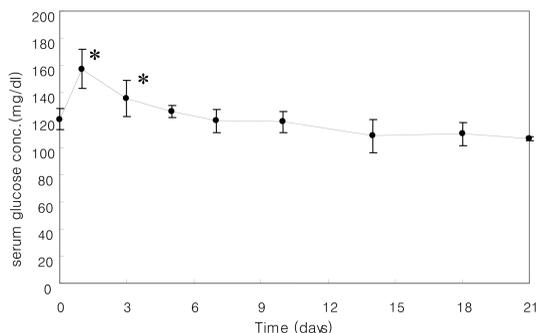


Fig. 3. Serum concentration of glucose in steers receiving sustained release implantable formula of bovine somatotropin (200 mg/head). Results were expressed as the mean and standard deviation of 4 steers. *The values were significantly different from initial value ($p < 0.05$).

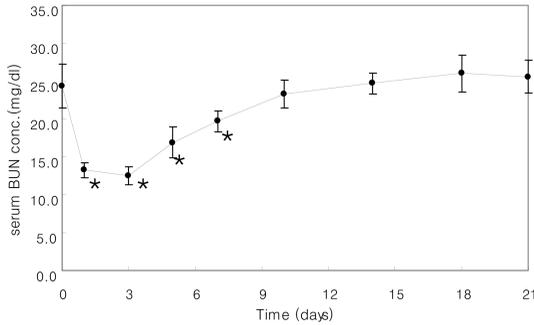


Fig. 4. Serum concentration of blood urea nitrogen (BUN) in steers receiving sustained release implantable formula of bovine somatotropin (200 mg/head). Results were expressed as the mean and standard deviation of 4 steers. *The values were significantly different from initial value ($p < 0.05$).

복귀되었다. 그러나 투여 전 BUN 농도의 값과 유의성 있는 차이는 투여 후 7일까지 나타났다($p < 0.05$).

고 찰

BST는 단백질 약물이므로 경구로 투여하면 소화 효소에 의해 분해 흡수되어 활성을 잃어버리므로 주사로 투여하여야 하고, 반감기가 서너 시간 밖에 되지 않아 자주 주사하여야 한다 [11, 16]. 그러나 BST를 동물에 자주 투여하기에는 많은 불편한 점이 있어 지속성 제형을 연구하고 있다. 한 예로 주사제 타입의 지속성 제형을 개발하고자 식물성 오일과 겔화제 등을 이용하여 유성 주사제가 연구되었다. 이런 유성 주사제는 초기 방출 효과가 매우 과다하여 지속 효과가 그리 오래 지속되지 못하는 것으로 보고되고 있다 [11, 13, 14, 24, 28]. 또 다른 연구들에서는 somatotropin의 지속 효과를 더 길게 유지하면서 용량을 일정하게 분비하고자 하는 연구들이 수행되었는데, Alza사에서 개발한 체내 삽입 기구인 osmotic pump를 사용하여 랫드나 돼지의 증체 및 사료 효율 검증 실험을 실시하였다 [2, 3, 19, 27]. 또한 비육우에서는 용량에 따른 약동력학적 시험을 실시하였다 [22]. 그러나 이런 기구들은 외과적 수술로 이식시키고 제거해야 하고, 삽입 기구의 값이 고가라는 단점이 있다. 그러므로 본 연구에서 개발한 이식 제형은 위의 단점을 보완하고자 삽입 기구들보다 지속 효과는 짧지만, 생체 분해성 고분자와 pore 물질을 사용하여 [21], BST와 PEG로 이루어진 펠렛을 코팅하므로 생체 내에 서서히 BST를 분비시키고 시간이 지나면 생체 내에 흡수되는 장점이 있어 수술적 제거가 필요 없다는 것이다.

그리고 이 실험에서 투여된 BST 200 mg의 용량은, 비록 비육우에서 6.7-200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 용량으로 다양하게 보

고되어 있지만 [7, 12, 20], 많은 문헌에서 적정 용량으로 추천되는 30-40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 을 기준으로 설정되었다 [7, 12]. 즉, 35 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 용량을 기준으로 14일 용량을 투여하였다.

