



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0035915
(43) 공개일자 2020년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7036653
(22) 출원일자(국제) 2018년05월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년12월11일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/053482
(87) 국제공개번호 WO 2018/211454
국제공개일자 2018년11월22일
(30) 우선권주장
110080 2017년05월17일 포르투갈(PT)
17179887.9 2017년07월05일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
유니버시다데 노바 데 리스보아
포르투갈, 1099-085 리스보아, 캠퍼스 데 캄폴리데
어쏘시에이션 포 더 어드밴스먼트 오브 티슈 엔지니어링 앤드 셀 베이스드 테크놀로지스 & 테라피즈 (에이4테크)-어쏘시아상
포르투갈, 4710-057 브라가, 캠퍼스 데 팔타, 디파트먼트 데 엔젠하리아 데 폴리메로스 3비에스 리서치 그룹, 유니버시다데 도 민호
노바 아이디 에프씨티 - 어쏘시에카오 파라 어 이노베이카오 에 데센블비멘토 다 에프씨티
포르투갈, 카파리카 2829-516, 캠퍼스 데 카파리카, 페이칼다데 데 시엔시아스 에 테크놀로지아 다 유니버시다데 노바 데 리스보아
(72) 발명자
크루즈 두아르테, 안나 리타
포르투갈, 브라가 4715-319, 5 에스쿠, 넘버 28, 루아 프로프. 카를로스 로이드 브라가
바보 데 알메이다 파이바, 알렉산더
포르투갈, 리스보아 1700-011, 루아 아폰소 로페즈 비에이라 넘버 35 3° 에스쿠.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최덕규

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물, 방법 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물, 방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 이 조성물은 세포, 유기체 및/또는 조직의 보존 및/또는 보호에 사용될 수 있다.

(72) 발명자

엘. 레이즈, 루이

포르투갈, 포르토 4250-242, 하비타카오 2.3, 101,
루아 아르퀘텍토 조아오 앤더슨

파이바 크라베이로, 리타 폴라

포르투갈, 코빌하 6200-142, 루아 마테우스 페르난
데스 넘버 68 4° 드토

마르케스 다 실바, 조아나 마리아

포르투갈, 귀마레스 4805-473, 루아 다 보아비스타
넘버 402 산타 레오카디아 데 브리테이로스

말티스타 데 카스트로, 바니아 이자벨

포르투갈, 귀마레스 4805-339, 빌라 데 폰테, 1
티12, 넘버195, 루아 베이가 데 카스텔라스

명세서

청구범위

청구항 1

수소 결합 주개(donor) 화합물 및 수소 결합 수용체 반개(acceptor) 화합물을 포함하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물에 관한 것으로,

폴리올로서 글리세롤; 당으로서 트레할로스; 및 선택적으로 요소 및/또는 아미노산, 또는 요소 및 아미노산을 포함하는 수용액을 포함하는 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 글리세롤; 트레할로스; 및 선택적으로 요소 및/또는 아미노산, 또는 요소 및 아미노산을 포함하는 수용액으로만 이루어지는 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 요소, 포도당, 프롤린 및 물을 포함하는 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 당:폴리올의 분자비가 1:0.5 - 1:40, 바람직하게는 1:7 - 1:30, 더 바람직하게는 1:10-1:20 사이인 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 요소:폴리올의 분자비가 1:0.25 - 1:10, 바람직하게는 1:1 - 1:5, 더 바람직하게는 1:3-1:4 사이인 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 요소:당의 분자비가 1:1 - 10:1, 바람직하게는 2:1 - 6:1, 더 바람직하게는 3:1-4:1 사이인 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산이 프롤린, 히스티딘, 글리신, 라이신, 트립토판, 아스파르트산, 알라닌, 글루탐산, 류신, 아이소류신, 발린, 아스파라긴, 세린, 글루타민, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 프롤린인 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 요소:폴리올:아미노산의 분자비가 1:1:0.25 - 3:3:1 사이인 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 요소:당:아미노산의 분자비가 1:1:1 - 3:2:1 사이이고, 바람직하게는 상기 요소:당:아미노산의 분자비가 1:1:1, 2:1:1, 3:1:1, 2:2:1, 3:2:1인 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 요소:당:아미노산:물의 분자비가 1:1:1:1 - 2:1:1:4, 바람직하게는 1:1:1:2, 1:1:1:3, 1:1:1:4, 2:1:1:1, 2:1:1:3인 것을 특징으로 하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 생존력 또는 조직의 증강자(enhancer)로서의 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물의 용도.

청구항 13

제12항에 있어서, 세포 또는 조직이 최고 8℃에서 보존되는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물의 용도.

청구항 14

제13항에 있어서, 세포 또는 조직이 최고 -4℃에서 보존되는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물의 용도.

청구항 15

제14항에 있어서, 세포 또는 조직이 최고 -20℃에서 보존되는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물의 용도.

청구항 16

제15항에 있어서, 세포 또는 조직이 최고 -80℃, 바람직하게는 최고 -196℃에서 보존되는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물, 방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 이 조성물은 세포, 유기체 및/또는 조직의 보존 및/또는 보호에 사용될 수 있다.

