



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0069983
(43) 공개일자 2021년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
C12N 5/0602 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0159897
(22) 출원일자 2019년12월04일
심사청구일자 2019년12월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임동권
서울특별시 강남구 언주로 203(도곡동, 매봉삼성아파트) 101동 2004호
안동준
서울특별시 서초구 사임당로19길 10, 102동 802호(서초동, 서초현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리체

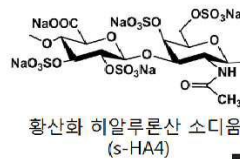
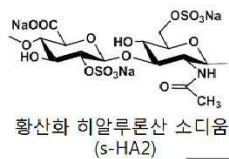
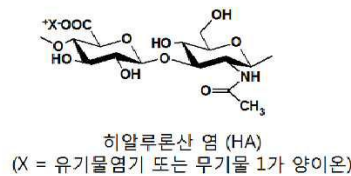
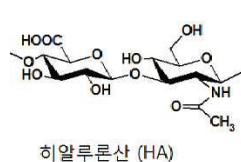
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 황산화 히알루론산을 포함하는 세포 동결보존용 조성물

(57) 요약

본 발명에 따른 황산화된 히알루론산은 황산화가 되지 않은 순수한 상태의 히알루론산에 비교하여 우수한 세포 동결보존 효과를 나타내며, 특히 가장 광범위하게 사용되는 물질인 디메틸설폭시드(DMSO)와 비교하여 2배 이상의 높은 세포 동결보존효과를 나타낸다. 또한 황산화 히알루론산은 히알루론산으로부터 용액상에서 2단계의 반응만으로 제조가 가능하므로, 제조과정이 매우 간단하며, 세포 독성등이 거의 없는 물질이므로 의학, 식품분야등의 다양한 관련 산업에서 활용도가 높다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/905 (2013.01)

(72) 발명자

양원석

서울특별시 마포구 승문길 48, 2층

김용덕

서울특별시 광진구 동일로68길 41(중곡동), 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3D1A1039421

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 미래소재디스커버리사업

연구과제명 DNA 기반 결빙제어소재 개발 및 평가

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.09.01 ~ 2023.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염을 포함하는, 세포 또는 조직의 동결보존용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 황산화 히알루론산 또는 황산화 히알루론산염은 히알루론산 단량체에 존재하는 4개의 수산화기 중에서 1개 이상의 수산화기가 황산화된, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염은 300 kDa 내지 500 kDa의 분자량을 갖는, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 세포는 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 줄기세포인, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 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 근육조직인, 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염이 0.1mg/ml 내지 2 mg/ml로 포함된, 조성물.

청구항 7

황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염을 시료에 첨가하는 단계를 포함하는, 세포 또는 조직의 동결 보존 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황산화 히알루론산을 포함하는 세포 동결보존용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 식물이나 동물의 세포, 조직, 또는 식품 등의 물을 포함하는 물질을 장기 보존하기 위해 0℃ 이하의 온도에서의 동결 보존법이 일상적으로 사용되고 있다. 그러나, 이들 물을 함유하는 물질을 동결하면, 동결 중에 물 분자끼리 용질이나 혼입물의 매질을 배제(排除)하면서 결정화하여 물 분자만으로 이루어진 얼음 결정을 형성하므로, 함수물 중에서 용질이나 혼입물의 매질이 불균일하게 확산되어, 동결 농축이 발생하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 동결 농축을 방지하기 위해, 여러 가지 저분자 화합물을 첨가하는 방법이 실시되고 있다. 예를 들어, 세포의 동결 보존을 실시하는 경우에 동결 보존 중에 일어나는 세포내의 물의 결정화에 의한 세포 손상을 최소화

하기 위해 동결 보호제로서 디메틸설폭시드(DMSO)나 글리세롤 등을 첨가하는 방법이 널리 활용되고 있다.

[0004] 즉, 5~20 %의 디메틸설폭시드, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 동결 보존제를 포함하는 배양액등의 생리적 용액에 세포를 현탁하여 크라이오 튜브에 채워 냉각하고, 최종적으로 -80 ℃ 또는 -196 ℃의 극저온에서 동결 보존하는 것이 일반적이다.

