

인간 HER-2 재조합 단백질을 사용한 항 HER-2 항체 단백질의 ELISA 정량 방법 개발

정선기****† · 류창선*† · 정규진* · 송규용* · 김상겸*#

*충남대학교 약학대학, 충남대학교 형질전환복제 돼지센터, **한화케미칼 중앙연구소
(Received October 12, 2010; Revised November 25, 2010; Accepted November 25, 2010)

Development of a Quantitative ELISA for Anti HER-2 Antibodies using Human HER-2 Recombinant Proteins

Sun Ki Jung****†, Chang Seon Ryu*†, Kyu Jin Choung*, Gyu Yong Song* and Sang Kyum Kim*#

*College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea
**Hanwha Chemical R&D Center, 305-804, Korea

Abstract — HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) is a protein giving higher aggressiveness in human breast cancers. Trastuzumab is a monoclonal antibody that targets HER-2 and is known to extend survival across all stages of HER2-positive breast cancer. In this study, we attempted to development of a quantitative ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) for evaluating anti HER-2 antibodies using human HER-2 recombinant proteins to support antibody producing processes and pharmacokinetic studies. We established direct or indirect ELISA method for the trastuzumab-like protein combined human recombinant HER-2. The ELISA method will prove to be great value in quantitating anti-HER-2 antibodies levels for developing anticancer antibodies.

Keywords □ ELISA, Trastuzumab, HER-2, breast cancer

Human epidermal growth factor receptor-2(HER-2)는 유방암 환자의 20~25%에서 발현되는 유전자로, 과량으로 발현 시에 유방암(human breast cancer)을 유발한다고 알려져있다.¹⁻⁵⁾ HER-2 수용체에 결합하는 트라스투주맙(trastuzumab, Herceptin®)은 HER-2가 과발현된 전이성 유방암 여성 환자에게 사용되는 인간화 항 HER-2 단일클론항체(humanized anti-HER-2 monoclonal antibody)로서 유방암환자의 치료에 사용되고 있다. 특히, 화학요법의 전치료를 받아온 전이성 질환 환자에게 단독 투여되는 방법으로 혹은, 전치료가 없는 환자에게는 파클리탁셀(paclitaxel)과 병용 투여하는 방법으로 승인되었다.⁶⁾ 트라스투주맙의 주요 작용 기전은 과발현된 HER-2에 결합하여 HER-2의 활성을 억제하고 HER-2의 하위단계 신호전달을 저해함으로써 암세포의 증식을 억제한다. 또한 항체의 특성으로 알려져 있는 antibody dependent cell cytotoxicity(ADCC) 효과, 즉 면역세포를 유도하여 HER-2가 과발현된 세포의 사멸을 유도하여 항암효

과를 가진다.^{7,8)} Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)는 검출 항체에 peroxidase, alkaline phosphatase 등의 효소를 공유 결합시켜 항원-항체 반응을 확인하는 방법으로, 방법이 간단하고 다량 분석이 가능하여 현재 가장 널리 사용되고 있는 정량과 정성 분석법의 하나이다.^{9,10)} 본 연구는 HER-2 항원에 결합하는 트라스투주맙과 같은 항체 단백질을 대한 정량 분석법을 확립하기 위해 효소 면역 반응을 이용한 ELISA 방법을 개발하였다. 이 방법은 항체 단백질을 항암제로 개발하기 위한 과정에서 항체 생산세포주의 동정 및 단백질 정량, 약물동력학에서의 단백질 정량, 품질관리 및 제품의 전수 검사(lot release test) 등에서 핵심적인 기법으로 사용될 것이다.

실험방법

표준액 및 항체

표준액 - 표준액은 국내 허가되어 치료제로 사용되고 있는 허셉틴(한국로슈, 1 vial [292.3 mg] 중 주성분 트라스투주맙 150.0 mg) 완제의약품을 slide-A-lyzer dialysis cassettes, 10K MWCO(Thermo Fisher Scientific, cat. 66807, Waltham, MA)

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

†These authors equally contributed to this work.

