



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0070128
(43) 공개일자 2021년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) A23L 3/3463 (2017.01)
C07C 13/567 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
A23L 3/3463 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2019-0160221
(22) 출원일자 2019년12월04일
심사청구일자 2019년12월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
이은지
서울특별시 마포구 백범로 170, 102동 1103호(공덕동, 공덕더샵아파트)
이창환
서울특별시 서초구 서초대로64길 83, 101동 702호(서초동, 월드 메르디앙)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

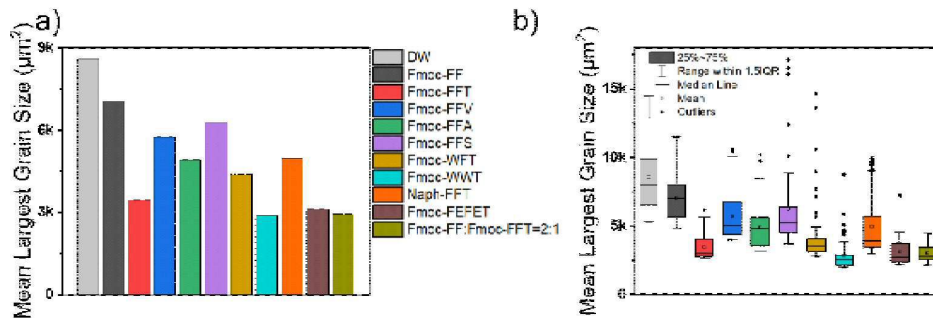
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 자기 조립 화합물을 포함하는 항-동결 조성물

(57) 요약

본 발명은 Fmoc (플루오레닐메틸옥시카보닐, Fluorenylmethyloxycarbonyl)에 2개 내지 5개의 아미노산, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 아미노산이 펩티드 결합으로 연결된 화합물을 포함하는 화합물을 포함하는 결빙 제어용 조성물, 세포 동결용 조성물, 및 식품 동결용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

C07C 13/567 (2013.01)

C12N 5/0602 (2013.01)

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

광주과학기술원

광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)

(72) 발명자

안동준

서울특별시 서초구 사임당로19길 10, 102동 802호
(서초동, 서초현대아파트)

김인혜

전라북도 군산시 조촌로 214, 903동 1502호(
경암동, 경암 제일 오투그란데 아파트)

이예담

서울특별시 은평구 증산로1길 26, 102동 803호(수
색동, DMC청구아파트)

김하연

경상북도 경산시 진량읍 일연로 747, 105동 1103
호(이안 경산진량 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3D1A1039421

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 미래소재디스커버리 사업

연구과제명 DNA 기반 결빙제어소재 개발 및 평가

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교

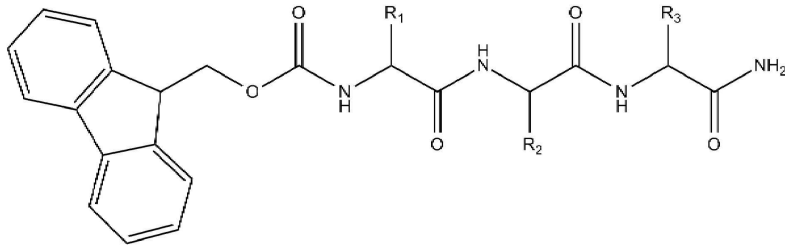
연구기간 2017.09.01 ~ 2019.12.31

명세서

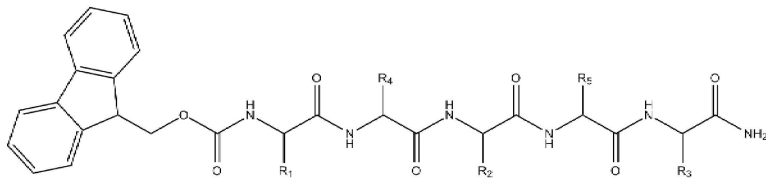
청구범위

청구항 1

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 결빙 제어용 조성물:

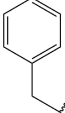
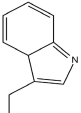


[화학식 1]



[화학식 2]

상기 화학식 1 또는 2에서,

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는  이고,

R_3 는 , , , , 또는  이고,

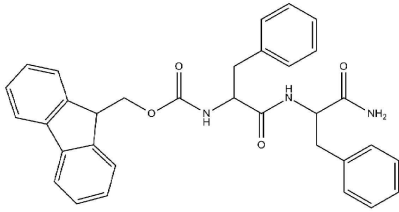
R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 , 또는  이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 자기 조립 (self-assembly)되어 피브릴(fibril) 또는 시트(sheet) 형상의 구조물을 형성하는, 결빙 제어용 조성물.

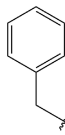
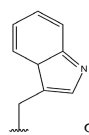
청구항 3

제1항에 있어서, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 더 포함하고, 이 때 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하고, 화학식 3로 표시되는 화합물 및 화학식 1로 표시되는 화합물이 2:1 (mole:mole)의 비율로 포함된, 결빙 제어용 조성물:



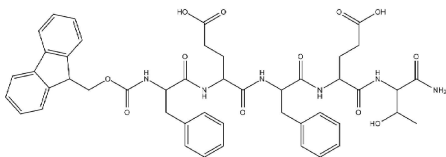
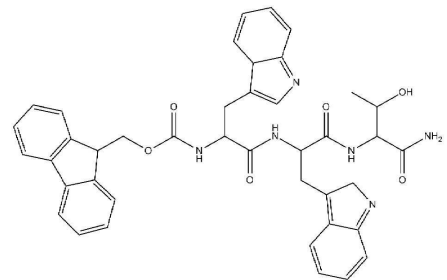
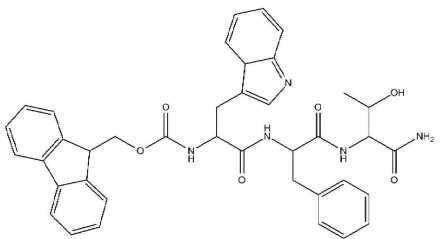
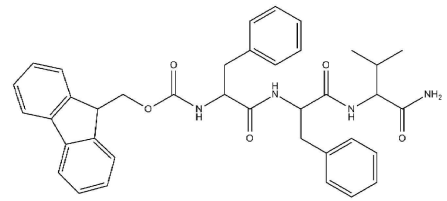
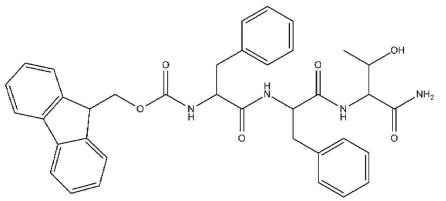
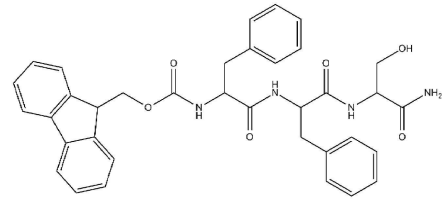
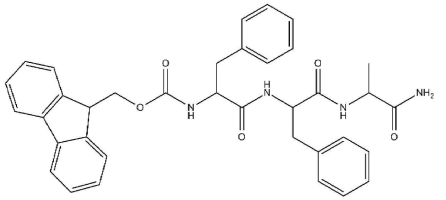
[화학식 3]

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는  이고, R_3 는  인, 결빙 제어용 조성물.

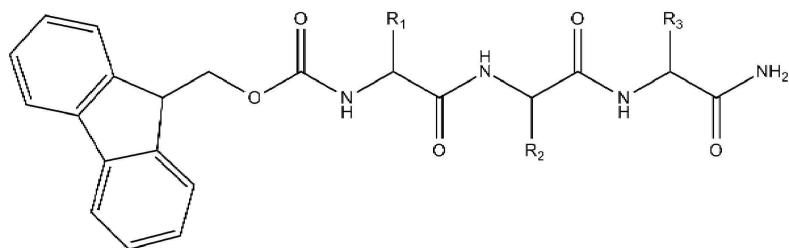
청구항 5

제1항에 있어서, 하기 화합물 중 적어도 하나를 포함하는, 결빙 제어용 조성물:

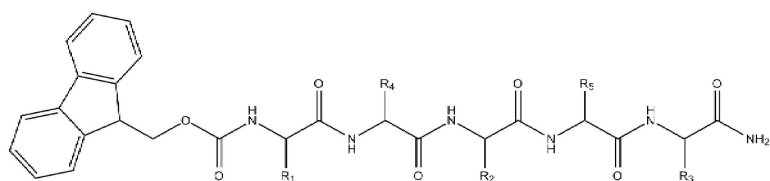


청구항 6

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 세포 동결용 조성물:

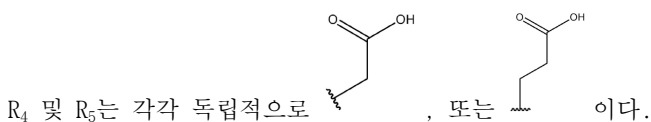
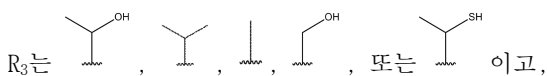
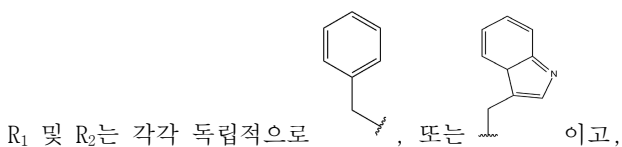


[화학식 1]



[화학식 2]

상기 화학식 1 또는 2에서,

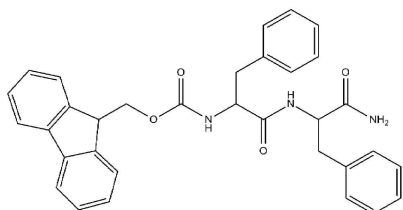


청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화합물은 자기 조립 (self-assembly)되어 피브릴(fibril) 또는 시트(sheet) 형상의 구조물을 형성하는, 세포 동결용 조성물.

청구항 8

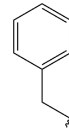
제6항에 있어서, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 더 포함하고, 이 때 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하고, 화학식 3로 표시되는 화합물 및 화학식 1로 표시되는 화합물이 2:1 (mole:mole)의 비율로 포함된, 세포 동결용 조성물:



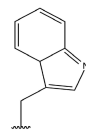
[화학식 3]

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로



, 또는



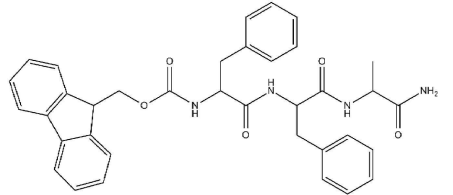
이고, R₃는



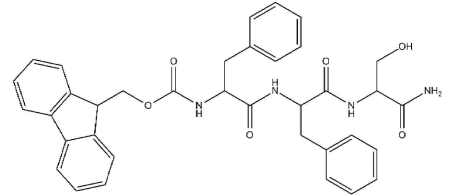
인, 세포 동결용 조성물.

청구항 10

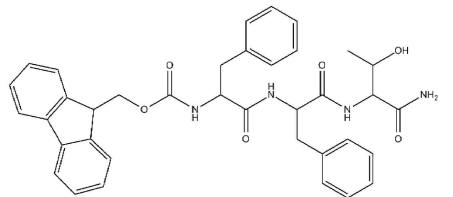
제6항에 있어서, 하기 화합물 중 적어도 하나를 포함하는, 세포 동결용 조성물:



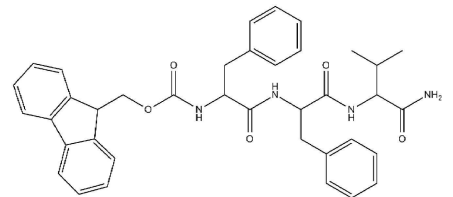
,



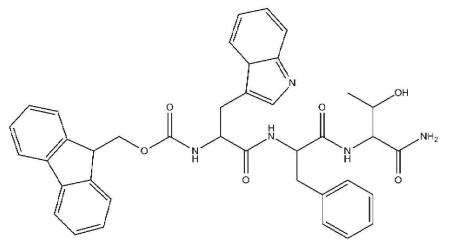
,



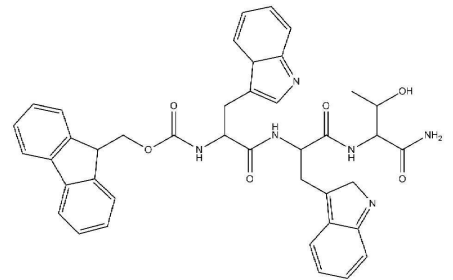
,



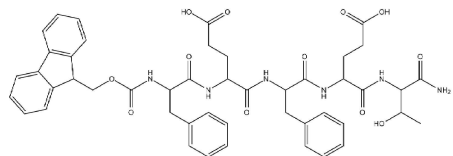
,



,



,



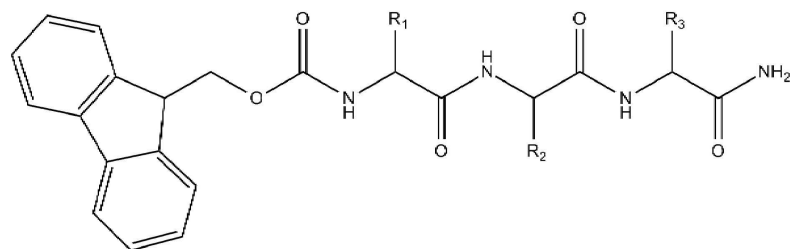
.

청구항 11

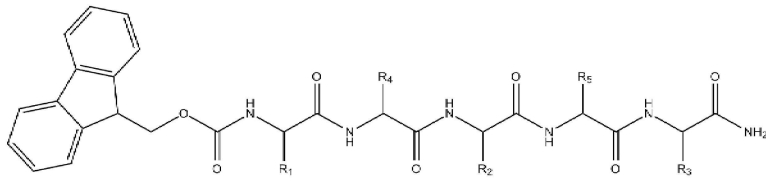
제6항에 있어서, 상기 세포는 정자, 난자, 상피 세포, 신경 세포, 표피 세포, 각질 세포, 조혈 세포, 멜라닌 세포, 연골 세포, B 세포, T 세포, 적혈구, 대식 세포, 단핵구, 섬유아세포, 근육 세포, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기세포, 또는 성체 줄기세포인, 세포 동결용 조성물.

청구항 12

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 식품 동결용 조성물:

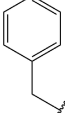
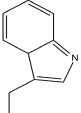


[화학식 1]

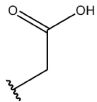
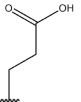


[화학식 2]

상기 화학식 1 또는 2에서,

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는  이고,

R_3 는 , , , , 또는  이고,

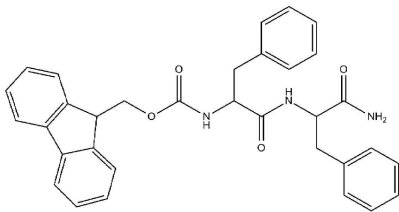
R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 , 또는  이다.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 화합물은 자기 조립 (self-assembly)되어 피브릴(fibril) 또는 시트(sheet) 형상의 구조물을 형성하는, 식품 동결용 조성물.

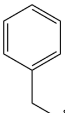
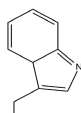
청구항 14

제12항에 있어서, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 더 포함하고, 이 때 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하고, 화학식 3로 표시되는 화합물 및 화학식 1로 표시되는 화합물이 2:1 (mole:mole)의 비율로 포함된, 식품 동결용 조성물:



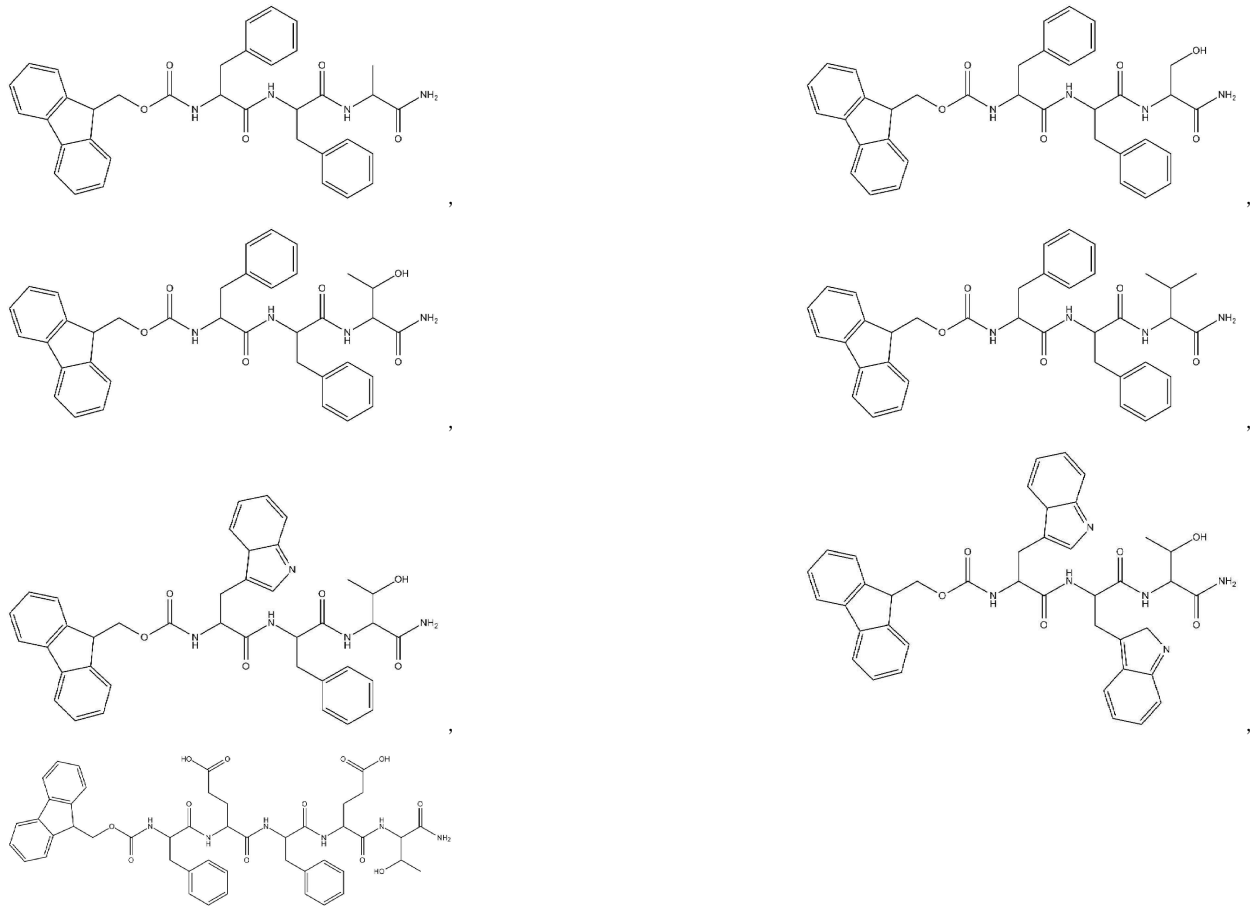
[화학식 3]

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는  이고, R_3 는  인, 결빙 제어용 조성물.

