

## Proteomics & Antibody Array 기술의 개요

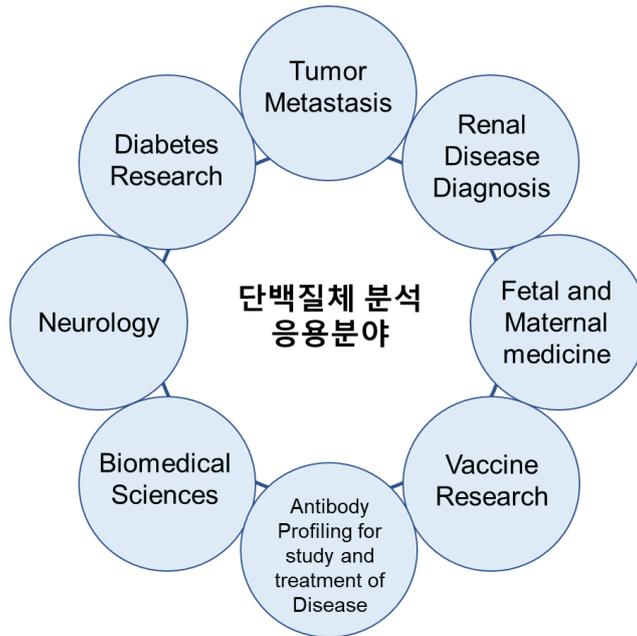


그림.1 Applications of Proteomics flow chart [1]

인간 게놈 프로젝트를 통해 인간 유전자 서열의 완전 해독이 가능해짐에 따라 DNA 서열과 같은 분자적 수준의 검정과 유전자 발현 정보를 손쉽게 얻을 수 있게 되었지만, 유전자 수준의 정보만으로는 생체 안에서 일어나는 생체분자들 간의 상호작용 전반을 이해하기에 어려움이 있다.

즉 DNA 배열 정보만으로는 단백질-DNA 상호작용과 번역 후 변형 (post-translational modification of protein)과 단백질-단백질 상호작용 등의 생명현상 전반의 중요한 정보는 제공하지 못한다. 이러한 생물체계의 정보를 얻기 위해서는 단백질 상태의 정보가 필요하다. [2][3]

실제적인 기능을 담당하는 단백질은 효소나 receptor 등의 형태로 존재하면서 다른 단백질이나 ligand, small molecule과의 상호작용을 통해 생명현상을 수행한다. 따라서 특정 단백질과 다른 생체분자와의 상호작용을 밝히는 것은 생명과학의 주된 연구과제이고, 생명현상을 다루는 보건, 의료, 제약산업의 주요 연구분야이다. [3](그림.1) 예를 들어, 혈액 속에 존재하는 단백질은 개인의 표현형 및 건강상태에 대한 측정 지표이다. 특히 죽은 세포와 주위 조직에서 분비된 단백질들은 질병에 대한 조기진단, 예후, 치료 및 예방의학적 관점에서 중요한 정보를 제공하고 있다. 현재까지 밝혀진 바로는 인체 혈액 내 존재하는 단백질은 약 30,000여 개로, 이중 최대 2,200개의 단백질이 질병의 생물학적 과정을 조율을 위해 혈액으로 분비된다. 대표적인 단백질로는 hormones, cytokines, chemokines, adipokines 그리고 growth factor 등이 있다. 이러한 단백질은 건강상태 및 질병 위험성에 대한 다양한 정보를 제공한다. [5]

### 단백질 생체지표 개발 도구와 기술 Protein biomarker discovery tools and technologies

유효한 단백질 생체지표(Biomarker)들을 확인하고 정량하는 것이 상당한 기술적 과제가 되고 있다. 실제로 단백질을 측정하기 위해서는 매우 높은 정확도, 민감도, 특이도 및 유효 정량 구간 설정이 필요하다. 기존에는, 다중 단백질을 분석하기 위해 2D gel electrophoresis를 사용하였지만, 현재는 거의 대부분 mass spectrometry(MS)와 antibody-based technologies(ABT)를 주로 사용하고 있다. MS는 고유의 분석적 장점을 가지고 있으면서 지난 10