배경 기술

- [0002] 세포의 동결 과정 중에 두 개의 주요 사건이 발생한다. 주위 압력에서 그리고 고속 냉각 속도로 0°C 이하로 냉각되었을 때, 물은 6각형 또는 입방 결정 형태의 얼음을 형성한다. 빙정의 형성은 세포막 및 세포소기관을 손상시켜 세포 사멸을 야기할 수 있다. 저속 냉각은 결정 형성을 감소시키지만, 세포의 배치로 물의 삼투에 의해 야기된 세포 탈수 및 수축의 영향을 증가시키고, 이 또한 세포막 및 세포소기관에 물리적 스트레스를 야기하여 마찬가지로 세포 사멸을 일으킨다. 두 경우 모두 용질의 세포내 농도의 증가된 농도 또한 세포 사멸에 기여한다. 냉각 속도가 세포내 빙정 형성을 방지하기에 충분히 느리지만, 심각한 탈수 영향을 극복하기에 충분히 빠른, 최적의 냉각 속도를 구할 수도 있다. 그러나 온혈의(온혈동물) 동물로부터의 장기 세포의 경우 이 냉각 속도 범위를 찾는 것이 굉장히 어렵고 그리고 완전한 세포 생존력이 달성될 수 없다. 제어 냉각 속도에 의한 냉동보존은 원핵 유기체와 같은 특정한 경우에만 실행가능한 고비용 방법이다³⁻⁵.
- [0003] 수용액이 급속으로 냉각될 때 결정화가 방지되어, 그 결과 물은 유리전이 이하의 온도에서 유리고체로 유리화되기 전에 준안정의 비결정 고체 상태가 된다. 동물 세포의 경우, 물 유리화를 달성하는데 필요한 냉각 속도는 실현 가능하지 않고 그리고 동결보호제의 사용이 필수적이다. 이 조건에서는 세포가 빙정을 가지지 않은 것으로 여겨진다. 세포내 빙정의 방지는 세포 생존의 핵심이다⁶. 상이한 세포 및 조직은 냉각 속도 및 동결보호제에 다르게 반응한다. 최고의 냉각 조건을 결정하는데에는 아직도 실험이 가장 효율적인 방법이다⁷. 동결보호제는 분자량(고MW 또는 저MW) 또는 세포 내로의 침투 속도로 나뉘어질 수 있다: 빠르게 침투하는 에탄올, 에틸렌-글리콜 또는 메틸아세트아미드 또는 느리게 침투하는 글리세롤. 세포벽 및/또는 세포질막에 침투하지 않고 그리고 10 내지 40% 사이의 농도에서 세포의 동결보호를 제공하는, 노노-, 올리고 및 다당류와 같은 동결보호제, 단백질 및 바이오폴리머의 클래스(class) 또한 있다^{1,4}.
- [0004] 가장 널리 사용되는 동결보존제인 DMSO 외에, 일부 보고서는 글리세롤 또는 1,2 디올-프로판과 같은 폴리알코올(poly-alcohols)이 피부 또는 신경 조직과 같은 복합 세포 구조에 어느 정도 성공적으로 적용되었음을 나타낸다. 텍스트란 또는 트레할로스와 같은 비침투성 동결보호제 또한 복합 조직의 동결보호에 단독으로 또는 침투성 동결보호제와 조합으로 사용되었다. 트레할로스의 경우에는 침투성 동결보호제의 연합이 유익하다는 것이 관찰되었다^{3,7}.
- [0005] 비침투성 및 침투성 동결보호제의 작용 사이의 또 다른 중요한 차이는 염분 농도이다. 염분을 함유하는 용액에서는 온도가 감소할수록 염분 농도가 급격하게 증가하겠지만, 반면에 동결보호제가 첨가된 용액에서는 용질 농도가 동일한 방식으로 증가하겠지만 염분 농도가 더 낮을 것이다. 비침투성 동결보호제의 경우 오직 세포의 염분 농도만이 영향받고 그리고 높은 용질 농도는 세포막에 삼투성 스트레스(osmotic stress)를 야기한다. 이는 침투성 동결보호제의 경우에는 그렇지 않다. 이 경우에는 물이 밖으로 확산되는 동안 동결 보호제가 세포 내로 확산되어 원래 세포 부피를 유지하고 그리고 삼투성 스트레스를 감소시킨다. 삼투성 스트레스 외에, 유리화 과정에 필요한 고농도의 동결보호 제제가 낮은 물 화학 퍼텐셜 또는 화학 독성에 의한 손상을 야기할 수도 있다⁴.
- [0006] 살아있는 유기체가 극한 기온 폭(amplitudes)에서 생존하기 위해 발견한 전략은 상이한 생체 대사물의 조직된 생산에 의존한다.
- [0007] 악명 높은 광범위의 당, 폴리올 및 아미노산은 동물계에서 극한 기온차에 저항하기 위한 다중요소 시스템의 일부인 것으로 입증되었다. 이 지식은 전세기의 동결보호제 용액 개발의 기반이었지만, 이 지식은 최근까지 깊은 공융 시스템(deep eutectic systems)과 연관되지 않았다.
- [0008] 천연 깊은 공융 용매(NADES)는 당, 아미노산, 유기산 또는 콜린 유도체와 같은, 2개 이상의 고형 또는 액형 구성요소의 혼합물로 정의되고, 그의 개별 구성 성분들과 비교하여, 이는 특정한 조성물일 때 높은 녹는점 내림을 제시하여 상온 또는 거의 상온에서 액상이 된다²⁵.
- [0009] 동결보존 연구는 계속 발전하고 있었지만 깊은 공융 용매 및 세포에서 자연적으로 발생하는 DES(NADES)의 더 구체적인 역할의 더 최근의 이해가 더 효율적이고 자연 기반의 동결보존제의 개발을 위한 연구 기회의 창을 열어 주었다. 본질적으로 NADES는 수소 결합 주개 및 수소 결합 수용체 받개로 구성된다. NADES를 구성할 수 있는 상이한 분자들의 배열은 10의 6승 까지의 조합까지로 추산된다.
- [0010] 천연 깊은 공융 시스템 기반의 새로운 동결보호 시스템이 설계되었고 그리고 세포의 동결보존에 대한 거동을 평가하였다.

[0011] 이 사실들은 본 발명이 다루는 기술적인 문제를 실례를 사용하여 설명하기 위해 개시되었다.

발명의 내용

[0012] 동결은 음식, 장기 그리고 심지어는 살아있는 유기체의 장기적인 보존을 위한 최고의 기법으로 여겨진다. 온도가 떨어지면서 반응은 느려지고 그리고 미생물 활성은 최소로 감소된다. 보존에 있어서 선호되는 기법이지만, 동결보존은 여러 어려움을 제기한다. 물은 살아있는 유기체의 세포에서 가장 흔한 구성요소이고 그리고 온도가 떨어지고 물이 얼음으로 변하면 사는데 필수적인 구성요소가 유해하게 된다. 동결될 때의 물 결정화는 많은 경우 해동시키는 것으로 회복될 수 없는 방식으로 세포를 파괴시켜 살아있는 유기체 또는 장기에 세포 사멸을 일으킨다. 세포내 빙정의 수 및 크기를 제어하기 위한 특정한 동결 시간 변화도(gradient)를 사용하는 것 또는 물의 무정형화(amorphization)를 촉진시켜 결정화 과정을 일부 또는 완전하게 방지하는 동결보호제를 사용하는 것과 같은, 이러한 영향들을 최소화 시키는 여러 해결책이 있다. 더 복잡한 시스템을 위한 해결책은 동결보존제를 사용하는 것이지만, 때때로는 고농도의 동결보존제가 필요로 하게 되어 독성 문제를 일으킨다¹. 동결보존제가 높은 가치가 있는 시장이기는 하지만 그는 효율적인 해결책을 가지고 있지 않다. 산업에서의 이 기법의 실행의 예시는 주로 해동되었을 때 많은 수의 세포 사멸이 허용 가능한 배아, 정자 및 줄기세포 보관에 있다².

[0013] 이러한 화합물들은 천연 깊은 공용 용매(NADES)로부터의 구성요소로 정의되었고 그리고 DMSO 및 다른 독성 동결보호제의 사용을 피하는 동결보호 제제의 개발을 위한 대단한 잠재력을 제시한다.

[0014] 동결보호제/동결보존제는 생체 조직, 세포 또는 유기체를 동결 손상으로부터 보호하기 위해 사용되는 물질이다.

[0015] 본 발명은 다음의 이점을 갖는다:

[0016] 천연 및 생체적합성 분자를 동결보존제로 사용함;

[0017] DMSO와 같은 독성 동결보호 제제를 사용하는 것을 피함;

[0018] 보존 온도를 증가시킴(-196℃에서 8℃로); 바람직하게는 -50℃ 내지 -20℃ 사이;

[0019] 세포, 조직 및/또는 장기의 보관을 허용;

[0020] 보관 시간을 증가시킬 가능성.

[0021] 한 구체예에서 본 발명의 조성물은 DMSO가 없는 동결보호제를 사용한다.

[0022] 본 발명은 수소 결합 주개 화합물 및 수소 결합 수용체 반개 화합물을 포함하는 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물에 관한 것으로,

[0023] 폴리올로서 글리세롤; 당으로서 트레할로스; 및 선택적으로 요소 및/또는 아미노산, 또는 요소 및 아미노산을 포함하는 수용액을 포함한다.

[0024] 한 구체예에서 상기 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물은 글리세롤 및 트레할로스, 그리고 선택적으로 요소 및/또는 아미노산, 또는 요소 및 아미노산을 포함하는 수용액으로 이루어진다.

[0025] 한 구체예에서 상기 조성물은 제2 당을 더 포함할 수 있고, 상기 제2 당은 단당류, 이당류, 또는 다당류일 수 있고, 특히 당은 포도당, 과당 또는 그의 혼합물로 이루어지는 목록으로부터 선택될 수 있다.

[0026] 한 구체예에서 상기 조성물은 제1 폴리올을 더 포함할 수 있고, 상기 제2 폴리올은 글리세롤, 솔피톨, 만나톨, 또는 그의 혼합물로 이루어지는 목록으로부터 선택될 수 있다.

[0027] 한 구체예에서 당:폴리올의 분자비는 1:0.5 - 1:40; 바람직하게는 1:7 - 1:30; 더 바람직하게는 1:10-1:20 사이일 수 있다. 바람직하게는 상기 당이 트레할로스이고 상기 폴리올은 글리세롤이다.

[0028] 한 구체예에서 요소:폴리올의 분자비는 1:0.25 - 1:10; 바람직하게는 1:1 - 1:5; 더 바람직하게는 1:3-1:4 사이일 수 있다. 바람직하게는 상기 폴리올이 글리세롤이다.

[0029] 한 구체예에서 요소:당의 분자비는 1:1 - 10:1; 바람직하게는 2:1 - 6:1; 더 바람직하게는 3:1-4:1 사이일 수 있다. 바람직하게는 상기 당이 트레할로스이다.