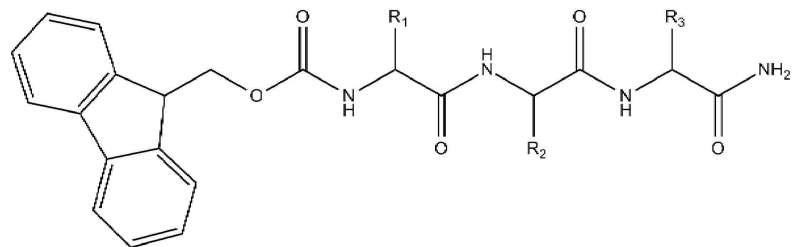
청구항 16

제12항에 있어서, 하기 화합물 중 적어도 하나를 포함하는, 식품 동결용 조성물:

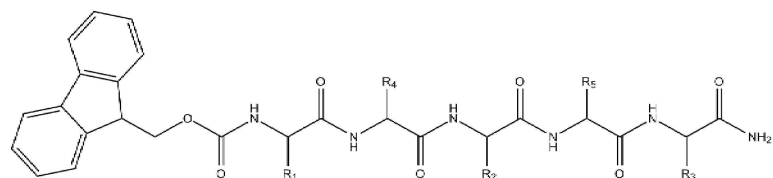


청구항 17

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 용매에 첨가하는 단계를 포함하는, 결빙 제어 방법:

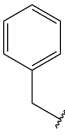
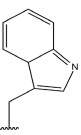


[화학식 1]

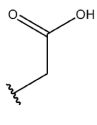
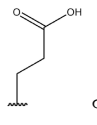


[화학식 2]

상기 화학식 1 또는 2에서,

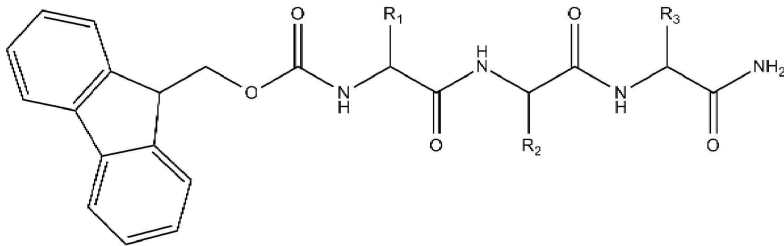
R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 , 또는  이고,

R_3 는 , , , , 또는  이고,

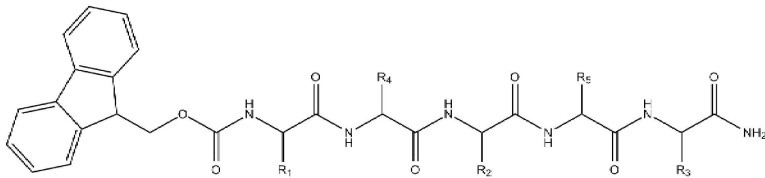
R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 , 또는  이다.

청구항 18

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 세포 동결 보존 방법:

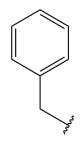
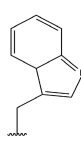


[화학식 1]

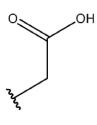
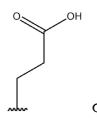


[화학식 2]

상기 화학식 1 또는 2에서,

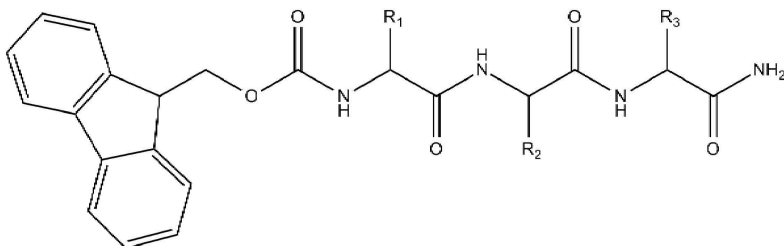
R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는  이고,

R_3 는 , , , , 또는  이고,

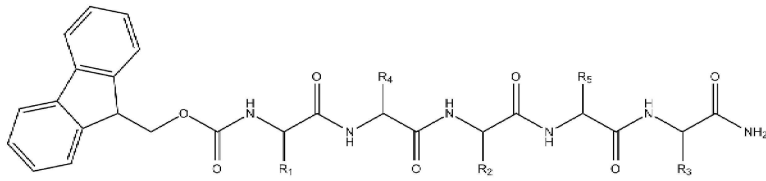
R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 , 또는  이다.

청구항 19

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 식품에 처리하는 단계를 포함하는, 식품 동결 보존 방법:

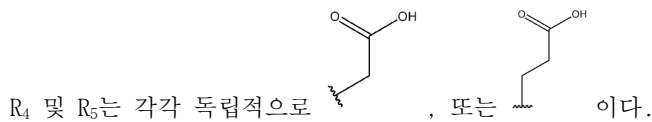
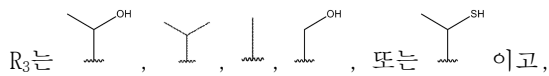
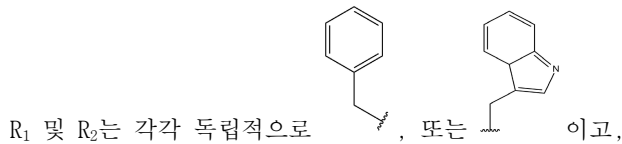


[화학식 1]



[화학식 2]

상기 화학식 1 또는 2에서,



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자기 조립 화합물을 포함하는 항-동결 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 저온보호제 (cryoprotective agent) (CPA)는 용액에 존재할 때 0℃ 아래의 온도에 노출된 용액에서 얼음 결정 형성을 감소시키거나 얼음 결정 성장을 저해시킬 수 있는 화합물이다. CPA는 소분자, 합성 폴리머, 및 동결방지제 단백질이 주로 이용된다.

[0004] 장기 이식은 생존율, 삶의 질, 및 비용 효과의 면에서 말기 장기 부전에 대한 최선의 치료법이다. 불행하게도, 장기 이식물의 공급과 수요 사이에 긴 시간 간격이 존재하며, 이는 장기 이식을 필요로 하는 환자가 오랜 기간 대기 시간 동안 힘들게 살도록 만드는 중대한 의료 장벽 중 하나이다. 장기의 공급이 부족한 이유 중 하나는 신 퇴할 수 있는 보존 방법이 존재하지 않는 것에 기인한 것이다.

[0005] 장기를 적절하게 보존하기 위해서, 장기를 보존 용액으로 세척하여 혈액을 제거하고 장기를 안정화시켜야 한다. 보존 용액 중에 장기를 안정화시킨 후에도, 기증자로부터의 제거 후에 장기 할당, 수술, 및 이식에 이용가능한 시간은 통상적으로 6시간 내지 12시간으로 제한적이다. 이러한 짧은 시간으로 인하여 대부분의 장기가 근거리 내의 환자에게 이식되는 것으로 제한되도록 하며, 이동 시간의 제약으로 인하여 원거리 환자에게는 장기 이식의 기회가 현저하게 줄어드는 결과를 가져온다. 이렇게 임상적으로 이용 가능한 장기의 부족으로 인하여, 대부분의 국가에서 인간 장기의 판매를 금지함에도 불구하고, 불법 장기 거래 및 인신 매매의 증가를 초래하였다.

[0006] 장기 보존에서 사용되는 현재의 CPA는 일반적으로 특히 에틸렌 글리콜, 1,2-프로판디올, 디메틸 술폭시드, 포름아미드, 글리세롤, 수크로스, 락토스, 또는 D-만니톨이 이용된다. 장기 보존 온도에서 얼음 결정 성장을 감소시키거나 저해시키기 위하여 CPA의 유효 농도는 보통 60% 이상으로 매우 높아야 한다. 이러한 고농도에서 이들 화합물은 그들이 보존하려고 시도하는 조직에 독성을 나타낼 수도 있고, 이식 전 승온과 함께 CPA를 대량으로 제거할 때, 비가역적인 세포사를 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 얼음 결정 형성을 감소 또는 저해시키는 데에 사용되는 기타 CPA로는 합성 폴리머 및 동결방지제 단백질이

있다. 상기에서 설명한 CPA 와 유사하게, 이들 각각은 그들의 결점을 갖는다. 예를 들어, 자연계에 존재하는 항-동결 단백질 (antifreeze protein, AFP), 예컨대 어류, 식물, 또는 곤충에서 단리된 단백질은 얼음 형성을 방지하는데 고도로 효과적이지만, 현재 이용가능한 동결방지제 단백질은 순도가 낮고 생산 단가가 높기 때문에 산업계에서 이용하기에는 비효율적인 것으로 인식된다.

[0008] 한편, 화학적 동결 방지제, 예를 들어, DMSO(dimethyl sulfoxide)는 발열, 간지러움 등의 부작용을 야기할 뿐만 아니라, 뇌를 퇴화시키거나 신경독으로 작용하는 등 생체 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 이와 같은 화학적 동결 방지제는 세포, 조직, 장기 또는 식품 등의 동결 시 사용하기 어렵다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국 등록 특허 제10-1396925호

발명의 내용

해결하려는 과제

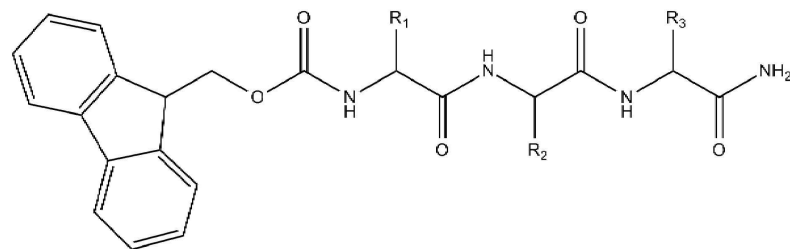
[0011] 본 발명은 세포 및 생체 독성이 낮은, 우수한 결빙 제어능을 갖는 소재를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 얼음의 재결정화 또는 얼음 결정의 직경 증가를 억제할 수 있는 소재를 개발하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 소재를 포함하는 결빙 제어용 조성물, 세포 동결용 조성물, 및 식품 동결용 조성물을 제공하는 것이다.

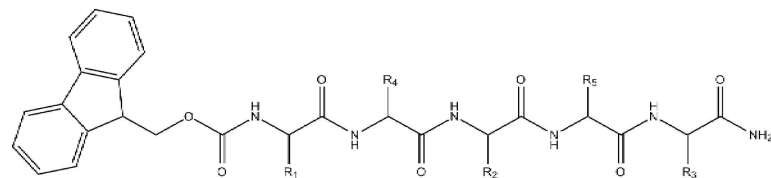
과제의 해결 수단

[0015] 1. 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 결빙 제어용 조성물:



[0016]

[0017] [화학식 1]

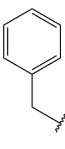
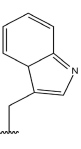


[0018]

[0019] [화학식 2]

[0020] 상기 화학식 1 또는 2에서,

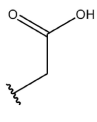
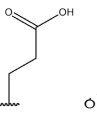
[0021]

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로  , 또는  이고,

[0022]

R_3 는  ,  ,  , 또는  이고,

[0023]

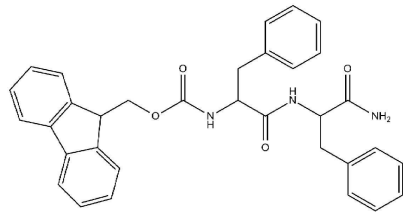
R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로  , 또는  이다.

[0025]

2. 항목 1에 있어서, 상기 화합물은 자기 조립 (self-assembly)되어 피브릴(fibril) 또는 시트(sheet) 형상의 구조물을 형성하는, 결빙 제어용 조성물.

[0026]

3. 항목 1에 있어서, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 더 포함하고, 이 때 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하고, 화학식 3로 표시되는 화합물 및 화학식 1로 표시되는 화합물이 2:1 (mole:mole)의 비율로 포함된, 결빙 제어용 조성물:

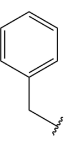
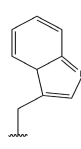


[0027]

[0028]

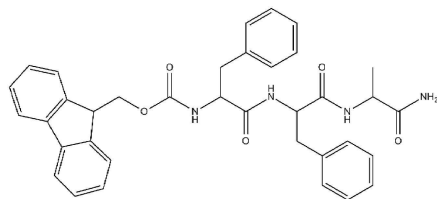
[화학식 3]

[0029]

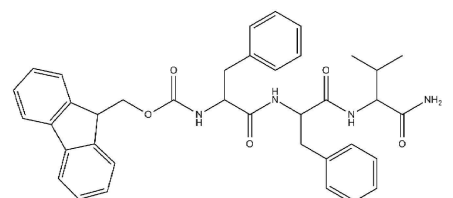
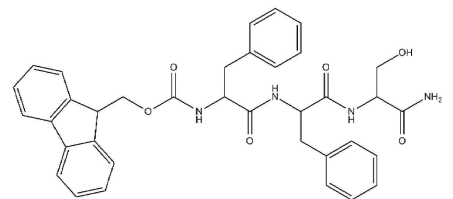
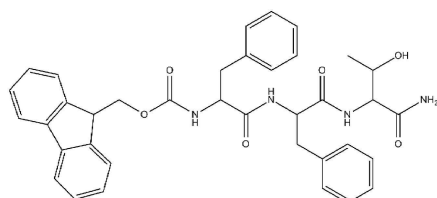
4. 항목 3에 있어서, 상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로  , 또는  이고, R_3 는  인, 결빙 제어용 조성물.

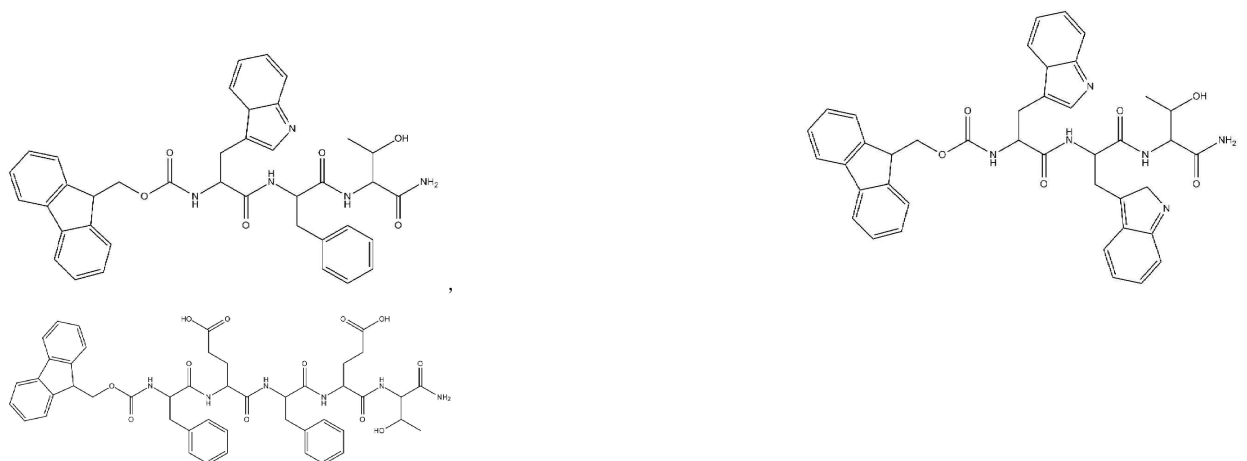
[0030]

5. 항목 1에 있어서, 하기 화합물 중 적어도 하나를 포함하는, 결빙 제어용 조성물:

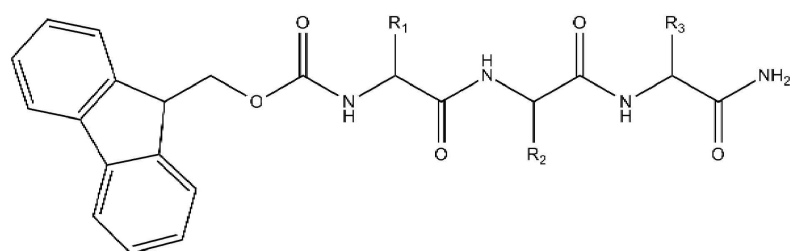


[0031]



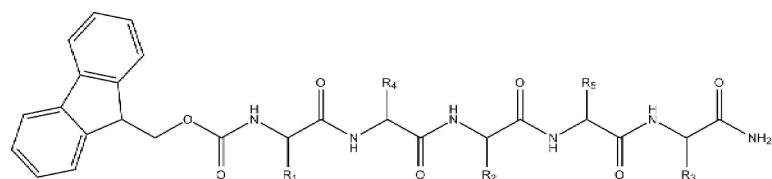


[0032] 6. 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 세포 동결용 조성물:



[0033]

[0034] [화학식 1]



[0035]

[0036] [화학식 2]

[0037] 상기 화학식 1 또는 2에서,

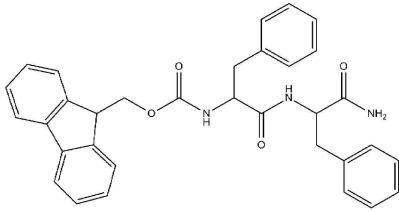
[0038] R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는 이고,

[0039] R_3 는 , , , , 또는 이고,

[0040] R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 , 또는 이다.

[0041] 7. 항목 6에 있어서, 상기 화합물은 자기 조립 (self-assembly)되어 피브릴(fibril) 또는 시트(sheet) 형상의 구조물을 형성하는, 세포 동결용 조성물.

[0042] 8. 항목 6에 있어서, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 더 포함하고, 이 때 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하고, 화학식 3로 표시되는 화합물 및 화학식 1로 표시되는 화합물이 2:1 (mole:mole)의 비율로 포함된, 세포 동결용 조성물:



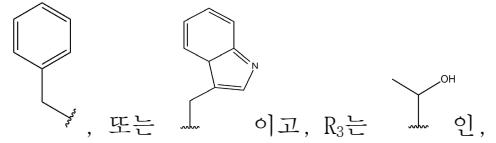
[0043]

[0044]

[화학식 3]

[0045]

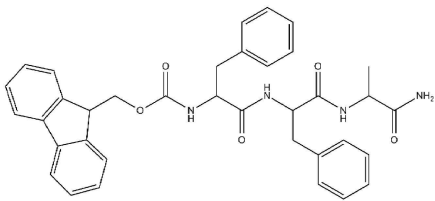
9. 항목 8에 있어서, 상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로



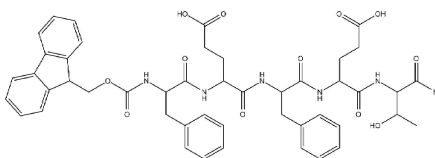
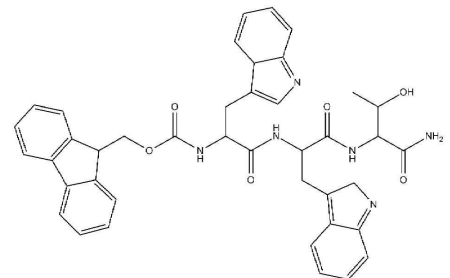
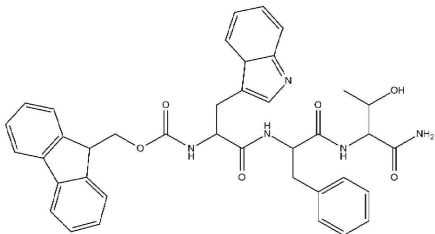
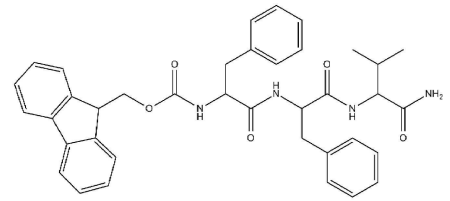
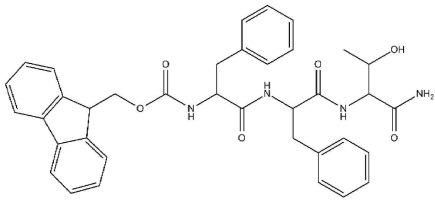
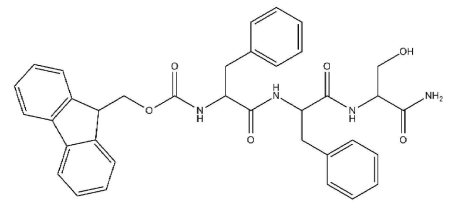
세포 동결용 조성물.

