

유전자재조합 인터페론 알파의 HPLC-PDA에 의한 함량분석

김지현* · 박지은 · 백승권 · 김춘미* · 홍성화 · 이화정*[#] · 손여원[#]

식품의약품안전청, *이화여자대학교 약학대학

(Received December 2, 2008; Revised April 20, 2009; Accepted May 29, 2009)

The Quantitative HPLC-PDA Method for Recombinant Interferon Alpha Analysis

Gihyun Kim*, Jieun Park, Seungkwan Paek, Choonmi Kim*, Seunghwa Hong,
Hwajoung Lee*[#] and Yeowon Sohn[#]

Korea Food and Drug Administration, Enpyung-gu Nokbun-dong 5 Seoul, Korea
*Ewha Womans University Pharmacy College, 11-1 Daehyun-Dong Seodaemun-gu Seoul, Korea

Abstract — Recombinant interferon alpha-2a is an active formula for the treatment of various cancer cells like malignant melanoma and a variety of virus infection diseases like acute or chronic hepatitis. The bioassay system based on the measurement of virus inhibitory activity by interferon has been used for interferon analysis with low repeatability. Here, we developed the HPLC assay to measure reproducibly interferon alpha-2a protein content which is replaceable to the reported bioassay. This method separated interferon alpha-2a from its oxidized forms and human serum albumin used as excipients. The regression coefficient using interferon alpha-2a EP CRS is more than 0.9 in the range from 5 µg/ml to 200 µg/ml. The recovery result in the range from 15 µg/ml to 60 µg/ml is 97~104% and the precision is 0.2~1.7%. The interferon alpha contents of 5 products are about 30 µg/ml.

Keywords □ interferon alpha, HPLC, human serum albumin, content

인터페론은 바이러스에 감염되었을 때 세포 보호 활성을 나타내며 Type I과 Type II로 나누어진다.¹⁾ Type I은 초기 동일 유전자로부터 유래되었으며, 이들과는 세포 표면의 동일 수용체에 작용할 수 있을 정도로 충분한 구조적 유사성을 가지고 있다. Type I은 IFN-α, IFN-β, IFN-τ, IFN-ω가 있으며 세포의 활성화와 세포분열 조절에 중요한 역할을 한다. 이들 사이토카인은 거의 모든 세포에서 분비되어 항암작용, 바이러스 활성을 억제하는 생리활성을 가지며 감염이 되었을 때 면역조절에 관여한다. Type II는 T 세포, NK 세포에서 분비되는 IFN-γ가 있으며 Type I과 구조적으로는 유사성이 없으나 감염시 유도되어 면역조절제로서 항바이러스 활성을 가진다.^{2,3)} 현재 인터페론 제제는 백혈병, 다발성 골수종 등에 대한 항암제, 항바이러스제로 사용되고 있다.^{4,6)}

유전자재조합의약품은 일반적으로 품질관리상 생물활성시험을 요구하고 있다. 이 시험은 농도에 따라 세포나 동물에서 반응하는 생물활성 차이, 즉 역가를 측정하는 것으로 목적하는 치료효과를 알 수 있는 방법으로 설정한다.⁷⁾ 그러나 세포나 동물을 이용하는 시험방법은 국제표준품이 설정되어 있어야 하고⁷⁾ 실험환경, 동물이나 세포의 상태, 실험자 등 여러 가지 환경요인에 의하여 시험결과가 영향을 많이 받는다.^{8,9)} 이러한 단점 때문에 제조현장에서는 제조공정과 품질관리공정에서 간단하게 사용할 수 있고 시험오차가 적은 다양한 분석법을 개발하고 있다. 예를 들어 생산공정이 매우 안정화 되어 원료의약품과 완제의약품이 매우 일관성있게 생산되고 생물활성과 함량의 수치가 상관성이 있는 경우 생물활성시험은 특성분석이나 원료의약품에서만 관리하고 완제의약품에서는 함량을 측정하는 것도 그 중 하나이다. 함량을 측정하는 방법 중 HPLC 측정방법은 실험환경에 영향을 적게 받는 시험방법으로 인슐린, 인성장호르몬¹⁰⁾ 등 유전자재조합의약품이 이 방법으로 완제의약품에서 품질관리를 한다.