[0030] 한 구체예에서 상기 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물이 아미노산을 더 포함할 수 있고, 특히 상기 아미노산은 다음으로 이루어지는 목록으로부터 선택된다: 프롤린, 히스티딘, 글리신, 라이신, 트립토판,

아스파르트산, 알라닌, 글루탐산, 류신, 아이소류신, 발린, 아스파라긴, 세린, 글루타민, 또는 그의 혼합물. 더 바람직하게는 프롤린이다.

- [0031] 한 구체예에서 요소:폴리올:아미노산의 분자비는 1:1:0.25 - 3:3:1 사이일 수 있다. 바람직하게는 상기 아미노산이 프롤린이다.
- [0032] 한 구체예에서 요소:폴리올:아미노산의 분자비는 다음일 수 있다:
- [0033] 1:1:0.25, 1:1:0.5, 1:1:0.75, 1:1:1,
- [0034] 2:1:0.25, 2:1:0.5, 2:1:0.75, 2:1:1,
- [0035] 3:1:0.25, 3:1:0.5, 3:1:0.75, 3:1:1,
- [0036] 1:2:0.25, 1:2:0.5, 1:2:0.75, 1:2:1,
- [0037] 1:3:0.25, 1:3:0.5, 1:3:0.75, 1:3:1,
- [0038] 2:2:0.25, 2:2:0.5, 2:2:0.75, 2:2:1,
- [0039] 3:3:0.25, 3:3:0.5, 3:3:0.75, 3:3:1.
- [0040] 한 구체예에서 요소:당:아미노산의 분자비는 1:1:1 - 3:2:1 사이일 수 있다. 바람직하게는 상기 아미노산이 프롤린이고 그리고/또는 상기 당이 트레할로스/포도당이다.
- [0041] 한 구체예에서 요소:당:아미노산의 분자비는 1:1:1, 2:1:1, 3:1:1, 2:2:1, 3:2:1일 수 있다. 바람직하게는 상기 아미노산이 프롤린이고 그리고/또는 상기 당이 트레할로스/포도당이다.
- [0042] 한 구체예에서 상기 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물은 물을 더 포함할 수 있다.
- [0043] 한 구체예에서 요소:당:아미노산:물의 분자비는 1:1:1:1 - 2:1:1:4; 바람직하게는 1:1:1:2, 1:1:1:3, 1:1:1:4, 2:1:1:1, 2:1:1:3일 수 있다. 바람직하게는 상기 아미노산이 프롤린이고 그리고/또는 상기 당이 트레할로스/포도당이다.
- [0044] 한 구체예에서 요소:당:프롤린:물의 분자비는 1:1:1:1 - 1:1:1:4일 수 있다.
- [0045] 한 구체예에서 상기 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물은 세포 또는 조직의 보존을 위한 것일 수 있고, 상기 세포 또는 조직은 최고 8°C, 바람직하게는 최고 -4°C, 바람직하게는 최고 -20°C, 바람직하게는 최고 -80°C, 바람직하게는 최고 -196°C에서 보존된다.
- [0046] 본 발명은 세포 생존력의 증강자(enhancer)로서 상기 동결보호제 및/또는 동결보존제 조성물의 용도에 관한 것이기도 하다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 다음의 도면들은 본 발명의 설명을 실례를 사용하여 설명하기 위한 바람직한 구체예를 제공하는 것으로, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 보아서는 안 된다.
- 도 1:** 순수 및 물의 상이한 혼합물 그리고 -90°C 내지 40°C 사이에서 1:30 분자비의 DES 트레할로스:글리세롤에 대해 10°C · min⁻¹에서 얻은 서모그램(thermograms).
- 도 2:** 상이한 농도의 천연 깊은 공융 시스템과 접촉하고 있을 때 세포 생존력.
- 도 3:** 트레할로스:글리세롤 1:30 및 DMSO 시스템의 상이한 농도와 접촉하고 있을 때 세포 생존력. %는 바탕 용액의 w/v; X:Y는 화합물의 분자비이다.
- 도 4:** 상이한 시스템으로 동결보존한 후에 보존된 세포의 형태학적 관찰. 우측은 MTC 생존력 시험의 결과. %는 바탕 용액의 w/v; X:Y는 화합물의 분자비이다.
- 도 5:** 상이한 경로, 생존-사멸(live-dead) 분석법, MTS 생존력 및 DNA 분석 후의 세포의 생존력. %는 바탕 용액의 w/v; X:Y는 화합물의 분자비이다.
- 도 6:** 해동 후(P0) 그리고 동결보호제로서 상이한 시스템 및 상이한 보관 온도를 사용한 제1 계대(passage)(P1)에 대해 MTS 분석법으로 구한 세포 생존력.

도 7: 글리세롤(A) 및 트레할로스(B) 시스템의 ¹H NMR 스펙트럼, 모든 공명이 기여되었다(attributed).

도 8: 트레할로스:글리세롤(1:30) 시스템의 ¹H NMR 스펙트럼, 모든 공명이 기여되었다.

도 9: 트레할로스:글리세롤(1:30) 시스템의 2D NMR(HMBC) 스펙트럼, 모든 공명이 기여되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 한 구체예에서는 트레할로스-글리세롤(분자비 1:30; D(+)) 이수 트레할로스, 99%, Sigma-Aldrich, 글리세롤, 99.9%, Sigma-Aldrich)을 포함하는 천연 깊은 공용 용액(NADES)이 투명한 액체가 형성될 때까지 교반하면서 70 °C로 가열하는 것으로 조제되었다.
- [0049] 한 구체예에서 NADES 샘플의 광학 특성화(optical characterization)는 라이카 디지털 카메라와 연결된 올림푸스 투과 현미경을 사용하여 실온에서 편광 현미경법(polarized light microscopy: POM)으로 얻었다. 커버는 1-2 방울의 NADES로 조제되었고 그리고 현미경에서 관찰되었다.
- [0050] 한 구체예에서는 시차 주사 열량분석법(DSC) 실험이 다음과 같이 실행되었다: 열량분석 실험은 TA Instruments Inc.(Tzero DSC technology)의 Heat Flow T4P 옵션에서 작동하는 DSC Q2000에서 실행되었다. 측정은 50 mL min⁻¹의 유속에서 무수의 순도가 높은 질소 하에서 실행되었다. DSC Tzero 보정은 -90 내지 200°C의 온도 범위에서 실행되었다. 순수한 화합물 물, 트레할로스, 글리세롤 및 순수한 DES(물 첨가 없음)가 10°C/min의 속도로 -90 내지 100°C(순수의 경우 120°C) 사이의 냉각 및 가열 과정을 거쳤다. 이 샘플들은 Tzero(알루미늄) 팬에 수분 증발을 허용하기 위한 핀홀을 가진 Tzero 밀폐 뚜껑으로 가두어졌다. DES와 물의 혼합물이 DSC로 분석되었을 때, -90°C 내지 40°C 사이의 냉각 과정이 마찬가지로 10°C/min의 속도로 실행되었지만, 이 경우 어느 물 손실이 라도 방지하기 위해 밀폐 팬에 핀홀이 없었다. 일부 샘플에서는 결과로 발생하는 물과 DES 혼합물의 열적 거동에 미치는 영향을 보기 위해 주사 속도가 다양했다. 그 경우에는 가열 주사 속도가 5°C/min 및 20°C/min이었다.
- [0051] 한 구체예에서는 L929 세포주가 DMEM(Sigma, USA)에서 성장되었고, 10% 열비활성화 소태아 혈청(FBS, Biochron AG, Germany) 및 1% 항생제-항진균제(antibiotic-antimycotic)(Gibco, USA)로 보충되었다. 세포는 5% CO₂를 가진 37°C의 가습된 분위기(humidified atmosphere)에서 배양되었다.
- [0052] 한 구체예에서는 조제된 시스템의 생존력이 세포와 직접적으로 접촉하는 방법(NADES와 세포 배양의 직접적인 접촉)을 사용하여 측정되었다. 상기 세포는 총 1x10⁴ 세포/웰로 24시간 동안 96웰에 시딩되었다(seeded). 24시간 후, 배지가 제거되었고 그리고 상이한 백분율, 특히 배양 배지에서 1%, 5%, 10% 및 20%의 NADES를 가진 추출물이 첨가되었다. 이 추출물과 배양된 세포의 생존력은 24시간 그리고 72시간 뒤에 MTS 분석법으로 측정되었다.
- [0053] 한 구체예에서는 세포가 동결되고 해동되었는데, 구체적으로는 세포가 원심분리법(5분 동안 300rpm)으로 수집되었고 그리고 FBS 및 동결보존제(DMSO 또는 Treh-Gly; FBS에서 5% 및 10% 동결보존제)를 가진 냉각 혼합물에 현탁되었다. 세포 및 동결 배지는 동결튜브(cryotubes)(Nunc)에 분배되었고(1x10⁶ 세포/1mL), 그리고 즉각 -20°C의 냉동 박스(freezing box)(Mr.Frosty)에 2시간 동안 배치되었다. 나중에 그는 -80°C에 24시간 동안 배치되었고 그리고는 동결튜브가 액체 질소 안에 놓였다. 상기 세포는 1, 2, 및 3개월 동안 냉동되었다. 대조군으로서 트레할로스 및 글리세롤이 단독으로 동일한 농도로 사용되었다.
- [0054] 한 구체예에서는 해동을 위하여 동결튜브가 약 1분 동안 37°C 물중탕으로 빠르게 데워졌다. 원심분리 튜브에 5mL의 배양 배지가 첨가되었고 그리고 세포 현탁액이 이동되었다. 이 현탁액은 원심분리 되었다(5분 동안 300rpm, 21°C), 그리고 상청액이 제거되었다. 상기 세포는 신선한 배양 배지에 다시 현탁되었고 그리고 96웰 플레이트에 시딩되었다.
- [0055] 한 구체예에서 MTS 세포 생존력 분석법은 다음과 같이 실시되었다: 동결보존제의 영향은 24시간 및 72시간 배양한 뒤 MTS 분석법(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA)으로 측정되었다. 페인트 시간(time point)에 세포가 PBS로 세척되었고 그리고 5:1 비율의 무혈청 세포 배양 배지 및 MTS 시약의 혼합물이 첨가되었고 그리고 5% CO₂를 함유한 가습된 분위기에서 37°C에서 4시간 동안 배양되었다. 이 기간 다음, 각 웰의 100 μL가 96웰 플레이트로 이동되었다. 흡광도는 마이크로플레이트 분광계(Synergy HT, Bio-TEK, USA)를 사용하여 490nm의 파장에서 측정되었다. 흡광도 결과로부터 맹검액(MTS 시약과 배양 배지 MT