[0046]

10. 항목 6에 있어서, 하기 화합물 중 적어도 하나를 포함하는, 세포 동결용 조성물:



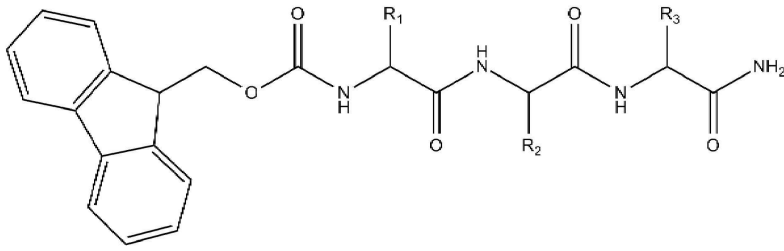
[0047]



[0048]

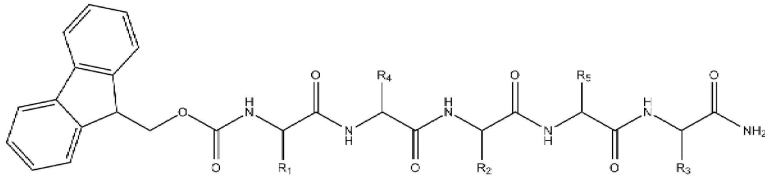
11. 항목 6에 있어서, 상기 세포는 정자, 난자, 상피 세포, 신경 세포, 표피 세포, 각질 세포, 조혈 세포, 멜라닌 세포, 연골 세포, B 세포, T 세포, 적혈구, 대식 세포, 단핵구, 섬유아세포, 근육 세포, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기세포, 또는 성체 줄기세포인, 세포 동결용 조성물.

[0049] 12. 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 식품 동결용 조성물:



[0050]

[0051] [화학식 1]

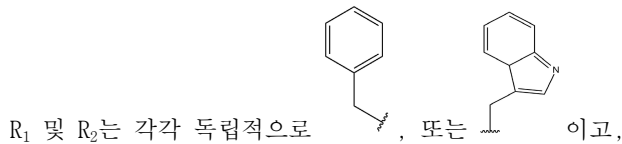


[0052]

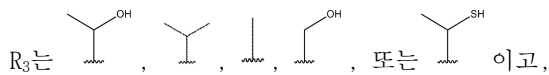
[0053] [화학식 2]

[0054] 상기 화학식 1 또는 2에서,

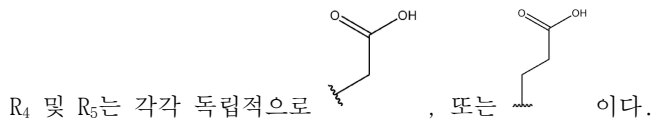
[0055]



[0056]



[0057]

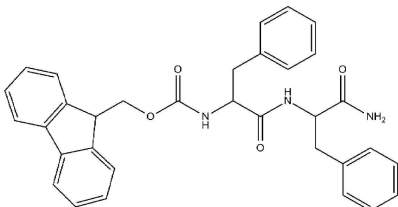


[0058]

13. 항목 12에 있어서, 상기 화합물은 자기 조립 (self-assembly)되어 피브릴(fibril) 또는 시트(sheet) 형상의 구조물을 형성하는, 식품 동결용 조성물.

[0059]

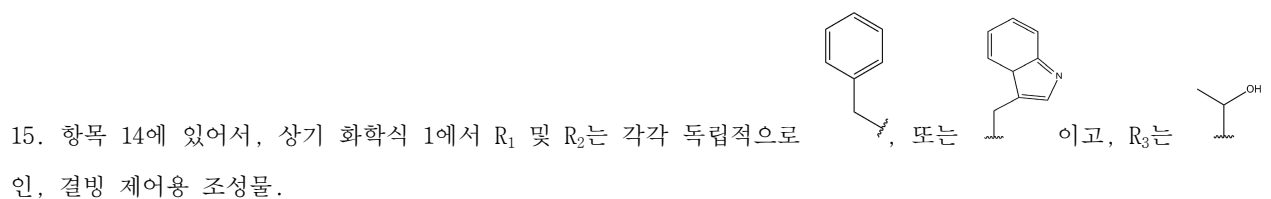
14. 항목 12에 있어서, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 더 포함하고, 이 때 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하고, 화학식 3로 표시되는 화합물 및 화학식 1로 표시되는 화합물이 2:1 (mole:mole)의 비율로 포함된, 식품 동결용 조성물:



[0060]

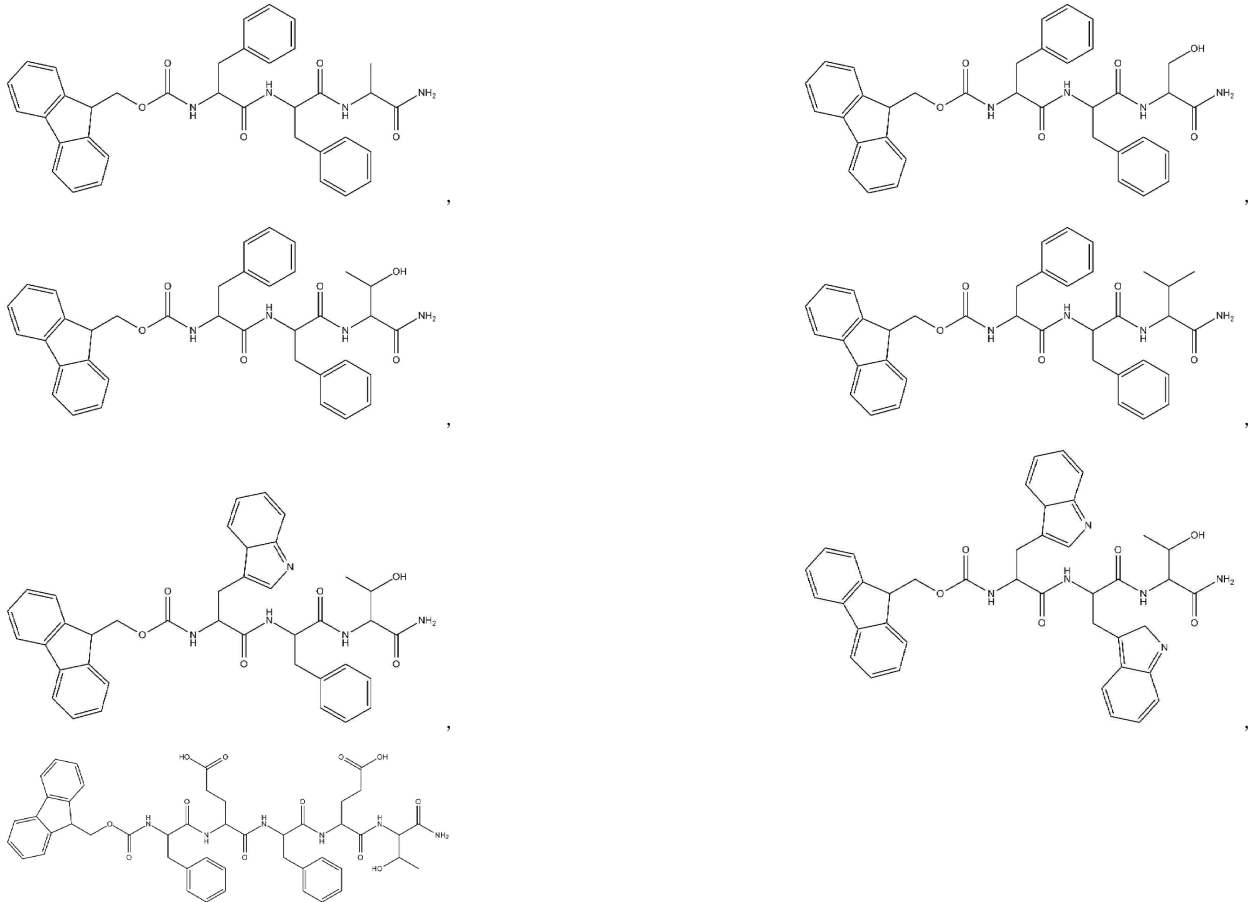
[0061] [화학식 3]

[0062]



[0064] 16. 항목 12에 있어서, 하기 화합물 중 적어도 하나를 포함하는, 식품 동결용 조성물:

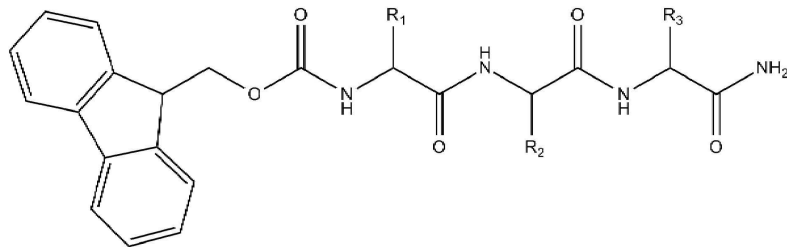
[0065]



[0066] 17. 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 용매에 첨가하는 단계를 포함하는, 결빙 제어 방법:

[0067]

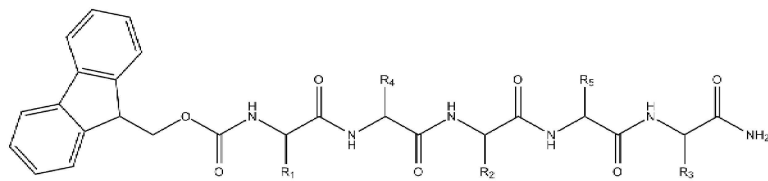
[0068]



[0067]

[0068]

[화학식 1]



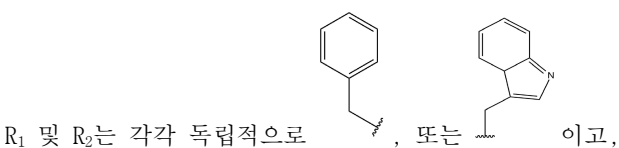
[0069]

[0070]

[0071]

상기 화학식 1 또는 2에서,

[0072]

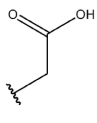
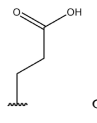


R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는 이고,

[0073]

R₃는 , , , , 또는  이고,

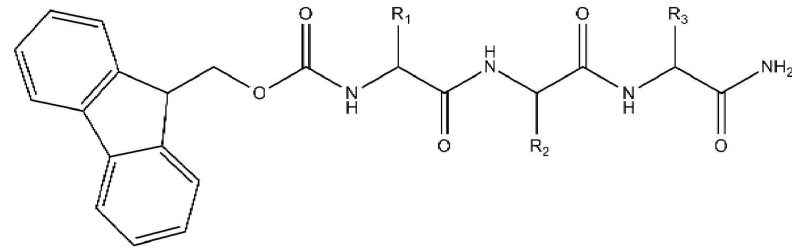
[0074]

R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 , 또는  이다.

[0075]

18. 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 세포 동결 보존 방법:

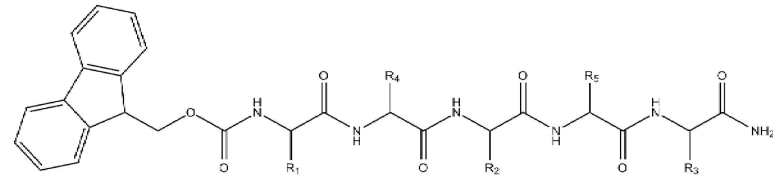
[0076]



[0077]

[화학식 1]

[0078]



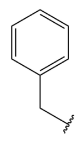
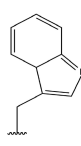
[0079]

[화학식 2]

[0080]

상기 화학식 1 또는 2에서,

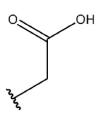
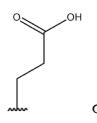
[0081]

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 , 또는  이고,

[0082]

R₃는 , , , , 또는  이고,

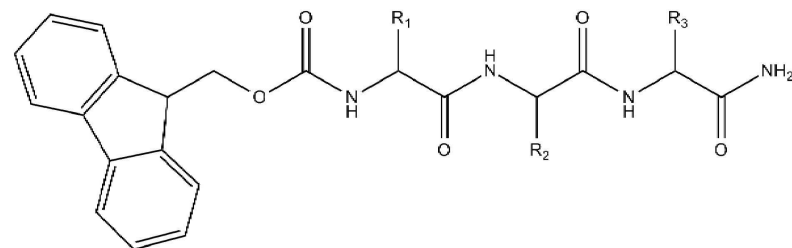
[0083]

R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 , 또는  이다.

[0084]

19. 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 식품에 처리하는 단계를 포함하는, 식품 동결 보존 방법:

[0085]



[0086] [화학식 1]

[0087]

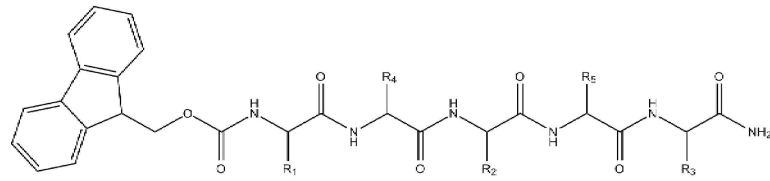
[0088] [화학식 2]

[0089] 상기 화학식 1 또는 2에서,

[0090]

[0091]

[0092]



R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 , 또는 이고,

R_3 는 , , , , 또는 이고,

R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 , 또는 이다.

발명의 효과

[0094]

[0095]

[0096]

본 발명에서 세포 및 신체 독성이 낮으면서도 우수한 결빙 제어능을 갖는 소재를 제공할 수 있다.

본 발명에 따른 결빙 제어 소재는 얼음의 재결정화 또는 얼음 결정의 직경 증가를 억제할 수 있다.

본 발명에 따른 소재를 포함하는 결빙 제어용 조성물, 세포 동결용 조성물, 및 식품 동결용 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0098]

도 1은 a) Fmoc-FF, b) Fmoc-FFT, c) Fmoc-FFV, d) Fmoc-FFA, e) Fmoc-FFS, f) Fmoc-FEFET, g) Fmoc-WFT, h) Fmoc-WWT, 및 i) Naph-FFT의 HPLC 스펙트럼이다.

도 2는 a) Fmoc-FF, b) Fmoc-FFT, c) Fmoc-FFV, d) Fmoc-FFA, e) Fmoc-FFS, f) Fmoc-FEFET, g) Fmoc-WFT, h) Fmoc-WWT, 및 i) Naph-FFT의 MALDI-TOF/TOF MS 스펙트럼이다.

도 3a)는 수용액에서 Fmoc-FF의 2차 구조를 나타내는 CD 스펙트럼이고, b)는 임계 미셀 응집의 Fmoc-FF 농도를 나타낸 것이며, c)는 Fmoc-FF의 TEM 이미지이다.

도 4는 수용액에서 a) Fmoc-FFT, b) Fmoc-FFV, c) Fmoc-FFA, 및 Fmoc-FFS의 CD 스펙트럼이다.

도 5a)는 Fmoc-FFT의 TEM, b)는 Fmoc-FFT의 초저온(cryogenic)-TEM, 및 c)는 Fmoc-FFT의 STEM 이미지이고, d)는 Fmoc-FFV의 TEM 이미지 (좌상단, 형광 현미경), e)는 Fmoc-FFA의 TEM 및 초저온-TEM 이미지 (좌상단, 형광 현미경), 및 f)는 수용액에서 Fmoc-FFS의 TEM 이미지이다.

도 6a)는 수용액에서 Fmoc-FEFET의 2차 구조를 나타내는 CD 스펙트럼이고, b)는 임계 미셀 응집의 Fmoc-FEFET 농도이고, c)는 Fmoc-FEFET의 TEM 이미지이고, d)는 Fmoc-FEFET의 초저온-TEM 이미지로서, 피브릴을 형성함을 보여준다.

도 7a)는 미셀 응집 임계의 Fmoc-FF 및 Fmoc-FFT의 공조립 구조체의 농도이고, b)는 Fmoc-FF 및 Fmoc-FFT의 공조립 구조체의 수력학적 반경을 DLS로 확인한 결과이고, c)는 Fmoc-FF 및 Fmoc-FFT의 공조립 구조체의 TEM 이미

지이다.

도 8a)는 Fmoc-WFT의 CD 스펙트럼, b)는 Fmoc-WWT의 CD 스펙트럼, c)는 Naph-FFT의 CD 스펙트럼이고, d)는 Fmoc-WFT의 TEM 이미지, e)는 Fmoc-WWT의 TEM 이미지, f)는 Naph-FFT의 TEM 이미지이다.

도 9a)는 16.7 nm 직경의 MPA-Au 나노입자의 16.7 nm 스펙트럼의 TEM 이미지이고, b)는 MPA-AuNP, MPA-AuNP + 2 μ M BSA, 및 MPA-AuNP + 2 μ M PEG의 동결/해동 후의 소광 스펙트럼이고, 동결-유도 조립은 소광 스펙트럼으로 정량할 수 있다.

도 10은 자기 조립 나노구조체의 동결/해동 전 (a) 및 후 (b)의 흡수 스펙트럼 변화를 나타낸 것이고, c)는 마이크로웰 접시에서 각각의 소재(0.5 mM의 50 μ L)와 혼합된 MPA-AuNP 용액 (300 μ M의 350 μ L)을 동결/해동 전과 후에 찍은 사진이고, d)는 c)에서의 Au NP 응집을 흡수 비율로서 정량한 것이다.

도 11은 얼음을 30분간 재결정화 시키고 모든 소재의 재결정화 도메인의 MLGS를 DFOM 이미지로부터 계산한 것으로, a) 및 b)는 보이는 계에서 가장 큰 도메인 10개를 선정하고 평균을 내어 측정하였다.

도 12는 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FFV, Fmoc-FFA, 및 Fmoc-FFS의 IRI 활성을 나타낸 것으로, a)는 30분간 재결정화된 얼음의 재결정화를 보여주는 DFOM을 시간 순서대로 보여주는 것이고, b)는 a)로부터 이미지를 이용해 각각의 소재의 재결정화 도메인의 MLGS를 계산하였다.