이 실험 결과에서 혈청 BST와 IGF-1 농도의 혈청 profile에서 peak time의 차이가 나타나는데, Cohick 등의 연구에서도 주사용 증류수에 용해된 BST가 투여된 후 혈청 내 IGF-1 농도가 5-7시간 지연된 후에 증가되었다고 보고하고 있다 [5]. 이런 현상은 다른 BST 제형들을 투여했을 때도 마찬가지로 나타나고 있는데, BST가 간에서 IGF-1으로 전환되어 혈청으로 이행되는 과정 중의 지연 효과(lag effect)라고 보고하고 있다 [22, 24, 28].

또한 BST를 투여 시 혈청 glucose농도의 증가와 혈청 BUN농도의 감소는 여러 문헌들에서 보고된 것처럼 사료 효율을 증가시켜 체내 에너지를 더 많이 제조하고, 성장에 필요한 체내 단백질을 활발히 합성하기 위해 혈액 내 질소를 더 많이 소모하므로 나타나는 현상이라고 보고하고 있다 [4, 15, 22]. 본 실험에서 사용된 이식형 BST 지속성 제형도 혈청 glucose 농도를 몇 일 동안 지속적으로 증가시키고, 역시 BUN 농도도 일주일 가량 지속적으로 감소시키므로 섭취된 사료를 지속적으로 효율적으로 활용되고 있다고 판단된다. 그러나 앞으로의 연구에서 이런 지속적인 혈중 지표의 변화들이 성장 촉진과 사료 효율 향상에 기여하는지 유효성 시험을 통해 객관적인 검증이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에 사용된 이식형 BST 지속성 제형의 혈청 내 BST 농도는 5일까지 지속성 효과를 나타냈으며, IGF-1 농도는 10일까지 지속성 효과를 나타내었다($p < 0.05$). 또한 혈청 glucose 농도는 3일까지 지속성 효과를 나타냈으며, BUN 농도는 7일까지 지속성 효과를 나타내었다($p < 0.05$). 이와 같은 결과들로 이식형 BST 지속성 제형은 비육우에서 지속성 효과가 인정되었다.

참고문헌

1. 김남중. Somatotropin 이식 제형 개발과 지속적 방출 효과. 대한수의학회지 2008, 48, 27-32.
2. Azain MJ, Kasser TR, Sabacky MJ, Baile CA. Comparison of the growth-promoting properties of daily versus continuous administration of somatotropin in female rats with intact pituitaries. J Anim Sci 1993, 71, 384-392.
3. Azain MJ, Roberts TJ, Martin RJ, Kasser TR.