S)에서 얻은 흡광도를 뺐다.

[0056] 한 구체예에서는 생존/사멸 세포 생존력 분석법(칼세인 AM/프로피듐 요오드화물(PI) 염색) (한 웰 당 n=5 샘플)이 세포 생존력을 평가하기 위해 사용되었다. 세포는 DMEM 배지에 2 μL 칼세인 AM(1mg mL⁻¹, Molecular Probes, Invitrogen, USA) 및 3 μL PI(1mg mL⁻¹, Molecular Probes, Invitrogen, USA)와 함께 그리고 차광되어 20분 동안 배양되었다. 상기 세포는 잔여 형광성을 제거하기 위해 PBS로 세척되었고 그리고 도립 현미경(Axio Observer, ZEISS, Germany)으로 가시화(visualized)되었다.

[0057] 한 구체예에서는 DAPI-팔로이딘 분석법 형태학적 특성화가 실행되었다. 세포는 45분 동안 10% 포르말린 용액으로 고정되었다. 포르말린이 제거되고 PBS로 교체되었다. DAPI-팔로이딘 분석법을 위하여 4,6-디아미디노-2-페니인돌, 디락테이트(DAPI, 20mg mL⁻¹, BIOTOIUM, USA) 및 팔로이딘-테트라메틸로다민 B 이소티오시아네이트(팔로이딘, 10mg mL⁻¹, Sigma-Aldrich, USA)(각 웰 당 n=5 샘플, 3회 반복)가 사용되었다. 팔로이딘의 용액이 5 μL의 팔로이딘 및 2 μL의 DAPI에 1mL PBS로 조제되었고, 그리고 세포에 첨가되었고, 그리고 차광되어 45분 동안 실온에서 배양되었다. 그런 다음 샘플은 PBS로 3회 세척되었고, 그리고 도립 현미경(Axio Observer, ZEISS, Germany)으로 가시화되었다. 이미지는 슬라이드 사이에 4.5 μm(10x) 및 2 μm(20x)의 해상도로 Z스택 모드로 얻었다.

[0058] 한 구체예에서 그리고 DNA 정량화를 위하여 Quant-IT PicoGreen dsDNA 분석법 키트가 제조사의 설명서에 따라 사용되었다. 처음에 96웰 플레이트에서 세포는 삼투압 충격 및 열충격으로 용해되었고 그리고 분석법을 위해 상청액이 수집되었다. 각 샘플 또는 표준 분석을 위해 3회 반복하여 실행되었다. 흡광도는 염료의 분광 성질에 따라 485nm 및 528nm가 각자 여기 및 방출 파장을 사용하여 마이크로플레이트 판독기(Bio-TEK, USA)에서 판독되었다. DNA 양을 계산하기 위하여 흡광도 값이 보정 곡선으로 조정되었다.

[0059] 한 구체예에서는 새로운 NADES가 표 1에 실린 대사물의 조합에 근거하여, 하지만 이에 제한되지는 않고, 더 구체적으로는 트레할로스, 포도당, 글리세롤에 더하여 다른 아미노산, 폴리알코올 및 당 기반으로 개발되었다.

표 1

[0060]

| 구성요소 1 | 구성요소2 | 구성요소 3 | 구성요소 4 |
|--------|-----------------------|---|-----------|
| 트레할로스 | - | - | - |
| 트레할로스 | 포도당 | 폴리올(솔비톨 및 만니톨) | - |
| 글리세롤 | - | - | - |
| 트레할로스 | - | - | - |
| 트레할로스 | 포도당 | 아미노산(글리신, 라이신 및 트립토판) | - |
| 트레할로스 | 글리세롤 | 프롤린 | - |
| 트레할로스 | 다른 당(과당 및 포도당) | 폴리올(솔비톨 및 만니톨) | 아미노산(알라닌) |
| 글리세롤 | 폴리올(솔비톨) | 트레할로스 | - |
| 트레할로스 | 폴리올(솔비톨 및 만니톨) | - | - |
| 포도당 | 아미노산(프롤린, 글루타민 및 알라닌) | - | - |
| 포도당 | - | - | - |
| 요소 | 포도당 | - | - |
| 요소 | 포도당 | 아미노산(아스파르트산, 알라닌, 글루탐산, 류신, 아이소류신, 발린, 아스파라긴, 세린) | - |

[0061] 표 1. NADES의 형성에 사용될 수 있는 천연 대사물의 가능한 조합의 목록

[0062] 한 구체예에서는 이 작업에서 상이한 분자비를 가진 상이한 조합이 생산되었다(표 2).

표 2

[0063]

| 구성요소 1 | 구성요소 2 | 구성요소 3 | 구성요소 4 | 분자비 |
|--------|--------|------------------|--------|---------|
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (1:1:1) |

| | | | | |
|-------|------|------------------|------------------|-----------|
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (1:2:2) |
| 요소 | 포도당 | - | - | (2:1) |
| 요소 | 포도당 | - | - | (3:1) |
| 요소 | 포도당 | - | - | (4:1) |
| 요소 | 포도당 | - | - | (5:1) |
| 요소 | 포도당 | - | - | (6:1) |
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (6:1:6) |
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (1:1:4) |
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (1:1:3) |
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (2:1:3) |
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (2:1:2) |
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (2:1:1) |
| 요소 | 포도당 | H ₂ O | - | (1:1:5) |
| 요소 | 포도당 | 프롤린 | H ₂ O | (1:1:1:3) |
| 요소 | 포도당 | 프롤린 | H ₂ O | (1:1:1:4) |
| 요소 | 포도당 | 프롤린 | H ₂ O | (2:1:1:1) |
| 요소 | 포도당 | 프롤린 | - | (3:1:1) |
| 요소 | 포도당 | 프롤린 | - | (2:2:1) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:1) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:1:5) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (2:1) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (2:1:4) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:2) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:2:4) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:7) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:8) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:8:10) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:5:10) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:9) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:9:4) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:3) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:3:5) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (3:1) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (3:1:6) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:20) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:20:10) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:21:6) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:22) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:22:4) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:23) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | H ₂ O | - | (1:23:10) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:25) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | - | - | (1:30) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | 프롤린 | H ₂ O | (1:5:1:2) |
| 트레할로스 | 글리세롤 | 프롤린 | H ₂ O | (1:5:1:2) |
| 요소 | 글리세롤 | - | - | (1:1) |
| 요소 | 글리세롤 | - | - | (2:1) |
| 요소 | 글리세롤 | - | - | (1:2) |
| 요소 | 글리세롤 | - | - | (1:3) |