[0005] 그 중에서도 가장 효과가 높고, 자주 사용되고 있는 것이 디메틸설폭시드이다. 그러나 디메틸설폭시드가 특히높은 농도에서는 생리학적으로 유독하고, 동결 보존된 세포를 주입받은 환자에게 고혈압, 오심(惡心), 구토를 일으키는 것도 알려져 있다. 디메틸설폭시드의 독성에 의해 해동한 세포의 배양시 또는 생체에 주입한 후의 생존율이나 기능이 저하되는 문제도 있다. 또한, 글리세린 등의 다른 동결 보존제는 효과가 낮으므로, 세포를 현탁하고 얼마동안 실온 또는 냉장에서 방치하고 나서 동결할 필요가 있고, 프로그램 프리저 등에 의한 엄밀한 온도관리가 필요하다. 또한, 동결 보호 효과가 낮고, 해동후의 기능이 저하되는 등의 문제가 있다. 한편, ES 세포나 iPS 세포 등의 간세포나 정자, 난자, 수정란 등에서는 예를 들어 디메틸설폭시드, 아세트아미드, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등의 고농도의 동해(凍害) 보호 물질을 함유하는 급속동결법(유리화법)이 알려져 있다. 유리화법이라는 것은 급격하게 저온으로 함으로써 세포에 포함되는 수분을 유리 형상으로 하고, 빙정(氷晶)형성에 의한 장애를 피하는 방법이다. 그러나, 이때 사용되는 고농도의 동해 방지제의 독성이 높으므로, 세포나 조직을 손상시킬 가능성이 높아 조직의 동결 보호에는 한정적으로 밖에 사용되고 있지 않다. 한편, 의약품이나 식품, 디스플레이용 얼음을 제조하는 경우에, 염화나트륨 등의 염류나, 글루코오스, 트레할로오스 등의 당류를 첨가하는 것도 실시되고 있다.

[0006] 또한, 식물이나 어류, 곤충 등이 생산하는 부동 단백질이나 부동 당단백질의 첨가가 알려져 있다. 또한, 연료 전지에서는 전기 화학 반응에 따라서 한쪽의 전극에서 물이 발생한다. 예를 들어, 고체 고분자형연료 전지에서는 캐소드 전극에서 물이 발생한다. 또한, 발생한 물의 일부는 전해질막을 통하여 애노드측으로 이동한다. 이와 같이 연료 전지 내에서 발생한 물, 또는 연료 전지에 공급되는 가스 중의 수증기가 연료 전지내에서 응축되면, 연료 전지 내에서의 가스 흐름이 방해받을 가능성이 있다. 그리고, 전극으로의 가스의 공급이 방해받을으로써, 전지 성능이 저하될 가능성이 있다. 이와 같은 응축수가 가스 흐름을 방해하는 것에 기인하는 문제를 방지하기 위한 구성으로서, 연료 전지의 내부, 예를 들어 가스 세퍼레이터의 표면에 단백질 등의 친수성 도막을 설치함으로써, 물의 체류를 억제하는 구성이 알려져 있지만, 저온 조건하에서는 액수(液水)가 동결되는 것에 기인하는 문제가 발생하는 경우가 있었다. 상기 목적을 달성하기 위해, 예를 들어 고체 고분자전해질막의 표면층을 이루는 경화성 수지에, 고분자 전해질과 함께 액수로부터의 얼음 결정의 성장을 억제하는 부동 단백질을 첨가하는 방법이 있지만, 이것도 비용이 많이 드는 등의 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 일본 공표특허공보 평10-511402호
(특허문헌 0002) 일본 특허 제3694730호
(특허문헌 0003) 일본 공개특허공보 제2005-126533호
(특허문헌 0004) 일본 공개특허공보 제2003-250506호
(특허문헌 0005) 일본 공개특허공보 제2008-041596호

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Lovelock JE and Bishop MWH, Nature 183:1394-1395, 1959
(비특허문헌 0002) Polge C, Smith AU, Parkes AS, Nature 164:666-666, 1949
(비특허문헌 0003) Misztal-Lane H, Gill P, Mirbolooki M, Lakey JRT. Cell Preserv Technol 5, 16-24, 2007
(비특허문헌 0004) Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH, Moon SY. Human Reproduction 20,

1779-1786, 2005

(비특허문헌 0005) Yu HN, Lee YR, Noh EM, et al. INT J HEMATOL ≡87: 189-194; 2008

(비특허문헌 0006) Adler S, Pellozzer C, Paparella M, Hartung T, Bremer S. Toxicol in Vitro 20:265-271; 2006