를 통해 1× PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4, Sigma, cat. P3813, St. Louis, MO) 용액으로 치환하여 사용하였다.

항체 - 인간 재조합 HER-2는 GST(glutathione S-transferase)가 결합된 Abcam 사(cat. ab40048, Cambridge, UK)와 histidine/human Fc가 결합된 R&D Systems 사(cat. 1129-ER, Minneapolis, MN)의 제품을 사용하였으며 검출 항체로는 표준액 및 검액 항체의 human kappa light chain에 결합하고 HRP(horseradish peroxidase)가 공유 결합된 goat anti-human kappa light chains peroxidase antibody(Sigma, cat. A7164, St. Louis, MO)를 이차항체로 사용하였다. 인간 재조합 HER-2에 결합하는 96well plate 바닥에 코팅항체는 anti-His mouse 단일클론 항체(Roche, cat. 11 922 416 001, Basel, Switzerland)를 사용하였다. Anti-human Fc 항체로는 goat anti-human IgG(Fc) 항체(Thermo Scientific, cat. 31125, Rochester, NY)가 사용되었다. 모든 ELISA 실험은 96 well Maxisorp high protein binding capacity ELISA plate(Thermo Scientific/Nunc, cat. 439454, Rochester, NY)를 사용하였다.

완충액의 제조

코팅항체를 제조하는데 사용하는 완충액은 1× PBS buffer를 여과하여 사용하였다. 표준액 및 검액, 항체를 희석하는데 사용하는 완충액은 blocking buffer을 사용하며 1× PBS 1에 1% BSA(albumin bovine serum, Fraction V, Sigma, cat. A9647, St. Louis, MO)와 0.001% Tween 20(Sigma, cat. P9416, St. Louis, MO)을 가하고 여과하여 제조하였다. Washing Buffer는 1× PBS에 0.05% Tween 20을 가하여 제조하였다.

Anti-HER-2를 이용한 정량 방법

Anti-His 항체를 1 µg/ml의 농도로 1× PBS buffer로 희석하여 96 well Maxisorp plate에 100 µl를 넣어 코팅하여 0.1 µg/well의 단백질 양이 들어가게 하였다. Plate를 4°C에서 14~16시간 정도 배양 하였다. 배양 후 well의 용액을 버리고 washing buffer로 300 µl씩 두 번 96 well plate washer(TECAN, 96PW-TECAN CE, Grödig, Austria)를 사용하여 세척하였다. Blocking buffer를 100 µl 넣고 37°C에서 1시간 배양하였다. Well의 용액을 버리고 washing buffer로 300 µl씩 두 번 96 well plate washer를 사용하여 세척하였다. 재조합 인간 HER-2/Fc/His를 0.1 µg/ml의 농도로 blocking buffer에 희석하여 100 µl 넣고 37°C에서 1시간 배양하였다. Well의 용액을 버리고 washing buffer로 300 µl씩 다섯 번 96 well plate washer를 사용하여 세

척하였다. HRP가 결합된 검출 항체를 blocking buffer에 1:12,500 비율로 희석하여 각 well에 100 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. Well의 용액을 버리고 washing buffer로 300 µl씩 다섯 번 96 well plate washer를 사용하여 세척하였다. 각 well에 TMB(3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma, cat. T-0440, St. Louis, MO) 100 µl씩을 넣고 은박지로 빛을 차단한 후 상온에서 10분 정도 발색시켰다. 표준액의 발색 정도를 확인한 후 각 well에 0.5 mol/l 황산 용액(1 N)(삼전화학, S1410, 서울) 100 µl씩 넣고 microplate reader(Molecular Devices, SpectraMax 190, Sunnyvale, CA)를 통해 450 nm(Ref. 650 nm) 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과의 표시

실험결과는 모두 평균±표준편차로 표시하였다. 선형분석 등에 사용한 분석 프로그램은 Molecular Device 사의 SoftMax Pro 5.2 software의 ELISA-endpoint, HRP/TMB protocol을 사용하였다. 표준곡선은 프로그램의 linear regression 방법을 사용하여 선형회귀분석을 통해 산출하였다.

