발명의 설명

발명의 명칭: TIE2 및 VEGF에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항체 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 신규한 항-Tie2 항체 또는 이의 결합 단편 및 VEGF 결합 부위를 포함하는 이중항체 및 이의 약학적 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] Tie2(Tyrosine kinase receptor 2) 단백질은 혈관내피세포에 특이적으로 발현되는 수용체형 티로신 키나아제(Tyrosine kinase, TK)로서, 특이적 리간드인 Ang-1(Agiopoietin-1) 단백질에 의해 인산화 되어 활성화된다. Tie2 단백질은 다양한 생리적 또는 병리적 상황에 혈관신생 또는 혈관의 구조적 또는 기능적 정상화 및 안정화에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(대한민국 등록특허공보 제10-2195957호). 따라서, Tie2 단백질은 허혈성 질환 치료제로서 주목받고 있다. 또한, Tie2 단백질의 활성화는 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의해 유발되는 혈관누수, 혈관염증 및 혈관의 비정상화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 최근 당뇨망막병증, 패혈증 및 종양의 치료 전략으로써, VEGF의 활성화 억제 및 Ang-1 단백질에 의한 Tie2 단백질의 활성화를 통해 비정상적인 혈관신생을 억제하고, 혈관의 정상화 및 안정화를 유도하는 방법이 제시되고 있다.

[3] 하지만, 상기 Ang-1 단백질의 생리적 활성화 형태인 Ang-1 사량체는 재조합 단백질 형태로 생산하기가 매우 어렵고, 생체 내에서 짧은 반감기를 나타내기 때문에 치료제로서 활용하기 어려운 실정이다. Ang-1의 문제점을 해결하기 위하여 Ang-1 단백질을 대체할 수 있는 다양한 Tie2 특이적 활성화제에 대한 연구가 진행되고 있지만, 낮은 생산성과 면역반응 유발의 우려와 같은 문제점이 있어 치료제로서 이용되는데 한계가 있다. 뿐만 아니라, VEGF 억제제는 다양한 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[4] 따라서, 보다 효과적인 Tie2 단백질 활성 유도 및 VEGF 활성 억제를 통해 혈관신생, 내피 신호전달, 염증 및/또는 혈관 누수 조절 등의 다양한 혈관 이상 관련 질환을 치료할 수 있는 방법에 대한 연구 및 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

기술적 과제

[5] 이에, 본 발명자들은 혈관 이상 관련 질환 치료제를 개발하기 위하여 연구한 결과, 신규한 항-Tie2 항체, 및 상기 항체 및 VEGF 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체가 혈관 질환 마우스 모델에서 혈관 이상 관련 질환을 개선함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 (a) i) 서열번호 84의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 1(HCDR1), ii) 서열번호 85의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 2(HCDR2), 및 iii) 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 86으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변영역(VH); 및 (b) iv) 서열번호 87의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1), v) 서열번호 88의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2), 및 vi) 서열번호 89의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 Tie2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 여기서 서열번호 84의 $X_1X_2X_3FX_4X_5X_6X_7$ 아미노산 서열의 X_1은 G 또는 S이고, X_2는 F 또는 D이고, X_3는 T 또는 S이고, X_4는 N, T 또는 A이고, X_5는 S 또는 G이고, X_6은 Y, N 또는 Q이고, X_7은 G, W 또는 A이며; 서열번호 85의 $X_8X_9X_{10}DX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ 아미노산 서열의 X_8은 T 또는 I이고, X_9는 S 또는 Y이고, X_{10}은 N, P 또는 W이고, X_{11}은 G, D 또는 S이고, X_{12}는 S 또는 G이고, X_{13}은 T, D 또는 G이고, X_{14}는 T 또는 I이며; 서열번호 86의 ARKVVRGYX$_{15}$X$_{16}$HDAFDI 아미노산 서열의 X_{15}는 S, H 또는 L이고, X_{16}은 Y 또는 P이며; 서열번호 87의 $QX_{17}X_{18}X_{19}SX_{20}$ 아미노산 서열의 X_{17}은 S, G 또는 D이고, X_{18}은 V 또는 I이고, X_{19}는 S 또는 D이고, X_{20}은 Y 또는 N이며; 서열번호 88의 $X_{21}X_{22}S$ 아미노산 서열의 X_{21}은 G 또는 A이고, X_{22}는 A 또는 S이며; 서열번호 89의 $QQX_{23}X_{24}X_{25}X_{26}PX_{27}T$ 아미노산 서열의 X_{23}은 Y, A 또는 G이고, X_{24}는 G, N 또는 Y이고, X_{25}는 T, S 또는 D이고, X_{26}은 T 또는 F이고, X_{27}은 Y, L 또는 W이다.

[7] 본 발명의 다른 측면은, 상기 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[8] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환된 세포를 배양하는 단계 및 상기 배양액에서 상기 항체 또는 이의 단편을 수득하는 단계를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조 방법을 제공한다.

[9] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체를 제공한다.

[10] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 이중 특이 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[11] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계 및 상기 배양액으로부터 이중 특이 항체를 수득하는 단계를 포함하는 이중 특이 항체의 제조 방법을 제공한다.

[12] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체를 유

효성분으로 포함하는 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 VEGF 특이적 결합 부위 포함하는 이중 특이 항체의 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료용 용도를 제공한다.

[14] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[15] 본 발명의 항-Tie2 항체는 Tie2 단백질에 특이적으로 결합하여 인산화를 유도하였다. 이때, 상기 항-Tie2 항체의 항원 특이성 및 친화도는 기존의 리간드(Ang-1, Ang-2)와 비교하여 우수하였다. 또한, 상기 항-Tie2 항체 및 VEGF 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체는 Tie2 단백질을 활성화시킴과 동시에 VEGF를 억제하였다. 특히 상기 이중 특이 항체는 VEGF의 억제제에 의해 발생할 수 있는 부작용을 효과적으로 억제하였다. 또한, 상기 항-Tie2 항체 또는 이중 특이 항체는 혈관 이상 관련 질환 마우스 모델에서 질환의 치료 효과를 나타내었다. 따라서, 본 발명에 따른 항-Tie2 항체, 및 항-Tie2 항체 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체는 혈관 이상 관련 질환의 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1a 내지 도 1c는 항-Tie2 항체(MT-100)가 인간 또는 마우스 Tie2를 발현하는 세포인 HEK293 세포, 3T3-J2 세포 또는 HUVEC(Human umbilical vein endothelial cell)에서 Tie2 및 이의 하위 신호 전달 인자의 인산화 정도를 웨스턴 블롯(Western blot)으로 확인한 결과이다.

[17] 도 2a 내지 도 2d는 HUVEC에서 항-Tie2 항체(MT-101, MT-110 또는 MT-111) 처리에 의한 Tie2 및 이의 하위 신호 전달 인자의 인산화 정도를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.

[18] 도 3은 HUVEC에서 항-Tie2 항체(MT-101)의 IgG1형 항체(MT-101(IgG1)), 동형(Isotype) IgG4의 불변부위를 가진 항체(MT-101(IgG4)) 및 IgG1형 CH2 영역에 L234A/L235A 아미노산 치환 변이를 가진 항체(MT-101(IgG1-LALA)) 처리에 의한 Tie2 및 이의 하위 신호전달 인자의 인산화 정도를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.

[19] 도 4는 HUVEC에서 항-Tie2 항체(MT-100) 처리 후, 49종의 인간 티로신 수용체 단백질(Receptor tyrosine kinases, RTKs)에 대하여 인산화 유도 여부를 스크리닝한 결과를 나타낸 도면이다.

[20] 도 5a 내지 도 5d는 항-Tie2 항체(MT-100, MT-101(IgG1), MT-101(IgG1-LALA) 또는 MT-101(IgG4))의 종간(Species) 교차결합(Cross-reactivity)을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[21] 도 6은 항-Tie2 항체(MT-100)의 혈관 네트워크 안정화 유도 효과를 확인한 결과이다.

[22] 도 7a 및 도 7b는 무혈청(Serum-free) 및 저산소(Hypoxia) 조건에서 배양된 HUVEC에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1), MT-101(IgG1-LALA) 또는 MT-101(IgG4)) 처리한 뒤, 세포사멸(Apoptosis)을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[23] 도 8a 및 도 8b는 HUVEC에서 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 및 항-Tie2 항체(MT-100 또는 MT-101)를 처리한 뒤, 혈관 투과성(혈관 누수 현상)을 확인한 결과를 나타낸 그래프 및 도면이다. 도 8c는 HUVEC에서 VEGF 및 항-Tie2 항체(MT-100 또는 MT-101)를 처리한 뒤, 염증반응 매개 인자인 ICAM-1(Intercellular adhesion molecule-1) 및 VCAM-1(Vascular cell adhesion molecule-1)의 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.

[24] 도 9a 및 도 9b는 Tie2 단백질 및 Ang-2(Angiopoietin-2) 단백질 상호결합에 대한 항-Tie2 항체(MT-101)의 영향을 생물층간섭계(Bio-layer interferometry, BLI)를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[25] 도 10은 HUVEC에서 Ang-2 단백질을 전처리 또는 항-Tie2 항체(MT-101)와 동시처리한 뒤, Tie2 및 이의 하위 신호 전달 인자의 인산화 정도를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[26] 도 11a 내지 도 11c는 허혈 및 재관류(Ischemia reperfusion, I/R)에 의해 유도된 급성 신손상(Acute kidney injury, AKI) 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 또는 MT-101(IgG1-LALA))를 투여한 뒤, 급성 신손상 억제 효능을 확인한 결과이다. 도 11a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이고, 도 11b는 혈청 크레아티닌(Serum creatinine) 분석 결과이다. 도 11c는 혈중요소질소(Blood urea nitrogen, BUN) 분석 결과이다.

[27] 도 12a 및 도 12b는 I/R 유도 AKI 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 또는 MT-101(IgG1-LALA))를 투여한 뒤, 신장 세뇨관 손상(Tubular-interstitial injury)을 H&E(Hematoxylin&eosin) 염색을 통해서 확인한 결과이다. 도 12a는 염색 결과를 나타낸 도면이고, 도 12b는 결과를 수치화하여 나타낸 그래프이다.

[28] 도 13a는 I/R 유도 AKI 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 투여한 뒤, 신장 혈관에서 Tie2 단백질의 인산화(P-Tie2)를 면역염색을 통해 확인한 결과이다. 도 13b는 혈관내피세포 마커 단백질(CD31) 및 혈관내피주위세포 마커 단백질(PDGFRβ)에 대한 면역염색 결과이다.

[29] 도 14a는 I/R 유도 AKI 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 투여한 뒤, 신장 혈관(CD31)에서 염증반응 매개 인자(VCAM-1)의 발현을 면역

염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다. 도 14b는 호중구세포의 부착 또는 유입 정도를 Gr-1 단백질의 면역염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다. 도 14c는 신장 조직에서 면역반응을 유도하는 사이토카인(CCL2, IL-6 또는 IL-1β)의 발현을 중합효소 연쇄 반응(Real-time PCR) 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[30] 도 15a 내지 도 15d는 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 패혈증에 의한 급성 신손상 마우스 모델(LPS-induced AKI)에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 마우스 정맥 내 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 15a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 15b 및 도 15c는 혈청 크레아티닌(Serum creatinine) 및 혈중요소질소(Blood urea nitrogen, BUN)를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 15d는 신장 손상 및 신장 혈관(CD31) 손상의 정도를 각각 KIM-1(Kidney injury molecule-1) 단백질 및 CD31 단백질에 대한 면역염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[31] 도 16a 내지 도 16c는 허혈 및 재관류에 의한 만성 신부전(Chronic kidney disease, CKD) 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 16a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 16b는 신장 조직을 신장 세뇨관 손상을 H&E 염색을 통해서 확인한 결과이다. 도 16c는 신장 섬유화(Kidney fibrosis)를 Masson's trichrome 염색, Sirius red 염색 및 섬유화 마커(Collagen IV, α-SMA)에 대한 면역염색을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[32] 도 17a 내지 도 17d는 아데닌(Adenine)에 의해 유도된 CKD 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 17a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 17b는 혈청 크레아티닌 측정 결과이고, 도 17c는 신장 손상 정도를 KIM-1 및 NGAL(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)의 유전자 발현을 통해 확인한 결과이다. 도 17d 및 도 17e는 H&E 및 PAS(Periodic acid-schiff) 염색 결과를 나타낸 도면 및 그래프이다.

[33] 도 18a 내지 도 18d는 아데닌으로 유도된 CKD 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 농도별(2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg)로 투여한 뒤, 마우스의 신장 섬유화를 확인한 결과이다. 도 18a 내지 도 18c는 각각 Sirius red 염색 및 섬유화 마커(Collagen IV 또는 α-SMA)에 대한 면역염색 결과이다. 도 18d는 Col1a1, Col3a1, ACTA2 또는 TGF-β 유전자 발현을 중합효소 연쇄반응을 통해 확인한 결과이다.

[34] 도 19a 내지 도 19c는 아데닌으로 유도된 CKD 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 농도별(2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg)로 투여한 뒤, 신장 세뇨관(Lotus tetragonolobus lectin, LTL) 및 혈관내피세포의 손상을 확인한 결과이다. 도 19a는 면역염색 결과이고, 도 19b는 면역반응 유도 인자(MCP-1, TNF-α, 또는 IL-1β)의 유전자 발현 및 면역세포 마커 단백질(CD4, CD11c, F4/80 또는 CD206)의 유전자 발현을 중합효소 연쇄반응을 통해 확인한 결과이다.

[35] 도 20a 내지 도 20c는 일측 요로 폐쇄(Unilateral ureteral obstruction, UUO)에 의해 유도된 CKD 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))의 효능을 확인한 결과이다. 도 20a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 20b 내지 도 20e는 H&E 염색, Masson's trichrome 염색 및 섬유화 마커 단백질(Collagen IV 또는 α-SMA)에 대한 면역염색을 통하여 신장 세뇨관 손상(Tubular-interstitial injury) 및 섬유화 정도를 확인한 결과이다.

[36] 도 21a 및 도 21b는 지질다당류(LPS)에 의해 유도된 패혈증 마우스 모델(LPS-induced sepsis)에서 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 21a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 21b는 마우스의 생존율(Percent survival(%))을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[37] 도 22a 내지 도 22d는 하지 허혈 질환 마우스 모델(Hindlimb ischemic mouse model)에서 항-Tie2 항체(MT-100 및 MT-101)를 농도별(1 mg/kg, 5 mg/kg)로 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 22a는 혈류 흐름 및 조직 괴사를 관찰한 결과이다. 도 22b는 혈류흐름(LDPI ratio)을 분석한 결과이고, 도 22c는 조직괴사(Necrosis)를 분석한 결과이다. 도 22d는 혈관신생(α-SMA^{+}CD31^{+} vessels)을 분석한 결과이다.

[38] 도 23a 내지 도 23c는 당뇨성 발기부전(Diabetic erectile dysfunction) 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-100 또는 MT-101)를 농도별(1 μg, 10 μg)로 투여한 뒤, 음경신경 전기자극에 따른 음경해면체(Corpus cavernosum penis) 내압(Intracavernosal pressure, ICP; 발기력 정도를 의미)을 측정한 결과이다. 도 23a는 내압을 측정한 결과이고, 도 23b는 최대 내압을 분석한 결과이며, 도 23c는 총 내압을 분석한 결과이다.

[39] 도 24a 내지 도 24c는 당뇨성 발기부전 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-100 및 MT-101)를 투여한 뒤, 음경해면체 조직에서 혈관내피세포 마커 단백질(CD31) 및 혈관내피주위세포 마커 단백질(NG2)에 대한 면역염색을 통하여 혈관신생을 확인한 결과이다. 도 24a는 면역염색 결과이고, 도 24b는 혈관내피세포 마커 단백질(CD31)의 발현 영역을 분석한 결과이며, 도 24c는 혈관내피주위세포 마커 단백질(NG2)의 발현 영역을 분석한 결과이다.

[40] 도 25a 및 도 25b는 고혈당(High glucose, HG)이 처리된 HUVEC에서 항-Tie2 항체(MT-100 또는 MT-101) 처리에 의한 모세혈관 유사 튜브형성(Capillary-like tube formation) 정도를 확인한 결과 및 혈관 네트워크 형성 수치를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[41] 도 26a 내지 도 26c는 레이저(Laser)에 의해 유도된 맥락막 혈관신생(Choroidal neovascularization, CNV) 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-100 또는 MT-101) 또는 대조 약물(EYLEA)을 유리체강 내로 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 26a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 26b는 맥락막의 혈관신생을 관찰한 결과이고, 도 26c는 맥락막 혈관신생 대비 맥락막 혈관 누수값을 측정한 결과이다.

[42] 도 27a 내지 도 27d는 레이저(Laser)에 의해 유도된 맥락막 혈관신생 마우스 모델(CNV)에서 항-Tie2 항체(MT-100 또는 MT-101)를 마우스 유리체강 내로 투여한 뒤, 엔도뮤신(Endomucin) 발현, CNV의 양(Mass), 부위(Area) 및 부피(Volume)를 분석한 결과이다.

[43] 도 28a 내지 도 28c는 산소 자극에 의해 유도된 망막증(Oxygen-induced retinopathy model, OIR) 마우스 모델에서 항-Tie2(MT-101) 또는 대조 약물(EYLEA)을 마우스 유리체강 내로 투여한 뒤, 망막내 무혈성 부위(Avascular area) 및 신생혈관총 부위(Neovascular tuft area)를 확인한 결과이다. 도 28a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 28b 및 도 28c는 각각 망막내 무혈성 부위 및 신생혈관총 부위를 관찰한 결과이다.

[44] 도 29a 및 도 29b는 산소에 의한 마우스 망막증 마우스 모델(OIR)에서 항-Tie2 항체(MT-101)를 유리체강 내에 투여한 뒤, 허혈에 의해 유도되는 망막 혈관내피세포의 증식 및 누수 정도를 확인한 결과이다.

[45] 도 30은 본 발명의 일 구체예인 항-Tie2 항체(MT-101) 및 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체(MT-103-1, MT-103-2, MT-103-3, MT-103-4 및 MT-103-5)의 구조를 나타낸 도면이다.

[46] 도 31a 내지 도 31e는 HUVEC에서 VEGF 및 이중 특이 항체(MT-103-1, MT-103-2, MT-103-3, MT-103-4 또는 MT-103-5) 또는 대조 약물(EYLEA, Avastin 또는 Beovu)을 처리한 뒤, VEGFR2 및 이의 하위 신호 전달 인자의 인산화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[47] 도 32a 및 도 32b는 HUVEC에서 항-Tie2 항체(MT-101) 또는 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4) 처리에 의한 Tie2 및 이의 하위 신호 전달 인자의 인산화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[48] 도 33a는 HUVEC에서 항-Tie2 항체(MT-101) 또는 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 농도별(1 nM, 10 nM)로 처리한 뒤, 세포사멸을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 33b 및 도 33c는 HREC 세포(Human retinal endothelial cell)에서 VEGF 및 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 농도별(0.125 nM, 0.5 nM, 2 nM, 8 nM, 32 nM)로 처리한 뒤, VEGF에 의해 유도되는 혈관내피세포의 투과성 증가를 부착연접 단백질(VE-cadherin)의 면역염색을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도면 및 그래프이다. 도 33d는 HREC 세포에 VEGF 및 Ang-2, 및 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 농도별(0.05 nM, 0.5 nM, 5 nM)로 처리한 뒤, VEGF 및 Ang-2에 의해 유도되는 혈관내피세포의 투과성 증가를 형광이 표지된 덱스트란의 투과 정도로 나타낸 그래프이다.

[49] 도 34는 이중 특이 항체(MT-103-1) 및 VEGF의 결합에 따른 Ang-2 및 Tie2의 결합을 생물층간섭계를 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[50] 도 35a는 HUVEC에서 Ang-1, Ang-2 및 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)의 처리에 의한 VEGFR 및 Tie2 하위 신호 전달 활성화를 확인하기 위한 실험

조건을 나타낸 도면이고, 도 35b는 각 조건별 VEGFR2, Tie2 및 이의 하위 신호 전달 인자의 인산화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[51] 도 36a는 HUVEC에서 VEGF, 및 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4) 또는 대조 약물(Vabysmo)을 처리한 뒤, VEGFR2, 및 Tie2 하위 신호 전달 인자의 인산화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다. 도 36b는 HUVEC에서 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4) 또는 대조 약물(Vabysmo, EYLEA 또는 Beovu)을 처리하고 무혈청 및 저산소 조건에서 배양한 뒤, 세포사멸 정도를 비교한 결과이다.

[52] 도 37a 내지 도 37c는 레이저(Laser) 조사에 의해 유도된 맥락막 혈관신생(CNV) 마우스 모델에서 항-Tie2 항체(MT-101) 또는 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 유리체강 내에 투여한 뒤, 신생혈관형성 억제 효능을 확인한 결과이다. 도 37a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 37b는 맥락막 혈관의 누수를 확인한 결과이며, 도 37c는 CNV 혈관 영역(area)을 분석한 결과이다.

[53] 도 38a 내지 도 38c는 레이저(Laser)에 조사에 의해 유도된 맥락막 혈관신생(CNV) 마우스 모델에서 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4) 또는 대조 약물(EYLEA)을 마우스 유리체강 내에 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 38a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 38b는 맥락막 혈관의 누수를 확인한 결과이고, 도 38c는 CNV 혈관 영역(area)을 분석한 결과이다.

[54] 도 39a 내지 도 39c는 산소 자극에 의해 유도된 망막증 마우스 모델(OIR)에서 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4) 또는 대조 약물(EYELA)를 유리체강 내 투여한 뒤, 효능을 확인한 결과이다. 도 39a는 실험 스케쥴을 나타낸 도면이다. 도 39b 및 도 39c는 각각 마우스의 망막내 무혈성 부위(Avascular area) 및 신생혈관총 부위(Neovascular tuft area)를 관찰한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[55] 용어의 정의

[56] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체"는 이황화 결합에 의해 서로 연결된 두개의 중쇄 각각에 하나씩의 경쇄가 이황화 결합에 의해 연결된 구조를 갖는 면역글로불린 분자 및 이들의 다량체를 의미한다. 경쇄(Light chain, LC)는 두 개의 영역, 즉 하나의 가변영역(경쇄 가변영역, Variable region of light chain, VL)과 하나의 불변영역(경쇄 불변영역, Constant region of light chain, CL)을 포함하고 있다. 또한, 중쇄(Heavy chain, HC)는 네 개의 영역, 즉 하나의 가변 영역(중쇄 가변영역, Variable region of heavy chain, VH)과 세 개의 불변영역(중쇄 불변영역, Constant region of heavy chain, CH; CH1, CH2 및 CH3)을 포함한다. 경쇄와 중쇄의 불변영역은 경쇄 및/또는 중쇄들 간의 결합, 분비, 보체 결합, Fc 수용체(FcR)와의 결합 등과 같은 생물학적 성질을 부여하는 역할을 하고, 경쇄와 중쇄의 가변 영역은 항원에 대한 인식 및 결합 특이성을 결정한다. 상기 항체는 작용제(Agonist)로서 작용할 수 있고, 길항제(Antagonist)로서 작용할 수 있다.

[57] 본 명세서에서 사용된 용어, "항원 결합 단편"은 온전한 항체의 일부분, 특히 온전한 항체의 항원 결합 자리 또는 가변 영역을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 당단백질을 의미한다. 상기와 같은 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기법에 의하거나, 온전한 항체를 효소적 또는 화학적으로 분해함으로써 생성될 수 있고, 상기 항원 결합 단편의 예로는 Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2, 디아바디(Diabodies) 등은 물론, 이들로부터 형성된 이중특이적 및 다중특이적 항체도 포함하며, 이에 국한되지 않는다.

[58] 본 명세서에서 사용된 용어, "단쇄 Fv" 또는 “scFv”는 항체의 VH와 VL 도메인을 15개 내외의 아미노산이 연결된 펩타이드 사슬로 이루어진 링커로 연결한 단백질을 지칭한다. 경쇄 가변영역(VL)-링커-중쇄 가변영역(VH) 또는 중쇄 가변영역(VH)영역-링커-경쇄 가변영역(VL)의 순서 모두 가능하며, 원 항체와 동일 혹은 유사한 항원 특이성을 가진다.

[59] 본 명세서에서 사용된 용어, "중쇄"는 가변영역(VH) 및 3개의 불변영역인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체 길이의 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미이다. 중쇄 불변영역(CH)은 상이한 아미노산 조성 및 순서를 나타내므로, 상이한 유형의 항원성을 보유한다. 따라서, 면역글로불린은 다섯 가지 카테고리로 분류될 수 있으며, 면역글로불린 이소형(Isotype), 즉, IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 지칭될 수 있다. 이에 상응하는 중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ε 사슬이다. 또한, 힌지 영역(Hinge region)의 아미노산 조성 및 중쇄 이황화 결합의 수와 위치에 따라, 동일한 유형의 면역글로불린은 상이한 하위 유형으로 분류될 수 있다. 예를 들어, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 분류될 수 있다.