도 13은 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FEFET, 및 Fmoc-FF: Fmoc-FFT의 공조립의 MLGS를 나타낸 것이다.

도 14는 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-WFT, Fmoc-WWT, 및 Naph-FFT의 IRI 활성을 나타낸 것으로, 얼음 재결정화를 보여주는 DFOM은 시간에 따라 촬영되었고, 얼음은 30분간 동안 재결정화시켰다. b)는 a)의 이미지로부터 계산된 각각의 소재의 재결정화 도메인의 MLGS이다.

도 15a) 다양한 시료 농도에서 mESC의 CCK-분석법으로 결정된 세포 생존율을 나타낸 그래프이고, b)는 크리스탈 바이올렛 염색으로 확인한 것이다.

도 16은 mESC의 CCK-분석법으로 확인한 세포 생존율이다.

도 17a)는 mESC를 각 시료로 동결보존한 후 37 $^{\circ}$ C에서 해동하여 세포 생존율을 확인한 것으로, 평균+SD 형식으로 나타내었다. b)는 시료로 동결보존한 후 4일간 mESC의 분화를 확인한 것이다.

도 18은 동결보존 후 4일간의 mESC의 분화를 동결 보존 용액의 농도에 따라 확인한 결과이다.

도 19은 동결/해동 정자의 생식능을 Fmoc-FF 및 Fmoc-FFT의 공조립체에 대하여 확인한 결과이다

도 20는 시료를 사용하여 동결보존한 정자를 주입하여 난자의 a) 배아 및 b) 배반포로의 발달을 확인한 것이다.

도 21은 C57BL/6 유래 2-세포 배아의 in vitro 및 in vivo에서의 발달을 나타낸 것이다.

도 22는 소고기(a)를 동결하기 전 Fmoc-FFT를 처리한 경우 (d, 및 e) 및 그렇지 않은 경우 (b, 및 c)의 얼음 결정의 크기 및 조직을 확인한 SEM 이미지 (b, 및 d), 광학 현미경 (c, 및 e의 왼쪽), 및 TEM 이미지 (c, 및 e의 오른쪽)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0099] 이제 본 발명은 첨부된 도면을 참조로 하기에서 더욱 충분히 기술될 것이며, 그러나 본 발명의 전부가 아닌 단지 일부의 구체예가 예시된다. 실제로, 이들 발명은 많은 다양한 형태로 구체화될 수 있으며, 본원에 제시된 구체예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수 형태는 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수한 대상을 포함한다.

[0100] 본 발명에서 “항동결 단백질”, “항-동결 단백질” 또는 “AFP”는 상호 교환적으로 사용 가능하고, AFP는 다양한 동물, 식물, 곰팡이 및 박테리아에서 발견되며, 이들 단백질은 얼음 결정에 결합함으로써 얼음의 성장 및 재결정화를 억제하는 것으로 알려졌다. 이러한 AFP의 성질은 저온에서 생물학적 시료를 보존하는 데에 이용되어 왔다. 자연계에 존재하는 항동결 단백질 (Anti-freeze protein, AFP)은 α -헬릭스 또는 β -시트의 2차 구조를 갖는데, 상기 2차 구조에서 얼음 결정 면과 접촉하는 위치에 물분자와 수소결합 또는 소수성 상호작용할 수 있는 아미노산인 T, S, 및 V이 배열되어 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 배열은 얼음 결정면에 존재하는 물 분자와 일정 간격을 두고 상호작용하여, 얼음 결정 면 바깥(액상)의 물 분자와 얼음 결정 면의 분자간 상호작용을 억제시킴으로써 얼음 성장 또는 얼음 재결정화를 막거나 저하시킨다. 본 발명자는 이러한 기술적 배경을 바탕으

로, 자기 조립을 통하여 펩티드와 유사한 배열을 가질 수 있는 화합물을 이용하여 펩티드 유사 구조체를 제조하였고, 이러한 구조체가 결빙 제어능이 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0101] 본 발명에 따른 결빙 제어용 조성물은 Fmoc (플루오레닐메틸옥시카보닐, Fluorenylmethyloxycarbony)에 2개 내지 5개의 아미노산, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 아미노산이 펩티드 결합으로 연결된 화합물을 포함한다. 상기의 화합물은 “펩티드 유사 화합물”, “본 발명에 따른 시료” “본 발명의 시료” “본 발명에 따른 화합물” “본 발명의 화합물” 또는 “시료”로 지칭된다. 또한, 상기의 화합물이 자기 조립되어 형성되는 구조체를 “자기 조립 나노구조체”로 지칭한다.

[0102] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 화합물에 포함된 아미노산 잔기는, 아르기닌(Arg, R), 히스티딘(His, H), 라이신(Lys, K), 아스파르트산(Asp, D), 글루탐산(Glu, E), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 아스파라긴(Asn, N), 글루타민(Gln, Q), 시스테인(Cys, C), 글리신(Gly, G), 프롤린(Pro, P), 알라닌(Ala, A), 발린(Val, V), 아이소류이신(Ile, I), 루이신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 타이로신(Tyr, Y), 및 트립토판(Trp, W)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 아미노산은 Thr, Ala, Val, Ser, Cys, Asp, Glu, Phe, 및 Trp으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기이다.

[0103] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 화합물은 Fmoc-FFX₁, Fmoc-WFX₁, Fmoc-WWX₁, FmocFWX₁, Fmoc-FX₂FX₃X₁, Fmoc-WX₂FX₃X₁, Fmoc-WX₂WX₃X₁, FmocFX₂WX₃X₁로 표시되는 구조를 갖고, 상기 X₁은 아미노산 T, V, A, S, 및 C로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나이고, 상기 X₂ 및 X₃는 각각 독립적으로 아미노산 D 또는 E이다.

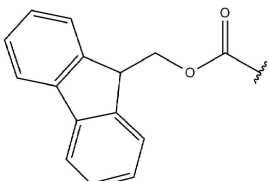
[0104] 본 발명에 따른 화합물 중 Fmoc-FF에서 Fmoc은 분자간 pi-pi stacking을 유도하고, Phe-Phe은 pi-pi- stacking 및 수소결합을 유도하여 자기 조립(self-assembly)되어 단백질 2차 구조와 유사한, α-헬릭스, 또는 β-시트를 형성한다. 이러한 배열을 통해, 물과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기가 자기 조립체의 바깥쪽으로 배열되어 얼음 계면과 친수성 상호작용, 소수성 상호작용, 또는 수소결합을 형성할 수 있다. 또한, Fmoc-FF에서 적어도 하나의 Phe은 Trp으로 치환될 수 있으며, 치환된 화합물 Fmoc-FWX, Fmoc-WFX, 또는 Fmoc-WWX는 모화합물인 Fmoc-FF와 비교할 때 동일 또는 유사한 정도의 결빙 제어 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

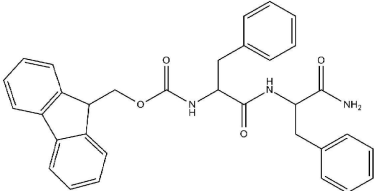
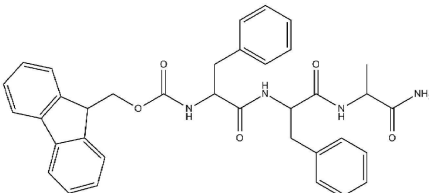
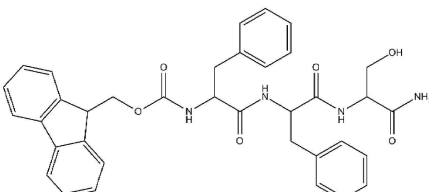
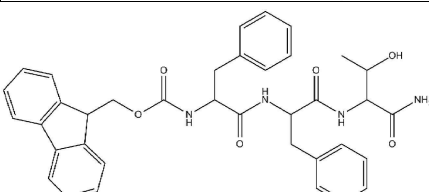
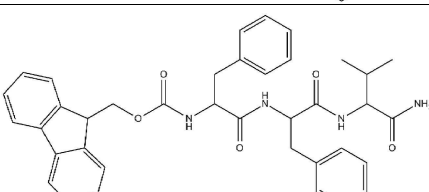
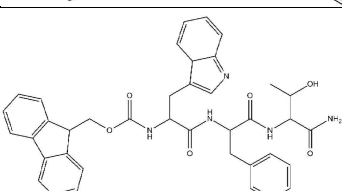
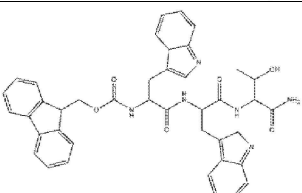
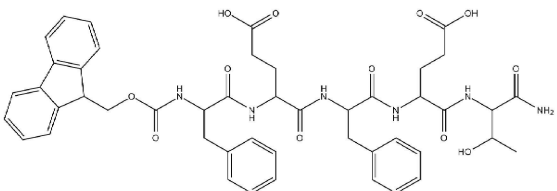
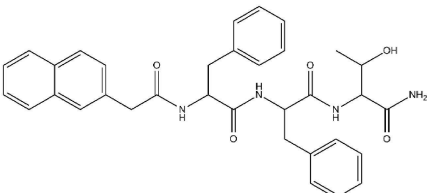
[0105] 본 발명의 일 실시예에서 상기 X₁은 물과 상호작용할 수 있는 아미노산으로서, 특히, Thr, Ala, Val, Ser, 또는 Cys이고, 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 X₁은 Thr, 또는 Ala이다. 본 발명의 발명자는 X₁이 Thr, Ala, Val, 또는 Ser인 경우 모두 얼음의 재결정화를 억제하거나 결빙을 제어할 수 있는 것으로 확인하였으며, 놀랍게도, X₁이 물과 친수성 상호작용, 또는 수소 결합을 형성할 수 있는 아미노산 잔기인 Ser인 경우에 비하여 소수성 작용기와 친수성 작용기를 모두 갖는 Thr인 경우에 더 나은 얼음 재결정화 억제 활성, 및/또는 결빙 제어 활성을 보임을 확인하였고, X₁이 Ser인 경우에 비하여 소수성 작용기만을 갖는 Ala인 경우에 더 나은 얼음 재결정화 억제 활성, 및/또는 결빙 제어 활성을 보임을 확인하였다.

[0106] 또한, X₂ 및 X₃는 각각 화합물의 친수성 수준을 높여 자기 조립 나노구조체의 수용성을 높이기 위하여 추가로 도입된 것이다. 본 발명의 일 실시예에서 X₂ 및 X₃는 각각 상호 독립적으로 Asp, 또는 Glu이고, 본 발명의 다른 실시예에서 X₂ 및 X₃는 각각 상호 독립적으로 Glu이다.

[0107] 본 발명에 따른 화합물은 본 명세서에서 하기와 같이 명명된다.

표 1

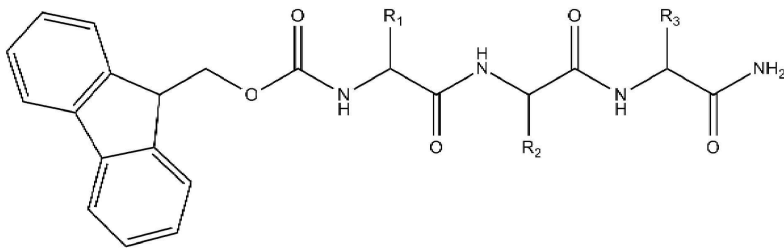
화합물	이름
	Fmoc-

	Fmoc-FF
	Fmoc-FFA
	Fmoc-FFS
	Fmoc-FFT
	Fmoc-FFV
	Fmoc-WFT
	Fmoc-WWT
	Fmoc-FEFET
	Naph-FFT

[0109] 본 발명의 일 실시예에서, 각추면(pyramidal plane)과 *w*fAFP의 높은 결합력을 모방하기 위하여, 본 발명의 자기

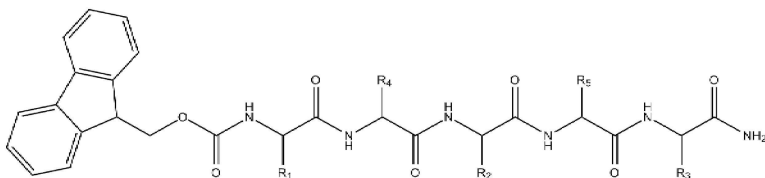
조립 구조체가 결정 면과 효과적인 결합을 할 수 있도록 Thr을 약 17.5 Å 간격으로 배열하고자 하였다 (Knight, C. A., Cheng, C. C., & DeVries, A. L. (1991). Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophysical Journal*, 59(2), 409-418.; Knight, C. A., Driggers, E., & DeVries, A. L. (1993). Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8. *Biophysical Journal*, 64(1), 252-259.). 또한, AFP 특성에 관여하는 얼음결정-결합면은 basal plane [0001], primary prism plane [1010], secondary prism plane [1120], pyramidal plane [2021]이다. 이중 느린 결정 성장을 보이는 basal plane에 반해 prismatic faces는 빠른 결정 성장을 보이고, pyramidal plane의 경우 얼음결정 성장 과정에서 노출되는 것으로 알려져 있다 (Lee, H. (2018). Structures, dynamics, and hydrogen-bond interactions of antifreeze proteins in TIP4P/Ice water and their dependence on force fields. *PLOS ONE*, 13(6), e0198887.; Olijve, L. L. C., Meister, K., DeVries, A. L., Duman, J. G., Guo, S., Bakker, H. J., & Voets, I. K. (2016). Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(14), 3740-3745.). 또한, 가자미(winter flounder)에서 유래된 wfAFP1의 경우 basal plane 대비 pyramidal plane에 결합되었을 때, 더 낮은 안정화 에너지를 가지며 실제로 wfAFP1 표면에 규칙적으로 존재하는 Thr 간의 간격이 16.5 Å을 가지고, 이는 얼음의 pyramidal plane [2021]의 산소-산소 간격과 일치하여 얼음결정 성장 억제 과정에서 지대한 영향을 끼치는 것으로 알려졌다. 이에 Fmoc-FF와 Fmoc-FFT를 2:1의 몰 비로 혼합함으로써 [(Fmoc-FF) (Fmoc-FF) (Fmoc-FFT)]의 배열로 자기 조립되도록 하였으며, 이러한 자기 조립체를 포함하는 조성물은 한가지 화합물로 이루어진 자기 조립 구조체에 비하여 동등하거나 월등한 결빙 제어 활성 및/또는 재결정화 억제 활성을 나타내었다.

[0110] 본 발명의 일 실시예에서, 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 결빙 제어용 조성물을 제공한다:



[0111]

[0112] [화학식 1]

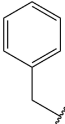
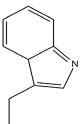


[0113]

[0114] [화학식 2]

[0115] 상기 화학식 1 또는 2에서,

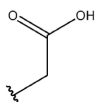
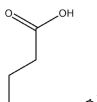
[0116]

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 , 또는  이고,

[0117]

R₃는 , , , , 또는  이고,

[0118]

R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 , 또는  이다.

[0119]

본 발명에서 사용하는 용어 “얼음 재결정화”는 작은 얼음 결정으로부터 더 큰 얼음 결정으로 성장하는 과정을

의미하고, 오스왈드 숙성 (Ostwald ripening)은 상온 및 결정 사이 표면 에너지 차이로 인한 압력에서 발생하는 이러한 재결정화를 의미하며, 용해-확산-재동결 또는 승화-확산-응축 메커니즘으로 진행될 수 있다.

[0120] 본 발명에서 사용하는 용어 “항동결” “항-동결” “동결 제어” “결빙 제어”, “동결 억제” 및 “결빙 억제”는 상호 교환적으로 사용 가능하고, 어는점을 낮추거나, 얼음이 형성되지 않도록 하거나 얼음 형성 속도를 늦추거나, 얼음의 재결정화가 되지 않도록 하거나, 얼음 재결정화 속도를 늦추거나, 얼음 결정의 크기를 작게 유지하는 작용을 의미한다.

[0121] 본 발명의 결빙 제어용 조성물은 종래에 알려진 결빙 제어능을 갖는 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서, 결빙 제어용 조성물은, 본 발명에 따른 자기 조립 나노구조체 외에도 DMSO(dimethyl sulfoxide), 글리세롤, 1,2-프로판-디올, 수크로오스, 글루코오스, 프롤린, 갈락토오스, 락토오스, 글리신 베타인, 또는 프룩토오스를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 세포 동결 보존 또는 식품 동결 보존에 이용되는 경우, 세포 독성이 낮은, 수크로오스, 글루코오스, 락토오스, 글리신 베타인, 또는 프룩토오스가 더 포함될 수 있다.

[0122] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 세포 동결용 조성물을 제공한다. 세포를 동결시키는 과정 및 해동시키는 과정에서, 얼음 재결정화가 일어날 수 있다. 얼음 재결정화가 발생하는 경우, 얼음 결정이 성장함에 따라 세포 막이 손상되고 세포 탈수가 진행되어 세포 및 조직에 손상을 입힌다. 본 발명에 따른 자기 조립 나노구조체를 포함하는 조성물은 얼음 성장 또는 재결정화를 억제시켜, 세포 동결 보존 시 얼음 결정 성장으로 인하여 세포가 사멸되는 것을 막을 수 있다.

[0123] 본 발명에 따른 조성물은 얼음 결정 성장 억제 효능이 탁월할 뿐만 아니라, 세포 독성이 낮아, 세포, 조직, 또는 장기의 동결 보존에 유용하게 사용될 수 있다. 상기의 세포는, 예를 들어, 이에 제한되지는 않으나, 미생물을 포함하는 원핵 세포, 식물, 동물, 균류, 원생 생물을 포함하는 진핵 생물의 세포, 예를 들어, 정자, 난자, 상피 세포, 신경 세포, 표피 세포, 각질 세포, 조혈 세포, 멜라닌 세포, 연골 세포, B 세포, T 세포, 적혈구, 대식 세포, 단핵구, 섬유아세포, 근육 세포, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기세포, 또는 성체 줄기세포일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조직은 막 상피 조직 및 선 상피 조직을 포함하는 상피조직; 소성 결합 조직, 지방 조직, 치밀 섬유 결합 조직, 세망 결합 조직, 연골, 골조직, 혈액, 및 림프를 포함하는 결합 조직; 신경원, 및 신경교를 포함하는 신경 조직; 및 평활근, 심근, 및 골격근을 포함하는 근육조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 장기는 갑상선, 혈관, 폐, 식도, 간장, 비장, 신장, 소장, 대장, 기관, 심장, 노관, 및 자궁을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0124] 세포, 조직, 또는 장기를 동결 보존하는 방법은, 동결 보존할 대상에 본 발명에 따른 유효량의 자기 조립 나노구조체를 접촉시키거나 첨가하고, 동결 보존을 위한 온도로 냉각하는 단계를 포함한다. 세포, 조직, 또는 장기를 동결 보존하는 방법은, 당해 기술 분야에서 공지의 기술을 이용하여 수행할 수 있으며, 예를 들어, 급속 냉각기, 또는 액체 질소를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0125] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 조성물은 정자 및 난자를 포함하는 생식 세포, 및 줄기세포를 동결 보존하는 데에 이용될 수 있다. 생식세포의 냉동 보존은 보조생식 기술(assisted reproductive technology, ARTs)을 위해 그리고 가축의 경우에는 번식 관리를 위한 중요한 기술로서 생명 공학에서 널리 연구되고 있다. 한편, 해동 후 정자의 질이 떨어져 생식능이 저하되게 되는데, 주요 원인으로는 급격한 온도 변화, 얼음 형성 및 삼투압 등이 제안되었다. 본 발명에 따른 생체적합성을 지니는 자기 조립 나노구조체를 이용하는 경우, 얼음 형성 및/또는 재결정화가 억제되고, 이에 따라 세포 내, 용매 내, 또는 배지 내에서 국소적인 농도 증가로 인한 삼투압 변화를 최소화시킬 수 있으며, 결과적으로 동결 후 해동된 정자의 생존율 및 생식능을 상승시킬 수 있음을 확인하였다.

