

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 1월 7일 (07.01.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/003067 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004936

(22) 국제출원일: 2015년 5월 18일 (18.05.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0083648 2014년 7월 4일 (04.07.2014) KR

(71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HAN-YANG) [KR/KR]; 133-791 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이동윤 (LEE, Dong Yun); 135-785 서울시 강남구 압구정로 113, 미성아파트 28동 1701호, Seoul (KR). 황용화 (HWANG, Yong Hwa); 137-868 서울시 서초구 남부순환로 315길 37, 코지밸리 301호, Seoul (KR). 이민형 (LEE, Min Hyung); 427-732 경기도 과천시 별양로 111, 주공아파트 507동 702호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

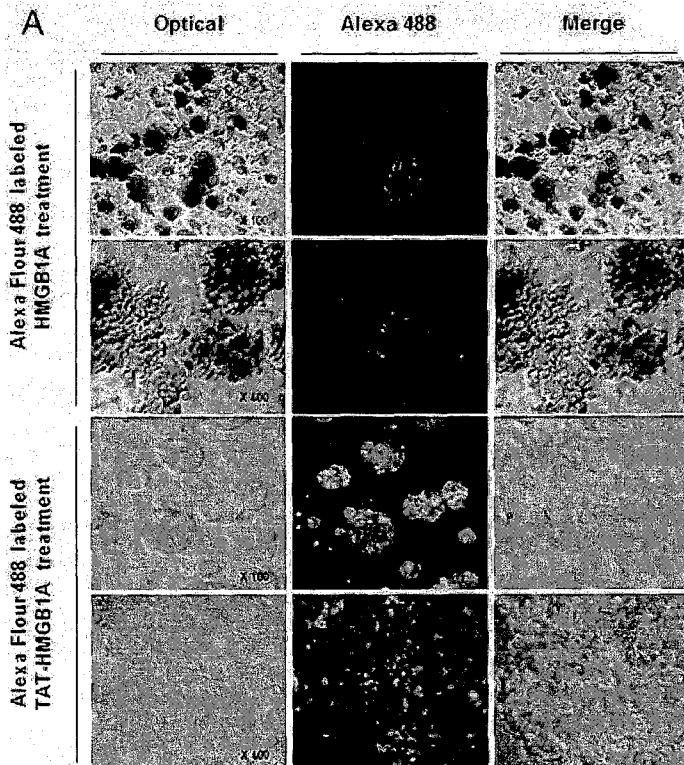
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR SUPPRESSING CELL TRANSPLANT REJECTION

(54) 발명의 명칭: 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for suppressing cell transplant rejection, the composition containing a high mobility group box 1 A domain (HMGB1A) as an active ingredient. The use of the composition of the present invention can minimize immunological rejection that may occur at the time of cell transplant, and increase the rate of cell transplant success.

(57) 요약서: 본 발명은 HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)를 유효성분으로 포함하는 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 사용함으로써 세포 이식시 발생할 수 있는 면역거부반응을 최소화하고, 세포의 이식 성공률을 높일 수 있다.

WO 2016/003067 A1



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

세포 이식 거부반응 억제용 억제학적 조성물

5 【기술분야】

본 발명은 대한민국 교육부의 지원 하에서 과제번호 201400000001005 에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 (재)한국연구재단, 연구사업명은 “이공분야 기초연구사업/ 중견연구자지원사업/ 도약연구”, 연구과제명은 “나노 하이브리드 시스템을 이용한 면역반응 조절형 세포의약 연구”, 주관기관은 10 한양대학교 산학협력단, 연구기간은 2014. 05. 01 ~ 2015. 04. 30 이다.

본 특허출원은 2014 년 7 월 4 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2014-0083648 호에 대하여 우선권을 주장하며, 15 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 세포 이식 거부반응 억제용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

20 【배경기술】

생체 내에 세포치료제를 이용한 치료 과정에서의 중요한 이슈는 (1) 투여된 세포치료제에 대한 면역반응 및 (2) 투여된 주변 환경에 의한 비특이적 염증반응이다. 이러한 중요한 문제점들에 의해서, 생체 내에 투여된 세포치료제들의 60~80%가 기능을 하지 못하는 초기 이식 손실(early 25 graft loss)이 나타나게 된다. 이의 주된 이유는 세포들이 갖고 있는 HMGB1(High Mobility Group Box 1; 유전자 전사 단백질(transcription factor protein)들 중의 한 종류) 단백질이 세포치료제가 미미한 손상을 입게 되면 세포 밖으로 방출된 후 주위 면역세포들 등의 TLR2/4 및 RAGE 등의 세포막 수용체(receptor)에 결합하여 면역반응 및 염증반응을 30 유발하게되고, 결국 이러한 과정이 지속되게 되면 세포치료제가 그 기능을 상실하게 되기 때문이다.

하나의 예를 들면, 당뇨병치료를 위한 췌도세포 이식(pancreatic islet transplantation)의 경우, HMGB1 이 이식 초기에 수술적 손상과 면역반응으로 인하여 췌도세포로부터 과량으로 방출되게 되고 이렇게 분비된 HMGB1 은 추가로 다른 면역세포들과 상호작용을 일으켜 극심한 면역반응을 진행하게 되어, 결국 이식된 췌도세포의 대부분이 심각하게 파괴되어 인슐린의 분비 능력을 잃게 되어 당뇨병 치료를 실패하게 된다. 따라서 상기 예에서 알 수 있듯이, 세포 내에 있는 HMGB1 단백질의 방출을 제어하는 기술 개발이 매우 중요하다는 것을 이해할 수 있다.

췌도 세포의 이식 시 초기에 발생하는 HMGB1 의 작용을 막기 위해 현재 진행하고 있는 연구는 HMGB1 의 항체를 세포 이식 된 동물에 정맥(Intravenous) 투여하여 HMGB1 의 면역반응을 줄여주는 연구 결과가 있다(Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. Cytokine Growth F R 17, 189-201 (2006), Huang Y, et al. Extracellular Hmgb1 functions as an innate immune-mediator implicated in murine cardiac allograft acute rejection. Am J Transplant 7, 799-808 (2007)). 이로 인해 동종이식에서 적은 수의 세포를 이식하여도 혈당을 조절하는 결과를 얻을 수 있었다. 또한, 패혈증 모델에서 HMGB1A 를 복강주사(intraperitoneal)나 정맥주사 시에 HMGB1 항체만큼 면역 물질의 분비를 줄여주는 효과가 있다는 연구 결과가 있다(Yang H, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 296-301 (2004)). 또한, 세포 전사 요소중 하나인 NF- κ B 를 막아주는 DHMEQ 나, 췌도 세포를 간에서 이식할 때 항응고 물질인 항트롬빈 III 을 동종 이식 후에 동물에 투여 해주면 HMGB1 의 발현을 줄일 수 있다는 등의 연구 결과가 공지되어 있다. 한편, HMGB1 항체나 siRNA 의 사용이 HMGB1 의 활성을 저해하여 암의 혈관신생(angiogenesis)을 저해한다는 연구가 진행되고 있다.

췌도 세포를 이식하고 난 후에 HMGB1 을 줄여 주기 위하여 추가 약물을 투입하는 방법은 번거로움이 많으며 정확한 시기에 투여하기엔 환자의 고통이 동반될 수 있다. 또한 대부분의 물질이 이식 된 세포를 타겟하는 것이 아니라 온몸으로 퍼져 나가기 때문에 그 효과를 바로

보기에는 한계가 있으며 체내에 약물을 투여하는 방법은 추후 임상적용 시에 안전성의 문제를 유발할 수 있다. 뿐만 아니라 대부분의 기술들은 동종이식에서만 그 효과를 보이고 있으며 이종 이식을 했을 때 효과를 증진시키려면 다른 조치를 취해야만 효과를 보이는 것으로 알려져 있다.

5

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

10

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명자들은 세포 치료를 위한 세포 이식시 발생할 수 있는 면역거부반응을 최소화하고, 이식 세포의 이식 성공률을 높일 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 HMGB1A(high mobility group box 1 A domain), 특히 PTD 가 결합된 HMGB1A 를 이용하는 경우 세포 이식시의 면역거부반응을 극적으로 경감시키고, 이식 세포의 생착률을 높일 수 있다는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

15

따라서, 본 발명의 목적은 세포 이식 거부반응 억제용 억제학적 조성물을 제공하는데 있다.

20

본 발명의 다른 목적은 상기의 세포 이식 거부반응 억제용 억제학적 조성물로 전처리된 세포를 포함하는 이식용 세포 조성물을 제공하는데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 세포 이식 거부반응 억제 방법을 제공하는데 있다.

25

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)를 유효성분으로 포함하는 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.

5

본 발명자들은 세포 이식 치료를 위한 세포 이식시 발생할 수 있는 면역거부반응을 최소화하고, 세포의 이식 성공률을 높일 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)를 이용하는 경우 세포 이식시의 면역거부반응을 극적으로
10 경감시키고, 이식 세포의 생착률을 높일 수 있다는 것을 규명하였다.

본 발명의 HMGB1A 는 HMGB1 단백질에서 유래한 단백질 절편(fragment)으로서, 본 발명자들은 HMGB1A 단백질이 HMGB1 단백질과 결합이 가능하다는 사실을 최초로 밝혔으며, 이의 활용 기술로써 HGMB1A 를 *ex vivo* 상에서 세포 내 유입이 가능하도록 PTD(protein transduction domain)가 도입된 PTD-HMGB1A 단백질을 개발을 하였다. 이러한 PTD-HMGB1A 를 세포 내 전달을 통해서 HMGB1 단백질의 세포 밖으로의 분비를 효과적으로 억제할 수 있음을 밝혔다. 따라서 이러한 PTD-HMGB1A 를 이용한 세포내의 전달 기술은 세포 치료 분야, 특히 당뇨병과 같은 췌도세포 결합 질병의 치료를 위한 췌도 세포 이식에서의 세포이식 거부반응 억제를
20 기대할 수 있으며, 더 나아가 줄기세포의 이식을 포함한 모든 세포의 이식 치료에서 또한 그 효과가 있을 것을 예상할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 HMGB1A 는 PTD(protein transduction domain)가 추가적으로 결합된 것이다.

본 발명자들은 PTD 가 부착된 HMGB1A 인 PTD-HMGB1A 를 포함하는
25 약제학적 조성물을 세포 이식시 사용하여, 세포의 이식 성공률을 극적으로 향상시킬 수 있음을 입증하였다. 상기 PTD 는 10-16 개의 염기성 아미노산으로 구성된 작은 펩타이드로, 특별한 수용체의 도움 없이 자기 자신 혹은 자신과 결합하고 있는 물질들과 함께 세포막(plasma membrane)을 통과하여 세포 내에 축적되는 물질이다. PTD 를 HMGB1A 에 부착하는 것은
30 당업계에 공지된 통상의 방법을 사용할 수 있고, 예를 들면, PTD-HMGB1A 를 발현하는 발현백터를 제조하여 이를 통해 PTD-HMGB1A 을 얻을 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 PTD 는 당업계에 공지되어 있는 것을 제한없이 사용가능하며, 구체적으로 예를 들면, Tat, Hph1, 페네트라틴(Penetratin), 트랜스포탄(Transportan), VP-22, 양쪽 친매성 펩타이드(Amphipathic peptides), MPG, Pep-1, MAP, SAP, PPTG1, 양이온성 펩타이드(Cationic peptides), 올리고알기닌(Oligoarginine), hCT(9-32), SyrB 및 Pvec 으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 PTD 는 Tat 이다. 상기 Tat 는 하위 타입에 따라 86 개-101 개의 아미노산으로 이루어진(참조: Jeang, K. T. (1996) In: Human Retroviruses and AIDS: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos National Laboratory (Ed.) pp. III-3-III-18) HIV-1 에 의해 발현되는 단백질로서, 단백질 전달(protein transduction) 현상을 일으킨다. Tat 의 아미노산 서열 중 49-57 번째 서열인 "RKKKKRRQRRR"이 PTD 역할을 하는데 있어서, 최소 부위임이 알려져 있다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 (a) 이식 전의 세포 전처리 및 (b) 세포가 이식된 객체(subject)에 대한 전신적 투여 중 적어도 하나에 사용된다. 본 발명에 있어서, 이식용 세포 전처리는 객체에 이식하기 위한 세포를 준비하여, 객체에 이식하기 전의 이식용 세포에 HMGB1A, 구체적으로 PTD-HMGB1A, 더욱 구체적으로 Tat-HMGB1A 을 처리하는 것을 의미하며, 구체적인 처리 방법은 분리된 이식용 세포를 실험실내에서 배양하며 순수 분리된 PTD-HMGB1A, 예를 들어 Tat-HMGB1A 을 배양액에 함께 배양하는 것이다. 본 발명에 있어서, 이식용 세포가 이식된 객체에 대한 전신적 투여는, 이식용 세포 이식과 함께 또는 직후 언제라도 가능하며, PTD-HMGB1A, 예를 들어 Tat-HMGB1A 는 이식용 세포가 이식된 부위에 직접 투여하지 않고, 다른 부위를 통해 투여하는 경우라도 전신적으로 효과가 발휘된다.

본 발명의 조성물은 바람직하게는 이식 전의 세포 전처리에 사용된다. 이식 전의 세포를 전처리 함으로서 이식 거부 반응을 예방할 수 있다는 점에서 이식 후 전신적 투여 또는 이식 부위 국소 투여만이 가능한 기준

약물들에 비하여 효율성이나 안정성 면에서 크게 유리하며, 이식 거부 반응 억제제를 위한 기존의 약물들과 차별화 된다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 본발명의 세포는 췌도세포, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 또는 유도만능 줄기세포(IPSC)이다. 본 발명의 세포 이식은 세포 결합 질병이라면 제한없이 질병의 치료를 위해 실시할 수 있으며, 특히 손상된 세포의 재생이 어렵거나 불가능하다고 여겨지는 질병의 치료를 위하여 실시될 수 있다. 췌도세포, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 또는 유도만능 줄기세포(IPSC)는 현재 세포 이식 치료를 위해 임상적으로 이용되고 있거나, 임상적 이용이 기대되는 세포들로서 세포 이식 치료를 위해 적절하게 이용이 가능하다. 이식용 세포의 이식은 당업계에 공지된 적절한 이식부위를 선정하여, 공지된 방식을 통해 세포를 주입하는 방법으로 수행될 수 있다. 구체적으로 예를 들면, 췌도세포의 이식의 경우 당업계에 공지된 적절한 이식부위(예를 들면, 신장 피막 하 및 간문맥 등)를 선정하고, 이식부위에 공지된 방식, 예를 들면 복강 절개없이 초음파 투시 하에서 경피적으로 간문맥을 통해 간 내로 준비한 췌도를 주입하는 방법 등을 통해 수행된다. 이식에 적합한 도세포의 조건은 ABO 일치형으로서 췌도 (islet)수가 5,000/kg(객체 체중) 이상, 췌도 순도(islet purity)가 30% 이상, 최종 부피가 10 ml 이하이며 그램 염색상 음성이고, 엔도톡신 음성인 경우 이식 조건이 된다(Shapiro J et al., International trial of the edmonton protocol for islet transplantation, *N Engl J Med* 355:1318-1330(2006)).

본 발명의 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물은 세포 이식시 이식용 세포와 함께 객체(subject)에 투여될 수 있고, 세포 이식 후에도 세포 이식 부위에 투여될 수 있다. PTD-HMGB1A 의 경우에는 세포 이식 부위가 아닌 다른 어떠한 부위를 통하여도 투여가 가능하다.

본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트,

활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물이 객체에 투여되는 방식으로 사용되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-1000 mg/kg이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 제 1형 당뇨병, 제 2형 당뇨병, 당뇨병성 만성 신질환, 백혈병, 재생불량성빈혈, 헌팅톤병, 뇌졸중, 척수손상 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병의 치료를 위한 것이다. 본 발명의 조성물은 본 발명의 다른 일 구현예에서 상술한 바와 같이 세포 결합 질병이라면 제한없이 질병의 치료를 위해 실시할 수 있으며, 특히 손상된 세포의 재생이 어렵거나 불가능하다고 여겨지는 질병의 치료를 위하여 실시될 수 있으나, 특히 제 1형 당뇨병, 제 2형 당뇨병, 당뇨병성 만성 신질환, 백혈병, 재생불량성빈혈, 헌팅톤병, 뇌졸중, 척수손상 또는 다발성 경화증의 치료를 위해 실시될 수 있다.

본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 질병은 제 1형 당뇨병이다. 제 1형 당뇨병의 경우에는, 인슐린을 분비하는 췌도의 베타세포가

파괴됨으로 인하여 인슐린 분비기능이 소실되어 발생하고, 췌도세포 이식이 제 1 형 당뇨병에 대한 좋은 치료방법이 될 수 있다.

본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물로 전처리된 세포를 포함하는 이식용 세포 조성물을 제공한다.

본 발명의 이식용 세포는 인간 또는 다른 공여 동물, 구체적으로 예를 들어 돼지에서 유래한 것을 사용할 수 있다. 현재 췌도세포의 경우, 인간으로부터 기증받은 췌장에서 분리한 췌도세포 뿐만아니라, 돼지로부터 분리한 췌도세포가 췌도세포 이식 치료에 이용되고 있으며, 본 발명의 이식용 췌도세포 조성물 또한 돼지로부터 분리한 췌도세포를 포함할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 세포는 췌도세포, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 또는 유도만능 줄기세포(IPSC)이다.

본 발명의 이식용 세포 조성물은, 이식을 위해 준비한 이식용 세포를 상기에서 설명한 조성물로 전처리한 것이므로, 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 중복되는 내용은 그 기재를 생략하도록 한다.

본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 (a) 이식 전의 세포에 전처리하는 단계 또는 (b) 세포가 이식된 객체(subject)에 대하여 전신적 투여하는 단계를 포함하는 세포 이식 거부반응 억제 방법을 제공한다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 HMGB1A 는 PTD(protein transduction domain)가 추가적으로 결합된 것이다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 세포는 췌도세포, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 또는 유도만능 줄기세포(IPSC)이다.

본 발명의 세포 이식 거부반응 억제 방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 세포 이식 거부반응 억제용 조성물을 이용하는 방법에 해당하므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)을 유효성분으로 포함하는 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.

(b) 본 발명은 HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)을 유효성분으로 포함하는 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물로 전처리된 세포를 포함하는 이식용 세포 조성물을 제공한다.

(c) 본 발명은 세포 이식 거부반응 억제 방법을 제공한다.

(d) 본 발명에 의하면 세포 이식시의 면역거부반응을 극적으로 경감시킬 수 있다.

(e) 본 발명에 의하면 이식 세포의 생착률을 높이고, 세포의 이식 성공률을 높일 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 HMGB1A 및 TAT-HMGB1A 발현을 위해 제작한 플라스미드를 나타낸다.

도 2a-c 는 TAT-HMGB1A 를 체도 세포에 처리했을 때, 세포의 viability에 영향을 주는지를 판단하는 실험 결과를 나타낸다.

도 3a-b 는 488nm 에서 형광을 띄는 Alexa Flour 488 dye 를 각각 HMGB1A 와 TAT-HMGB1A 에 표지 시킨 후, 각각의 단백질을 체도 세포에 처리한 후, 세포내에 유입된 단백질을 공초점 현미경을 사용하여 촬영한 이미지를 나타낸다.

도 4a-b 는 TAT-HMGB1A 의 처리가 체도 세포의 기능인 인슐린 분비능력에 영향을 주는지를 측정하기 위하여 GSIS(Glucose Stimulated Insulin Secretion)을 측정한 결과를 나타낸다.

도 5a-d 는 in vitro 상에서 일반 체도 세포와 TAT-HMGB1A 를 처리한 체도 세포를 STZ 에 노출을 시키게 되면, 대부분의 세포들은 손상을 입게 되는데, 이때의 세포의 기질에서 측정되는 HMGB1 의 양을 HMGB1 ELISA kit 를 사용하여 측정한 결과를 나타낸다.

도 6 은 TAT-HMGB1A, HMGB1A, TAT-MT, 및 HMGB1 항체를 분석대상으로 하여 다양한 농도에서 HMGB1 과의 결합 유무를 SPR(Surface Plasmon Resonance)분석한 결과를 나타낸다.

5 도 7 은 HMGB1 과 분석 대상들 간의 결합 유무를 알아보기 위한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다.

도 8a-b 는 제 1 형 당뇨병을 유도한 누드 마우스에서의 췌도 세포 이식에 있어서, 각각의 시료 처리에 따른 정상 혈당 조절능, 염증반응 유무, 인슐린 분비능, 또는 시료의 세포내 유입 정도를 나타낸다.

10 도 9 는 제 1 형 당뇨병을 유도한 Balb/c 마우스에서의 췌도 세포 이식에 있어서, 이식된 췌도세포의 생존 기간을 나타낸다.