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 급속 냉동법을 포함하는 현상태의 동결 보존법에서는 동결 해동 후의 세포·조직의 완전한 형태에서의 보존이 곤란하고, 독성이 낮은 새로운 동결 보존 물질이 요망되고 있다. 또한, N,N-디메틸설폭시드(DMSO)는 화학물질로서 잠재적으로 독성이 있기때문에, 특정세포의 분화를 유도하는 경우도 있으며, 동결보존에 적합하지 않은 세포도 있다. 한편, 부동 단백질이나 부동 당단백질은 세포 동결 보존효과는 DMSO보다는 낮은 수준이지만, 독성이 없는 장점이 있다. 그러나 제조비용이 높기 때문에, 다양한 산업분야(식품, 제약등)에 적용하는 데에는 한계가 있다. 따라서 본 발명은 디메틸설폭시드, 부동 단백질이 아닌, 독성이 없고, 또한 세포 조직의 보호 효과가 우수하면서도 저비용으로 생산이 가능한 동결 보존제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 항목 1. 황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염을 포함하는, 세포 또는 조직의 동결보존용 조성물.
- [0013] 항목 2. 청구항 1에 있어서, 황산화 히알루론산 또는 황산화 히알루론산염은 히알루론산 단량체에 존재하는 4개의 수산화기 중에서 1개 이상의 수산화기가 황산화된, 조성물.
- [0014] 항목 3. 청구항 1에 있어서, 상기 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염은 300 kDa 내지 500 kDa의 분자량을 갖는, 조성물.
- [0015] 항목 4. 청구항 1에 있어서, 상기 세포는 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 줄기세포인, 조성물.
- [0016] 항목 5. 청구항 1에 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 근육조직인, 조성물.
- [0017] 항목 6. 청구항 1에 있어서, 상기 황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염이 0.1mg/ml 내지 2 mg/ml로 포함된, 조성물.
- [0018] 항목 7 황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염을 시료에 첨가하는 단계를 포함하는, 세포 또는 조직의 동결보존 방법.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 황산화된 히알루론산은 황산화가 되지 않은 순수한 상태의 히알루론산에 비교하여 우수한 세포동결보존 효과를 나타내며, 특히 가장 광범위하게 사용되는 물질인 디메틸설폭시드(DMSO)와 비교하여 2배 이상의 높은 세포 동결보존효과를 나타낸다. 또한 황산화 히알루론산은 히알루론산으로부터 용액상에서 2단계의 반응만으로 제조가 가능하므로, 제조과정이 매우 간단하며, 세포 독성등이 거의 없는 물질이므로 의학, 식품분야 등의 다양한 관련 산업에서 활용도가 높다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 동결보존 효과를 나타내는 황산화 히알루론산 또는 황산화 히알루론산염의 제조에 사용되는 히알루론산 또는 히알루론산 염의 단량체의 분자구조를 나타낸 그림이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 동결보존 효과를 나타내는 발명의 일태양으로 황산화 히알루론산 또는 황산화 히알루론산 소듐의 단량체의 분자구조 및 제조 후 동결 건조된 사진을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 본 발명에 따라 합성된 황산화된 히알루론산의 NMR 및 질량 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 HUVEC에 DMSO, HA (분자량 5 k) (1 mg, 5 mg, 10 mg), HA (분자량 20 k) (1 mg, 5 mg, 10 mg), HA (분자량 100k) (1mg, 5 mg, 10 mg), sHA-2 (1mg, 5 mg, 10 mg), sHA-4 (1mg, 5 mg, 10 mg)을 가하고 동결보존 7일 후에 해동하여 살아있는 세포들을 서로 비교한 결과이다.