실험결과 및 고찰

트라스투주맙에 대한 ELISA 정량법을 구축하기 위해, 다음의 두 가지 방법을 고안하였다. 첫째로는 상업적으로 시판되는 트라스투주맙의 항원인 HER-2를 ELISA 96 well plate의 바닥에 코팅하고 이 항원에 트라스투주맙을 결합시킨 후 트라스투주맙 항체에 결합하고 효소가 공유결합으로 연결 되어 있는 항체인 이차 항체를 이용하여 검출하는 직접적인 방법이다(Fig. 1a). 둘째로는 위에서 사용한 것과 동일한 트라스투주맙의 항원인 HER-

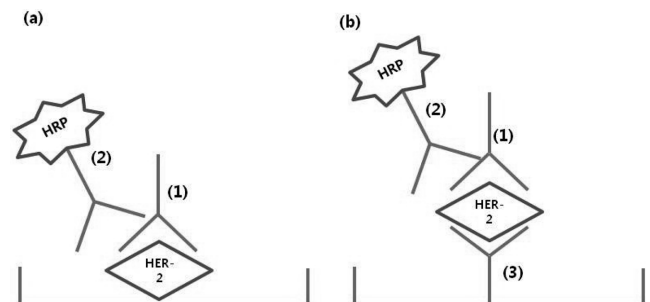


Fig. 1 - Schematic representation of (a) direct and (b) indirect ELISA method for trastuzumab using HER-2. (a) direct method: microplates were coated with a recombinant HER-2/His/Fc proteins. Trastuzumab (1) interacts with HER-2 captured in microwells. Goat anti-human kappa light chains conjugated with horseradish peroxidase (HRP) antibody (2) was used for detection of trastuzumab. (b) indirect method: as for indirect ELISA method, mouse anti-His monoclonal antibody (3) was used for coating proteins.

2에 6X-Histidine이나 GST가 공유결합으로 연결되어 있는 두 종의 상용제품인 HER-2/GST 나 HER-2/His/Fc 에 GST나 His에 결합하는 이중 항체를 ELISA plate 바닥에 코팅 시킨 후 HER-2/GST나 HER-2/His/Fc를 결합시키고 여기에 트라스투주맵을 첨가하여 결합시킨 후 이차 항체를 연속적으로 반응시켜 검출하는 간접적인 방법이다(Fig. 1b).

트라스투주맵은 유방암 세포의 표면에 존재하는 수용체 단백질인 human HER-2에 결합하여 세포 내의 신호전달 기전을 차단함으로써 세포 증식을 억제하여 효능을 나타낸다. 따라서, HER-2 수용체 단백질과 트라스투주맵 항체의 결합을 통한 ELISA 방법은 정량적으로 시험물질의 항체결합력을 측정할 수 있다. HER-2와 검액의 결합력을 정량하기 위해 먼저 ELISA plate에 검액의 항원인 HER-2를 코팅하고 검액을 바로 결합시킨 후 결합한 검액 항체를 검출 정량 하는 직접적인 방법을 고안하였다(Fig. 1a). 트라스투주맵의 항원인 human HER-2는 Abcam사의 HER-2/GST 결합 단백질과 R&D Systems사의 HER-2/His/hFc 결합 단백질을 각각 사용하였다. Abcam사의 HER-2/GST를 0.1 µg/well로 코팅하고 검출 구간을 확인하기 위해 트라스투주맵을 1,000 µg/ml에서부터 1/10배 희석하여 8 포인트로 처리한 후 트라스투주맵 항체의 Fc 도메인과 결합하는 효소결합 항체인 goat anti-human Fc-HRP(Thermo Science, cat. 31413, Rochester, NY)를 1:5,000의 비율로 희석하여 배양 후 TMB로 확인하였다. 트라스투주맵 1 µg/ml의 고농도가 되어야 완충액 농도에서의 흡광