- Comparison of daily versus continuous administration of somatotropin on growth rate, feed intake, and body composition in intact female rats. *J Anim Sci* 1995, **73**, 1019-1029.
4. **Buonomo FC, Klindt J, Yen JT.** Administration of porcine somatotropin by sustained-release implant: growth factor and metabolic responses in crossbred white and genetically lean and obese boars and gilts. *J Anim Sci* 1995, **73**, 1318-1326.
 5. **Cohick WS, Plaut K, Sechen SJ, Bauman DE.** Temporal pattern of insulin-like growth factor-I response to exogenous bovine somatotropin in lactating cows. *Domest Anim Endocrinol* 1989, **6**, 263-273.
 6. **Collier RJ, Byatt JC, Denham SC, Eppard PJ, Fabellar AC, Hintz RL, McGrath MF, McLaughlin CL, Shearer JK, Veenhuizen JJ, Vicini JL.** Effects of sustained release bovine somatotropin (somatotribove) on animal health in commercial dairy herds. *J Dairy Sci* 2001, **84**, 1098-1108.
 7. **Crooker BA, McGuire MA, Cohick WS, Harkins M, Bauman DE, Sejrsen K.** Effect of dose of bovine somatotropin on nutrient utilization in growing dairy heifers. *J Nutr* 1990, **120**, 1256-1263.
 8. **Etherton TD, Bauman DE.** Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 1998, **78**, 745-761.
 9. **Gallo L, Bailoni L, Schiavon S, Carnier P, Ramanzin M, Andrighetto I, Bittante G.** Effect of slow-release somatotropin on the pattern of milk yield between and within injection intervals. *J Dairy Sci* 1997, **80**, 46-51.
 10. **Gallo L, Cassandro M, Carnier P, Mantovani R, Ramanzin M, Bittante G, Tealdo E, Casson P.** Modeling response to slow-releasing somatotropin administered at 3- or 4-week intervals. *J Dairy Sci* 1994, **77**, 759-769.
 11. **Hammond BG, Collier RJ, Miller MA, McGrath M, Hartzell DL, Kotts C, Vandaele W.** Food safety and pharmacokinetic studies which support a zero (0) meat and milk withdrawal time for use of somatotribove in dairy cows. *Ann Rech Vet* 1990, **21** (Suppl 1), 107S-120S.
 12. **Hancock DL, Preston RL.** Titration of the recombinant bovine somatotropin dosage that maximizes the anabolic response in feedlot steers. *J Anim Sci* 1990, **68**, 4117-4121.
 13. **Harn NR, Jeng YN, Kostelec JG, Middaugh CR.** Spectroscopic analysis of highly concentrated suspensions of bovine somatotropin in sesame oil. *J Pharm Sci* 2005, **94**, 2487-2495.
 14. **Hartnell GF, Franson SE, Bauman DE, Head HH, Huber JT, Lamb RC, Madsen KS, Cole WJ, Hintz RL.** Evaluation of somatotribove in a prolonged-release system in lactating dairy cows--production responses. *J Dairy Sci* 1991, **74**, 2645-2663.
 15. **Hodate K, Ozawa A, Johke T.** Effect of a prolonged release formulation of recombinant bovine somatotropin on plasma concentrations of hormones and metabolites, and milk production in dairy cows. *Endocrinol Jpn* 1991, **38**, 527-532.
 16. **Hu OY, Chang WC, Yang TS.** Pharmacokinetic properties of recombinant porcine growth hormone in pigs. *Pharmacology* 1995, **50**, 63-68.
 17. **Jenny BF, Grimes LW, Pardue FE, Rock DW, Patterson DL.** Lactational response of Jersey cows to bovine somatotropin administered daily or in a sustained-release formulation. *J Dairy Sci* 1992, **75**, 3402-3407.
 18. **Kajkowski EM, Price LA, Pausch MH, Young KH, Ozenberger BA.** Investigation of growth hormone releasing hormone receptor structure and activity using yeast expression technologies. *J Recept Signal Transduct Res* 1997, **17**, 293-303.
 19. **Klindt J, Buonomo FC, Yen JT.** Administration of porcine somatotropin by sustained-release implant: growth, carcass, and sensory responses in crossbred white and genetically lean and obese boars and gilts. *J Anim Sci* 1995, **73**, 1327-1339.
 20. **Lemal D, Renaville R, Claes V, Ruelle L, Fabry J, Burny A, Underwood LE, Ketelslegers JM.** Effect of pituitary somatotropin injections on plasma insulin-like growth factor I and somatotropin profiles in growing heifers. *J Anim Sci* 1989, **67**, 2715-2723.
 21. **Pineda LM, Büsing M, Meinig RP, Gogolewski S.** Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mater Res* 1996, **31**, 385-394.
 22. **Roeder RA, Garber MJ, Dalke BS, Kasser TR, Veenhuizen J, Schelling GT.** Effects of recombinant bovine somatotropin implants on serum concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor-I and blood urea nitrogen in steers. *Growth Regul* 1994, **4**, 101-107.
 23. **Sadaf S, Khan MA, Akhtar MW.** Production of

- bubaline somatotropin by auto-induction in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 2007, **47**, 21-26.
24. **Slaba J, Krejci P, Skarda J, Huybrechts LM, Decuypere E, Herrmann H.** Plasma profiles of somatotropin and IGF-I in dairy cows following application of two preparations of recombinant bovine somatotropin in a sustained release vehicle. *Physiol Res* 1994, **43**, 37-43.
 25. **Trepod CM, Mott JE.** A spontaneous runaway vector for production-scale expression of bovine somatotropin from *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, **58**, 84-88.
 26. **Warren WC, Bentle KA, Schlittler MR, Schwane AC, O'Neil JP, Bogosian G.** Increased production of peptide deformylase eliminates retention of formylmethionine in bovine somatotropin overproduced in *Escherichia coli*. *Gene* 1996, **174**, 235-238.
 27. **Yen JT, Klindt J, Kerr BJ, Buonomo FC.** Lysine requirement of finishing pigs administered porcine somatotropin by sustained-release implant. *J Anim Sci* 2005, **83**, 2789-2797.
 28. **Zhao X, McBride BW, Trouten-Radford LM, Golfman L, Burton JH.** Somatotropin and insulin-like growth factor-I concentrations in plasma and milk after daily or sustained-release exogenous somatotropin administrations. *Domest Anim Endocrinol* 1994, **11**, 209-216.