도 10 은 제 1 형 당뇨병을 유도한 Balb/c 마우스에서의 췌도 세포 이식에 있어서, 신장에 이식된 췌장소도의 H&E 와 insulin, 6X his tag, HMGB1 의 염색을 시행결과를 나타낸다.

15 도 11a-c 는 암세포에서의 TAT-HMGB1A 전달 확인 실험 결과를 나타낸다.

도 12 는 암세포의 HMGB1 방출 조건에서 TAT-HMGB1A 처리에 따른 HMGB1 방출 억제 효과 실험 결과를 나타낸다.

도 13a-c 는 TAT-HMGB1A 에 의한 HUVEC 의 생존율, TAT-HMGB1A 의 세포 내 전달 실험 결과를 나타낸다.

20 도 14 는 HUVEC 세포를 이용한 세포 침윤 분석 결과를 나타낸다.

도 15a-b 는 래트(rat) 대동맥 고리(aortic ring)를 이용한 TAT-HMGB1A 의 혈관신생 억제 실험 결과를 나타낸다.

도 16 은 HMGB1A 처리에 따른 HUVEC 세포 내에서의 HMGB1 의 발현 변화 실험 결과를 나타낸다.

25

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

30

실시예

실시예 1: TAT-HMGB1A 융합 단백질 제작

1-1. HMGB1A 및 TAT-HMGB1A 플라스미드 제작

HMGB1 cDNA 를 HEK(Human Embryonic Kidney) 293 세포로부터 총(total) RNA 를 RT-PCR 을 사용하여 증폭시켰다. cDNA 단편(fragment)을 인코딩하고 있는 인간 rHMGB1 의 아미노산 서열 1-164 를 PCR 로 증폭시켰다. 사용한 프라이머는 다음과 같다.

forward(*EcoRI* site 밑줄) 5 '-CCGGAATTCATGGGCAAAGGAGATCCTAAG-3'

reverse(*HindIII* site 밑줄) 5 '-

10 CCCAAGCTTGATGTAGGTTTTTCATTTCTCTTTC-3'

증폭된 유전자를 *EcoRI* 과 *HindIII* 로 자르고 아가로오스 겔 전기영동을 실시하였다. 정제된 rHMGB1A cDNA 를 pET21a 벡터에 삽입 후, 6 히스티딘을 C-말단에 인코딩(rHMGB1A-his₆)하고 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 진행하였다. TAT 펩타이드 서열을 제작하였다. upstream DNA(*BamHI* site 밑줄) 5 '-GATCCAAGCTTCGCAAAAAGCGGAGACAGAGACGCAGGG-3', downstream DNA(*EcoRI* site 밑줄) 5 '-AATTCCTGCGTCTCTGTCTCCGCTTTTTGCGAAGCTTG-3'를 이용하였다. TAT cDNA 를 box A cDNA 와 결합시킨 후, pET21a 플라스미드에 삽입하였다(rTAT-HMGB1A-his6). 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. DNA 서열 분석을 통해 구조를 확인하였다(참조: 도 1).

1-2. 재조합 단백질의 발현

E. coli BL21(λ DE3) 균주를 유전자 재조합 단백질 발현에 사용하였다. 박테리아를 LB 배지(Luria-Berani medium)(50 µg/ml 암피실린, LB-amp)으로 자라게 하고, 단일 콜로니(pET21a-HMGB1A 또는 pET21a-TAT-HMGB1A)를 37°C LB-amp 에서 키웠다(OD_{600nm}=0.6). IPTG 500 µM 첨가 후 37°C에서 6 시간 동안 배양하였다. 원심분리를 하여 펠릿(pellet)을 만든 후, 1 mM PMSF 가 들어간 용해 버퍼(lysis buffer)를 넣고 30 초씩 3 번 초음파처리(sonication) 하였다. 4°C, 10000 g 로 원심분리하여 잔해물(debris)을 제거 한 후, 상층액을 정제하였다.

1-3. 재조합 단백질의 정제

rTAT-HMGB1A-his6 펩타이드를 니켈-킬레이트 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 반응을 하지 않은 단백질은 버퍼를 이용하여 제거하였다. 융합 단백질은 이미다졸을 첨가한 후, BCA 분석을 통하여 농도를 측정하고 SDS-PAGE 를 통하여 사이즈를 분석하였다. 20% 글리세롤과 0.2 mM PMSF 가 함유된 PBS 에서 6000-8000 Da 막(membrane)으로 투석하였다. 프로테아제 억제제 각테일을 넣고 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다.

10 실시예 2: 췌장소도 세포 분리

7 주령의 수컷 SD-래트를 마취제를 이용하여 마취한 후 복부 절개하였다. 췌장 장기를 노출 시킨 후 총담관(Common bile duct)을 통해서 콜라게나아제 P 용액을 이용하여 췌장 장기를 부풀린 후 췌장 장기를 적출하였다. 17 분 동안 효소 반응 후 차가운 M199 배지를 넣어 효소 반응을 정지 한 후 2 번의 세척을 실시하였다. 피콜-히스토페이크(Ficoll-histopaque) 및 M199 배지의 이중 층(double-layer)을 이용한 밀도 구배-원심분리(density gradient-centrifugation)를 24 분간 실시하였다. 분리된 층 사이의 췌장소도를 모아 2 번의 세척 후 스테레오스코프(stereoscope)를 이용하여 핸드 피킹(handpicking)하였다. 10% FBS 및 1%항생제가 들어 있는 RPMI-1640 배양액에서 1 일 동안 배양하였다. 다음날 배양액을 1 회 교체하였다.

실시예 3: 췌장소도에서의 TAT-HMGB1A 처리 조건 확립

TAT-HMGB1A 의 처리 농도에 따른 생존율을 측정하였다. 췌장소도에 TAT-HMGB1A 농도 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M 및 25 μ M 을 RPMI-1640 용액으로 맞춘 후 24 시간 동안 37℃, CO₂ 인큐베이터에서 처리하였다. 처리한 췌장소도를 RPMI-1640 으로 2 회 세척 후, 세포의 모양을 광학현미경으로 촬영하고 CCK-8 분석 키트로 생존율을 측정하였다. 10 μ M TAT-HMGB1A 농도를 0, 4, 8, 12, 24 시간에 따라서 37℃, CO₂ 인큐베이터에서 처리한 후, RPMI-1640 으로 2 회 세척 후, CCK-8 분석 키트로 생존율을 측정하였다.

본 실시예는 TAT-HMGB1A 를 췌도 세포에 처리했을 때, 세포의 생존력에 영향을 주는지를 판단하는 실험이다. 도 2 의 A 의 그래프에서 TAT-HMGB1A 를 췌도 세포에 농도별로 처리 했을 시, 농도가 높아질수록 세포의 생존율이 떨어지는 것을 알 수 있다. 특히 농도가 20 μ M 이상으로

5 처리 했을 때, 세포의 생존력이 현저하게 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이는 광학현미경으로 촬영한 도 2 의 C 의 이미지와도 같은 결과를 보이고 있는 것을 알 수 있다. 고농도의 TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포에서 세포의 겔 콜라겐 층이 깨져있는 것을 확인 할 수 있었다. 도 2 의 B

10 그래프는 TAT-HMGB1A 를 10 μ M 에서 처리 시간에 따른 세포의 생존율을 관찰한 것인데, 이를 통해서 단백질의 처리 시간은 세포의 생존율에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단을 하였다. 췌도 세포는 다른 일반 세포들과는 다르게 하나의 세포가 여러 개 모여서 하나의 클러스터를 이루는 세포이기 때문에, 단백질의 세포내 유입은 상당히 힘든 것으로 알려져 있다. 따라서 위 생존율 실험을 통해서 TAT-HMGB1A 의 전달을

15 극대화시키기 위하여 TAT-HMGB1A 의 처리 농도와 시간을 10 μ M, 24 시간으로 결정하였다.

실시예 4: TAT-HMGB1A 의 췌도 세포내 유입 확인 (형광물질 Alexa 488 을 이용한 Alexa 488-표지된 TAT-HMGB1A 을 제작하여 췌장소도 세포내 유입

20 정도 관찰)

1 M 소듐바이카보네이트 용액을 제작하였다(pH 8.3). TAT-HMGB1A 100 μ l 와 10 μ l 의 1M 소듐바이카보네이트 용액을 섞어주었다. 4 μ l 의 Alexa 488 을 넣고 15 분간 반응시키고 스피ن 필터를 이용하여 정제하였다. Alexa 488-표지된 TAT-HMGB1A 를 췌장소도에 10 μ M 로 24 시간 동안 RPIM-1640

25 배지안에서 처리하였다. 췌장소도를 RPMI-1640 으로 2 회 세척 후 공초점 현미경으로 췌장소도 세포 내 유입을 확인하였다. 처리가 끝난 췌도 세포를 Tryple Express 용액을 사용하여 단일 세포로 분리 후, FACs 측정을 실시하였다.

30 488 nm 에서 형광을 띄는 Alexa Flour 488 염료를 각각 HMGB1A 와 TAT-HMGB1A 에 표지 시킨 후, 각각의 단백질을 췌도 세포에 처리한 후,

세포내에 유입된 단백질을 공초점 현미경을 사용하여 촬영한 이미지를 도 3의 A에 나타내었다. 도 3의 A에서 보는 바와 같이, TAT-HMGB1A는 일반 HMGB1A 단백질보다 훨씬 채도 세포내의 유입이 잘 된 것을 확인할 수 있다. 정량적으로 분석을 하기 위하여 FACs를 측정해본 결과, TAT-HMGB1A의 유입율은 22.31%로 단순히 HMGB1A(6.1%)처리 하는 것보다 훨씬 좋은 효율로 전달이 잘 되는 것을 알 수 있다.

실시에 5: TAT-HMGB1A 처리 후 *In vitro* 상에서의 췌장소도 인슐린 방출(release) 능력 평가

췌장소도에 TAT-HMGB1A 10 μ M을 24시간 처리한 후 RPMI-1640 배지로 세척하였다. 일반 췌장소도와 TAT-HMGB1A를 처리한 췌장소도를 2.8 mM 글루코오스 크랩 버퍼(glucose Kreb's buffer)로 2회 세척하였다. 인서트(Insert)에 각 그룹 50IEQ씩 담아서 저농도 글루코오스(2.8 mM) 크랩 버퍼로 1시간동안 37°C에서 배양하였다. 반응이 끝난 후 용액을 E-튜브에 담고, 인서트를 고농도 글루코오스(20.2 mM) 크랩 버퍼로 옮긴 후 1시간동안 37°C에서 배양하였다. 고농도 글루코오스에서 반응한 용액을 E-튜브에 담고 인슐린 ELISA를 이용하여 용액의 인슐린의 양을 정량 분석하였다. 인서트에 있는 각 그룹의 췌장소도를 회수한 후, 세포를 RIPA 버퍼를 이용하여 용해시킨 후, 세포 잔여물(debris)을 제거한 후, DNA를 회수하여 DNA 분석 키트(Quant-iTTM dsDNA assay kit; Invitrogen)를 사용하여 정량하였다.

TAT-HMGB1A의 처리가 췌도 세포의 기능인 인슐린 분비능력에 영향을 주는지를 측정하기 위하여 GSIS(Glucose Stimulated Insulin Secretion)을 측정한 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4의 A에서 보는 바와 같이, TAT-HMGB1A를 처리한 췌도 세포는 일반 췌도 세포와 마찬가지로 낮은 농도와 높은 농도의 글루코오스 용액 상에서 인슐린을 분비하는 양상이 비슷했다. 또한 낮은 농도의 글루코오스에서 높은 농도의 글루코오스의 용액으로 바뀔 때 분비량이 얼마나 증가하는지를 알아보는 인슐린 자극 인덱스 값(Insulin Stimulation Index value)을 확인해본 결과, 도 3의 B에서 보는 것처럼 TAT-HMGB1A를 처리한 췌도 세포는 일반 췌도 세포처럼 인슐린의 증가

비율이 2 배 이상임을 확인 할 수 있었다. 이는 TAT-HMGB1A 의 처리가 췌도 세포의 인슐린 분비 능력에는 영향을 주지 않는다는 것을 확인 할 수 있는 지표이다.

5 실시예 6: 손상된 췌도 세포에서의 HMGB1 분비량 측정

일반 췌도 세포와 TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포에 스트렙토조토신(STZ)을 1.5 mM 8 시간동안 처리하였다. 반응 시간이 끝난 후, 세포의 배지를 회수하여 HMGB1 ELISA 측정을 실시하였다. 회수한 세포는 웨스턴 블랏 및 HMGB1 항체를 이용하여 면역염색하였다.

10

췌도 세포의 핵에는 HMGB1 이 풍부하게 들어있고, 세포가 손상을 받게 되면, 이 HMGB1 이 세포의 기질로 방출이 되게 된다. STZ 는 동물모델에서 세포 사멸을 유도하여 제 1 형 당뇨병을 유발하는 시약으로 알려져 있다. *In vitro* 상에서 일반 췌도 세포와 TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도

15

세포를 STZ 에 노출을 시키게 되면, 대부분의 세포들은 손상을 입게 되는데, 이때의 세포의 기질에서 측정되는 HMGB1 의 양을 HMGB1 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. 도 5 의 A 에서 보는 바와 같이, TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포 그룹에서는 일반 췌도 세포의 그룹과 비교 했을 때, 세포의 기질에서 측정되는 HMGB1 의 양이 현저하게 줄었음을 확인 할 수 있었다. 또한 각각의 그룹에 STZ 를 처리한 세포들을 회수하여 웨스턴 블랏을 시행하였을 때, 도 5 의 B 와 C 에서 보는 바와 같이, 세포 내에 존재하는 HMGB1 의 양이 TAT-HMGB1A 그룹에서 훨씬 많이 존재하고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 뿐만 아니라, 각 그룹의 세포들을 HMGB1 항체를 이용하여 면역염색을 해본 결과, 일반 췌도 세포에서는 STZ 처리에 의하여 세포에

20

25

존재하고 있는 대부분의 HMGB1 이 세포외로 빠져나가 염색되는 정도가 약한 반면, TAT-HMGB1A 를 처리한 그룹에서는 HMGB1 의 염색이 세포의 핵과 세포질에서 관찰이 되었다. 이를 통해서, TAT-HMGB1A 의 세포내 유입은 췌도 세포가 손상을 입었을 때 방출하는 HMGB1 을 현저히 막아준다는 것을 확인할 수 있었다.

30

실시예 7: HMGB1 과 TAT-HMGB1A 의 결합 친화도 확인

7-1. SPR(Surface Plasmon Resonance)

골드 칩(Gold chip)으로는 CMDH 칩을 사용하였고, Reichert SR7500DC system 의 장비를 이용하여 측정하였으며, scrubber2 소프트웨어를 이용하여
5 분석하였다. 사용되는 버퍼는 PBS-T(0.05% Tween 20)이며, 리간드로는 HMGB1 10 μg 을 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 플로우(flow)로 10 분간 칩에 코팅을 시켜주었다. 그 후, TAT-HMGB1A, HMGB1A, TAT-MT, HMGB1 항체를 분해물질(analyte)로 다양한 농도에서 HMGB1 과의 결합 유무를 분석하였다. 이때, 사용되는 TAT-MT 는 메탈로티오네인(metallothionein)이라는 단백질에
10 TAT 펩타이드를 붙인 것으로 TAT-HMGB1A 와 결합 능력을 비교하기 위한 그룹으로 이용하였다.

【표 1】

	$K_a(\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	$K_d(\text{S}^{-1})$	KD
HMGB1A+TAT-HMGB1A	$(9.20 \pm 4) \times 10^3$	$(6.91 \pm 3) \times 10^{-4}$	$75.1 \pm 3 \text{ nM}$
HMGB1+HMGB1A	$(1.4 \pm 2) \times 10^3$	$(3.942 \pm 3) \times 10^{-3}$	$2.8 \pm 3 \text{ } \mu\text{M}$
HMGB1+TAT-MT	-	-	-
HMGB1+HMGB1Ab	$(7.298 \pm 6) \times 10^4$	$(6.38 \pm 9) \times 10^{-5}$	$876.9 \pm 7 \text{ pM}$

15 SPR 분석 결과, HMGB1 단백질은 TAT-HMGB1A 와 HMGB1A 각각의 단백질과 결합을 하는 것을 알 수 있었다(참조: 표 1 및 도 6). 비록 HMGB1 항체에 비하여 그 결합력은 훨씬 작지만, 이러한 결합을 한다는 것을 밝히는 것은 상당한 의미가 있다. TAT-HMGB1A 는 일반 HMGB1A 와 비교 했을 때, 다소 결합의 세기가 더 크고 안정적으로 되는 것을 알 수 있었는데,
20 이때 TAT-MT 그룹은 HMGB1 과 결합을 하지 않는 것을 보아 이러한 결합은 단순한 TAT 가 가지고 있는 (+)charge 때문에 결합이 되는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다.

7-2. 웨스턴 블랏을 이용한 결합 테스트

HMGB1 단백질에 TAT-MT, HMGB1A, TAT-HMGB1A 단백질을 1:1 의
 질량비로 섞고 상온에서 한 시간 반응시켰다. HMGB1, TAT-MT, HMGB1A, TAT-
 HMGB1A, HMGB1+TAT-MT, HMGB1+HMGB1A, HMGB1+TAT-HMGB1A 단백질 2 μ g 을
 5 각각 10% 아크릴아마이드 겔에 넣고 SDS-PAGE 를 실시하였다. PVDF 막에
 SDS-PAGE 가 끝난 겔을 넣고 트랜스퍼하였다. 5% 탈지유(skim milk)로
 1 시간동안 상온에서 블로킹하였다. 토끼 HMGB1 항체로 1:1000 으로 희석한
 후 1 시간 상온에서 반응시켰다. TBS-T 로 10 분간 세 번 세척 후, 항-토끼
 2 차 항체로 1:5000 으로 희석한 후, 1 시간에서 상온 반응시켰다. TBS-T 로
 10 10 분간 세 번 세척 후, 화학발광 시약(chemiluminescent reagent) 처리 후,
 화학발광 이미지(chemiluminescent image)를 촬영하였다(참조: 도 7).

웨스턴 블랏의 결과, 도 7 에 나타난 바와 같이 HMGB1+HMGB1A,
 HMGB1+TAT-HMGB1A 의 라인에서만 밴드가 2 개가 염색이 됨을 알 수 있었다.
 15 따라서 이는 SPR 의 결과와 마찬가지로 각각의 HMGB1A, TAT-HMGB1A 단백질은
 HMGB1 과 결합한다는 것을 알 수 있다. 더욱이 HMGB1+TAT-MT 에서는 밴드가
 하나만 관찰되는 것으로 보아 TAT-HMGB1A 와 HMGB1A 단백질이 HMGB1 과
 특이적으로 반응을 한다는 것을 알 수 있다.

20 실시예 8: 제 1 형 당뇨병을 유도한 누드 마우스에서의 췌도 세포 이식

8-1. 당뇨병 모델

인위적으로 당뇨병을 유도하기 위해 시트르산 버퍼 200 μ l 에
 스트렙토조토신을 누드 마우스의 체중 kg 당 200 mg 의 비율로 녹였다. 이를
 신속히 복강에 주사한 후 1 주일 후 혈당을 측정하여 혈당 수치가 이를 연속
 25 >350 mg/dl 이상인 실험동물을 당뇨병 모델로 사용하였다.

8-2. TAT-HMGB1A 를 처리한 췌장소도의 신장 이종이식(xenotransplantation)

당뇨병이 유발된 실험동물을 마취제를 이용하여 마취하였다.
 마우스의 왼쪽 신장 위치 부근을 알코올 솜으로 충분히 닦아 준 후,
 30 절개하였다. 신장을 조심스럽게 꺼낸 후, 아무 처리도 하지 않은 일반
 췌장소도와 TAT-HMGB1A 를 처리한 췌장소도를 각각 200 개, 400 개씩 헤밀턴

시린지를 이용하여 왼쪽신장 내피 막 사이에 이식하였다. 실험동물의
 피부를 이식 후 봉합하였다. 실험동물이 마취에서 깨어날 때까지 적절한
 온도 하에서 관찰하였다. 격일로 매일 오후 1 시-3 시 사이에 췌장소도를
 이식 받은 마우스의 꼬리 정맥에서 혈액을 얻어 원터치 울트라 혈당 측정
 5 시험지를 사용하여 혈당을 측정하였다. 이식 한 다음 날부터 30 일 동안
 혈당을 측정하였다.