인터페론의 함량을 측정하는데 두 가지 문제점이 있다. 하나는

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
손여원 : (전화) 02-380-1740 (팩스) 02-387-7429
(E-mail) ywsohn@kfd.go.kr
이화정 : (전화) 02-3277-3409
(E-mail) hwalee@ewha.ac.kr

인터페론의 역가를 측정하는 여러 가지 시험방법¹¹⁾ 중 세포를 죽이는 바이러스 활성을 인터페론이 억제하는 정도를 측정하는 항바이러스 생물활성 시험법이 품질관리 시험방법으로 설정되어 가장 많이 사용되고 있는데 재현성이 낮아 기준이 70~150%로 넓은 허용범위를 가진다.¹²⁾ 시험법이 재현성이 낮으면 생산에서 가장 중요한 관리사항인 일정한 함량을 충족하고 정량하는데 어려운 점이 있다. 다른 하나는 일반적으로 주사용 건조 인터페론 알파-2a 제제는 일반적으로 안정성을 늘리기 위하여 부형제로 인혈청알부민을 추가하고 있다.¹³⁾ 이럴 경우 인혈청알부민 사용량이 많아 주성분만 분리하고, 이중 불순물을 다시 분리하여 검출하는 것이 어려워 인혈청알부민이 포함된 인터페론 제제는 순도시험이 따로 설정되어 있지 않다.¹²⁾ 이에 본 연구는 인터페론 제제의 품질관리와 제조 수준을 향상시키고자 인터페론 HPLC 함량시험법을 개발하였고 이 시험방법은 완제의약품에서 인혈청알부민 포함 여부에 관계없이 주성분인 인터페론의 함량을 간단하고 재현성 있게 분리 정량할 수 있었고 불순물로 간주하여 관리하고 있는 산화형 인터페론¹⁴⁾도 분리하여 검출할 수 있는 방법이다.

Table I – The labeled potency of interferon α -2a sample

Product name	IU/ml
A	300 만
B	300 만
C	300 만
D	300 만
E	300 만

실험방법

검체 및 시약

표준품과 검체 – 표준품은 유럽약전 표준품(EP CRS IFN alpha-2a, 약 1.63 mg/ml, 0.5 ml/vial, cat. I0320300, France)을 사용하였다. 검체는 국내 허가되어 치료제로 사용되고 있는 인터페론 알파-2a 완제의약품 5개를 대상으로 하였다. 검체는 무작위 순서로 배정하였다(Table I).

시약 – 표준품은 인산완충용액(pH7.4±0.2, NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l, Na₂HPO₄ · 2H₂O 1.44 g/l)으로 희석하였다. 알부민이 분리되는지 확인하기 위한 용액은 완제의약품의 부형제 조성을 맞추기 위하여 PBS에 인혈청알부민(Sigma, USA) 5 mg/ml, D-mannitol(Sigma, USA) 20 mg/ml, Glycine(Sigma, USA) 20 mg/ml을 넣었다.

Table II – The mobile phase A and B gradient composition of HPLC

Time (min)	A (%)	B (%)
0	84	16
5	84	16
10	74	26
25	66	34
35	54	46
40	20	80
42	20	80
50	84	16
60	84	16

