

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 11월 5일 (05.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/167062 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01) A61L 27/38 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/004364
- (22) 국제출원일: 2014년 5월 15일 (15.05.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0051444 2014년 4월 29일 (29.04.2014) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 변영로 (BYUN, Youngro); 151-742 서울시 관악구 관악로 1 서울대학교 약학대학 21동 313호, Seoul (KR). 김지웅 (KIM, Jiwoong); 151-742 서울시 관악구 관악로 1 서울대학교 약학대학 142동 414호, Seoul (KR). 하쿠리즈와눌 무하마드 (HAQUE, Rezwanul Muhammad); 151-742 서울시 관악구 관악로 1 서울대학교 약학대학 142동 414호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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, LT, 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.

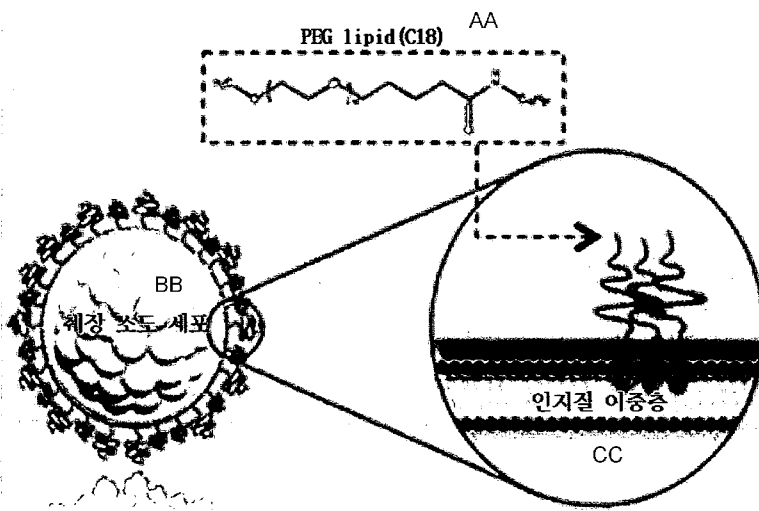
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR MODIFYING PANCREATIC ISLET SURFACE BY MEANS OF POLYETHYLENE GLYCOL SYNTHETIC MATERIAL AND SURFACE-MODIFIED PANCREATIC ISLET USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 폴리에틸렌 글리콜 합성 물질을 이용한 췌장 소도 표면을 개질하는 방법 및 이를 이용한 표면 개질된 췌장 소도



AA ... PEG lipid (C18)
BB ... Pancreatic islet cell
CC ... Phospholipid bilayer

(57) Abstract: The present invention relates to a method in which lipid and DOPA are synthesized with 6-arm PEG, DOPA is synthesized with gelatin, the lipid solubility of lipid is used and thereby lipid is induced to interfere and bind between surface cell phospholipid layers of the pancreatic islet of a pig, and by using a covalent bond between DOPA and SH the surface of a pancreatic islet membrane of a pig is modified through a bond between 6-arm PEG-SH, DOPA, gelatin-DOPA and linear PEG-SH. The present invention, compared to a pure pancreatic islet that has not been given any treatment, does not show changes in pancreatic islet shape, insulin secretion and cell survivability, and by confirming the increasing of maintenance time for blood glucose concentration, stability and viability of pancreatic islet can be enhanced, thereby being effectively used in a pancreatic islet transplant.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 6-arm PEG 에 lipid 및 DOPA 를 합성하고 젤라틴에 DOPA 를 합성하여 lipid 가 가지는 지용성을 이용해 돼지 췌장 소도의 표면 세포 인지질층 사이에 lipid 가 끼어들어 결합하도록 유도하고, DOPA 와 SH 간의 공유 결합을 이용하여 6-arm PEG-SH, DOPA, 젤라틴-DOPA 및 linear PEG-SH 간의 결합을 통해 돼지 췌장 소도 막 표면을 개질하는 방법으로 아무런 처리를 하지 않은 순수 췌장 소도에 비해 췌장 소도 모양과 인슐린 분비 정도 및 세포 생존성의 변화가 나타나지 않고, 혈중 포도당의 유지기간이 상승하는 것을 확인함으로써 췌장 소도의 안정성(Stability) 및 생존율(viability)을 향상시켜서 췌장 소도 이식에 있어서 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

폴리에틸렌 글리콜 합성 물질을 이용한 체장 소도 표면을 개질하는 방법
및 이를 이용한 표면 개질된 체장 소도

5

【기술분야】

본 발명은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 합성 물질을 이용한 체장 소도의
표면 개질 방법에 관한 것이다.

10 【배경기술】

폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)은 물분자와 수소 결합을
효과적으로 하는 대표적인 친수성 고분자로 알려져 있다. 수용액뿐만 아니라
많은 종류의 유기용매에도 녹는 성질이 있으며, 화학적 안정성을 가진다.

또한, 단백질, 펩타이드, 유전자와 같은 생체활성을 지니는 약품과 PEG의
15 접합체는 PEG의 수용액 상에서 높은 유체역학적 부피로 인해 혈액 내에서
반감기가 증가되며, 생체 면역계에 의한 인식이 저해되는 특징을 보인다.

좀 더 효과적인 접합체를 형성하기 위해 유체역학적 부피에 있어
차이를 보이게 하기 위해 PEG의 구조적인 측면에서 선형, 이중가지, 삼중가지,
덴드론, 덴드리머 형태의 고차구조를 가지는 PEG와 생체활성 물질과 접합체에
20 대한 연구가 바이오 분야에서 현재까지 꾸준히 이루어지고 있다.

Dong Keun Han et al., Bioactive and Compatible Polymers, 2009, 24,
316-328에서는 티타늄-니켈 합금으로된 스텐트(stent) 표면을 선형의
아이소시아네이트 PEG(2 kDa)로 표면처리하여, 전임상 실험에서 PEG로 변형된
스텐트에서 비특이적 단백질 결합과 혈소판의 부착이 억제됨을 개시하고 있고,
25 대한민국 공개특허 2008-0072960호에서는 숙신이미딜 카르보네이트를 활성화
그룹으로 갖는 선형의 모노에톡시-PEG(5~30 kDa)를 L-리신에 반응시켜
L-리신을 중심부(core)로 하여 카르복시기를 포함하는 덴드리머-유사구조
PEG(20~120 kDa)를 합성하고 크로마토그래피를 이용하여 정제하여, 인터페론

알파-2b 등 약리적 활성을 지닌 단백질들과 덴드리머-유사구조 PEG와의 결합체를 생체 내, 외에서 테스트하여 생체 내 안정성 증가를 개시하고 있다.

제 1형 당뇨병의 치료를 위한 돼지 췌장 소도 이식에 있어서 가장 큰 문제점은 돼지 췌장 소도 분리 후 췌장 소도의 부서짐 현상이다. 돼지의 췌장 소도는 다른 종과는 달리 분리 후 콜라겐을 거의 생성하지 않아서 쉽게 부서지는 현상이 관측된다. 췌장 소도의 기능 유지를 위해서는 췌장 소도가 부서지지 않고 단단한 클러스터(cluster) 형태로 존재하여야 하므로, 췌장 소도가 분비하는 콜라겐과 유사한 성분인 젤라틴(gelatin)을 이용한 인조 세포 외 기질(artificial extra cellular matrix, A.ECM)을 돼지 췌장 소도의 표면에 접합시켜 췌장 소도의 부서짐을 방지할 수 있다.

인조 세포 외 기질(A.ECM)을 접목한 돼지 췌장 소도 클러스터(cluster)는 단단한 구조를 지니게 되어 부서짐 현상은 줄어들며, 이를 수여자에게 이식하였을 경우 수여자의 면역체계를 활성화시켜 강한 면역반응을 일으키고 결국 파괴되게 된다.

이에 본 발명자들은 상기 문제점들을 극복하기 위하여, 인조 세포 외 기질(A.ECM)을 만들고 그 위에 PEG를 이용한 여러 종류의 PEG 유도체 중 돼지 췌도 세포의 생존을 향상을 이끄는 가장 최적의 물질인 6-arm PEG-SH, 6-arm PEG-DOPA 및 linear PEG-SH를 차례로 접목한 추가적인 표면 개질을 통해 이식한 돼지 췌도 세포의 이식 후 안정성(stability) 및 생존율(viability)을 비약적으로 향상시킬 수 있다.

즉, 인조 세포 외 기질(A.ECM)을 돼지 췌도 세포에 우선 접목해 표면을 개질하여 돼지 췌도 세포의 구조상의 안정성을 획득한 후, 추가적으로 PEG 유도체들인 6-arm PEG-SH, 6-arm PEG-DOPA 및 linear PEG-SH를 이용한 이차적 표면 개질을 통하여 이식한 후의 돼지 췌도 세포의 안정성 및 생존율을 향상시킬 수 있는 방법을 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 웨장 소도 세포의 안정성(stability) 및 생존율(viability)을 향상시키기 위한 웨장 소도의 표면 개질 방법을 제공하는
5 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 표면 개질된 웨장 소도를 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

10 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고차구조의 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)에 지질이 결합된 고차구조의 PEG-lipid를 웨장 소도 표면에 결합시키는 단계(단계 1);

상기 단계 1의 고차구조의 PEG-lipid와 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체를 결합시키는 단계(단계 2); 및

15 상기 단계 2의 PEG-lipid의 결합되지 않은 카테콜 유도체의 하이드록시(hydroxy)기에 PEG 유도체를 결합시키는 단계(단계 3)를 포함하는 웨장 소도 세포 표면 개질 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 고차구조의 PEG, 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체, 및 하나 이상의 PEG 또는 이의 유도체가 순차적으로 웨장 소도 세포 표면에
20 결합된 표면 개질된 웨장 소도를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 6-arm PEG에 lipid 및 DOPA를 합성하고, 젤라틴에 DOPA를 합성하여 lipid가 가지는 지용성을 이용해 돼지 웨장 소도의 표면 세포
25 인지질층 사이에 lipid가 끼어들어 결합하도록 유도하고, DOPA와 SH간의 공유 결합을 이용하여 6-arm PEG-SH, DOPA, 젤라틴-DOPA 및 linear PEG-SH 간의 결합을 통해 돼지 웨장 소도 막 표면을 개질하는 방법은 아무런 처리를 하지 않은 순수 웨장 소도에 비해 웨장 소도 모양과 인슐린 분비 정도 및 세포 생존성의

변화가 나타나지않고, 혈중 포도당의 유지기간이 상승하는 것을 확인함으로써
 췌장 소도의 안정성(Stability) 및 생존율(viability)을 향상시켜서 췌장 소도
 이식에 있어서 유용하게 사용될 수 있다.