[60] 본 명세서에서 사용된 용어, "경쇄"는 λ 및 κ의 2종류가 있으며 대략 211 내지 217개의 아미노산으로 구성되어 있다. 사람의 항체 각각에는 모두 동일하게 1가지의 사슬만이 존재한다. 경쇄는 가변영역(VL) 및 불변영역(CL)이 연속적으로 이루어져 있다. 상기 경쇄는 전체 길이의 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다. 이들 항체 부류의 임의의 CL 및 CH1 영역은 본 개시 내용에 사용될 수 있다.

[61] 상기 "가변영역"은 항체에서 항원이 결합하는 영역을 말한다. 상기 가변영역은 상보성 결정 영역(Complementarity determining region, CDR)이라 불리는 3개의 초가변영역(Hypervariable region) 및 4개의 구조 영역(Framework region, FR)을 포함한다.

[62] 본 명세서에서 사용된 용어, "상보성 결정 영역(CDR)"은 항체의 가변 부위 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위를 의미한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프에 결합하는 역할을 한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 상보성 결정 영역을 포함한다. 각 사슬의 CDR은 전형적으로 N 말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리고, 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다. 각 사슬의 FR은 전형적으로 N 말단으로부터 시작하여 순차적으로 FR1, FR2, FR3 또는 FR4로 불리고, 특정 FR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.

[63] 본 명세서에서 사용된 용어, "Fc 영역"은 면역글로불린의 Fc 도메인을 의미한다. 상기 Fc 영역은 면역글로불린의 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1) 및 경쇄 불변영역(CL)은 포함하지 않는 단백질을 의미한다.

[64] 상기 Fc 영역은 야생형 Fc 도메인 뿐만 아니라, Fc 도메인 단편일 수 있다. 예를 들어, 상기 Fc 영역의 단편은 C 말단에서 라이신(K)이 결실된 것일 수 있다. 또는 상기 Fc 영역의 단편은 CH3만 포함하는 것일 수 있다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM일 수 있다. 또한, IgG의 하위 부류인 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgA의 하위 부류인 IgA1 또는 IgA2일 수 있다.

[65] 본 명세서에서 사용된 용어, "Fc 영역 변이체"는 야생형 Fc 영역의 당쇄 형태(Glycosylation pattern)와 다르거나, 야생형 Fc 영역에 비해 증가된 당쇄, 야생형 Fc 영역에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거(Deglycosylated)된 형태일 수 있다. 또한, 무당쇄(Aglycosylated) Fc 영역도 포함된다. Fc 영역 혹은 변이체는 배양조건 혹은 호스트의 유전자 조작을 통해 조정된 숫자의 시알산(Sialic acid), 퓨코실화(Fucosylation), 당화(Glycosylation)를 갖도록 한 것일 수 있다.

[66] 또한, 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린의 Fc 영역의 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM의 Fc 영역이 혼합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 Fc 영역 변이체는 상기 Fc 영역의 일부 아미노산이 치환된 형태일 수 있다.

[67] 상기 치환 및/또는 부가에 의해 도입되는 "아미노산"은 라이신(K), 알라닌(A), 아르기닌(R), 아스파라진(N), 아스파르트산(D), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 글라이신(G), 히스티딘(H), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프롤린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 타이로신(Y) 및 발린(V)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[68] 구체적으로, 상기 Fc 영역 변이체는 천연 서열 Fc 영역에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어 약 1개 내지 약 10개의 아미노산 치환, 또는 약 1개 내지 약 5개의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 또한. 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성, 적어도 약 90% 상동성, 적어도 약 95% 상동성을 가질 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 상기 Fc 영역 또는 이의 변이체는 서열번호 54, 서열번호 63 또는 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[69] 본 명세서에서 사용된 용어, "항원"은 항체에 선택적으로 결합할 수 있는 구조이다. 표적 항원은 폴리펩타이드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 기타 자연적으로 발생된 화합물이거나 합성된 화합물일 수 있다. 구체적으로, 항원은 폴리펩타이드이며, 세포 표면 또는 세포 내에 존재하는 단백질일 수 있다.

[70] 본 명세서에서 사용된 용어, "벡터"는 본 명세서에 기재된 다중 특이적 융합 단백질(예를 들어, 항체)을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열을 운반하거

나 발현시키기 위한 물질을 의미한다. 구체적으로, 벡터는 발현 벡터, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 인공 염색체를 포함한다.

[71] 본 명세서에서 사용된 용어, "폴리뉴클레오티드"는 "핵산"이라고도 지칭되며, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[72] 본 명세서에서 사용된 용어, "이중 특이 항체"는 적어도 하나 이상의 표적 또는 항원에 결합하는 물질을 의미한다. 본 발명에서 상기 이중 특이 항체는 Tie2에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위 및 VEGF 단백질에 특이적으로 결합하는 결합 부위를 포함할 수 있다.

[73] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[74] **<항-Tie2 항체 또는 이의 단편>**

[75] **Tie2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편**

[76] 본 발명은, Tie2에 특이적으로 결합하는 항-Tie2 항체 또는 이의 단편을 제공한다.

[77] 본 명세서에서 사용된 용어, "Tie2"는 혈관내피세포에 특이적으로 발현되는 수용체형 티로신 키나아제를 의미한다. TEK 티로신 키나아제(TEK tyrosine kinase), Antiopoietin-1 receptor 또는 CD202B(Cluster of differentiation 202B)로도 알려져 있으며, 인간에서 TEK 유전자에 의해 암호화되는 단백질이다. 상기 Tie2 단백질은 대표적으로 Tie2 리간드인 Ang-1에 의해 인산화되어 활성화된다. Tie2 단백질은 Ig-유사 도메인 1, Ig-유사 도메인 2, 3개의 EGF-유사 도메인, Ig-유사 도메인 3 및 3개의 피브로넥틴 type-III으로 구성된 세포외 도메인(Extracellular domain, ECD); 막통과 도메인(Transmembrane); 및 세포내 티로신 키나아제 도메인(Intracellular tyrosine kinase domain, ITK)으로 구성되어 있다. Tie2 단백질은 다양한 생리적/병리적 상황에 혈관신생, 혈관의 구조적/기능적 정상화 및 안정화에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

[78] 본 발명에서 상기 Tie2 단백질은 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류를 포함하는 포유류 유래의 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[79] 구체적으로 상기 Tie2 단백질은 Tie 단백질의 세포외 도메인일 수 있다. Tie2 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 일반적으로 지칭한다. 상기 Tie2에 대한 아미노산 서열 및 폴리뉴클레오티드 서열은 미국국립보건원(NCBI)의 유전자은행(GenBank)과 같은 공지의 데이터베이스 등에서 얻을 수 있다. 일 구체예에서, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[80] 또한, 상기 Tie 단백질은 이의 단편을 포함할 수 있다. 상기 “단편”은 단백질의 N 말단 및/또는 C 말단의 일부가 결실된 단백질을 의미한다. 따라서, 상기 Tie 단백질 단편은 Tie2 단백질의 N 말단 및/또는 C 말단의 일부가 결실된 것일 수 있다. 구체적으로, Tie2 단백질의 세포외 도메인의 N 말단 및/또는 C 말단이 결실된 것일 수 있다.

[81] 또한, 상기 단백질과 동일한 활성을 갖거나 염색체 상의 상기 Tie2를 암호화하는 유전자 위치가 동일한 이상, 상기 단백질의 하나 또는 몇 개의 아미노산이 첨가, 결실, 치환되는 서열로 구성될 수 있다. 구체적으로, Tie2 단백질은 서열번호 91의 아미노산 서열과 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 동일성 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.

[82] 본 발명에서 상기 항체 또는 이의 단편은 (a) i) 서열번호 84의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 1(HCDR1), ii) 서열번호 85의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 2(HCDR2), 및 iii) 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 86으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변영역(VH); 및 (b) iv) 서열번호 87의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1), v) 서열번호 88의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2), 및 vi) 서열번호 89의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역(VL)을 포함할 수 있다. 여기서 서열번호 84의 $X_1X_2X_3FX_4X_5X_6X_7$ 아미노산 서열의 X_1은 G 또는 S이고, X_2는 F 또는 D이고, X_3는 T 또는 S이고, X_4는 N, T 또는 A이고, X_5는 S 또는 G이고, X_6은 Y, N 또는 Q이고, X_7은 G, W 또는 A이며; 서열번호 85의 $X_8X_9X_{10}DX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ 아미노산 서열의 X_8은 T 또는 I이고, X_9는 S 또는 Y이고, X_{10}은 N, P 또는 W이고, X_{11}은 G, D 또는 S이고, X_{12}는 S 또는 G이고, X_{13}은 T, D 또는 G이고, X_{14}는 T 또는 I이며; 서열번호 86의 $ARKVVRGYX_{15}X_{16}HDAFDI$ 아미노산 서열의 X_{15}는 S, H 또는 L이고, X_{16}은 Y 또는 P이며; 서열번호 87의 $QX_{17}X_{18}X_{19}SX_{20}$ 아미노산 서열의 X_{17}은 S, G 또는 D이고, X_{18}은 V 또는 I이고, X_{19}는 S 또는 D이고, X_{20}은 Y 또는 N이며; 서열번호 88의 $X_{21}X_{22}S$ 아미노산 서열의 X_{21}은 G 또는 A이고, X_{22}는 A 또는 S이며; 서열번호 89의 $QQX_{23}X_{24}X_{25}X_{26}PX_{27}T$ 아미노산 서열의 X_{23}은 Y, A 또는 G이고, X_{24}는 G, N 또는 Y이고, X_{25}는 T, S 또는 D이고, X_{26}은 T 또는 F이고, X_{27}은 Y, L 또는 W이다.

[83] 구체적으로, 상기 항체 또는 이의 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[84] 또한, 구체적으로, 상기 항체 또는 이의 단편은 서열번호 1, 서열번호 7 및 서열번호 13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2, 서열번호 8 및 서열번호 14로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 3, 서열번호 9, 서열번호 15, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의

아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4, 서열번호 10 및 서열번호 16으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5, 서열번호 11 및 서열번호 17로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6, 서열번호 12 및 서열번호 18로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[85] 일 구체예에서, 상기 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[86] 일 구체예에서, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[87] 일 구체예에서, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[88] 일 구체예에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
일 구체예에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[89] 이때, 상기 항체는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 27의 아미노산 서

열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[90] 본 발명에서 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 Tie2 단백질에 결합하여 Tie2를 활성화시킬 수 있다. 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 Tie2 단백질의 결합은 결합 친화도를 측정하여 확인할 수 있다.

[91] 본 명세서에서 사용된 용어, "결합 친화도"는 분자의 단일 결합 부위와 그것의 결합 파트너 사이의 비-공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 분자 X의 그것의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_D)에 의해 제시될 수 있으며, 이는 해리 및 연관 속도 상수(각각 K_{off} 및 K_{on})의 비(ratio)이다.

[92] 상기 항-Tie2 항체의 결합 친화도는 항-Tie2 항체 또는 이의 단편이 Tie2 단백질에 결합하는 능력을 의미하는 것이며, 상기 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다. 본 발명의 일 구체예인 항-Tie 항체 또는 이의 단편은 인간 유래의 Tie2 단백질에 대하여 약 1.0E-11 M 내지 약 1.0E-8 M의 해리 상수를 나타낼 수 있다. 일 실시예에서, 약 4.75E-10 M 내지 약 3.42E-09 M의 해리 상수를 나타낼 수 있다.

[93] 또한, 본 발명의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 인간 이외에도 원숭이, 마우스, 래트, 개 및 돼지 등의 포유류 유래의 Tie2 단백질과 결합할 수 있다. 본 발명의 일 구체예인 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 마우스 유래의 Tie2 단백질에 대하여 약 1.0E-10 M 내지 약 5.0E-7 M의 해리 상수를 나타낼 수 있다. 일 실시예에서, 약 6.66E-9 M 내지 약 1.44E-8 M의 해리 상수를 나타낼 수 있다.

[94] **항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드**

[95] 본 발명의 또 다른 측면은, 항-Tie2 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 항-Tie 2 항체 및 이의 단편은 상술한 바와 동일하다.

[96] 구체적으로 상기 항-Tie2 항체의 중쇄 가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 21, 서열번호 23, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 28의 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 항-Tie2 항체의 경쇄 가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 22, 서열번호 24 또는 서열번호 26의 아미노산을 암호화하는 염기서열을 포함할 수 있다.

[97] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 동일한 폴리펩타이드를 암호화한다면, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl.,37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체지지체 상의 올리고뉴클레오티드 합성법 등을 들 수 있다.

[98] 일 구체예에 따르면, 상기 중쇄 가변영역을 암호화하는 폴리펩타이드는 서열번호 21, 서열번호 23, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 28의 아미노산 서

열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[99] 일 구체예에 따르면, 상기 경쇄 가변영역을 암호화하는 폴리펩타이드는 서열번호 22, 서열번호 24 또는 서열번호 26의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[100] 상기 폴리뉴클레오티드는 신호서열(Signal sequence) 또는 리더 서열(Leader sequence)을 추가적으로 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 용어 "신호서열"은 목적 단백질의 분비를 지시하는 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 의미한다. 상기 신호 펩타이드는 숙주 세포에서 번역된 후에 절단된다. 구체적으로, 본원 발명의 신호서열은 ER(Endoplasmic reticulum) 막을 관통하는 단백질의 이동을 개시하는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.

[101] 신호서열은 당업계에 그 특징이 잘 알려져 있으며, 통상 16 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함하나, 그보다 더 많거나 적은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 통상적인 신호 펩타이드는 기본 N 말단 영역, 중심의 소수성 영역 및 보다 극성인 (Polar) C 말단 영역의 세 영역으로 구성된다. 중심 소수성 영역은 미성숙 폴리펩타이드가 이동하는 동안 막지질 이중층을 통하여 신호서열을 고정시키는 4 내지 12개의 소수성 잔기를 포함한다.

[102] 개시 이후에, 신호서열은 흔히 신호 펩티다아제(Signal peptidases)로 알려진 세포 효소에 의하여 ER의 루멘(Lumen) 내에서 절단된다. 이때, 상기 신호서열은 tPa(tissue Plasminogen Activation), HSV gDs(Signal sequence of herpes simplex virus glycoprotein D), 또는 성장 호르몬(Growth hormone)의 분비신호서열일 수 있다. 바람직하게, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵 세포에서 사용되는 분비 신호서열을 사용할 수 있다. 또한, 숙주세포에서 발현 빈도가 높은 코돈으로 치환하여 사용할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 신호서열은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[103] **폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터**

[104] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 제공한다. 구체적으로 상기 벡터는 항-Tie2 항체 또는 이의 단편의 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 21, 서열번호 23, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 암호화하는

염기서열을 포함할 수 있다. 상기 벡터는 상기 항-Tie2 항체의 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 22, 서열번호 24 또는 서열번호 26의 아미노산을 포함하는 경쇄 가변영역을 암호화하는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 중쇄영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 경쇄영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 각각의 다른 벡터에 적재될 수도 있고, 하나의 벡터에 적재될 수도 있다.

[105] 상기 벡터는 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포 유전체 내로 재조합 및 삽입될 수 있다. 또는 상기 벡터는 에피좀으로서 자발적으로 복제될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 수단으로 이해된다. 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[106] 구체적으로, 상기 벡터는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 상업적으로 개발된 플라스미드(예, pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(예, pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(예, pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(예, Yep13, Yep24, Ycp50 등), 파아지 DNA(예, Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(예, 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 백시니아 바이러스(Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(예, 배큘로바이러스(Baculovirus) 등)이 될 수 있다. 상기 벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[107] 본 명세서에서 사용된 용어, 목적 단백질의 "유전자 발현" 또는 "발현"은, DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역 및 항체 생산물 또는 이의 단편의 분비를 의미하는 것으로 이해된다. 유용한 발현 벡터는 RcCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다. 상기 발현 벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 인간 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, 및 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 폴리아데닐레이션 신호서열을 포함할 수 있다.

[108] **형질전환 세포**

[109] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.

[110] 본 명세서에서 사용된 용어, "형질전환 세포"는 재조합 발현 벡터가 도입될 수 있는 원핵세포 및 진핵세포를 나타낸다. 상기 형질전환 세포는 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환시킴으로써 제작할 수 있다. 또한, 상기 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 본 발명에 따른 항체를 생산할 수 있다.

[111] 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있다. 본 발명의 항체를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다, 구체적으로, 상기 형질전환 방법은

$CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 침전법에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(Electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 감염(Infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시킬 수 있다. 또한, 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 도입할 수 있다.

[112] 또한, 상기 형질전환 세포의 제작에 사용되는 숙주 세포 역시 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 숙주 세포는 원핵세포, 진핵세포, 포유동물, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 상기 원핵세포의 일 예로는 대장균을 사용할 수 있다. 또한, 진핵세포의 일 예로는 효모를 사용할 수 있다. 또한, 상기 포유동물 세포로 CHO 세포, F2N 세포, COS 세포, BHK 세포, 바우스(Bowes) 흑색종 세포, HeLa 세포, 911 세포, AT1080 세포, A549 세포, SP2/0 세포, 인간 림프아구(Human lymphoblastoid), NSO 세포, HT-1080 세포, PERC.6 세포, HEK293 세포 또는 HEK293T 세포 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업자에게 알려진 포유동물 숙주 세포로 사용 가능한 세포는 모두 이용 가능하다.

[113] 또한, 본 발명에 따른 다중 특이적 융합단백질의 치료제로서의 특성을 최적화하거나 기타 다른 목적을 위해, 호스트 세포가 갖고 있는 당화(Glycosylation) 관련 유전자를 당업자에게 알려져 있는 방법을 통해 조작하여 항체의 당쇄 패턴(예를 들어, 시알산, 퓨코실화, 당화)을 조정할 수 있다.

[114] **항체 또는 이의 단편의 제조 방법**

[115] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편의 제조 방법을 제공한다.

[116] 상기 항체의 제조 방법은 i) 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계; 및 ii) 상기 배양액으로부터 항체 또는 이의 단편을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 항-Tie2 항체, 이의 단편, 형질전환 세포는 상술한 바와 동일하다.

[117] 본 명세서에서 사용된 용어, "배양"은 미생물(예를 들어, 상기 형질전환 세포)을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.

[118] 상기 형질전환 세포를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 본 발명의 단백질을 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(Fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[119] 또한, 배양물로부터 상기 단백질을 수득하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 수득 방법은 생산된 본 발명의 단백질을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 수득 방법

은 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면, 암모늄설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법일 수 있다.

[120] **<이중 특이 항체>**

[121] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-Tie 2 항체 또는 이의 단편; 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체를 제공한다. 상기 항-Tie 2 항체 및 이의 단편은 상술한 바와 동일하다.

[122] 이때, 항-Tie 2 항체 또는 이의 단편에 적어도 하나의 VEGF 특이적 결합 부위가 결합된 것일 수 있다. 바람직하게는 항-Tie 2 항체 또는 이의 단편에 두개의 VEGF 특이적 결합 부위가 결합될 수 있다. 또한, VEGF 특이적 결합 부위는 항-Tie 2 항체의 중쇄 불변영역의 C 말단에 결합된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[123] **VEGF 결합 부위**

[124] 본 명세서에서 사용된 용어, "VEGF"는 혈관 내피 성장 인자로서, 혈관 형성을 자극하는 세포에 의해 생성된다. VEGF는 혈관내피세포를 분열 증식시키고, 혈관의 투과성을 증가시켜 혈관 신생에 관여하는 중요한 신호 전달 단백질이다. 상기 VEGF는 VEGF 수용체(VEGFR)와 결합하여 혈관신생 및 림프관 신생을 유도한다. 상기 VEGF는 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F 및/또는 PlGF(Placental growth factor)를 포함할 수 있다.

[125] 본 발명에서 상기 VEGF 단백질은 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류를 포함하는 포유류 유래의 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 또한, 상기 VEGF 단백질은 VEGF 수용체(VEGFR)와 결합하여 VEGF와 동등하거나 유사한 활성을 나타내는 것이라면 제한제한 없이 포함될 수 있다. 여기에서, "활성"은 예를 들어 VEGF 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 이 특이적 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다.

[126] 또한, 상기 VEGF 단백질은 천연형 VEGF 및 이의 단편을 포함할 수 있다. 상기 천연형 VEGF 단백질은 천연의 VEGF 단백질을 의미한다. 상기 천연형 VEGF 단백질에 대한 아미노산 서열 및 폴리뉴클레오티드 서열은 미국국립보건원(NCBI)의 유전자은행(GenBank)과 같은 공지의 데이터베이스 등에서 얻을 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 VEGF 단백질은 서열번호 79, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94 또는 서열번호 95의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[127] 또한, 상기 VEGF 단백질과 동일한 활성을 갖거나 염색체 상의 상기 VEGF 단백질을 암호화하는 유전자 위치가 동일한 이상, 상기 단백질의 하나 또는 몇 개의 아미노산이 첨가, 결실, 치환되는 서열로 구성될 수 있다. 구체적으로, VEGF는 서열번호 79, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94 또는 서열번호 95의 아미노산 서열과 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.

[128] 본 발명에서 VEGF 특이적 결합 부위는 VEGF에 결합하는 수용체, 리간드, 항체 및 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, VEGF에 특이적으로 결합하여 VEGF의 활성을 억제하는 것이라면 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 VEGF 특이적 결합 부위는 수용체일 수 있다. 이때, 상기 수용체는 VEGF 수용체(VEGFR)일 수 있다.

[129] 상기 "VEGF 수용체(VEGFR)"는 혈관내피성장인자(VEGF)와 결합하여 혈관신생(Angiogenesis)을 조절하는 막관통 단백질을 지칭한다. VEGFR은 티로신 키나아제 수용체로서, VEGFR1, VEGFR2 또는 VEGFR3의 세가지 유형으로 존재하며, VEGF는 각각 VEGFR의 세포외 도메인에 결합하여 수용체를 활성화시킨다. 이때, VEGF-A는 VEGFR1과 VEGFR2에 모두 결합하고, 이들 두 수용체는 모두 혈관내피세포에서 발현된다. 또한, VEGF-B와 PlGF는 VEGFR1에만 결합한다. 반면, VEGF-C와 VEGF-D는 VEGFR2와 VEGFR3에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이때, VEGFR3는 림프내피세포에 주로 발현되어 있다. 상기 VEGFR은 7개의 세포외 도메인, 막관통 도메인, 세포내 티로신 키나아제 도메인을 포함한다.

[130] 본 발명에서, VEGFR은 VEGFR의 세포외 도메인일 수 있다.

[131] 본 명세서에서 사용된 용어, "VEGF 수용체의 세포외 도메인"은 상기 VEGF에 결합하는 VEGF 수용체의 도메인을 의미한다. 구체적으로, VEGF 수용체의 막관통 도메인 및 세포내 티로신 키나아제 도메인을 제외한 부분을 의미한다. 구체적으로, VEGFR1(서열번호 96) 또는 VEGFR2(서열번호 80)의 세포외 도메인일 수 있다. 일 구체예로, 상기 VEGFR1 세포외 도메인 및 VEGFR2 세포외 도메인은 각각 서열번호 97 및 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[132] 본 발명에서 상기 수용체는 이의 단편을 포함할 수 있다. 상기 "단편"은 상술한 바와 동일하다. 구체적으로, 상기 수용체 단편은 VEGFR의 N 말단 및/또는 C 말단의 일부가 결실된 것일 수 있다. 보다 구체적으로 VEGFR의 세포외 도메인의 N 말단 및/또는 C 말단의 일부가 결실된 것일 수 있다. 상기 "VEGFR의 세포외 도메인의 단편"은 VEGF가 결합하는 영역인 VEGFR의 도메인 D1, D2, D3 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 VEGFR의 단편은 D2 및/또는 D3을 포함할 수 있다.

[133] 또한, VEGFR은 VEGFR 하위 유형의 세포외 도메인 단편이 서로 융합된 형태의 것일 수 있다. 일 구체예로, VEGFR1의 세포외 도메인 단편 및 VEGFR2의 세포외 도메인 단편이 융합된 형태일 수 있다. 일 구체예로, VEGFR1의 세포외 도메인 단편 및 VEGFR3의 세포외 도메인 단편이 융합된 형태일 수 있다. 일 구체예로, VEGFR2의 세포외 도메인 단편 및 VEGFR3의 세포외 도메인 단편이 융합된 형태일 수 있다. 이때, 상기 세포외 도메인은 직접 연결되거나 링커를 통해 연결될 수 있다. 상기 링커는 펩타이드 링커이며, 펩타이드 링커는 하기에 기술한다. 바람직하게, 상기 VEGFR은 VEGFR1의 D2 도메인 및 VEGFR2의 D3 도메인이 융합된 형태일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 수용체는 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[134] 구체적으로, 상기 VEGF 특이적 결합 부위는 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 상기 항체 및 이의 단편은 상술한 바와 동일하다.

[135] 보다 구체적으로 VEGF에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편은 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역, 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역, 또는 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 VEGF에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편은 펩타이드 링커를 통해 연결될 수 있다. 여기서, 펩타이드 링커는 하기에 기술한다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커는 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 70 또는 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[136] 본 발명에서 상기 VEGF에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편은 VEGF에 특이적으로 결합하여 VEGF의 활성을 억제할 수 있다.