도 값인 0.1과 구별 될 수 있는 값이 나왔으며, 이는 트라스투주맵이 1 µg/ml 농도 이상에서 검출이 가능하여 고농도의 트라스투주맵 표준액과 검액이 요구됨을 시사한다. 두 번째로 항원으로 R&D Systems 사의 HER-2/His/Fc를 코팅 단백질로 사용하고 트라스투주맵을 1 µg/ml부터 1/10 희석하여 동일한 방법으로 처리하였다. 이 경우 트라스투주맵 0.001 µg/ml 이상에서 완충액 농도의 흡광도 값인 0.01보다 높은 0.04 이상 그리고 0.1 µg/ml에서는 1.0 이상의 OD 값을 보여 0.001 µg/ml에서 0.1 µg/ml 사이에서 비례적으로 반응할 것으로 추정하였다(Table Ia). 실제로 1:5,000의 희석농도에서 0.01 µg/ml에서 0.0006 µg/ml까지 1/2 희석한 5 포인트에서 $R^2=0.99$ 이상의 직선성을 구하였다(Table Ib). 이상의 결과는 Abcam 사의 HER-2를 사용했을 때 트라스투주맵의 검출범위가 1 µg/ml 이상 인 것에 반해 R&D Systems 사의 HER-2/His/Fc를 사용할 때 0.01 µg/ml로 검출감도가 높아 소량의 시료도 검출할 수 있었다. 최종적으로 농도 범위를 0.05 µg/ml부터 1/2 희석한 결과 0.025~0.0016 µg/ml 사이에서도 $R^2=0.99$ 이상의 직선성을 얻었다(Table Ic, Fig. 2a).

간접적인 ELISA 방법으로 HER-2에 공유 결합되어 있는 펩타이드를 매개로 하여 시료를 평가하는 방법을 구축하기 위해 HER-2 항원에 연결되어 있는 GST와 HIS에 대한 항체를 먼저 코팅하였다(Fig. 1b). R&D Systems 사의 HIS를 사용하기 위해 Anti-His 항체를 1.0 µg/ml로 코팅하고 HER-2/His를 0.001, 0.01, 0.1 µg/ml로 반응시키고 트라스투주맵을 1,000 µg/ml부터

Table I – Direct ELISA method for trastuzumab using HER-2/His/Fc

(a) Concentration range of trastuzumab is 8 points from 1 µg/ml by 10-fold dilution

Trastuzumab (µg/ml)	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001	0.000001	0.0
1 : 5,000								
Average OD	2.324	1.882	0.554	0.068	0.015	0.009	0.010	0.011
±SD	±0.118	±0.095	±0.066	±0.004	±0.002	±0.001	±0.002	±0.001
1 : 10,000								
Average OD	1.554	1.164	0.308	0.044	0.010	0.006	0.004	0.010
±SD	±0.052	±0.013	±0.004	±0.001	±0.001	±0.001	±0.005	±0.004

(b) Concentration range of trastuzumab is from 0.01 µg/ml by 2-fold dilution

Trastuzumab (µg/ml)	0.01	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0.0003	0.0001	0.0
1 : 5,000								
Average OD	0.554	0.275	0.147	0.089	0.047	0.028	0.019	0.012
±SD	±0.066	±0.012	±0.0	±0.004	±0.001	±0.002	±0.0	±0.001

(c) Concentration range of trastuzumab is from 0.05 µg/ml by 2-fold dilution

Trastuzumab (µg/ml)	0.05	0.025	0.013	0.006	0.003	0.0016	0.0008	0.0
1 : 5,000								
Average OD	1.193	0.739	0.440	0.239	0.130	0.066	0.056	0.007
±SD	±0.121	±0.063	±0.028	±0.033	±0.011	±0.003	±0.019	±0.001

Coating concentration of HER-2/His/Fc is fixed by 1.0 µg/ml. Each dilution concentration of detection antibody is 1 : 5,000 and 1 : 10,000.

Three independent experiments of triplicate samples were done and results are shown as mean±S.D.