5 【도면의 간단한 설명】

도 1은 돼지 췌장 소도 세포의 인지질 이중층에 PEG lipid(C18)가
 접합하는 모습을 나타낸 도이다.

도 2는 돼지 췌장 소도의 외곽에 인조 세포 외 기질이 접합하는 형태를
 나타낸 도이다.

10 도 3은 인조 세포 외 기질 위에 6-arm PEG SH, 6-arm PEG DOPA 및 linear
 PEG SH를 차례로 도입하여 표면을 개질한 모식도이다.

도 4는 췌장 소도 세포를 디티존(dithizone)으로 염색한 후 순수 췌장
 소도 세포와 표면을 개질한 췌장 소도 세포를 현미경으로 관찰한 이미지이다.

15 도 5는 돼지 췌장 소도를 형광물질을 도입한 PEG를 이용하여 인조 세포
 외 기질, 6-arm PEG SH, 6-arm PEG DOPA 및 linear PEG SH로 표면을 개질한 뒤
 췌장 소도의 표면 개질 정도를 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰한
 이미지로, optical 이미지는 형광 염료를 관측하기 전 이미지이고, central은
 췌장 소도의 중간 부분에 초점을 맞춰 형광을 촬영한 이미지이고, merge는
 여러 장의 초점 이미지를 합쳐 입체적으로 형광을 촬영한 이미지이다.

20 도 6은 LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit를 이용하여 순수 췌장
 소도 세포와 표면을 개질한 췌장 소도 세포의 세포 생존성을 현미경으로
 관찰한 이미지로, 녹색 형광은 살아있는 세포, 붉은 형광은 죽은 세포를 나타낸
 도이다.

25 도 7은 아무 처리도 하지 않은 순수한 돼지 췌장 소도 그룹과 돼지 췌장
 소도 표면을 개질한 그룹을 각각 5000 IEQ 씩 c57bl/6 마우스에 이식한 후
 혈당을 측정한 그래프이다:

(A)는 대조군으로써 아무런 처리를 하지 않은 순수한 돼지 췌도 세포를
 이식한 후 혈당 그래프이고, (B)는 실험군으로써 인조 세포 외 기질과 함께

6-arm PEG SH, 6-arm PEG DOPA 및 linear PEG SH을 이용해 표면을 개질하여 이식한 후의 혈당 그래프이다.

도 8은 아무 처리도 하지 않은 순수한 돼지 췌장 소도 그룹과 돼지 췌장 소도 표면을 개질한 그룹을 각각 8000 IEQ 씩 c57bl/6 마우스에 이식한 후

5 혈당을 측정한 그래프이다:

(A)는 대조군으로써 아무런 처리를 하지 않은 순수한 돼지 췌도 세포를 이식한 후 혈당 그래프이고, (B)는 실험군으로써 인조 세포 외 기질과 함께 6-arm PEG SH, 6-arm PEG DOPA 및 linear PEG SH을 이용해 표면을 개질하여 이식한 후의 혈당 그래프이다.

10 도 9는 돼지 췌장 소도를 인조 세포 외 기질과 함께 6-arm PEG SH, 6-arm PEG DOPA 및 linear PEG SH을 이용해 표면을 개질하여 8000 IEQ 씩 balb/c 누드마우스에 이식한 후 혈당을 측정한 그래프이다.

도 10은 돼지 췌장 소도를 인조 세포 외 기질과 함께 6-arm PEG SH, 6-arm PEG DOPA 및 linear PEG SH을 이용해 표면을 개질하여 4000 IEQ, 8000 IEQ
15 씩 SCID 마우스에 이식한 후 혈당을 측정한 그래프이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

20 본 발명은 고차구조의 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)에 지질이 결합된 고차구조의 PEG-lipid를 췌장 소도 표면에 결합시키는 단계(단계 1);

상기 단계 1의 고차구조의 PEG-lipid와 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체를 결합시키는 단계(단계 2); 및

25 상기 단계 2의 PEG-lipid의 결합되지 않은 카테콜 유도체의 하이드록시(hydroxy)기에 PEG 유도체를 결합시키는 단계(단계 3)를 포함하는 췌장 소도 세포 표면 개질 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 단계별로 더욱 구체적으로 설명한다.

본 발명에 따른 체장 소도의 표면개질 방법에 있어서, 상기 단계 1 내지 2는 체장소도 표면의 인지질층에 고차구조의 PEG-lipid와 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체를 결합시켜 인조 세포 외 기질을 만드는 단계이다.

상기 단계 1의 지질은 인지질(phospholipid)인 것이 바람직하고, 고차구조의 PEG-lipid는 체장 소도 세포 표면의 인지질 이중층과 결합되는 것이 바람직하며, 상기 단계 2의 카테콜 유도체는 DOPA(3,4-dihydroxyphenylacetic acid)인 것이 바람직하다.

상기 단계 2의 결합은 고차구조의 PEG-lipid의 카테콜기, 아민기, 히드록실기, 카르복실기, 티올기 및 설펜기로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 관능기와 젤라틴 및 카테콜 복합체의 하이드록시기가 결합하는 것이 바람직하고, 고차구조의 PEG-lipid의 티올기와 젤라틴 및 카테콜 복합체의 하이드록시기로 공유결합하는 것이 보다 바람직하다.

상기 고차구조의 PEG-lipid와 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체를 결합시킨 후 젤화(gelation)시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 체장 소도의 표면개질 방법에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 1 내지 2에서 만들어진 인조 세포 외 기질에 PEG 유도체를 결합시켜 생체고분자(biopolymer)가 다층(multi-layer) 그래프트된 체장 소도 세포를 만드는 단계이다.

상기 PEG 유도체는 체장 소도를 이식 시 발생하는 면역반응을 감소시켜 체장 소도의 생존기간을 연장시키는 역할을 한다. 상기 PEG 유도체로는 고차구조의 PEG, linear PEG, PEG-도파(PEG-DOPA), 모노메톡시 PEG(monomethoxy polyethylene glycol), PEG 프로피온산의 숙시니미드(succinimide of PEG propionic acid), PEG 부타논산의 숙시니미드(succinimide of PEG butanoic acid), 가지달린 PEG-HNS(branched PEG-NHS), PEG 숙시니미딜 숙시네이트(PEG

succinimidyl succinate), 카복시메틸화 PEG의 숙시니미드(succinimide of carboxymethylated PEG), PEG의 벤조트리아졸 카보네이트(benzotriazole carbonate of PEG), PEG-글리시딜 에테르(PEG-glycidyl ether), PEG-옥시카보닐이미다졸(PEG-oxycarbonylimidazole), PEG 니트로페닐 카보네이트(PEG nitrophenyl carbonates), PEG-알데히드(PEG-aldehyde), PEG 숙시니미딜 카르복시메틸 에스테르(PEG succinimidyl carboxymethyl ester), PEG 숙시니미딜 에스테르(PEG succinimidyl ester) 등을 사용할 수 있다.

상기 카테콜 유도체의 하이드록시기에 결합하지 않은 PEG 유도체 잔기에 서로 다른 PEG 유도체를 도입하는 단계를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하고, 추가적으로 도입된 PEG 유도체에 linear PEG 또는 생체 활성 물질을 추가적으로 도입하는 단계를 포함하는 것이 바람직하고, 생체 활성 물질은 재조합 헤파린(recombinant heparin), 헤파린 유사체(heparin analogue) 등을 사용할 수 있으나, 헤파린을 사용하는 것이 바람직하다.

상기 linear PEG-SH 대신에 UFH-SH(unfracturated heparin), LMWH-SH(low molecular weight heparin)등을 추가적으로 도입하는 것을 특징으로 한다.

아울러, 본 발명에서의 모든 반응은 pH 8 정도의 약염기 조건에서 수행되는 것이 바람직하다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 돼지 췌장 소도 표면 세포의 세포막 표면 개질하기 위해 돼지 췌장 소도를 분리하고, 6-arm PEG-lipid, 젤라틴-DOPA 및 6-arm PEG-DOPA를 제조하여 췌장 소도의 세포막에 존재하는 인지질 사이에 6-arm PEG lipid가 지나는 지질이 끼어들어 단단한 결합을 형성하여 6-arm PEG가 췌장 소도 막 표면에 결합된다(도 1 참조). 그리고 PEG의 잔기에 존재하는 티올기에 젤라틴-DOPA를 적용하면, DOPA와 SH가 공유결합을 형성하여 단단히 결합한다. 이를 M199 배지를 이용해서 30분간 배양하면 젤화(gelation)가 일어나서 젤라틴이 췌장 소도의 외곽을 감싸는 형태로 되어 인공적으로 세포 외 기질을 형성할 수 있게 된다(도 2 참조).