[137] **이중 특이 항체 구조**

[138] 본 발명의 이중 특이 항체는 항-Tie2 항체 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함할 수 있다. 이때, 상기 VEGF 특이적 결합 부위는 항-Tie2 항체의 Fc 영역 또는 이의 변이체에 결합될 수 있다. 또한, 상기 결합은 링커를 통해 연결될 수 있다.

[139] 보다 구체적으로, 상기 이중 특이 항체는 하기 구조식 (I) 및 (II)를 포함하는 융합단백질 이량체 일 수 있다:

[140] N'-X'-[L1]p-Fc 영역 또는 이의 변이체-[L2]q-Y-C' (I); 및

[141] N'-X''-C' (II)

[142] 이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,

[143] 상기 N'은 N 말단이고,

[144] 상기 C'는 C 말단이며,

[145] 상기 -는 결합을 의미하고,

[146] X'은 항-Tie2 항체의 중쇄 가변영역 (VH) 및 중쇄 불변영역(CH1)이고,

[147] X''은 항-Tie2 항체의 경쇄 가변영역(VL) 및 경쇄 불변영역(CL)이고,

[148] X' 및 X''은 결합하여 Tie2에 특이적으로 결합하는 결합 부위(X)를 형성하고,

[149] 상기 Y는 VEGF 특이적 결합 부위이며,

[150] 상기 L1 및 L2는 펩타이드 링커이고,

[151] 상기 p 및 q는 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.

[152] 상기 항-Tie2 항체, VEGF 특이적 결합 부위, Fc 영역 또는 이의 변이체, 중쇄 가변영역(VH), 중쇄 불변영역(CH), 경쇄 가변영역(VL) 및 경쇄 불변영역(CL)은 상술한 바와 동일하다.

[153] 본 명세서에서 사용된 용어, "펩타이드 링커"는 하나 이상의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 의미한다. 전형적으로 1 내지 100개의 연속된 아미노산, 5 내

지 80개의 연속된 아미노산, 7 내지 70개의 연속된 아미노산, 또는 10 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 12 내지 50개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 펩타이드 링커는 당해 기술에 알려져 있거나 본원에서 설명된다. 일 구체예로 펩타이드 링커 L1 또는 L2는 30개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 구체적으로 상기 링커 L1은 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 구체적으로, 한 개, 두 개 또는 세 개의 시스테인을 포함할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커 L1는 면역글로불린의 힌지에서 유래된 것일 수 있다. 일 구체예로 상기 링커 L1은 서열번호 53 또는 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 링커 L2는 (G4S)n을 포함할 수 있고 (G)n 또는 1 내지 10개의 아미노산을 추가로 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 링커 L2는 (G)n 또는 (GS3)n일 수 있다. 이때, n은 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 일 구체예로 상기 링커 L2는 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 70 또는 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[154] 이때, VEGF 특이적 결합 부위는 상술한 바와 동일하다.

[155] 상기 이중 특이 항체의 구체예는 다음과 같다.

[156] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[157] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[158] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[159] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[160] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[161] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[162] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[163] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[164] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[165] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[166] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[167] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[168] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[169] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[170] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[171] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[172] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[173] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[174] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[175] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[176] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[177] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[178] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[179] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[180] 일 구체예에서 상기 이중 특이 항체의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, VEGF 특이적 결합 부위는 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[181] **이중 특이 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드**

[182] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 이중 특이 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 이중 특이 항체는 상술한 바와 동일하다.

[183] 구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45 또는 서열번호 46의 아미노산 서열 포함하는 중쇄를 암호화하는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 47의 아미노산을 포함하는 경쇄를 암호화하는 염기서열을 포함할 수 있다.

[184] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 동일한 폴리펩타이드를 암호화한다면, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl.,37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체지지체 상의 올리고뉴클레오티드 합성법 등을 들 수 있다.

[185] 일 구체예에 따르면, 상기 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45 또는 서열번호 46의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%,

적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[186] 일 구체예에 따르면, 상기 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 47의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[187] 상기 폴리뉴클레오티드는 신호서열(Signal sequence) 또는 리더 서열(Leader sequence)을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 신호서열은 상술한 바와 동일하다.

[188] **폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터**

[189] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 이중 특이 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 제공한다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 상술한 바와 동일하다. 구체적으로 상기 벡터는 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45 또는 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 벡터는 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[190] 이때, 각각의 폴리뉴클레오티드는 각각의 벡터에 적재될 수 있고, 동일한 벡터에 적재될 수 있다.

[191] **형질전환 세포**

[192] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 이중 특이 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다. 상기 이중 특이 항체는 상술한 바와 동일하다.

[193] **이중 특이 항체의 생산방법**

[194] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 이중 특이 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[195] 상기 이중 특이 항체의 제조 방법은 i) 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계; 및 ii) 상기 배양액으로부터 이중 특이 항체를 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[196] **<약학 조성물>**

[197] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체를 유효성분으로 포함하는 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 이중 특이 항체는 상술한 바와 동일하다.

[198] 본 명세서에서 사용된 용어. “혈관 이상 관련 질환”은 혈관신생 이상, 또는 혈관의 구조적 및/또는 기능적 변이와 관련된 질환을 의미한다.

[199] 상기 혈관 이상 관련 질환은 혈관신생 이상, 또는 혈관의 구조적 및/또는 기능적 변이와 관련된 질환일 수 있다. 상기 "혈관신생"은 기존에 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되거나 성장하는 것을 의미하고, 상기 "혈관신생 관련 질환"은 혈관신생의 발생이나 진행과 관련된 질환을 의미한다. 구체적으로 상기 “혈관신생 이상”은 과도하게 증가하거나, 감소 또는 결핍되어 유발되는 것일 수 있다. 상기 “혈관의 구조적 및/또는 기능적 변이 관련 질환”은 혈관의 구조적 비정상화, 혈관의 기능 장애 및 혈관의 손상으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[200] 상기 혈관 이상 관련 질환은 구체적으로 혈관의 누수, 염증, 국소적 허혈에 의해 유발되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 급성 신손상, 만성 신부전, 황반변성, 당뇨성 망막병증, 당뇨성 황반 부종, 망막혈관폐쇄, 증식성 망막병증, 미숙아 망막병증, 각막 이식 거부, 녹내장, 중증하지허혈, 당뇨성 발기부전, 패혈증, 급성 호흡곤란 증후군, 혈관염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 뇌졸중, 혈전증, 폐색증, 암, 전신 적혈증, 건선, 혈우병 관절염, 관련 경화증, 죽상경화반의 모세관 형성, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 부착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론병, 재협착, 죽상경화증, 장 유착, 고양이 스크래치 질환, 궤양, 간경화, 신장염, 당뇨성 신장병, 당뇨병, 염증성 질환 및 신경변성 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[201] 상기 "예방"은 질환의 시작을 억제 또는 지연되도록 하는 모든 조치를 의미한다. 또한, 상기 "치료"는 발현된 질환의 증상이 개선되거나 호전되도록 하는 모든 조치를 의미하며, 상기 치료의 바람직한 효과에는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후 등을 포함한다.

[202] 상기 약학 조성물은 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물에서 그 유효성분은 질환에 대한 치료 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있다. 여기서 "유효량"이란 질환의 상태 개선 또는 치료(Treatment) 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[203] 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터(Pharmacokinetic parameters) 및 클리어런스율(Clearance rate)과 같은 기본적인 파라미터(Underlying parameters)도 효능에 영향을 줄 수 있다. 따라서, "향상된 효능"(예를 들어, 효능의 개선)은 향상된 약동학적 파라미터 및 향상된 효능에 기인할 수 있으며, 시험 동물 또는 인간 대상체에서 클리어런스율 및 질환의 치료 또는 개선과 같은 파라미터를 비교하여 측정될 수 있다.

[204] 상기 약학 조성물은 상기 유효성분 외에, 약학적으로 허용 가능한 담체(carrier) 또는 첨가제를 더 포함할 수 있다. 상기 '약학적으로 허용 가능한'의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다. 상기 담체는 세포 또는 조직 내로의 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하고, 상기 첨가제는 약학 조성물을 필요한 제형으로 제조하기 위해 필요한 임의의 성분들, 예컨대 부형제, 붕해제, 결합제, 착향제, 방부제, 활택제, 안정화제, 점성화제 등을 의미한다.

[205] 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(Phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed, 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.

[206] 상기 본 발명의 유효성분 또는 상기 유효성분을 포함하는 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 개체에 투여될 수 있다. 상기 '약학적으로 유효한 양'은 모든 의학적 치료에 적용 가능한 합당한 이익/위험 비율(Benefit/risk ratio)로 충분히 예방 또는 치료의 효과를 나타내는 양을 의미한다. 또한, 상기 '약학적으로 유효한 양'은 치료해야 할 질환의 중증도, 환자의 나이 및 성별, 질환의 종류, 약제의 활성도, 약제에 대한 민감도, 투여시간, 투여경로, 분비속도, 치료기간 및 본 분야에서 알려진 다른 파라미터를 포함한 다양한 요인에 따라서 달라진다.

[207] 상기 개체는 포유 동물일 수 있고, 바람직하게 인간일 수 있다. 또한, 상기 "개체"는 혈관 이상 관련 질환을 앓고 있거나, 앓을 가능성이 있는 개체를 의미한다.

[208] 본 명세서에서 사용된 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로 비경구 투여일 수 있다. 상기 비경구 투여는 예를 들어, 정맥 투여(Intravenously), 피하 투여(Subcutaneously), 복강내 투여(Intraperitoneally), 자궁내 투여(Intrauterinely), 뇌혈관내 투여(Intracerebrovascularly) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 질환부에 국소적으로 직접 투여할 수 있다.

[209] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 μg/㎏ 내지 10 g/㎏ 범위, 또는 0.01 ㎎/㎏ 내지 1 g/㎏ 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[210] 상기 약학 조성물은 단독으로 또는 다른 치료법과 조합하여 투여될 수 있다. 이와 같은 경우에, 종래의 치료법과 함께 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 1회량 또는 다회 용량으로 나누어서 투여될 수 있다. 이들 요인들을 완전하게 고려할 때, 부작용 없이 최대의 효과를 얻기에 충분한 최소량을 투여하는 것이 중요하며, 이 복용량은 분야의 전문가에 의하여 용이하게 결정될 수 있다. 상기 약학적 조성물의 복용량은 특별하게 한정되지는 않으나, 환자의 건강 상태 및 체중, 질환의 중증도, 약의 종류, 투여경로 및 투여시간을 포함한 다양한 요인에 따라 변경된다.

[211] 또한, 상기 본 발명의 유효성분 또는 상기 유효성분을 포함하는 약학 조성물은 다른 혈관 이상 관련 질환 치료제, 항암제 등과 병용 투여되는 것일 수 있다. 이때, 상기 본 발명의 유효성분 또는 상기 약학 조성물은 혈관 이상 관련 질환 치료 약물, 소염 약물, 항암제 등과 같은 다른 치료제와 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 혈관 이상 관련 질환 치료 약물, 소염 약물, 항암제 등과 같은 다른 치료제를 개체에 먼저 투여한 후, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학 조성물을 상기 개체에 추가로 투여하거나, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학 조성물을 개체에 먼저 투여한 후, 혈관 이상 관련 질환 치료 약물, 소염 약물, 항암제 등과 같은 다른 치료제를 개체에 추가로 투여할 수 있다. 또한, 경우에 따라서, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학 조성물과 혈관 이상 관련 질환 치료 약물, 소염 약물, 항암제 등과 같은 다른 치료제를 동시에 개체에 투여할 수도 있다.

[212] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체의 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료용 용도를 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[213] 상기 항-Tie2 항체, 단편, VEGF, 이중 특이 항체, 개체, 예방, 치료 및 혈관 이상 관련 질환은 상술한 바와 동일하다.

발명의 실시를 위한 형태

[214] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[215] **I. 인간 Tie2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체**

[216] **실시예 1. 인간 Tie2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 제작**

[217] **실시예 1.1. 인간 Tie2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 선별**

[218] 본 발명에 포함된 유효 항체 동정을 위하여, 자체 보유한 인간 항체 라이브러리(다양성: $2.5x10^{11}$) 및 마우스 IgG의 Fc 부위(mFc)가 결합된 재조합 인간 Tie2 세포

외 부위(hTie2-ECD-mFc) 단백질(서열번호 99)을 이용하여 파지 디스플레이 패닝을 실시하였다.

[219] 구체적으로, 항원으로 사용된 hTie2-ECD-mFc를 10 μg/mL 농도로 면역튜브(Immunotube)에 고정하고 항체 라이브러리로부터 발현된 파지 분자들을 1시간 동안 결합시킨 후 PBST(PBS/0.05% Tween20) 완충용액으로 7회 세척하였다. 항원에 결합된 파지 분자들은 100 mM Triethylamine 용액을 10분간 처리하여 회수되었고, TG1 대장균 숙주에 감염시켜 2x YT/ampicillin/2% glucose 고체배지에 도말하여 항원 결합 파지가 감염된 TG1 숙주를 획득하였다.

[220] 그 후, M13KO7 helper 파지를 이용하여 획득된 TG1 숙주로부터 다시 파지 분자들을 발현시켰고, 이어지는 패닝에 사용하였다. 총 3차 패닝 라운드까지 상기 서술한 방법으로 진행하였고, 결합력이 높은 항체 발현 파지들을 회수하기 위해 2차 라운드에서 15회, 3차 라운드에서 20회의 세척 과정을 수행하였다. 이후 3차 라운드에서 회수된 단일 클론들을 96-웰 플레이트 내 150 μL/웰로 분주된 2x YT/ampicillin/2% glucose 액체 배지에 각각 접종하여 37℃에서 16시간 동안 교반 배양하였다. 배양액에 50 μL의 2x YT/50% glycerol 용액을 첨가하여 마스터 플레이트를 제작 후 마스터 플레이트로부터 10 μL를 취해 다시 150 μL/웰로 분주된 2x YT/ampicillin/2% glucose 액체 배지에 접종하여 37℃에서 약 3시간 교반 배양하였다. 배양 후 플레이트를 4,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 대장균 펠렛을 150 μL의 2x YT/ampicillin/1mM IPTG 액체 배지로 재 부유시켜 30℃에서 16시간 배양하였다.

[221] 상기 방법으로 배양한 배양액을 원심분리 후 대장균 펠렛을 150 μL의 주변세포질(Periplasmic) 추출용액(30 mM Tris-HCl, 20% sucrose, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 처리하여 30분 동안 얼음에 정치하였다. 이후 4,000 rpm에서 10분 원심분리하여 상층액으로부터 주변세포질 단백질을 회수하였다. Periplasmic 단백질은 hTie2-ECD-mFc 또는 마우스 Tie2 세포외 부위(mTie2-ECD-mFc)가 100 ng/웰로 코팅된 96-웰 ELISA 플레이트에 처리되어 주변세포질 scFv 항체의 스크리닝을 진행하였다.

[222] 그 후, 스크리닝을 통해 hTie2-ECD(서열번호 91) 및 mTie2-ECD(서열번호 100)에 교차 결합하는 scFv 항체를 스크리닝하였고, 결합력을 보인 항체의 서열분석을 통해 아래와 같이 중쇄 및 중쇄 가변영역 내 상보성결합부위(CDR)들을 가지는 5종의 서로 다른 항체(각각 'MT-100', 'MT-110', 'MT-120', 'MT-101', 'MT-111'로 명명)를 발굴하였다(표 1).

[223] 각 항체의 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL) 서열은 표 2 내지 표 6에 나타내었다. 상기 항체를 IgG 형태로 일시발현을 위해 IgG1 중쇄 불변영역(CH1-hinge-CH2-CH3) 및 경쇄 불변영역(CL)이 각각 도입된 pcDNA3.4 기반 중쇄 및 경쇄 발현 벡터(Invitrogen)에 클로닝하여 일시발현 및 정제에 사용하였다. 이하 항체는 MT-100 또는 MT-100 항체, MT-110 또는 MT-110 항체, MT-120 또는

MT-120 항체, MT-101 또는 MT-101 항체 및 MT-111 또는 MT-111 항체로 호환되어 사용될 수 있다.

[224] [표1]

항체명	CDR	아미노산 서열	서열번호
MT-100	MT-100 -HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-100 -HCDR2	TSNDGSTT	2
	MT-100 -HCDR3	ARKVVRGYSYHDAFDI	3
	MT-100 -LCDR1	QSVSSY	4
	MT-100 -LCDR2	GAS	5
	MT-100 -LCDR3	QQYGTTPYT	6
MT-110	MT-110 -HCDR1	SDSFTSNW	7
	MT-110 -HCDR2	IYPDDSDT	8
	MT-110 -HCDR3	ARQIDTGYFDY	9
	MT-110 -LCDR1	QGISSN	10
	MT-110 -LCDR2	AAS	11
	MT-110 -LCDR3	QQANSFPLT	12
MT-120	MT-120 -HCDR1	GFTFAGQA	13
	MT-120 -HCDR2	ISWDSGGI	14
	MT-120 -HCDR3	ARGSTAFPRYFEY	15

	MT-120 -LCDR1	QDIDSY	16
	MT-120 -LCDR2	ASS	17
	MT-120 -LCDR3	QQGYDFPWT	18
MT-101	MT-101 -HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-101 -HCDR2	TSNDGSTT	2
	MT-101 -HCDR3	ARKVVRGYHYHDAFDI	19
	MT-101 -LCDR1	QSVSSY	4
	MT-101 -LCDR2	GAS	5
	MT-101 -LCDR3	QQYGTTPYT	6
MT-111	MT-111 -HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-111 -HCDR2	TSNDGSTT	2
	MT-111 -HCDR3	ARKVVRGYLPHDAFDI	20
	MT-111 -LCDR1	QSVSSY	4
	MT-111 -LCDR2	GAS	5
	MT-111 -LCDR3	QQYGTTPYT	6

[225] [표2]

MT-100	아미노산 서열	서열 번호

MT-100 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARKVVRGYSYHDAFDIWGQGTMVTVSS	21
	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV	52
	제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
	Fc(CH2+CH3)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	54
MT-100 LC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[226] [표3]

MT-110		아미노산 서열	서열 번호
MT-110 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VH	QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSSDSFTSNWIAWVRQKPGKGLEWMGIIYPDDSDTRYSPSFQGQVTMSADKSTSTAYL	23

		QWSSLKASDTAMYYCARQIDTGYFDY WGQGTLITVSS	
	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKV	52
	제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
	Fc(CH2+CH3)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	54
MT-1 10 LC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL	DIQMTQYPSSLAASTGDRVTITCRASQG ISSNLAWYQQKPGNSPKLLIYAASSLQS GVPSKFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQANSFPLTFGPGTKVEIK	24
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[227] [표4]

MT-120		아미노산 서열	서열 번호
MT-1 20 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VH	QLQLVQSGGDLVQPGRSLRLSCAASGF TFAGQAMHWVRQAPGKGLEWVSSISW DSGGIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGSTAFPRYFE YWGQGTLVTVSS	25
	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA	52

		VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKV	
	제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
	Fc(CH2+CH3)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	54
MT-1 20 LC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL	DIQMTQSPSSVSASIGDKVTITCRSSQDI DSYLAWYQQRPGQTPNLLIYASSTLQD GVPSRFSGSGSGTHFTLTITNLQPEDSAT YHCQQGYDFPWTFGQGTKVEIK	26
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[228] [표5]

MT-101		아미노산 서열	서열 번호
MT-1 01 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF TFNSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSN DGSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRSEDTAVYYCARKVVRGYHYH DAFDIWGQGTMVTVSS	27
	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKV	52
	제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53

	Fc(CH2+CH3)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	54
MT-1 01 LC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV FYCQQYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[229] [표6]

MT-111		아미노산 서열	서열 번호
MT-1 11 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF TFNSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSN DGSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRSEDTAVYYCARKVVRGYLPH DAFDIWGQGTMVTVSS	28
	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKV	52
	제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
	Fc(CH2+CH3)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA	54

		KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
MT-1 11 LC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV FYCQQYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[230] **실시예 1.2. MT-101 기반 IgG1-LALA 및 IgG4 변이 항체 설계**

[231] IgG1 형태의 항체는 Fc 감마 수용체(Fc-gamma receptor; FcγR) 군에 결합하여 비특이적 면역세포 활성 부작용을 유도할 수 있기에, IgG1 형태의 Tie2 결합 항체(MT-101)로부터 Fc 반응기능이 감소된 두 가지 변이 항체를 제작하여 평가하였다. 구체적으로, IgG1의 CH2 영역에 234번 및 235번 아미노산인 류신(Leucine)을 알라닌(Alanine)으로 치환된 변이 항체를 제작하였다. 구체적으로, MT-101(IgG1)의 Fc 영역 내 234번 및 235번 류신이 알라닌으로 치환되도록 DNA 서열 변이를 유도할 수 있는 프라이머를 제작하여 MT-101의 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에서 점돌연변이(Site-directed mutagenesis)를 유도하였다. 그 결과, MT-101(IgG1-LALA) 중쇄(표 9, 서열번호 29)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 제작하였다. 추가적으로, 자연 상태에서 FcγR에 결합력이 낮은 동형의 MT-101(IgG4) 변이 항체 제작을 위해, 인간 IgG4 불변영역이 도입된 pcDNA3.4 벡터에 MT-101의 중쇄 가변영역을 클로닝하여 MT-101(IgG4) 중쇄(표 9, 서열번호 30) 발현 벡터를 제작하였다. 상기 2종의 변이 항체는 각각의 중쇄 발현 벡터와 MT-101(IgG1)의 경쇄 발현 벡터를 이용하여 일시발현 및 정제하였다.

[232] [표7]

MT-101(IgG1-LALA)		아미노산 서열	서열 번호
MT-101(IgG1-LA LA) HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF TFNSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSN DGSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL	27

		QMNSLRSEDTAVYYCARKVVRGYHYH DAFDIWGQGTMVTVSS	
	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKV	52
	제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
	Fc(CH2 +CH3)	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	63
MT-101 (IgG1-L ALA) LC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV FYCQQYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[233] [표8]

MT-101(IgG4)		아미노산 서열	서열 번호
MT-101(IgG4) HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF TFNSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSN DGSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRSEDTAVYYCARKVVRGYHYH DAFDIWGQGTMVTVSS	27
	CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA	90

		VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRV	
	제1 링커	ESKYGPPCPPCP	65
	Fc(CH2 +CH3)	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	66
MT-101(IgG4) LC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV FYCQQYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[234] [표9]

서열 정보	서열	서열 번호
MT-101(IgG 1-LALA)-HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSY GMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDTAVY YCARKVVRGYHYHDAFDIWGQGTMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF	29

	LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	
MT-101(IgG4)-HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSY GMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDTAVY YCARKVVRGYHYHDAFDIWGQGTMVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK	30

[235] **실시예 1.3. 대조군 항체 설계**

[236] 본 발명의 MT-101과 기출원된 Tie2 활성화 항체와의 비교 분석을 위하여 총 5종의 대조군 Tie2 활성화 항체를 설계 및 제작하였다. 구체적으로, 국제공개특허 WO 2021-029746 A2 내 포함된 2F2 항체 및 4E2 항체, 미국등록특허 US 9902782 B2 내 포함된 TIE-1-Igγ1 항체, 미국공개특허 US 2023-0287109 A1 내 포함된 IGT-427 항체, 국제공개특허 WO 2021-102173 A1 내 포함된 #3 항체를 대조군으로 설정하였다. 상기 각각의 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 아미노산 서열을 참고하여 역번역(Reverse translation)한 후, Expi293F 세포에서 생산하기 위하여 코돈 최적화 과정을 수행하여 유전자를 합성하였다. 합성된 각각의 중쇄 및 경쇄 가변영역 유전자는 IgG1 중쇄 불변영역 및 경쇄 불변영역을 갖는 pcDNA3.4 벡터에 각각 클로닝하여 총 5종 항체에 대한 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 제작했다. 대조군 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 표 10과 같으며, 일시발현 및 정제 과정을 거쳐 실험에 사용하였다.