년여 동안 현저한 기술적 진보를 이루었다. 임상 단백질체학에서 MS가 상당한 장점이 있지만 민감도, 특이도, 재현성, 분석 처리량 및 비용 등을 포함한 많은 해결해야 할 사항들이 있다. 특히 현대 임상 단백질체학에서 사용되고 있는 MS의 민감도는 nM 수준인데, pM~fM 사이의 극미량까지도 검출할 필요가 있기 때문에 MS의 기술적 부분에서 해결해야 할 사항이기도 하다. 위에서 밝힌 도구들은 모두 고유한 특성을 가지고 있어 특정 활용가능한 분야가 있지만, 각각 장비 및 인건비, 시간 소비 또는 처리능력의 제한과 같은 단점으로 인해 이용하기에 어려운 점이 있다. 따라서, 합리적인 가격과 함께 신속하고 민감하되, 극도로 전문화되거나 비용이 많이 드는 장비는 필요하지 않은 기술이 요구되고 있다. 이러한 요구조건을 충족하는 항체 어레이(Antibody array)의 장점과 유용성에 맞추어 본문을 서술하고자 한다. [6]

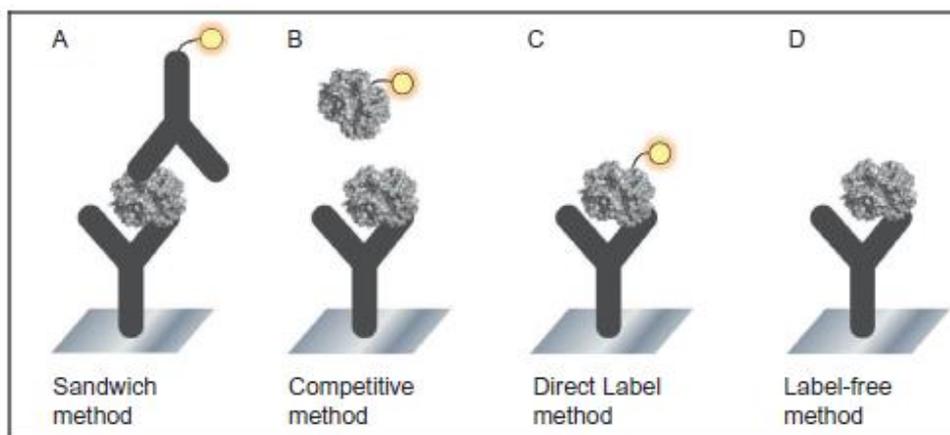
### 항체 어레이 플랫폼과 유용성 Antibody array platforms and utility

항체 어레이는 높은 특이성과 안정성을 보인다. 다수의 단백질들 속에 미량의 농도로 섞여 있는 상황에서도 특정 항원만 특이적으로 결합할 수 있게 해주며, [3] 높은 반응 안정성으로 항체 어레이 실험 과정 속에서도 결합반응이 유지된다. 또한 array간의 낮은 변동계수 (5%)에 의한 높은 재현성의 특징을 갖고 있어 강력한 기술로 널리 인식되고 있다. 다른 단백질 동정 기술에서 요구하는 depletion 및 분리 기술이 요구되지 않으며, 높은 항체의 민감성 덕분에 타겟 단백질의 picomolar, femtomolar 단위에서의 high-throughput과 high specificity를 갖추고 있다. 즉 특정 단백질과 반응할 수 있는 수십에서 수천 종류의 단백질 등을 고체(금속, 유리, 플라스틱 등)의 표면에 부착시킨 후 이들과 특이적으로 상호 반응하는 단백질의 양, 활성도, 상호작용 등을 동시다발적으로 신속하게 분석하는 화학적 검출을 위한 다중 플랫폼 시스템으로 이해할 수 있다. [7]