이후 젤라틴의 잔기에 남아있는 DOPA를 이용해 추가적으로 6-arm

PEG-SH를 공유결합으로 결합시킬 수 있으며, 결합 후 남은 6-arm PEG-SH의 잔기에 6-arm PEG-DOPA를 결합시킬 수 있다. 최종적으로 linear PEG-SH를 위의 6-arm PEG-DOPA의 잔여 DOPA에 공유결합시켜서 돼지 췌장 소도의 표면 개질을 완성할 수 있다(도 3 참조).

5 또한, 돼지 췌장 소도의 표면을 개질한 이후, 표면 개질을 하지않은 순수한 돼지 췌장 소도와 비교했을 때 췌장 소도의 형태와 인슐린 분비 정도를 확인하기 위하여 췌장의 β 세포에 반응하는 디티존을 이용하여 염색을 하였고, 표면을 개질한 췌장 소도세포가 기존의 순수 췌장 소도세포와 비교해서 형태나 인슐린 분비 정도가 유사함을 확인하였다(도 4 참조).

10 또한, 췌장 소도 표면에 결합된 인조 세포 외 기질과 3층의 PEG 유도체의 확인을 위해서 형광물질(FITC)로 표지된 PEG을 사용하여 초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy)으로 이미지를 확인하였고, 인조 세포 외 기질과 6-arm PEG-SH, 6-arm PEG-DOPA, linear PEG-SH이 돼지 췌장 소도 표면에 잘 결합하는 것을 확인하였다(도 5 참조).

15 또한, LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit를 이용하여 돼지 췌장 소도의 생존성을 확인하였고, 순수 췌장 소도와 표면을 개질한 췌장 소도의 세포 생존성이 비슷하게 나타남으로 표면 개질 물질로 인한 독성이 거의 없음을 확인하였다(도 6 참조).

20 또한, 당뇨가 유도된 c57b1/6 마우스에 표면 개질한 췌장 소도 5000 IEQ를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였고, 혈중 포도당 농도의 유지기간이 상승하는 것을 확인하였다(도 7 참조).

또한, 당뇨가 유도된 c57b1/6 마우스에 표면 개질한 췌장 소도 8000 IEQ를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였고, 혈중 포도당의 유지기간이 상승하는 것을 확인하였다(도 8 참조).

25 또한, 당뇨가 유도된 Balb/c 누드 마우스에 표면 개질한 췌장 소도 8000 IEQ를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였고, 혈당변화가 개체별로 다양하게 관찰되었지만, 약 5일간은 혈당이 유지되는 것을 확인하였다(도 9 참조).

아울러, 당뇨가 유도된 SCID 누드 마우스에 표면 개질한 채장 소도 4000, 8000 IEQ를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였고, 4마리 중 1마리를 제외하고는 모두가 60일 이상 혈당이 정상수치로 유지됨을 확인하였다(도 10 참조).

- 5 따라서, 본 발명에 따른 돼지 채장 소도 막 표면을 개질하는 방법은 아무런 처리를 하지 않은 순수 채장 소도에 비해 채장 소도 모양과 인슐린 분비 정도 및 세포 생존성의 변화가 나타나지않고, 혈중 포도당의 유지기간이 상승하는 것을 확인함으로써 채장 소도의 안정성 및 생존율을 향상시켜서 채장 소도 이식에 있어서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

10

본 발명은 고차구조의 PEG, 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체, 및 하나 이상의 PEG 또는 이의 유도체가 순차적으로 채장 소도 세포 표면에 결합된 표면 개질된 채장 소도를 제공한다.

- 15 본 발명의 표면 개질된 채장 소도는 아무런 처리를 하지 않은 순수 채장 소도에 비해 채장 소도 모양과 인슐린 분비 정도 및 세포 생존성의 변화가 나타나지않고, 혈중 포도당의 유지기간이 상승하는 것을 확인함으로써 채장 소도의 안정성 및 생존율을 향상시켜서 채장 소도 이식에 있어서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하여 표면 개질된 채장 소도로 이용할 수 있다.

- 20 또한, 본 발명은 고차구조의 PEG, 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체, 및 하나 이상의 PEG 또는 이의 유도체가 순차적으로 채장 소도 세포 표면에 결합된 표면 개질된 채장 소도를 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- 25 또한, 본 발명은 당뇨 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 고차구조의 PEG, 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체, 및 하나 이상의 PEG 또는 이의 유도체가 순차적으로 채장 소도 세포 표면에 결합된 표면 개질된 채장 소도의 용도를 제공한다.

본 발명의 표면 개질된 채장 소도를 유효성분으로 하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지,

라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 구체적으로 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 본 발명의 조성물의 유효용량은 0.0001 ~ 10 g/kg일 수 있고, 구체적으로 0.001 ~ 1 g/kg일 수 있으며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

본 발명의 조성물은 신경보호를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

따라서, 본 발명의 표면 개질된 채장 소도는 아무런 처리를 하지 않은 순수 채장 소도에 비해 채장 소도 모양과 인슐린 분비 정도 및 세포 생존성의 변화가 나타나지않고, 혈중 포도당의 유지기간이 상승하는 것을 확인함으로써 채장 소도의 안정성 및 생존율을 향상시켜서 채장 소도 이식에 있어서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였으며 상기 표면 개질된 채장 소도를 당뇨 예방 및 치료용 조성물로 이용할 수 있음을 확인하였다.

25

이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명한다.

단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<실시에 1> 돼지 췌장 소도 표면 세포의 세포막 표면 개질

<1-1> 돼지 췌장 소도의 분리

췌장소도를 분리하기 하루 전부터 금식시킨 체중 250 내지 300 g의 SD
 5 랫트(대한실험동물센터, 한국)를 케타민(ketamine)과 자일라진(xylazine)의
 혼합용액으로 피하주사하여 마취시켰다. 복강을 개복한 후 췌장을 부풀리기
 위해 콜라게네이즈(collagenase; 1.5 mg 콜라게네이즈/HBSS 1mL, 12.5 mL/SD
 랫트)를, 담즙관(bile duct)을 통해 주입하였고, 주입이 끝남과 동시에 즉시
 부풀려진 췌장을 적출하였다. 적출한 췌장을 가위로 잘게 부수고, 37°C 수조
 10 내에서 흔들어주면서 분해시킨 후 더 이상의 분해를 막기 위하여 냉각된
 HBSS를 첨가하였다. 분해된 췌장 조직을 채로 거른 후 여러 번 세척하였다.
 이를 약 1400 rpm에서 3분간 원심분리를 수행하여 상층액을 제거하고, 27, 23,
 20 및 11 %의 피콜(ficoll) 농도 구배를 준 후 약 2400 rpm에서 24분간
 원심분리를 실시하였다. 20 %와 23 % 층 사이 및 11 %와 20 % 층 사이에
 15 존재하는 췌도를 모아 세척한 후 RPMI-1640 배양액(제조사: Sigma, 11.1 mM
 glucose, 2 mM sodium pyruvate, 6 mM HEPES, 10 % FBS, 1 %
 penicillin/streptomycin)이 첨가된 배양 접시로 옮겨 37°C, 5 % 이산화탄소를
 공급하면서 배양하였다. 배양액은 이틀에 한 번씩 새것으로 교체해 주었고
 이로부터 췌장 소도를 분리하였다.

20

<1-2> 6-arm PEG-lipid의 제조

6-arm PEG-SH(mw 15000, 선바이오), 6-maleimidohexanoic acid
 Nhydroxysuccinimide ester(EMCS; mw 308.29, Sigma), 인지질(phospholipid; mw
 744.063, Avanti Polar Lipids) 및 트리에틸아민(Triethylamine, TEA; mw 101.19,
 25 Sigma)을 이용하여 6-arm PEG-lipid를 제조하였다.

먼저, 500 mg 인지질을 1 ml 클로로포름에 용해시키고 둥근 바닥
 플라스크에 넣는다. 혐기성 조건에서 반응액에 140 ul TEA를 천천히 넣어준다.
 인지질에 EMCS를 결합시키기 위해 249 mg EMCS를 클로로포름에 용해시키고 둥근

바닥 플라스크에 넣고 24시간동안 섞어준다. 반응한 용액을 동결건조하여 인지질-EMCS를 얻었다.

6-arm PEG-SH 1000 mg을 클로로포름에 용해시키고 이전에 합성한 인지질-EMCS 168.38 mg을 넣고, 24시간동안 섞어준다. 정제를 위해 차가운 에테르를 준비하고, 침전시키기 위해 반응액에 에테르를 천천히 넣어주었다. 6-arm PEG-SH는 에테르에 녹지않으므로 반응하지않은 인지질-EMCS만 에테르에 녹고 합성된 물질은 침전시켰다. 펠렛은 동결건조하고 상등액은 버렸다. 이러한 방법으로 6-arm PEG-lipid를 얻었다.

10 <1-3> 젤라틴-DOPA의 제조

젤라틴(gelatin; Sigma), EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride; Sigma), NHS(N-hydroxysuccinimide; Sigma) 및 DOPA(3,4-dihydroxyphenylacetic acid; Sigma)를 이용하여 gelatin-DOPA를 제조하였다.

15 젤라틴 1 g을 50 ml 증류수에 용해하고, pH 5 EDC 110 mg, NHS 70 mg 및 DOPA 100 mg을 넣고 50℃에서 24시간동안 섞어준다. 반응이 끝난 후, pH 5, 50℃ 미만에서 반응액을 투석한다(분획분자량: 1,000, SpectraPor). 정제 후, 동결건조하여 gelatin-DOPA를 얻었다.

20 <1-4> 6-arm PEG-DOPA의 제조

6-arm PEG 1000 mg을 클로로포름에 용해시키고, pH 5 EDC(110 mg), NHS(70 mg) 및 DOPA(100 mg)를 넣고 24시간동안 섞어준다. 반응한 용액은 멤브레인 튜브(membrane tube)에 주입한 후 3일동안 투석시키면서 반응하지 않은 DOPA를 제거한 후 동결건조하여 6-arm PEG-DOPA를 얻었다.