[237] [표10]

항체명	구분	아미노산 서열	서열 번호
2F2	2F2-HC	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMTWVRQAPGKGLEWVSRISGSGGSTNYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGGLHHGFDIWGQGTMVTVSSASTKGPS	31

		VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	
	2F2-LC	SYELTQPPSLSVAPGKTARITCDGDNIESKSVH WYQQKPGQAPVLVIYYDNDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTYTDQ PVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	32
4E2	4E2-HC	QVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSDY AMHWVRQAPGKGLEWVALISFDGNNQYYAD SVKGRFTISRDNSKNTIYLQMNSLRAEDTAVY YCTTDTMSGYDWEDAFDIWGQGTMITVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	33
	4E2-LC	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQSIGRWL AWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS	34

		VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
TIE-1 -Igγ1	TIE-1-I gγ1-HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKGLEWVAGISWNSGSIVYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDIREQLVEDAFDIWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	35
	TIE-1-I gγ1-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHSH RYNYLDWYQQKPGKAPKLLIYLGSNRASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCMQTL QTPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
	TIE-1-Ig γ1-tetrav alent-HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKGLEWVAGISWNSGSIVYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDIREQLVEDAFDIWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FDDYAMHWVRQAPGKGLEWVAGISWNSGSI VYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDIREQLVEDAFDIWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD	37

		YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	
IGT-427	IGT-427-HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTS YWMNWVRQAPGQGLEWMGMIHPSDSETRLN QKFMDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARGLYGNSWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	38
	IGT-427-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGISLN WYQQEPGKAIKRLIYATSSLDSGVPKRFSGSRS GTEYTLTISSLESEDFADYYCLQYASSPYTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	39
p2.3	p2.3-HC	DVQLVESGGGVVRPGESLRLSCTASGFTFDSY GMSWVRQAPGKGLEWVSSINVGDNTYYADS VRGRFIISRDSSRNTLYLQMNSLTAEDTAVYY CANWNSFFDYWGLGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS	40

		GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
	p2.3-LC	EIVLTQSPGTLSLSPGEIATLSCRASQNVRSDLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYSNWPPLTF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	41

[238] **실시예 1.4. 인간 Tie2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 제작**

[239] 상기 실시예 1.1 내지 실시예 1.3의 방법으로 제작된 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 pcDNA3.4 벡터(Invitrogen)를 Expi293F 세포 또는 ExpiCHO 세포에 도입하여 항체의 일시발현 및 정제를 진행하였다. 구체적으로, Expi293 세포에서 항체의 일시발현을 위하여, 중쇄와 경쇄의 발현 벡터 각 50 μg씩(총 100 μg)을 Opti-MEM 배지(6 mL)에 희석하고, ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit의 시약(ExpiFectamine™ 293 Reagent) 320 μL를 Opti-MEM 배지(6 mL)에 희석하여 각각 5분간 정치하였다. 상기 벡터를 첨가한 배지와 상기 시약을 첨가한 배지를 섞어 10분간 추가 정치한 후, Expi293F 세포 100 mL($2.0x10^6$ 세포/mL)에 첨가하여 24시간 동안 부유 배양하였다.

[240] 상기 서술한 방법으로 배양된 세포에 ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer를 첨가하여 4일 동안 추가 배양한 다음, 10,000xg 속도에서 30분 동안 원심분리하고 0.2 μm 필터로 여과하여 상층액을 회수하였다. ExpiCHO 기반 항체를 발현시키기 위하여 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 각 40 μg씩 총 80 μg을 OptiPRO™ SFM 배지(4 mL)에 희석하고, ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit의 시약(ExpiFectamine™ CHO Reagent) 320 μL를 OptiPRO™ SFM 배지 3.7 mL에 희석하여 각각 4분간 정치하였다. 상기 벡터를 첨가한 배지와 상기 시약을 첨가한 배지를 섞어 5분간 더 정치한 후, ExpiCHO 세포 100 mL($3.0x10^6$세포/mL)에 첨가하여 22시간 동안 부유 배양하였다.

[241] 상기와 같이 배양된 세포에 ExpiFectamine™ CHO Transfection Enhancer 1 600 μL 와 ExpiCHO™ Feed solution 16 mL을 처리하고, 5일 뒤에 ExpiCHO™ Feed solution 16 mL을 추가로 처리하여 12일 동안 배양하였다. 이후 배양액을 10,000xg로 40분 동안 원심분리 한 다음 0.2 μm 필터로 여과하여 상층액을 회수하였다. Expi293F 또는 ExpiCHO로부터 회수된 상층액은 AKTA Avant 150 기기(Cytiva)를 이용하여 친화성 컬럼(MabSelect PrismA, cytiva)에 결합시킨 후 산성 용출액(100 mM 글리신 완충용액, pH 3.5)으로 용출하였다. 용출시킨 항체는 제염 컬럼(Desalting column, Hiprep 26/10)을 사용하여 PBS 완충용액 내로 최종 정제되었다. 흡광도 또는 BCA 분석으로 정제된 항체의 농도를 측정한 후 비환원(Non-reducing) 및 환원(Reducing) 조건 하에서 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과, 중쇄(약 50 kDa) 및 경쇄(약 25 kDa)를 갖는 총 분자량이 약 150 kDa인 항체를 확인하였다.

[242] **실시예 2. 항-Tie2 항체의 결합 친화도 확인**

[243] 상기 실시예 1.4를 통하여 준비한 항체의 인간 Tie2 단백질에 대한 결합력을 확인하였다.

[244] BLI(Biolayer interferometry) 기법에 기반하여 Octet K2(ForteBio) 기기로 항체의 친화도를 측정하였다. 구체적으로 AR2G 바이오센서 팁을 3차 증류수로 10분간 수화(hydration)시킨 후, 20 mM EDC 및 10 mM Sulfo-NHS을 포함하는 버퍼를 이용하여 활성화시켰다. 이후, 항원으로 60 nM의 hTie2-ECD-6xHis 단백질(서열번호 101) 또는 mTie2-ECD-mFc 단백질을 고정화 버퍼(10 mM sodium acetate; pH 6.0)에 희석하여, 상기 활성화된 AR2G 팁과 10분 동안 반응시켜 항원을 상기 AR2G 팁에 고정화(immobilization)시켰다.

[245] 그 후, 1 M의 에탄올아민(ethanolamine, pH 8.5) 용액을 처리하여 항원 고정화 반응을 종료시키고, 항원-항체 결합의 기준선(baseline)을 잡기 위해 상기 AR2G 팁을 PBS 완충용액에서 60초 동안 반응시켰다. 이후, MT-100(IgG1), MT-111(IgG1), MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 또는 MT-101(IgG1-LALA)를 PBS 완충용액을 이용하여 5 nM에서 100 nM 사이의 농도에서 3구간으로 희석하여 상기 항원이 고정된 AR2G 팁과 800초 동안 결합(association)시킨 후 800초 동안 해리(dissociation)시켰다. 결합 및 해리 반응 분석을 통해 확인된 반응곡선을 기반으로, Data Analysis HT 12.0 프로그램의 global fitting 분석을 통해 K_{on}, K_{off} 및 K_D 값을 산출하여 각 항체의 친화도를 측정하였다.

[246] [표11]

항원	항체	K_D(M)	K_{on}(1/Ms)	K_{off}(1/s)
인간 Tie2	MT-100	3.42E-09	3.38E05	1.15E-03
	MT-111	6.41E-10	1.04E05	6.67E-05
	MT-101(IgG1)	4.71E-10	1.93E05	9.12E-05

	MT-101(IgG4)	7.21E-10	7.40E05	5.34E-04
	MT-101(IgG1-LALA)	4.75E-10	7.87E05	3.74E-04
마우스 Tie2	MT-100	1.44E-08	5.84E05	8.44E-03
	MT-111	1.95E-09	2.43E05	4.75E-04
	MT-101(IgG1)	6.66E-09	2.73E05	1.82E-03

[247] 그 결과, 상기 표 11에 나타낸 바와 같이, MT-100, MT-111 및 MT-101 중 MT-101(IgG1)이 인간 Tie2 단백질에 대해 가장 높은 친화도를 갖는 것을 확인하였다. 또한, MT-101(IgG1)과 동일한 가변영역을 갖는 MT-101(IgG4) 및 MT-101(IgG1-LALA) 변이체 역시 인간 Tie2 단백질에 대한 친화도가 0.47 nM 내지 0.72 nM 수준으로 MT-101(IgG1)과 유사함을 확인하였다.

[248] **실시예 3. 항-Tie2 항체에 의한 Tie2의 활성화 확인**

[249] 상기 실시예 1.4에서 준비한 IgG1 형태의 Fc를 backbone으로 하는 항체(MT-100, MT-101, MT-110 및 MT-111) 및 MT-101의 동종 항체(MT-101(IgG4)) 및 변이 항체(MT-101(IgG1-LALA))의 Tie2 활성화능을 확인하기 위하여 Tie2 단백질(인간 또는 마우스) 및 상기 Tie2 단백질의 하위 신호 전달 인자(AKT, ERK, eNOS 또는 FOXO1)의 인산화(P-Tie2, P-AKT, P-ERK, P-eNOS 또는 P-FOXO1)를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다.

[250] 구체적으로, 인간 Tie2 단백질을 발현하는 HEK293 세포($1x10^6$ 세포) 혹은 마우스 Tie2를 발현하는 3T3-J2 세포($5x10^5$ 세포)를 60 mm 배양 접시 내에서 DMEM 배지를 이용하여 37℃의 온도로 배양하였다. 상기와 같이 배양된 세포를 무혈청 DMEM 배지에서 6시간 동안 유지하여 혈청 기아 상태로 만든 다음, 상기 항체(MT-100)를 0.1 μg/mL 내지 20 μg/mL의 농도 범위에서 15분 동안 처리한 후, 용해 버퍼로 세포를 용해하여 세포 용해물을 획득하였다.

[251] 상기와 같이 얻어진 세포 용해물을 대상으로 SDS-PAGE를 수행한 다음, 이를 PVDF 멤브레인에 옮긴 후, 3% BSA가 희석된 0.1% Tween20 TBST 완충용액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1:1,000으로 희석된 1차 항체를 각각 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이때, 상기 1차 항체는 항-phospho-tyrosine 항체(Sigma, 05-321), 항-Tie2 항체(R&D systems, AF313), 항-phospho-AKT 항체(Cell Signaling, 9271), 항-AKT 항체(Cell Signaling, 9272), 항-phospho-ERK 항체(Cell Signaling, 9106), 항-ERK 항체(Cell Signaling, 9102), 항-phospho-eNOS 항체(Cell Signaling, 9571), 항-eNOS 항체(Cell Signaling, 5880), 항-phsopho-FOXO1 항체(Cell Signaling, 9461), 항-FOXO1 항체(Cell Signaling, 2880)를 사용하였다. 1차 항체 반응 후, 1:5,000으로 희석된 과산화효소-결합(Peroxidase-conjugated) 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때, 2차 항체는 항-토끼 IgG 항체(Invitrogen, 31460), 또는 항-마우스 IgG 항체

(Abcam, ab97023)를 사용하였다. 상기 2차 항체 반응 종료 후, ECL 용액을 처리하여 단백질의 발현을 확인하였다.

[252] 그 결과, MT-100이 인간 또는 마우스의 Tie2, AKT 또는 ERK 단백질의 인산화를 유도하는 것을 확인할 수 있었다(도 1a 및 도 1b).

[253] 또한, HEK293 세포 대신 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)와 배지로 EGM-2 배지 및 무혈청 M199 배지를 사용하고, Tie2의 인산화를 확인하기 위해 세포를 용해하였다. 그 후, 면역침강법(Immunoprecipitation)를 이용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 인간 Tie2가 발현되는 HUVEC에서 Tie2 단백질의 인산화 및 상기 신호 전달 인자의 인산화를 확인하였다.

[254] 그 결과, HEK293 세포에서와 동일하게 상기 항체(MT-100, MT-101, MT-110, MT-111, MT-101(IgG4) 또는 MT-101(IgG1-LALA))가 HUVEC에서도 Tie2, AKT, ERK, eNOS 또는 FOXO1 단백질의 인산화를 유도하는 것을 확인하였다(도 1c 내지 도 3).

[255] **실시예 4. Tie2 항원 단백질에 대한 항-Tie2 항체의 특이성 확인**

[256] 상기 실시예 1.4에서 수득한 항-Tie2 항체가 혈관내피세포에서 Tie2 단백질만을 특이적으로 인산화시키는지, 아니면 상기 Tie2 단백질 이외에 다른 수용체 단백질도 인산화시키는지 확인하였다.

[257] 구체적으로, HUVEC($3x10^6$ 세포)을 100 mm 배양 접시에서 EGM-2 배지를 이용하여 37℃의 온도로 배양하였다. 상기와 같이 배양된 HUVEC을 1%의 혈청이 포함된 M199 배지에서 6시간 동안 유지하여 혈청 기아 상태로 만들고, MT-100을 5 μg/mL의 농도로 30분간 처리하였다. 상기 세포에 용해 완충용액을 처리하고 세포를 용해하여 세포 용해물을 수득하였다. 상기의 방법으로 수득한 세포 용해물을 BCA 단백질 정량법으로 정량한 후, 49개의 인간 티로신 수용체 단백질(Receptor tyrosine kinases(RTKs); ALK/CD246, Axl, DDR1, DDR2, Dtk, EGF R, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6, ErbB2, ErbB3, ErbB4, FGF R1, FGF R2 alpha, FGF R3, FGF R4, Flt-3/Flk-2, HGF R/c-MET, IGF-I R, Insulin R/CD220, M-CSF R, Mer, MSP R/Ron, MuSK, PDGF R alpha, PDGF R beta, c-Ret, ROR1, ROR2, Ryk, SCF R/c-kit, Tie-1, Tie-2, TrkA, TrkB, TrkC, VEGF R1/Flt-1, VEGF R2/KDR 및 VEGF R3/Flt-4)에 대한 항체가 포함되어 있는 멤브레인에 처리하여 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 상기 멤브레인에 항-타이로신 인산화 항체(Anti-phospho-tyrosine-HRP)를 처리하고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, ECL 용액을 처리하여 49개의 RTKs의 인산화를 확인하였다.

[258] 그 결과, MT-100은 HUVEC에서 49개의 RTKs 중에서 Tie2 단백질만을 선택적으로 인산화시키는 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[259] **실시예 5. Tie2 항원 단백질에 대한 항-Tie2 항체의 종간 교차 결합력 확인**

[260] 종간 Tie2 단백질에 결합하는 항-Tie2 항체(MT-100, MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 및 MT-101(IgG1-LALA))가 다른 종(Species) 유래의 Tie2 단백질에 대해서도 교차 결합(Cross-species binding)을 할 수 있는지 확인하였다.

[261] 이에, 원숭이, 마우스, 래트, 개 또는 돼지의 Tie2 유전자를 합성하였고, pcDNA3.4 벡터에 클로닝하여 각 종별 Tie2 발현 벡터(서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105 및 서열번호 106)를 제작하였다. Tie2 발현 벡터 각 10 μg 및 Lipofectamine 2,000(Invitrogen) 20 μL를 Opti-MEM 배지 1 mL에 희석하여 HEK293T 세포($2.0x10^6$ 세포)에 처리하고, 2일간 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리(300xg, 5분)하여 상층액을 분리하여 제거하고, 세포를 FACS 완충용액으로 세척하였다.

[262] 상기와 같이 얻어진 각 종별 Tie2가 발현된 세포에 항-Tie2 항체(MT-100, MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 또는 MT-101(IgG1-LALA))를 1 μg/mL의 농도로 처리하고 실온에서 1시간 반응 후, FACS 완충용액으로 2회 세척하였다. 그리고 1:200으로 희석된 염소 항-인간 IgG-FITC(FITC-conjugated goat anti-human IgG, Ivitrogen)를 100 μL씩 첨가하고 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, FACS 완충용액으로 다시 2회 세척한 후 NovoCyte Flow Cytometer 기기(Agilent)를 이용하여 항체 결합 여부를 확인하였다.

[263] 그 결과, 항-Tie2 항체(MT-100, MT-101(IgG1), MT-101(IgG4), MT-101(IgG1-LALA))는 인간 뿐 아니라, 원숭이, 마우스, 래트, 개 또는 돼지 유래의 Tie2 단백질에도 결합하는 것을 확인하였다(도 5a 내지 도 5d).

[264] **실시예 6. 항-Tie2 항체의 혈관내피세포 활성화 효과 확인**

[265] **실시예 6.1. 항-Tie2 항체의 혈관 형성 및 네트워크 구조 안정화 효과 분석**

[266] 항-Tie2 항체가 혈관내피세포의 혈관 형성(Tube formation) 및 네트워크 안정화를 유도하는지 마트리젤(Matrigel) 상에서 분석하였다.

[267] 구체적으로, 1%의 혈청이 포함된 M199 배지에서 6시간 동안 배양하여 혈청 기아 상태가 된 HUVEC($1x10^5$ 세포)을 GFR(Growth factor reduced)-마트리젤이 코팅된 24-웰 배양 접시에 접종하였다. 상기 HUVEC에 MT-100을 10 μg/mL 농도로 처리하고, 대조 물질인 Ang-1(R&D systems, 923-AN)을 500 ng/mL 농도로 처리하여 18시간 동안 배양하면서 모세혈관 유사 관형성(Capillary-like tube formation) 정도를 확인하였다.

[268] 그 결과, MT-100 처리군에서 양성 대조군인 Ang-1 처리군과 유사하게 혈관 네트워크가 증가되고 또한 장기간 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[269] **실시예 6.2. 항-Tie2 항체의 혈관내피세포 손상 억제 효과 분석**

[270] 항-Tie2 항체의 혈관내피세포의 손상 억제 효능은 무혈청 및 저산소 조건에서 배양할 때 유도되는 혈관내피세포의 세포사멸(Apoptosis) 분석을 통해서 확인하였다.

[271] 구체적으로, HUVEC($5x10^4$ 세포)을 24-웰 플레이트에 접종한 뒤, EGM-2 배지를 이용하여 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 다음 날, 무혈청 M199 배지에서 HUVEC에 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1))를 도 7a에 도시한 농도별(0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM 또는 100 nM)로 처리하고, 37℃의 저산소(산소 1% 미만) 배양 조건에서 40시간 동안 배양하였다. 상기의 방법으로 배양된 세포를 고정하고 Crystal violet 시약을 처리하여 10분간 염색하였다. 그 후, 증류수를 이용하여 4회 세척한 후, 1% SDS가 포함된 증류수로 염색된 시약을 용출시켜 흡광값(OD 570 nm)을 측정하였다.

[272] 또한, 상기와 같은 방법으로 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 및 MT-101(IgG1-LALA))를 도 7b에 도시한 농도(0.5 nM 또는 5 nM)로 처리하고 흡광값(OD 570 nm)을 측정하였다.

[273] 그 결과, MT-101(IgG1) 처리군은 대조군(Control)에 비해 농도 의존적으로 세포사멸을 억제하는 것으로 확인되었다(도 7a). 또한, MT-101(IgG4) 및 MT-101(IgG1-LALA)도 MT-101(IgG1)과 동일하게 각각 세포사멸 억제 효능이 있음을 확인할 수 있었다(도 7b).

[274] **실시예 6.3. 항-Tie2 항체의 혈관내피 투과성(누수) 및 염증 억제 효과 분석**

[275] 혈관의 비정상화로 인한 혈관내피 투과성 증가(일명, 누수 현상)에 대한 억제 효과를 세포면역화학염색법을 이용하여 확인하였다.

[276] 구체적으로, 12-웰 트랜스웰 플레이트(Transwell plate)(0.4 μm pore)의 상부 챔버(Upper chamber)에 HUVEC($1x10^5$ 세포)을 접종하여 3일 동안 배양한 후, 6시간 동안 혈청 기아 상태로 유지하였다. 그 후, 혈관 투과성을 인위적으로 증가시키기 위해 50 ng/mL의 VEGF(R&D systems, 293-VE)를 처리하는 한편, MT-100을 20 μg/mL의 농도로 5시간 동안 처리하였다. 그 후, 형광이 표지된 덱스트란(FITC-Dextran, 70 kDa)을 배양액에 첨가하고 30분 후에 HUVEC 사이로 투과된 덱스트란을 형광분석기(SpectraMAx i3x)로 비교 분석하였다.

[277] 그 결과, VEGF만을 단독으로 처리한 세포에서는 혈관의 투과성이 증가된 반면, VEGF 및 MT-100을 처리한 세포에서는 혈관 투과 현상이 완전히 억제된 것을 확인하였다(도 8a).

[278] 또한, HUVEC($1x10^5$ 세포)을 35 mm confocal dish(SPL)에 접종하고 2일 동안 배양한 후, 6시간 동안 혈청 기아 상태로 유지하였다. 그리고, VEGF(50 ng/mL) 또는 VEGF(50 ng/mL) 및 MT-100(10 μg/mL)를 처리한 뒤 3시간 동안 반응시켰다. 그 후, 세포를 4% 파라포름알데히드(Paraformaldehyde)로 10분간 고정하고, 0.2% Triton X-100을 포함된 PBS 완충용액을 이용하여 10분 동안 세포막을 투과시킨 뒤, 1% BSA가 포함된 PBS 완충용액으로 1시간 동안 상온에서 블로킹하였다. 1차 항체로 항-VE-cadherin 항체(Santacruz, sc-9989)를 1:50의 비율로 희석하여 처리한 뒤, 상온에서 2시간 반응시켰다. 그리고, 형광이 표지된 2차 항체(Alexa Fluor 488 donkey anti-goat, Invitrogen)를 1:200의 비율로 희석하여 처리한 뒤, 상온

에서 1시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 1:1,000으로 희석된 DAPI로 세포에 처리하고 3분간 세포핵을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다.

[279] 그 결과, VEGF 단독 처리 세포에서는 세포-세포간의 세포연접이 현저히 약하게 형성되어 있으나, MT-100을 처리한 세포에서는 세포-세포간의 세포연접이 잘 유지되고 경계면이 강하게 발달되는 것으로 확인되었다(도 8b).

[280] 또한, 항-Tie2 항체의 혈관내피 염증 억제 효과는 혈관내피세포와 염증세포(Leukocyte)의 부착을 매개하는 단백질들(Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1))의 발현을 통해서 분석하였다.

[281] 구체적으로, HUVEC($5x10^5$ 세포)을 60 mm 배양 접시에 접종(Seeding)하고 24시간 동안 배양한 후, 무혈청 M199 배지에서 6시간 동안 유지하여 혈청 기아 상태로 만들었다. 그 후, 20 ng/mL의 VEGF 단독 및/또는 10 μg/mL 농도의 MT-100을 처리하고 6시간 반응시켰다. 그리고 상기 세포를 용해하여 세포 용해물을 수득하였다.

[282] 상기와 같이 얻어진 세포 용해물을 시료로 사용하여 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때, 항-ICAM-1 항체(Santacruz, sc-8439) 또는 항-VCAM-1 항체(Santacruz, sc-13160)를 사용하였고, 2차 항체는 항-마우스 IgG 항체(Abcam, ab97023)를 사용하여 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 확인하였다.

[283] 그 결과, MT-100 처리군에서는 VEGF 처리에 의해 유도된 ICAM-1과 VCAM-1의 발현이 감소된 것으로 확인되었다(도 8c).

[284] **실시예 7. 항-Tie2 항체의 Tie2에 대한 Ang-2의 결합 억제 효능 확인**

[285] Ang-2가 증가된 병리적 상황에서 Tie2 및 Ang-2의 상호 결합에 대한 항-Tie2 항체의 결합 억제 효과를 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 확인하였다.

[286] 구체적으로, AR2G 바이오센서 팁을 3차 증류수로 10분간 수화시킨 후, 20 mM EDC 및 10 mM Sulfo-NHS을 포함하는 버퍼를 이용하여 활성화시켰다. 그런 다음, 항원으로 100 nM의 hTie2-ECD-6x His 단백질을 고정화 버퍼(10 mM sodium acetate, pH 6.0)에 희석하여, 상기 활성화된 AR2G 팁과 10분 동안 반응시켜 항원을 팁에 고정화시켰다.

[287] 그 후, 1 M의 에탄올아민(Ethanolamine, pH 8.5) 용액을 처리하여 항원 고정화 반응을 종료하였다. 먼저, 항원-항체 결합의 기준값(Baseline)을 측정하기 위하여 상기 AR2G 팁을 PBS 완충용액에서 60초 동안 반응시켰다. 그리고 200 nM의 MT-101(IgG1) 또는 PBS 완충용액을 상기 항원이 고정된 AR2G 팁과 600초 동안 결합(Association)시킨 후 40 nM의 재조합 인간 Ang-2 단백질을 각각 600초 동안 결합 및 해리(Dissociation)시켰다. 결합 및 해리 반응값은 Data Analysis HT 12.0 프로그램의 global fitting으로 분석하였다.

[288] 그 결과, MT-101(IgG1)이 Tie2에 결합되어 있을 때는 Ang-2가 Tie2에 결합하지 못하는 것으로 확인되었다(도 9a 및 도 9b).

[289] **실시예 8. Ang-2 존재 하에서 항-Tie2 항체의 Tie2 활성화 유도 효과 확인**

[290] Ang-2가 있는 조건에서 항-Tie2 항체가 혈관내피세포에서 발현되는 Tie2의 인산화를 유도할 수 있는지를 분석하였다.

[291] 구체적으로, HUVEC($3x10^6$ 세포)을 100 mm 배양 접시에 접종하고 24시간 동안 배양한 후, 무혈청 M199 배지에서 6시간 동안 유지하여 혈청 기아 상태로 만들었다. 그 후, Ang-2(5 nM)를 항-Tie2 항체(MT-101(1 nM))를 처리하기 20분 전에 전처리한 뒤, Ang-2(5 nM) 및 MT-101(1 nM)를 단독 또는 병용 처리하여 20분간 반응시켰다. 상기 반응이 종료된 뒤, 용해 버퍼로 세포를 용해하여 세포 용해물을 수득하였다.

[292] 상기와 같이 얻어진 세포 용해물에 1 μg/mL 농도로 항-Tie2 항체(R&D systems, AF313)를 첨가하여 4℃에서 12시간 동안 반응시키고, 30 μL의 protein G bead(Millipore, 16-266)를 첨가하여 면역침강(Immunoprecipitation)하여 시료를 수득하였다. 이때, 전체 단백질(Whole cell lysate, WCL)도 함께 수득하여 시료로 사용하였다.