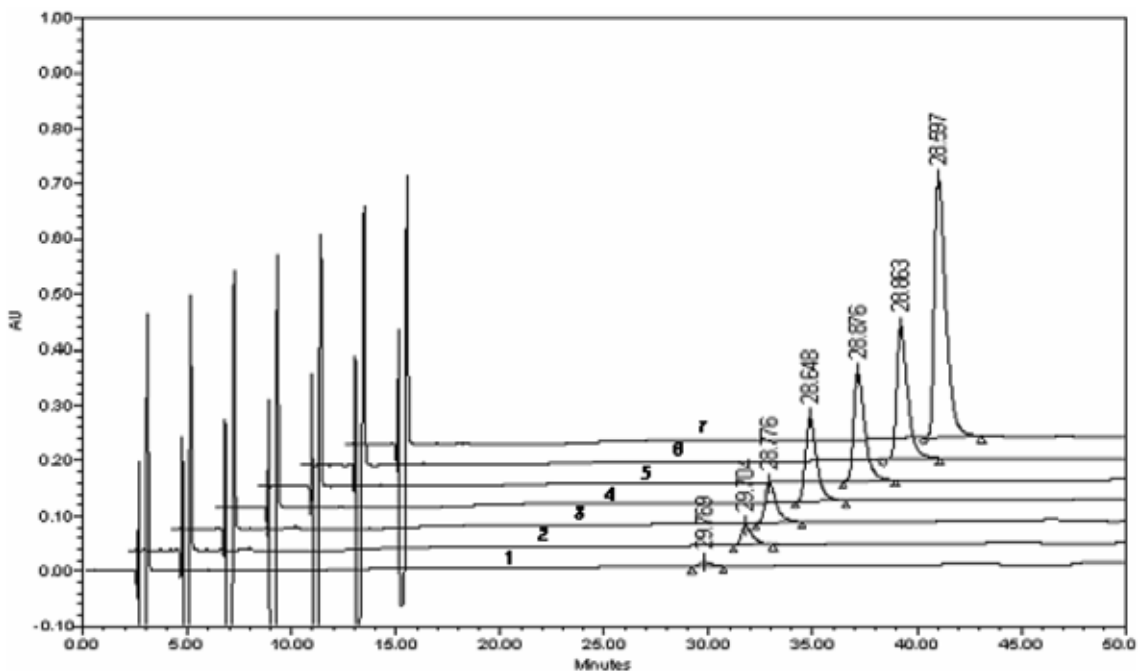


Fig. 1 – The separation chromatogram of interferon α -2a standard; 1=5 μ g/ml, 2=15 μ g/ml, 3=30 μ g/ml, 4=60 μ g/ml, 5=80 μ g/ml, 6=100 μ g/ml, 7=200 μ g/ml.

인터페론 알파 산화형 유도 - 인터페론 알파 표준품을 1 mg/ml 로 하여 이 액 400 µl에 0.25% 과산화수소(Aldrich, USA) 10 µl 를 가하여 실온에서 1시간 방치하였다. 그 후 L-methionine (Aldrich, USA) 5 mg을 가하여 실온에서 1시간 방치 후 농도를 60 µg/ml로 하였다.¹²⁾

HPLC 분석조건

HPLC 분석기기는 Waters 2690 separation module을 사용하였으며 이때 결과 수집 및 계산은 IBM 컴퓨터와 Millennium 32 software를 이용하였다. 분석용 컬럼은 Vydac 218TP54: Protein and Peptide C18(4.6×250 mm; 300 Å pore size; 5 µm particle size, Grave, USA)을 사용하였다. 이동상 A(Acetonitrile(Fluka, HPLC grade, USA) 300 ml, Distilled Water(Fluka, HPLC grade, USA) 0.15%)와 이동상 B(Acetonitrile 800 ml, Distilled Water 200 ml, Trifluoroacetic acid 0.15%)를 분석하는 동안 혼합배율을 변화시켰다(Table II). 유속은 1.0 ml/min, 검체 주입량은 100 µl, 검출과장은 UV 214 nm(Waters 996 Photodiode Array Detector (PDA), 컬럼 온도는 실온, 검체는 냉장보관하면서 분석하였다. 검량선은 Sigmaplot software 9.0을 이용하여 작성하였다.

실험결과

HPLC 시험법에 따라 인터페론을 함량을 정량할 수 있는지 확

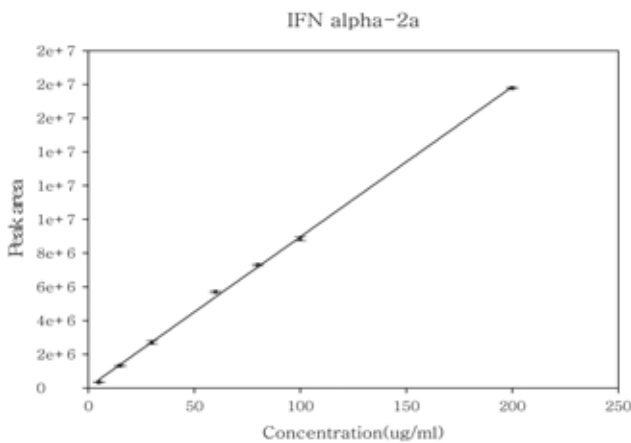


Fig. 2 - The calibration curve of interferon α-2a standard (x axis: concentration of interferon alpha, y axis: peak area of each interferon concentration).