25

<1-5> 생체고분자(biopolymer)가 다층(multi-layer) 그래프트된 체장 소도 세포의 제조

돼지 체장 소도 세포의 세포막 표면에 6-arm PEG-lipid를 결합시키고,

젤라틴-DOPA를 그 위에 결합해 인조 세포 외 기질을 형성하였고, 이 위로 6-arm PEG-SH, 6-arm PEG-DOPA 및 linear PEG-SH을 차례로 결합시켜 돼지 췌장 소도 세포의 세포막 표면을 개질하였다.

구체적으로, 6-arm PEG-lipid 10 mg을 1 ml의 pH 8 HBSS에 녹인 완충액을 돼지 췌장 소도세포에 첨가하여 세포배양기(37℃, 5 % 이산화탄소)에서 1시간 동안 반응시킨 후 더 이상의 반응을 막기 위해 새 pH 7 HBSS 완충액으로 이 돼지 췌장 소도를 세척하였다.

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 6-arm PEG-lipid가 췌장소도에 결합된다(도 1).

또한, 젤라틴-DOPA 10 mg를 1 ml pH 8 HBSS에 녹인 완충액을 위의 6-arm PEG-lipid가 결합된 돼지 췌장 소도에 첨가하여 세포배양기(37℃, 5 % 이산화탄소)에서 1시간 동안 반응시킨 후 더 이상의 반응을 막기 위해 새 pH 7 HBSS 완충액으로 이 돼지 췌장 소도를 세척하고 M199로 세포배양기(37℃, 5 % 이산화탄소)에서 30분 동안 반응시킨 후 더 이상의 반응을 막기 위해 새 pH 7 HBSS 완충액으로 이 돼지 췌장 소도를 세척하였다.

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 젤라틴-DOPA와 6-arm PEG-lipid가 결합한 형태로 젤화(gelation)가 일어나 인조 세포 외 기질(A.ECM)이 형성된다(도 2).

또한, 6-arm PEG-SH 10 mg을 1 ml의 pH 8 HBSS에 녹인 완충액을 위의 인조 세포 외 기질이 형성된 돼지 췌장 소도세포에 첨가하여 세포배양기(37℃, 5 % 이산화탄소)에서 1시간 동안 반응시킨 후 더 이상의 반응을 막기 위해 새 pH 7 HBSS 완충액으로 이 돼지 췌장 소도를 세척하면 6-arm PEG-SH가 췌장소도에 결합되고, 6-arm PEG-DOPA 10 mg을 1 ml의 pH 8 HBSS에 녹인 완충액을 위의 6-arm PEG-SH이 결합된 돼지 췌장 소도세포에 첨가하여 세포배양기(37℃, 5 % 이산화탄소)에서 1시간 동안 반응시킨 후 더 이상의 반응을 막기 위해 새 pH 7 HBSS 완충액으로 이 돼지 췌장 소도를 세척하면 6-arm PEG-DOPA가 췌장 소도에 결합되며, linear PEG-SH 10 mg을 1 ml의 pH 8 HBSS에 녹인 완충액을 위의 6-arm PEG-DOPA가 결합된 돼지 췌장 소도세포에 첨가하여 세포배양기(37℃, 5 %

이산화탄소)에서 1시간 동안 반응시킨 후 더 이상의 반응을 막기 위해 새 pH 7 HBSS 완충액으로 이 돼지 췌장 소도를 세척하면 linear PEG-SH가 췌장 소도에 결합된다.

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 마지막에 linear PEG-SH가 결합하고
5 나면 돼지 췌장 소도의 표면 개질이 완성된다(도 3).

<실시예 2> 디티존(dithizone) 염색을 이용한 췌장 소도 모양 관측

상기 실시예 <1-5>의 방법으로 돼지 췌장 소도의 표면을 개질한 이후, 표면 개질을 하지않은 순수한 돼지 췌장 소도와 비교했을 때 췌장 소도의
10 형태와 인슐린 분비 정도를 확인하기 위하여 췌장의 β 세포에 반응하는 디티존을 이용하여 염색을 하였다.

구체적으로, 표면 개질을 하지않은 순수 췌장 소도세포와 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 췌장 소도세포를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 디티존을 1 % 부피당 무게비로 녹인 후, 세포에 2 ug/ml의 농도로 처리하여
15 10분간 반응시킨 후, 현미경으로 관찰하였다.

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 표면을 개질한 췌장 소도세포가 기존의 순수 췌장 소도세포와 비교해서 형태나 인슐린 분비 정도가 유사함을
확인하였다(도 4).

20 <실시예 3> 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy)을 이용한 돼지 췌장소도 세포막 표면 확인

췌장소도 표면에 결합된 인조 세포 외 기질과 3층의 PEG 유도체의 확인을 위해서 형광물질(FITC)로 표지된 PEG을 사용하여 상기 실시예 <1-5>와 같은 방식으로 반응시키고 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning
25 Microscopy)으로 이미지를 확인하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 인조 세포 외 기질과 6-arm PEG-SH, 6-arm PEG-DOPA, linear PEG-SH이 돼지 췌장소도 표면에 잘 결합하는 것을
확인하였다(도 5).

<실시예 4> LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit를 이용한 돼지 췌장 소도의 생존성 확인

LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit를 이용하여 돼지 췌장 소도의

5 생존성을 확인하였다.

구체적으로, 순수 췌장 소도와 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 췌장 소도의 생존성을 LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit를 이용하면 죽은 세포는 붉은색으로, 살아있는 세포는 녹색으로 염색된다. 살아있는 세포는 세포 내 에스테르가수분해효소(esterase) 활성이 높고
10 원형질막(plasma membrane)이 완전한 반면, 죽은 세포는 esterase 활성이 낮고 원형질막이 망가지는 성질을 토대로 이를 감별할 수 있는 두 가지 형광을 사용하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 동시에 결정할 수 있는 방법이다. 두 가지 형광으로 Calcein AM과 Ethd-1(Ethidium homodimer-1)이 사용된다. Calcein AM은 비형광물질이었던 것이 살아있는 세포에서
15 에스트라제(estrerase)에 의해 분해될 경우, 녹색 형광을 띠면서 세포 내에 남게되고, EthD-1은 원형질막이 손상된 죽은 세포에만 들어가 핵산과 결합하면서 밝은 붉은색 형광을 띠게 된다.

그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 순수 췌장 소도와 표면을 개질한 췌장 소도의 세포 생존성이 비슷하게 나타남으로 표면 개질 물질로 인한
20 독성이 거의 없음을 확인하였다(도 6).

<실시예 5> 췌장 소도 세포 5000 IEQ를 c57b1/6 마우스에 이식 후 혈당 확인

당뇨가 유도된 c57b1/6 마우스에 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면 개질한 췌장 소도를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였다.

25 구체적으로, streptozocin 160 mg/kg 을 정상 c57b1/6 마우스에 투여하여 혈당이 350 mg/dl 이상으로 측정되면, 당뇨가 유도된 c57b1/6마우스가 된다. 이 마우스에 대조군으로 아무런 처리를 하지 않은 돼지 췌장 소도 세포 5000 IEQ를 신피막(kidney capsule)과 신장의 사이 공간에 이식하고, 같은 방법으로

상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 돼지 췌장 소도를 이식한 후 여러 종의 면역억제제(FK506, Rapamycin, MR-1(anti CD-154mAb), clodrosome 및 anti CD19 mAb 등)를 함께 투여하여 각각 두마리씩 혈당의 변화를 확인하였다.

그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 아무런 처리 하지 않은 췌장 소도를 5000 IEQ 이식한 군에 비하여 표면을 개질한 췌장 소도를 5000 IEQ 이식한 군에서 혈중 포도당 농도의 유지기간이 상승하는 것을 확인하였다(도 7).

<실시예 6> 췌장 소도 세포 8000 IEQ를 c57b1/6 마우스에 이식 후 혈당 확인

당뇨가 유도된 c57b1/6 마우스에 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 췌장 소도를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였다.

구체적으로, streptozocin 160 mg/kg 을 정상 c57b1/6 마우스에 투여하여 혈당이 350 mg/dl 이상으로 측정되면, 당뇨가 유도된 c57b1/6 마우스가 된다. 이 마우스에 대조군으로 아무런 처리를 하지 않은 돼지 췌장 소도 세포 8000 IEQ를 신피막과 신장의 사이 공간에 이식하고, 같은 방법으로 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 돼지 췌장 소도를 이식한 후 여러 종의 면역억제제(FK506, Rapamycin, MR-1(anti CD-154mAb), clodrosome 및 anti CD19 mAb 등)를 함께 투여하여 각각 두마리씩 혈당의 변화를 확인하였다.

그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 아무런 처리 하지 않은 췌장 소도를 8000 IEQ 이식한 군에 비하여 표면을 개질한 췌장 소도를 8000 IEQ 이식한 군에서 혈중 포도당의 유지기간이 상승하는 것을 확인하였다(도 8).

<실시예 7> 췌장 소도 세포 8000 IEQ를 Balb/c 누드 마우스에 이식 후 혈당 확인

당뇨가 유도된 Balb/c 누드 마우스에 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 췌장 소도를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였다.

구체적으로, streptozocin 110 mg/kg 을 정상 Balb/c 누드 마우스에 투여하여 혈당이 350 mg/dl 이상으로 측정되면, 당뇨가 유도된 Balb/c

누드마우스가 된다. 이 마우스에 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 돼지 췌장 소도 8000 IEQ를 신피막과 신장의 사이 공간에 이식하고 8마리의 혈당 변화를 확인하였다.