[293] 상기와 같이 준비된 시료를 이용하여 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때, 1차 항체는 항-phospho-tyrosine 항체(Sigma, 05-321), 항-Tie2 항체, 항-phospho-AKT 항체, 항-AKT 항체, 항-phospho-ERK 항체 또는 항-ERK 항체를 사용하였다.

[294] 그 결과, MT-101은 Ang-2 존재하더라도 Tie2, AKT 또는 ERK 단백질의 인산화를 강하게 유도하는 것으로 확인되었다(도 10).

[295] **실시예 9. 항-Tie2 항체의 급성 신손상 억제 효과 확인**

[296] **실시예 9.1. 허혈 및 재관류에 의해 유도된 급성 신손상 동물 모델에서 항-Tie2 항체의 효과 분석**

[297] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 급성 신손상 억제 효능은 허혈 및 재관류에 의해 유발되는 급성 신손상 동물 모델을 이용하여 확인하였다.

[298] 구체적으로, 8주령 C57BL/6J 마우스 정상군(Sham) 또는 허혈 및 재관류 유도군(Ischemia reperfusion, I/R)의 꼬리 정맥으로 Control IgG(10 ㎎/kg) 또는 항-Tie2 항체((MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 및 MT-101(IgG1-LALA))를 도 11b 및 도 11c에 도시한 농도(5 ㎎/kg 또는 10 ㎎/kg)로 100 μL씩 투여하였다. 주입 30분 후, 동물용 전신마취제인 Ketamin(60 mg/kg)과 Xylazine(6 mg/kg)을 혼합한 용액을 복강 내 주입(0.2 μL/g)하여 마우스를 마취시킨 후, 마우스 복부의 피부를 약 1.5 cm 절개하였다. 상기 절개 부위를 통해 PBS 완충용액을 묻힌 얇은 면봉과 미세포셉으로 신장 주위 지방을 피하여 우측 신장을 확보하고, 미세 클램프를 이용하여 신장에 연결되어 있는 동맥과 정맥을 고정하였다. 좌측 신장도 동일한 방법으로 허혈을 유도하였다(도 11a).

[299] 또한, 마우스는 발열 패드와 마우스 직장 체온계를 이용하여 마우스의 체온을 35℃ 내지 36℃로 유지시켰으며, 30분 후 미세 클램프를 제거하여 신장에 혈액을 재관류시켰다. 그리고 절개한 복부를 봉합사로 봉합하고, 금속 스테이플로 외피 상처를 봉합하여 22℃ 내지 25℃의 온도에서 마우스를 관찰하며 회복시

켰다. 수술 후 24시간 뒤, 마취된 마우스의 하대정맥으로부터 혈액을 채취하여 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수득하고, 혈청 내 크레아티닌(Serum creatinine, s-creatinine) 및 혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN)을 자동 화학 분석기(Hitachi 7180)를 이용하여 분석하였다.

[300] 그 결과, Control IgG 군에서는 I/R에 의해 혈청 내 크레아티닌 및 BUN의 농도가 증가한 반면, 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 또는 MT-101(IgG1-LALA)) 투여군에서는 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 11b 및 도 11c).

[301] **실시예 9.2. 항-Tie2 항체에 의한 세뇨관 손상 억제 효과 분석**

[302] 항-Tie2 항체의 급성 신손상 억제 효과를 확인하기 위하여 조직학적 분석을 통해서 신장 세뇨관 손상 정도를 분석하였다.

[303] 구체적으로, 상기 실시예 9.1의 실험 마우스에서 신장을 적출하여 10% 포르말린에 24시간 고정시키고 파라핀에 포매하여 블록을 제작하였다. 상기 파라핀 블록은 4 μm 두께로 절편하여 슬라이드 상에 부착 및 고정시켜 조직 절편 슬라이드를 제작하였다. 그 후, 절편 슬라이드는 자일렌(xylene)을 처리하여 파라핀을 제거하고 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin&eosin)(도 12a) 시약으로 염색하여 신장 세뇨관의 손상을 관찰하였으며, 이를 손상 점수(score)로 다음과 같이 평가하였다: 0: 정상군(Normal), 1: 25% 이하 손상, 2: 25% ~ 50% 손상, 3: 50% ~ 75% 손상, 4: 75% 이상 손상.

[304] 그 결과, 급성 신손상 유도군(Control IgG)에서는 정상군(Sham)에 비해 세뇨관 손상이 뚜렷하게 나타난 반면, 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1), MT-101(IgG4) 또는 MT-101(IgG1-LALA)) 투여군에서는 농도 의존적으로 세뇨관 손상이 억제됨을 확인할 수 있었다(도 12a 및 도 12b).

[305] **실시예 9.3. 항-Tie2 항체에 의한 Tie2 활성화 유도 및 혈관내피세포 손상 억제 효과 분석**

[306] 상기 실시예 9.1에서 확인한 항-Tie2 항체의 급성 신손상 억제 효과가 Tie2 활성화를 통한 신장 혈관내피세포 손상 억제에 의해 유도되었는지 확인하기 위하여, Tie2 인산화와 신장 혈관내피세포 및 혈관내피 주위세포의 면역염색을 수행하였다.

[307] 구체적으로, 상기 실시예 9.1의 마우스 신장을 적출하여 4% 파라포름알데히드에서 2시간 동안 고정하고, 15%의 수크로오스(Sucrose)가 포함된 PBS 완충용액에서 4℃, 2시간 그리고 30%의 수크로오스가 포함된 PBS 완충용액에서 4℃, 24시간 동안 탈수시킨 후, 동결용 포매제(OCT)를 이용하여 동결 블록을 제작하였다. 동결 블록은 7 μm 두께로 절편하여 슬라이드 상에 4% 파라포름알데히드로 약 5분간 고정시키고, 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질 차단 버퍼(1% BSA in PBS)로 1시간 동안 블로킹하였다.

[308] 1차 항체(항-CD31 항체(Sigma, MAB1398Z, 1:200), 항-p-Tie2 항체(R&D system, AF2720, 1:100) 또는 항-PDGFRβ(Invitrogen, 14-1402-82, 1:100)를 처리하여 4℃

에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 세척 버퍼로 3회 세척한 뒤, FITC 또는 Alexa flour 594가 표지된 2차 항체(FITC 표지 항-래빗 IgG, Invitrogen, A21206; Alexa flour 594 표지 항-햄스터 IgG, Invitrogen, A21113; FITC 표지 항-햄스터 IgG, Invitrogen, A21110; Alexa flour 594 표지 항-래트 IgG, Invitrogen, A21209, 각각 1:1,000)를 처리하고, 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole; 1 μg/mL)를 처리하고 1분간 상온에서 반응시켜서 세포 핵을 염색하였다. 반응 종료 후, 세척 완충액으로 2회 세척한 후에 형광현미경을 이용하여 조직 절편을 관찰하였다.

[309] 그 결과, 급성 신손상 유도군(Control IgG)에서는 Tie2 단백질의 인산화가 유도되지 않는 반면, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 신장 혈관에서 Tie2 단백질의 인산화가 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 13a). 또한, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 혈관내피세포 및 혈관 주위 세포가 정상군(Sham)과 유사하게 유지되어 있음을 확인할 수 있었다(도 13b).

[310] **실시예 9.4. 항-Tie2 항체의 염증 억제 효능 분석**

[311] 허혈 및 재관류에 의한 급성 신손상의 주요인 중 하나는 과도한 염증 반응이다. 허혈 및 재관류에 의해 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이 증가하면 신장혈관 내피세포 표면에는 호중구(Neutrophil)와 같은 염증세포의 부착을 매개하는 단백질(예: VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule-1) 발현이 증가하고 이로 인해 호중구가 혈관벽에 부착 및 세뇨관 간질내(Interstitium)로 유입이 증가하여 지속적인 염증 반응을 유발하여 세뇨관 손상을 악화시킨다.

[312] 상기 실시예 9.1에서 항-Tie2 항체의 급성 신손상 억제 효과가 염증 억제를 통하여 유도되었는지 분석하기 위해서 혈관내피세포 마커 단백질인 CD31, 염증세포 부착 매개 단백질인 VCAM-1 또는 호중구 마커인 Gr-1의 발현을 면역염색을 통하여 분석하였다.

[313] 구체적으로, 상기 실시예 9.1의 마우스에서 신장을 적출하여 조직 염색을 상기 실시예 9.3과 동일한 방법으로 수행하였다. 이때, 1차 항체(항-CD31 항체(Sigma, MAB1398Z, 1:200), 항-VCAM-1 항체(Santacruz, sc-13160, 1:100) 또는 항-Gr-1 항체(Abcam, ab25377, 1:100)를 사용하였으며, FITC 또는 Alexa flour 594가 표지된 2차 항체(FITC 표지 항-마우스 IgG, Invitrogen, A21202; FITC 표지 항-래트 IgG, Invitrogen, A21208; Alexa flour 594 표지 항-햄스터 IgG, Invitrogen, A21113, 각각 1:1,000)를 사용하였다.

[314] 그 결과, 급성 신손상이 유도군(Control IgG)에서는 정상군(Sham)에 비해 신장 혈관내피세포에서 VCAM-1의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 반면, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 정상군과 유사하게 감소되어 있었다(도 14a). 이때, 세뇨관 간질내로 호중구의 유입도 감소됨을 확인할 수 있었다(도 14b).

[315] **실시예 9.5. 항-Tie2 항체의 염증반응 유도인자 발현 저해 효과 분석**

[316] 항-Tie2 항체(MT-101(IgG1-LALA))를 처리한 마우스 신장 조직에서 염증반응을 유도하는 사이토카인(CCL2, IL-6 또는 IL-1β)의 발현 변화를 실시간 중합효소 연쇄 반응(Real-time PCR) 분석을 통해서 확인하였다.

[317] 구체적으로, 상기 실시예 9.1의 마우스 신장을 적출하여 TRIzol(Invitrogen)용액 1 mL에서 균질화기(Homogenizer)를 이용하여 균질화한 뒤, 5분 동안 방치하여 핵단백질 복합체를 완전히 해리시키고, 클로로포름(Chloroform) 200 μL를 첨가 후 15초간 흔들고 실온에서 반응시켰다. 이를 14,000 rpm에서 4℃로 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, 약 400 μL를 새 튜브로 옮긴 후 동량의 아이소프로판올(Isopropanol)을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 침전물을 14,000 rpm에서 4℃로 10분간 원심분리한 후, 75% 에탄올 1 mL로 세척하고 같은 조건에서 5분간 원심분리하여 RNA 펠릿을 수집하였다. 펠릿을 건조한 뒤 50 μL 내지 100 μL의 RNase-free 물을 첨가하고, 55℃에서 10분간 용해하여 RNA를 준비하였다.

[318] cDNA 합성을 위해 준비된 RNA를 희석하여 1 내지 1.5 μg/μL의 농도로 맞춘 후, RNA(2 μg), oligo dT primer(1 μL) 및 RNase-free 물을 총 10 μL가 되도록 혼합하여 70℃에서 10분간 반응시키고 얼음에서 5분간 냉각시켰다. 이후, cDNA 합성 혼합물을 준비하여 42℃에서 1시간 반응한 후, 70℃에서 10분간 처리하여 RTase를 비활성화하였다. qPCR은 Solg 2X Real-Time PCR Smart mix(solgent)를 사용하여 Bio-rad 장비(96-웰 PCR 플레이트)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응은 95℃에서 15분간 효소 활성화 후 35 사이클(95℃, 20초; 58℃, 40초; 72℃, 30초)을 진행하였고, 최종적으로 PCR 용해 곡선 단계를 수행하였다.

[319] 그 결과, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 Control IgG 처리군에 비해 염증 유도 인자인 CCL2(C-C motif chemokine ligand2), IL-6 및 IL-1β의 발현이 저해됨을 확인할 수 있었다(도 14c).

[320] **실시예 10. 항-Tie2 항체의 패혈증 유래 급성 신손상 억제 효과 확인**

[321] **실시예 10.1. 지질다당류에 의한 패혈증 유래 급성 신손상 동물 모델에서 항-Tie2 항체의 효과 분석**

[322] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 급성 신손상 억제 효능을 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)에 의한 패혈증 유래 급성 신손상 마우스 모델에서도 확인하였다.

[323] 구체적으로, 8주령 C57BL/6J 마우스를 무작위로 그룹으로 나누고, 10 mg/kg의 용량으로 LPS(sigma, L3024)를 단회 복강 내 투여(Intraperitoneal injection)하였다. LPS 투여 1시간 전 또는 1시간 후에 Control IgG 또는 MT-101(IgG1-LALA)을 10 mg/kg 농도로 100 μL씩 꼬리 정맥 내 주입하였다. 24시간 뒤, 마취된 마우스의 하대정맥으로부터 혈액을 채취하여 4 ℃에서 원심분리하여 혈청을 수득하고, 혈청 내 크레아티닌(s-creatinine) 및 혈액요소질소(BUN)를 자동 화학 분석기(Hitachi 7180)를 이용하여 분석하였다(도 15a).

[324] 그 결과, Control IgG 투여군에서는 s-creatinine 및 BUN의 농도가 증가하였으나, MT-101(IgG1-LALA)을 1시간 전 또는 후에 투여한 군에서는 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 15b 및 도 15c).

[325] **실시예 10.2. 항-Tie2 항체의 패혈증 유래 급성 신손상 동물 모델에서 신장 혈관 내피세포 및 세뇨관 손상 억제 효과 분석**

[326] 상기 실시예 10.1에서 항-Ti2 항체의 급성 신손상 억제 효능을 신장 조직에서 세뇨관 손상 마커 단백질인 KIM-1 및 혈관내피세포 마커 단백질인 CD31의 면역염색을 통해 분석하였다.

[327] 구체적으로, 상기 실시예 10.1의 마우스 신장을 적출하여 조직 염색을 상기 실시예 9.3과 동일한 방법으로 수행하였다. 이때, 1차 항체(항-CD31 항체(Sigma, MAB1398Z, 1:200) 또는 항-KIM-1 항체(R&D system, MAB18171, 1:200)를 사용하였으며, FITC 또는 Alexa flour 594가 표지된 2차 항체(FITC 표지 항-래빗 IgG(Invitrogen, A21206), Alexa flour 594 표지 항-햄스터 IgG(Invitrogen, A21113), 각각 1:1,000)를 사용하였다.

[328] 그 결과, MT-101(IgG1-LALA)을 1시간 전 또는 후에 투여한 군에서는 세뇨관 및 신장 혈관 손상이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 15d).

[329] **실시예 11. 항-Tie2 항체의 만성 신부전 치료 효과 확인**

[330] **실시예 11.1. 허혈 및 재관류에 의해 유도된 만성 신부전 동물 모델에서 항-Tie2 항체의 효과 분석**

[331] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 만성 신부전 치료 효능을 허혈 및 재관류에 의해 유도되는 만성 신부전 동물 모델에서 분석하였다.

[332] 구체적으로, 8주령 C57BL/6J 마우스를 무작위로 나누어, 동물용 전신마취제인 Ketamine(60 mg/kg)과 Xylazine(6 mg/kg)을 혼합한 용액을 복강 내 주입(0.2 μL/g)하여 마우스를 마취시킨 후, 마우스 복부의 피부를 약 1.5 cm 절개하였다. 상기 절개 부위를 통해 PBS 완충용액을 묻힌 얇은 면봉과 미세포셉으로 신장 주위 지방을 피하여 우측 신장을 확보하고, 미세 클램프를 이용하여 신장에 연결되어 있는 동맥과 정맥을 고정하였다. 좌측 신장도 동일한 방법으로 허혈을 유도하였다(도 16a).

[333] 또한, 마우스는 발열 패드와 마우스 직장 체온계를 이용하여 마우스의 체온을 35℃ 내지 36℃로 유지시켰으며, 27분 후 미세 클램프를 제거하여 신장에 혈액을 재관류시켰다. 그리고 절개한 복부를 봉합사로 봉합하고, 금속 스테이플로 외피 상처를 봉합하여 22℃ 내지 25℃의 온도에서 마우스를 관찰하며 회복시켰다. 이후 2일, 4일, 6일에 꼬리 정맥으로 Control IgG 또는 항-Tie2 항체(MT-101(IgG-LALA))를 5 ㎎/kg 농도로 100 μL씩 주입한 뒤, 3일, 7일, 또는 14일에 하대정맥으로부터 혈액을 채취하여 4℃에서 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 그리고 14일차 마우스 신장을 적출하여, 조직 염색은 상기 실시예 9.2와 동일한 방법으로 헤마톡실린-에오신(H&E) 시약으로 염색하여 신장 세뇨관의 손상을 관찰하였으며,

손상 점수(Score)는 다음과 같이 평가하였다: 0: 정상군(Normal), 1: 25% 이하 손상, 2: 25% ~ 50% 손상, 3: 50% ~ 75% 손상, 4: 75% 이상 손상.

[334] 그 결과, 만성 신부전 유도군(Control IgG)에서는 정상군(Sham)에 비해 세뇨관 손상이 뚜렷하게 나타난 반면, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 신장 세뇨관 손상이 뚜렷하게 억제됨을 확인할 수 있었다(도 16b).

[335] **실시예 11.2. 허혈 및 재관류에 의해 유도된 만성 신부전 동물 모델에서 항-Tie2 항체의 섬유화 억제 효과 분석**

[336] MT-101의 신장 섬유화 억제 효능은 Masson's trichrome 염색, sirus red 염색 및 섬유화 마커 단백질인 collagen IV 또는 α-SMA의 면역염색을 통해서 확인하였다.

[337] 구체적으로, 상기 실시예 11.1에서 진행한 14일차 마우스에서 신장을 적출하여, 실시예 9.2와 동일한 방법으로 파라핀 블락을 제작하였다. Masson's trichrome 방법으로 섬유화 정도를 확인하기 위하여, 파라핀에 매립된 신장 조직을 4 μm 두께로 절단하여 슬라이드에 부착한 후, 탈파라핀화 및 증류수로 수화를 수행하였다. Bouin's 용액을 후드 내에서 60℃로 예열한 뒤 슬라이드를 용액에 60분 동안 침지하고, 10분 동안 냉각하였다. 슬라이드를 수돗물로 헹구어 조직을 완전히 맑게 한 후, 증류수로 한 번 세척하였다.

[338] Weigert's Iron Hematoxylin 용액 A 및 B를 동일 비율로 혼합하여 5분간 염색한 뒤, 슬라이드를 흐르는 물에 2분간 세척하였다. 이후 Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin 용액을 슬라이드에 적용하여 15분 동안 염색하고, 증류수로 세척하였다. Phosphomolybdic/Phosphotungstic acid 용액을 사용하여 15분간 분화 처리하거나 콜라겐이 적색으로 보이지 않을 때까지 처리한 후, 세척 없이 Aniline Blue 용액을 5 내지 10분 동안 침지하고, 95% 알코올을 2회 순차적으로 매우 빠르게 탈수하였다. 마지막으로 자일렌으로 투명화한 후 합성 수지로 슬라이드를 봉입하였다.

[339] 또한, Sirius red를 이용한 섬유화 확인은 파라핀에 매립된 신장 조직을 4 μm 두께로 절단하여 슬라이드에 부착한 후, 3분씩 3회 자일렌에 침지하여 탈파라핀화하고, 100% 에탄올에서 2분씩 3회, 95% 내지 50% 에탄올에서 2분, 탈이온수에서 5분 동안 각각 재수화 하였다. Sirius Red 용액에 슬라이드를 60분간 침지하여 염색을 수행한 후, 아세트산 용액으로 2회 세척하였다. 이후, 100% 에탄올에서 5회 두드려 탈수하고, 자일렌에서 3분씩 3회 투명화한 뒤, Permount를 사용하여 슬라이드를 봉입하였다.

[340] 또한, 섬유화 마커 단백질인 collagen IV(abcam, ab6586) 및 α-SMA(abcam, ab7817)를 확인하기 위하여, 파라핀에 매립된 신장 조직을 4 μm 두께로 절단하여 슬라이드에 부착한 후, 5분씩 2회 자일렌에 침지하여 탈파라핀화하고, 100% 에탄올에서 5분씩 2회, 95% 내지 50% 에탄올에서 2분, 탈이온수에서 5분 동안 각각 재수화 하였다. 항원 회수는 pH 6.0의 나트륨 시트르산 완충액에서 95℃에서 20분 동안 실시한 후, 1x TBST 완충용액으로 5분 세척하였다. 세포막 투과를 위해 0.2% Triton X-100을 포함하는 0.1 M TBS 완충용액에서 20분 처리한 뒤, 0.1

M TBST, 2% BSA, 2% 혈청 및 10% Avidin D를 포함하는 용액으로 20분 동안 차단하고, 0.1 M TBST 완충용액으로 세척하였다. 1차 항체는 2% BSA, 2% 혈청 및 10% Biotin을 포함하는 0.1 M TBST 완충용액에 희석하여 4℃에서 밤새 습식 챔버에서 배양한 후, 1x TBS 완충용액으로 10분씩 두 번 세척하였다. 그 후 0.1 M TBS 및 0.3% H_2O_2 용액에서 15분간 처리하고, 두 번 세척하였다.

[341] 2차 항체는 0.1 M PBS 완충용액에 희석하여 처리한 뒤, 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 종료 후 0.1 M TBS 완충용액으로 두 번 세척하였다. Vectastain Elite ABC 시약(Vector laboratories)을 실온에서 1시간 동안 희석하여 배양하고, 0.1 M TBS 완충용액으로 5분씩 두 번 세척한 후, DAB 용액을 처리하고 5분 동안 반응시켰다. 최종적으로 증류수로 두 번 세척한 후, 헤마톡실린으로 역염색을 실시하고, 증류수로 10분 동안 세척하였다. 탈수는 70% 에탄올에서 1분, 95% 에탄올에서 2분씩 3회, 100% 에탄올에서 2분씩 3회 진행한 후, 자일렌에서 3분씩 3회 처리하였다. 마지막으로, Permount를 사용하여 슬라이드를 봉입하는 Diaminobenzidine(DAB) 방법을 이용하여 확인하였다.

[342] 그 결과, 만성 신부전 유도군(Control IgG)에서는 정상군(Sham)에 비해 섬유화 진행이 뚜렷하게 나타났다. 반면, MT-101(IgG1-LALA) 투여군은 만성 신부전 유도군과 비교하여 섬유화 진행 및 마커 단백질의 발현이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 16c).

[343] **실시예 11.3. 아데닌에 의해 유도된 만성 신부전 동물 모델에서 항-Tie2 항체의 효과 분석**

[344] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 만성 신부전 치료 효능을 아데닌(Adenine) 섭취로 유도된 만성 신부전 동물 모델에서도 분석하였다.

[345] 구체적으로, 8주령 C57BL/6J 마우스를 무작위로 5 그룹으로 나누고, 각각 아데닌(Sigma, A5665)을 50 mg/kg의 용량으로 15일 동안 매일 경구 투여하였다. 이때, Control IgG(10 mg/kg) 또는 MT-101(2 mg/kg, 5 mg/kg 또는 10 mg/kg)을 100 μL씩 꼬리 정맥 내로 3일, 8일, 13일 및 18일에 각각 투여하였다. 최초 아데닌 투여일로부터 21일째에 마우스를 희생하여 상기 실시예 9.1과 동일한 방법으로 마우스의 혈청을 수득하여 혈청 크레아티닌을 측정하였다. 또한, 세뇨관 손상 인자인 KIM-1 및 NGAL(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)의 발현 억제를 확인하기 위하여, 상기 실시예 9.5와 동일한 방법으로 실시간 중합효소반응을 실시하였다(도 17a).

[346] 그 결과, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 혈청 크레아티닌의 농도가 감소하였으며(도 17b), KIM-1 또는 NGAL의 유전자 발현 분석을 통해서 세뇨관의 손상이 억제되었음을 확인할 수 있었다(도 17c).

[347] 또한, 조직학적 분석을 통해서 신장 및 세뇨관 손상 억제 효능을 분석하였다.

[348] 구체적으로, 21일째 희생된 마우스에서 신장을 적출한 뒤, 상기 실시예 9.2와 동일한 방법으로 절편 슬라이드를 제작한 뒤, 헤마톡실린-에오신 염색을 통해 신장 세뇨관의 손상을 관찰하였다(도 17d).

[349] 사구체 및 세뇨관의 기저막 손상은 하기의 방법을 통해 확인하였다.

[350] 상기 신장 조직 절편 슬라이드를 탈파라핀화 및 증류수로 수화한 뒤 10분간 페리오딕 산 용액에 침지 하였다. 그 뒤, 증류수로 4회 세척하고 30분간 시프 용액(Schiff's solution)에 침지 하였다. 이후 절편 슬라이드를 증류수로 2회 세척하고, 1분간 헤마톡실린으로 염색한 뒤 에탄올로 탈수과정을 거쳐 자일렌으로 봉입하였다(도 17e). 신장 피질의 공포화(Vacuolization), 세뇨관/근위세뇨관 백혈구 침윤 및 근위세뇨관 단순화는 다음과 같은 점수 체계로 세뇨관 손상 점수(Score)로 평가하였다: 0: 정상군(Normal), 1: 25% 이하 손상, 2: 25% ~ 50% 손상, 3: 50% ~ 75% 손상, 4: 75% 이상 손상.