8-3. 이식 받은 누드 마우스에 대한 체내 포도당 저항성
 테스트(Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 실험을 통한 혈당
 10 변화량에 따른 반응성 평가

D-글루코오스를 200 mg/ml 의 비율로 PBS 에 녹였다. 췌장소도를
 이식한 ICR-SCID 마우스를 6 시간 동안 금식시켰다. PBS 에 녹아있는 D-
 글루코오스를 마우스 체중 g 당 10 μ l 씩 복강으로 주사하였다. 매 5, 10,
 15, 20, 30, 60, 90, 120 분에 마우스의 꼬리정맥에서 혈액을 얻어
 15 원터치울트라 혈당측정 시험지(Johnson & Johnson Lifescan Glucometer,
 One Touch Ultra)를 사용하여 혈당량을 측정하였다.

8-4. 신장에 이식된 췌장소도의 조직검사

이식한지 30 일이 지난 후, 마우스를 희생시켜 신장을 분리하였다.
 20 분리된 신장을 PBS 에서 가볍게 헹구 혈액을 제거하였다. 10%
 포르말데히드에 넣은 후 하루 동안 고정하고 파라핀 블록을 제작하였다. 5
 μ m 로 시리얼 섹션한 후, H&E 를 통해서 이식된 췌장소도의 위치를 찾았다.
 췌장소도가 존재하는 슬라이드 번호 주위 샘플로 인슐린, HMGB1, 6His tag
 면역 검사를 시행하였다.

25 누드마우스는 T 세포가 결핍된 쥐로써, 면역반응이 크지 않아
 기초적인 세포 이식의 효능을 평가하는데 적합한 동물 모델이다.
 일반적으로 당뇨병모델의 마우스에서 래트(rat)에서 분리한 췌도 세포를
 이식했을 경우 정상혈당으로 조절하기 위한 세포의 수는 대략 400 개
 30 정도이다. STZ 로 제 1 형 당뇨병을 유도한 후, 아무것도 처리하지 않은 췌도
 세포(untreated)와 TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포 200 개와 400 개를 각각

왼쪽 신장막에 이식을 하였을 때 일반 췌도 세포의 그룹에서는 200 개의 세포를 이식을 해주었을 때 정상혈당을 조절하지 못하는 반면에, TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포의 이식에서는 200 개의 췌도 세포를 이식을 해주었음에도 정상 혈당 수치를 계속 유지해 주는 것으로 관찰이 되었다(참조: 도 8). 이는 일반 췌도 세포 이식 그룹은 수술적인 손상에 의하여 염증반응이 진행되어 이식 된 췌도 세포가 대부분 기능을 하지 못하는 반면에, TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포는 이러한 수술적 과정에서 오는 손상에 의한 HMGB1 의 작용을 어느 정도 줄여줬기 때문인 것으로 판단된다. 또한, 이식 후 30 일째에 시행한 IPGTT 에서 TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포 200 개의 이식 그룹은 췌도 세포를 400 개를 이식해준 그룹들과 비슷하게 체내의 증가된 혈당의 농도를 성공적으로 조절하는 것을 알 수 있었다(참조: 도 8). 뿐만 아니라, TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포는 이식 후 초기 기간인 6 시간과 장시간 후인 30 일째에도 꾸준히 인슐린을 분비하는 것을 알 수 있었다. 이때, 췌도 세포에 처리한 TAT-HMGB1A 단백질이 얼마나 췌도 세포내에서 존재하는지 알기 위하여 염색한 6X his tag 염색에서는 이식 초기에는 TAT-HMGB1A 가 발견이 되었으나, 30 일 이후에는 염색이 되지 않는 것으로 나타났다. 하지만, 이식 후, 초기에 HMGB1 에 의한 염증반응이 극대화 되는 시기는 이식 후 6 시간 이후이기 때문에 이러한 결과는 큰 영향을 주지 않을 것으로 판단이 된다.

실시에 9: 제 1 형 당뇨병을 유도한 Balb/c 마우스에서의 췌도 세포 이식

9-1. 당뇨병 모델

인위적으로 당뇨병을 유도하기 위해 시트르산 버퍼 200 μ l 에 스트렙토조토신을 Balb/C 마우스의 체중 kg 당 200 mg 의 비율로 녹였다. 이를 신속히 복강에 주사한 후 1 주일 후 혈당을 측정하여 혈당 수치가 이를 연속 >350 mg/dl 이상인 실험동물을 당뇨병 모델로 사용하였다.

9-2. TAT-HMGB1A 를 처리한 췌장소도의 신장 이종이식(xenotransplantation)

당뇨병이 유발된 실험동물을 마취제를 이용하여 마취하였다. 마우스의 왼쪽 신장 위치 부근을 알코올 솜으로 충분히 닦아 준 후, 절개하였다. 신장을 조심스럽게 꺼낸 후, 아무 처리도 하지 않은 일반

췌장소도와 TAT-HMGB1A 를 처리한 췌장소도 400 개를 헤밀턴 시린지를 이용하여 왼쪽신장 내피 막 사이에 이식하였다. 실험동물의 피부를 이식 후 봉합하였다. 실험동물이 마취에서 깨어날 때까지 적절한 온도 하에서 관찰하였다. 매일 오후 1 시-3 시 사이에 췌장소도를 이식 받은 마우스의 꼬리 정맥에서 혈액을 얻어 윈터치 울트라 혈당 측정 시험지(Johnson & Johnson Lifescan Glucometer, One Touch Ultra)를 사용하여 혈당을 측정하였다. 이식 한 다음 날부터 혈당이 >350 mg/dl 이상이 3 일 연속이 되면 마우스의 장기를 적출하였다.

9-3. 신장에 이식된 췌장소도의 조직검사

이식 후, 6 시간째와 정상혈당을 조절하지 못한지 3 일이 된 날에 마우스를 희생시켜 신장을 고정액에 처리하였다. 파라핀 블록을 만든 후, H&E 와 인슐린, 6X his tag, HMGB1 의 염색을 시행하였다.

【표 2】

	생존 일 수	중앙값(median)±S.E.
무처리(n=8)	3, 5, 6, 5, 6, 7, 8, 7	6±0.54
TAT-HMGB1A(n=8)	12, 8, 3, 13, 12, 9, 10, 13	11±1.19

Balb/C 마우스는 누드 마우스와는 다르게 면역반응이 정상적으로 이루어지고 있는 동물이다. 보통 래트에서 분리한 췌도 세포를 Balb/c 마우스에 이식을 하게 되면, 극심한 염증반응과 면역반응으로 인하여 이식한 췌도 세포가 대부분 사멸이 일어나기 때문에 정상 혈당조절이 일주일 넘기기 힘들다. 또한, Balb/c 마우스를 이용하면, 췌도 세포를 이식한 후 일어나는 면역반응에 의한 HMGB1 과의 작용을 TAT-HMGB1A 가 얼마나 줄여 줄 수 있는지를 확인할 수 있다. 상기 표 2 및 도 9 를 보면 알 수 있듯이, TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포를 Balb/c 마우스의 왼쪽 신장막에 이식을 하게 되면, 이식된 췌도 세포의 생존율이 일반 췌도 세포의 이식에 비하여 약 2 배 정도 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 이식 후 6 시간째에 HMGB1 을 염색을 해본 결과, 일반 췌도 세포에서는 HMGB1 의

염색이 이식된 췌도 세포 주변과 세포의 세포질에서 염색이 많이 된 반면에, TAT-HMGB1A 를 처리한 췌도 세포의 이식에서는 HMGB1 의 염색이 세포의 핵에서 염색이 된 것을 확인 할 수 있었다(참조: 도 10). 이는 TAT-HMGB1A 가 이식 후 일어나는 HMGB1 을 매개로 하는 염증반응을 상당히 줄여 줄 수 있음을 의미한다.

실시에 10: 췌도 세포 이외의 다른 세포인 췌장암세포에서의 TAT-HMGB1A 전달 확인

10-1. 췌장암 세포에서의 TAT-HMGB1A 생존율 측정

Mia PaCa-2 췌장 세포 주를 96 웰 플레이트에 1×10^4 으로 접종하였고, TAT-HMGB1A 를 농도 0, 5, 10, 15, 20 μM 로 24 시간동안 처리하였다. 그 후 CCK-8 로 세포의 생존율을 측정하였다.

10-2. TAT-HMGB1A 가 췌장암 세포의 증식(proliferation)에 미치는 영향 측정

Mia PaCa-2 세포를 96 웰 플레이트에 5×10^3 으로 접종하였다. TAT-HMGB1A 를 10 μM 로 처리하여 1 일, 4 일, 7 일째의 증식률을 측정하였다.

10-3. TAT-HMGB1A 의 췌장암세포로의 전달 확인

TAT-HMGB1A 를 Alexa 488 형광 염료로 컨쥬게이션하여 10 μM 로 24 시간 동안 처리하였다. 처리 후, 세포를 PBS 로 세척해주고 형광 이미지를 촬영하였다. 전달 효율을 측정하기 위하여 유동 세포 분석법(flow cytometry)을 이용하여 췌장암 세포에 전달된 TAT-HMGB1A 를 측정하였다.

Mia PaCa-2 세포는 췌장암의 대표적인 세포 주로 많은 양의 HMGB1 을 함유하는 것이 확인이 되었다. 우선 TAT-HMGB1A 의 전달이 췌장암 세포의 독성을 주는지를 알아 보기 위하여 TAT-HMGB1A 를 농도별로 처리를 해보았다. 도 11a 에서 보는 바와 같이 TAT-HMGB1A 를 농도별로 처리를 하여도 세포의 독성을 일으키지는 않았다. 또한 10 μM 의 TAT-HMGB1A 를 지속적으로 세포에 노출을 시켜 세포의 증식률을 측정 해본 결과 아무것도 처리하지 않은 세포와 비슷한 속도의 세포 증식이 일어나고 있음을 확인 할 수

있었다. TAT-HMGB1A 가 췌장암 세포에 효과적으로 전달이 되었는지를 알아보기 위하여 TAT-HMGB1A 를 Alexa 488 녹색 형광 염료와 결합을 시킨 후 동일한 농도로 췌장암 세포에 처리를 해본 결과, 대부분의 세포에서 녹색 형광이 나타나는 것을 알 수 있었고, 이를 통하여 TAT-HMGB1A 가 효과적으로 전달이 되었음을 알 수 있었다(참조: 도 11b). 유동 세포 분석법을 이용하여 전달 효율을 측정 해본 결과, 95% 이상의 단백질이 췌장암 세포에 전달이 되었음을 알 수 있었고, 이는 상당히 높은 수치의 결과 였다(참조: 도 11c).

10 실시예 11: 저산소증(hypoxia) 상태에서 췌장암세포에 남아있는 HMGB1 의 양 측정

HMGB1 분비 조건 환경에 놓인 췌장암세포에 대한 TAT-HMGB1A 처리 효과를 보기 위한 실험을 실시하였다. Mia PaCa-2 세포에 TAT-HMGB1A 를 처리하지 않은 대조군과 TAT-HMGB1A 를 10 μ M 로 24 시간 처리한 세포를 준비하였다. 저산소(hypoxia) 챔버에 각 그룹의 세포들을 넣고 저산소 조건(1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂)으로 6 시간 처리하였다. 각 그룹의 세포들을 용해시킨 후, 웨스턴 블랏을 시행하였다.

암세포들은 성장하는 과정에서 저산소 조건에 노출이 되게 되고, 이러한 저산소조건은 세포 괴사를 일으켜, 세포에서 HMGB1 의 분비를 촉진 시키게 된다. 이러한 현상을 측정해 보기 위하여 Mia PaCa-2 세포 주에 TAT-HMGB1A 를 처리하지 않은 그룹과 처리한 그룹에 저산소 조건을 6 시간 동안 노출을 하여 세포에 남아있는 HMGB1 의 양을 웨스턴을 이용하여 비교를 해보았다. 정상 산소 조건에서는 두 그룹에서 HMGB1 의 발현양이 차이가 없다는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만, 저산소 상태에 장시간 노출이 되면 세포 괴사가 일어나 세포로부터 HMGB1 이 지속적으로 분비가 되어 세포 밖 주변 환경으로 이동하게 되는데, TAT-HMGB1A 를 처리한 췌장암 세포에서는 세포 안에 전달된 TAT-HMGB1A 가 세포에서 분비되는 HMGB1 과 결합하여 HMGB1 의 세포 밖 분비를 억제 시키는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 웨스턴 블랏의 세포 밴드를 통해서 확인이 가능하다(참조: 도 12).

실시에 12: 또 다른 세포인 HUVEC 에 미치는 TAT-HMGB1A 의 영향

12-1. TAT-HMGB1A 가 미치는 세포의 생존율 측정

HUVEC 세포(LONZA, 한국) 4×10^4 개를 96 웰 플레이트에 접종하였다. TAT-HMGB1A 를 농도 0, 5, 10, 15, 20, 25 μM 로 24 시간 동안 처리하였다. CCK-8 을 통하여 세포 생존력을 측정하였다.

12-2. TAT-HMGB1A 의 HUVEC 세포 전달 확인

Alexa 488 컨쥬게이션된 TAT-HMGB1A 를 10 μM 의 농도로 HUVEC 세포에 24 시간 처리하였다. PBS 로 세척 후 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

TAT-HMGB1A 는 HUVEC 세포에서도 농도별로 처리를 하였을 시, 세포의 생존력에는 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다(참조: 도 13a). 또한, Alexa 488 염료를 TAT-HMGB1A 와 결합을 시킨 후, HUVEC 에 처리를 해보았을 때, TAT-HMGB1A 가 HUVEC 세포에도 전달이 가능하다는 것을 Alexa 488 형광을 통해서 알 수 있었다(참조: 도 13b). 유동 세포 분석법을 이용하여 HUVEC 세포로의 전달 효율을 측정을 해본 결과, 95% 이상의 단백질이 HUVEC 세포에 전달이 되었음을 알 수 있었고 이는 상당히 높은 수치의 결과였다(참조: 도 13c).

실시에 13: 세포 침투 분석

매트릭셀을 0.2 mg/ml 의 농도로 인서트(8 μm pore)에 24 시간 동안 코팅하였다. HUVEC 세포 4×10^5 개를 혈청 프리 배지(serum free media)를 이용하여 각 인서트에 옮겨 담았다. 바텀 라인(bottom line)에는 혈청 프리 배지에 VEGF(20 ng/ml), HMGB1(500 ng/ml), HMGB1(500 ng/ml) + TAT-HMGB1A(10 μM)로 각각 처리하였다. 인서트를 바텀(bottom) 용액과 함께 24 시간 동안 배양하였다. 세척 후, 4% 파라포름알데히드로 고정한 후, 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 30 분간 염색하였다. 침투하지 않은 세포를 제거 후, 사진 촬영을 실시하였다. 메탄올로 염색약을 녹인 후 540 nm 에서 흡광도 촬영을 하였다.

VEGF 는 대표적으로 HUVEC 세포를 활성화(activation)하는데 사용되는 것으로 본 발명에서는 양성 대조구(positive control)로 사용이 되었다. HMGB1 을 500 ng/ml 의 농도로 HUVEC 세포에 자극을 주면 VEGF 와 마찬가지로 HUVEC 세포의 세포 침투가 일어나는 것을 확인 할 수 있었다.

5 하지만 여기에 TAT-HMGB1A 를 섞어 주게 되면 이러한 HMGB1 의 효과를 감소시켜 세포 침투가 감소되는 것을 알 수 있었다(참조: 도 14). 이는 TAT-HMGB1A 가 HMGB1 에 경쟁적 길항제(antagonist)로 작용하여 생긴 결과로 여겨진다.

10 실시예 14: 래트 대동맥 고리(aortic ring) 분석

48 웰에 매트릭젤(환원형) 120 μ l 를 넣고 겔화시켰다. SD-래트에서 대동맥 고리(aortic ring)를 추출하여 48 웰 매트릭젤 위에 삽입시켰다. 매트릭젤 100 μ l 를 넣고 다시 겔화시켰다. 혈청 프리 배지에 무 첨가제(no additive), HMGB1(500 ng/ml), HMGB1(500 ng/ml) + TAT-HMGB1A(10 μ l)를

15 각각 넣어 준 후 6일간 관찰하였다.

래트 대동맥 고리 분석 결과 HMGB1 500 ng/ml 의 처리는 대동맥 고리 주변에 미세 혈관의 형성이 매우 많이 일어난 것을 확인 할 수 있었다(참조: 도 15a). 이는 HMGB1 이 미세 혈관의 형성을 촉진 시킨다고 말할 수 있으며, 이는 HMGB1 이 신생 혈관 생성(angiogenesis)의 중요한

20 작용을 한다고 할 수 있다. 이때, HMGB1 에 TAT-HMGB1A 처리를 하게 되면, 미세혈관(microvessel)이 매우 적게 형성 되는 것을 확인 할 수 있었다. 위 사진의 데이터를 정량화 시켜본 결과, HMGB1 을 처리한 경우 대조구와 TAT-HMGB1A 를 처리한 그룹보다 미세 혈관의 형성에 있어서 대략 3 배 정도 증가된 수치를 보이는 것을 알 수 있었고, 이는 통계적으로 분석해본 결과

25 유효성이 있는 것으로 나타났다(참조: 도 15b).

실시예 15: HMGB1 의 처리에 따른 HUVEC 세포 내에서의 HMGB1 의 발현 변화

HUVEC 세포를 혈청 프리 배지 조건에서 6 시간동안 영양 공급 차단(starvation) 시켰다. HMGB1 500 ng/ml 의 농도를 HUVEC 세포에 24 시간

30 처리한 그룹과 TAT-HMGB1A 10 μ M 을 섞어주어 24 시간 동안 처리한 후,

세포 용해를 통해 웨스턴 샘플링하였다. HMGB1 항체를 통해서 웨스턴 블랏을 시행하였다.

HUVEC 을 혈청 프리 배지 상태에서 6 시간 동안 영양 공급 차단(starvation) 시키면, HMGB1 의 발현이 사일런싱(silencing)되어 그 발현의 양이 상당히 줄어들게 된다. 하지만 HMGB1 을 500 ng/ml 의 농도로 처리를 해주게 되면, HMGB1 의 자극에 의해서 HUVEC 에서 발현되는 HMGB1 의 발현이 증가가 되어 웨스턴 블랏에서 보이는 HMGB1 의 밴드가 증가되는 것을 볼 수 있었다. 하지만, HMGB1 에 TAT-HMGB1A 를 처리를 하게 되면 이러한 발현 역시 억제가 되어 대조구 HUVEC 과 비슷한 수준의 HMGB1 이 검출되었다(참조: 도 16). 이를 통해서 TAT-HMGB1A 는 세포 내부의 HMGB1 의 세포 외부로의 방출을 억제하는 것 뿐만 아니라, 세포 외부의 HMGB1 의 자극에 의한 세포의 HMGB1 의 발현도 억제시킨다는 것을 알 수 있다. 이는 HMGB1 의 리셉터인 RAGE 나 TLR4 를 가진 세포에서 모두 같은 결과를 보일 것으로 예상된다. 대표적으로 채도 세포의 경우에도 HMGB1 의 리셉터를 가지고 있기 때문에 이에 해당이 될 것으로 판단된다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)를 유효성분으로 포함하는 세포 이식 거부반응 억제용 약제학적 조성물.

5

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 HMGB1A 는 PTD(protein transduction domain)가 추가적으로 결합된 것을 특징으로 하는 조성물.

10 【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 PTD 는 Tat, Hph1, 페네트라틴(Penetratin), 트랜스포탄(Transportan), VP-22, 양쪽 친매성 펩타이드(Amphipathic peptides), MPG, Pep-1, MAP, SAP, PPTG1, 양이온성 펩타이드(Cationic peptides), 올리고알기닌(Oligoarginine), hCT(9-32), SyrB 및 Pvec 으로

15

구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 PTD 는 Tat 인 것을 특징으로 하는 조성물.

20 【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 (a) 이식 전의 세포 전처리 및 (b) 세포가 이식된 객체(subject)에 대한 전신적 투여 중 적어도 하나에 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

25 【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 이식 전의 세포 전처리에 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

30

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 췌도세포, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 또는 유도만능 줄기세포(IPSC)인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 제 1 형 당뇨병, 제 2 형 당뇨병, 당뇨병성 만성 신질환, 백혈병, 재생불량성빈혈, 헌팅톤병, 뇌졸중, 척수손상 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병의 치료를 위한 것임을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 질병은 제 1 형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 조성물로 전처리된 세포를 포함하는 이식용 세포 조성물.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 상기 세포는 췌도세포, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 또는 유도만능 줄기세포(IPSC)인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 12】

HMGB1A(high mobility group box 1 A domain)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 (a) 이식 전의 세포에 전처리하는 단계 또는 (b) 세포가 이식된 객체(subject)에 대하여 전신적 투여하는 단계를 포함하는 세포 이식 거부반응 억제 방법.