- 5 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 당뇨가 유도된 누드마우스에 표면을 개질한 췌장 소도 8000 IEQ 이식한 후 혈당변화가 개체별로 다양하게 관찰되었지만, 약 5일간은 혈당이 유지되는 것을 확인하였다(도 9).

<실시예 8> 췌장 소도 세포 4000, 8000 IEQ를 SCID 마우스에 이식 후 혈당 확인

- 10 당뇨가 유도된 SCID 누드 마우스에 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 췌장 소도를 이식하였을 때, 혈당의 변화를 관찰하였다.

구체적으로, streptozocin 130 mg/kg 을 정상 SCID 마우스에 투여하여 혈당이 350 mg/dl 이상으로 측정되면, 당뇨가 유도된 SCID 마우스가 된다. 이 마우스에 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 표면을 개질한 돼지 췌장 소도 4000, 8000 IEQ를 신피막과 신장의 사이 공간에 이식하고 혈당의 변화를 관측하였다.

- 15 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 표면을 개질한 췌장 소도 4000 또는 8000 IEQ를 이식하였을 때, 4마리 중 1마리를 제외하고는 모두가 60일 이상 혈당이 정상수치로 유지됨을 확인하였다(도 10).

【청구의 범위】**【청구항 1】**

고차구조의 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)에 지질이 결합된 고차구조의 PEG-lipid를 채장 소도 표면에 결합시키는 단계(단계 1);

5 상기 단계 1의 고차구조의 PEG-lipid와 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체를 결합시키는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2의 PEG-lipid의 결합되지 않은 카테콜 유도체의 하이드록시(hydroxy)기에 PEG 유도체를 결합시키는 단계(단계 3)를 포함하는 채장 소도 세포 표면 개질 방법.

10

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 단계 1의 지질은 인지질(phospholipid)인 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

15 **【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 상기 단계 1의 고차구조의 PEG-lipid는 채장 소도 세포 표면의 인지질 이중층과 결합되는 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

【청구항 4】

20 제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 카테콜 유도체는 DOPA(3,4-dihydroxyphenylacetic acid)인 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

【청구항 5】

25 제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 결합은 고차구조의 PEG-lipid의 관능기와 젤라틴-카테콜 복합체의 하이드록시기가 결합하는 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 관능기는 카테콜기, 아민기, 히드록실기, 카르복실기, 티올기 및 설펜기인 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

【청구항 7】

5 제 1항에 있어서, 상기 고차구조의 PEG-lipid와 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체를 결합시킨 후 젤화(gelation)시키는 단계를 추가적으로 포함하는 표면 개질 방법.

【청구항 8】

10 제 1항에 있어서, 상기 단계 3의 PEG 유도체는 고차구조의 PEG, linear PEG, PEG-도파(PEG-DOPA), 모노메톡시 PEG(monomethoxy polyethylene glycol), PEG 프로피온산의 숙시니미드(succinimide of PEG propionic acid), PEG 부타논산의 숙시니미드(succinimide of PEG butanoic acid), 가지달린 PEG-HNS(branched PEG-NHS), PEG 숙시니미딜 숙시네이트(PEG succinimidyl succinate), 카복시메틸화 PEG의 숙시니미드(succinimide of carboxymethylated PEG), PEG의 벤조트리아졸 카보네이트(benzotriazole carbonate of PEG),
 15 PEG-글리시딜 에테르(PEG-glycidyl ether), PEG-옥시카보닐이미다졸(PEG-oxycarbonylimidazole), PEG 니트로페닐 카보네이트(PEG nitrophenyl carbonates), PEG-알데히드(PEG-aldehyde), PEG
 20 숙시니미딜 카르복시메틸 에스테르(PEG succinimidyl carboxymethyl ester), PEG 숙시니미딜 에스테르(PEG succinimidyl ester)인 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

【청구항 9】

25 제 1항에 있어서, 단계 3의 카테콜 유도체의 하이드록시기에 결합하지 않은 PEG 유도체 잔기에 서로 다른 PEG 유도체를 도입하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

【청구항 10】

제 9항에 있어서, 추가적으로 도입된 PEG 유도체에 linear PEG 또는 생체 활성 물질을 추가적으로 도입하는 단계를 포함하는 표면 개질 방법.

5 【청구항 11】

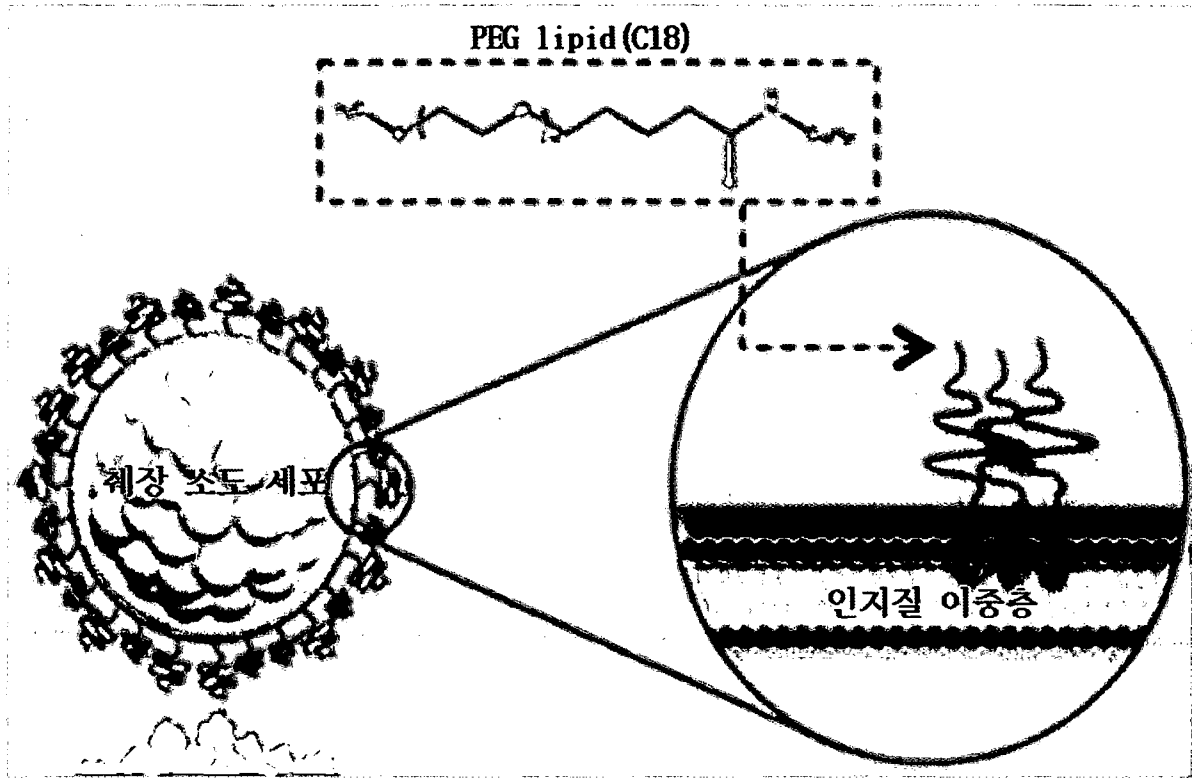
제 10항에 있어서, 상기 생체 활성 물질은 헤파린인 것을 특징으로 하는 표면 개질 방법.

【청구항 12】

10 고차구조의 PEG, 젤라틴 및 카테콜 유도체의 복합체, 및 하나 이상의 PEG 또는 이의 유도체가 순차적으로 채장 소도 세포 표면에 결합된 표면 개질된 채장 소도.

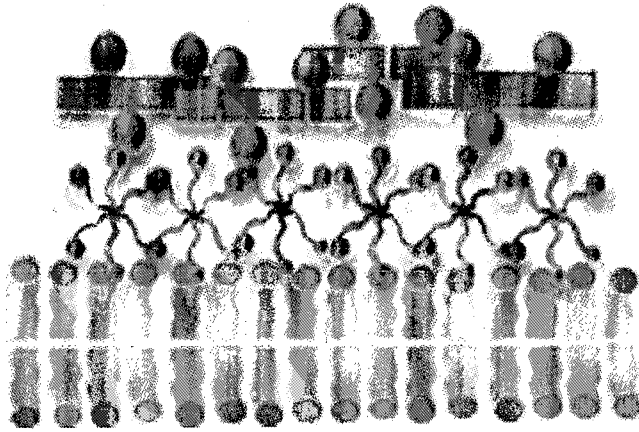
1/10

[도 1]



2/10

[도 2]



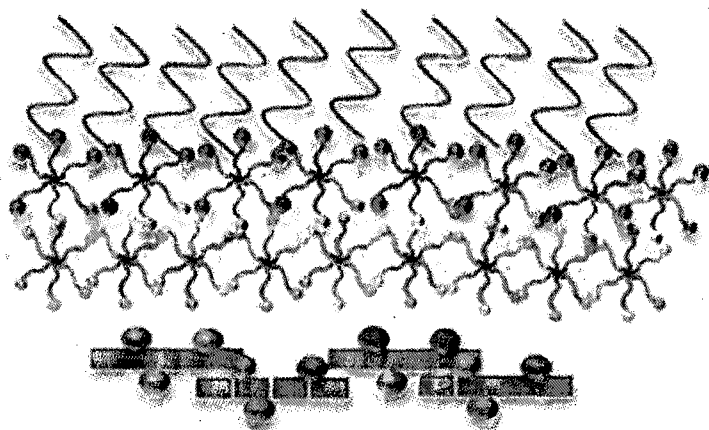
젤라틴 도파(Gelatin dopa)

6-arm PEG 지질

세포막

3/10

[도 3]