어레이 플랫폼은 classical ELISA와 마찬가지로, 고정된 농도를 가지는 항원 혼합물(cocktail)에 대하여 어레이 신호를 표준화 함으로써, 정량분석 결과를 얻도록 설계되기도 한다. 표준화된 혼합물(cocktail)이 없다면, semi-quantitative로 signal의 intensities를 이용하여 단백질 발현량을 상대적인 fold-change를 측정할 수 있다. Quantitative(정량) 과 Semi-Quantitative(반 정량) 분석 모두 바이오 마커 연구에서 이용된다. 초기에 대량의 단백질을 검출할 수 있는 semi-Quantitative 어레이 방법으로 pre-screening 수행하며, 그 후 후보 단백질을 선별하여 정량 (ELISA 또는 Western blot)을 통해서 검증할 수 있다.[6]

항체 어레이는 일반적으로 네 가지 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 플랫폼 중 하나에서 설계될 수 있다. (그림.1)

그림. 2 Antibody array platforms.



ELISA는 항체에 결합된 효소를 통해 항원-항체 반응을 확인하는 실험법으로, 단백질 정성, 정량 연구에 주로 사

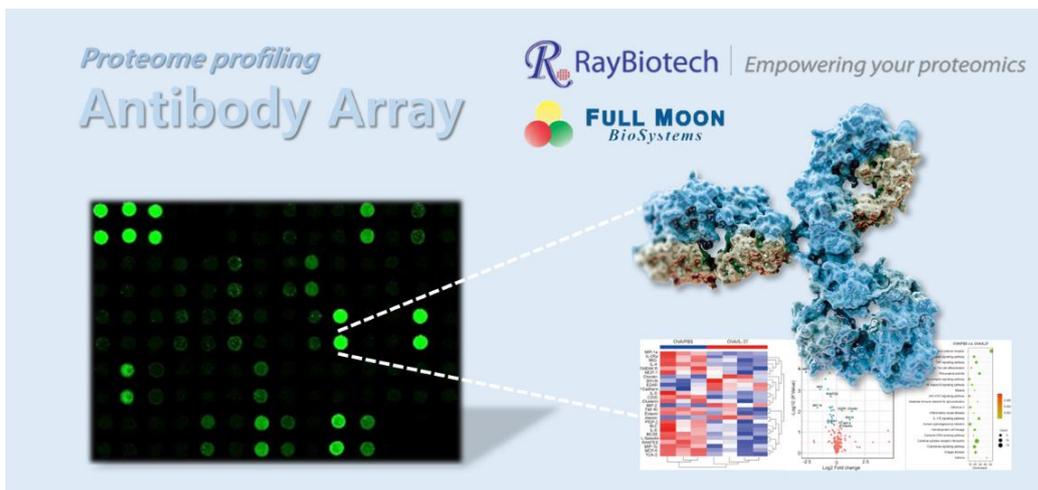
용되는 실험법이다. 첫번째로, 샌드위치 기반의 면역측정법(sandwich method)은 표적 단백질에 두 개의 특이적인 항체를 샌드위치 형태로 검출한다. 두 번째 방법은 결합경쟁을 이용한 방법으로, 형광이 conjugation된 항원과 sample을 함께 넣어 결합경쟁을 통해 신호를 탐지하게 된다. 세번째로, 직접 레이블링 접근법으로 단백질에 직접적으로 표지인자 (예: 비오틴)을 붙여서 반응시킨다. 간단하게, 다량의 샘플 screening이 가능하기 때문에 진단분야에서 주로 사용된다. 마지막으로, 라벨이 없는 접근 방식으로 분석하고자 하는 항원 그 자체로 신호를 읽는다. 항체 어레이는 연구자의 실험 요구에 따라 적용할 수 있는 플랫폼 뿐만 아니라 다양한 샘플 유형에서 단백질 표현의 변화를 식별할 수 있는 강력한 도구를 제공한다.[6][8]