【청구항 13】

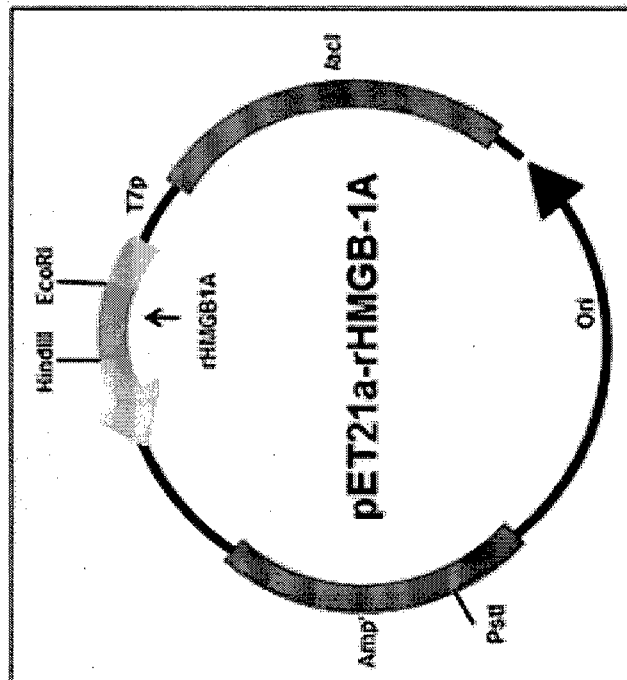
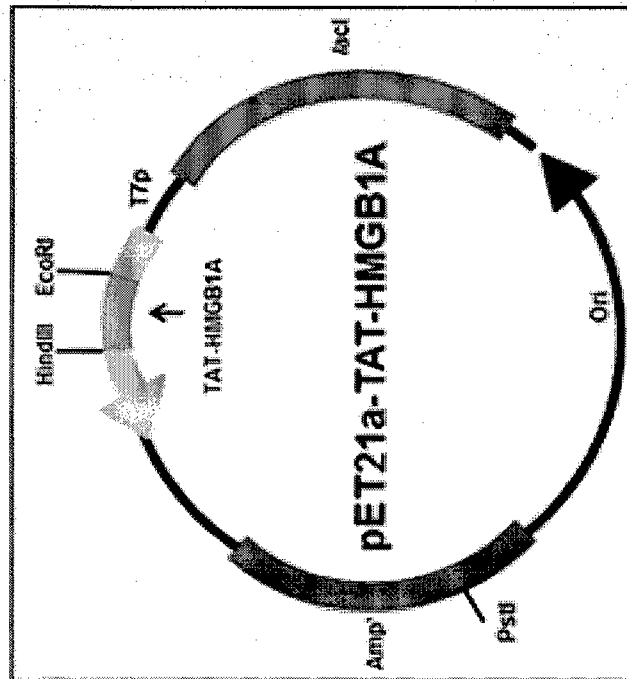
제 12 항에 있어서, 상기 HMGB1A 는 PTD(protein transduction domain)가 추가적으로 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제 12 항에 있어서, 상기 세포는 췌도세포, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 또는 유도만능 줄기세포(IPSC)인 것을 특징으로 하는 방법.

1/29

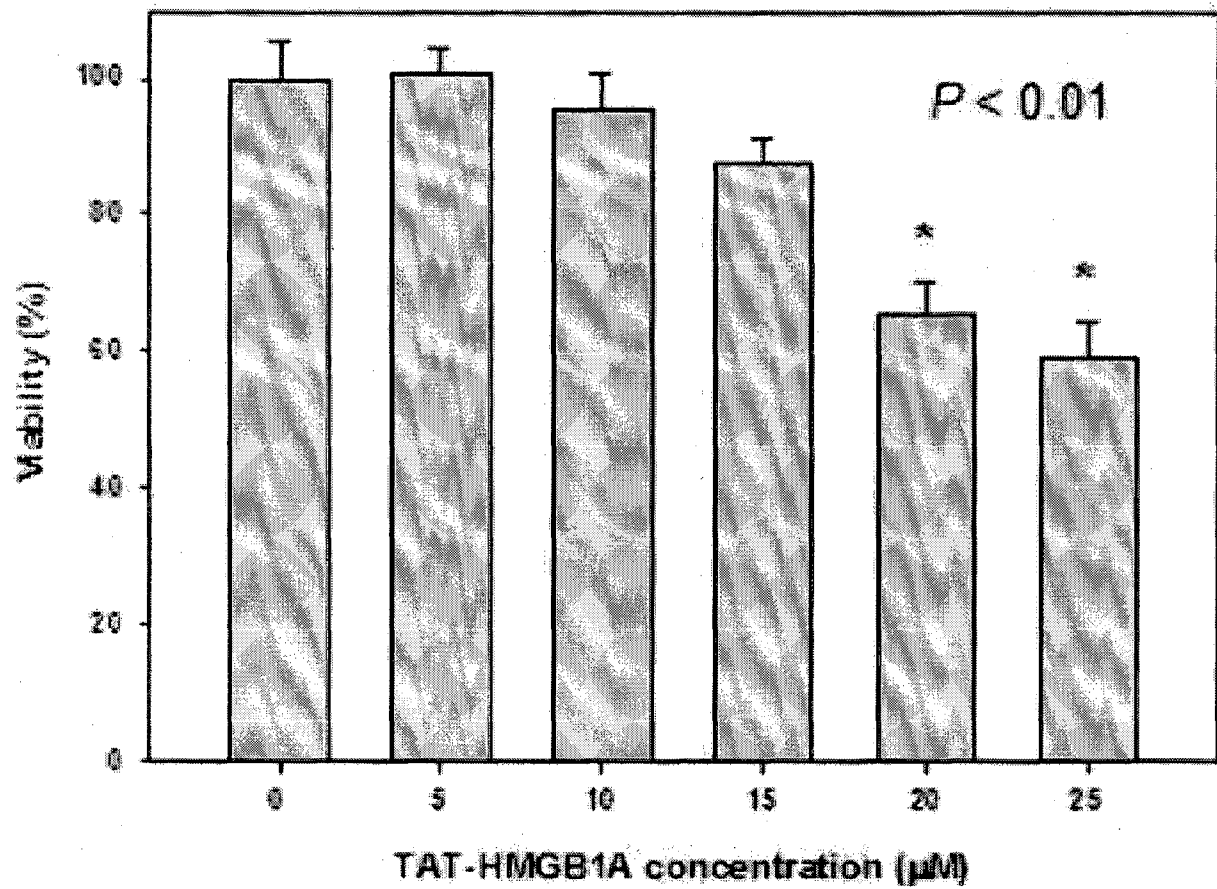
Figure 1



2/29

도 2a

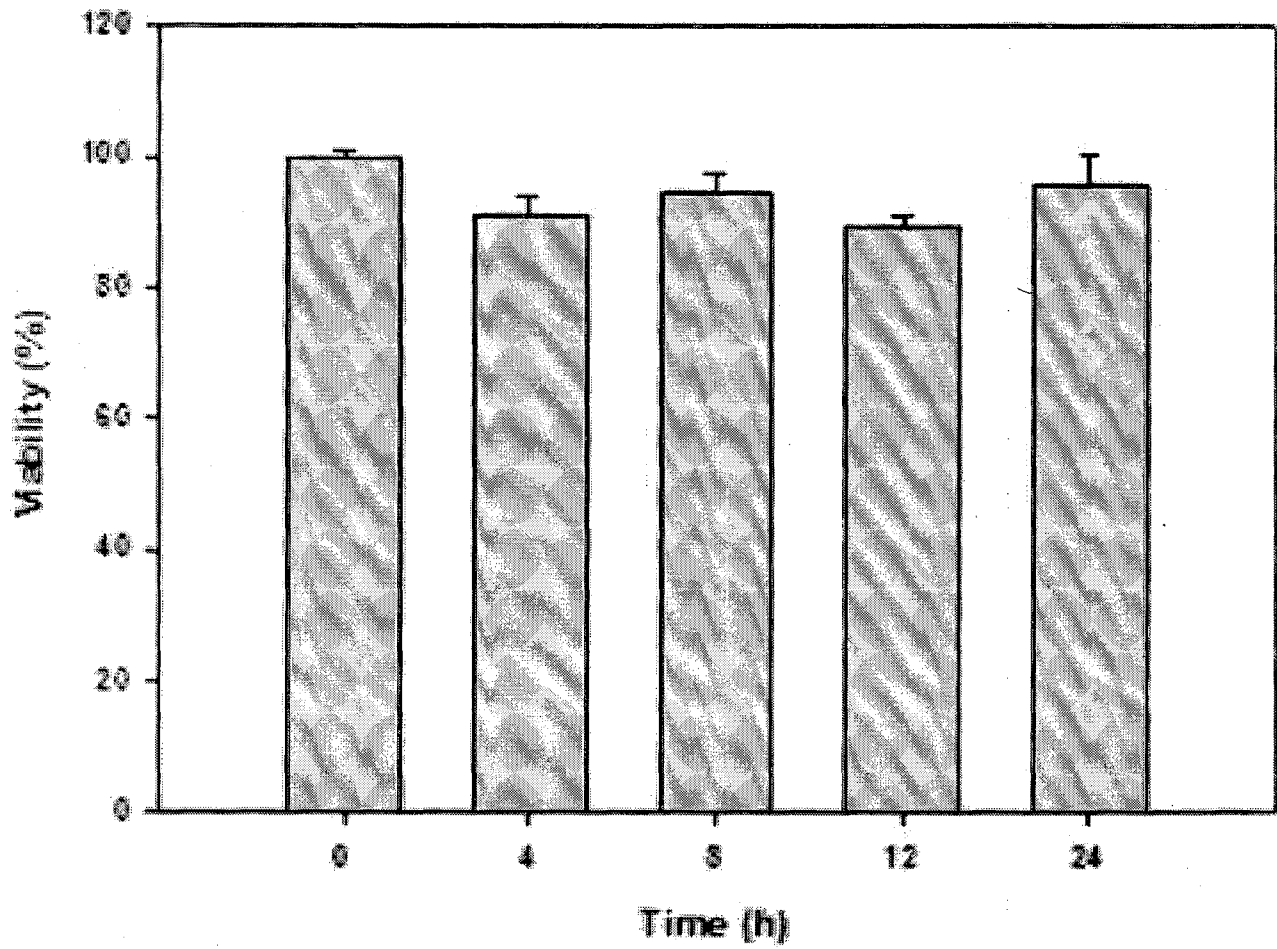
A



3/29

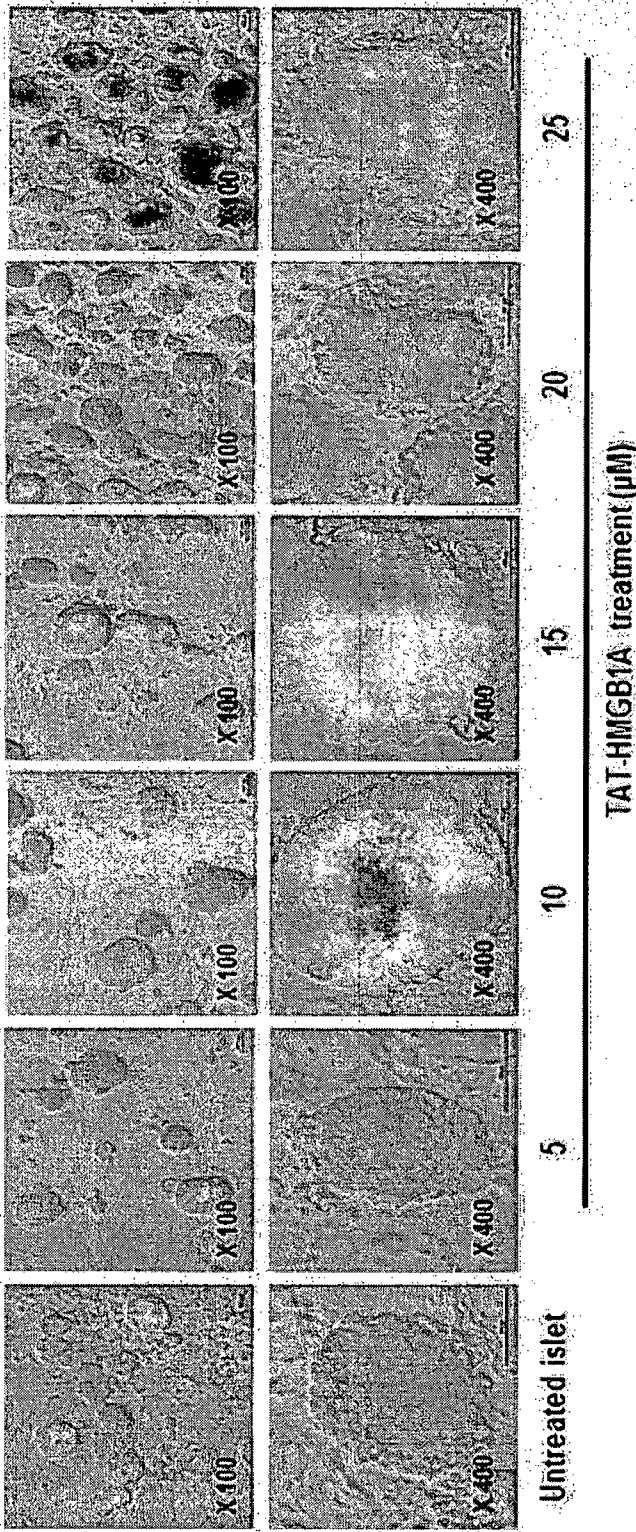
도 2b

B



4/29

도 2c



C

5/29

도 3a

A

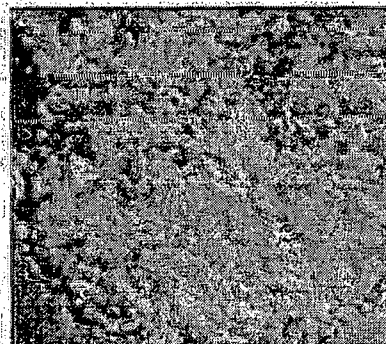
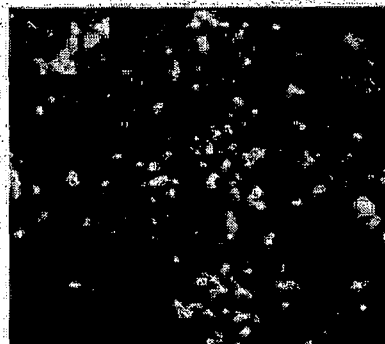
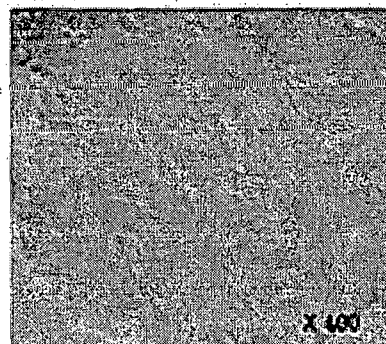
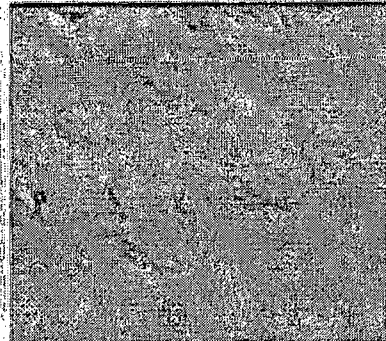
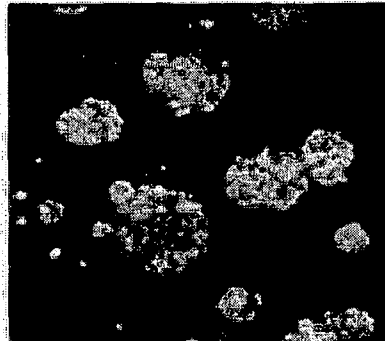
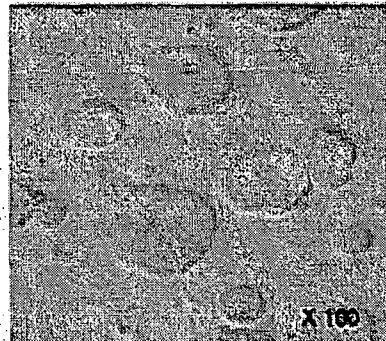
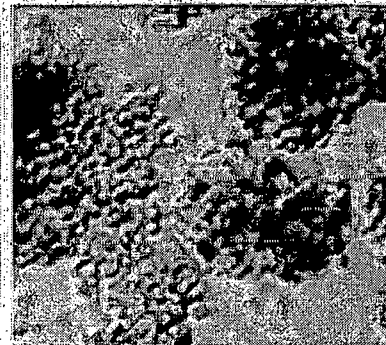
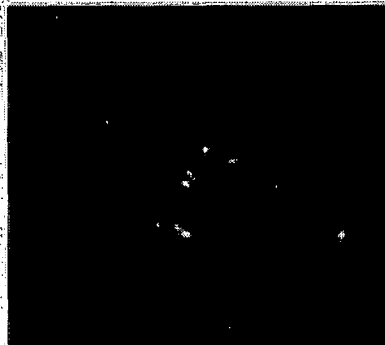
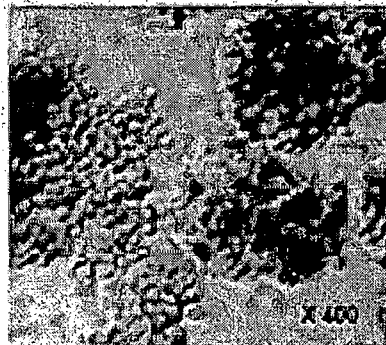
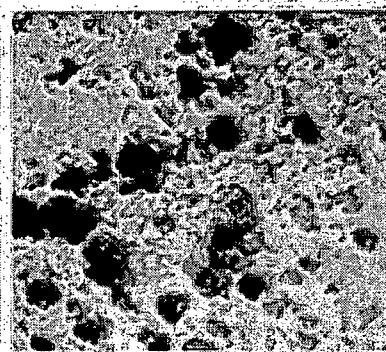
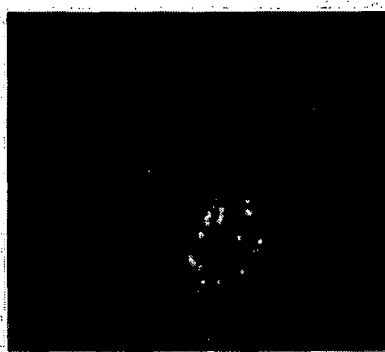
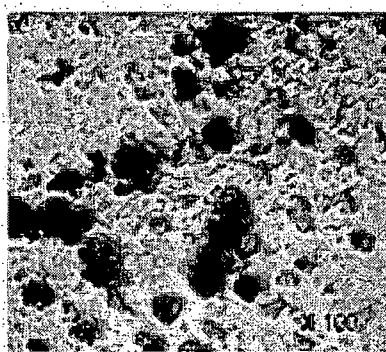
Optical

Alexa 488

Merge

Alexa Flour 488 labeled
HMGB1A treatment

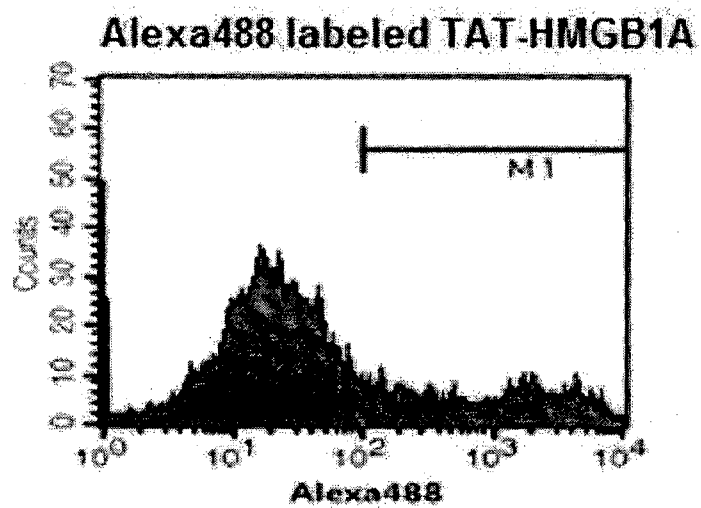
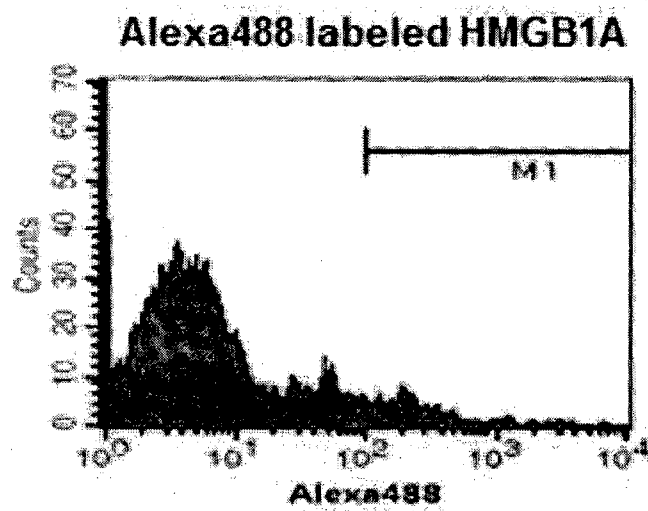
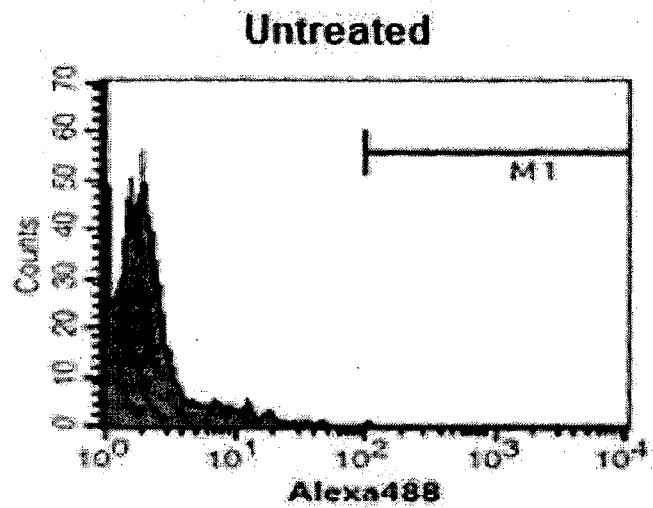
Alexa Flour 488 labeled
TAT-HMGB1A treatment