[351] 그 결과, Control IgG 투여군에서는 아데닌에 의한 신장 손상이 뚜렷하게 나타났으나, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 신장 피질 및 세뇨관의 손상이 농도 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다(도 17d 및 도 17e).

[352] **실시예 11.4. 아데닌에 의해 유래된 만성 신부전 모델에서 항-Tie2 항체의 섬유화 억제 효능 분석**

[353] 항-Tie2 항체의 신장 섬유화 억제 효능은 Sirus red 염색 및 섬유화 마커 단백질(Collagen IV, α-SMA)에 대한 면역염색을 통해 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 11.3의 실험 마우스의 신장을 적출하여 상기 실시예 11.2와 동일한 방법으로 Sirus red 염색(도 18a) 및 섬유화 마커 단백질인 collagen IV(도 18b) 또는 α-SMA(도 18c)의 면역염색을 실시하였다.

[354] 그 결과, 아데닌에 의해 만성 신부전이 유발된 Control IgG 투여군에서는 정상군(sham)에 비해, 신장 사구체 및 세뇨관에서 섬유화가 증가된 반면, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 섬유화가 감소됨을 확인할 수 있었다(도 18a 내지 도 18c).

[355] 또한, MT-101(IgG1-LALA)의 항섬유화 효능을 실시간 중합효소 연쇄 반응을 통하여 분석하였다.

[356] 구체적으로, 상기 실시예 11.3의 실험 마우스에서 신장을 적출하여 상기 실시예 9.5와 동일한 방법으로 각 그룹 내의 Col1a1, Col3a1, ACTA2 및 TGF-β의 유전자 발현량을 중합효소 연쇄 반응을 통해 측정하였다.

[357] 그 결과, 상기 면역염색(도 18a 내지 도 18c)에서 나타난 결과와 동일하게 MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 섬유화 마커 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(도 18d).

[358] **실시예 11.5. 아데닌에 의해 유도된 만성신부전 모델에서 항-Tie2 항체의 혈관 손상 억제 및 안정화 효능 분석**

[359] 항-Tie2 항체의 만성 신부전 억제 효능을 확인하여, 신장 조직에서 세뇨관 마커 단백질인 LTL 및 혈관내피세포 마커 단백질인 CD31의 면역염색을 수행하였다.

[360] 구체적으로, 상기 실시예 11.3의 실험 마우스에서 신장을 적출하여 4% 파라포름알데히드에서 2시간 동안 고정하였다. 그 뒤, 15%의 수크로오스가 포함된 PBS 완충용액에 침지하여 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 30%의 수크로오스가 포

함된 PBS 완충용액에 침지하여 4℃에서 24시간 동안 침지하여 탈수하였다. 그리고 동결용 포매제(OCT)를 이용하여 동결 블록을 제작하였다. 동결 블록은 7 μm 두께로 절편하여 슬라이드 상에 4% 파라포름알데히드로 약 5분간 고정시키고, 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium azide in PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질 차단 버퍼(1% BSA in PBS)로 1시간 동안 블로킹하였다.

[361] 그 후, 1차 항체(항-LTL 항체(Verot laboratories, RL-1321-2, 1:400), 항-CD31 항체(Sigma, MAB1398Z, 1:200))를 처리하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 세척 버퍼로 3회 세척한 뒤, 항-LTL 항체(1:1,000) 또는 Alexa Flour594가 표지된 2차 항체(Alexa Flour594 표지 항-햄스터 IgG(Invitrogen, A21113), 1:1,000)를 처리하고, 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 DAPI(1 μg/mL)를 처리하고 1분간 상온에서 반응시켜서 세포 핵을 염색하였다. 반응 종료 후, 세척 완충액으로 2회 세척한 후에 형광현미경을 이용하여 조직 절편을 관찰하였다.

[362] 그 결과, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 신장 세뇨관 및 신장 혈관 손상이 억제됨을 확인할 수 있었다(도 19a).

[363] **실시예 11.6. 항-Tie2 항체에 의한 염증 억제 효능 분석**

[364] 만성 신부전 및 섬유화는 신장내 지속적인 염증 반응에 의해 심화된다. 따라서 MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서 염증관련 인자들의 발현이 억제되는지 확인하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄 반응(Real-time PCR)을 실시하였다.

[365] 구체적으로, 상기 실시예 11.3의 실험 마우스에서 신장을 적출하여, 상기 실시예 9.5와 동일한 방법으로 중합효소 연쇄 반응을 통해 염증 유도인자인 MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), TNF-α(Tumor necrosis factor-α) 및 IL-1β; 및 면역세포 마커인 CD4, CD11c, F4/80, 및 CD206의 유전자 발현량을 측정하였다.

[366] 그 결과, Control IgG 투여군과 비교하여, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 염증 유도인자의 발현 및 면역세포 마커의 발현이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 19b).

[367] **실시예 11.7. 편측성 요관 폐색에 의해 유도된 신장 손상 동물 모델에서 항-Tie2 항체의 치료 효능 분석**

[368] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 편측성 완전 요관 폐색(Unilateral ureteral obstruction, UUO) 마우스 모델에서 신장 손상 억제 효능을 추가적으로 확인하였다.

[369] 구체적으로, 8주령 C57BL/6J 마우스를 무작위로 나누고, 동물용 전신마취제인 Ketamine(60 mg/kg)과 Xylazine(6 mg/kg)을 혼합한 용액을 복강 내 주입(0.2 μL/g)하여 마우스를 마취시켰다. 마취 상태에서 마우스 복부의 피부를 약 1.5 cm 절개한 후, PBS 완충용액을 묻힌 얇은 면봉과 미세포셉으로 좌측 요관을 측면 절개를 통해 노출하고, 신장 하극의 수준에서 두 개의 봉합사를 사용하여 결찰하였다. 수술 후 2일, 4일 및 6일째에 Control IgG(5 mg/kg) 또는 MT-101(5 mg/kg)을 100

μL씩 정맥 주사하였다. 수술일로부터 7일차에 마우스를 희생하고 혈액 및 소변을 수집하고, 신장 조직을 적출하였다(도 20a).

[370] 적출된 신장 조직은 상기 실시예 9.2와 동일한 방법으로 헤마톡실린-에오신 시약으로 염색한 뒤, 신장 세뇨관의 손상을 관찰하고 손상 점수를 평가하였다(0: 정상군(Normal), 1: 25% 이하 손상, 2: 25% ~ 50% 손상, 3: 50% ~ 75% 손상, 4: 75% 이상 손상).

[371] 그 결과, Control IgG 투여군에서는 정상군(Sham)에 비해 세뇨관 손상이 뚜렷하게 나타난 반면, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 세뇨관 손상이 감소됨을 확인할 수 있었다(도 20b).

[372] **실시예 11.8. 편측성 요관 폐색에 의해 유도된 신장 손상 동물 모델에서 항-Tie2 항체의 섬유화 억제 효능 분석**

[373] 편측성 요관 폐색(UUO) 의해 유도된 신장 손상 동물 모델에서 MT-101의 신장 섬유화 억제 효능을 면역염색을 통해서 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 11.7의 실험 마우스에서 적출된 신장 조직에 대하여 상기 실시예 11.2와 동일한 방법으로 Masson's trichrome 염색(도 20c) 및 collagen IV(도 20d) 또는 α-SMA(도 20e)의 면역염색을 수행하였다.

[374] 그 결과 Control IgG 투여군에서는 정상군(sham)에 비해 섬유화가 증가되고, collagen IV 및 α-SMA의 발현이 증가된 반면, MT-101(IgG1-LALA) 투여군에서는 Control IgG 투여군에 비해 감소됨을 확인할 수 있었다(도 20c 내지 도 20e).

[375] **실시예 12. 항-Tie2 항체의 패혈증 치료 효과 확인**

[376] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 패혈증(Sepsis) 치료 효능을 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 패혈증 마우스 모델(LPS-induced sepsis)에서 확인하였다.

[377] 구체적으로, 8주령 C57BL/6J 마우스를 무작위로 나누고, 10 mg/kg의 용량으로 LPS(sigma, L3024)를 단회 복강 내 투여(Intraperitoneal injection)하였다. LPS 투여 1시간 전 또는 1시간 후에 Control IgG(10 mg/kg) 또는 MT-101(IgG1-LALA)(5 mg/kg 또는 10 mg/kg)을 각각 100 μL씩 꼬리 정맥 내로 주입한 후, 168시간(7일)까지 마우스의 생존 여부를 분석하였다(도 21a).

[378] 그 결과, LPS 투여 1시간 후에 Control IgG를 투여한 군에서는 시간 경과에 따라 사망률이 증가하였고, LPS로 패혈증을 유도한 후 7일째(168시간)에는 마우스 생존율이 43.75%로 감소하였다. 반면, LPS 주입 1시간 전에 MT-101(IgG1-LALA)(10 mg/kg)을 투여한 군에서는 모든 마우스가 생존하였다. 또한, LPS 주입 1시간 후 MT-101(IgG1-LALA)을 5 mg/kg 또는 10 mg/kg 투여한 군에서는 마우스 생존율이 각각 93.75% 또는 100%로 증가됨을 확인할 수 있었다(도 21b).

[379] **실시예 13. 항-Tie2 항체의 중증하지허혈 치료 효과 확인**

[380] **실시예 13.1. 하지허혈 동물 모델에서 치료 효과 분석**

[381] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 치료 효능을 하지허혈 동물 모델을 이용하여 확인하였다.

[382] 구체적으로, 6주령 수컷 BALB/CA-nu/nu 마우스(평균 무게: 20 g 내지 24 g)를 호흡 마취 시스템을 이용하여 마취시킨 후 마우스 다리를 테이프로 고정시켰다. 포셉 및 가위를 사용하여 무릎에서 대퇴부 중간 방향으로 피부를 약 1 cm 절개하고 리트랙터로 수술 부위 시야를 확보하였다. 상기 수술 부위를 통해 해부현미경 하에서 대퇴동맥(Femoral artery)과 오금동맥(Popliteal artery) 사이의 기부와 원위 부위를 각각 두 개의 봉합사로 묶어 폐색시킨 후 절제하여 하지 내로의 혈류의 흐름을 차단하였다.

[383] 그 후, HBSS 용액, Control IgG(5 mg/kg) 또는 항-Tie2 항체(MT-100 또는 MT-101)(1 mg/kg 또는 5 mg/kg)를 하지허혈 주변 조직 내로 각각 주입한 후, 레이저 도플러(Laser doppler perfusion imaging, LDPI, Moor Instruments Ltd)를 이용하여 마우스 하지의 혈류 흐름을 측정하였다. 혈류의 흐름은 수술 당일(0일), 7일, 14일, 21일 및 28일째에 레이저 도플러 이미지를 통해 측정하였다. 허혈성 및 비허혈성 하지의 관류는 색상 히스토그램에 생성된 픽셀 유형을 기반으로 계산하였다. 이때, 빨간색과 파란색은 각각 높은 관류 수준과 낮은 관류 수준을 나타낸다. 혈액 관류는 허혈성 및 비허혈성 사지 혈류의 비율을 나타내는 LDPI 지수로 표현되는데, 수술 전 비율이 100이면 양쪽 발의 혈액 관류가 동일함을 나타낸다. 허혈성 뒷다리 괴사(necrosis)의 정도는 수술 후 28일에 측정하였으며, 괴사 점수(score)는 다음과 같이 평가하였다: 0, 사지 회상(limb recall); 1, 발가락 절단(toe amputation); 2, 발 절단(foot amputation); 3, 사지 절단(limb amputation).

[384] 그 결과, HBSS 또는 Control IgG(5 mg/kg) 투여군의 하지와 비교하여, MT-100 또는 MT-101을 투여한 마우스의 하지에서 혈류의 흐름이 현저히 개선된 것을 확인할 수 있었다(도 22a 및 도 22b). 또한, MT-101 처리군에서 괴사가 억제된 것으로 확인할 수 있었다(도 22c).

[385] **실시예 13.2. 하지허혈 부위에서 기능성 혈관신생 유도 확인**

[386] 상기 실시예 13.1의 하지허혈 개선 효과가 하지허혈이 야기된 부위로 기능성 혈관신생을 유도함으로써 나타난 것인지를 확인하기 위하여, 혈관내피세포 마커 단백질인 CD31 및 혈관 주위 세포의 마커 단백질인 α-SMA의 발현을 면역염색을 통해 확인하였다.

[387] 구체적으로, 상기 실시예 13.1의 실험 마우스에서 허혈이 유도된 하지 근육을 적출한 뒤, 상기 실시예 9.3과 동일한 방법으로 절편 슬라이드를 준비하였다. 이때, 상기 절편 슬라이드는 7 μm 두께로 제작하였다. 상기 절편 슬라이드에 4% 파라포름알데히드를 처리하고 약 5분간 반응시켜 절편 슬라이드를 고정하였다. 그 뒤, 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium azide in PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질 차단 버퍼(5% BSA in PBS)로 1시간 동안 블로킹하였다. 상기와 같이 준비된 조직 절편 슬라이드는 상기 실시예 9.3과 동일한 방법으로 면역염색을 실시하였다.

[388] 이때, 1차 항체는 항-CD31 항체(Sigma, MAB1398Z, 1:200) 또는 항-α-SMA 항체(Abcam, ab5694, 1:200)를 사용하였다. 1차 항체를 절편 슬라이드에 처리

한 뒤 4℃에서 16시간 동안 반응시키고 세척 버퍼로 3회 세척한 뒤, 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 처리한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이때, 2차 항체는 Cy3-표지된 항-토끼 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch, 128-165-160) 또는 TRITC-표지된 항-햄스터 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch, 101-025-165)를 사용하였다. 각 조직 블록의 3개 연속 섹션에서 무작위로 선택된 3개의 현미경 필드를 사용하여 각 마우스의 모세혈관(CD31) 밀도 및 α-SMA 세포 수를 계산하여 평가하였다.

[389] 그 결과, HBSS 용액 또는 Control IgG(5 mg/kg) 투여군의 하지와 비교하여, MT-100 또는 MT-101을 투여한 마우스의 하지에서 혈관신생이 증가한 것을 확인하였다. 이때, 새롭게 생성된 혈관은 혈관 주위의 세포들에 의해 잘 둘러싸여 있는 것을 확인할 수 있었다(도 22d).

[390] **실시예 14. 항-Tie2 항체의 발기부전 치료 효과 확인**

[391] **실시예 14.1. 당뇨성 발기부전 동물 모델에서 치료 효과 분석**

[392] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 발기부전 치료 효능은 스트렙토조토신(Streptozotocin, STZ)으로 유도된 당뇨성 발기부전 동물모델을 이용하여 확인하였다.

[393] 구체적으로, 수컷 8주령 C57BL/6J 마우스(평균 무게: 20 g 내지 25 g)에 5일 동안 STZ(0.1 M 구연산염 완충액, pH 4.5, Sigma-Aldrich)을 복강 내로 주사하였다. 투여 8주 후, Accu-Chek 혈당 측정기(Roche Diagnostics)를 이용하여 마우스의 공복 및 식후 혈당 수준을 측정하고, 평균 수축기 혈압(MSBP)은 비침습적 꼬리 커프 시스템(Visitech system)을 이용하여 측정하였다. 항-Tie2 항체(MT-100, MT-101)의 발기 기능(Erectile function) 개선 효과를 확인하기 위해서는 STZ로 당뇨가 유도된 마우스 음경해면체(Intracavernous)에 PBS, Control IgG(10 μg), MT-100(1 μg 또는 10 μg) 또는 MT-101(1 μg 또는 10 μg)을 30 게이지 인슐린 주사기를 이용하여 각각 20 μL씩 투여하였다.

[394] 2주 후, 발기력을 측정하기 위해 각 마우스의 하복부에서 좌측 표피 부분을 개복하고, 전립선의 후외측에 위치한 음경해면체신경(음경신경)이 잘 보이도록 준비하였다. 음경신경의 전기자극을 위해서 백금 전극을 음경신경에 위치시킨 후, 5 볼트, 12 헤르츠의 강도로 약 1분 동안 전기 자극을 가하여 음경의 발기를 유도하였다. 이때, 발기 시 음경해면체 내압(Intracavernosal pressure, ICP)을 음경해면체에 삽입된 카테터를 통해 컴퓨터와 연결되어 있는 압력 전달기(바이오스팩 시스템)를 이용하여 측정하였다.

[395] 도 23a에서의 세로축의 ICP는 발기 시 음경 내부의 압력을 의미하며, 일반적으로 발기력을 나타내는 지표이다. 가로축은 전기자극 후의 시간을 나타내며, 1분간의 전기자극 기간은 가로축에 검정색 막대로 표시하였다. 또한, 도 23b는 최고 음경해면체 내압(Maximal ICP)을 평균 수축기 혈압(MSBP)으로 나눈 값을 나타낸 것이다. 도 23c는 음경해면체 내압 곡선의 면적(Total ICP(area under the curve))을 평균 수축기 혈압(MSBP)으로 나눈 값을 나타낸 것이다. 이때, 혈압은 음경해

면체 내압에 영향을 줄 수 있기 때문에 발기력을 측정하기 위해 확인하는 값이다.

[396] 그 결과, MT-100(10 μg) 또는 MT-101(1 μg 또는 10 μg)을 투여한 군에서는 PBS 혹은 Control IgG 처리군에 비해 높은 발기력 개선 효과를 보였으며, 비 당뇨군(Normal)의 약 90% 이상 수준까지 발기력이 회복됨을 확인하였다. 특히, 음경 발기와 관련한 최고 음경해면체 내압 및 음경압력곡선의 면적이 항-Tie2 항체(MT-100 및 MT-101) 투여군에서 정상 수준까지 개선되었다(도 23a 내지 도 23c).

[397] **실시예 14.2. 음경해면체에서 기능성 혈관신생 및 안정화 유도 효능 분석**

[398] 음경은 음경발기의 기능을 담당하는 해면체 조직과 이에 영양을 공급하는 소혈관들로 이루어져 있다. 그러나 당뇨, 고지질증 또는 신경손상 등에 의한 병리적 조건하에서는 이러한 혈관의 기능이 소실되고 불안정화 되어 발기부전을 초래한다.

[399] 상기 실시예 14.1의 항-Tie2 항체의 발기 개선 효과가 음경해면체 내 기능성 혈관신생 및 안정화를 통해 유도되었는지를 확인하기 위해 음경해면체 내 혈관 정도를 혈관내피세포 마커 단백질인 CD31과 혈관 주위 세포 마커 단백질인 NG2의 발현을 면역염색법을 통해 확인하였다.

[400] 구체적으로, 각 마우스의 음경 조직으로부터 음경 배부 신경 및 음경 해면체를 분리한 후, 각 조직을 4% 파라포름알데히드에서 4℃, 24 시간 동안 고정하였다. 상기 고정된 조직을 동결용 포매제를 이용하여 고정시킨 후, 동결 절편기에서 7 μm 두께로 잘라 조직 절편 슬라이드를 준비하였다. 다음으로, 준비된 조직 절편을 슬라이드 상에 4% 파라포름알데히드로 약 5분간 고정시킨 뒤, 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium azide in PBS)로 3회 세척하였다. 상기 조직 절편 슬라이드에 비특이적 단백질 차단 버퍼(5% BSA in PBS)를 처리하고 1시간 동안 블로킹하였다.

[401] 그 후, 1차 항체는 항-CD31 항체(Sigma, MAB1398Z, 1:200) 또는 NG2의 항체(Sigma, ZRB5320, 1:100)를 처리하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 세척 버퍼로 3회 세척한 뒤, FITC 또는 TRITC가 표지된 2차 항체(FITC 표지 항-햄스터 IgG(Invitrogen, A21110), Alexa Fluor 594 표지 항-래빗 IgG(Invitrogen, A21207), 각각 1:1,000)를 처리하고, 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole; 2 μg/mL)를 처리하고 5분간 상온에서 반응시켜서 세포 핵을 염색하였다. 반응 종료 후, 세척 완충액으로 2회 세척한 후에 형광현미경을 이용하여 조직 절편을 관찰하였다.

[402] 그 결과, 스트렙토조토신(STZ)으로 당뇨가 유발된 마우스 군(DM) 중에서 PBS 또는 Control IgG(10 μg)를 투여한 군의 음경해면체에서는 정상군(Normal)에 비해, 혈관분포 및 혈관 주위 세포의 커버리지(Coverage)가 감소되어 있는 반면, MT-100(10 μg) 또는 MT-101(1 μg 또는 10 μg)을 투여한 군에서는 혈관의 분포 및 혈관 주위 세포의 커버리지가 정상군과 유사하게 회복되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 24a 내지 도 24c).

[403] **실시예 14.3. 고혈당 조건에서 혈관 형성 유도 및 네트워크 구조 안정화 효능 분석**

[404] 혈관신생은 혈관내피세포가 증식하여 상호 이동하고 관 형태로 분화하여 최종적으로 네크워크를 유지함으로써 유도된다. 이때, 다양한 상황(저산소 또는 고혈당)에 혈관내피세포가 노출되면 비정상화 되고 이로 인해 강(Lumen)으로의 분화가 억제되어 네트워크 형성에 핵심인 세포-세포간 접합(Junction)이 저해되게 된다.

[405] 상기 실시예 14.2에서 확인한 항-Tie2 항체에 의한 기능성 혈관신생 유도 효과를 검증하기 위해, 혈관내피세포를 고혈당에 노출시킨 후, MT-100 또는 MT-101의 관 형성 유도 및 안정화 효능을 분석하였다.

[406] 구체적으로, HUVEC을 정상 범위의 혈당 수치와 유사한 5 mM 글루코스 및 고혈당 수치에 해당하는 30 mM 글루코스를 처리하고 48 시간 동안 배양하였다. 이때, 상기 글루코스와 함께 PBS, Control IgG(5 μg/mL) 또는 항-Tie2 항체(MT-100(1 μg/mL, 10 μg/mL) 또는 MT-101(0.1 μg/mL, 1 μg/mL, 5 μg/mL)를 처리하였다. 그 후, 마트리겔(matrigel)이 코팅된 24-웰 플레이트에 각각의 HUVEC($2x10^5$ 세포)을 접종하고, 16 시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하면서 현미경을 통해 관찰하였다.

[407] 그 결과, 정상 농도 글루코스(NG) 처리군과 비교하여 고농도 글루코스(HG) 단독 처리군(HG-PBS 또는 HG-Control IgG)에서 혈관 형성(Tube formation) 정도가 현저하게 감소되었다. 반면, 고농도 글루코스(HG) 및 MT-100(10 μg/mL) 또는 MT-101(1 μg/mL 또는 5 μg/mL) 병용 처리군은 정상 농도 글루코스(NG) 처리군과 비교하여 혈관 형성이 현저하게 증가하였으며, 네트워크도 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 25a 및 도 25b).

[408] **실시예 15. 항-Tie2 항체의 망막질환 치료 효과 확인**

[409] **실시예 15.1. 레이저 조사에 의해 유도된 맥락막 혈관신생 동물모델에서 치료 효과 분석**

[410] 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체의 노인성 황반변성(age-related macular degeneration, AMD)에 대한 치료 효능을 레이저 유도 혈관신생(CNV) 마우스 모델을 이용하여 확인하였다.

[411] 구체적으로, 7주령 C57BL6 마우스 안구에 0.5% proparacaine hydrochloride(Alcon)을 국소 마취하였다. 그리고 1% tropicamide(Santen pharmaceutical)로 동공을 확장하고 레이저 광응고기(Laser photocoagulator)를 이용하여 레이저 광응고(Wavelength 532 nm, Diameter 50 μm, Duration 80 mS, Power level 200 mW)로 각 눈의 4개 지역(Posterior pole의 3, 6, 9, 12시 위치)의 브루크막(Bruch's membrane)을 파열시켰다. 레이저를 망막 표면에 조사하면 망막조직의 화상으로 망막 표면에 기포가 맺히게 되는데, 기포가 관찰되지 않은 마우스는 분류하여 제외하였다.

[412] 레이저 광응고 후 3일째, Control IgG(10 μg), MT-100(10 μg), MT-101(10 μg) 또는 대조 약물인 EYLEA(10 μg)를 각각 1 μL씩 각각 마우스 유리체강 내로 주사(Intravitreal injection)하였다. 레이저 광응고 후 7일째에 비정상적인 맥락막 신혈관신생을 관찰하기 위해서 인도시아닌 그린 혈관조영술(Indocyanine Green Angiography, ICGA)을 수행하였다. 이때, 동시에 맥락막 신생혈관의 누수를 분석하기 위해 형광 안저 혈관 조영술(Fluorescein Angiography, FA)도 시행하였다. 레이저 광응고 후 8일째, 각각의 마우스 안구를 적출한 뒤 상온에서 4% 파라포름알데히드에 1시간 동안 고정한 후 PBS 완충용액으로 세번 세척하였다(도 26a).