[0127] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 식품 동결 보존용 조성물을 제공한다. 식품을 동결 및/또는 해동하는 과정에서, 수분으로부터 발생된 얼음 결정이 성장하게 되는데, 이는 식품에 존재하는 세포 및/또는 조직을 파괴하여 식감 저하를 초래한다. 본 발명에 따른 자기 조립 나노구조체는 결빙을 억제하고/거나 얼음의 재결정화를 억제하므로, 얼음 결정 성장, 및 이로 인한 삼투압 변화에 의한 식품 품질 저하를 최소화시킬 수 있다.

[0128] 식품을 동결 보존하는 방법은, 동결 보존할 대상에 본 발명에 따른 유효량의 자기 조립 나노구조체를 접촉시키거나 첨가하고, 동결 보존을 위한 온도로 냉각하는 단계를 포함한다. 동결 보존 방법은, 당해 기술 분야에서 공

지의 기술을 이용하여 수행할 수 있으며, 예를 들어, 급속 냉각기, 또는 액제 질소를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0130] 통상의 기술자는 “약”이 불가피하게 사용되어야 하는 경우를 이해할 것이며, 본 명세서에서 용어 “약”은 오차 범위 내의 수치를 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0131] 본 발명에서 사용하는 용어 “실질적으로 동일”은 오차범위 내에서 동일하거나, 인지할 수 없는 정도의 차이가 있는 경우를 의미한다. 본 발명에서 사용하는 용어 “실질적으로 없다” “실질적으로 없는” 또는 이와 유사한 의미의 표현은, 0 또는 오차 범위 내에 0이 포함되는 경우, 또는 통상의 기술자가 인식하기에 무시할 수 있는 경우를 지칭한다.

[0133] 실시예

[0134] 제조예 1. Fmoc-FF의 제조

[0135] Fmoc-FF는 CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Discover에서 표준 고체상 펩티드 합성 (solid-phase peptide synthesis, SPPS) 방법을 이용하여 Rink Amide MBHA 수지 상에서 합성하였다. DCM (dichloromethan)으로 수지를 세척한 후, 교반 배양기에서 30분 동안 DMF(dimethylformamide) 및 DCM이 1:1로 혼합된 용액에서 수지를 팽창시켰다. 수지의 Fmoc 부분을 DMF 내에서 20% 피페리딘으로 3분간 마이크로파에서 제거하고, DMF, DCM 및 NMP(N-Methyl-2pyrrolidone)으로 완전히 세척하였다. 그 후 Fmoc-Phe-OH (5.0 당량), HBTU(O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate) (4.9 당량) 및 DIPEA(N,N-Diisopropylethylamine) (5.0 당량)과 혼합된 NMP 용액을 수지에 첨가하고, 10분간 마이크로파에서 처리하였다. 그 후, Fmoc-Phe-OH를 Fmoc-FF-수지 순서로 수지 상의 펩티드의 N-말단과 커플링시켰다. 각각의 커플링 및 보호기 제거 공정에 대하여 Kaiser 테스트를 통해 자유 아미노기의 존재를 확인하였다. 수지에 절단 용액 (TFA (Trifluoroacetic acid):TIS(Triisopropylsilane):H₂O = 95:2.5:2.5)을 교반 배양기에서 2시간동안 처리하였다. 과량의 TFA는 아르곤 가스로 제거하였고, 생성물을 차가운 Et₂O에서 침전시킨 후 4000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 펩티드는 역상 HPLC로 C18 컬럼(SUPELCO, Discovery[®] BIO Wide Pore C18, 5 μ m, 10 x 250 mm)에서 2 mL min⁻¹ 속도로 물 (0.1% TFA) 및 아세트니트릴 (0.1% TFA)의 선형 구배를 사용하여 펩티드를 정제하고, 230 nm 및 254 nm에서 UV 흡수 스펙트럼으로 확인하였다. Fmoc-FF의 분자량(557 [M+Na]⁺)은 MALDI-TOF/TOF 질량 분석기로 확인하였다.

[0137] 제조예 2. Fmoc-FFX의 제조

[0138] Fmoc-FFX는 CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Discover에서 표준 고체상 펩티드 합성 방법을 이용하여 Rink Amide MBHA 수지 상에서 합성하였다. DCM으로 수지를 세척한 후, 교반 배양기에서 30분 동안 DMF 및 DCM이 1:1로 혼합된 용액에서 수지를 팽창시켰다. 수지의 Fmoc 부분을 DMF 내에서 20% 피페리딘으로 3분간 마이크로파에서 제거하고, DMF, DCM 및 NMP으로 완전히 세척하였다. 그 후 각각 Fmoc-FFT를 위해서는 Fmoc-Thr(tBu)-OH (5.0 당량), Fmoc-FFV를 위해서는 Fmoc-Val-OH(5.0 당량), Fmoc-FFA를 위해서는 Fmoc-Ala-OH(5.0 당량), 및 Fmoc-FFS를 위해서는 Fmoc-Ser(tBu)-OH(5.0 당량); HBTU (4.9 당량); 및 DIPEA (5.0 당량)과 혼합된 NMP 용액을 수지에 첨가하고, 10분간 마이크로파에서 처리하였다. 그 후, Fmoc-Phe-OH를 Fmoc-FF-수지 순서로 수지 상의 펩티드의 N-말단과 커플링시켰다. 각각의 커플링 및 보호기 제거 공정에 대하여 Kaiser 테스트를 통해 자유 아미노기의 존재를 확인하였다. 수지에 절단 용액 (TFA:TIS:H₂O = 95:2.5:2.5)을 교반 배양기에서 2시간동안 처리하였다. 과량의 TFA는 아르곤 가스로 제거하였고, 생성물을 차가운 Et₂O에서 침전시킨 후 4000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 펩티드는 역상 HPLC로 C18 컬럼(SUPELCO, Discovery[®] BIO Wide Pore C18, 5 μ m, 10 x 250 mm)에서 2 mL min⁻¹ 속도로 물 (0.1% TFA) 및 아세트니트릴 (0.1% TFA)의 선형 구배를 사용하여 펩티드를 정제하고, 230 nm 및 254 nm에서 UV 흡수 스펙트럼으로 확인하였다. Fmoc-FFT의 분자량 (657 [M+Na]⁺),

Fmoc-FFV의 분자량 ($655 [M+Na]^+$, $671 [M+K]^+$), Fmoc-FFA의 분자량 ($627 [M+Na]^+$), 및 Fmoc-FFS의 분자량 ($643 [M+Na]^+$, $659 [M+K]^+$)은 MALDI-TOF/TOF 질량 분석기로 확인하였다.

[0140] 제조예 3. Fmoc-FEFET의 제조

[0141] Fmoc-FEFET는 CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Discover에서 표준 고체상 펩티드 합성 방법을 이용하여 Rink Amide MBHA 수지 상에서 합성하였다. DCM으로 수지를 세척한 후, 교반 배양기에서 30분 동안 DMF 및 DCM이 1:1로 혼합된 용액에서 수지를 팽창시켰다. 수지의 Fmoc 부분을 DMF 내에서 20% 피페리딘으로 3분간 마이크로파에서 제거하고, DMF, DCM 및 NMP로 완전히 세척하였다. 그 후 각각 Fmoc-Thr(tBu)-OH (5.0 당량); HBTU (4.9 당량); 및 DIPEA (5.0 당량)과 혼합된 NMP 용액을 수지에 첨가하고, 10분간 마이크로파에서 처리하였다. 그 후, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 및 Fmoc-Phe-OH를 Fmoc-FEFET-수지 순서로 수지 상의 펩티드의 N-말단과 커플링시켰다. 각각의 커플링 및 보호기 제거 공정에 대하여 Kaiser 테스트를 통해 자유 아미노기의 존재를 확인하였다. 수지에 절단 용액 (TFA:TIS:H₂O = 95:2.5:2.5)을 교반 배양기에서 2시간동안 처리하였다. 과량의 TFA는 아르곤 가스로 제거하였고, 생성물을 차가운 Et₂O에서 침전시킨 후 4000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 펩티드는 역상 HPLC로 C18 컬럼(SUPELCO, Discovery[®] BIO Wide Pore C18, 5 μ m, 10 x 250 mm)에서 2 mL min⁻¹ 속도로 물 (0.1% TFA) 및 아세트ونی트릴 (0.1% TFA)의 선형 구배를 사용하여 펩티드를 정제하고, 230 nm 및 254 nm에서 UV 흡수 스펙트럼으로 확인하였다. Fmoc-FEFET의 분자량 ($915 [M+Na]^+$, $932 [M+K]^+$)은 MALDI-TOF/TOF 질량 분석기로 확인하였다.

[0143] 제조예 4. Fmoc-WFT의 제조

[0144] Fmoc-WFT는 CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Discover에서 표준 고체상 펩티드 합성 방법을 이용하여 Rink Amide MBHA 수지 상에서 합성하였다. DCM으로 수지를 세척한 후, 교반 배양기에서 30분 동안 DMF 및 DCM이 1:1로 혼합된 용액에서 수지를 팽창시켰다. 수지의 Fmoc 부분을 DMF 내에서 20% 피페리딘으로 3분간 마이크로파에서 제거하고, DMF, DCM 및 NMP로 완전히 세척하였다. 그 후 각각 Fmoc-Thr(tBu)-OH (5.0 당량); HBTU (4.9 당량); 및 DIPEA (5.0 당량)과 혼합된 NMP 용액을 수지에 첨가하고, 10분간 마이크로파에서 처리하였다. 그 후, Fmoc-Trp-OH 및 Fmoc-Phe-OH를 Fmoc-WFT-수지 순서로 수지 상의 펩티드의 N-말단과 커플링시켰다. 각각의 커플링 및 보호기 제거 공정에 대하여 Kaiser 테스트를 통해 자유 아미노기의 존재를 확인하였다. 수지에 절단 용액 (TFA:TIS:H₂O = 95:2.5:2.5)을 교반 배양기에서 2시간동안 처리하였다. 과량의 TFA는 아르곤 가스로 제거하였고, 생성물을 차가운 Et₂O에서 침전시킨 후 4000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 펩티드는 역상 HPLC로 C18 컬럼(SUPELCO, Discovery[®] BIO Wide Pore C18, 5 μ m, 10 x 250 mm)에서 2 mL min⁻¹ 속도로 물 (0.1% TFA) 및 아세트ونی트릴 (0.1% TFA)의 선형 구배를 사용하여 펩티드를 정제하고, 230 nm 및 254 nm에서 UV 흡수 스펙트럼으로 확인하였다. Fmoc-WFT의 분자량 ($674 [M+H]^+$, $696 [M+Na]^+$)은 MALDI-TOF/TOF 질량 분석기로 확인하였다.

[0146] 제조예 5. Fmoc-WWT의 제조

[0147] Fmoc-WWT는 CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Discover에서 표준 고체상 펩티드 합성 방법을 이용하여 Rink Amide MBHA 수지 상에서 합성하였다. DCM으로 수지를 세척한 후, 교반 배양기에서 30분 동안 DMF 및 DCM이 1:1로 혼합된 용액에서 수지를 팽창시켰다. 수지의 Fmoc 부분을 DMF 내에서 20% 피페리딘으로 3분간 마이크로파에서 제거하고, DMF, DCM 및 NMP로 완전히 세척하였다. 그 후 각각 Fmoc-Thr(tBu)-OH (5.0 당량); HBTU (4.9 당량); 및 DIPEA (5.0 당량)과 혼합된 NMP 용액을 수지에 첨가하고, 10분간 마이크로파에서 처리하였다. 그 후, Fmoc-Trp-OH를 Fmoc-WWT-수지 순서로 수지 상의 펩티드의 N-말단과 커플링시켰다. 각각의 커플링 및 보호기 제거 공정에 대하여 Kaiser 테스트를 통해 자유 아미노기의 존재를 확인하였다. 수지에 절단 용액 (TFA:TIS:H₂O = 95:2.5:2.5)을 교반 배양기에서 2시간동안 처리하였다. 과량의 TFA는 아르곤 가스로

제거하였고, 생성물을 차가운 Et₂O에서 침전시킨 후 4000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 펩티드는 역상 HPLC로 C18 컬럼(SUPELCO, Discovery[®] BIO Wide Pore C18, 5 μ m, 10 x 250 mm)에서 2 mL min⁻¹ 속도로 물 (0.1% TFA) 및 아세트니트릴 (0.1% TFA)의 선형 구배를 사용하여 펩티드를 정제하고, 230 nm 및 254 nm에서 UV 흡수 스펙트럼으로 확인하였다. Fmoc-WWT의 분자량 (714 [M+H]⁺, 736 [M+Na]⁺, 752 [M+K]⁺)은 MALDI-TOF/TOF 질량 분석기로 확인하였다.

[0149] 제조예 6. Naph-FFT의 제조

[0150] Naph-FFT는 CEM Focused Microwave[™] Synthesis System, Discover에서 표준 고체상 펩티드 합성 방법을 이용하여 Rink Amide MBHA 수지 상에서 합성하였다. DCM으로 수지를 세척한 후, 교반 배양기에서 30분 동안 DMF 및 DCM이 1:1로 혼합된 용액에서 수지를 팽창시켰다. 수지의 Fmoc 부분을 DMF 내에서 20% 피페리딘으로 3분간 마이크로파에서 제거하고, DMF, DCM 및 NMP으로 완전히 세척하였다. 그 후 각각 Fmoc-Thr(tBu)-OH (5.0 당량); HBTU (4.9 당량); 및 DIPEA (5.0 당량)과 혼합된 NMP 용액을 수지에 첨가하고, 10분간 마이크로파에서 처리하였다. 그 후, Fmoc-Phe-OH를 Naph-FFT-수지 순서로 수지 상의 펩티드의 N-말단과 커플링시켰다. Fmoc은 동일한 커플링 과정을 통해 1-나프틸아세트산(1-Naphthylacetic acid)으로 치환시켰다. 각각의 커플링 및 보호기 제거 공정에 대하여 Kaiser 테스트를 통해 자유 아미노기의 존재를 확인하였다. 수지에 절단 용액 (TFA:TIS:H₂O = 95:2.5:2.5)을 교반 배양기에서 2시간동안 처리하였다. 과량의 TFA는 아르곤 가스로 제거하였고, 생성물을 차가운 Et₂O에서 침전시킨 후 4000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 펩티드는 역상 HPLC로 C18 컬럼(SUPELCO, Discovery[®] BIO Wide Pore C18, 5 μ m, 10 x 250 mm)에서 2 mL min⁻¹ 속도로 물 (0.1% TFA) 및 아세트니트릴 (0.1% TFA)의 선형 구배를 사용하여 펩티드를 정제하고, 230 nm 및 254 nm에서 UV 흡수 스펙트럼으로 확인하였다. Naph-FFT의 분자량 (603 [M+Na]⁺, 619 [M+K]⁺)은 MALDI-TOF/TOF 질량 분석기로 확인하였다.

[0152] 상기 제조예 1 내지 6에 따라 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FFV, Fmoc-FFA, Fmoc-FFS, Fmoc-FEFET, Fmoc-WFT, Fmoc-WWT, 및 Naph-FFT가 성공적으로 제조되었음을 HPLC (도 1), 및 MALDI/TOF-TOF (도 2)를 통해 확인하였다.

[0154] 제조예 7. 나노 구조체의 형성

[0155] 상기 제조예 1 내지 6에서 합성된 모든 화합물을 임계 농도를 고려하여 정제수에 10 내지 20 μ M 농도로 첨가함으로써 자기 조립된 나노 구조체를 제조하였다.

[0157] 7.1 Fmoc-FF

[0158] 합성된 Fmoc-FF는 CD 분광학 실험 시 195 nm에서 양의 최대 타원율(positive maximum ellipticity)과 220 nm에서 음의 최소 타원율(negative minimum ellipticity)을 보여주는 것으로 보아 수용액상에서 전형적인 베타시트 이차 구조를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 농도에 따른 발광 강도(emission intensity) 차이를 통해 17 μ M의 임계미셀농도(Critical micellar concentration, CMC)를 가짐을 알 수 있었다. 이러한 Fmoc-FF가 수용액 상에서 5 nm 두께를 가지는 피브릴을 형성함을 TEM (transmission electron microscopy) 실험을 통해 확인하였다 (도 3).

[0160] 7.2 Fmoc-FFT, Fmoc-FFV, Fmoc-FFA, 및 Fmoc-FFS

[0161] 합성된 Fmoc-FF기반의 Fmoc-FFT, Fmoc-FFV, Fmoc-FFA, 및 Fmoc-FFS 펩타이드는 모두 베타시트 이차 구조를 가지는 것을 CD 분광학을 통해 확인하였다 (도 4). 그러나 자기 조립 나노구조체 형태는 화합물에 따라 상이하였다 (도 5). Fmoc-FF에 Thr 잔기를 도입한 Fmoc-FFT는 1D 피브릴 구조가 유지되는 반면, Fmoc-FFT에서 Thr 잔기의 하이드록실기가 메틸기로 치환된 Fmoc-FFV의 경우 소수성 상호작용이 강화되어 2D 시트구조가 형성되었고, 메틸기와 하이드록실기가 모두 없는 Fmoc-FFA의 경우도 2D 시트구조 또는 리본구조가 형성되었으며, 메틸기가

제거된 Fmoc-FFS의 경우 피브릴을 그대로 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

[0163] 7.3 Fmoc-FEFET

[0164] Fmoc-FEFET는 Fmoc-FFT에 비해 CMC가 22.8 μM 로 증가하는 것으로 보아 용해도가 향상되었음을 확인할 수 있었다. 또한 베타시트 이차 구조를 가지며 수용액상에서 매우 잘 분산된 피브릴을 형성함을 cryo-TEM과 TEM으로 확인하였다 (도 6).

[0166] 7.4 Fmoc-FF 및 Fmoc-FFT의 공-조립 (co-assembly)

[0167] Fmoc-FF, 및 Fmoc-FFT를 2:1(mole:mole)로 혼합하여 FmocFF:FmocFFT의 공조립체를 제조하였다. Fmoc-FF, 및 Fmoc-FFT와 CMC가 비슷하였고, DLS 분광학을 통해 공조립체가 균일한 분산성을 가지며 나노구조체의 형태는 피브릴을 그대로 유지함을 TEM 실험을 통해 확인하였다 (도 7).

[0169] 7.5 Fmoc-WFT, Fmoc-WWT, 및 Naph-FFT

[0170] Fmoc-WFT, 및 Fmoc-WWT 경우 각각 랜덤코일, 알파헬릭스 이차구조가 우세하게 형성됨을 확인하였으며, 특히, F를 모두 W로 대체한 Fmoc-WWT의 경우 헬리컬 피브릴이 형성함을 확인하였다 (도 8).