6/29

도 3b

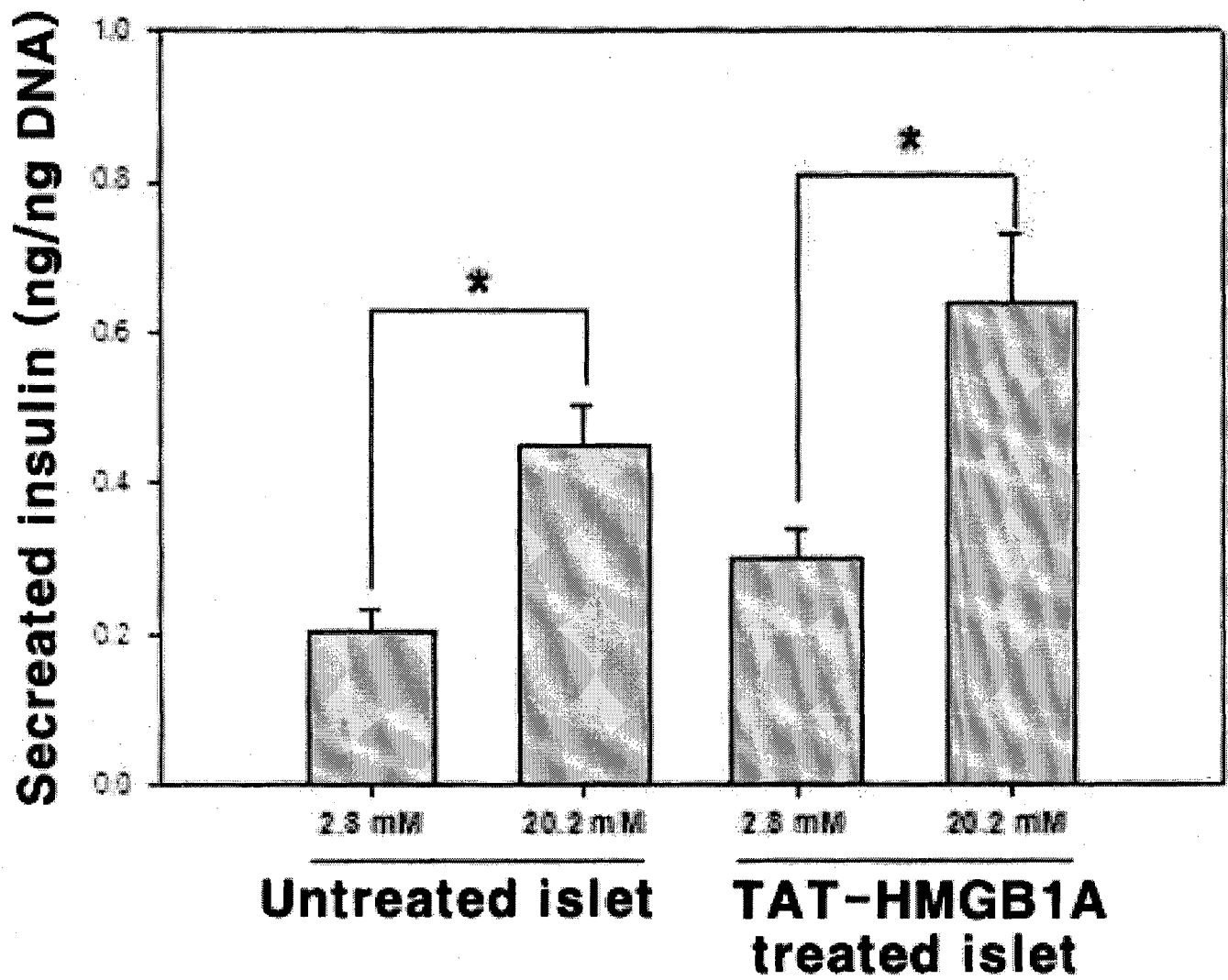
B



7/29

도 4a

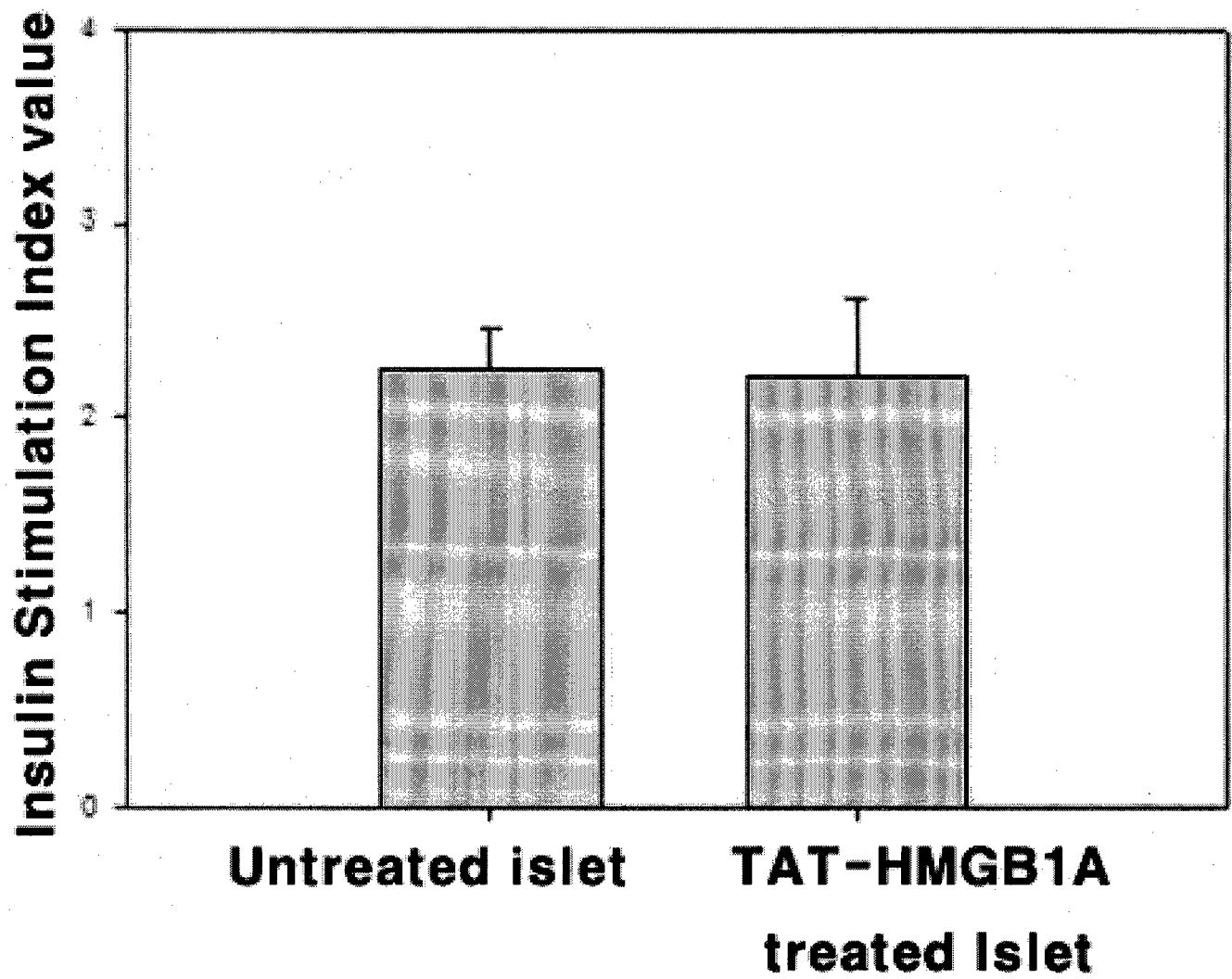
A



8/29

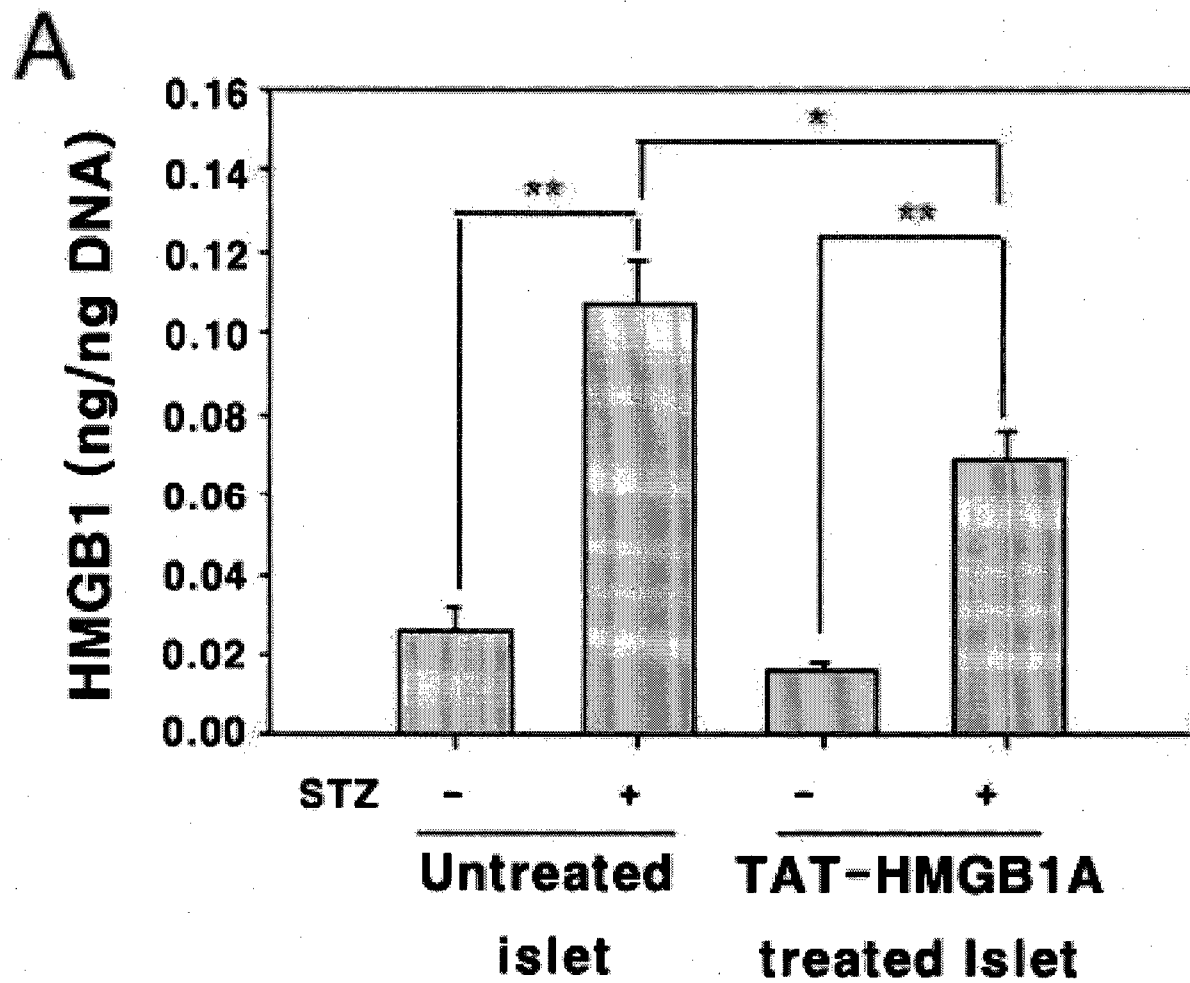
도 4b

B



9/29

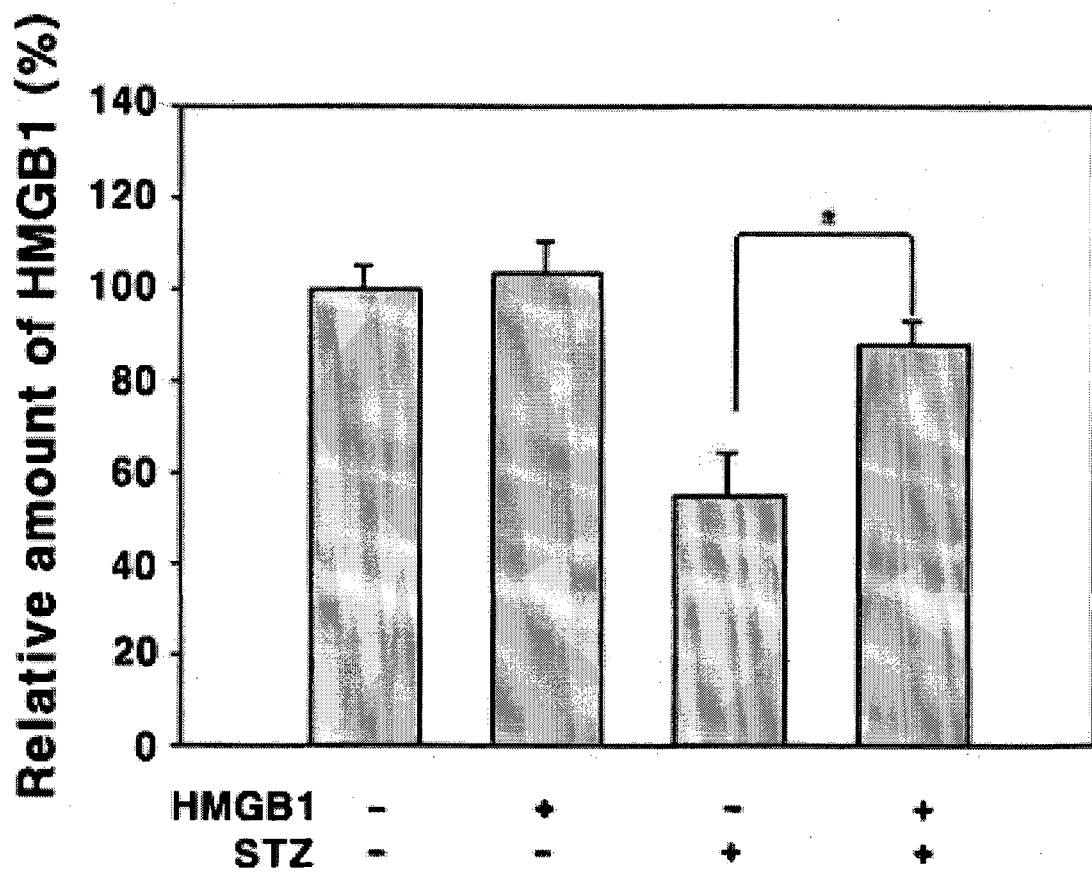
도 5a



10/29

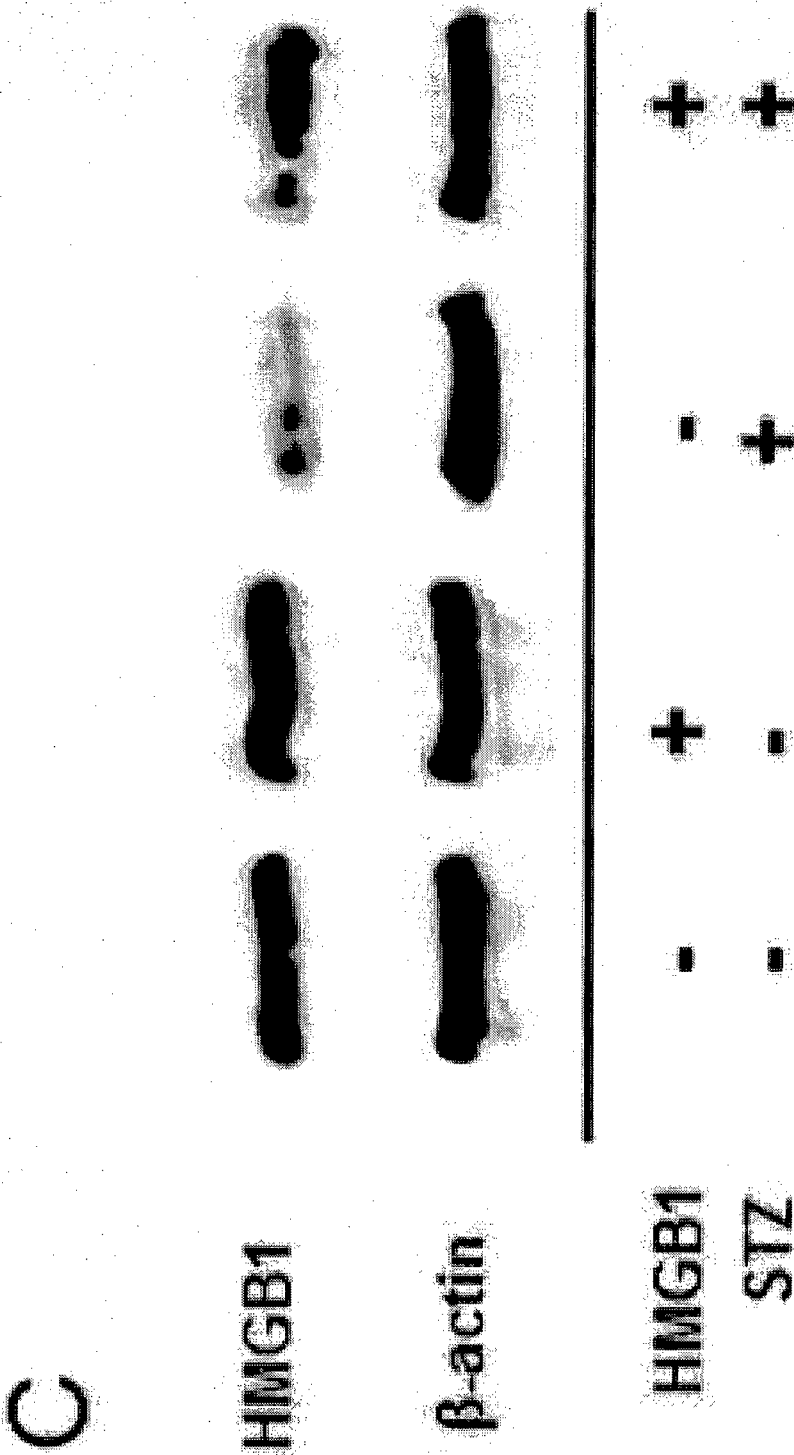
도 5b

B



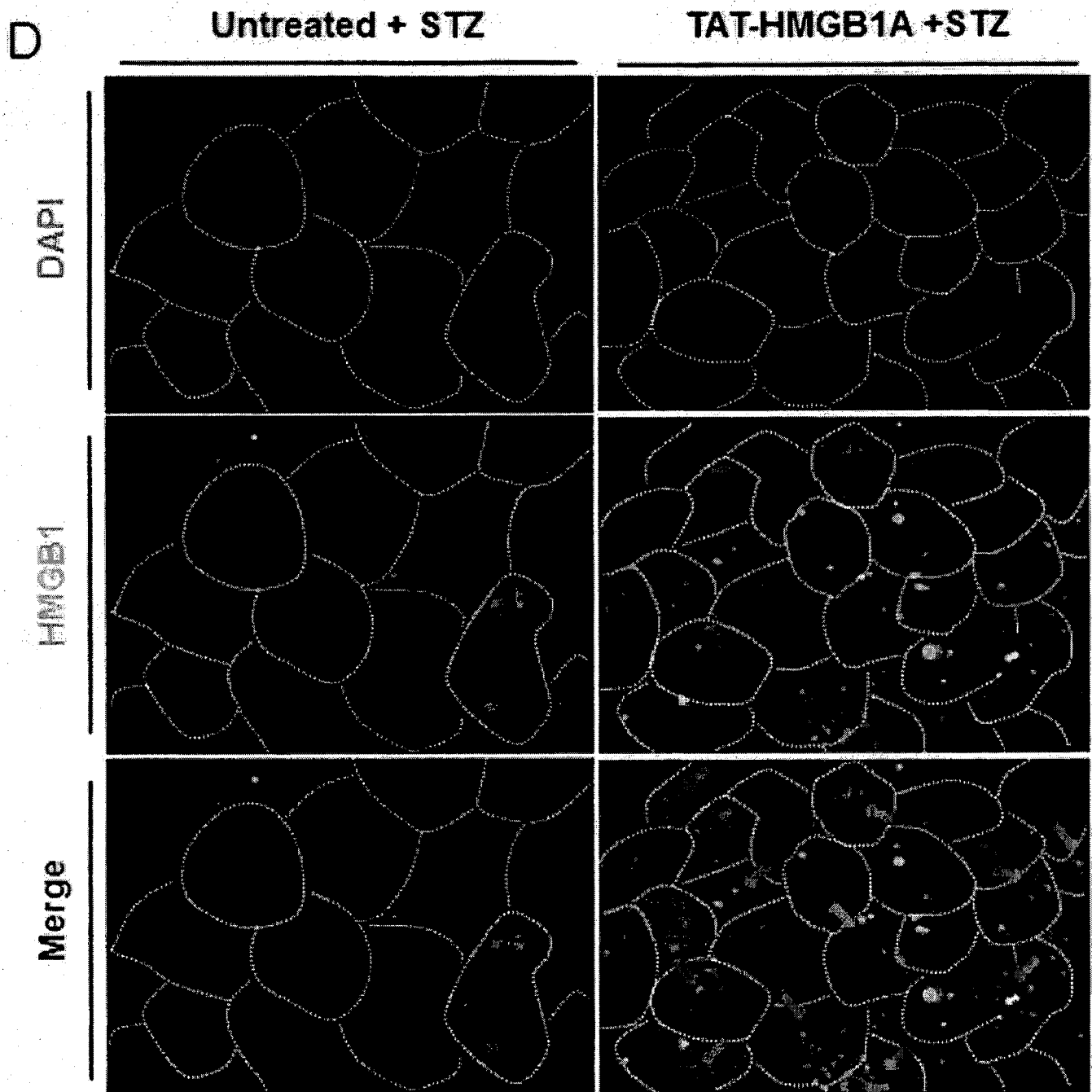
11/29

도 5c