[413] 그 후, 해부현미경 하에서 수술용 칼을 이용하여 각막을 통해 방사형 절개하고, 절개된 부위부터 시작하여 집게로 공막(Sclera)을 시신경 쪽으로 조심스럽게 벗겨내고 최종적으로 수정체를 제거하였다. 망막을 네잎클로버 모양으로 자른 후, PBST(0.5% Triton X-100 in PBS) 완충용액에 4℃에서 16시간 동안 투과화시켜 조직 슬라이드를 제작하였고 면역조직화학염색을 수행하였다.

[414] 투과화된 망막은 PBS 완충용액으로 3번 세척한 다음, PBST-BSA(0.5% Triton-X100 + 3% BSA in PBS) 용액에 4℃에서 16시간 동안 블로킹하였다. 1차 항체로 항-endomucin 항체(Santacruz, SC-65495, 1:200)를 처리하고 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후, PBST 완충용액으로 20분 간격으로 4회 세척한 다음, 2차 항체(Cy3-표지된 항-항체 1:100)를 처리하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 조직 슬라이드를 PBST 완충용액으로 20분 간격으로 4회 세척하고 슬라이드에 수용성 부착 용액(Hydrosoluble mounting medium)을 처리한 뒤, 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[415] 도 27a에서의 노란색 점선 영역은 CNV의 양(Mass)을 나타내며, 흰색 점선 영역은 CNV의 부위(Area)를 나타낸다. CNV의 부피(Volume)은 하기 [수학식 1]에 의하여 구할 수 있다.

[416] **[수학식 1]**

[417] CNV의 부피(Volume) = CNV 양(Mass) size x z-Stack height(z-Scan 1 μm) x 2/3(반구 계수(Hemisphere coefficient))

[418] 그 결과, MT-100 또는 MT-101 투여군에서는 CNV 부위(Area) 및 맥락막 혈관의 누수가 뚜렷하게 감소되었다. 특히, 상기 감소 효과는 대조 약물인 EYLEA 투여군과 유사한 효과임을 확인할 수 있었다(도 26b 및 도 26c). 또한, 조직 내 Endomucin 발현 결과를 통해 MT-100 또는 MT-101 투여군에서 CNV의 부위(Area), 양(Mass) 또는 부피(Volume)를 감소시키는 것으로 확인할 수 있었다(도 27a 내지 도 27d).

[419] **실시예 15.2. 산소 조건에 의해 유도된 망막병증 동물모델에서 치료 효과 분석**

[420] 미숙아 망막병증(Retinopathy of prematurity, ROP), 증식성 당뇨병성 망막병증(Proliferative diabetic retinopathy, PDR) 및 망막 정맥 폐색(Retinal vein occlusion, RVO)을 포함한 허혈성 망막 질환에서 상기 실시예 1.4에서 준비된 항-Tie2 항체

의 치료 효능 검증은 산소 유도된 망막병증(Oxygen-induced retinopathy, OIR) 마우스모델을 이용하여 분석하였다.

[421] 구체적으로, 생후 7일째 C57BL/6J 마우스를 산소 농도가 75%로 유지되는 고산소 유지 장치(Hyperbaric oxygen chamber)를 이용하여 5일 동안 노출시켰다. 12일째 마우스를 고산소 유지 장치에서 꺼낸 다음, Control IgG(10 μg), MT-101(10 μg) 또는 대조 약물인 EYLEA(10 μg)를 1 μL씩 각각 마우스 유리체강 내로 주사하여 일반 대기상태(21% 산소 농도)에서 5일 동안 유지시켰다(도 28a). 17일째, 마우스로부터 안구를 적출한 뒤 상온에서 4% 파라포름알데히드에 1시간 동안 고정한 후 PBS 완충용액로 세 번 세척하였다. 상기 안구 조직을 상기 실시예 15.1과 동일한 방법으로 망막을 적출하여 조직 슬라이드를 제작하고 면역조직화학염색을 수행하였다. 이때, 1차 항체는 항-CD31 항체를 사용하였다. 상기의 방법을 통해 염색된 조직을 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[422] 그 결과, MT-101(10 μg) 투여군에서는 망막내 무혈성 부위(Avascular area)(도 28b) 및 신생혈관총 부위(Neovascular tuft area)(도 28c)가 대조 약물인 EYLEA 투여군과 비교하여 뚜렷하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[423] **실시예 15.3. 망막 혈관의 누수 억제 효능 분석**

[424] 혈관신생과 관련된 망막질환에서는 망막 혈관의 비정상화로 인해 투과성이 증가하여 주변 조직으로 누수(Leakage)가 야기된다. 따라서, 본 발명에 따른 항-Tie2 항체의 망막 혈관의 누수 억제 효과를 상기 실시예 15.2의 마우스 모델에서 Evans Blue 염색법을 통해 확인하였다.

[425] 구체적으로, 상기 실시예 15.2와 동일한 방법으로 마우스에 Control IgG 또는 MT-101 항체를 안구 내로 주사하였다. 17일째 현미경 하에서 대퇴정맥(Femoral vein)에 Evans Blue dye를 투여하고 2시간 후에 안구를 적출하여 4% 파라포름알데히드를 처리하여 1시간 동안 고정하였다. 고정된 조직에 동결용 포매제(OCT)를 처리하여 동결 블록을 제작하였다. 상기 동결 블록은 10 μm 두께로 절편하여 조직 절편 슬라이드를 제작하였고, 상기 조직 절편 슬라이드에 4% 파라포름알데히드를 약 5분간 처리하여 조직을 고정시켰다. 레이저 스캐닝 공초점 현미경을 이용하여 상기 조직 절편 슬라이드를 관찰함으로써 망막 혈관 주변으로 누수된 Evans blue dye 감도를 분석하였다.

[426] 그 결과, MT-101 투여군에서는 Control IgG 투여군에 비해 망막혈관 주변으로의 누수가 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 29a 및 도 29b).

[427] **II. 이중 특이 항체**

[428] **실시예 16. Tie2 활성화 및 VEGF 신호경로 억제를 위한 이중 특이 항체 제작**

[429] 혈관내피세포 특이적 Tie2 및 이의 하부 신호전달인자들을 활성화시면서 Ang-2의 Tie2에 대한 결합 및 VEGF 또는 VEGFR2의 신호전달 경로를 억제하는 삼중 기능(Triple function)을 가지고 있는 이중 특이 항체를 제작하였다.

[430] **실시예 16.1. 이중 특이 항체의 구조체 설계**

[431] Tie2 활성화, Ang-2 결합 저해 및 VEGF 신호경로를 억제하기 위하여, MT-101 항체를 골조(Backbone)로 하여 Fc 영역의 C 말단 부위에 5종의 VEGF 신호경로 저해물질(서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45 또는 서열번호 46)을 도입한 융합단백질 또는 이중 특이 항체 구조체를 설계하였다(도 30).

[432] 구체적으로, 애플리버셉트(Aflibercept) VEGFR1-D2 및 VEGFR2-D3 도메인이 도입된 MT-103-1 융합단백질(서열번호 42), Bevacizumab 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역이 scFv 형태로 도입된 MT-103-2 이중 특이 항체(서열번호 43), Ranibizumab 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역이 scFv 형태로 도입된 MT-103-3 이중 특이 항체(서열번호 44), Brolucizumab 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역이 scFv 형태로 도입된 MT-103-4 이중 특이 항체(서열번호 45) 및 Ramucirumab 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역이 scFv 형태로 도입된 MT-103-5(서열번호 46)를 설계하였다.

[433] 이때, 각 5종의 VEGF 신호경로 저해물질의 아미노산 서열을 참고하여 역번역(Reverse translation)한 후 Expi293F 세포에서 발현시키기 위하여 코돈 최적화 과정을 수행한 뒤 코딩 유전자를 합성하였다. 합성된 5종의 VEGF 신호경로 저해물질 유전자는 pcDNA3.4(Invitrogen) 기반 MT-101 중쇄 발현 벡터 내 C 말단 부위에 클로닝 되었고, MT-101 IgG와 서열번호 49 또는 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 링커로 연결된 형태로 도입되었다. 대조군 이중 특이 항체로는 p2.3의 중쇄 가변영역(서열번호 40)을 MT-101-1의 중쇄 가변영역(서열번호 27) 부위에 클로닝을 통해 대체하여 중쇄 발현 벡터를 제작하였다.

[434] 표 12는 이중 특이 항체의 CDR 아미노산 서열을 나타내고 있으며, 표 13 내지 표 18는 MT-103-1, MT-103-2, MT-103-3, MT-103-4, 및 MT-103-5의 중쇄의 아미노산 서열과 공통으로 사용된 MT-103 경쇄의 아미노산 서열 및 대조군 p2.3-1의 중쇄의 아미노산 서열을 나타내고 있다. 대조군 p2.3-1 융합단백질의 경쇄는 서열번호 41에 기재되어 있다. 융합단백질 또는 이중 특이 항체 일시발현은 구축된 각각의 중쇄 및 경쇄 발현벡터를 이용하였다.

[435] [표12]

항체	서열 정보	서열	서열번호
MT-103-1	MT-103-1-HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-103-1-HCDR2	TSNDGSTT	2
	MT-103-1-HCDR3	ARKVVRGYHYHDAFDI	19
	MT-103-1-LCDR1	QSVSSY	4

	MT-103-1-LCDR2	GAS	5
	MT-103-1-LCDR3	QQYGTTPYT	6
MT-103-2	MT-103-2-HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-103-2-HCDR2	TSNDGSTT	2
	MT-103-2-HCDR3	ARKVVRGYHYHDAFDI	19
	MT-103-2-LCDR1	QSVSSY	4
	MT-103-2-LCDR2	GAS	5
	MT-103-2-LCDR3	QQYGTTPYT	6
MT-103-3	MT-103-3-HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-103-3-HCDR2	TSNDGSTT	2
	MT-103-3-HCDR3	ARKVVRGYHYHDAFDI	19
	MT-103-3-LCDR1	QSVSSY	4
	MT-103-3-LCDR2	GAS	5
	MT-103-3-LCDR3	QQYGTTPYT	6
MT-103-4	MT-103-4-HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-103-4-HCDR2	TSNDGSTT	2

	MT-103-4-HCDR3	ARKVVRGYHYHDAFDI	19
	MT-103-4-LCDR1	QSVSSY	4
	MT-103-4-LCDR2	GAS	5
	MT-103-4-LCDR3	QQYGTTPYT	6
MT-103-5	MT-103-5-HCDR1	GFTFNSYG	1
	MT-103-5-HCDR2	TSNDGSTT	2
	MT-103-5-HCDR3	ARKVVRGYHYHDAFDI	19
	MT-103-5-LCDR1	QSVSSY	4
	MT-103-5-LCDR2	GAS	5
	MT-103-5-LCDR3	QQYGTTPYT	6

[436] [표13]

MT-103-1			아미노산 서열	서열 번호
MT-103-1 HC	MT-101 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
		VH1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFNSYGMQWVRQAP GKGLEWVAVTSNDGSTTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRSEDTAVYYCARKVVRGY HYHDAFDIWGQGTMVTVSS	27
		CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL	52

			SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV	
		제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
		Fc(CH2+CH3)	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	63
	VEGF 특이적 결합 수용체 단편	제2 링커	GGGGSGGGGSGGGGS	49
		D2 도메인	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEG RELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNA TYKEIGLLTCEATVNGHLYKTN YLTHRQTNTIID	67
		D3 도메인	VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCT ARTELNVGIDFNWEYPSSKHQ HKKLVNRDLKTQSGSEMKKFL STLTIDGVTRSDQGLYTCAASS GLMTKKNSTFVRVHEK	68
MT-103-1 LC	signal peptide		MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL1		DIQMTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYRQKPGQA PRLLIYGASIRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQ QYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST	82

			YSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	

[437] [표14]

MT-103-2			아미노산 서열	서열 번호
MT-103-2 HC	MT-101 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
		VH1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFNSYGMQWVRQAP GKGLEWVAVTSNDGSTTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRSEDTAVYYCARKVVRGY HYHDAFDIWGQGTMVTVSS	27
		CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV	52
		제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
		Fc(CH2+CH3)	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	63
	VEGF 특이적 결합 항체 단편	제2 링커	GGGGSGGGGSGGGGSKL	50
		VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAAD FKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS	69

			LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSS HWYFDVWGQGTLVTVSS	
		제3 링커	SGGGGSGGGGSGGGGS	70
		VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAP KVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYSTVPWTFGQGTKVEIK	71
MT-103-2 LC	signal peptide		MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL1		DIQMTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYRQKPGQA PRLLIYGASIRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQ QYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[438] [표15]

MT-103-3			아미노산 서열	서열 번호
MT-103-3 HC	MT-101 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
		VH1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFNSYGMQWVRQAP GKGLEWVAVTSNDGSTTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRSEDTAVYYCARKVVRGY HYHDAFDIWGQGTMVTVSS	27
		CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV	52
		제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53

		Fc(CH2+CH3)	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	63
	VEGF 특이적 결합 항체 단편	제2 링커	GGGGSGGGGSGGGGSKL	50
		VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSS	72
		제3 링커	GGGGSGGGGSGGGGS	49
		VL2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK	73
MT-103-3 LC	signal peptide		MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL1		DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[439] [표16]

MT-103-4			아미노산 서열	서열 번호
MT-103-4 HC	MT-101 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
		VH1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFNSYGMQWVRQAP GKGLEWVAVTSNDGSTTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRSEDTAVYYCARKVVRGY HYHDAFDIWGQGTMVTVSS	27
		CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV	52
		제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
		Fc(CH2+CH3)	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	63
	VEGF 특이적 결합 항체 단편	제2 링커	GGGGSGGGGSGGGGS	49
		VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC TASGFSLTDYYYMTWVRQAPG KGLEWVGFIDPDDDPYYATWA KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAGGDHNSGWG LDIWGQGTLVTVSS	74
		제3 링커	GGGGGSGGGGSGGGGSGGGG S	75

		VL2	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC QASEIIHSWLAWYQQKPGKAP KLLIYLASTLASGVPSRFSGSGS GAEFTLTISSLQPDDFATYYCQ NVYLASTNGANFGQGTKLTVL	76
MT-103-4 LC	signal peptide		MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL1		DIQMTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYRQKPGQA PRLLIYGASIRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQ QYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	82

[440] [표17]

MT-103-5			아미노산 서열	서열 번호
MT-103-5 HC	MT-101 HC	signal peptide	MGWSCIILFLVATATGVHS	51
		VH1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFNSYGMQWVRQAP GKGLEWVAVTSNDGSTTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRSEDTAVYYCARKVVR GYHYHDAFDIWGQGTMVTVS S	27
		CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKV	52
		제1 링커	EPKSCDKTHTCPPCP	53
		Fc(CH2+CH3)	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPE	63

			VKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	
	VEGF 특이적 결합 항체 단편	제2 링커	GGGGSGGGGSGGGGSKL	50
		VH2	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARVTDAFDI WGQGTMVTVSS	77
		제3 링커	GGGGSGGGGSGGGGS	49
		VL2	DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITC RASQGIDNWLGWYQQKPGKA PKLLIYDASNLDTGVPSRFSGS GSGTYFTLTISSLQAEDFAVYF CQQAKAFPPTFGGGTKVDIK	78
MT-103-5 LC	signal peptide		MGWSCIILFLVATATGVHS	51
	VL1		DIQMTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYRQKPGQ APRLLIYGASIRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVFY CQQYGTTPYTFGQGTKVEIK	22
	CL		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	82

[441] [표18]

항체명	구분	아미노산 서열	서열 번호
MT-103-1	MT-103-1-HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARKVVRGYHYHDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	42
	MT-103-1-LC	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGTTPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	47
MT-103-2	MT-103-2-HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARKVVRGYHYHDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	43

		GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSKLEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY TFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKP GKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IK	
	MT-103-2-LC	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGTTPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	47
MT-103-3	MT-103-3-HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNS YGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDT AVYYCARKVVRGYHYHDAFDIWGQGTMVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT	44

		CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSKLEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY DFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSS LSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPG KAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEI K	
	MT-10 3-3-LC	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGTTPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	47
MT-1 03-4	MT-10 3-4-HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNS YGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDT AVYYCARKVVRGYHYHDAFDIWGQGTMVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSKLEIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIH SWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSR FSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYL	45

		ASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCT ASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFID PDDDPYYATWAKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQG TLVTVSS	
	MT-10 3-4-LC	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGTTPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	47
MT-1 03-5	MT-10 3-5-HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNS YGMQWVRQAPGKGLEWVAVTSNDGSTTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDT AVYYCARKVVRGYHYHDAFDIWGQGTMVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG GSKLEVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARVTDAFDIWGQGTMVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASIGDRVTI TCRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDAS NLDTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAV YFCQQAKAFPPTFGGGTKVDIK	46

	MT-103-5-LC	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYRQKPGQAPRLLIYGASIRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGTTPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	47
p2.3	p2.3-VEGFR1D2-VEGFR2D3-HC	DVQLVESGGGVVRPGESLRLSCTASGFTFDSY GMSWVRQAPGKGLEWVSSINVGDN TYYADSVRGRFIISRDSSRNTLYLQMNSLTAE DTAVYYCANWNSFFDYWGLGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGG SGGGGSGGGGSKLSDTGRPFVEMYSEIPEIIH MTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKK FPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLL TCEATVNGHLYKTNYLTHRQTN TIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNV GIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK	48

[442] 이하, VEGF 수용체를 포함하는 이중 특이 융합단백질도 이중 특이 항체로 기재하였다.

[443] **실시예 16.2. 이중 특이 항체의 발현 및 정제**

[444] 제작된 MT-103-1, MT-103-2, MT-103-3, MT-103-4 또는 MT-103-5 중쇄 발현 벡터는 MT-103 경쇄 발현 벡터를 상기 실시예 1.4와 동일한 방법으로 Expi293F 또는 ExpiCHO 세포에 도입하여 항체의 일시발현 및 정제를 진행하였다. PBS 완충

용액 내로 최종 정제된 이중 특이 항체의 농도를 흡광도 또는 BCA 분석으로 측정한 후, 비환원(Non-reducing) 및 환원(Reducing) 조건 하에서 SDS-PAGE 분석을 통해 분석하였다.

[445] 그 결과, MT-103-1은 중쇄가 약 80 kDa이고, 경쇄가 약 25 kDa이며, 총 분자량이 약 210 kDa인 것을 확인하였다. 또한, MT-103-2, MT-103-3, MT-103-4 또는 MT-103-5는 각각 중쇄가 약 75 kDa이고, 경쇄가 약 25 kDa이며, 총 분자량이 약 200 kDa인 것을 확인하였다.

[446] **실시예 16.3. 이중 특이 항체의 표적 친화도 확인**

[447] 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)의 표적 친화도를 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 BLI 기법을 이용하여 분석하였다.

[448] 구체적으로, Tie2에 대한 친화도 측정을 위해, AR2G 바이오센서 팁을 3차 증류수로 10분간 수화(Hydration) 시킨 후 20 mM EDC, 10 mM Sulfo-NHS을 포함하는 버퍼를 이용하여 활성화시켰다. 그런 다음, 100 nM의 hTie2-ECD-6x His 단백질을 고정화 버퍼(10 mM sodium acetate, pH 6.0)에 희석하여, 활성화된 AR2G 팁과 10분 동안 반응시켜 항원을 상기 AR2G 팁에 고정화 시켰다. 이후 1 M의 에탄올아민(ethanolamine, pH 8.5) 용액을 처리하여 항원 고정화 반응을 종료시키고, 항원-항체 결합의 기준선을 잡기 위해 상기 AR2G 팁을 PBS 완충용액에서 60초 동안 반응시켰다.

[449] 그 후, 60 nM의 MT-103-1 또는 MT-103-4를 hTie2-ECD-6xHis 항원이 고정된 AR2G 팁과 각각 800초 동안 결합 및 해리시켰다. VEGF에 대한 친화도 측정을 위해, 200 nM의 MT-103-1 또는 MT-103-4를 상기와 같이 AR2G 팁에 고정화 후 60 nM의 재조합 인간 VEGF(hVEGF) 단백질을 이중 특이 항체가 고정된 팁과 각각 800초 동안 결합 및 해리 시켰다. 결합 및 해리 반응 분석을 통해 확인된 반응 곡선을 기반으로, Data Analysis HT 12.0 프로그램의 global fitting 분석을 통해 K_{on}, K_{off}, 및 K_D 값을 산출하여 MT-103-1 또는 MT-103-4의 각 항원에 대한 친화도를 측정하여 표 1타내었다.

[450] 그 결과, MT-103-1 및 MT-103-4 항체가 hTie2 및 hVEGF에 대한 높은 친화도를 나타내는 것을 확인하였다(표 19).

[451] [표19]

항원	항체	K_D(M)	K_{on}(1/Ms)	K_{off}(1/s)
인간 Tie2	MT-103-1	7.92E-11	1.92E05	1.52E-05
	MT-103-4	5.58E-10	1.49E05	8.32E-05
인간 VEGF	MT-103-1	<1.00E-12	1.78E05	<1.00E-07
	MT-103-4	<1.00E-12	1.02E05	<1.00E-07

[452] **실시예 17. 이중 특이 항체의 활성화 확인**

[453] 이중 특이 항체의 활성 검증은 혈관내피세포에서 Tie2 및 이의 하위 신호전달 인자들의 인산화 유도 활성, 세포사멸 및 혈관내피 투과성 억제 활성, VEGF-VEGFR2 신호전달 경로 억제 활성 및 Ang-2의 Tie2에 대한 결합 억제 활성 분석을 통해서 확인하였다.

[454] **실시예 17.1. 이중 특이 항체의 VEGF 신호전달 경로 억제 효능 확인**

[455] 상기 실시예 16.2의 방법으로 준비된 이중 특이 항체의 VEGF 신호전달 경로 억제 효능은 혈관내피세포에서 VEGF에 의한 VEGFR2 및 이의 하위 신호전달 인자의 인산화 정도를 대조 약물(Aflibercept:EYLEA, Bevacizumab:Avastin 또는 Brolucizumab:Beovu)과 비교 분석하였다.

[456] 구체적으로, HUVEC($5x10^5$ 세포)을 60 mm 배양 접시에서 EGM-2 배지를 이용하여 37℃의 온도로 배양하였다. 상기와 같이 배양된 HUVEC을 1%의 혈청이 포함된 M199 배지에서 6시간 동안 배양하여 혈청 기아 상태로 만들었다. 그 뒤, 이중 특이 항체(MT-103-1, MT-103-2, MT-103-3, MT-103-4) 또는 대조 약물(EYLEA, Avastin 또는 Beovu), 및 VEGF(도 31a 내지 도 31e에 도시한 농도별)를 혼합하여 20분간 반응시킨 뒤, 상기 혼합액을 HUVEC에 처리하고 15분 동안 반응시켰다.

[457] 그 뒤, 세포를 용해 버퍼를 이용하여 용해하여 단백질을 추출한 뒤, 상기 단백질에 대하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 그리고, 이를 PVDF 멤브레인에 트랜스퍼한 뒤, 상기 멤브레인을 3% BSA가 희석된 0.1% Tween-20 TBST 완충용액으로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 이후, 1차 항체를 1:1,000으로 희석하여 멤브레인에 처리하고 상온에서 2시간 반응시켰다. 이때, 1차 항체는 항-phospho-VEGFR2 항체(Cell signaling, 3770), 항-phospho-AKT 항체 및 항-phospho-ERK 항체를 사용하였다. 그 뒤, 2차 항체(Peroxidase-conjugated)를 1:3,000으로 희석하여 멤브레인에 처리한 뒤 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤, 멤브레인에 ECL 용액을 처리하여 VEGF의 신호전달 경로 인자의 인산화 정도를 확인하였다.

[458] 그 결과, MT-103-1 또는 MT-103-4는 각각의 대조 약물인 EYLEA 또는 Beovu와 동등 수준으로 VEGFR2의 인산화를 뚜렷하게 감소시켰다(도 31a 및 도 31d). MT-103-2, MT-103-3 또는 MT-103-5 처리군에서도 농도 의존적으로 VEGFR2의 인산화가 감소되었다(도 31b, 도 31c 및 도 31e). 또한, 이중 특이 항체 처리군에서는 AKT 또는 ERK의 인산화가 뚜렷하게 증가되었는데, 이는 이중 특이 항체가 Tie2 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 증가된 것으로 확인되었다(도 31a 내지 도 31e).

[459] **실시예 17.2. 이중 특이 항체의 Tie2 신호전달 경로 활성화 확인**

[460] 상기 실시예 16.2의 방법으로 준비된 이중 특이 항체가 혈관내피세포에서 Tie2 및 이의 하위 신호전달인자들의 인산화를 유도하는지 비교 분석하였다. 실험은 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[461] 구체적으로, HUVEC($3x10^6$ 세포)을 100 mm 배양 접시에서 EGM-2 배지를 이용하여 37℃의 온도로 배양하였다. 상기와 같이 배양된 HUVEC을 1%의 혈청이 포

함된 M199 배지에서 6시간 동안 배양하여 혈청 기아 상태로 만들었다. 그 뒤, 항-Tie2 항체(MT-101) 또는 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 도 32a에 도시한 농도(0.5 nM, 1 nM, 5 nM 또는 10 nM)로 처리한 뒤 20분 동안 반응시켰다. 그 뒤, 상기 세포를 용해 버퍼로 용해하여 세포 용해물을 획득하였다. 상기 세포 용해물을 시료로 이용하여 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 면역침강 및 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[462] 그 결과, 이중 특이 항체인 MT-103-1은 단일 항체인 MT-101과 동일하게 Tie2, AKT 또는 ERK 단백질의 인산화를 유도하였다(도 32a). 또한, MT-103-4는 MT-103-1과 유사한 수준의 인산화 유도 활성을 나타내었다(도 32b).