[0172] 실시예 1. 결빙 제어 효과

[0173] 실시예 1.1 골드 나노입자의 색변화를 활용한 항 동결 효과 분석 (TH, IRI 평가)

[0174] 항 동결 활성으로서 열 이력현상(thermal hysteresis, TH)은 Park, J.-I., Lee, J. H., Gwak, Y., Kim, H. J., Jin, E., & Kim, Y.-P. (2013). *Frozen assembly of gold nanoparticles for rapid analysis of antifreeze protein activity. Biosensors and Bioelectronics*, 41, 752-757에 기재된 방법에 따라 측정하였고, 얼음 재결정화 억제 (ice recrystallization inhibition, IRI) 활성은 Mitchell, D. E., Congdon, T., Rodger, A., & Gibson, M. I. (2015). *Gold Nanoparticle Aggregation as a Probe of Antifreeze (Glyco) Protein-Inspired Ice Recrystallization Inhibition and Identification of New IRI Active Macromolecules. Scientific Reports*, 5(1)에 기초하여 측정하였다. 더욱 구체적으로, 금 나노입자가 분산된 용액에 AFP를 분산시키고 용액을 냉동시킨 후 다시 해동시킬 때, AFP가 얼음결정면과 결합력이 좋을 경우 골드 나노입자의 분산성이 좋아 본래 용액색을 유지하는 반면, 결합력이 약하여 AFP를 석출하며 얼음결정이 빠르게 생성될 경우 용액은 색변화를 일으킨다.

[0176] 실시예 1.1.1 골드나노입자의 합성

[0177] 시트르산으로 안정화된 금 나노입자 (Cit-AuNP)를 합성하여 머캅토프로피온산(mercaptopropionic acid, MPA)-AuNP를 제조하였다. 1 mM의 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 를 함유하는 20 mL의 저장용 용액을 50 mL의 정제수(deionized water, DI water)에 첨가하였다. 상기 용액을 교반하며 끓는점까지 가열한 후, 2 mL의 정제수 중의 30 mM 소듐 시트르산을 상기 용액에 더 첨가하고 20분간 가열하였다. 용액의 색은 밝은 노랑에서 버건디색으로 변하였다. 그 후, 용액을 교반하면서 실온까지 냉각하고 1시간 동안 더 교반하였다. MPA-capped AuNP의 평균 크기는 약 16.7 nm로 측정되었다.

[0179] 실시예 1.1.2 비색 분석(Colorimetric assay)

[0180] 마이크로웰 플레이트에서 0.5 mM의 시료를 포함하는 용액 50 μL 를 300 μM MPA-AuNP 용액 350 μL 에 각각 첨가하였다. 대조군으로 300 μM MPA-AuNP 용액 350 μL 를 사용하였다. 시료 혼합물이 담긴 마이크로웰 플레이트를 -65°C 로 23분간 냉각시키고, 완전히 녹을 때까지 실온에서 승온시켰다. 동결 과정 동안, 5분마다 시료를 관찰하였고, 20분이 지난 시점부터는 1분마다 확인하였다. 동결 전 및 해동 후의 색 변화를 정량적으로 확인하기 위하여, 동결 전 및 해동 후에 각 혼합물의 흡수 스펙트럼을 UH5300 분광계로 측정하였다. 스펙트럼은 400 nm/min

스캔 속도로 300 nm 내지 900 nm에서 측정하였고, 각 혼합물의 응집 특성 (E525/E650)을 비교하였다.

[0182] 실시예 1.1.3 BSA 및 PEG의 TH 및 IRI 활성 측정

[0183] 얼음 재결정화 억제 효과를 가지는 것으로 알려진 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)와 얼음 재결정화 억제 효과가 없는 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol, PEG)을 이용하여 상기 실험의 신뢰성을 확인하였다. BSA 첨가 시 응집이 일어나지 않아 색변화가 없었지만 PEG 첨가 용액은 색변화가 일어났으며, 이를 통해 응집이 일어났음을 확인하였다 (도 9). 이 실험을 통해 부동효과 확인이 가능함을 입증하였다.

[0185] 실시예 1.1.4 Fmoc-FF, Fmoc-FFX, Fmoc-FEFET, Fmoc-FF:FmocFFT=2:1, Fmoc-WFT, Fmoc-WWT, Naph-FFT의 TH 및 IRI 활성 측정

[0186] 525 nm에서 가장 강한 흡수를 보이는 금입자가 용액의 냉동/해동 후에 특이적으로 Fmoc-WFT, 및 Fmoc-WWT를 첨가한 경우는 응집 현상을 보여 흡수 피크가 650 nm로 일부 적색 편이된 것을 확인할 수 있었다 (도 10). 이는 이 두 시료의 경우 다른 시료와 달리 이차 구조가 베타시트 형태를 벗어나기 때문에 표면의 트레오닌(Thr), 즉, 얼음과 결합하는 잔기의 규칙적인 배열이 달라지는 것 때문으로 설명할 수 있다.

[0188] 실시예 1.2 스플랫 분석 (slpat assay)을 이용한 IRI 활성 분석

[0189] 얼음결정성장 억제 효과를 좀더 명확히 확인하기 위하여 Ice recrystallization inhibition(IRI) 특성을 분석하였다. 얼음 재결정화의 분석은 Mitchell, D. E., Clarkson, G., Fox, D. J., Vipond, R. A., Scott, P., & Gibson, M. I. (2017). *Antifreeze Protein Mimetic Metallohelices with Potent Ice Recrystallization Inhibition Activity. Journal of the American Chemical Society, 139(29), 9835-9838* 및 Budke, C., Heggemann, C., Koch, M., Sewald, N., & Koop, T. (2009). *Ice Recrystallization Kinetics in the Presence of Synthetic Antifreeze Glycoprotein Analogues Using the Framework of LSW Theory. The Journal of Physical Chemistry B, 113(9), 2865-2873*를 참조하여 수행하였다. 더욱 구체적으로, 10 μ L 시료를 1.5 mm 높이에서 미리 -60℃로 냉각된 커버글라스 표면에 떨어뜨려 얇은 얼음 막을 생성시켰다. 얇은 얼음 막이 형성된 커버글라스를 20℃로 설정된 Peltier 냉각기로 옮기고 커버글라스의 표면을 5 min⁻¹ 속도로 -6℃까지 승온시키고 시료를 30분간 어닐링시켰다. 암시야 현미경 (DFOM) 이미지를 얼음 재결정화 동안에 촬영하고, 이미지에서 가장 큰 10개의 입자를 선택하여 평균값을 계산함으로써 IRI 활성을 평가하였다. 평균 최대 입자 크기 (mean largest grain size, MLGS) 분석은 3회 반복 실험하였다.

[0190] Fmoc-FFT, Fmoc-FFV, Fmoc-FFA, 및 Fmoc-FFS는 IRI 효과를 가짐을 확인하였으며, 동결 후 해동 시 얼음 재결정 과정 중에 얻은 DFOM 이미지 (도 12a)를 정량 분석함으로써 IRI 효과를 결정하였다. Fmoc-FFT가 가장 높은 IRI 활성을 보였으며, 그 다음으로는 FFA, FFV 및 FFS 순으로 IRI 활성이 있는 것으로 나타났다. 이를 통해, 친수성, 및 소수성 잔기가 모두 존재하는 것이 동결 억제 활성에서 중요함을 확인하였다. 즉, 친수성기는 물과 수소 결합을 형성하고 소수성기는 사이에 물을 가두는 방법으로 얼음 성장을 억제할 수 있는 것으로 생각된다.

[0191] Fmoc-FEFET 나노피브릴의 경우 Fmoc-FFT와 비교하여 비슷하거나 조금 높은 IRI 효과를 지님을 확인할 수 있었고, 각추면과의 결합을 유도한 Fmoc-FF와 Fmoc-FFT를 공조립시킨 나노 피브릴의 경우 조금 더 높은 IRI 효과를 가짐을 확인할 수 있었다(도 13).

[0192] 또한 Fmoc-FFT의 Fmoc을 나프탈렌으로 치환한 Naph-FFT, 및 적어도 하나의 페닐알라닌을 트립토판, 즉 소수성 아미노산으로 대체한 Fmoc-WFT, 및 Fmoc-WWT의 경우 모두 IRI 효과를 가지는 것으로 나타났다 (도 14).

[0194] 실시예 2. 줄기 세포 및 생식 세포에 대한 독성 평가 및 동결 보존 효과

[0195] 실시예 2.1 세포 실험 방법

[0196] 실시예 2.1.1 동물

[0197] C57BL/6J 마우스(OrientBio Korea)를 정자 공여체(12 내지 15주령) 및 난자 공여체(8 내지 10주령)로 사용하였

다. C57BL/6 기반으로 유전적으로 변이된 마우스 10종을 체외 수정 (In Vitro Fertilization, IVF) 및 배아 이식에 사용하였다. ICR 마우스 (8 내지 10주령, SLC JAPAN)을 2-세포 배아의 수요체로 사용하였다.

[0199] 실시예 2.1.2 배지

[0200] 정자를 동결보존하기 위하여, 본 발명에 따른 동결보존제가 첨가된 100 mM L-글루타민 또는 탈지유를 함유하는 변경된 18% 라피노오스 펜타하이드레이트/3% 탈지유 (Difco, Becton Dickinson) 용액을 제조하였다. IVF 과정 동안 HTF (human tubal fluid) 배지를 사용하였고, 2-세포 배아를 배반포 단계까지 배양하는 동안에는 PSOM (potassium simplex optimized medium)을 사용하였다.

[0202] 실시예 2.1.3 정자 동결 및 해동

[0203] 60 μ L로 분주된 정자 동결보존 용액을 35 mm 배양 접시에 담고 파라핀 오일로 덮었다. 수컷 마우스를 경부 전위로 희생시킨 후, 정소 상체의 미부를 제거하고 조각으로 나누었으며, 동결보존 용액으로 옮기기 전에 현미경으로 관찰하면서 모든 지방 및 혈액을 제거하였다. 배양 접시를 37°C에서 3분간 유지시키고 매분마다 부드럽게 교반하여 조직으로부터 정자가 분산되도록 하였다. 정자를 준비하는 동안, 동결용 빨대 (freezing straw)에 100 μ L의 동결보존 용액 및 15 mm 공기를 1 mL 주사기를 사용하여 주입하였다. 정자 현탁액을 동결 빨대에 주입하고 양쪽 끝을 밀봉하였다. 밀봉된 빨대를 동결용 용기로 옮기고 저장을 위해 액화 질소에 넣었다. IVF 실험 전에 시료를 액화 질소에서 꺼내고 37°C 항온수조에서 10분간 해동하였다.

[0205] 실시예 2.1.4 체외수정

[0206] 성체 암컷 마우스에 7.5 IU의 말 융모성 성선 자극호르몬을 복막내 주사하여 과배란을 유도하고 48시간 후 인간 융모성 성선 자극호르몬 (human chorionic gonadotropin, hCG) 7.5 IU를 주입하였다. 15시간 후, 마우스를 희생시키고 수란관을 빠르게 제거하여 파라핀 오일이 담긴 수정용 접시로 옮겼다. 그 후 2마리 내지 3마리의 암컷 마우스의 나팔관 팽대부로부터 4 내지 6개의 난자 난구 복합체를 수득하고 난자에 HTF 배지 90 μ L를 가하였다.

[0207] 다양한 조건 하에서 동결된 정자를 해동시켜 난자를 함유하는 IVF 드랍(drop)에 첨가하고 37°C에서 배양하였다 (최종 운동형 정자 농도: 200-400 sperm/ μ L). 6시간 후, 수정된 난자를 HTF 드랍에서 3회 세척하였다. 수정 24시간 후, 전체 난자 수 대비 2-세포 배아의 총 수를 백분율로 하여 수정율을 계산하였다.

[0209] 실시예 2.1.5 배아 배양 및 착상

[0210] IFV를 수행한 후, 2-세포 배아를 배반포 단계로 배양할 군과 ICR 암컷의 수란관에 착상시킬 군으로 분류하였다. 출산 후에, 새끼의 수를 기록하였다.

[0212] 실시예 2.1.6 통계 분석

[0213] 두 군 간의 비교는 Student's t 검정을 이용하였고, 다수의 군에 대해서는 일방 또는 쌍방 ANOVAs를 이용하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM로 표기하였다. 별표는 통계적으로 유의한 수준을 나타낸다 (*, $P < 0.05$, and **, $P < 0.01$). $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0215] 실시예 2.1.7 마우스 배아 줄기 세포 배양

[0216] 마우스 ES 세포를 0.1% 젤라틴(Sigma)이 코팅된 60 mm 세포 배양 접시에서 분화를 막기 위한 2 mM L-글루타민 (Mediatech Inc), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Mediatech Inc), 15% 열-불활성화된 우태아혈청 (Hyclone), 20 mM HEPES-pH 7.3 (Cellgro), 0.1 mM MEM 비필수 아미노산 (Cellgro), 0.1 mM 2-머캅토에탄올 (Sigma) 및 1000U/mL LIF (Millipore)가 첨가된 DMEM (Hyclone) 배지에서 배양하였다.

- [0218] 실시예 2.1.8 마우스 배아 줄기 세포 생존율 분석
- [0219] 마우스 ES 세포를 상기의 다양한 동결보존 용액이 담긴 96웰 플레이트에서 웰 당 8×10^4 세포씩 접종하였다. 9 시간 후, CCK-8 시약을 첨가하고 ELISA Reader (TECAN)을 이용하여 형광 강도를 측정하였다.
- [0221] 실시예 2.1.9 마우스 배아 줄기 세포 동결 및 해동
- [0222] 트립신화된 마우스 ES 세포 250 μ L, FBS 200 μ L 및 동결보존 용액 50 μ L (0.005 μ M, 0.01 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M)를 급속 냉동고에서 2일간 냉동시킨 후, LN2 탱크에서 저장하였다. 해동은 37℃ 항온수조에서 수행하였다. 세포 냉동 스톱 혼합물은 15mL 튜브의 4.5 mL 배지에 접종하고 1000 rpm으로 5분간 원심분리시켰다. 세포 펠렛에 1 mL 배지를 첨가하고 6웰 플레이트에 접종하였다.
- [0224] 실시예 2.1.10 크리스탈 바이올렛 염색
- [0225] 마우스 ES 세포를 2.5 μ M 내지 10 μ M 동결보존 용액에서 12시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS 500 μ L로 세척하고 4% PFA 500 μ L를 15분간 첨가하였다. 고정된 세포를 PBS 500 μ L로 2회 세척하고 0.5% 크리스탈 바이올렛 용액을 30분간 첨가하였다. 염색된 세포는 수돗물로 세척하였다.
- [0227] 실시예 2.2 마우스 배아 줄기 세포 (Mouse embryonic stem cells, mESCs)에 대한 독성 및 동결보존효과
- [0228] Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FFA, Fmoc-FEFET, 및 Fmoc-FF+ Fmoc-FFT (2:1 mole:mole)의 줄기세포에 대해 동결보존 효과를 확인하였다.
- [0230] 실시예 2.2.1 CCK-8 분석을 이용한 mESC의 세포 생존율 평가
- [0231] 화학적 동결 방지제인 DMSO를 대조군으로하여 상기 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FFA, Fmoc-FEFET, 및 Fmoc-FF+ Fmoc-FFT (2:1 mole:mole)에 대해 5 내지 20 μ M 범위내에서 mESC에 처리하고 CCK-8 분석법을 이용하여 세포 생존율을 확인하였다.
- [0232] 크리스탈 바이올렛 염색 이미지에서 확인할 수 있듯이 DMSO는 세포에 대해 높은 독성을 나타내었다. 반면, 본 발명에 따른 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FFA, Fmoc-FEFET, 및 Fmoc-FF+ Fmoc-FFT (2:1 mole:mole)는 독성이 나타나지 않았으며 (도 15a-c), 이를 통해 본 발명에 따른 소재가 생체적합성 소재임을 확인하였다.
- [0233] 또한, Fmoc-FFV, Fmoc-FFS, Fmoc-WFT, Fmoc-WWT, 및 Naph-FFT 역시 mESC에 대하여 상당 수준의 세포 생존율을 보이는 것을 확인하였다 (도 16).
- [0235] 실시예 2.2.2 mESC에 대한 동결보존 활성
- [0236] 세포보관용액은 본 발명에 따른 시료 용액 10%(v/v), FBS 40%(v/v), Media 50%(v/v)로 제조하였고, 급속 냉동고를 사용하여 -80℃로 동결시킨 후 2일 동안 세포를 보관하고, 액체질소 탱크에 2일 이상 보관한 후, 이를 해동하여 실험에 사용하였다. 또한, LIF(leukemia inhibitory factor)와 함께 처리하여 세포를 배양함으로써, 줄기세포의 분화능을 확인하였다. 대조군은 본 발명에 따른 시료 대신에 정제수를 첨가한 것을 제외하고는 모두 동일한 조건에서 배양하고 분화시켰다.
- [0237] 본 발명에 따른 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FFA, Fmoc-FEFET, 및 Fmoc-FF+ Fmoc-FFT (2:1 mole:mole)를 이용하여 동결 및 해동하는 경우, mESC의 생존 및 증식이 원활히 이루어지는 반면, 대조군의 경우 대부분의 세포가 사멸되는 것으로 확인되었다 (도 17a). 또한 mESC의 세포분화를 4일 후까지 확인하였을 때 (도 17b). 본 발명에 따른 소재는 줄기세포 동결보존제로서 이용될 수 있음을 확인하였으며, 고농도에서도 세포분화가 잘 일어나는 것을 확인하였다 (도 18).

[0239] **실시예 2.3 생식세포 정자(sperm) 동결보존효과**

[0240] 정자를 3% 탈지유; 및 Fmoc-FF, Fmoc-FFT, Fmoc-FFA, Fmoc-FFS, Fmoc-FFV, Fmoc-WFT, Fmoc-WWT, Naph-FFT, 또는 Fmoc-FF + Fmoc-FFT (2:1 mole:mole)와 함께 상기의 실시예 2.2.2의 방법에 따라 동결 및 해동시킨 후 난자에 체외수정(IVF, in vitro fertilization)하여 배아세포 생성 유무를 확인함으로써, 동결 및 해동된 생식세포가 생식 기능을 유지하는지 확인하였다. 또한 마우스에 직접적인 수정란 이식을 통해 동결보존된 정자가 제 기능을 유지하는지에 관해 연구하였다.

[0241] 먼저, 공조립된 파이버 소재, Fmoc-FF + Fmoc-FFT (2:1 mole:mole) 및 3% 탈지유에서 정자를 동결시킨후, 난자에 수정시켜 형성된 수정란(fertilized egg)의 개수를 확인하였다. 2.5 내지 7.5 μ M에서 70%이상 2.5 내지 10 μ M에서 50%이상의 수정란이 성공적으로 형성되었음을 확인하였다 (도 19).