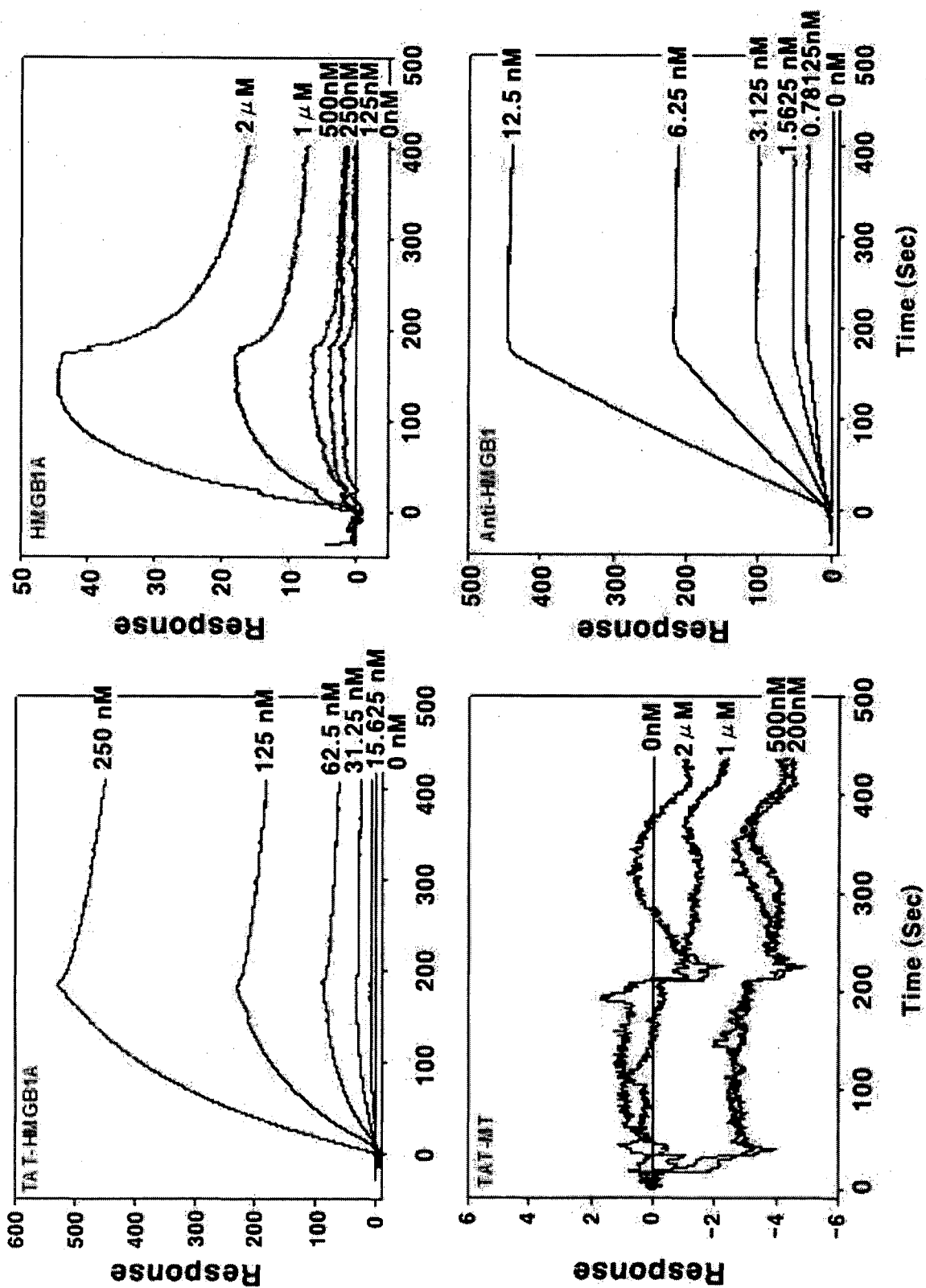
12/29

도 5d



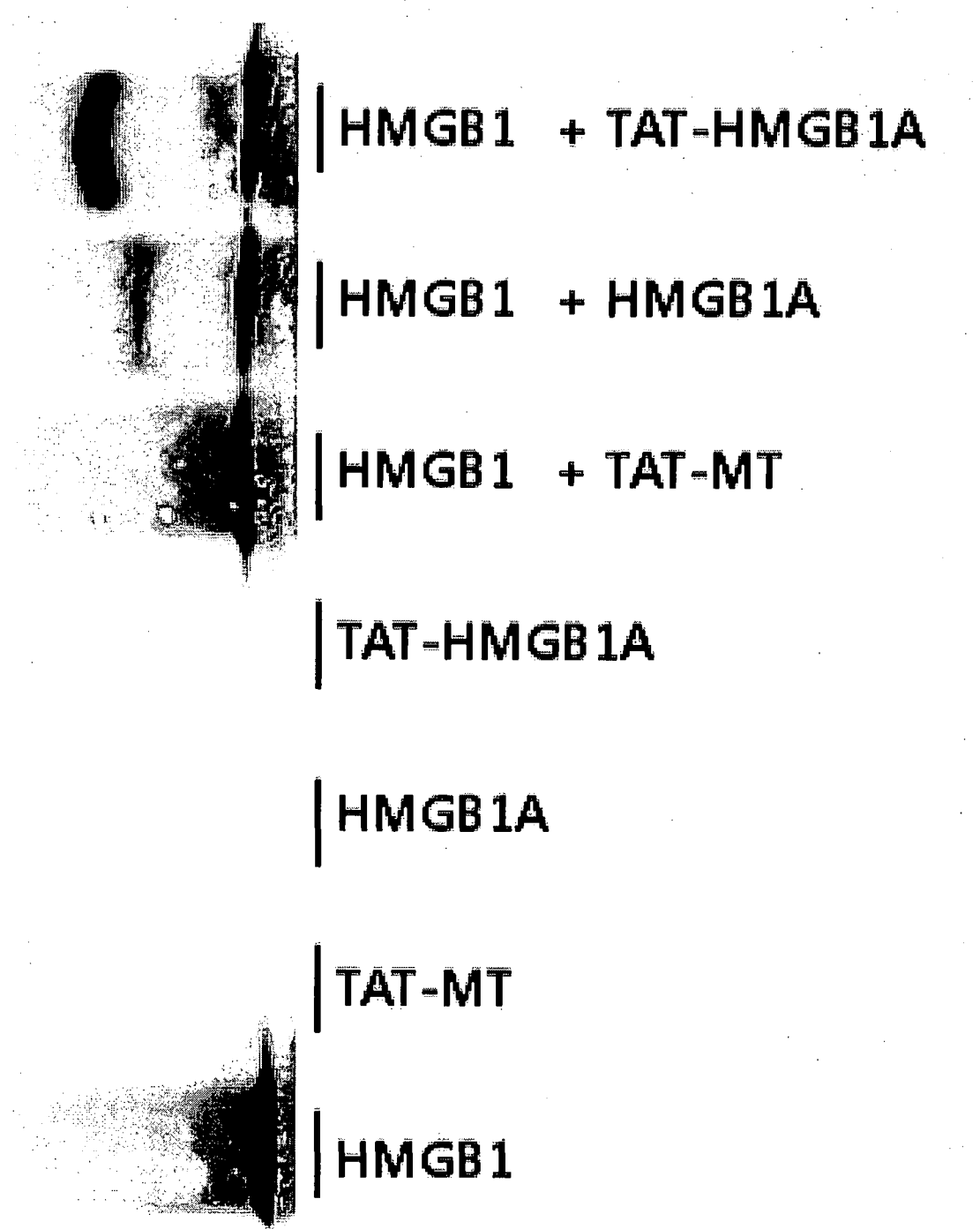
13/29

FIG 6



14/29

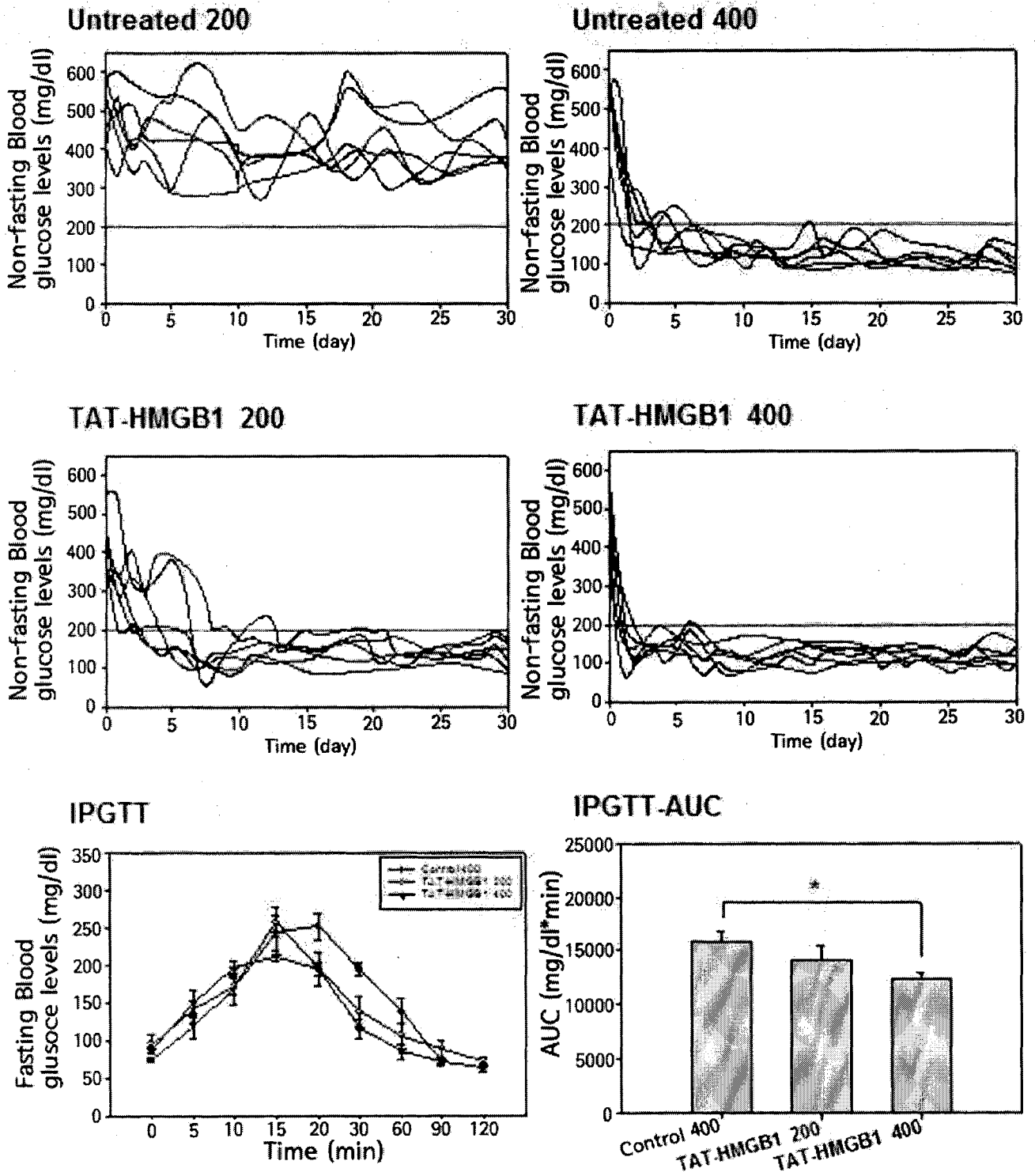
도 7



15/29

도 8a

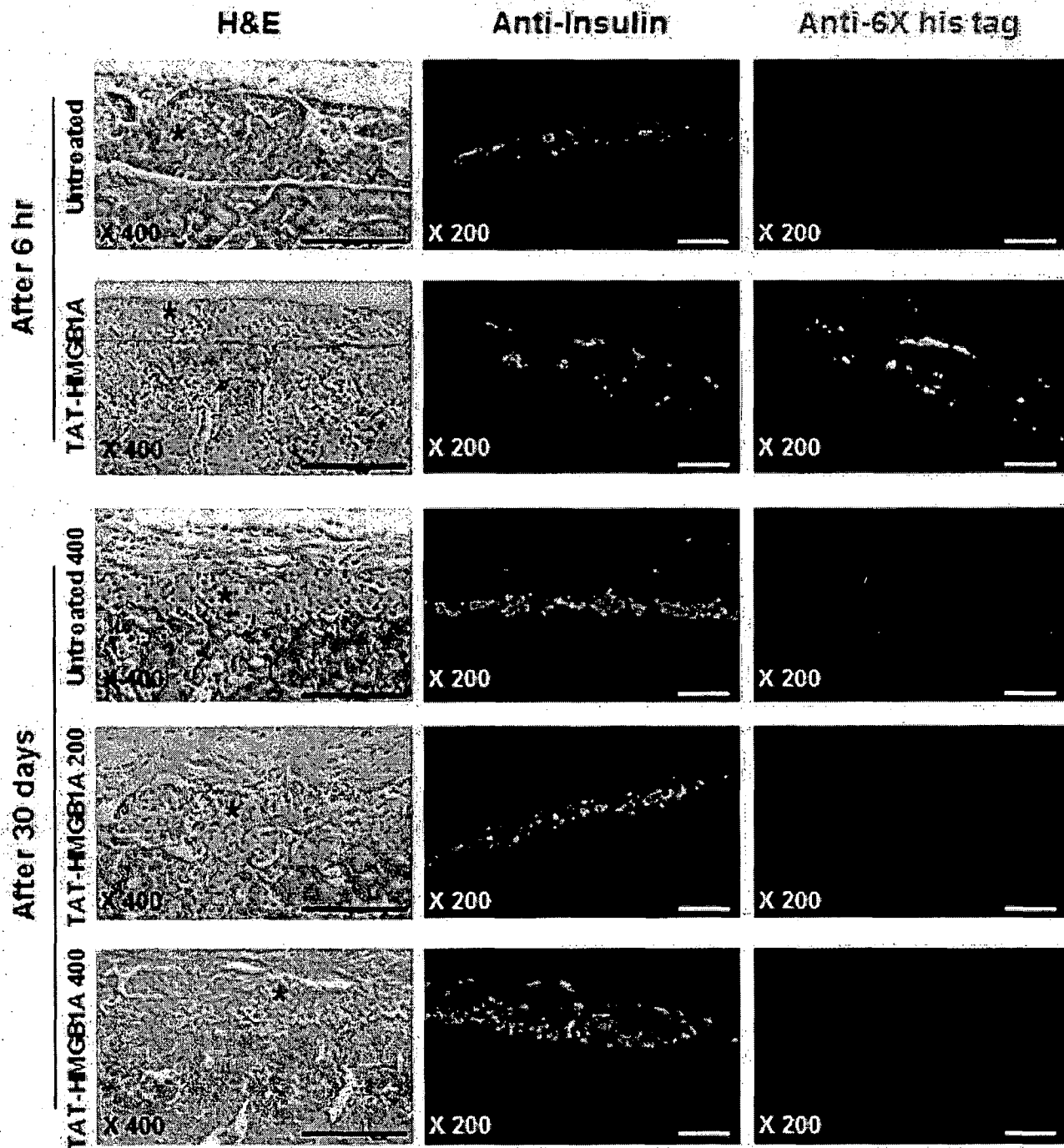
A



16/29

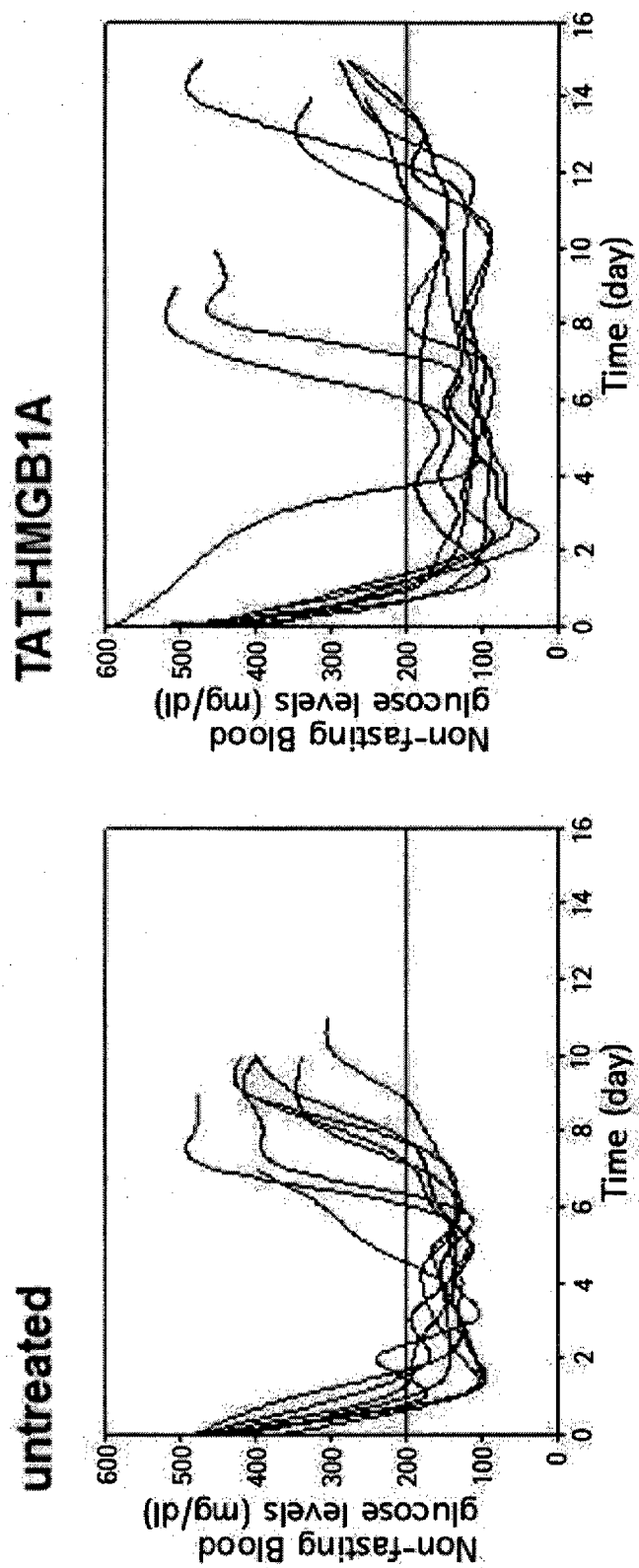
도 8b

B

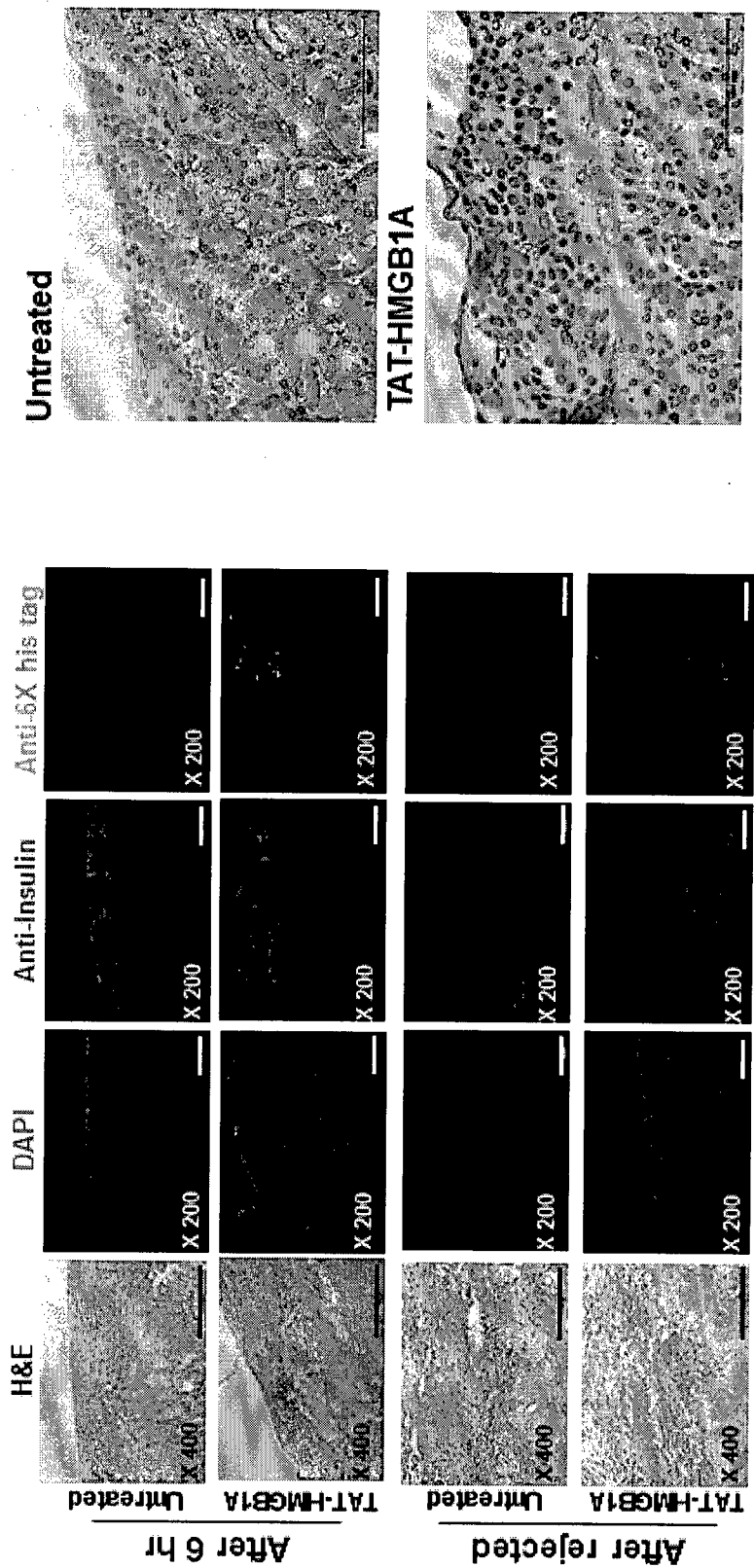


17/29

도 9

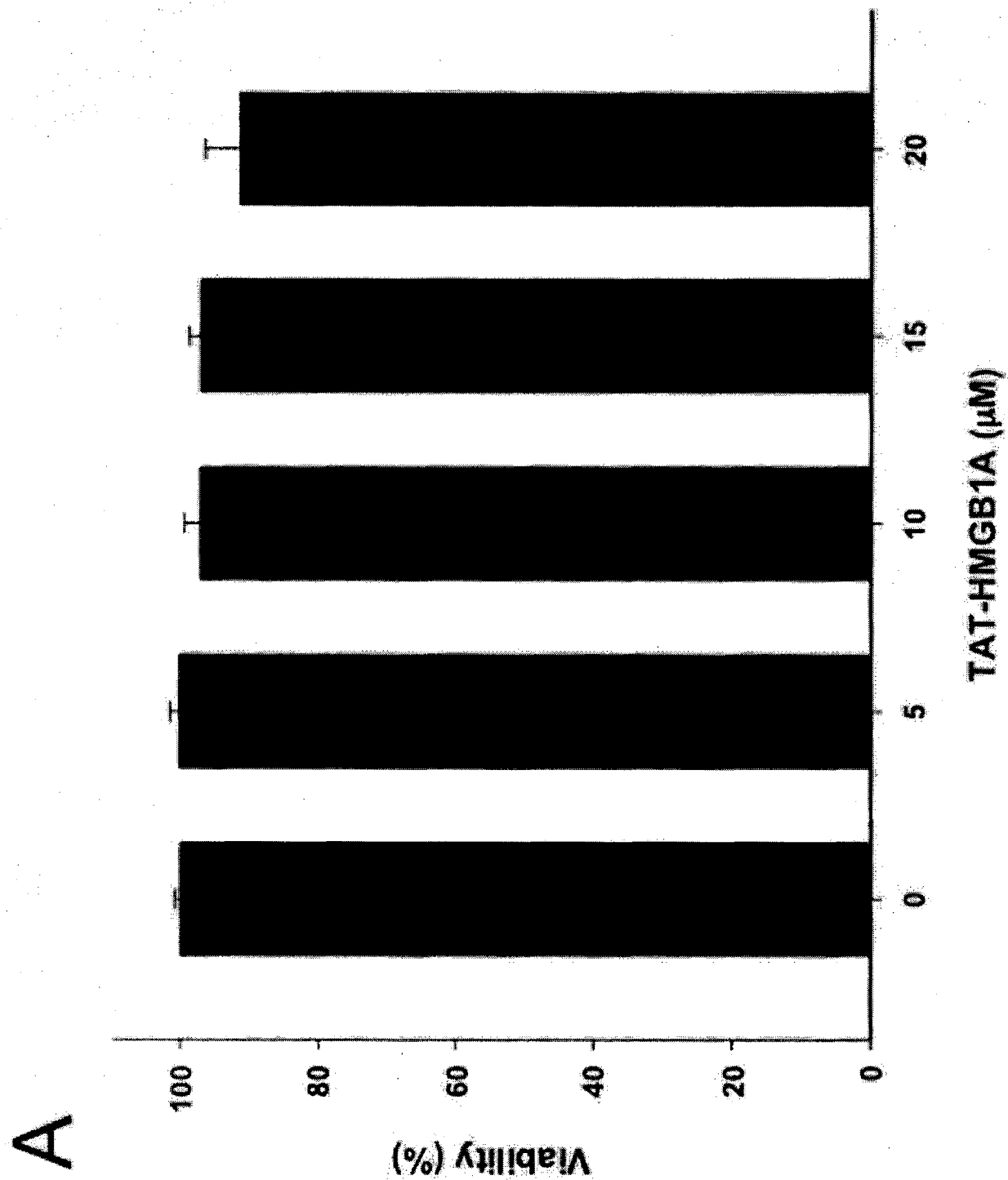