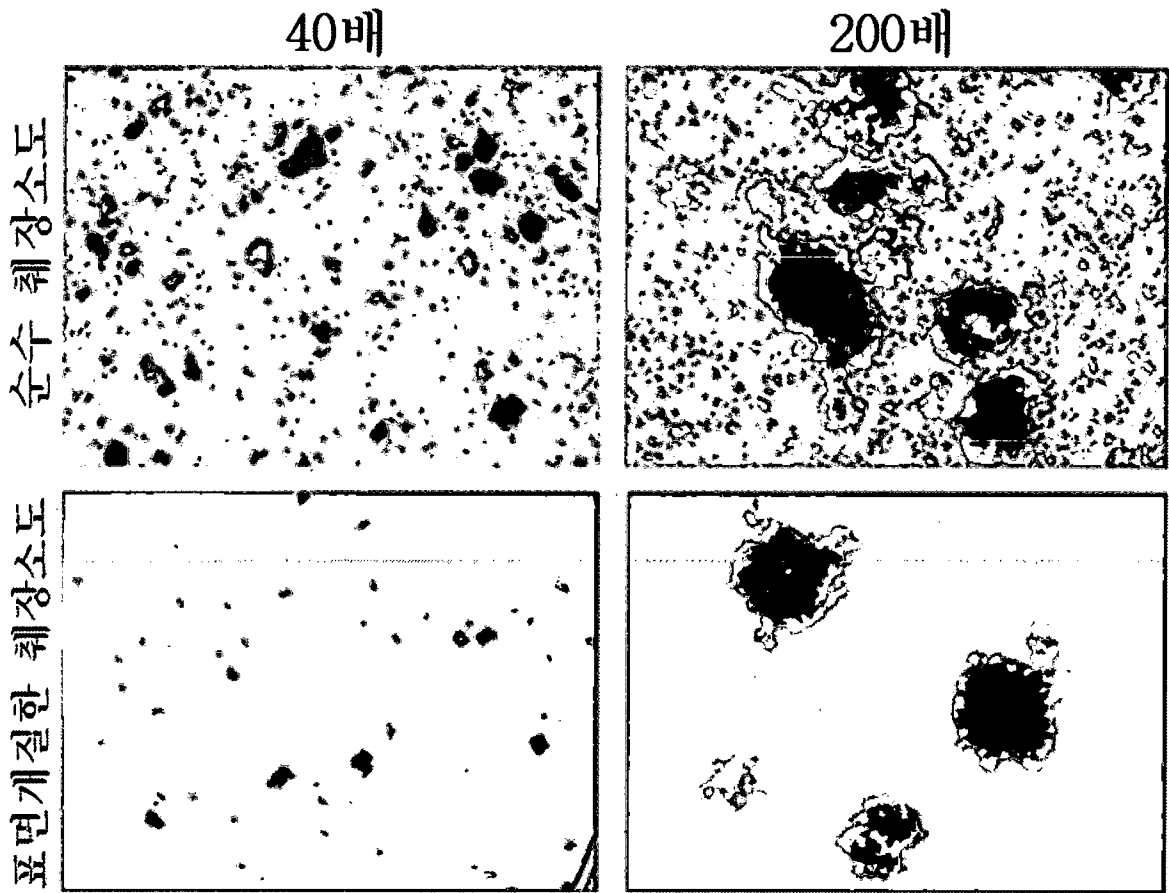
선형 PEG SH(linear PEG SH)

6-arm PEG DOPA

6-arm PEG SH

인조 세포외 기질

[도 4]

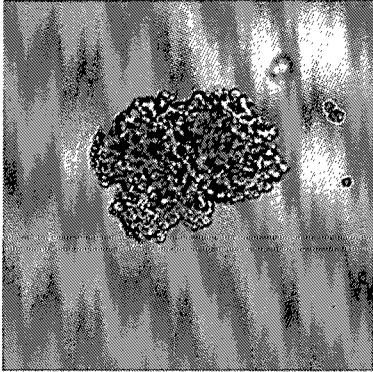


5/10

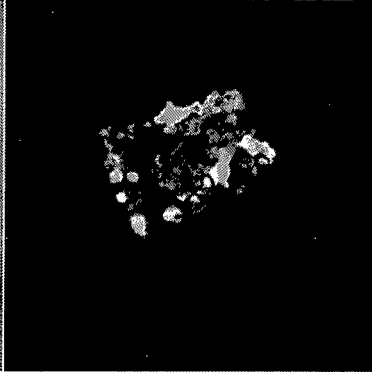
[도 5]

표면개질한
웨이퍼

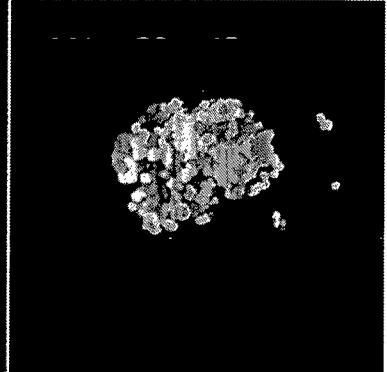
광학(optical)



중심(cenral)

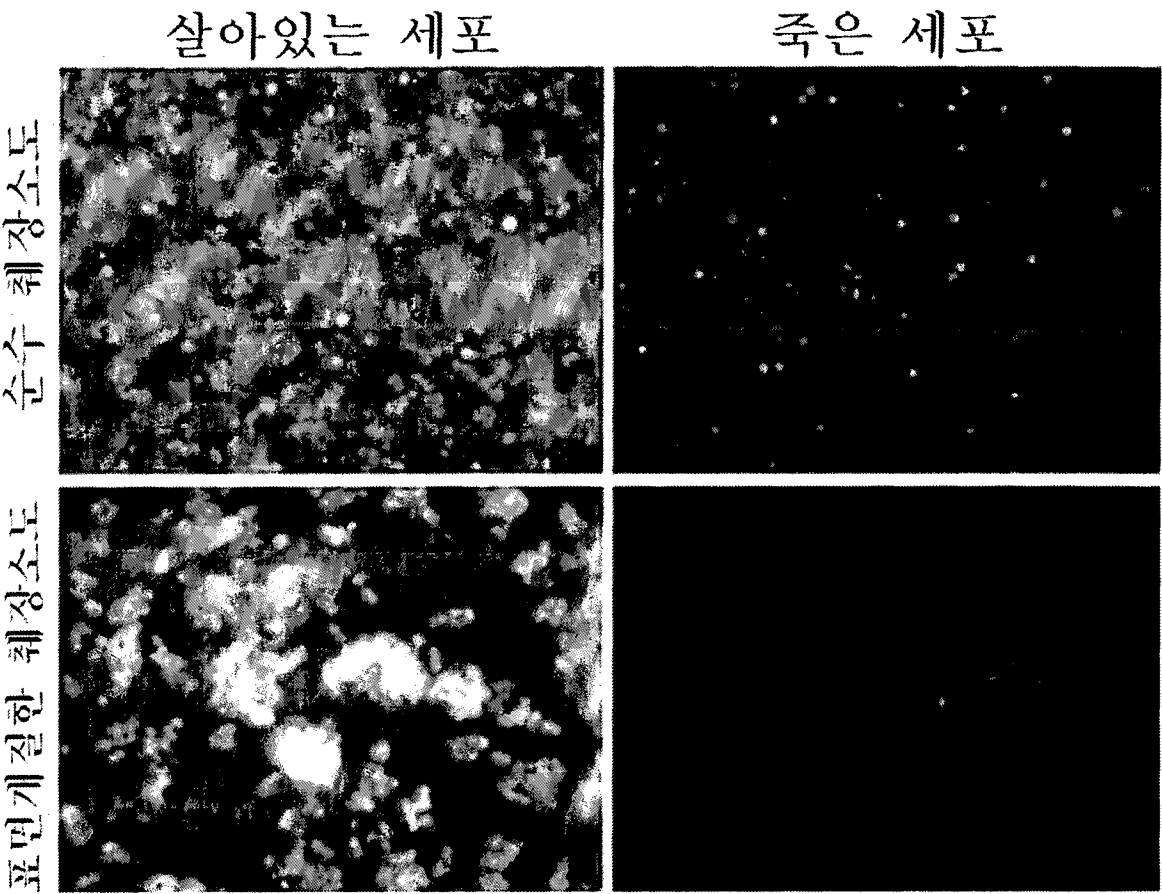


합침(merge)