[0242] 또한, 상기 본 발명에 따른 9가지 소재에 대하여 10 내지 20 μ M을 포함하는 3% 탈지유에서 정자를 동결시키고, 난모세포에 주입한 후, 접합체 성장(Zygote Development) 과정에서 2-세포 배아를 분리하였다. 그 후 배반포(Blastosysts)로의 성숙과정을 확인함으로써 동결보존 효과를 확인하고자 하였다 (도 20). 모든 샘플은 해동한 정자를 난자에 수정 시 60% 이상의 비율로 2-세포 배아가 형성되었으며, 특이적으로 Fmoc-WWT의 경우 77% 이상 높은 효율로 2-세포 배아가 생성되었음을 확인하였다. 분리된 2-세포 배아의 배반포 생성 비율은 모두 70% 이상 보였으며, 특히 각추면과 결합을 유도한, 공조립된 Fmoc-FF + Fmoc-FFT (2:1 mole:mole)의 경우 70%이상의 비율로 2-세포 배아를 형성하고 92%이상 배반포를 형성함을 확인하였다. 이는 얼음성장을 억제함과 동시에 생성된 얼음의 형상이 바늘 형상이 아닌 구 형태의 얼음 성장 과정을 유도하기 때문이라고 판단하였다.

[0243] 배반포는 수정란이 자궁벽에 착상할 때의 형태이므로, 2-세포 배아 60개를 세 마리의 암쥐(C57BL/6)의 자궁에 주입한 결과, 태어난 생쥐 중 50-60%의 쥐가 건강하게 생존함을 확인하였다 (도 21).

[0245] **실시예 3. 식품에 대한 결빙제어 효과**

[0246] Fmoc-FFT가 식품에 대한 동결 보존제로 사용가능한지 여부를 판단하고자 소고기(도 22a)에 Fmoc-FFT를 첨가시킨 후 -20℃에서 하루 동안 냉동하고 실온으로 해동한 후 SEM 이미지를 관찰하였다(도 22b, 및 d). Fmoc-FFT를 첨가하지 않은 경우, 조직 표면이 매우 거칠고 큰 구멍들이 발견되는 반면(도 22b), Fmoc-FFT를 첨가한 경우, 조직 표면이 매우 매끄럽고 조직 사이에 큰 구멍들이 잘 발견되지 않았다 (도 22d).

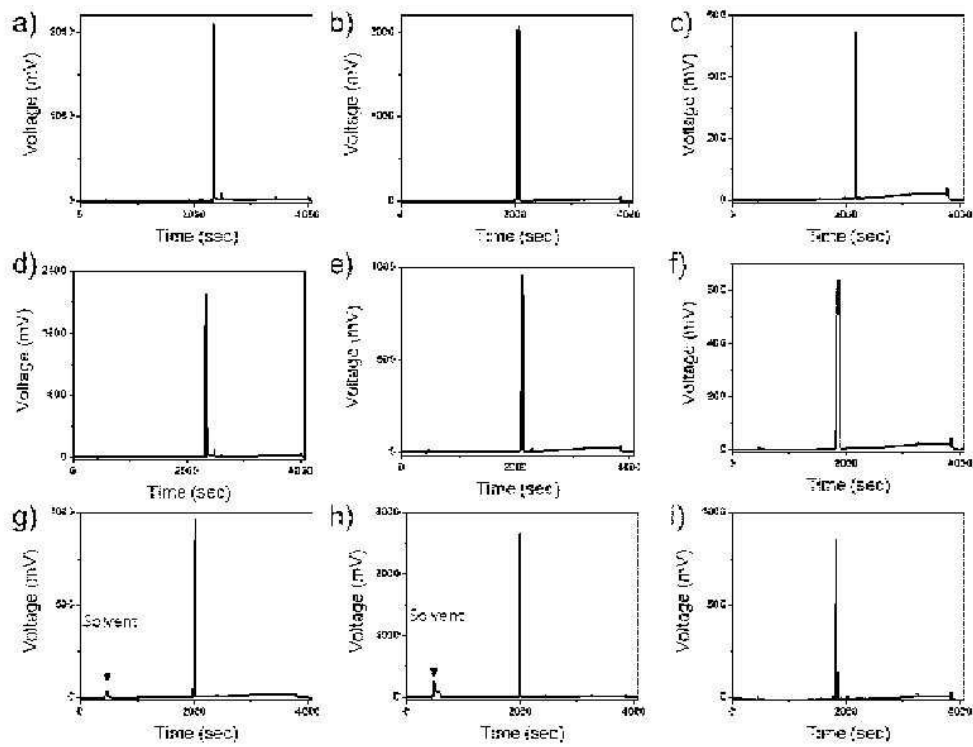
[0247] 동결 및 해동 후 소고기 조직을 확인하기 위해 Fmoc-FFT를 물에 첨가하고 -20 ℃로 얼린 후 얼음의 재결정 과정을 광학현미경으로 살펴본 결과, Fmoc-FFT를 첨가한 경우(도 22e), Fmoc-FFT를 첨가하지 않은 경우(도 22c)에 비하여, 재결정 얼음의 크기가 현저히 작은 것을 확인하였다.

[0248] 또한, 조직 변화를 더욱 상세히 확인하기 위하여, 해동한 조직을 급속하게 액체질소에서 얼려 -20 ℃를 유지한 채로 자르고 내부 조직을 살펴보았다. Fmoc-FFT를 육류에 첨가한 경우(도 22e 오른쪽), Fmoc-FFT를 첨가하지 않은 경우(도 22c 오른쪽)에 비하여, 재결정 얼음의 크기가 현저히 작은 것을 확인하였다. Fmoc-FFT를 첨가하지 않은 경우 조직 구멍의 크기는 $22 \pm 8.6 \mu\text{m}$ 이었으며, 첨가한 경우 $5 \pm 2.3 \mu\text{m}$ 로 관찰되었다.

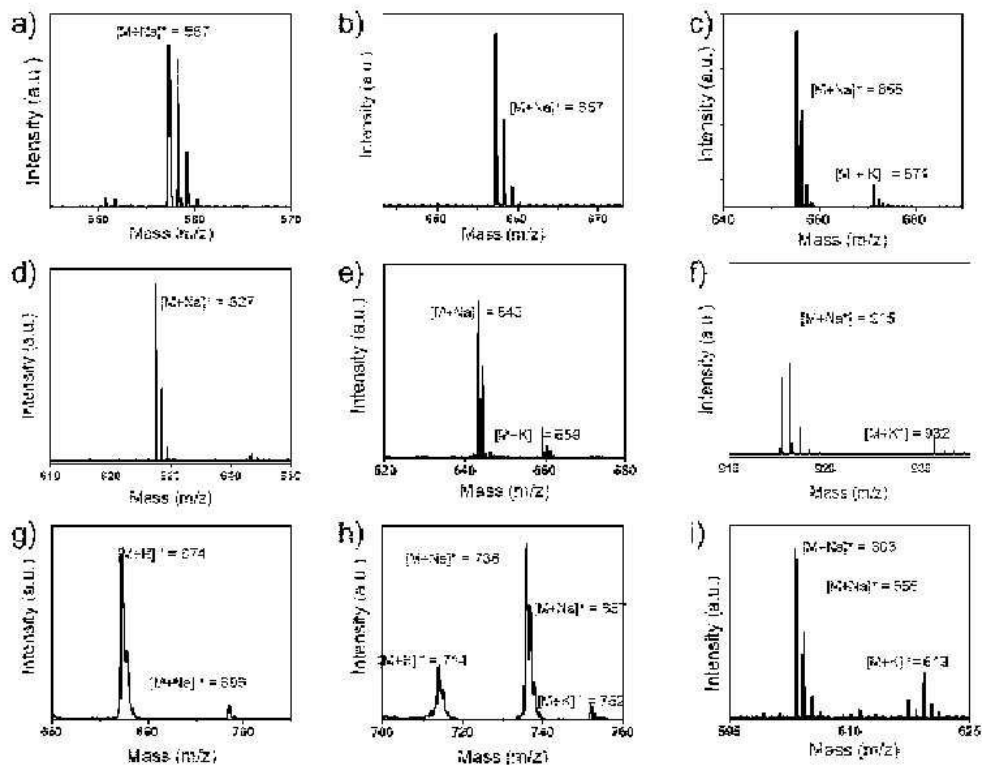
[0250] 예를 들어, 청구항 구성 목적을 위해, 이하 기재되는 청구항은 어떤 식으로든 이의 문자 그대로의 언어보다 좁게 해석되어선 안 되고, 따라서 명세서로부터의 예시적 구현예가 청구항으로 읽혀서는 안 된다. 따라서, 본 발명은 예시로서 기재되었고, 청구항의 범위에 대한 제한이 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구항에 의해서만 제한된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 발행된 특허, 특허 출원, 서적 및 저널 논문은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 각각 포함된다.