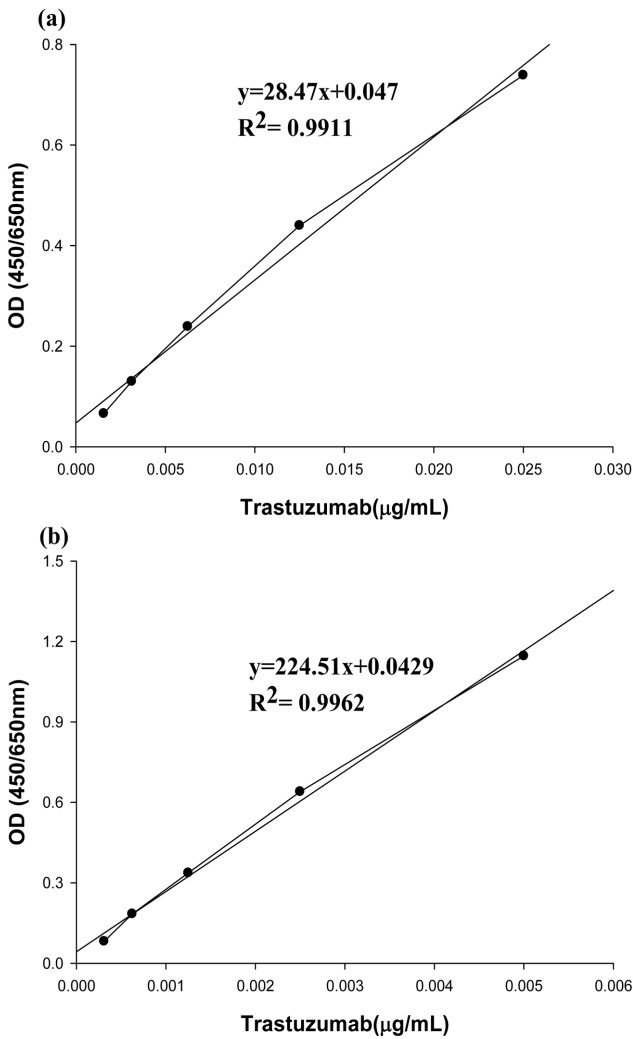


Fig. 2 – (a) The calibration curve of trastuzumab standard in direct ELISA method using HER-2 from R&D Systems (b) The calibration curve of trastuzumab standard in indirect ELISA method using HER-2 from R&D Systems (X axis: concentration of trastuzumab, y axis: optical density at wavelength 450 nm).

1/10 희석하여 10개의 농도 범위에서 트라스투주맙 항체의 경사슬에 결합하는 검출항체인 goat anti-human kappa light chain-HRP(1 : 5,000 배율)로 평가하였다. 이 경우 트라스투주맙 Fc와 결합하는 HRP-goat anti-human Fc(Thermo Scientific, cat. 31114, Rochester, NY)는 항원으로 사용한 HER-2 단백질과 공유결합으로 연결되어 있는 human Fc가 존재하기 때문에 사용할 수 없었다.