| | | | | |
|-------|------|------------------|---|------------|
| 요소 | 글리세롤 | - | - | (1:4) |
| 요소 | 글리세롤 | 프롤린 | - | (1:2:1) |
| 요소 | 글리세롤 | 히스티딘 | - | (1:2:1) |
| 요소 | 글리세롤 | 히스티딘 | - | (1:2:0.5) |
| 요소 | 글리세롤 | 히스티딘 | - | (1:2:0.25) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (1:1) |
| 트레할로스 | 만니톨 | H ₂ O | - | (1:1:4) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (1:2) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (2:1) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (1:6) |
| 트레할로스 | 만니톨 | H ₂ O | - | (1:6:6) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (3:1) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (4:1) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (1:11) |
| 트레할로스 | 만니톨 | - | - | (1:22) |

[0064] 표 2. 상이한 시스템의 목록

[0065] 한 구체예에서는 실온 이하 또는 그에 근접한 용해 온도(melting temperature)를 제시하는 것들에 있어서 새로운 NADES의 예비(preliminary) 생존력을 구하기 위하여, 상이한 조성물에서 물이 NADES와 혼합될 것이다. NADES/물 시스템의 열적 특성화는 시차 주사 열량분석법(DSC)을 통해 실행될 것이다.

[0066] 한 구체예에서는 유리화 및/또는 용해 온도의 상당한 감소의 형성에 요구되는 NADES의 최소 농도가 연구되었다. 냉각-가열 사이클에서 발생하는 위상 전이의 이해는 동결보존제로서의 시스템의 평가에 대단히 중요하다. 결정화는 동적 현상이고, 그러므로 용융 온도의 상당한 감소가 발생하는지 또는 결정화 현상을 완전히 피하여 유리 전이 온도에서만 관찰되는지, 즉 물의 완전한 유리화가 달성되는지를 알아내기 위하여, 상이한 냉각 및 가열 속도가 -120°C 내지 40°C 내에서 시험되었다. 그에 더하여, 한 기간 동안 무정형의 물질을 저온으로 유지하는 것으로(가열 냉각), 결정의 형성이 촉진될 수 있다.

[0067] 한 구체예에서 그리고 물에서 DES 트레할로스:글리세롤(1:30)의 영향을 평가하기 위해, 상이한 백분율의 물 및 DES(10wt% 간격으로)를 가진 여러 혼합물이 조제되었다. 이 DES의 물 결정화를 방지하는 잠재력을 보기 위하여, 이 혼합물 각각의 열적 거동이 DCS로 분석되었다. 도 1은 순수의 서모그램 및 조제된 DES의 서모그램을 도시한다. DES 서모그램에 있어서는, 적어도 DSC 탐지 한계까지는, 열적 사건이 발생하지 않는다는 것이 관찰되었다. 특정 양의 트레할로스:글리세롤이 물에 첨가되었을 때, 그의 열적 거동이 영향을 받고, 그리고 변화는 상기 혼합물에 있는 트레할로스:글리세롤의 양에 따라 결정된다. 60wt% 이상의 트레할로스:글리세롤 가진 샘플에 있어서, 서모그램에서 열적 사건이 관찰되지 않았고, 이는 혼합물이 물 결정이 존재한다는 증거가 없는, 무정형 물질로서 거동한다는 것을 의미한다. H₂O 및 40:60의 wt% 비율의 트레할로스:글리세롤이 혼합되었을 때, 냉결정화 피크(peak) 및 용해 피크가 DSC에서 관찰되었지만(도 1), 여전히 결정화 피크는 관찰되지 않았다. 더 많은 양의 물(50 내지 90wt%)에서는 용해 피크가 항상 관찰되었다. 이 피크로부터 상기 피크의 시작으로 정의되는 용해 온도(T_m)가 계산될 수 있고, 그리고 상기 피크 아래의 면적으로부터 용해 엔탈피 변화(ΔH_m)를 구할 수 있다.

[0068] 한 구체예에서는 물 용해 온도의 상당한 감소를 보이거나 또는 완전히 유리화되는 NADES/물 혼합물에 있어서 독성 시험이 실행되었다. NADES 구성요소는 인체에서 자연적으로 발생하는 것이고 독성 문제가 생기지 않아야 하지만, NADES를 형성하기 위한 두 가지 구성요소 사이의 상호작용이 사전에 알려지지 않은 독성을 야기할 수도 있다. 선택된 NADES가 실제로 동결보존제로 사용될 수 있다는 것을 보장하기 위해서는 그가 조직에 어느 유의한 독성도 제시하지 않는다는 것이 가장 중요하다. NADES의 독성을 계산하기 위하여, NADES/물 혼합물의 세포독성이 다음의 ISO 가이드라인을 따라 평가되었다. 흡광도를 사용하여 상이한 농도에 대해 일부분의 세포독성이 평가되어 세포 생존력을 구했다. 도 2는 시험된 상이한 시스템에 실행된 생존력 시험의 결과를 도시한다.

[0069] 한 구체예에서는 동결보호 제제로 사용되는 황금 기준(gold standard) DMSO와 비교했을 때, 제제의 독성 프로파일(toxicity profile)에서의 차이가 현저하다(도 3). 시스템 Treh:Gly(1:30)은 10wt%의 농도까지는 37°C에서 세포와 접촉하는 좋은 생존력 결과를 제시한다. DMSO와 접촉하는 세포는 1 또는 5%와 같은 낮은 농도에서조차 굉장히 낮은 생존력을 제시하고 그리고 배양 배지에서 DMSO의 농도를 10% 및 20%로 증가시키는 것은 세포 사멸

로 이어진다.