Table IV - The linearity of interferon α-2a content 15, 30, 60 µg/ml

	1st	2nd	3rd
Calibration curve	y=97207x-92060	y=97975x-201265	y=97555x-239812
R ²	1.0	0.9994	0.9989

인하기 위하여 검량선을 작성하였다. 표준품인 EP CRS(1.63 mg/ml)를 5 µg/ml, 15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml의 농도로 인산완충용액에 희석하였고 이를 위의 시험조건으로 3회 반복 측정하였다. 주 피크는 28분대에 나타났다(Fig. 1). 계산되어진 1차 함수식은 y=89065.6x+49946.6 이고 직선성은(R²) 0.9996으로 계산되었다. x축은 재조합 인터페론 표준품 알파-2a의 농도(µg)이며, y축은 peak의 면적이다(Fig. 2).

위의 조건으로 시험법을 검증하였다. 정확도를 확인하기 위하여 각 검량선 대비 표준액 15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml에서 회수율을 계산하였다. 인터페론 함량 회수율은 97%에서 104% 이었다. 각 농도에서 정밀성은 1.7%, 1.4%, 0.2%이었다. 직선의 R² 은 1.0, 0.9994, 0.9989 이었다(Table III, IV).

완제의약품에서 주성분 함량측정이 목적이므로 부형제인 인혈청알부민, 주성분의 산화형이 분리되는지 확인하였다. 먼저 인혈청알부민이 분리되는지 시간을 확인하기 위하여 PBS에 인혈청알부민(Sigma) 5 mg/ml, D-mannitol(Sigma) 20 mg/ml, Glycine (Sigma) 20 mg/ml만으로 완제의약품의 부형제 조성을 맞춘 검체를 HPLC에 주입하였다. 인혈청알부민은 10분 내외와 22분대에 분리되었다(Fig. 3(a)). 산화형 인터페론의 분리확인인 표준품에 과산화수소를 1시간 처리하여 산화형을 유도하여 분석하였다. 산화형 인터페론과 인터페론은 26분과 28분대에 각각 분리되어 검출되었다(Fig. 3(b)).

이 시험의 목적 중 하나는 치료제로 사용되고 있는 완제의약품에서 주성분으로 들어있는 인터페론 정량이 목적이므로 현재 시판되고 있는 검체를 제품별로 3개씩 검체마다 1회씩 HPLC 주입하여 피크면적과 피크유지시간을 측정하였다. 건조제 검체

Table III - The recovery of interferon α-2a content 15, 30, 60 µg/ml

Numerical value (µg/ml)	Peak area	Measured value (µg/ml)	Recovery (%)	Average recovery (%)±SD
15	1373968	15.1	101	102±1.7
	1311230	15.4	103	
	1280841	15.6	104	
30	2815435	29.9	100	99±1.4
	2673664	29.3	98	
	2600857	29.1	97	
60	5747491	60.0	100	100±0.2
	5698653	60.2	100	
	5642163	60.3	101	
Maximum (%)	104	Minimum (%)	97	