매개되는 HER-2의 농도가 0.001 µg/ml의 농도일 때 모든 트라스투주맙의 농도 범위에서 흡광도의 차이가 없었으며, 이는 HER-2/His 단백질이 코팅 항원보다 1000배 낮은 농도이기 때문에 anti-His 항체에 결합되지 않은 것으로 보인다(Table II). 검출항체를 1 : 5,000으로 희석 사용 시 background 값이 0.4의 높은 값이 나와 이후 검출항체의 농도를 1 : 10,000으로 희석하고 HER-2의 농도를 0.01 µg/ml과 0.1 µg/ml을 사용하였으며 트라스투주맙은 1 µg/ml에서부터 1/10씩 희석하여 8 농도 범위를 평가하였을 때 0.001 µg/ml 이상에서 background와 구별되는 흡광도 값을 보였다. HER-2를 0.1 µg/ml로 처리하였을 때 트라스투주맙 농도 1~0.001 µg/ml 범위에서 흡광도가 증가하는 추세를 보였으나 HER-2 0.01 µg/ml은 트라스투주맙 최고 농도인 1 µg/ml에서도 흡광도가 낮고 농도의존적인 증가를 보이지 않았다(Table IIIa). 이후 실험에서 HER-2의 농도를 0.1 µg/ml로 고정하고 트라스투주맙을 0.1 µg/ml에서 1/2씩 희석하여 8 포인트에서 실험한 결과 0.0125 µg/ml부터 0.0016 µg/ml 구간에서 R 계값값이 0.9846인 직선성을 얻었다(Table IIIb). 이러한 HER-2 매개의 간접적 ELISA 방법은 트라스투주맙 0.02 µg/ml부터 0.00031 µg/ml까지 1/2 희석 농도 범위와 검출항체 1 : 12,500 희석 농도를 사용한 조건에서 0.01 mg/ml 이하에서 선형회귀분석으로 0.99 이상의 R² 값을 얻을 수 있었으며 트라스투주맙 0.00031 µg/ml에서 0.005 µg/ml의 직선범위를 제시하였다(Table IV, Fig. 2b).

Anti-GST 항체를 사용한 Abcam사의 HER-2/GST에 대한 간접적 ELISA 방법의 경우 HER-2를 처리하지 않은 대조군과 같

Table II – Indirect ELISA method for trastuzumab using HER-2/His/Fc at a broad concentration range of trastuzumab

Trastuzumab (µg/ml)	1000	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0
HER-2 (0.001 µg/ml)								
Average OD	0.535	0.492	0.496	0.500	0.489	0.486	0.481	0.408
±SD	±0.014	±0.008	±0.011	±0.006	±0.001	±0.013	±0.028	±0.001
HER-2 (0.01 µg/ml)								
Average OD	1.298	1.266	1.214	1.277	1.207	1.186	1.091	0.390
±SD	±0.004	±0.021	±0.006	±0.001	±0.071	±0.008	±0.050	±0.021
HER-2 (0.1 µg/ml)								
Average OD	3.580	3.558	3.600	3.656	3.647	3.280	2.296	0.357
±SD	±0.027	±0.025	±0.019	±0.038	±0.062	±0.141	±0.304	±0.006

Coating concentration of Anti-His antibody is fixed by 1.0 µg/ml. Dilution concentration of detection antibody is 1 : 5,000. In the concentration 0.001 µg/ml HER-2, optical density data of Anti-His coating antibody 2.0 µg/ml is similar to that of 1.0 µg/ml. Two independent experiments of triplicate samples were done and results are shown as mean±S.D.

Table III – Indirect ELISA method for trastuzumab using HER-2 below 1 µg/ml concentration of trastuzumab

(a) Comparison between 0.01 µg/ml and 0.1 µg/ml of HER-2

Trastuzumab (µg/ml)	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001	0.000001	0
HER-2 (0.01 µg/ml)								
Average OD ±SD	0.529 ±0.005	0.500 ±0.035	0.369 ±0.018	0.111 ±0.011	0.059 ±0.002	0.054 ±0.003	0.055 ±0.001	0.057 ±0.001
HER-2 (0.1 µg/ml)								
Average OD ±SD	1.609 ±0.028	1.594 ±0.016	0.725 ±0.016	0.137 ±0.002	0.057 ±0.0	0.051 ±0.0	0.050 ±0.0	0.053 ±0.0

(b) Linearity range of trastuzumab with 0.1 µg/ml HER-2

Trastuzumab (µg/ml)	0.1	0.05	0.025	0.013	0.006	0.003	0.0016	0
HER-2 (0.1 µg/ml)								
Average OD ±SD	1.594 ±0.016	1.543 ±0.024	1.227 ±0.014	0.870 ±0.010	0.563 ±0.030	0.349 ±0.011	0.211 ±0.003	0.057 ±0.001

Coating concentration of Anti-His antibody is fixed by 1.0 µg/ml. Dilution concentration of detection antibody is 1 : 10,000. Two independent experiments of triplicate samples were done and results are shown as mean±S.D.