- 도 5는 HUVEC에 DMSO, HA (분자량 5 k) (1 mg, 5 mg, 10 mg), HA (분자량 20 k) (1 mg, 5 mg, 10 mg), HA (분자량 100k) (1mg, 5 mg, 10 mg), sHA-2 (1mg, 5 mg, 10 mg), sHA-4 (1mg, 5 mg, 10 mg)을 가하고 동결보존 30 일후에 해동하여 살아있는 세포들을 서로 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이제 본 발명은 첨부된 도면을 참조로 하기에서 더욱 충분히 기술될 것이다. 그러나 본 발명의 전부가 아닌 단지 일부의 구체예가 예시된다. 실제로, 이들 발명은 많은 다양한 형태로 구체화될 수 있으며, 본원에 제시된 구체예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수 형태는 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수한 대상을 포함한다.
- [0024] 히알루론산(hyaluronic acid)은 글루크로닉산 (glucuronic acid)와 아세틸글루코스아민(acetylglucosamine)으로 구성된 선형 다당류(polysaccharide)로서 세포외기질(extracellular matrix, ECM), 관절 윤활액(synovial fluid), 연골을 구성하는 지지체에 존재하는 글리코사미노-글리칸(glycosamino-glycan, GAG)중의 하나이다. 히알루론산 (평균 분자량: 500,000 ~ 2,000,000)은 생체 내의 다양한 조직(예를 들면 피하 조직, 안구, 관절)에 많이 존재하는 무코 다당류이며, 그 높은 보습 기능에 의하여, 예를 들면 화장품의 성분으로서 넓게 이용되어 왔다(예를 들면, 일본 공개특허 제 2000-095660호). 또한, 히알루론산을 섭취함에 의하여, 생체에 본래 존재하는 히알루론산 함량의 저하를 보충하여, 피부의 보습, 탄력성, 및 유연성을 개선하는 효과가 인정되고 있기 때문에, 히알루론산 및 이의 염은 여러 가지 식품에 첨가되고 있다. 히알루론산은 또한 세포의 운동성, 세포분화, 상처치유 및 암 전이에 있어서 시그널 분자(signaling molecule)로서 중요한 역할을 하고 있다. 면역적인 측면에 있어서도 히알루론산은 생체에서 유래된 물질이므로 이상면역반응의 문제가 없기 때문에 미용, 조직공학, 약물전달시스템에 널리 사용되고 있다.
- [0025] 또 다른 형태로 히알루론산을 이용하는 방법으로서, 히알루론산 단량체에 존재하는 반면, 미국 특허 공개 (US 2004/0053885)에서는 히알루론산에 존재하는 수산화기(-OH)를 황산기(SO₃-)로 변형하여 제조된 황산화 히알루론산을 사용하여 염증성 류마티스 관절염에 적용해본 결과, 황산화되지 않은 히알루론산에 비교하여 현저한 염증의 완화 효과를 관찰하여 보고한 바 있다. 유럽 공개특허 (WO 96/24362)에서도 40 kDa 내지 1,300 kDa의 황산화 히알루론산이 다양한 원인으로부터 발생한 염증에 대한 항염증 효과를 보고한 바 있으며, 최소 분자량은 40 kDa, 최대 분자량은 1,300 kDa임을 보고한 바 있으며, 황산화가 되지 않은 히알루론산에 비교하여 현저한 항염증 효과의 개선이 보고된 바 있다. 대한민국 등록특허 0591960호에서는 천연물 유래 다당류의 황산화에 따른 신생혈관형성 억제 효과, 항염증제로서의 용도를 보고한 바 있다. 대한민국 공개 특허 (10-2009-0014359)에서는 퇴행성 골관절염 치료에 효과적인 황산화 히알루론산에 기초한 경구 및 관절내 제제를 보고한 바 있다. 그러나 이러한 종래기술에서는 히알루론산의 단량체에 포함된 4개의 수산기(-OH)의 황산화 정도에 따른 항염증효과, 신생혈관 형성 억제효과등에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 최근 Biomaterials지 (2016. 77, 130-138)에 발표된 보고에 따르면 히알루론산의 4개 수산기의 황산화 정도를 조절하는 경우 혈관신생인자들 중에 특히 혈관신생에 관여하는 신생혈관성장인자(VEGF165a)만을 선택적으로 저해하는 방법등이 보고된 바 있다.
- [0026] 한편, 식물이나 동물의 세포, 조직, 또는 식품 등의 물을 포함하는 물질을 장기 보존하기 위해 0℃ 이하의 온도에서의 동결 보존법이 일상적으로 사용되고 있다. 그러나, 이들 물을 함유하는 물질을 동결하면, 동결 중에 물 분자끼리 용질이나 혼입물의 매질을 배제(排除)하면서 결정화하여 물 분자만으로 이루어진 얼음 결정을 형성하므로, 함수물 중에서 용질이나 혼입물의 매질이 불균일하게 확산되어, 동결 농축이 발생하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 동결 농축을 방지하기 위해, 여러 가지 저분자 화합물을 첨가하는 방법이 실시되고 있다. 예를들