- [0070] 한 구체예에서는 동결보존제로서 NADES의 성능의 시험관내 생체 평가가 L929 세포주를 사용하여 평가되었다. 앞서 언급된 바와 같이 동결보존은 삼투성 스트레스와 연관된 저온 손상(chilling injury)을 야기할 수 있고, 그러므로 개발된 NADES 제제와 접촉하고 있을 때 세포 삼투 내성 및 막 완전성이 연구되어야 한다.
- [0071] 한 구체예에서는 동결보존된 세포가 상이한 기간(1, 2 및 3 개월) 동안 -20℃, -80℃ 및 -196℃에서 그리고 상이한 시스템의 상이한 농도에서, 항상 대조군으로 사용된 DMSO와 비교해 보면서, 보관되어 유지되었다. 해동 과정 후 상기 세포는 현미경법으로 평가되었다. 이는 상이한 세포 유형 및 보관 조건에 대해 동결보존제로서 NADES의 영향에 대한 증거를 제공할 것이다.
- [0072] 한 구체예에서 그리고 다른 구체예에 추가적으로, 세포 생존력을 평가하고 그리고 해동 후 세포막의 완전성을 확인하기 위해 생존-사멸 분석법 및 Dapi-팔로이딘 시험이 실행되었다. 도 4는 형태학적 분석 및 세포 생존력에 대한 제1 시험을 도시한다. 이미지로부터 관찰될 수 있는 바와 같이 10% DMSO를 가진 세포 그리고 트레할로스:글리세롤(1:30)을 가진 세포의 동결보존이 유사한 반응을 가졌다. 다른 한편으로는, 트레할로스 또는 글리세롤만 단독으로 사용했을 때는 세포 생존력이 다소 저하된다.
- [0073] 한 구체예에서는 MTS 생존력 시험이 이 결과들을 확인시켜준다. 이런 이유로 실제로 구성요소 단독과 비교했을 때 시스템 트레할로스:글리세롤의 존재로 인한 상승 효과가 있다.
- [0074] 한 구체예에서는 두 시스템 사이에 세포의 형태학이 유사하고 그리고 계대 사이에 차이 또한 없다. DAPI-팔로이딘은 세포막의 완전성 및 배양 후 세포의 길쭉한 형태를 보여준다.
- [0075] 한 구체예에서는 상이한 시스템이 상이한 보관 온도, 특히 -196℃, -80℃ 및 -20℃ 하에서 시험되었다. 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 세포를 보존하고 그리고 -80℃에서 그의 생존력을 유지하는 것이 가능하다. 상이한 시스템이 시험되었고 그리고 DMSO에 필적하는 결과를 얻었다.
- [0076] 한 구체예에서는, 놀랍게도 시스템 요소:포도당:프롤린:H₂O(1:1:1:2)가 동결보호제로 사용되었을 때 세포 생존력을 저해시키지 않고도 세포가 -20℃에서 적어도 1개월 동안 보관될 수 있고, 그리고 뿐만 아니라 연구된 다른 시스템에서 일어난 것과는 달리 다시 플레이트되고 성장(P1)될 수 있다.
- [0077] 핵자기 공명(NMR) 분광학이 NADES에 수소 결합이 존재한다는 것을 입증하기 위해 사용되었다. 이 연구에서는 ¹H NMR이 Treh:Gly(1:30)(도 8), Treh(도 7b) 및 Gly(도 7a)에 적용되었고 그리고 2D NMR(HMBC)이 Treh:Gly(1:30)(도 9)에 적용되었다. Treh:Gly(1:30)에서 Treh와 Gly 사이에 있는 수소 결합의 존재를 관찰하는 것이 가능하며, 이가 공유 혼합물이라는 것을 입증한다.
- [0078] 본 명세서는 어느 방식으로도 기술된 구체예에 제한되는 것으로 보아서는 안 되고 그리고 당업계의 숙련자라면 그의 많은 가능한 변경을 내다볼 수 있을 것이다.
- [0079] 상기에 기술된 구체예들은 조합 가능하다.
- [0080] 하기의 청구항은 본 발명의 특정한 구체예를 더 제시한다.
- [0081] **참조문헌**
- [0082] (1) Hub, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms q. 2003, 46, 205-229.
- [0083] (2) Karlsson, J. O. M.; Toner, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues. Biomaterials 1996, 17 (3), 243-256.
- [0084] (3) Liu, D.; Pan, F. Advances in Cryopreservation of Organs*. 2016, 36 (2), 153-161.
- [0085] (4) FAO. Basic principles of cryopreservation. Cryoconservation Anim. Genet. Resour. 2012, 85-94.
- [0086] (5) Segall, P. E. Low Temperature Preservation in Medicine and Biology, edited by M. J. Ashwood-Smith and J. Farrant. Med. Phys. 1982, 9 (3), 19-44.
- [0087] (6) Huebinger, J.; Han, H. M.; Hofnagel, O.; Vetter, I. R.; Bastiaens, P. I. H.; Grabenbauer, M. Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization. Biophys. J. 2016, 110 (4), 840-849.

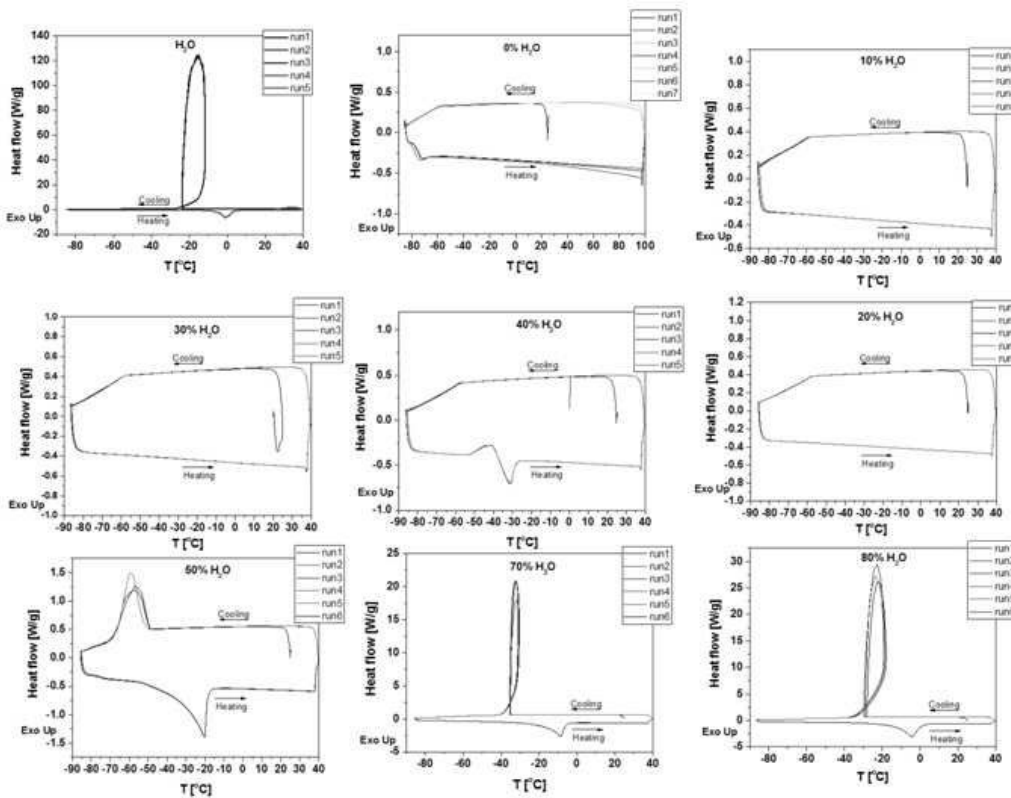
- [0088] (7) Bakhach, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis* 2009, 5 (3), 119-126.
- [0089] (8) John M. Kimble. *Global Climate Change and Cold Regions Ecosystems*; R Lal, R M Kimble, B. A. S., Ed.; CRC Press, 2000.
- [0090] (9) Walters, K. R.; Sformo, T.; Barnes, B. M.; Duman, J. G. Freeze tolerance in an arctic Alaska stonefly. *J. Exp. Biol.* 2009, 212 (Pt 2), 305-312.
- [0091] (10) Sømme, L.; Meier, T. Cold tolerance in Tardigrada from Dronning Maud Land, Antarctica. *Polar Biol.* 1995, 15 (3), 221-224.
- [0092] (11) Right, J. C. W. Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades? . 2001, 240 (August 2000), 563-582.
- [0093] (12) Westh, P.; Ramlov, H. Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *Journal of Experimental Zoology.* 1991, pp 303-311.
- [0094] (13) Hengherr, S.; Heyer, A. G.; Kϕhler, H. R.; Schill, R. O. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades - Evidence for divergence in responses to dehydration. *FEBS J.* 2008, 275 (2), 281-288.
- [0095] (14) Kostal, V.; Dolezal, P.; Rozsypal, J.; Moravcova, M.; Zahradnickova, H.; Simek, P. Physiological and biochemical analysis of overwintering and cold tolerance in two Central European populations of the spruce bark beetle, *Ips typographus*. *J. Insect Physiol.* 2011, 57 (8), 1136-1146.
- [0096] (15) Kostal, V.; Simek, P. Dynamics of cold hardiness, supercooling and cryoprotectants in diapausing and non-diapausing pupae of the cabbage root fly, *Delia radicum* L. *J. Insect Physiol.* 1995, 41 (7), 627-634.
- [0097] (16) Overgaard, J.; Malmendal, A.; Sϕrensen, J. G.; Bundy, J. G.; Loeschcke, V.; Nielsen, N. C.; Holmstrup, M. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 2007, 53 (12), 1218-1232.
- [0098] (17) Lee, R.; Dommel, R.; Joplin, K.; Denlinger, D. Cryobiology of the freeze-tolerant gall fly *Eurosta solidaginis*: overwintering energetics and heat shock proteins. *Clim. Res.* 1995, 5, 61-67.
- [0099] (18) Rozsypal, J.; Kostal, V.; Zahradnickova, H.; Simek, P. Overwintering Strategy and Mechanisms of Cold Tolerance in the Codling Moth (*Cydia pomonella*). *PLoS One* 2013, 8 (4).
- [0100] (19) Lalouette, L.; Kostal, V.; Colinet, H.; Gagneul, D.; Renault, D. Cold exposure and associated metabolic changes in adult tropical beetles exposed to fluctuating thermal regimes. *FEBS J.* 2007, 274 (7), 1759-1767.
- [0101] (20) Morrissey, R. E.; Baust, J. G. The ontogeny of cold tolerance in the gall fly, *Eurosta solidaginis*. *J. Insect Physiol.* 1976, 22 (3), 431-437.
- [0102] (21) Lee, K. Y.; Chang, Y. D.; Kim, Y. G. Trehalose, a Major Sugar Cryoprotectant of the Overwintering Rice Water Weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Asia. Pac. Entomol.* 2002, 5 (1), 35-41.
- [0103] (22) Kostal, V.; Zahradnickova, H.; Simek, P.; Zeleny, J. Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *J. Insect Physiol.* 2007, 53 (6), 580-586.
- [0104] (23) Sformo, T.; Walters, K.; Jeannet, K.; Wowk, B.; Fahy, G. M.; Barnes, B. M.; Duman, J. G. Deep supercooling, vitrification and limited survival to -100oC in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae). *J. Exp. Biol.* 2010, 213, 502-509.
- [0105] (24) Choi, Y. H.; van Spronsen, J.; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular

metabolism and physiology? Plant Physiol. 2011, 156 (4), 1701-1705.

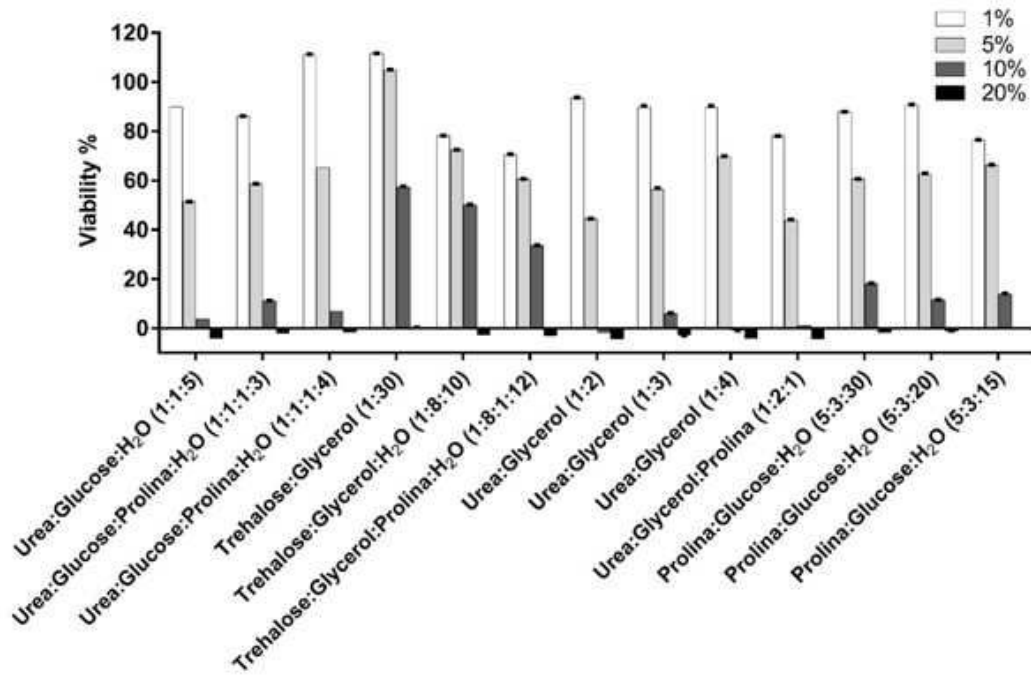
- [0106] (25) Paiva, A.; Craveiro, R.; Aroso, I.; Martins, M.; Reis, R. L.; Duarte, A. R. C.; Paiva, Alexandre; Craveiro, Rita; Aroso, Ivo; Martins, Marta; Reis, Rui; Duarte, A. R. Natural Deep Eutectic Solvents - Solvents for the 21st century. *Sustain. Chem. Eng.* 2014, ASAP.
- [0107] (26) Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents. *J. Nat. Prod.* 2013, 76 (11), 2162-2173.
- [0108] (27) Francisco, M.; van den Bruinhorst, A.; Kroon, M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, 52 (11), 3074-3085.
- [0109] (28) Durand, E.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures. *Biochimie* 2016, 120, 119-123.