항체 어레이는 단일 표적 ELISA와 Western blot에서 얻을 수 있는 것보다 훨씬 더 넓은 범위의 단백질 활성을 볼 수 있으며, 혈청, 혈장 및 세포 또는 조직 용해물을 포함한 다양한 생체 유체로부터 단백질 발현을 검출하는데 사용하게 된다. 이를 통해 특정 세포 조직 특이적인 단백질들이 발현 양상 확인, 신약 개발을 위한 잠재적 분자 표적 식별, 약물 작용의 분자 매커니즘 확인 및 질병 Biomarker 발굴에 활용될 수 있다. (Table. 1 ) [9][10]

<b>Table 1. Continued</b>					
<b>Disease studied</b>	<b>Target identified</b>	<b>Array used</b>	<b>Significance</b>	<b>References</b>	
Hidradenitis suppurativa	IL-1 $\beta$ , CXCL9, BLC	QAH-INF-3 (RayBiotech, Inc.)	Elucidating mechanisms of drug action	94	
Bladder cancer	c-MET	Homemade arrays	Bladder cancer diagnosis and clinical outcome stratification	101	
Osteosarcoma	CXCL4, CXCL6, CXCL1	AAH-BLG-1 (RayBiotech, Inc.)	Diagnosis and prognosis of osteosarcoma	103	
Heart failure	Angiogenin	AAH-BLM-1 (RayBiotech, Inc.)	Diagnosis and prognosis of HFPEF	104	
Prostate cancer	M-CSF, CCL-18, IGFBP-6, Fas	QAH-CAA-3000 (RayBiotech, Inc.)	Diagnosis of prostate cancer	106	
Lupus nephritis	Angiogenin	AAH-CYT-G4000 (RayBiotech, Inc.)	Chronicity changes in the kidney in patients with lupus nephritis	108	
Asthma	IL-4, RANTES	AAH-INF-3 (RayBiotech, Inc.)	Monitoring progress during steroid treatment	110	
<b>Disease studied</b>	<b>Target identified</b>	<b>Array used</b>	<b>Potential utility</b>	<b>Clinical trial ID</b>	<b>References</b>
Applications of antibody arrays in clinical trials					
Head and neck cancers	MEK1, BRCA1, JunB, I $\kappa$ B $\alpha$ , eEF2K	Cancer/apoptosis phosphorylation array (Full Moon Biosystems)	Combined treatment with erlotinib and celecoxib inhibited EGFR and mTOR pathways as an effective chemopreventive approach	Phase I study	92
Spontaneous preterm birth	IL-8	Custom array (RayBiotech, Inc.)	Categorization of high-risk patients and guide appropriate therapies	NCT01007513	95
Refractory solid tumors	IL-6	AAH-CYT-1, AAH-INF-3 (RayBiotech, Inc.)	Determine potential mediators of HDAC inhibitor belinostat toxicity	Phase I study	100
ccRCC, clear cell renal cell carcinoma; DILI, drug-induced hepatic injury; EGFR, epidermal growth factor receptor; HCC, hepatocellular carcinoma; HFPEF, heart failure with preserved ejection fraction; HGF, hepatocyte growth factor; IGF-1R, phosphorylated insulin-like growth factor-1 receptor; IGF-2R, phosphorylated insulin-like growth factor-2 receptor; IL, interleukin; OSM, oncostatin M; RTK, receptor tyrosine kinase.					

Table1. Summary of the Applications of Antibody Arrays in the Drug Discovery Process [10]

## Antibody Array 분석 서비스 Antibody Array Analysis service



이바이오젠에서 제공하는 Antibody Array 제품과 분석 서비스를 소개하고자 한다.

첫번째로, Fullmoonbio사의 antibody array 서비스가 있다. 이바이오젠은 Fullmoonbio 공식 Distributor로서, antibody array 제품 공급을 맡고 있으며, 실험서비스도 제공하고 있다. high-throughput ELISA 기반의 플랫폼으로 다양한 샘플 (세포, 조직, serum, plasma, culture media)에서 수백개의 단백질을 한번의 array로 protein expression을 profiling 할 수 있다. 40개의 Signaling pathway 특화된 array를 통해 연구자에게 맞는 실험이 진행 가능하다. 대표적으로 Signaling Explorer, Phospho Explorer, Cytokine profiling, Cell signaling Phospho Array가 있으며, array별 타겟 단백질 리스트는 홈페이지에서 확인 할 수 있다. 이바이오젠에서는 antibody array 서비스를 통해 얻은 결과를 ExDEGA Report 형식으로 보고드리고 있으며 GO, Pathway, Clustering, Network 등의 다양한 분석을 함께 지원하고 있다.