도면

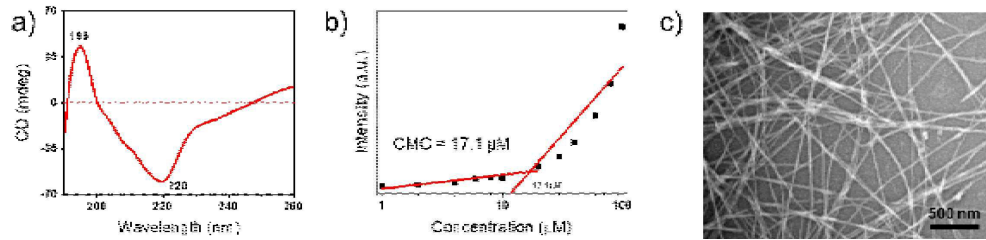
도면1



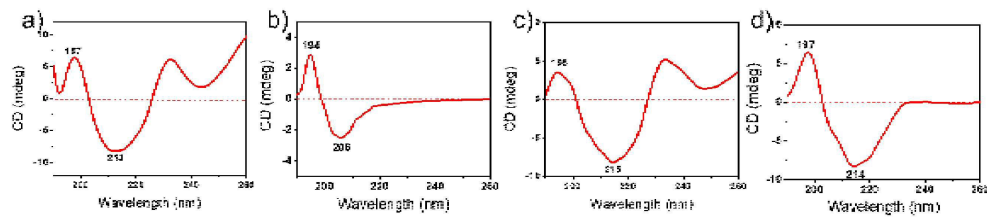
도면2



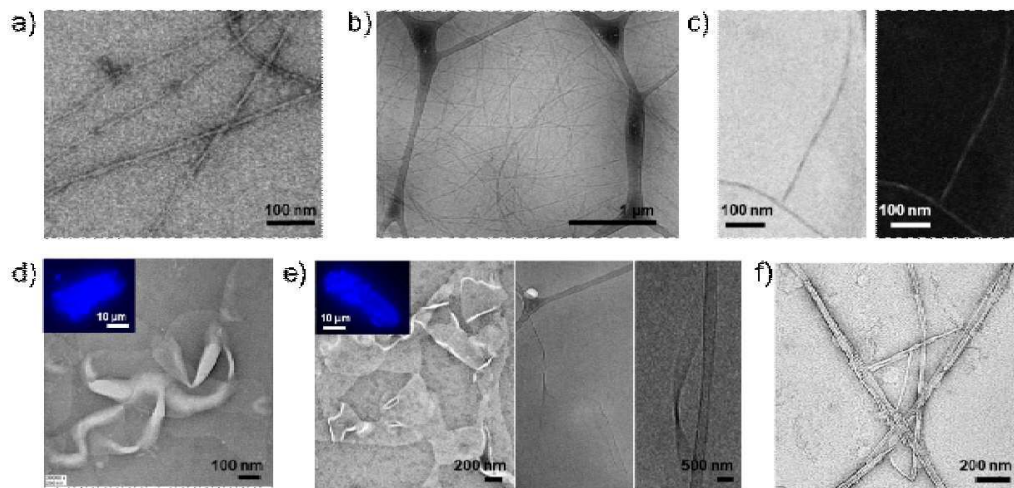
도면3



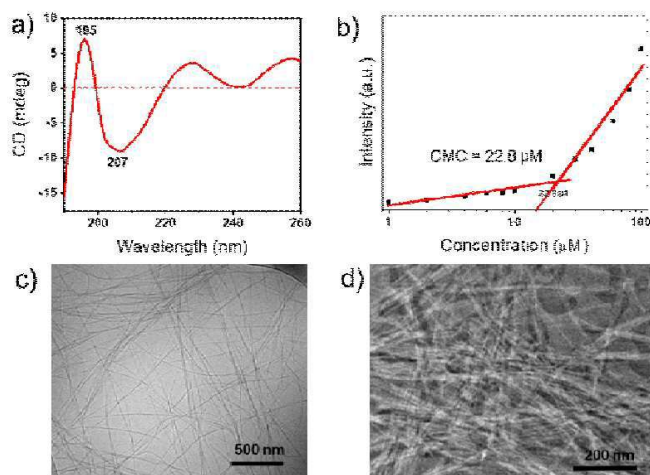
도면4



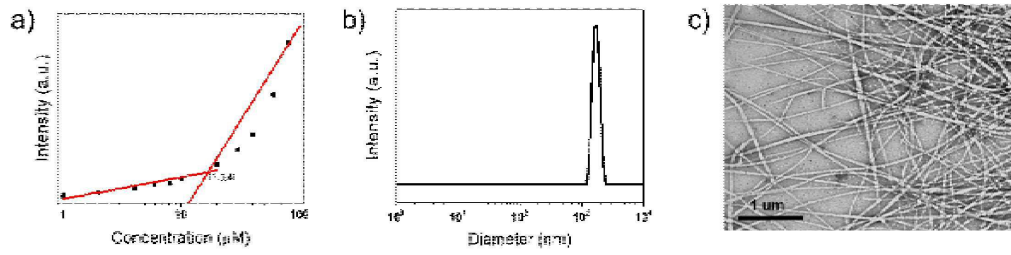
도면5



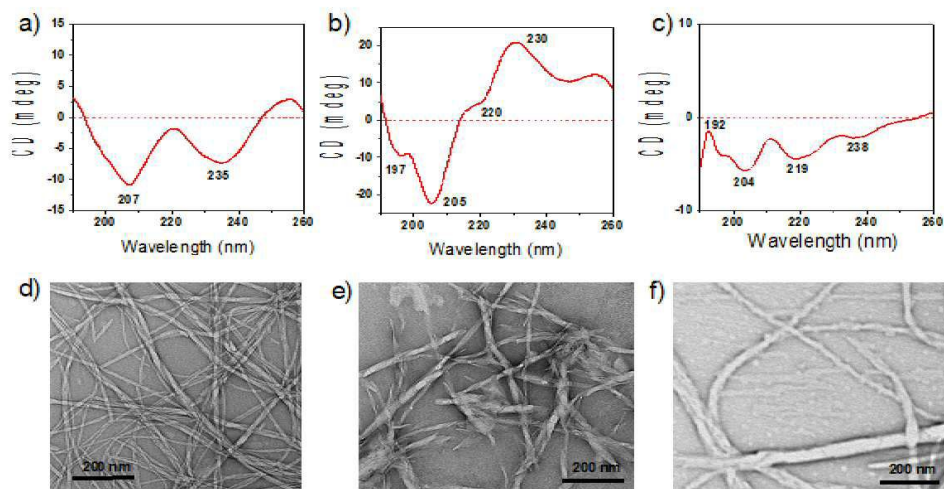
도면6



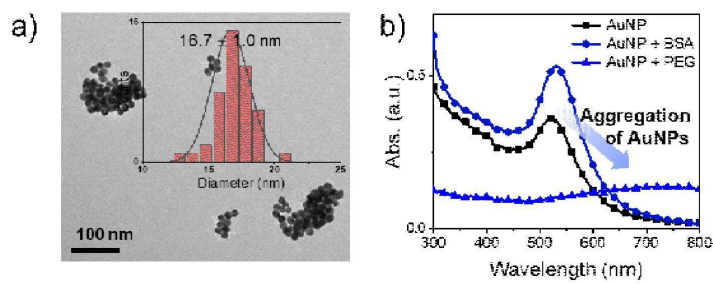
도면7



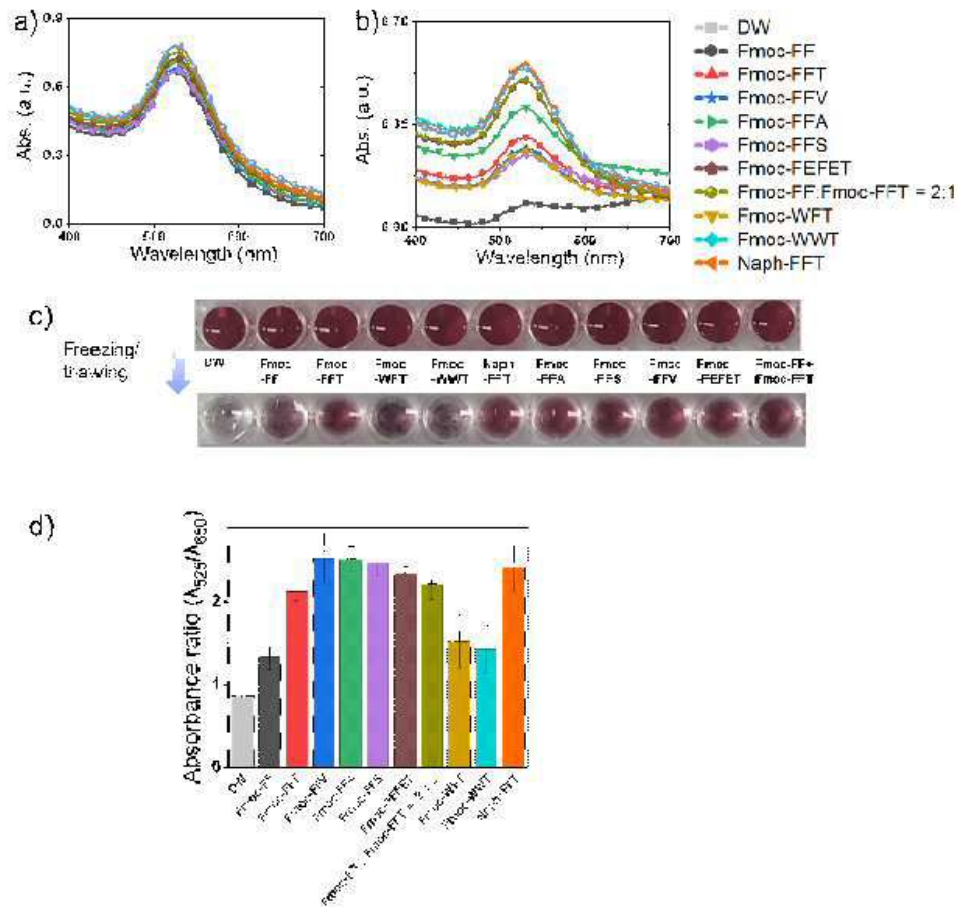
도면8



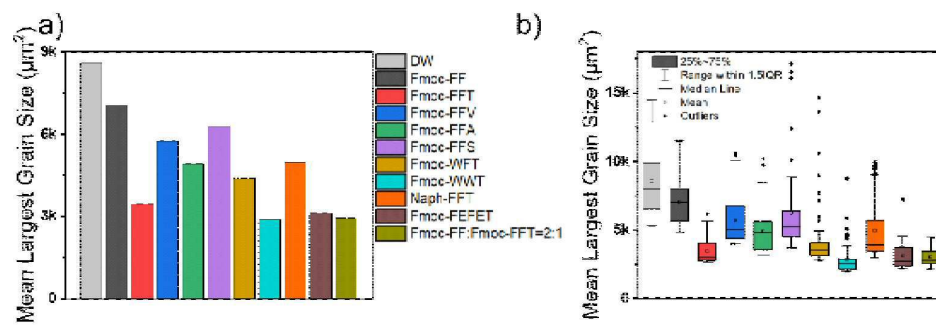
도면9



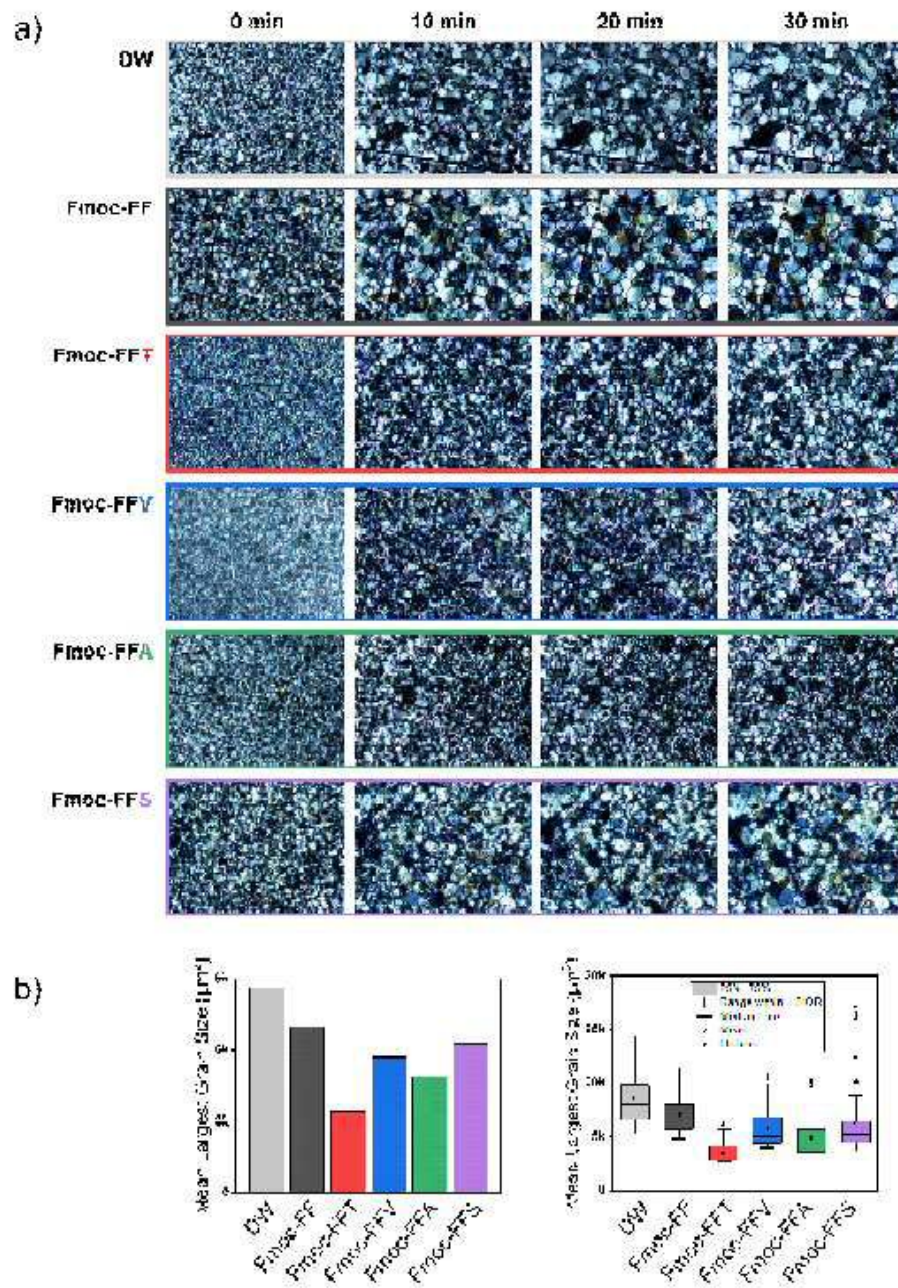
도면10



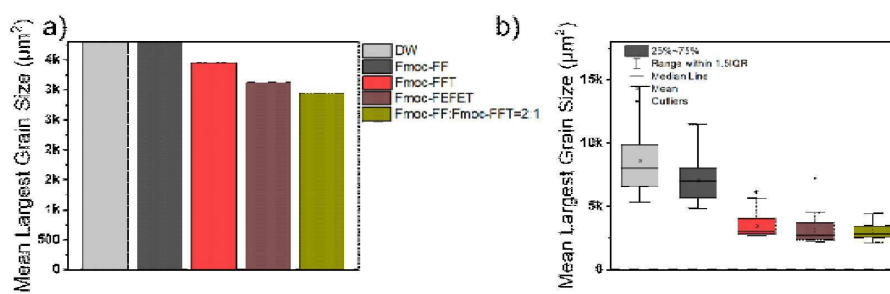
도면11



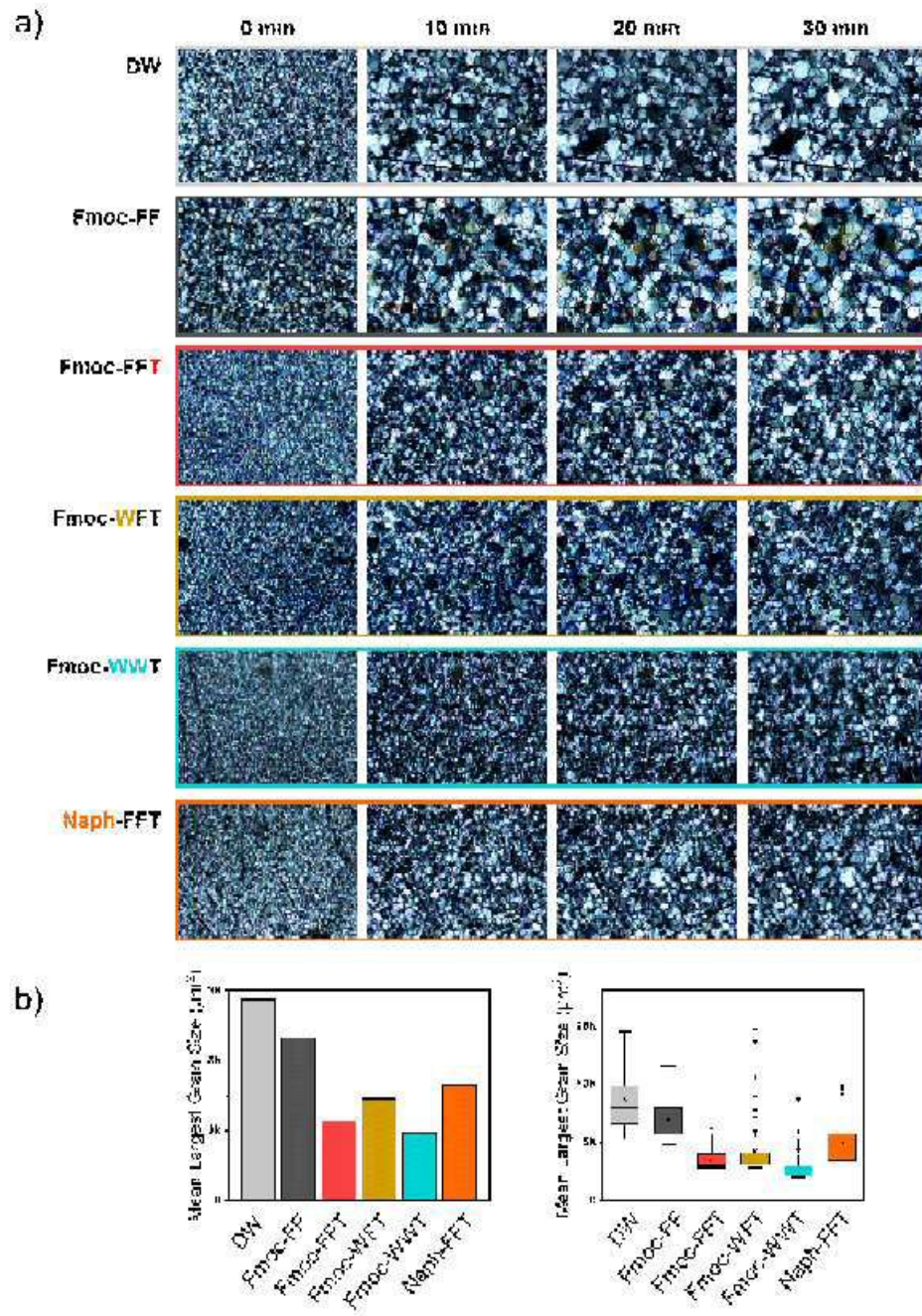
도면12



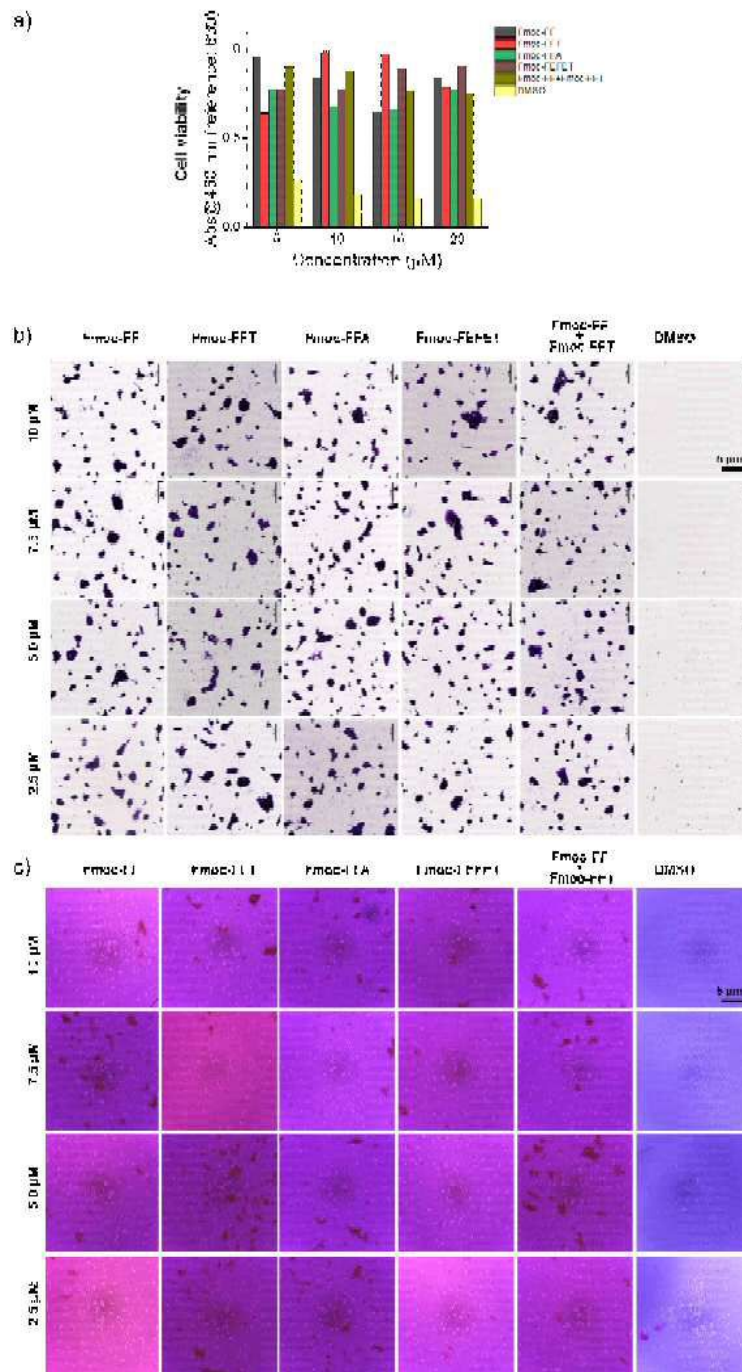
도면13



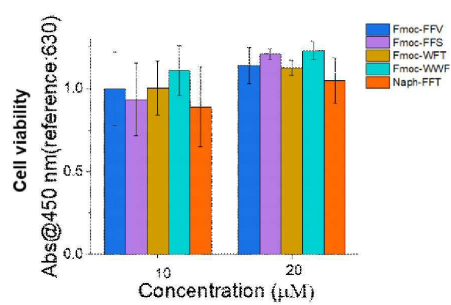
도면14



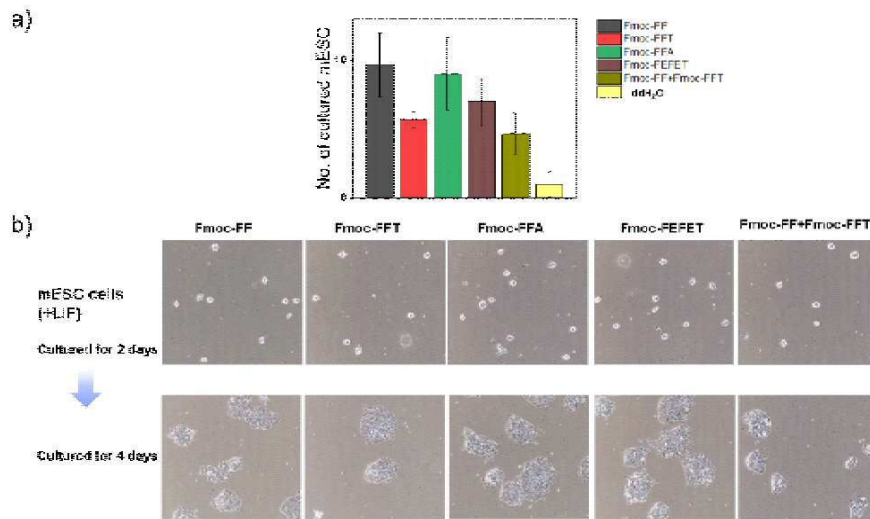
도면15



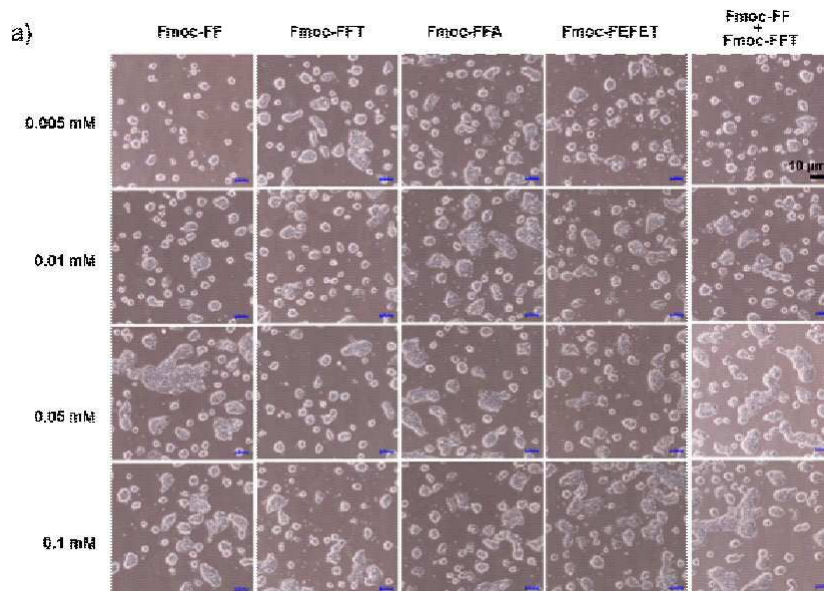
도면16



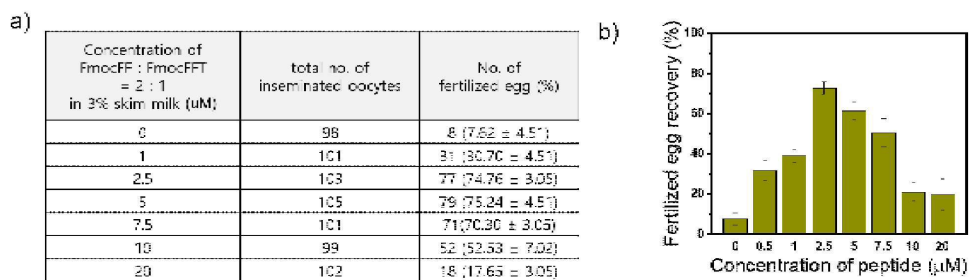
도면17



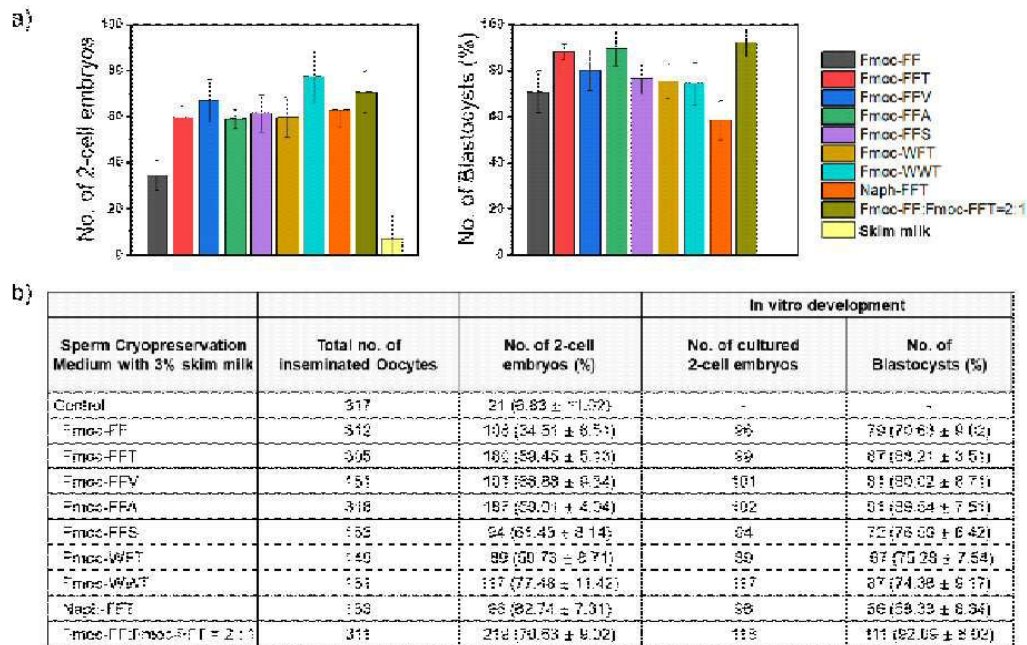
도면18



도면19



도면20



도면21

Sperm Cryopreservation Medium with 3% skim milk	In vivo development		In vivo development		
	No. of cultured 2-cell embryos	No. of Blastocysts (%)	No. of transferred 2-cell embryos	No. of Recipients	No. of Live pups (%)
Control	-	-	-	-	-
Fmcc-FFT	99	87 (88.21 ± 3.51)	60	3	29 (48.89 ± 3.51)
Fmcc-FFA	102	91 (89.54 ± 7.51)	60	3	31 (52.22 ± 4.51)
Fmcc-FF:Fmcc-FFT = 2:1	118	111 (92.09 ± 8.02)	60	3	36 (60.56 ± 2.52)

도면22