*Recovery=(measured value/numerical value)*100

*Measured value=(peak area-intercept)/slope of linear curve

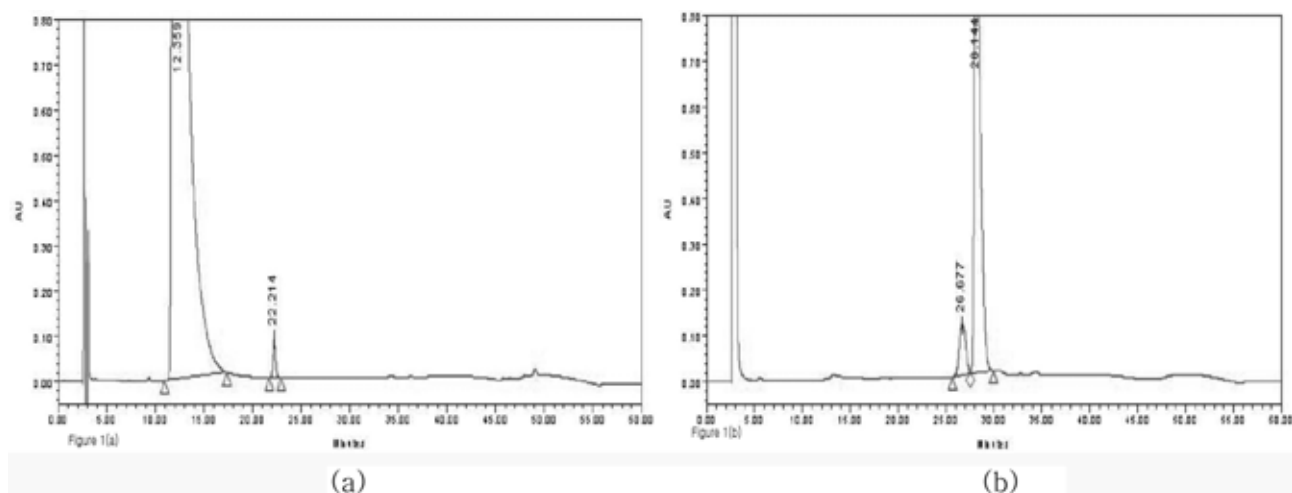


Fig. 3 – The separation of interferon alpha-2a, oxidized interferon alpha-2a, human serum albumin. (A) human serum albumin, (B) interferon alpha-2a and oxidized form.

Table V – The repeatability of peak retention time. The main peak were measured at 3 times

Products name	1st	2nd	3rd	Average	SD	RSD (%)
A	30.520	30.508	30.598	30.542	0.049	0.16
B	30.506	30.572	30.578	30.555	0.043	0.14
C	30.631	30.475	30.452	30.519	0.097	0.32
D	30.537	30.464	30.477	30.493	0.039	0.13
E	30.172	29.603	29.762	29.846	0.294	0.98

4개는 인산완충용액(1 ml)으로 녹여 시험에 사용하였고, 액상제 제 검체 1개는 희석하는 과정이 없이 그대로 시험에 사용하였다. 모든 인혈청알부민이 들어 있는 검체(A, B, C, D)에서는 알부민 함유여부(피크 유지시간 10분대)에 관계없이 일정한 피크 유지 시간(피크유지시간 30분대)을 유지하면서(Fig. 4(a), (b), (c), (d), Table V) 분리되었고 알부민이 없는 검체(E)는 인터페론만 피크 유지시간 30분대에서 주피크로 관찰되었다(Fig. 4(e), Table V). 모든 검체에서는 산화형 인터페론의 정량이 불가능했다.

위 실험에서 나온 결과는 EP CRS 표준품을 희석하여(15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml) 검량선을 작성하였고 검체의 피크면적 대비 인터페론 알파의 함량을 계산하였다. 검체마다 함량은 21.5 µg/ml, 20.9 µg/ml, 22.8 µg/ml, 27.1 µg/ml, 30.8 µg/ml 이었다. 각 검체마다 함량의 편차는 2.4%, 4.0%, 2.6%, 0.9%, 0.3% 이었다(Table VI).

고 찰

역상크로마토그래피는 분자량이 큰 단백질을 분석할 수 있는 시험방법이다.¹⁵⁾ 인터페론을 액체크로마토그래프로 분석한 시험

방법은 인터페론의 함량이 높은 원료의약품에서 산화형 인터페론의 양을 측정하는 방법¹⁴⁾과, 이 시험방법을 응용하여 함량 측정을 시도한 방법¹⁶⁾이 개발되어 있다. 또 다른 종류로는 완제의약품에서 인혈청알부민을 정량할 수 있는 방법이 있으나 이 또한 주성분이 아닌 인혈청알부민을 정량하는 방법¹⁷⁾이다. 이처럼 완제의약품은 인혈청알부민의 함량이 많아 주성분을 정량하는 시험방법을 개발하기 어렵다.

본 연구에서는 0.15% TFA가 있는 이동상에서 물질의 소수성 차이를 이용하여 분리하는 역상크로마토그래프 시험방법으로,¹⁸⁾ 완제의약품에서 인혈청알부민, 산화형 인터페론과 인터페론을 분리하여 정량할 수 있는 인터페론 함량시험법을 개발하였고 시험방법을 검증하였다. 검체의 인터페론 함량을 정량하기 위한 표준품의 직선 농도 범위 계산식은 15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml 범위로 잡았다. 이는 검체의 농도 범위를 가장 잘 반영한 구간이다. 각 농도에서 회수율은 97%에서 104%, 정밀성은 1.7%, 1.4%, 0.2%, 직선의 R²은 1.0, 0.9994, 0.9989로 만족할 만한 결과를 얻었다(Table III, IV).¹⁹⁾

완제의약품에서 사용하고 있는 부형제인 인혈청알부민이 분리되는 것을 확인은 Fig. 3의 (a)에서 보여준 것처럼 알부민 피크가 10분대와 22분에 피크가 나타나 30분대에 나오는 인터페론(Fig. 1)과 겹치지 않는 피크 유지시간을 가지면서 분리되었고 이를 검체에서 확인하였을 때도 알부민은 11분, 인터페론은 30분에 서로 겹치지 않고 분리가 되는 것을 확인하였다(Fig. 4(a), (b), (c), (d)).