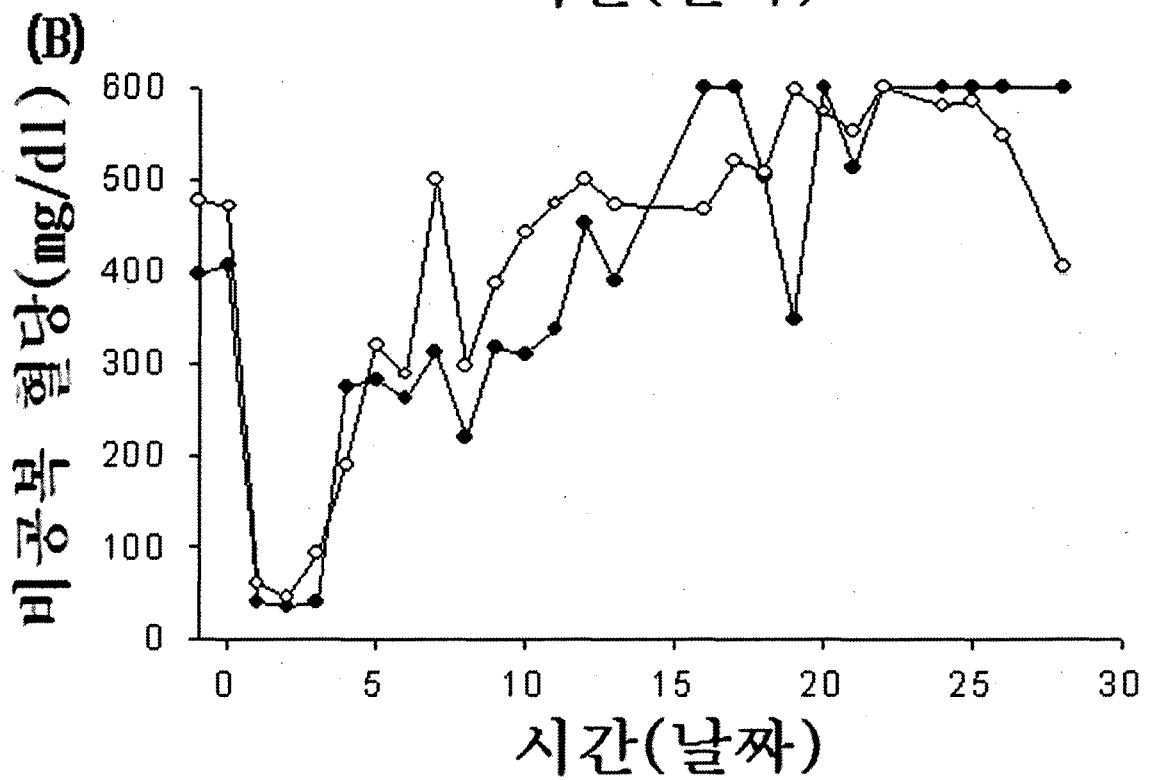
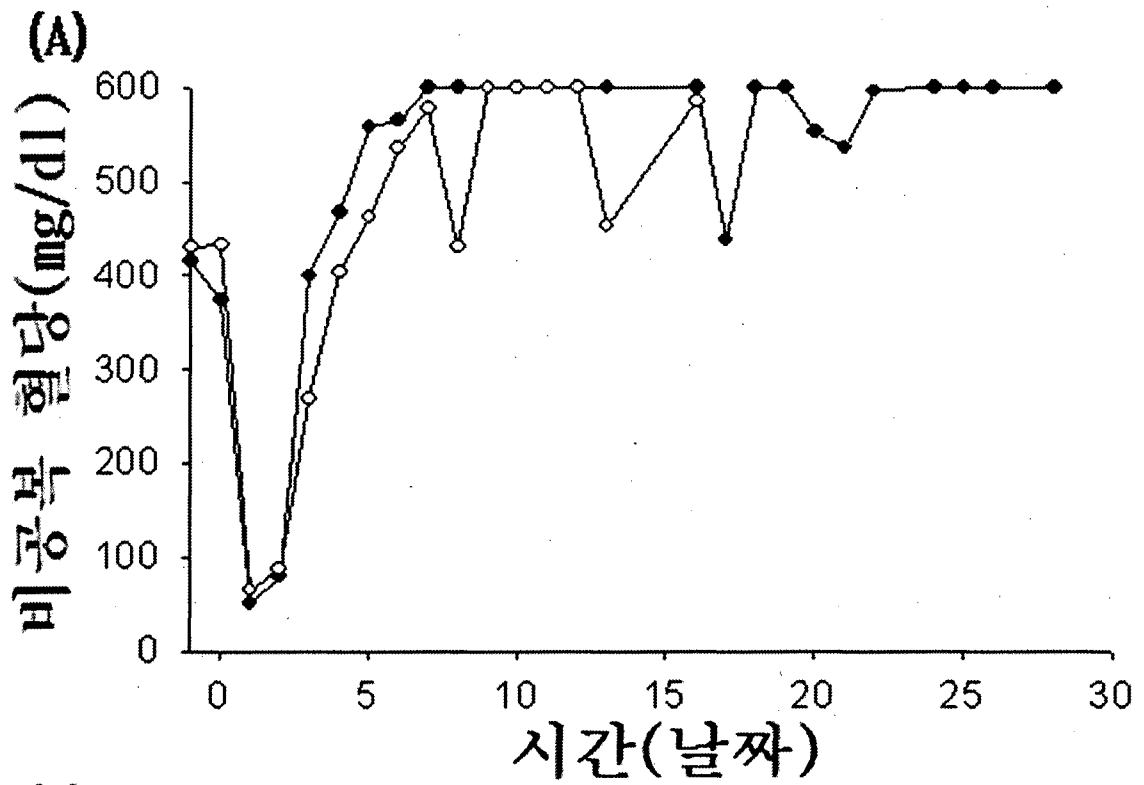
6/10

[도 6]



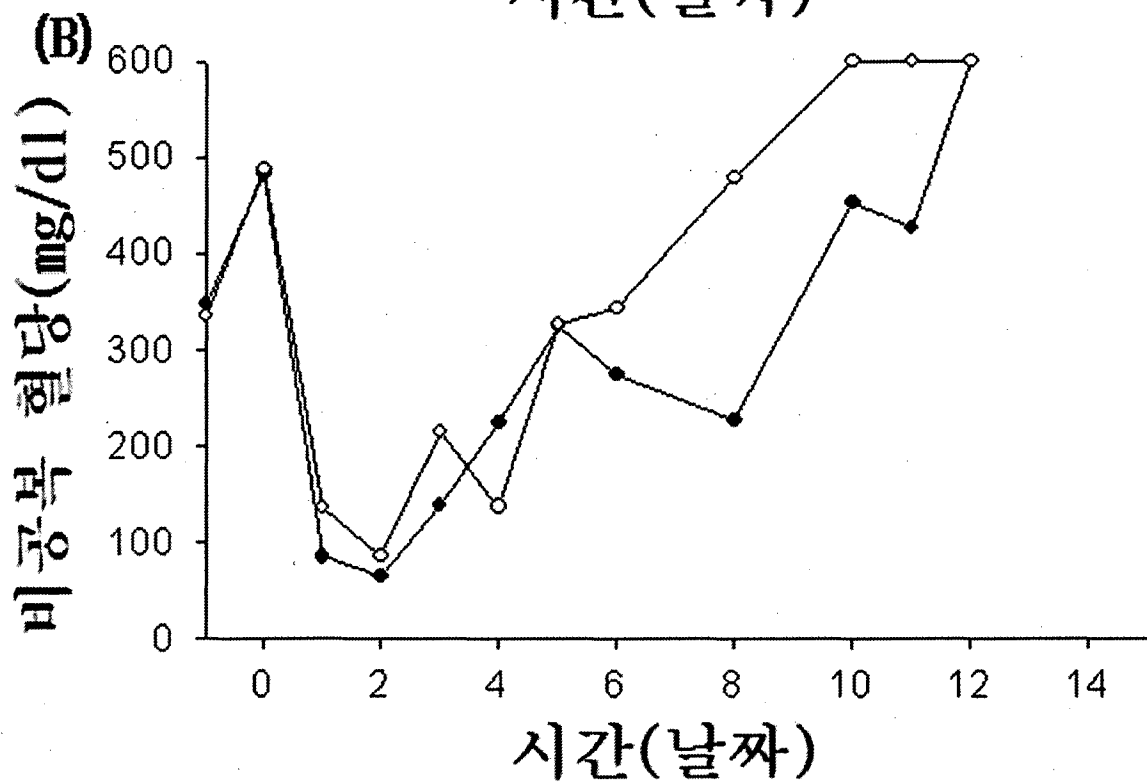
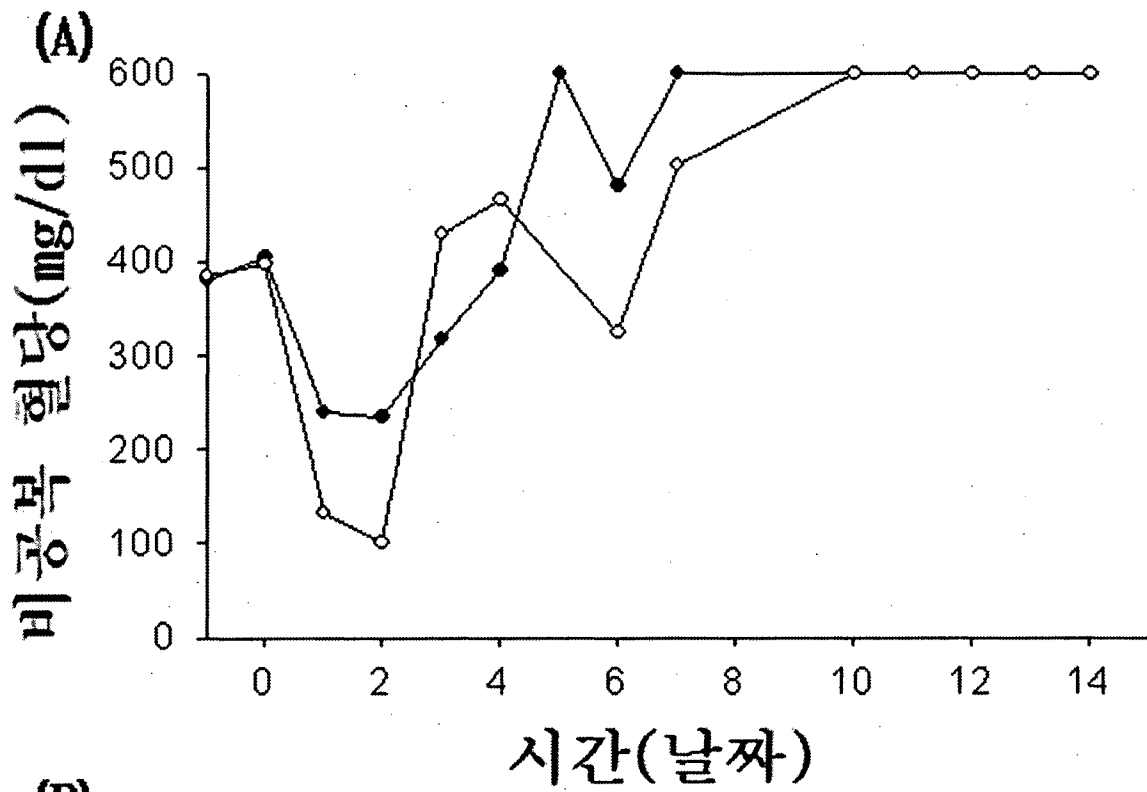
7/10