도 10



19/29

11a



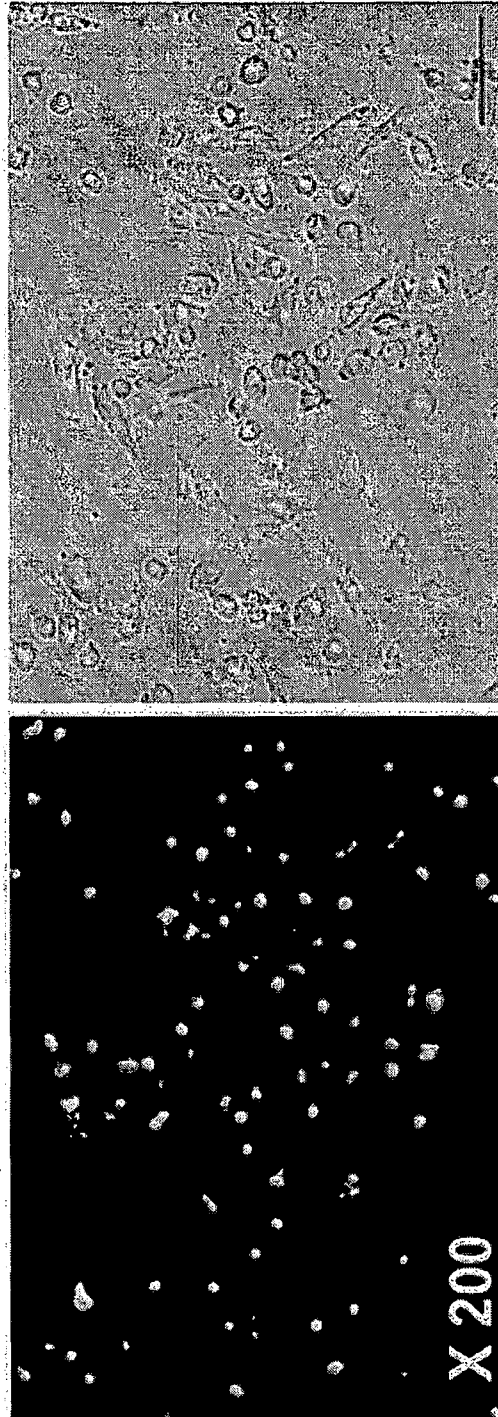
20/29

도 11b

B

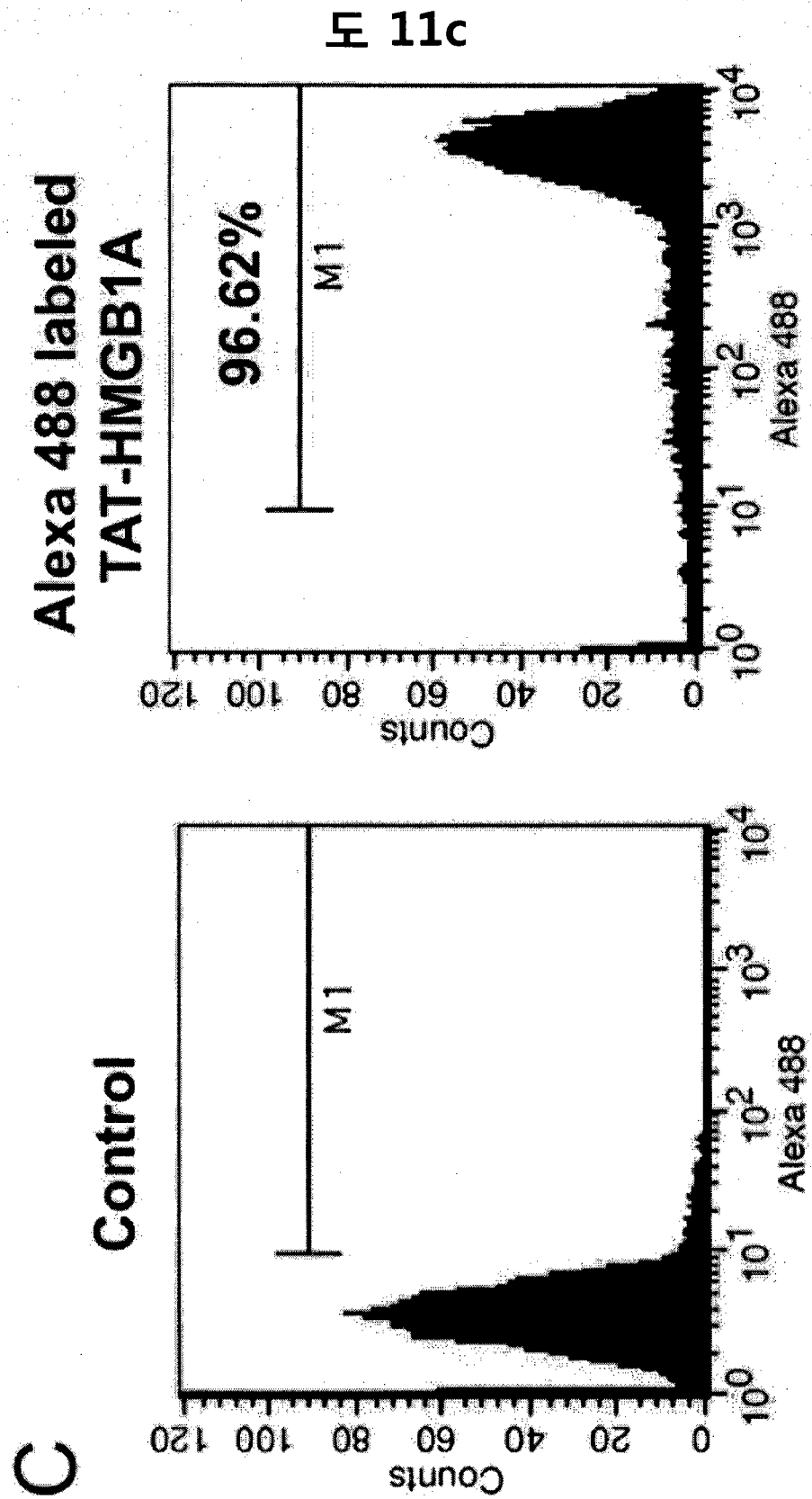
**Alexa 488 labeled
TAT-HMGB1A**

Optical Merge



X 200

21/29

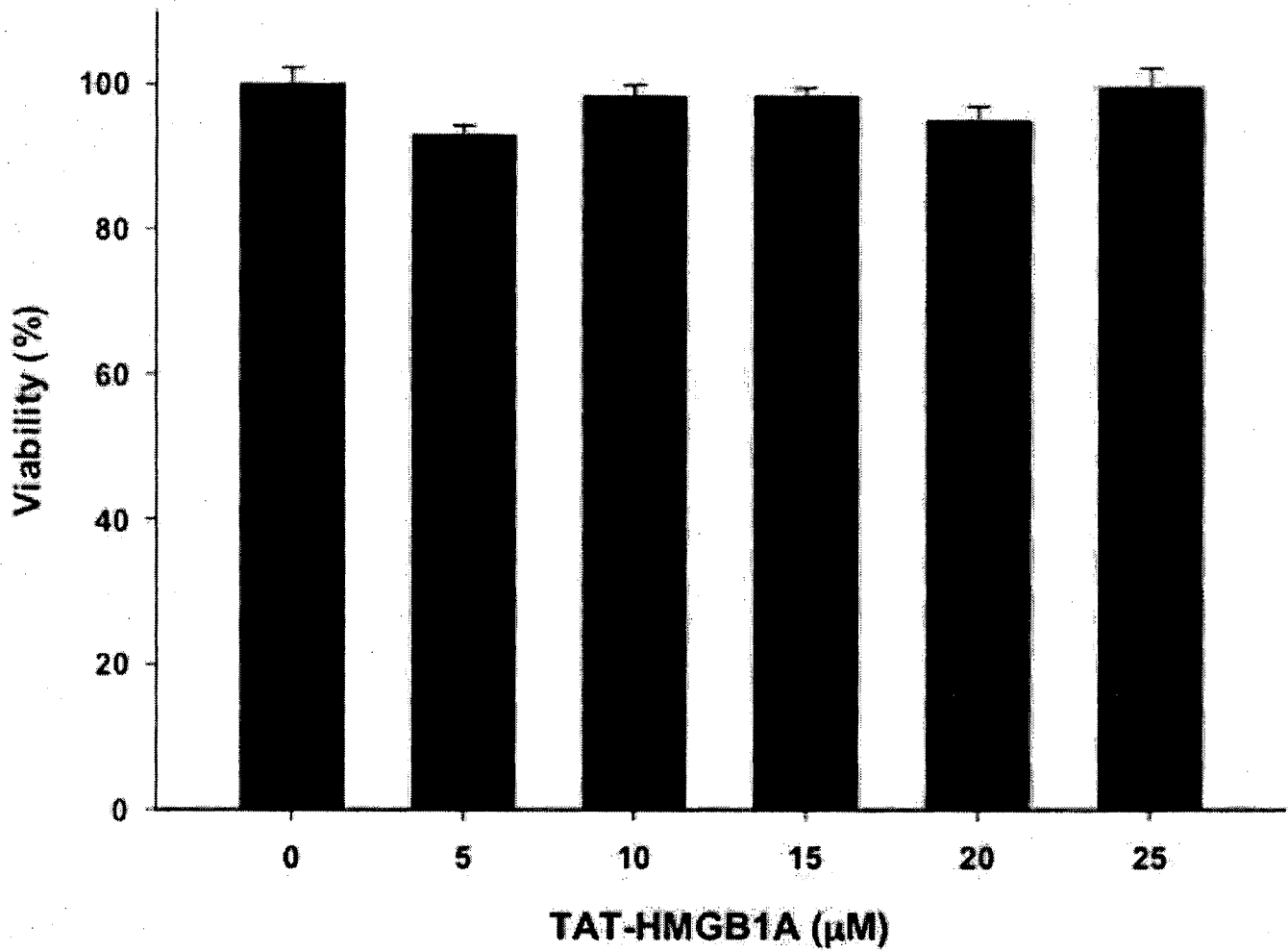


22/29

도 12



23/29

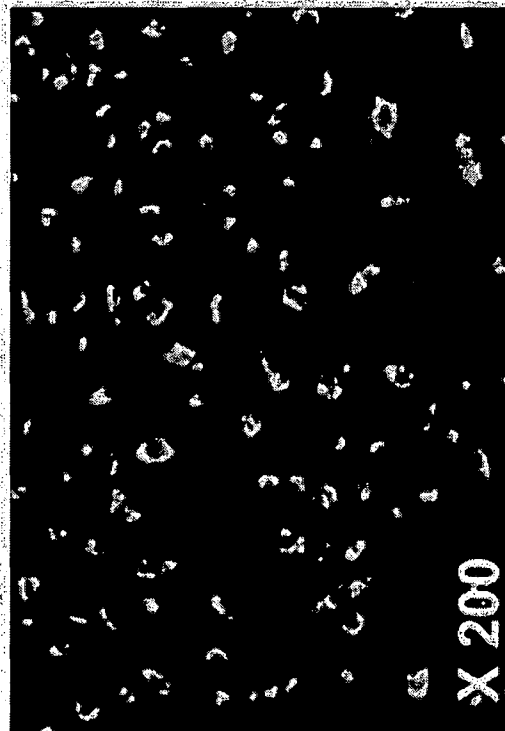
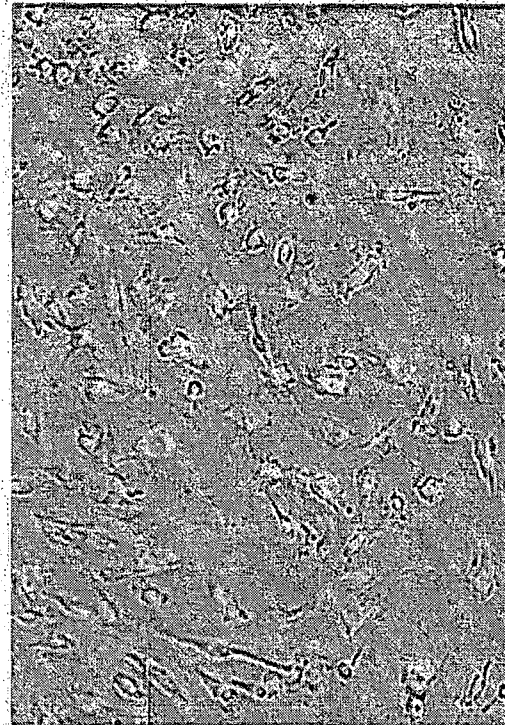
도 13a**A**