Fullmoonbio 항체 어레이 서비스의 실험방식은 아래와 같다.

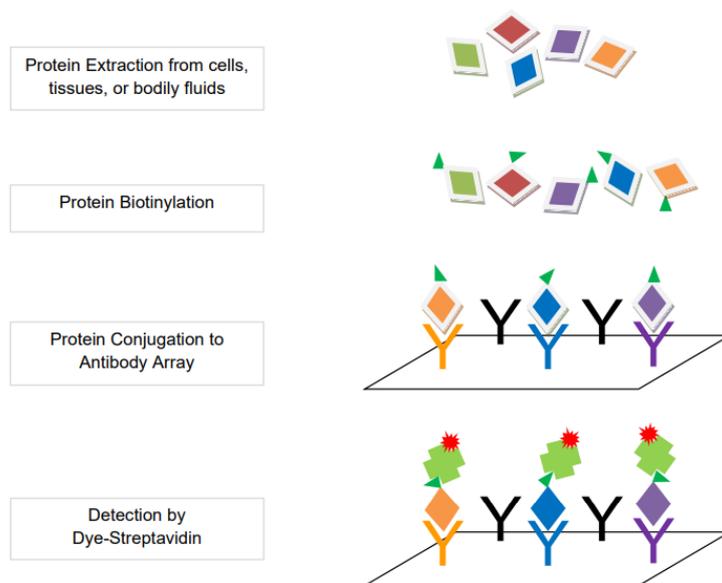


그림. 3 The ELISA based antibody array platform involves four major steps [11]

Direct Label 방식이며, 세포나 조직, Serum, plasma 등으로부터 전용 키트로 추출된 non-denatured (native tertiary structures) 단백질은 biotinylation 과정을 거친다. 이후, antibody array와 단백질 샘플을 incubation한 뒤, dye labeled streptavidin으로 형광신호를 탐지하여 단백질 발현을 측정하는 과정으로 되어있다. [11]

두번째로, proteomics 항체 어레이 분야에서 20년 이상의 경험을 가졌으며, 세계적으로 가장 많은 ELISA kit 제품 생산 및 공급 서비스를 제공하는 Raybiotech사의 antibody array 서비스가 있다. 다양한 biological process (apoptosis, inflammation, angiogenesis, immune response, migration 등)와 관련된 단백질 발현을 한번의 array 로 profiling할 수 있다. Raybiotech 의 제품군은 염증, 혈관 신생, 세포사멸, 세포성장, 신호전달, 당화 등에 관련된 단백질의 효율적인 분석을 위한 수백 개의 배열과 면역측정법을 포함하도록 계속해서 개발 확장되고 있으며, 특히 sandwich based ELISA 기법을 이용한 Quantibody는 단백질 발현을 정량화 할 수 있는 특징이 있다. 이바 이오젠에서는 Raybiotech사 제품 중 L-Series, G-Series, Quantibody Glass 타입의 Antibody array 실험 분석 서비스를 제공해드리고 있다. [12]

## Antibody Array를 이용한 학술논문 Publications on Antibody Arrays

항체 어레이에 대한 바이오 학술분야에서 발표된 내용에 대하여 간단히 소개하고자 한다.

2022 년 Basic Res Cardiol, 저널지에 심장 심근세포 특이적으로 유도한 NR4A2 는 성장, 증식 및 세포사멸 신호경로를 활성화시킨다는 논문이 발표되었다. 본 논문에서는 성인 심장 근세포의 대사 및 구조적 리모델링을 담당하는 세포 내 신호를 추가로 screening 하기 위해, Fullmoonbio 사 Cell Signaling Phospho Antibody Array 를 이용하여, 항체 어레이를 진행하였다. PI3K/AKT signaling, apoptosis, autophagy, cell cycle, Erb, MAPK, p53, V/EGF 등을 포함한 16 개 세포 신호 경로의 304 개의 target 단백질을 분석함으로써 타목시펜 처리 후 Nr4a2-icTg 마우스 LV 에서 34 개 단백질의 발현 및/또는 인산화 신호 정량결과를 얻을 수 있었다. 후보 바이오마커의 정성 프로파일링 및 스크리닝을 위해 사용하였다.