Table IV – The linearity range of trastuzumab in indirect ELISA method using HER-2 from R&D systems

Trastuzumab (µg/ml)	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.00125	0.000625	0.00031	0.0
HER-2 (0.1 µg/ml)								
Average OD ±SD	2.490 ±0.047	1.888 ±0.004	1.146 ±0.036	0.640 ±0.011	0.337 ±0.008	0.184 ±0.001	0.082 ±0.007	0.010 ±0.004

Two independent experiments of triplicate samples were done and results are shown as mean±S.D.

은 OD 값을 보이며 트라스투주맙의 검출농도가 10 µg/ml 이상의 고농도이므로 효과적인 평가방법으로 사용하기 어려운 것으로 판단하였다(data not shown).

본 연구에서 트라스투주맙과 유사한 항체를 정량하기 위한 방법으로 사용이 간편하고 대량의 시료를 빠른 시간에 평가할 수 있는 방법으로 효소 면역 반응을 이용하는 ELISA 방법을 확립하였으며, 이 방법은 트라스투주맙 0.01 µg/ml에서 0.0003 µg/ml의 저 농도 검출도 검출이 가능하였다. 0.5 µg/ml 이상의 고농도에서 검출 가능한 flow cytometric assay가 몇 시간 정도에 결과를 얻을 수 있는 것에 반해, ELISA는 더 많은 시간이 필요하고 재조합 단백질을 추가로 요구하지만 1 µg/ml 이하의 저농도 항체를 검출할 수 있으며 다수의 시료를 동시에 평가할 수 있다. 또한 비임상 및 임상 시료는 상대적으로 낮은 농도의 anti-HER-2 항체를 포함하므로 ELISA 방법이 실질적인 평가방법으로 유용하다.¹¹⁾ 트라스투주맙의 제조사인 Genentech(San Francisco, CA, USA)의 관련 문헌에 ELISA 방법에 대한 기술이 매우 제한적이며 ELISA 방법에 사용한 coating 단백질인 HER-2 수용체의 extracellular domain(p185^{HER2/neu})은 상업적으로 구입할 수 없다.¹²⁻¹⁷⁾ 따라서 트라스투주맙과 유사한 bio-similar를 개발하기 위해서는 정량적이고 효율적인 ELISA 방법의 확립이 필요하다. 또한 이 ELISA 방법의 확립은 *in vitro* 평가뿐만 아니라 *in vivo* 약동력학적 연구를 위한 기본 조건이다. 본 연구에서 확립한 직

접적 ELISA 방법은 HER-2/Fc/His 재조합 단백질을 coating 단백질로 사용하여 coating 단백질로 HER-2 수용체의 extracellular domain(p185^{HER2/neu})을 사용한 Genentech 사의 ELISA 방법과 유사하다. 본 연구에서 확립된 HER-2를 매개한 간접적인 ELISA 방법은 생쥐를 사용한 트라스투주맙 및 유사 항체의 약물동력학 분석에 사용되었으며 검출 범위 내에서 혈청 내의 잔존 항체를 정량할 수 있었다(data not shown).

본 연구에서는 R&D Systems 사의 재조합 인간 HER-2가 매개되는 ELISA에는 HER-2를 코팅 단백질로 사용하는 직접적인 방법과 HER-2의 공유 결합된 단백질인 His에 대한 항체를 코팅 단백질로 사용하는 간접적인 방법을 개발하였다. 두 방법을 비교할 때 간접적인 방법은 대량 스크리닝에 적합하며 직접적인 방법은 HER-2 결합에 대한 간섭 요인을 최소화할 경우 유용한 것으로 보인다. 본 실험에서 확립한 ELISA 방법은 트라스투주맙 등의 생물의약품에 대한 연구개발 과정에서 우수한 항체생성 세포주의 선별에 사용될 수 있으며 HER-2의 결합을 매개하므로 시료의 항원 결합력까지 추정할 수 있는 장점이 있다. 또한 비임상 및 임상 시험에서 약물동력학 분석 시 혈청 내 잔존 항체의 함량을 측정할 수 있다. ELISA 실험법은 빠르고 간편하며 재현성이 좋아 제조현장에서의 품질관리 등의 항목으로 적용할 수 있으며, 이를 위해서는 추후 본 ELISA 정량법에 대한 간섭인자 제거 및 시료 안정성 등의 검증이 필요하다.