[도 7]



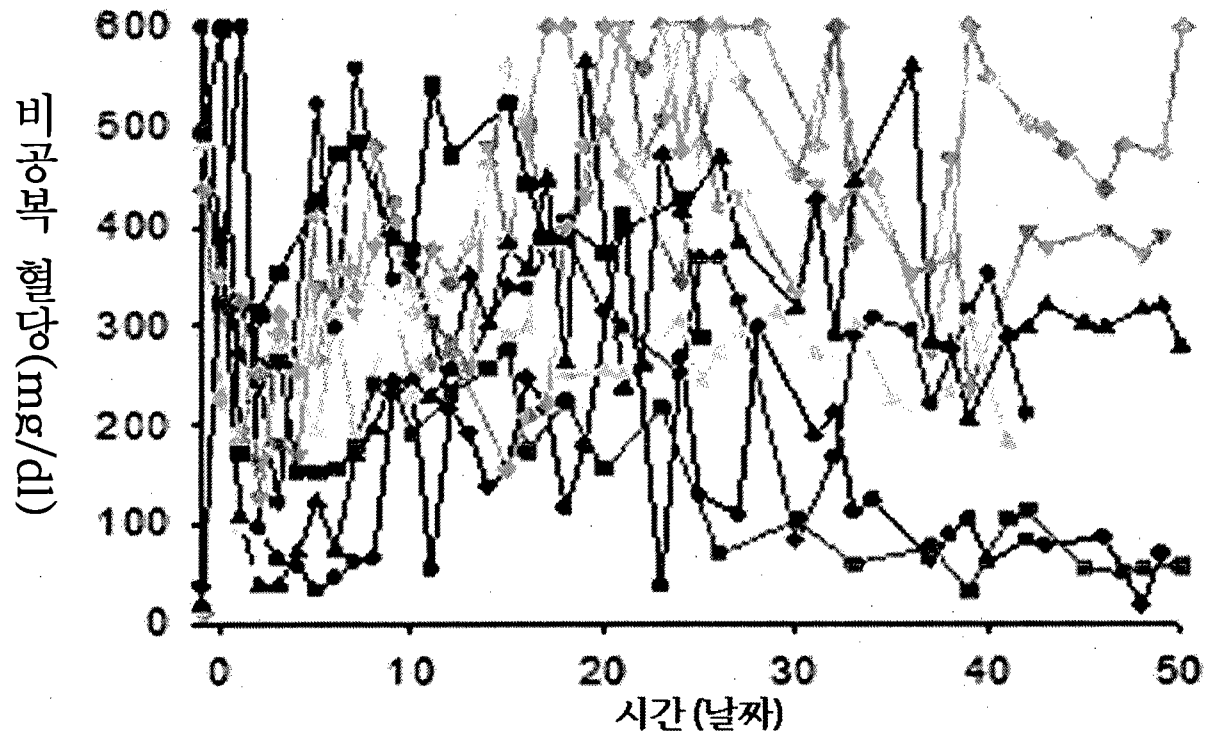
8/10

[도 8]



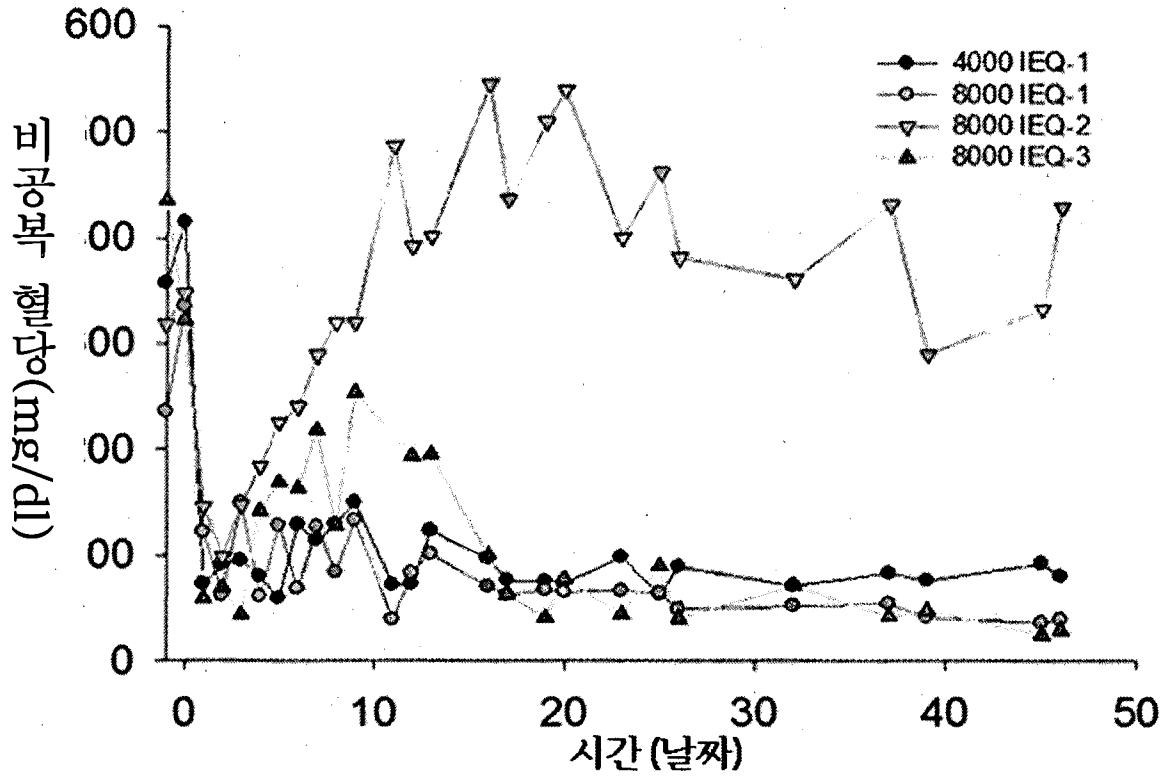
9/10

[도 9]



10/10

[도 10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/004364**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/071(2010.01)i, A61L 27/38(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)

C12N 5/071; A61L 27/50; A61K 9/20; A61F 2/04; A61K 9/28; A61L 27/38

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: polyethyleneglycol, catechol, heparin, pancreas, gelation, transplatation**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IM, B-H. et. al., "The effects of 8-arm-PEG-catechol/heparin shielding system and immunosuppressive drug, FK506 on the survival of intraportally allotransplanted islets", <i>Biomaterials</i> , 2013, vol. 34, pages 2098-2106. (Published online on 19 December 2012) See abstract; fig. 1.	1-12
A	JEONG, J-H. et al., "Surface camouflage of pancreatic islets using 6-arm-PEG-catechol in combined therapy with tacrolimus and anti-CD154 monoclonal antibody for xenotransplantation", <i>Biomaterials</i> , 2011, vol. 32, pages 7961-7970. (Published online on 09 August 2011) See abstract; fig. 1.	1-12
A	HWANG, Yong Hwa et al., "Enhancing Viability of Transplanted Pancreatic Islets by Using Biomimetic Polymer to Cure Type I Diabetes Mellitus", <i>Polymer Science and Technology</i> , October 2011, vol. 22, no. 5, pages 439-446. See pages 441-444.	1-12
A	KR 10-2012-0110856 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 10 October 2012 See abstract; figure 1.	1-12
A	KR 10-1220429 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 18 January 2013 See abstract; figures 2, 3.	1-12



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

"I" 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

26 JANUARY 2015 (26.01.2015)

Date of mailing of the international search report

26 JANUARY 2015 (26.01.2015)

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

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/004364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0110856 A	10/10/2012	NONE	
KR 10-1220429 B1	18/01/2013	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i, A61L 27/38(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/071; A61L 27/50; A61K 9/20; A61F 2/04; A61K 9/28; A61L 27/38

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: PEG, catechol, heparin, pancreas, gelation, transplatation

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	IM, B-H. et. al., 'The effects of 8-arm-PEG-catechol/heparin shielding system and immunosuppressive drug, FK506 on the survival of intraportally allotransplanted islets', Biomaterials, 2013년, 34권, 2098-2106면. (2012.12.19. 온라인 공개) 초록; Fig.1 참조.	1-12
A	JEONG, J-H. et al., 'Surface camouflage of pancreatic islets using 6-arm-PEG-catechol in combined therapy with tacrolimus and anti-CD154 monoclonal antibody for xenotransplantation', Biomaterials, 2011년, 32권, 7961-7970면. (2011.8.9. 온라인 공개) 초록; Fig.1 참조.	1-12
A	황용화 외 3인, '제1형 당뇨병 치료를 위한 생체 모사 고분자를 이용한 이식된 췌도 세포 생존율 증강 기술', 고분자 과학과 기술, 2011년 10월, 제22권, 제5호, 439-446면. 441-444면 참조.	1-12
A	KR 10-2012-0110856 A (서울대학교산학협력단) 2012.10.10. 초록; 도면 1 참조.	1-12
A	KR 10-1220429 B1 (서울대학교산학협력단) 2013.01.18. 초록; 도면 2, 3 참조.	1-12

☐ 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 01월 26일 (26.01.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 01월 26일 (26.01.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

이효진

전화번호 +82-42-481-8743



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2012-0110856 A

2012/10/10

없음

KR 10-1220429 B1

2013/01/18

없음