산화형 인터페론은 부적절한 보관으로 인하여 생성되며²⁰⁾ 비산화형 인터페론보다 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 있다²¹⁾ 유럽약전에서 이 불순물로 간주하여 원료의약품에서 분리하여 정량하도록 하고 있다.¹⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 인터페론이

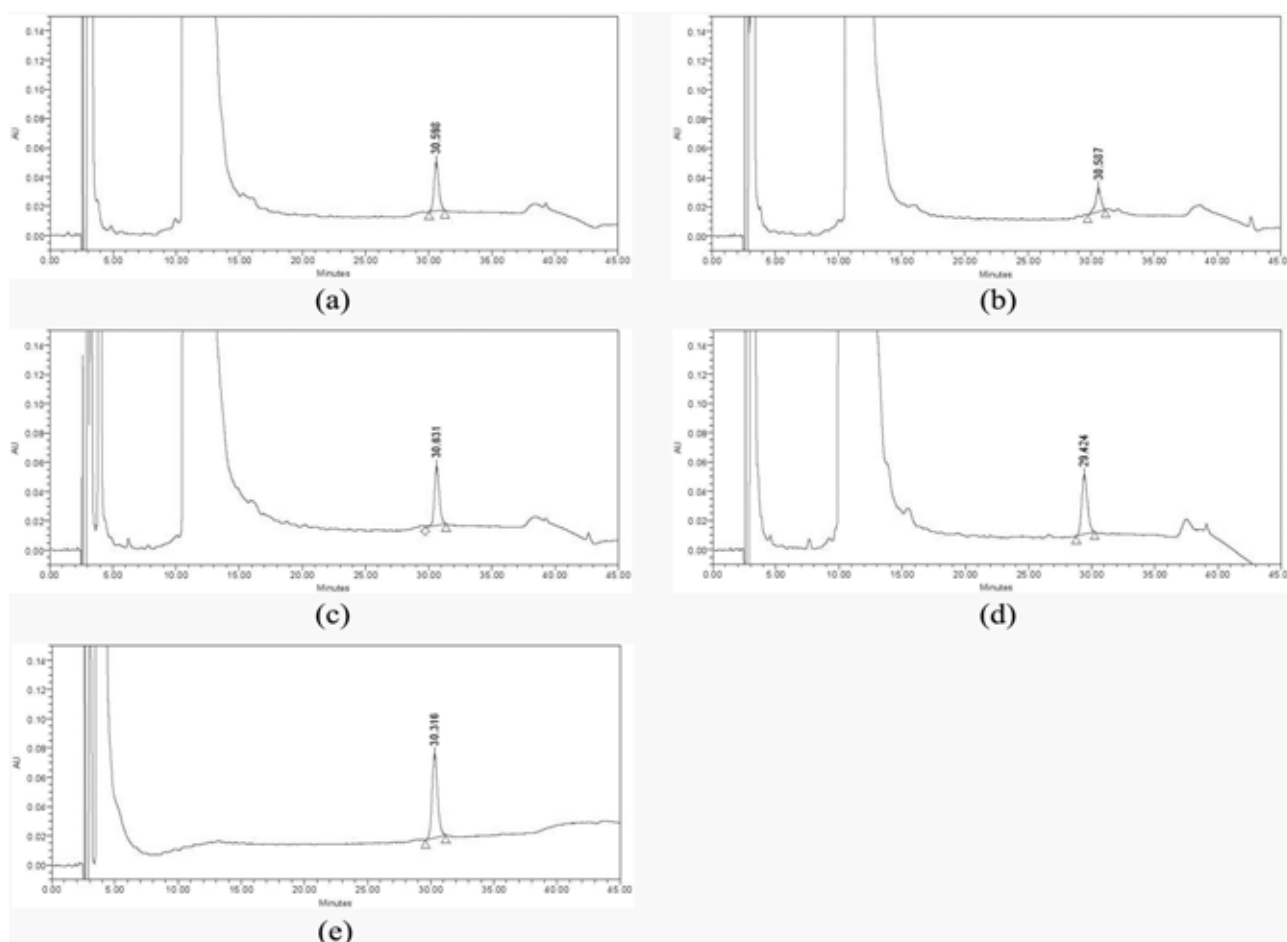


Fig. 4 – Chromatography patterns of five samples; (a) A, (b) B, (c) C, (d) D, (e) E.