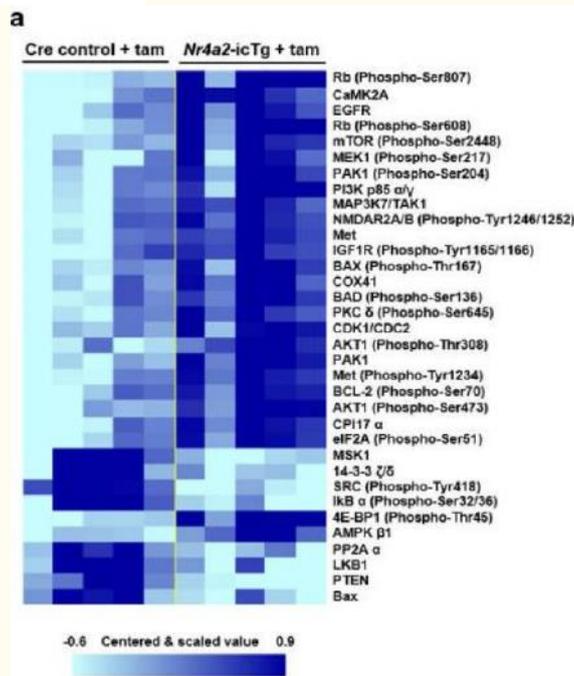


그림. 4 Cardiac myocyte-specific induction of NR4A2 activates growth, proliferation and apoptosis signaling pathways in the adult heart. a Heat map representation of the 34 proteins and phosphoproteins from 16 major cell signaling pathways that are differentially expressed in the left ventricle (LV) of *Nr4a2-icTg* mice when compared to LV of Cre recombinase expressing control mice at 21 days after tamoxifen (tam) treatment. [13]

추가로 2015년 발표된 Nature 종양학 관련 논문에 따르면, Vemurafenib 5일간 처리된 A375 종양에서 마우스 Raybiotech cytokine array, G2000 (174개 단백질 검출)을 사용하여 murine stroma-derived 및 면역 세포의 사이토카인 및 사이토카인 수용체를 측정하였다. Vemurafenib 치료는 표적 치료 동안 종양 퇴행에서 종양 내 면역 세포 구성과 스트로마 사이토카인 조성의 광범위한 변화를 유도함을 밝혀냈다. 이러한 데이터는 많은 상향 및 하향 조

절된 분비 인자로 인하여, secretome (TIS) 유도 치료가 퇴행하는 종양 미세 환경에 침투하고 암세포를 자극한다는 것을 나타낸다. [14]