결 론

유방암 세포에서 과발현되는 HER-2 항원에 결합할 수 있는 트라스투주맵과 같은 항체 단백질에 대해 0.01 µg/ml 이하의 소량에서도 정량할 수 ELISA 방법을 확립하였다. HER-2를 코팅 단백질로 사용하는 직접적인 방법과 HER-2의 공유결합된 단백질을 매개로 이에 대한 항체를 코팅하는 간접적인 방법의 두 가지 방법을 고안하였으며 각각 표준액의 농도 범위는 0.025~0.0016 µg/ml, 0.005~0.00031 µg/ml에서 R² 0.99 이상의 직선성을 보였다. 본 연구에서 개발된 ELISA 방법은 생산세포주 개발 단계, 임상시료의 분석 또는 제조현장에서의 품질관리 항목으로 적용이 가능하며, 이 방법은 항체 단백질을 항암제로 개발하기 위한 신약개발 과정에서 항체 단백질의 역가를 측정할 수 있는 핵심적인 기법으로 사용될 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 형질전환복제되지 ERC 프로그램(grant R11-2002-100-00000-0)의 지원을 받았음.

참고문헌

- 1) King, C. R., Kraus, M. H. and Aaronson, S. A. : Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* **229**, 974 (1985).
- 2) Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W. L. : Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177 (1987).
- 3) Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R. and Aaronson S. A. : erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* **237**, 178 (1987).
- 4) Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G. and Keith, D. E. : Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707 (1989).
- 5) Moasser, M. M. : The oncogene HER-2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469 (2007).
- 6) Press, M. F. and Lenz, H. J. : EGFR, HER-2 and VEGF pathways, validated targets for cancer treatment. *Drugs* **67**, 2045 (2007).
- 7) Hortobagyi, G. N. : Overview of treatment results with trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* **28**(6 Suppl 18), 43 (2001).

- 8) Clynes, R. A., Towers, T. L. and Presta, L. G. : Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* **6**, 443 (2000).
- 9) Maple, L., Lathrop, R., Bozich, S., Harman, W., Tacey, R., Kelley, M. and Danilkovitch-Miagkova, A. : Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum. *J. Immunol. Methods* **295**, 169 (2004).
- 10) Sias, P. E., Kotts, C. E., Vetterlein, D., Shepard, M. and Wong, W. L. : ELISA for quantitation of the extracellular domain of p185HER2 in biological fluids. *J. Immunol. Methods* **132**, 73 (1990).
- 11) Piechocki, M. P., Pilon, S. A. and Wei, W. Z. : Quantitative measurement of anti-ErbB-2 antibody by flow cytometry and ELISA. *J. Immunol. Methods* **259**, 33 (2002).
- 12) Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C. and Norton, L. : Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **14**, 737 (1996).
- 13) Pegram, M. D., Lipton, A., Hayes, D. F., Weber, B. L., Baselga, J. M., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, S. A., Twaddell, T., Glaspy, J. A. and Slamon, D. J. : Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2659 (1998).
- 14) Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowski, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinnar, F. and Slamon, D. : Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* **18**, 2241 (1999).
- 15) Leyland-Jones, B., Gelmon, K., Ayoub, J. P., Arnold, A., Verma, S., Dias, R. and Ghahramani, P. : Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3965 (2003).
- 16) Baselga, J., Carbonell, X., Castañeda-Soto, N. J., Clemens, M., Green, M., Harvey, V., Morales, S., Barton, C. and Ghahramani, P. : Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2162 (2005).
- 17) Bruno, R., Washington, C. B., Lu, J. F., Lieberman, G., Banken, L. and Klein, P. : Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2+ metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* **56**, 361 (2005).