24/29

도 13b

Optical Merge

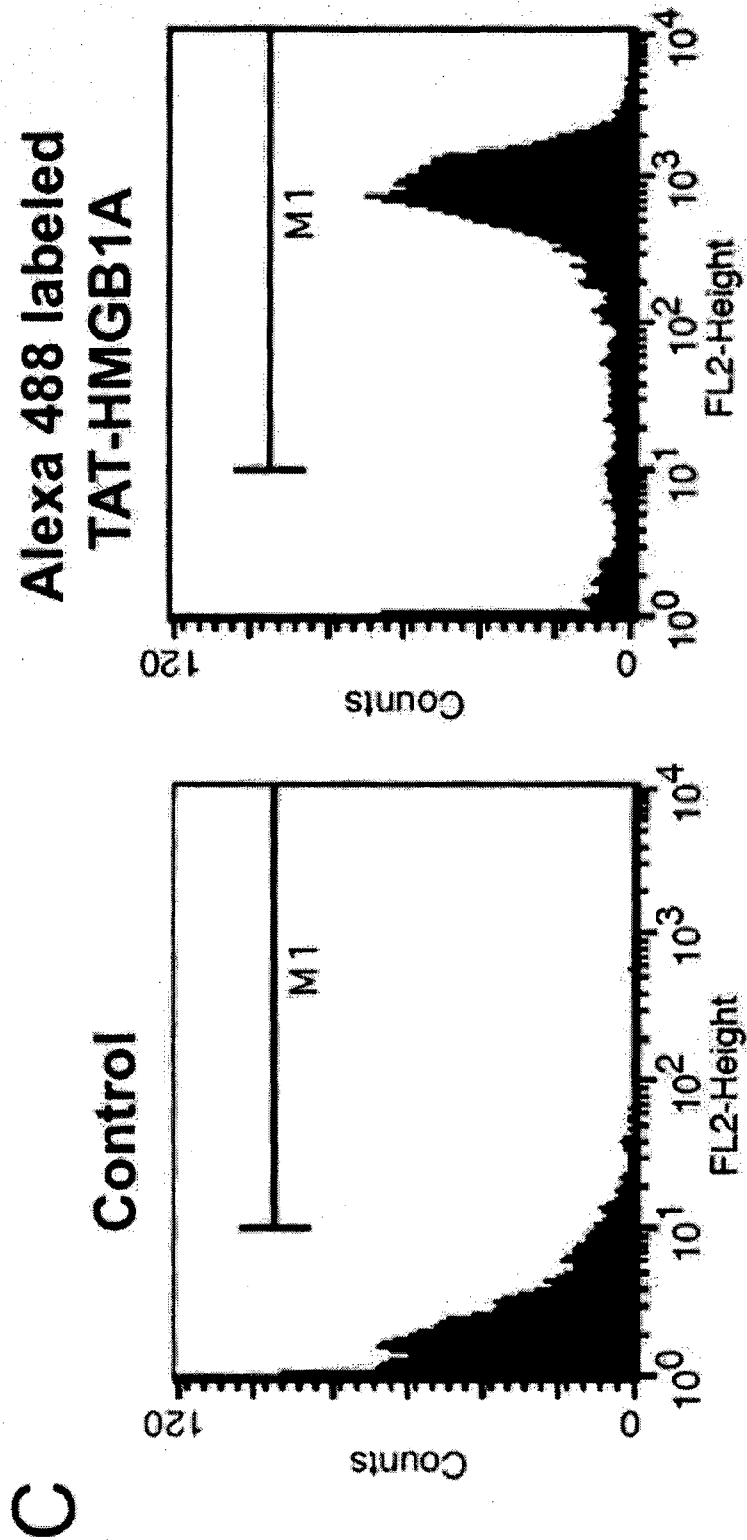
**Alexa 488 labeled
TAT-HMGB1A**



B

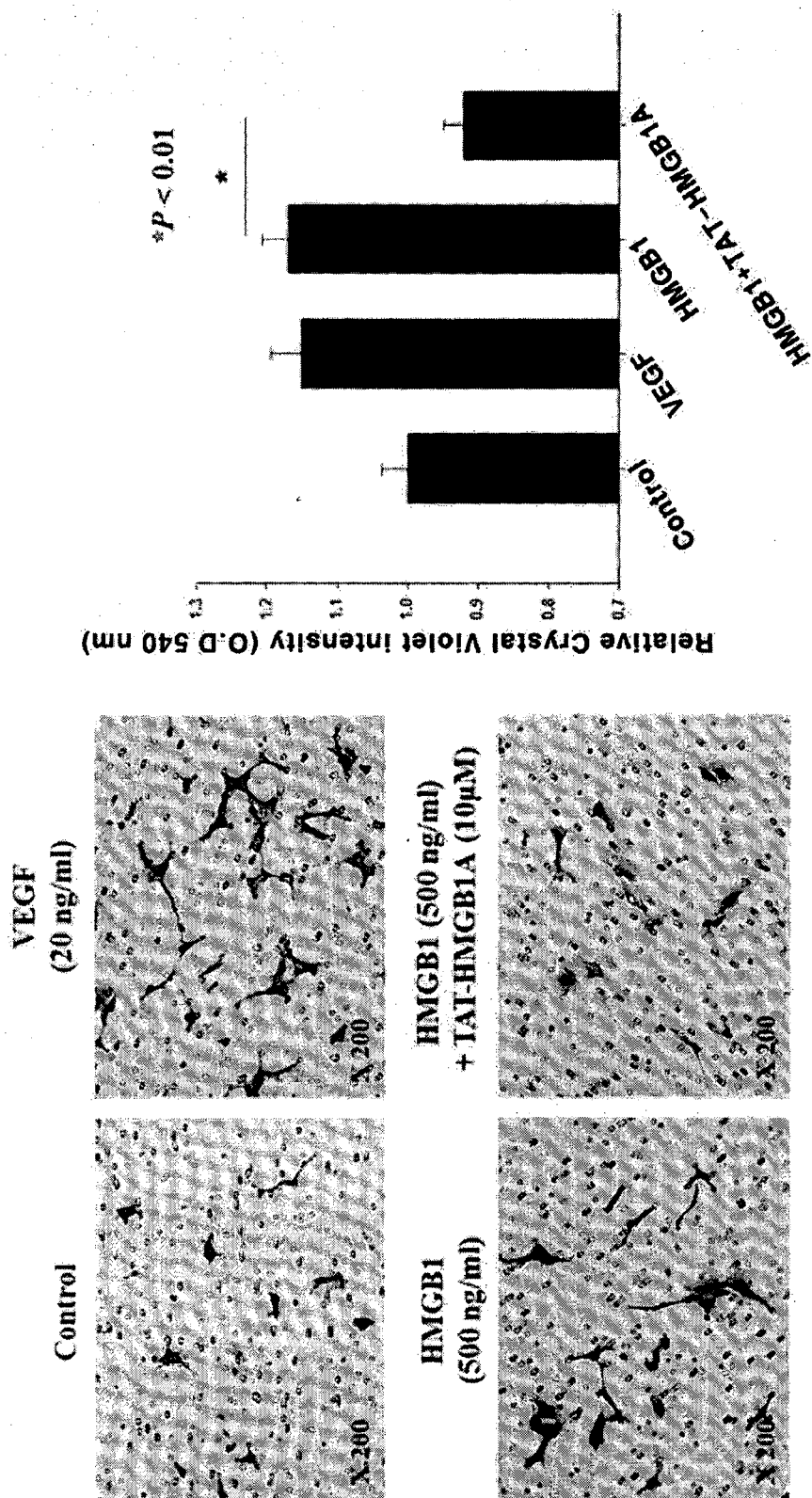
25/29

도 13c

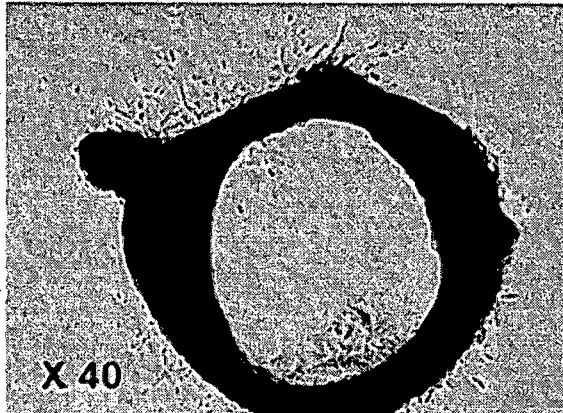
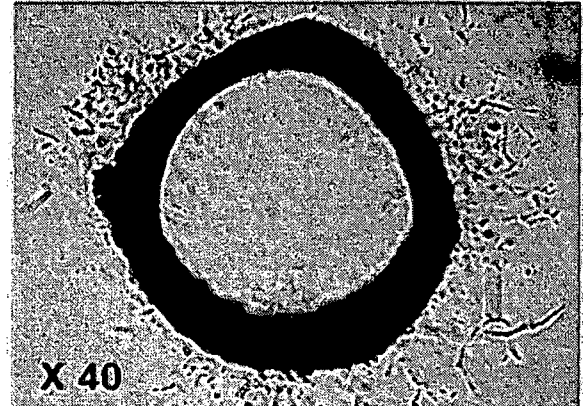
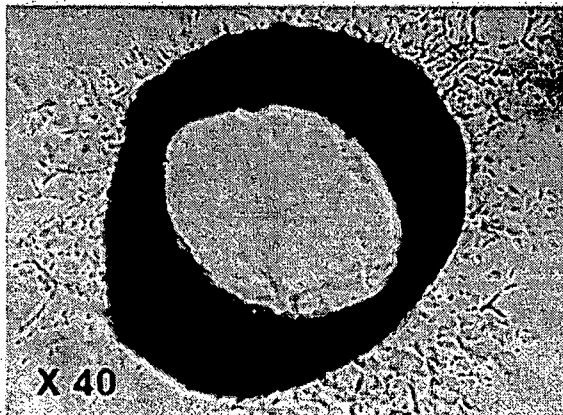
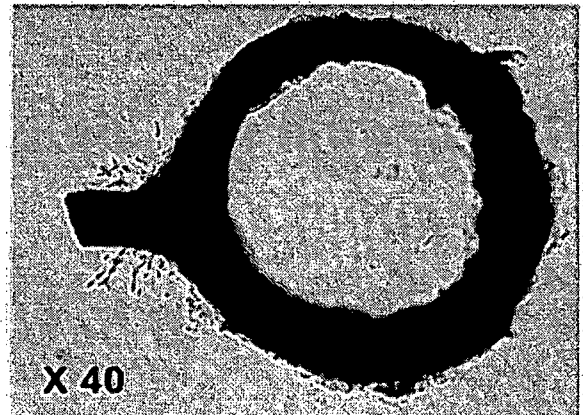


26/29

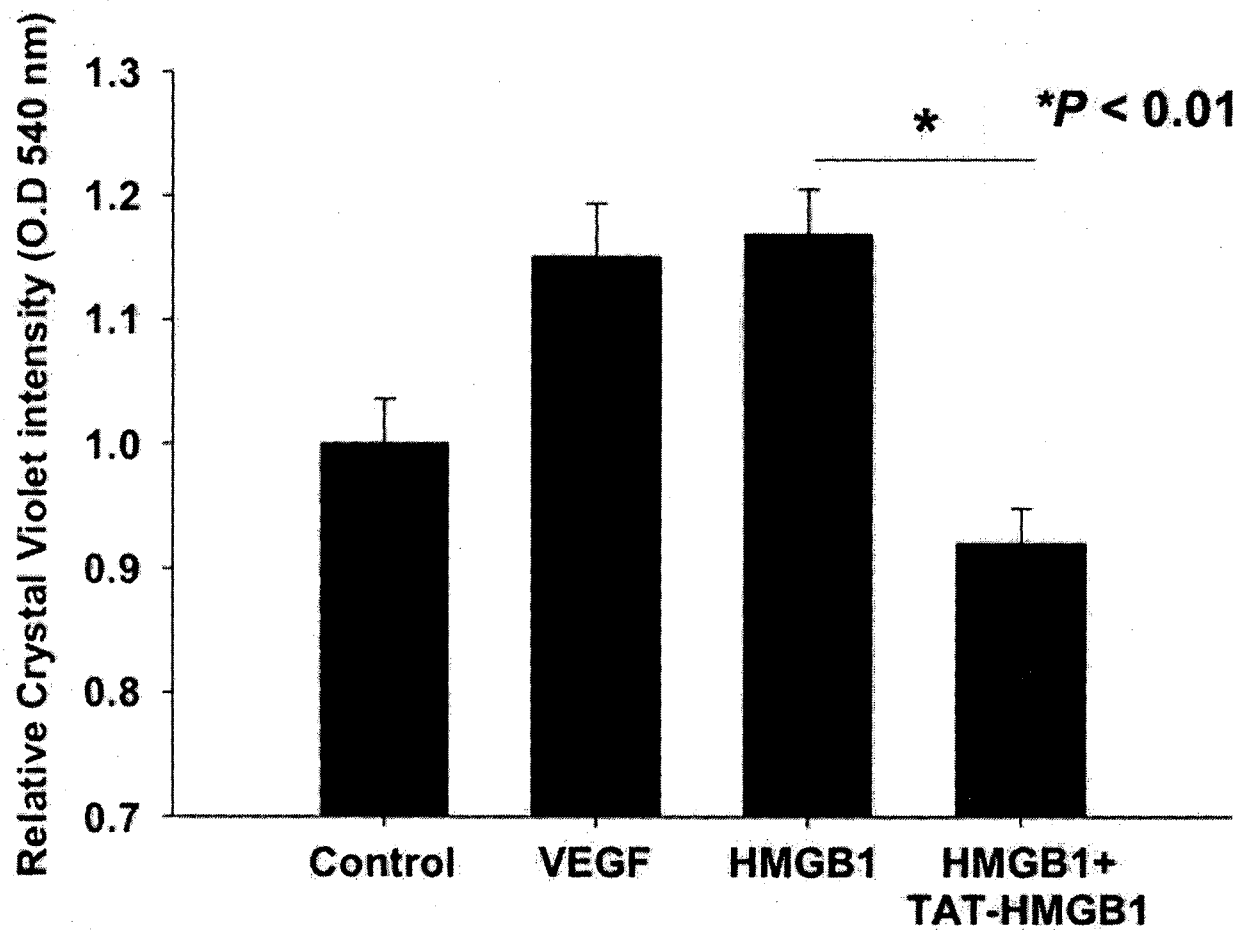
도 14



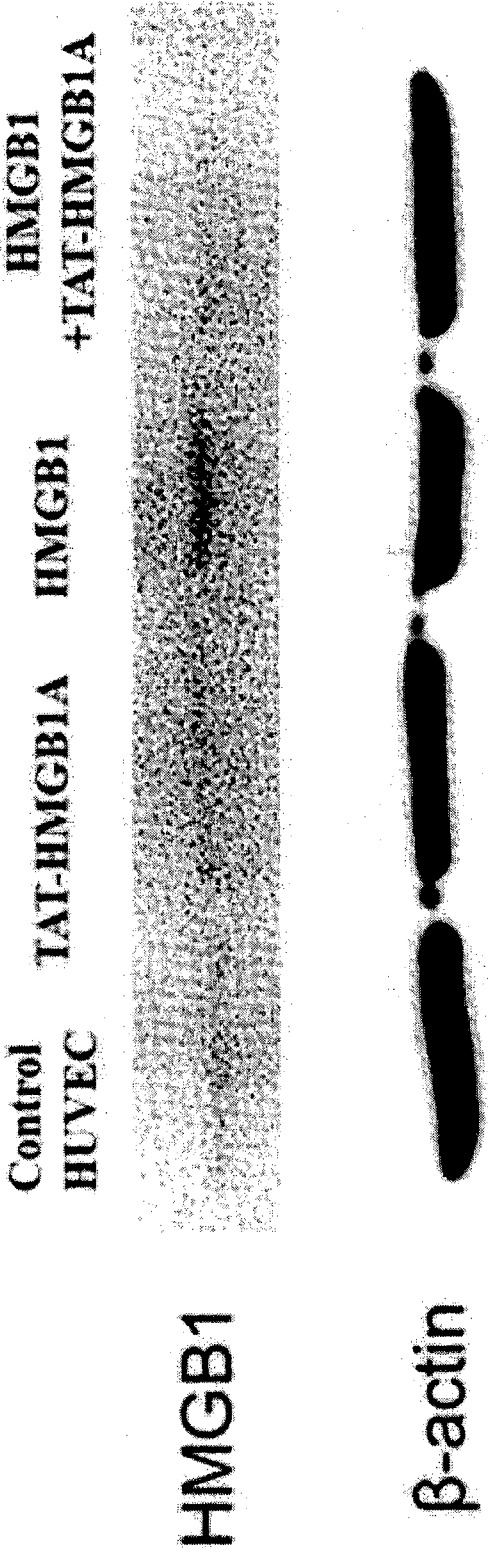
27/29

도 15a**A****Control****VEGF
(20 ng/ml)****HMGB1
(500 ng/ml)****HMGB1 (500 ng/ml)
+ TAT-HMGB1A (10μM)**

28/29

도 15b**B**

도 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004936**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 48/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00; A61K 31/7088; A61K 39/395; A61P 3/10; A61P 25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: HMGBA1, TAT, diabetes, islet transplant, graft rejection, HMGB1 inhibitor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUANG, Y. et al., "Extracellular Hmgb1 functions as an innate immune-mediator implicated in murine cardiac allograft acute rejection", American Journal of Transplantation, 2007, vol. 7, no. 4, pages 799-808 See abstract; and page 807.	1-11
A	KIM, B. et al., "Combination of TAT-HMGB1A and R3V6 amphiphilic peptide for plasmid DNA delivery with anti-inflammatory effect", Journal of Drug Targeting, Published online 15 May 2014, vol. 22, no. 8, pages 739-747 See abstract.	1-11
A	US 2013-0183348 A1 (TANIGUCHI, T. et al.) 18 July 2013 See abstract and claims 1-7.	1-11
A	KIM, K. et al., "Expression, purification and characterization of TAT-high mobility group box-1A peptide as a carrier of nucleic acids", Biotechnology Letters, 2008, vol. 30, no. 8, pages 1331-1337 See abstract.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 AUGUST 2015 (27.08.2015)

Date of mailing of the international search report

28 AUGUST 2015 (28.08.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004936

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HWANG, Y. H. et al., "Cytoprotection of xenotransplanted pancreatic islets using cellular delivery of tat-high mobility group box 1a fusion protein", In: Asian Federation for Pharmaceutical Sciences Conference, 2013, page 195 See the entire document. ※ The above document is a document declaring non-prejudicial lack of novelty by the applicant.	1-11
X	HWANG, YONG HWA et al., "Cellular Internalization of Tat-High Mobility Group BOX 1A Fusion Protein For Cytoprotection of Xenotransplanted Pancreatic Islets", In: 12th congress of the cell transplant society, 2013, pages 52, P-20 See the entire document. ※ The above document is a document declaring non-prejudicial lack of novelty by the applicant.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004936

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **12-14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 12-14 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004936

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0183348 A1	18/07/2013	EP 2617426 A1	24/07/2013
		EP 2617426 A4	30/04/2014
		JP 5686814 B2	18/03/2015
		WO 2012-036215 A1	22/03/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; A61K 31/7088; A61K 39/395; A61P 3/10; A61P 25/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: HMGBA1, TAT, 당뇨병, 체도 이식, 이식 거부 반응, HMGB1 저해제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HUANG, Y. 등, 'Extracellular Hmgbl functions as an innate immune-mediator implicated in murine cardiac allograft acute rejection', American Journal of Transplantation, 2007, 7권, 4호, 페이지 799-808 요약; 및 페이지 807 참조.	1-11
A	KIM, B. 등, 'Combination of TAT-HMGB1A and R3V6 amphiphilic peptide for plasmid DNA delivery with anti-inflammatory effect', Journal of Drug Targeting, 온라인 공개 2014.05.15, 22권, 8호, 페이지 739-747 요약 참조.	1-11
A	US 2013-0183348 A1 (TANIGUCHI, T. 등) 2013.07.18. 요약 및 청구항 1-7 참조.	1-11
A	KIM, K. 등, 'Expression, purification and characterization of TAT-high mobility group box-1A peptide as a carrier of nucleic acids', Biotechnology Letters, 2008, 30권, 8호, 페이지 1331-1337 요약 참조.	1-11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 08월 27일 (27.08.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 08월 28일 (28.08.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이정아

전화번호 +82-42-481-8740



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HWANG, Y. H. 등, ‘Cytoprotection of xenotransplanted pancreatic islets using cellular delivery of tat-high mobility group box 1a fusion protein`, In: Asian Federation for Pharmaceutical Sciences Conference, 2013, 페이지 195 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-11
X	HWANG, YONG HWA 등, ‘Cellular Internalization of Tat-High Mobility Group BOX 1A Fusion Protein For Cytoprotection of Xenotransplanted Pancreatic Islets’ , In: 12th congress of the cell transplant society, 2013, page 52, P-20 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-11

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 12-14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제12항 내지 제14항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및
규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를
요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된
기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2013-0183348 A1

2013/07/18

EP 2617426 A1

2013/07/24

EP 2617426 A4

2014/04/30

JP 5686814 B2

2015/03/18

WO 2012-036215 A1

2012/03/22