Table VI – The interferon alpha-2a content ($\mu\text{g/ml}$) was calculated from serially diluted standard calibration curve

Products name	1st	2nd	3rd	Average	SD	RSD (%)
A	22.06515	21.12777	21.18859	21.5	0.52452	2.4
B	21.13916	21.60495	19.97027	20.9	0.84216	4.0
C	22.22130	22.69521	23.37848	22.8	0.58174	2.6
D	26.82330	27.16265	27.29480	27.1	0.24322	0.9
E	30.73906	30.76189	30.90006	30.8	0.08711	0.3

부형제와 분리되는 것 뿐 아니라 불순물인 산화형을 분리되어 검출될 수 있어야 하므로 이를 확인하였다. 연구결과는 Fig. 3(b)에서 보여주는 바와 같이 주성분인 인터페론과 분리도(peak resolution) 4로 잘 분리되었다(기준: 분리도 1.5 이상²²). 그러나 시험에 사용된 검체에서는 검출감도 때문에 산화형 불순물 정량이 불가능했다(Fig. 4).

실제 인혈청알부민이 함유된 제품에서 인터페론 주피크가 잘 분리되었다. 주피크의 유지시간도 30분에서 일정하게 잘 유지하고 있었으며 편차도 적었다(Table V).

검증한 RP-HPLC 시험조건으로 완제의약품에서 함량을 측정하였다. 검체별로 함량은 $21.5 \mu\text{g/ml}$, $20.9 \mu\text{g/ml}$, $22.8 \mu\text{g/ml}$, $27.1 \mu\text{g/ml}$, $30.8 \mu\text{g/ml}$ 이고 함량의 편차는 2.4%, 4.0%, 2.6%, 0.9%, 0.3%이었다(Table V). 함량이 검체마다 다른 것은 제조회사마다 원액의 비활성이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 시험결과에 따르면 각 회사별 검체 3개 반복시험 결과내에서도 편차가 있었다. 검체 D와 E는 검체내 함량 충전량 편차가 작고(약 1% 미만), 적은 정도이지만 B 경우 다른 검체보다 함량 충전량 차이가 편차가 있는데(4%) 이는 완제의약품의 주성분 혼합이 일정함의 정도에 차이가 있는 것이 이유로 생각된다. 즉 이 실험에서 보여준 바에 따르면 완제품에서 주성분 함량이 편차가 큰 제품의 경우 인터페론의 생물활성시험법의 한계로 항바이러스 생물활성시험으로는²³ 그 함량 편차를 판단하기 어렵다. 이 경우 HPLC 시험을 이용하면 제품에서 함량의 균질성을 평가할 수 있을 것이다.

본 결과에서 제시하고 있지는 않으나 인터페론 알파-2b의 제제도 같은 시험방법으로 분석할 수 있었다. 이 시험방법에서 제시한 직선범위는 $5 \mu\text{g/ml}$ 에서 $200 \mu\text{g/ml}$ 의 범위이다. 검체 300

만 IU의 함량이 약 30 µg/ml 내외인 것을 볼 때 1800만 IU와 3000만 IU도 본 시험방법의 정량범위를 조절하던가 희석의 과정을 거치면 함량측정이 가능할 것이다.

HPLC를 사용하는 시험방법은 생물활성을 측정하는 시험법과 달리 빠르고 간편하고 재현성이 좋아 제조현장에서 공정관리나 품질검사로 활용하기에 적합하다. 생물의약품 중 공정관리가 잘 되는 제조조건하에서 일정 단백질 함량이 항상 일정한 생물활성, 즉 비활성이 일정하다는 특성²⁴과 생물활성과 함량과의 상관관계가 잘 밝혀진 경우, 함량시험을 품질관리에 활용할 수 있을 것이다. 이 시험방법이 공정관리에 사용되기 위해서는 실제 적용하는 생산현장에 적용시키는 검증이 필요하다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년 식품의약품안전청 연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 본 연구의 내용은 식품의약품안전청의 공식입장과 다를 수 있습니다.