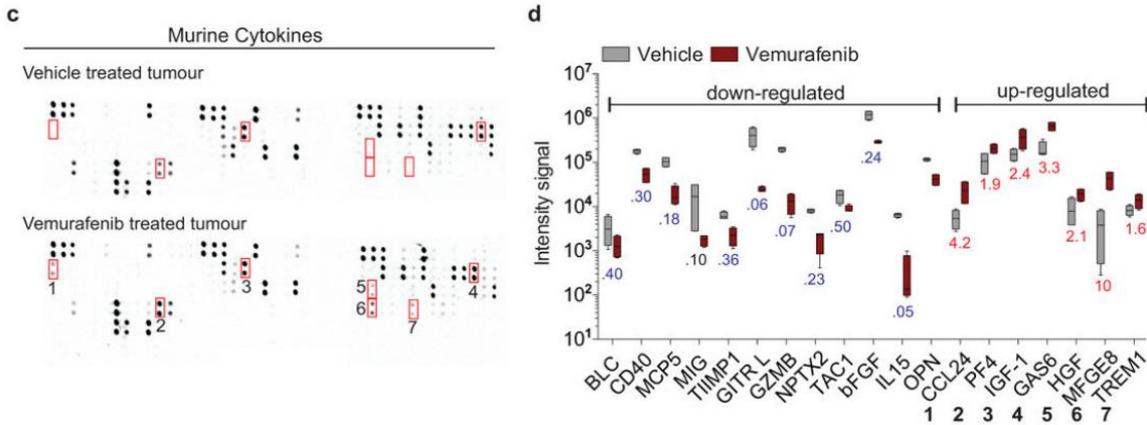


그림. 5 Vemurafenib treatment induces widespread changes in the intratumour immune cell composition and stromal cytokine composition in tumours regressing during targeted therapy c-d, Cytokine array of murine stroma-derived cytokines within A375-derived xenograft tumours treated with vehicle or vemurafenib for 5 days. [14]

이바이오젠 홈페이지(www.e-biogen.com)를 방문하면 다양한 항체 어레이(Antibody array)에 대한 정보를 확인할 수 있다.

Fullmoonbio Antibody Array Service		
Type	Protein Expression Profiling	Phosphorylation Profiling
Species	H, M, R	H, M, R
Detection	Fluorescent	Fluorescent
Results	Semi-quantitative	Semi-quantitative
Array List	Information	
Design Principle	Direct Labeling (Biotin)	Direct Labeling (Biotin)
대표적인 Array	<a href="#">Signaling Explorer Array</a> <a href="#">Cytokine Profiling Array</a>	<a href="#">Phospho Explorer Array</a> <a href="#">Cell Signaling Phospho Array</a>

※ Fullmoonbio 사의 경우 Human 기준으로 annotaion이 제공됩니다.

Raybiotech Antibody Array Service			
Type	L-Series	G-Series	Quantibody
Species	H, M, R	H, M, R	H, M, R, B, C, F, E, P, L, N
Detection	Fluorescent	Fluorescent	Fluorescent
Results	Semi-quantitative	Semi-quantitative	Quantitative
# OF ANALYTES	90 - 1000	10 - 274	10 - 440
Design Principle	Direct Labeling (Biotin)	Sandwich ELISA	Sandwich ELISA
Array List	Information	Information	Information

\*H=human | M=mouse | R=rat | P=porcine | C=canine | F=feline | B=bovine | E=equine | N=rhesus monkey | L=rabbit

< 참고문헌 >

1. <http://sgugenetics.pbworks.com/w/page/31990372/Applications>
2. 항체 마이크로어레이 실험설계 및 분석-cDNA 어레이의 방법 적용. *Cancer research\_2005*, 65(8), 2985~2989
3. 단백질 Microarray와 그 응용, *BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING*, 2004, 9(2), 69~75
4. Protein chip 개발을 위한 단백질 및 ligand의 microarray 기술에 관한 연구, 김학성, 과학기술부, 2005-06, 1350019712
5. 단백질체학 기반 다중 단백질 분석 플랫폼 기술개발 동향, 이상후, KOSEN Report, 2020
6. *Antibody Arrays in Biomarker Discovery, Advances in Clinical Chemistry\_2015*, ISSN 0065-2423, p.269-274
7. 단백질 칩 (Protein chip), 생명공학정책연구센터, 기술동향 2005-5, p.6
8. [https://m.blog.naver.com/bms\\_korea/221327779165](https://m.blog.naver.com/bms_korea/221327779165), BMS
9. <https://www.raybiotech.com/antibody-array>
10. *Integration of Antibody Array Technology into Drug Discovery and Development, Assay Drug Dev Technol\_2018*, 16(2):74-95.
11. <https://www.fullmoonbio.com/datasheets/AntibodyArrayUserGuide>
12. <https://www.raybiotech.com/antibody-array>
13. *Prolonged cardiac NR4A2 activation causes dilated cardiomyopathy in mice, Basic Res Cardiol.* 2022; 117(1): 33.
14. *Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression, Nature.* 2015 April 16; 520(7547): 368-372