[463] **실시예 17.3. 이중 특이 항체의 혈관내피세포 손상 및 투과성 억제 효능 확인**

[464] 상기 실시예 16.2에서 준비된 이중 특이 항체의 혈관내피세포 활성화 효능은 무혈청 및 저산소 조건에서 배양할 때 유도되는 혈관내피세포의 세포사멸(Apoptosis)과 VEGF에 의해 유도되는 혈관내피세포 투과성(Permeability) 분석을 통해서 확인하였다.

[465] 구체적으로, HUVEC($5x10^4$ 세포)을 24-웰 플레이트에서 EGM-2 배지를 이용하여 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 다음 날 무혈청 M199 배지에서 HUVEC에 항-Tie2 항체(MT-101), 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 도 24a에 도시한 농도별(1 nM 또는 10 nM)로 처리하고, 37℃의 저산소(산소 1% 미만) 배양 조건에서 40시간 동안 배양하였다. 그 뒤, 살아남은 세포를 고정하고 Crystal violet 시약으로 10분간 염색하였다. 상기 세포를 증류수를 이용하여 4번 정도 세척한 후, 1% SDS가 포함된 증류수로 염색된 시약을 용출시켜 흡광값을 측정하였다.

[466] 그 결과, MT-103-1 또는 MT-103-4 처리군은 MT-101 처리군과 동등 이상으로 세포사멸을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 33a).

[467] HREC 세포($1x10^5$ 세포)를 35 mm Confocal dish(SPL)에 접종하여 2일 동안 배양한 후, 4시간 동안 혈청 기아 상태로 유지하였다. 그 뒤, VEGF(1 nM), 및 Control IgG(2 nM) 또는 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 농도별(0.125 nM, 0.5 nM, 2 nM, 8 nM, 32 nM)로 함께 처리한 뒤 30분간 반응시켰다. 이후, 4% 파라포름알데히드로 10분간 고정하고, 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS 용액을 이용하여 30분 동안 세포막을 투과시켰다. 그 뒤, 3% BSA가 포함된 PBS 용액을 이용하여 1시간 동안 상온에서 블로킹하였다. 항-VE-cadherin 항체(R&D, 1:100)를 처리하고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 뒤, 형광이 표지된 2차 항체(Alexa Fluor 488 donkey anti-goat, Invitrogen)를 1:200으로 희석하여 처리한 뒤 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 세포에 1:1,000으로 희석된 DAPI를 처리하여 세포의 핵을 3분 동안 염색한 뒤 형광현미경으로 관찰하였다.

[468] 그 결과, VEGF 및 Control IgG를 처리한 군에서는 세포 간의 세포연접이 현저히 약하게 형성된 것을 확인할 수 있었다. 반면, VEGF와 함께 MT-103-1 또는

MT-103-4를 처리한 군에서는 세포-세포간의 세포연접이 잘 유지되고 경계면이 강하게 발달되는 것을 확인할 수 있었다(도 33b). 또한, 두 종의 이중 특이 항체 모두 처리 농도가 증가할수록 이러한 양상이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 33c).

[469] 또한, HREC 세포($1x10^5$ 세포)를 12-트랜스웰에 접종하고 EGM-2 배지를 이용하여 37℃에서 72시간 동안 배양한 후, VEGF가 제외된 EGM-2 배지를 이용하여 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 200 ng/mL 농도의 40 kDa FITC-dextran 용액을 처리하고 30분간 37℃에서 반응시킨 뒤 최초의 형광 누수를 측정하였고, VEGF 및 Ang-2, 및 Control IgG(5 nM) 또는 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)를 농도별(0.05 nM, 0.5 nM, 5 nM)로 처리하였다. 처리가 완료된 시점에서 200 ng/mL 농도의 40 kDa FITC-dextran 용액을 처리하고 30분간 37℃에서 반응시킨 뒤 24시간 후의 형광 누수를 측정하고, 최초의 측정값 대비 변화를 계산하였다.

[470] 그 결과, MT-103-1 또는 MT-103-4를 처리한 모든 군에서 VEGF 및 Ang-2, 및 Control IgG 처리군 대비 상대적 형광 누수가 감소된 것을 확인하였다. 이때, 5 nM의 이중 특이 항체 VEGF 및 Ang-2와 함께 처리한 군에서 모두 가장 높은 억제 효능을 보였다. 특히, MT-103-4의 억제 효능이 MT-103-1과 비교하여 보다 우수한 것을 확인할 수 있었다(도 33d).

[471] **실시예 18. 이중 특이 항체의 삼중 효능 확인**

[472] VEGF와 Ang-2가 모두 증가된 병리적 상황에서, MT-103-1 또는 MT-103-4의 삼중 효능(Tie2 결합, Ang-2의 Tie2 결합 억제 및 VEGF 결합)을 상기 실시예 2에서 기술한 BLI 기법을 기반으로 확인하였다.

[473] 구체적으로, AR2G 바이오센서 팁을 3차 증류수로 10분간 수화시킨 후 20 mM EDC, 10 mM Sulfo-NHS을 포함하는 버퍼를 이용하여 활성화시킨 다음, 200 nM의 MT-103-1, MT-103-4 또는 p2.3-1 대조군 이중 특이 항체를 10분 동안 반응시켜 항체를 팁에 고정화시켰다. 항체 고정화 후 Tie2 결합능을 분석하기 위해 100 nM의 hTie2-ECD-6xHis 단백질을 각각 600초 동안 결합 및 해리시켰고, Ang-2 결합 억제능을 분석하기 위해 팁을 다시 40 nM의 재조합 Ang-2 단백질과 각각 600초 동안 결합 및 해리시켰다. 마지막 단계에서는 VEGF 결합능을 평가하기 위해, 팁에 60 nM의 hVEGF 단백질을 처리하여 각각 600초 동안 결합 및 해리시켰다. 상기 결합 및 해리 반응을 Data Analysis HT 12.0 프로그램의 global fitting으로 분석하였다.

[474] 그 결과, MT-103-1 및 MT-103-4는 Tie2에 결합하고, Ang-2와 Tie2 결합을 억제하였다. 또한, hVEGF에도 결합하였다. 대조군 p2.3-1 이중항체의 경우, Tie2 및 hVEGF에는 결합하였으나 Ang-2의 Tie2 결합을 억제하지는 못하였다(도 34).

[475] **실시예 19. 이중 특이 항체의 Tie2 신호전달 경로 활성화 및 VEGF 신호전달 경로 억제 효능 확인**

[476] Ang-1, Ang-2 또는 VEGF가 발현된 조건에서 이중 특이 항체가 혈관내피세포에서 발현되는 Tie2는 활성화시키면서 VEGF는 억제하는지 확인하였다.

[477] 구체적으로, HUVEC($3x10^6$ 세포)을 100 mm 배양 접시에 접종하고 24시간 동안 배양한 후, 무혈청 M199 배지에서 6시간 동안 유지하였다. 그리고 Ang-2(5 nM) 및 VEGF(1 nM) 또는 Ang-1(5 nM), Ang-2(5 nM) 및 VEGF(1 nM)가 포함된 배지에 MT-103-1(1 nM 또는 5 nM) 또는 MT-103-4(1 nM 또는 5 nM)를 첨가하여 10분간 반응시켰다. 도 35a와 같은 조건으로 세포에 각각 15분간 처리한 후, 용해 버퍼로 세포를 용해하여 세포 용해물을 획득하였다.

[478] 상기와 같이 얻어진 세포 용해물에 1 μg/mL 농도로 항-Tie2 항체(R&D)를 처리하고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 뒤, 30 μL의 protein G bead를 첨가하여 면역침강을 수행하였다. 상기와 같이 준비된 시료를 이용하여 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이 때, 1차 항체는 항-phospho-tyrosine 항체, 항-phospho-VEGFR2 항체, 항-phospho-AKT 항체 또는 항-phospho-ERK 항체를 1:1,000의 비율로 희석하여 사용하였다.

[479] 그 결과, MT-103-1 또는 MT-103-4는 Ang-1, Ang-2 및 VEGF가 존재 하에서 Tie2, AKT 또는 ERK 단백질의 인산화를 강하게 유도하면서 VEGFR2의 인산화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 35b).

[480] **실시예 20. 이중 특이 항체 및 대조 약물의 Tie2 활성화 및 VEGF 억제 효능 비교**

[481] 상기 실시예 16.2에서 준비된 이중 특이 항체 및 현재 치료제로 사용되는 Ang-2와 VEGF 동시에 저해하는 이중항체(Faricimab:Vabysmo)의 효능을 비교하였다.

[482] 구체적으로, HUVEC($3x10^6$ 세포)을 60 mm 배양 접시에 접종하고 24시간 동안 배양한 후, 무혈청 M199 배지에서 6시간 동안 유지하였다. 그리고 상기 세포에 MT-103-1, MT-103-4 또는 Vabysmo를 농도별(0.5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM 또는 10 nM)로 15분간 처리한 후, 용해 버퍼로 세포를 용해하여 상기 실시예 17.1과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[483] 그 결과, 대조 약물인 Vabysmo는 Tie2 하위 신호전달 경로 인자들(AKT 및 ERK)의 인산화를 유도하지 못하였다. 반면, MT-103-1 또는 MT-103-4는 Tie2 하위 신호전달 경로 인자들(AKT 및 ERK)의 인산화를 유도하였다. 또한, VEGFR2의 인산화는 Vabysmo와 비교하여 MT-103-1의 경우 약 8배 이상, MT-103-4의 경우는 약 20배 낮은 농도에서도 동등한 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 36a).

[484] 또한, 상기 실시예 17.3과 동일한 방법으로 세포사멸 억제 효능을 분석한 결과, MT-103-1 또는 MT-103-4는 무혈청 및 저산소에서 배양 시 유도되는 HUVEC의 세포사멸이 효과적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 반면, Vabysmo에 의한 세포사멸 효과는 관찰되지 않았다(도 36b).

[485] **실시예 21. 이중 특이 항체의 망막질환 치료 효과 확인**

[486] **실시예 21.1. 레이저 조사에 의해 유도된 맥락막 혈관신생 동물모델에서 맥락막 신생혈관형성 억제 효능 분석**

[487] 노인성 황반변성(AMD)에 대한 치료 효능을 레이저 유도 혈관신생(CNV) 마우스 모델을 이용하여 확인하였다. 해당 마우스 모델에서는 타목시펜(Tamoxifen)에 의해 혈관내피세포에 tdTomato 형광 표지가 발현하는 VE-cad-creERT^2-tdTomato 마우스(Max Plank Institute 및 Jackson Laborartory)를 이용하여 신생혈관을 정량적으로 분석하였다.

[488] 구체적으로, 7주령 VE-cad-creERT^2-tdTomato 마우스 안구에 0.5% proparacaine hydrochloride(Alcon)을 국소 마취한 후 1% tropicamide(Santen pharmaceutical)로 동공을 확장하고 레이저 광응고기(Laser photocoagulator)를 이용하여 레이저 광응고(Wavelength 532 nm, Diameter 50 μm, Duration 80 mS, Power level 200 mW)로 각 눈의 4개 지역(Posterior pole의 3, 6, 9, 12시 위치)의 브루크막(Bruch's membrane)을 파열시켰다. 레이저를 망막 표면에 조사하면 망막조직의 화상으로 망막 표면에 기포가 맺히게 되는데, 기포가 관찰되지 않은 마우스는 분류하여 제외하였다.

[489] 레이저 광응고 후 3일째, Control IgG(20 μg), MT-101(20 μg), MT-103-1(20 μg), MT-103-4(20 μg) 또는 대조 약물인 EYLEA(10 또는 20 μg)를 각각 1 μL씩 각각 마우스 유리체강 내로 주사하였다. 레이저 광응고 후 7일째에 비정상적인 맥락막 신혈관신생을 관찰하기 위해서 인도시아닌 그린 혈관조영술(ICGA)을 수행하였다. 이때, 동시에 맥락막 신생혈관의 누수를 분석하기 위해 형광 안저 혈관 조영술(FA)을 시행하였다(도 37a).

[490] 레이저 광응고 후 8일째, 각각의 마우스 안구를 적출한 뒤 상온에서 4% 파라포름알데히드에 1시간 동안 고정한 후 PBS 완충용액으로 세번 세척하였다. 그 후, 해부현미경하에서 수술용 칼을 이용하여 각막을 통해 방사형 절개하고, 절개된 부위부터 시작하여 집게로 공막을 시신경 쪽으로 조심스럽게 벗겨내고 최종적으로 수정체를 제거하였다. 망막을 네잎클로버 모양으로 자른 후 일부 조직은 웨스턴 블롯 분석을 위해 채취 후 남은 조직을 PBST(0.5% Triton X-100 in PBS)에 4℃에서 16시간 동안 투과화시켜 조직 슬라이드를 제작하였다. 투과화된 망막은 PBS 완충용액으로 3번 세척한 다음 수용성 부착 용액(Hydrosoluble mounting medium)을 처리한 뒤, 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[491] 그 결과, 항-Tie2 항체(MT-101) 또는 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4) 투여군에서는 맥락막 혈관의 누수가 뚜렷하게 감소되었다. 특히, 상기 감소 효과는 대조 약물인 EYLEA 2개 농도 투여군보다 뛰어난 효과임을 확인할 수 있었다(도 37b). 또한, 조직 내 dtTomato 형광 표지를 발현하는 CNV 혈관 영역(area)이 이중 특이 항체 투여군(MT-103-1 또는 MT-103-4)에서 대조 약물인 EYELA 투여군과 비교하여 뚜렷하게 감소됨을 확인할 수 있었다(도 37c).

[492] **실시예 21.2. 레이저 조사에 의해 유도된 맥락막 혈관신생 동물모델에서 기 형성된 맥락막 신생혈관 억제 효능 분석**

[493] 상기 실시예 21.1과 동일한 방법으로 레이저 유도 혈관신생(CNV) 마우스 모델을 이용하여 기 형성된 맥락막 신생혈관 억제 효능을 확인하였다. 해당 마우스 모델에서도 타목시펜에 의해 혈관내피세포에 tdTomato 형광 표지가 발현하는 VE-cad-creERT^2-tdTomato 마우스를 이용하여 신생혈관을 정량적으로 분석하였다.

[494] 해당 실험에서는 레이저 광응고 후 7일째에 비정상적인 맥락막 신혈관신생을 관찰하기 위해서 인도시아닌 그린 혈관조영술(ICGA)을 수행하였다. 이와 동시에 맥락막 신생혈관의 누수를 분석하기 위해 형광 안저 혈관 조영술(FA)을 시행하였다. 그 후 Control IgG(20 μg), MT-103-1 항체(20 μg), MT-103-4 항체(20 μg) 또는 대조 약물인 EYLEA(10 또는 20 μg)를 각각 1 μL씩 각각 마우스 유리체강 내로 주사하였다. 레이저 광응고 후 14일 째 ICGA 및 FA를 수행하여 광응고 후 7일째 획득한 데이터와의 비교하여 레이저 광응고 후 불안정한 신생혈관에 의해 발생하는 누수를 억제하는 정도 및 기 형성된 맥락막 신생혈관의 영역을 감소시키는 효능을 분석하였다.

[495] 그 결과, 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4) 투여군에서 맥락막 혈관의 누수와 맥락막 신생혈관 생성이 뚜렷하게 감소되었다. 특히, 상기 감소 효과는 대조 약물인 EYLEA(2개 농도) 투여군과 동등 이상의 효과임을 확인할 수 있었다(도 38b). 또한, 조직 내 dtTomato 형광 표지를 발현하는 CNV 혈관 영역(Area)이 대조 약물인 EYELA 투여군과 비교하여 이중 특이 항체 투여군(MT-103-1 또는 MT-103-4)에서 뚜렷하게 감소됨을 확인할 수 있었다(도 38c).

[496] **실시예 21.3. 산소 조건에 의해 유도된 망막병증 동물모델에서 치료 효과 분석**

[497] 미숙아 망막병증(ROP), 증식성 당뇨병성 망막병증(PDR) 및 망막 정맥 폐색(RVO)을 포함한 허혈성 망막 질환에서 이중 특이 항체(MT-103-1 또는 MT-103-4)의 치료 효능을 고산소로 유도된 망막병증(OIR) 마우스 모델을 이용하여 분석하였다.

[498] 구체적으로, 생후 7일째 C57BL/6J 마우스를 산소 농도가 75%로 유지되는 고산소 유지 장치(Hyperbaric oxygen chamber)에서 5일 동안 사육하여 고산소 상태에 노출시켰다. 12일째 마우스를 고산소 유지 장치에서 꺼낸 다음, Control IgG(20 μg), MT-103-1 항체(20 μg), MT-103-4 항체(20 μg) 또는 대조 약물인 EYLEA(10 μg 또는 20 μg)를 1 μL씩 각각 마우스 유리체강 내로 주사하여 일반 대기상태(21% 산소 농도)에서 5일 동안 유지시켰다. 17일째, 마우스로부터 안구를 적출한 뒤 상온에서 4% 파라포름알데히드에 1시간 동안 고정한 후 PBS 완충용액으로 세 번 세척하였다. 상기 안구 조직을 상기 실시예 15.1과 동일한 방법으로 망막을 적출하여 조직 슬라이드를 제작하고 면역염색을 수행하였다. 이때, 1차 항체는 항-CD31 항체를 사용하였다. 상기의 방법을 통해 염색된 조직을 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다(도 39a).

[499] 그 결과, MT-103-1 또는 MT-103-4 투여군에서는 망막 내 허혈부 혈관신생의 면적이 대조 약물인 EYELA 투여군과 비교하여 뚜렷하게 감소된 것으로 분석되었다. 또한, 병리적 신생혈관총의 면적 역시 EYLEA 대비 MT-103-1 투여군에서 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 39b 및 도 39c).

청구범위

[청구항 1] (a) i) 서열번호 84의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 1(HCDR1); ii) 서열번호 85의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 2(HCDR2); 및 iii) 서열번호 9, 서열번호 15 및 서열번호 86으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄 상보성 결정영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변영역(VH) 및
(b) iv) 서열번호 87의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1); v) 서열번호 88의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2); 및 vi) 서열번호 89의 아미노산 서열로 표시되는 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 Tie2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편:
$X_1X_2X_3FX_4X_5X_6X_7$(서열번호 84)
여기서 X_1은 G 또는 S이고, X_2는 F 또는 D이고, X_3는 T 또는 S이고, X_4는 N, T 또는 A이고, X_5는 S 또는 G이고, X_6은 Y, N 또는 Q이고, X_7은 G, W 또는 A이며;
$X_8X_9X_{10}DX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$(서열번호 85)
X_8은 T 또는 I이고, X_9는 S 또는 Y이고, X_{10}은 N, P 또는 W이고, X_{11}은 G, D 또는 S이고, X_{12}는 S 또는 G이고, X_{13}은 T, D 또는 G이고, X_{14}는 T 또는 I이며;
ARKVVRGYX$_{15}$X$_{16}$HDAFDI(서열번호 86)
X_{15}는 S, H 또는 L이고, X_{16}은 Y 또는 P이며;
QX$_{17}$X$_{18}$X$_{19}$SX$_{20}$(서열번호 87)
X_{17}은 S, G 또는 D이고, X_{18}은 V 또는 I이고, X_{19}는 S 또는 D이고, X_{20}은 Y 또는 N이며;
$X_{21}X_{22}$S(서열번호 88)
X_{21}은 G 또는 A이고, X_{22}는 A 또는 S이며;
QQX$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$X$_{26}$PX$_{27}$T(서열번호 89)
X_{23}은 Y, A 또는 G이고, X_{24}는 G, N 또는 Y이고, X_{25}는 T, S 또는 D이고, X_{26}은 T 또는 F이고, X_{27}은 Y, L 또는 W이다.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 항체 또는 이의 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것인, Tie2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편:

ARKVVRGYX$_{15}$X$_{16}$HDAFDI(서열번호 86)
여기서, X$_{15}$는 S, H 또는 L이고, X$_{16}$은 Y 또는 P이다.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 1, 서열번호 7 및 서열번호 13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2, 서열번호 8 및 서열번호 14로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 3, 서열번호 9, 서열번호 15, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및
서열번호 4, 서열번호 10 및 서열번호 16으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5, 서열번호 11 및 서열번호 17로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6, 서열번호 12 및 서열번호 18로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는 것인, Tie2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;
서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;
서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;
서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열

번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;
또는
서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;
을 포함하는 것인, Tie2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;
서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;
서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;
서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는
서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것인, Tie2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

[청구항 6] 제1항의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 및 VEGF 특이적 결합 부위를 포함하는 이중 특이 항체.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 VEGF 특이적 결합 부위는 수용체, 리간드, 항체 및 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 이중 특이 항체.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 VEGF 특이적 결합 부위는 수용체인 것인, 이중 특이 항체.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 수용체는 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 이중 특이 항체.

[청구항 10] 제7항에 있어서
상기 VEGF 특이적 결합 부위는 항체 또는 이의 단편인 것인, 이중 특이 항체.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 항체 또는 이의 단편은 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;
서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;

서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는
서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는 것인, 이중 특이 항체.

[청구항 12] 제6항에 있어서,
상기 항-Tie2 항체 또는 이의 단편 및 VEGF 특이적 결합 부위는 링커를 통해 연결되는 것인, 이중 특이 항체.

[청구항 13] 제6항에 있어서,
상기 이중 특이 항체는 하기 구조식 (I) 및 (II)를 포함하는 융합단백질 이량체인 것인, 이중 특이 항체:
N'-X'-[L1]p-Fc 영역 또는 이의 변이체-[L2]q-Y-C' (I); 및
N'-X''-C' (II)
이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,
상기 N'은 N 말단이고,
상기 C'는 C 말단이며,
상기 -는 결합을 의미하고,
X'은 제1항의 항-Tie2 항체의 중쇄 가변영역(VH) 및 중쇄 불변영역(CH1)이고,
X''은 제1항의 항-Tie2 항체의 경쇄 가변영역(VL) 및 경쇄 불변영역(CL)이고,
X` 및 X``은 결합하여 Tie2에 특이적으로 결합하는 결합 부위(X)를 형성하고,
상기 Y는 VEGF 특이적 결합 부위이며,
상기 L1 및 L2는 펩타이드 링커이고,
상기 p 및 q는 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.

[청구항 14] 제1항의 항체 또는 이의 단편; 또는 제6항의 이중 특이 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 15] 제14항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

[청구항 16] 제15항의 벡터로 형질전환된 세포.

[청구항 17] i) 제16항의 형질전환된 세포를 배양하는 단계; 및
ii) 상기 세포 배양액에서 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 이중 특이 항체를 수득하는 단계;를 포함하는 수득하는 단계;를 포함하는 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 이중 특이 항체를 제조하는 방법.

[청구항 18] 제1항의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 제6항의 이중 특이 항체를 유효성분으로 포함하는 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 19] 제18항에 있어서,

상기 혈관 이상 관련 질환은 혈관신생 이상, 또는 혈관의 구조적 및/또는 기능적 변이와 관련된 질환인 것인, 약학 조성물.

[청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 혈관신생 이상 관련 질환은 과도하게 증가 또는 감소하거나 결핍되어 유발되는 것인. 약학 조성물.

[청구항 21] 제19항에 있어서,
상기 혈관의 구조적 및/또는 기능적 변이 관련 질환은 혈관의 구조적 비정상화, 혈관의 기능 장애 및 혈관의 손상으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 의해 유발되는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 22] 제18항에 있어서,
상기 혈관 이상 관련 질환은 급성 신손상, 만성 신부전, 황반변성, 당뇨성 망막병증, 당뇨성 황반 부종, 망막혈관폐쇄, 증식성 망막병증, 미숙아 망막병증, 각막 이식 거부, 녹내장, 중증하지 허혈, 당뇨성 발기부전, 패혈증, 급성 호흡곤란 증후군, 혈관염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 뇌졸중, 혈전증, 폐색증, 암, 전신 적혈증, 건선, 혈우병 관절염, 관련 경화증, 죽상경화반의 모세관 형성, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 부착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론병, 재협착, 죽상경화증, 장 유착, 고양이 스크래치 질환, 궤양, 간경화, 신장염, 당뇨성 신장병, 당뇨병, 염증성 질환 및 신경변성 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 약학 조성물.

[청구항 23] 제1항의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 제6항의 이중 특이 항체의 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료용 용도.

[청구항 24] 제1항의 항-Tie2 항체 또는 이의 단편; 또는 제6항의 이중 특이 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관 이상 관련 질환의 예방 또는 치료 방법.