참고문헌

- 1) Issac, A. and Lindenmann, J. : Virus interference I. The interferon: *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **147**, 258 (1957).
- 2) Meager, A., Interferon Alpha, Beta and Omega : *Cytokines*, Academic Press. UK pp361-380 (1998).
- 3) Edward, De M. and Jaqueline, De M. : *The Cytokine Handbook*, 3rd Edition, Academic Press, UK, pp491-516 (1998).
- 4) Mahon, F. X., Fabères, C., Pueyo, S., Cony-Makhoul, P., Salmi, R., Boiron, J. M., Marit, G., Bilhou-Nabera, C., Carrère, A., Montastruc, M., Pigneux, A., Bernard, Ph. and Reiffers, J., Response at three months is a good predictive factor for newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated by recombinant interferon-alpha. *Blood* **92**, 4059 (1998).
- 5) Kirkwood, J. : Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin. Oncol.* **29**, 18 (2002).
- 6) Bayraktar, Y., Koseoglu, T., Somner, C., Kayhan, B., Temizer, A., Uzunalimoglu, B., De Maria, N. and Van Thiel, D. H. : The use of deferoxamine infusions to enhance the response to interferon- α treatment of chronic viral hepatitis B. *J. Viral Hepat.* **3**, 129 (1996).
- 7) Federici, M. Marcia : The Quality control of biotechnology products. *Biologicals* **22**, 151 (1994).
- 8) Yuan-yuan H. Chui, John L. Gueriguian : *Drug Biotechnology Regulation-Scientific Basis and Practices*, Marcel Dekker Inc. pp341-354 (1991).
- 9) Mire-Sluis, A. R., Page, L. and Thorpe R. : Quantitative cell line based bioassays for human cytokines. *J. Immunol. Methods* **187**, 191 (1995).
- 10) European Pharmacopoeia 2007 Somatropin concentrated solution, 1110 (2007).
- 11) Meager, A. : Biological assays for interferons. *Journal of Immunological Methods* **261**, 21 (2002).
- 12) 식품의약품안전청 고시, 제2005-70호, 생물학적제제기준및시험방법, 주사용 건조 인터페론 2알파-2a.
- 13) Geigert, J., Ziegler, D. L., Panschar, B. M., Creasey, A. A. and Vitt, C. R. : Potency stability of recombinant (Ser-17) human interferon-beta. *J. Interferon Research* **7**(2), 203 (1987).
- 14) European Pharmacopoeia 2007 Interferon alfa-2a concentrated solution, 1110.
- 15) Itoh, H., Nimura, N., Kinoshita, T., Nagae, N. and Nomura, M. : Fast protein separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography on octadecylsilyl-bonded nonporous silica gel. *Analytical Biochemistry* **199**, 7 (1991).
- 16) EDQM, Collaborative study for establishment of an HPLC potency assay for batch consistency control of recombinant interferon alfa-2, Pharmeuropa Bio 2002.1-June (2002).
- 17) Qian, J., Tang, Q., Cronin, B., Markovich, R. and Rustum, A. : Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of human serum albumin in a lyophilized formulation of interferon alfa-2b. *J. Chromatography A* **1194**, 48 (2008).
- 18) Elton, T. S. and Reeves, R. : Microheterogeneity of the mammalian high mobility group (HMG) protein and 2 investigated by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **144**, 403 (1985).
- 19) ICH Guideline. Q2(R) : Validation of Analytical Procedures : Test and Methodology.
- 20) Hochuli, E. : Interferon immunogenicity: technical evaluation of interferon-alpha 2a. *J. Interferon Cytokine Res.* **17**(1), S15 (1997).
- 21) Ryff, J. C. : Clinical Investigation of the immunogenicity of interferon alpha 2a. *J. Interferon Cytokine Res.* **17**(1), S29 (1997).
- 22) 대한약전 9개정, 일반시험법, 액체크로마토그래피법.
- 23) FDA Guideline, Interferon test procedures : Point to consider in the production and testing of interferon intended for investigational use in humans.
- 24) ICH Guideline. Q6B : Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.