도면

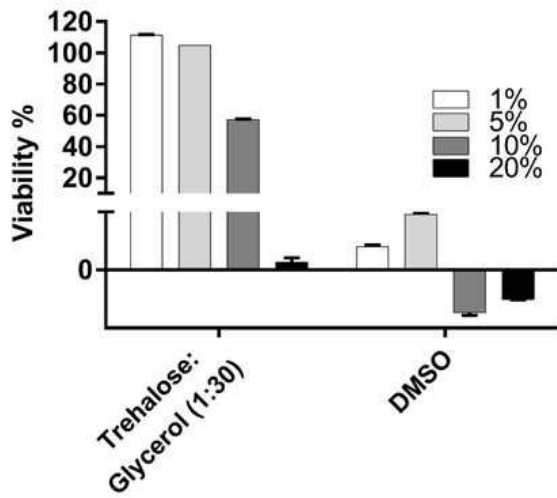
도면1



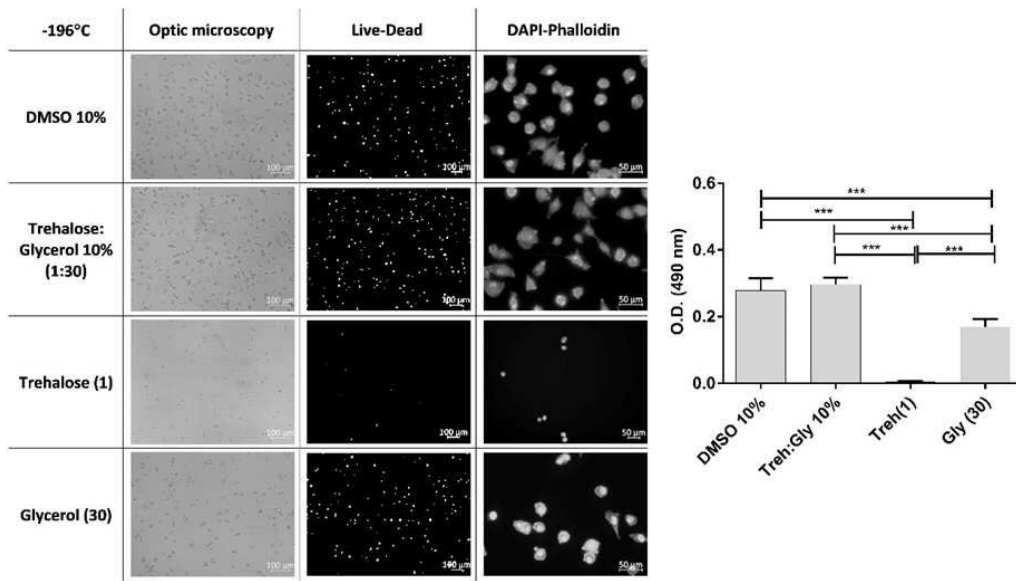
도면2



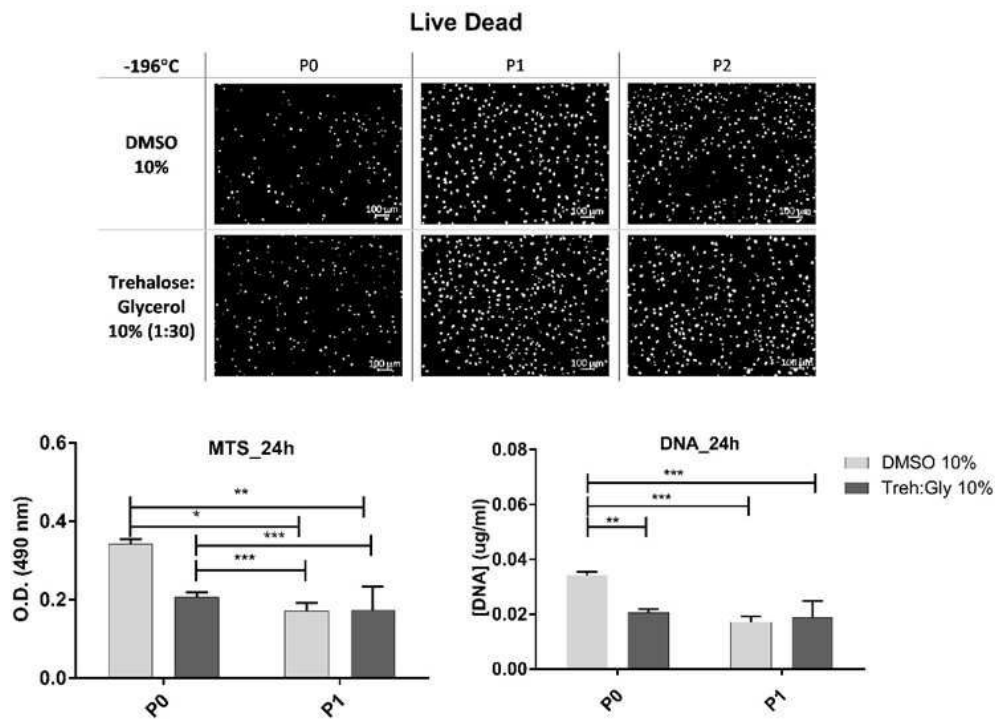
도면3



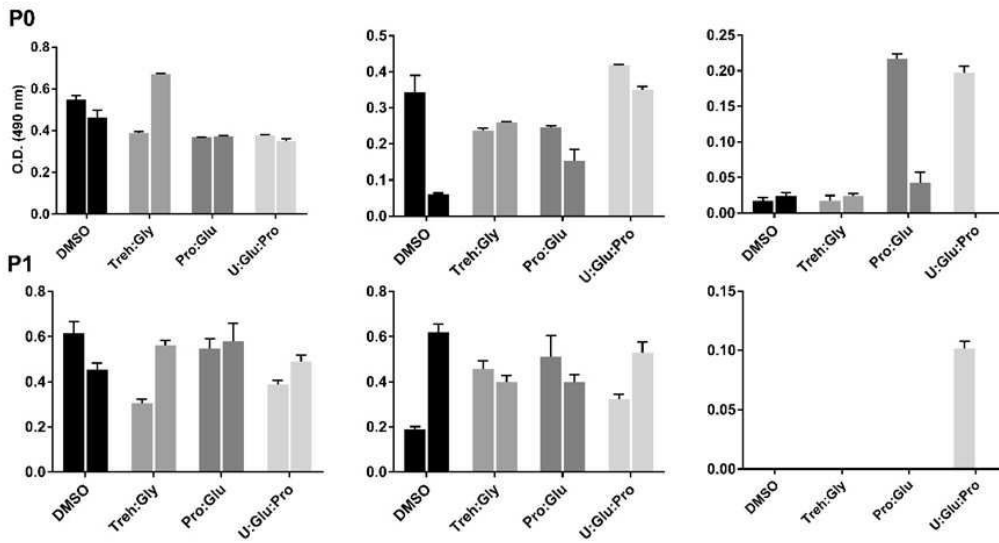
도면4



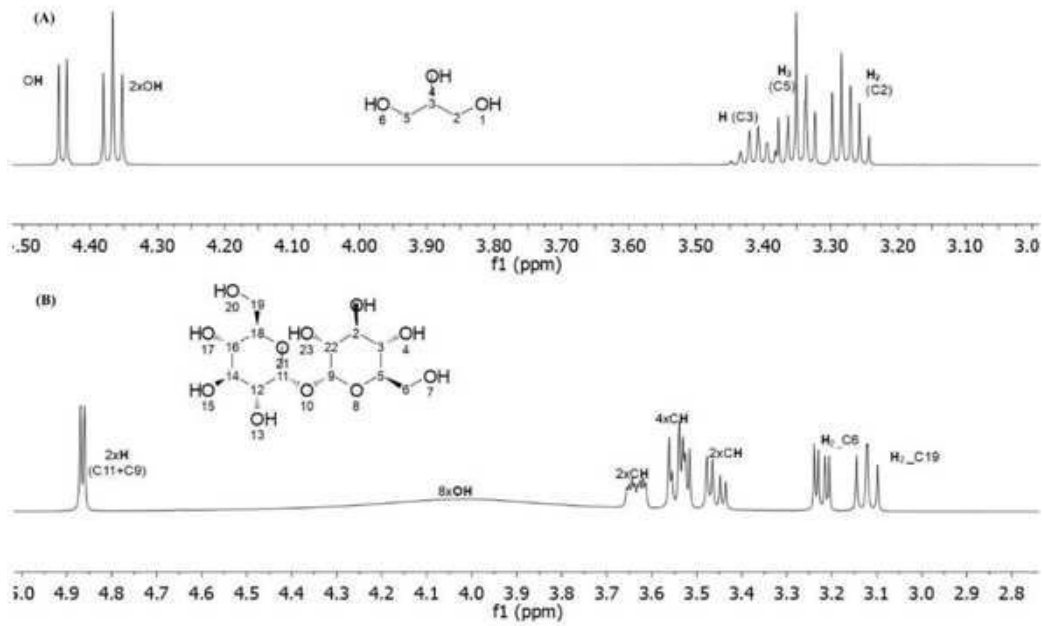
도면5



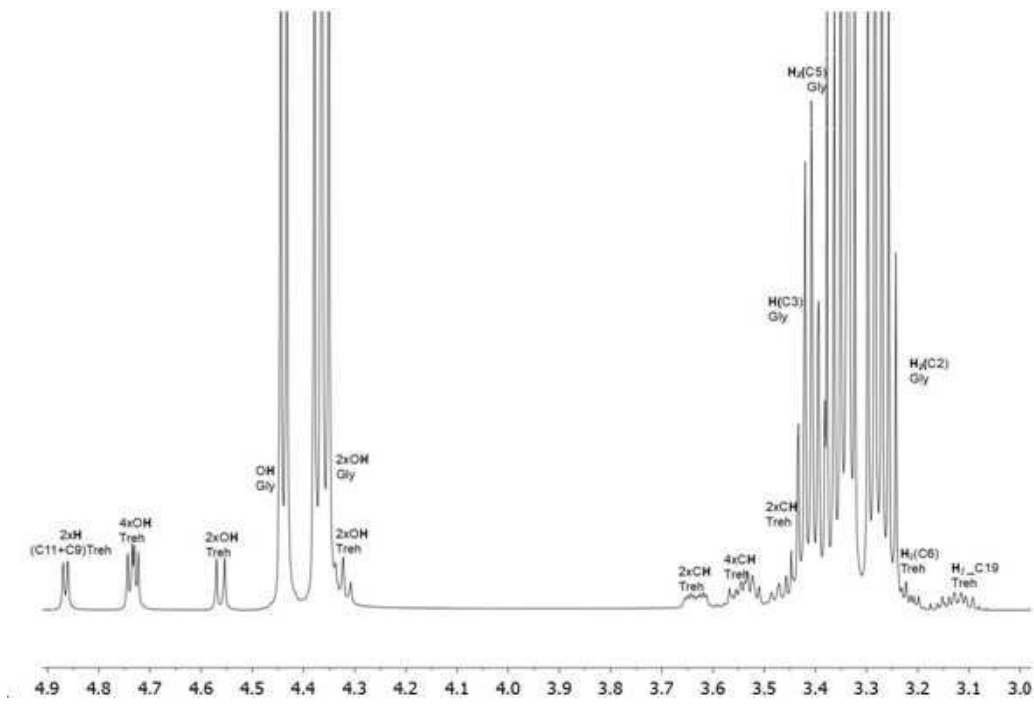
도면6



도면7



도면8



도면9