어, 세포의 동결 보존을 실시하는 경우에 동결 보존 중에 일어나는 세포내의 결정화에 의한 세포로의 악영향을 최소한으로 억제하기 위해 동결 보호제로서 디메틸설폭시드(DMSO)나 글리세롤 등을 첨가하는 방법이 실시되고 있다. 즉, 5~20 %의 디메틸설폭시드, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 동결 보존제를 포함하는 배양액등의 생리적 용액에 세포를 현탁하여 크라이오 튜브에 채워 냉각하고, 최종적으로 -80 °C 또는 -196 °C의 극저온에서 동결 보존하는 것이 일반적이다.

[0027] 본 발명은, 실용에 적합한 우수한 빙결정화 저해 활성을 갖고, 식품 제조에 이용할 수 있는 안전한 공정으로, 간단하고, 효율 좋고, 저렴하게 제조할 수 있는 빙결정화 저해 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은, 당해 빙결정화 저해 물질의 제조 방법, 당해 빙결정화 저해 물질의 활성 부분인 폴리펩티드, 및 당해 빙결정화 저해 물질 또는 폴리펩티드를 함유하는 빙결정화 저해 조성물, 식품, 생체 시료 보호제 및 화장품을 제공하는 것도 목적으로 한다.

[0028] 본 발명에 따른 조성물은 황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염이 0.01mg/ml 내지 10mg/ml로 포함되거나, 0.05mg/ml 내지 5mg/ml로 포함되거나, 0.07mg/ml 내지 3mg/ml로 포함되거나, 0.08mg/ml 내지 2mg/ml로 포함되거나, 0.09mg/ml 내지 1.5mg/ml로 포함되거나, 0.1mg/ml 내지 1mg/ml로 포함된다. 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염이 0.01mg/ml 미만인 경우 세포 동결보존 효과를 얻을 수 없고, 10mg/ml를 초과하는 경우에는 세포 독성을 나타내므로 바람직하지 않다. 본 발명의 일 실시예에서 황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염이 0.1mg/ml 내지 1mg/ml의 황산화된 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 염을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0029] 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, 뇨관, 및 자궁을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 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 공지된 기술을 이용하여 수행할 수 있으며, 예를 들어, 급속 냉각기, 또는 액체 질소를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 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.

[0033] 이하에서는 본 발명을 구체적인 실시예를 들어 설명한다. 하기 실시예는 오직 예시목적으로 의도되며, 어떠한 식이든 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다.

[0035] 실시예 1. 황산화 히알루론산(s-HA2)의 합성 및 분자량 측정

[0036] 히알루론산 나트륨 수용액(2000 kDa, 100 ml 증류수 중 500 mg)을 DOWEX 50WX8-400 이온교환수지(5.0 g, 수지 중의 양이온을 TBA와 교환함)와 혼합하고 3 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 거름종이로 여과하여 이온교환수지를 제거하고 동결 건조시켜 희백색 고체 (TBA-HA)를 수득 하였다. TBA-HA (50 mg)를 10 mL의 N,N-dimethylformamide (DMF)에 용해시키고, 2.0 mL 의 DMF에 용해된 다양한 양의 삼산화황 피리딘 착물(0.15 g)과 반응시킴으로써 s-HA-2 (히알루론산 단량체에서 4개의 OH 기 중에 2개가 황산화된 구조임)를 합성하고자 함. 반

응은 질소 분위기하에서 0 내지 5 °C의 온도를 유지하면서 1 시간 동안 진행하였다. 10 mL의 물을 첨가하여 반응을 중단시키고, 1.0 M NaOH 용액으로 용액의 pH를 8.5-9.0으로 조정하여 황산화된 히알루론산 나트륨염을 생성시켰다. 샘플을 증류수를 이용하여 3 일 동안 투석하였다. 최종적으로 샘플을 동결 건조하여 백색 고체 (s-HA-2 (42.8 mg))을 수득하였으며, NMR 및 분자량 분석을 통해 황산화 반응의 확인과 분자량을 결정하였다.

[0038] 실시예 2. 황산화 히알루론산(s-HA-4)의 합성 및 분자량 측정

[0039] 히알루론산 나트륨 수용액(2000 kDa, 100 mL 증류수 중 500 mg)을 DOWEX 50WX8-400 이온교환수지(5.0 g, 수지 중의 양이온을 TBA와 교환함)와 혼합하고 3 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 거름종이로 여과하여 이온교환수지를 제거하고 동결 건조시켜 회백색 고체 (TBA-HA)를 수득 하였다. TBA-HA (50 mg)를 10 mL의 N,N-dimethylformamide (DMF)에 용해시키고, 2.0 mL의 DMF에 용해된 다양한 양의 삼산화황 피리딘 착물(0.61 g)과 반응시킴으로써 s-HA-4 (히알루론산 단량체에서 4개의 OH 기 중에 4개가 황산화된 구조임)를 합성하고자 함. 반응은 질소 분위기하에서 0 내지 5 °C의 온도를 유지하면서 1 시간 동안 진행하였다. 10 mL의 물을 첨가하여 반응을 중단시키고, 1.0 M NaOH 용액으로 용액의 pH를 8.5-9.0으로 조정하여 황산화된 히알루론산 나트륨염을 생성시켰다. 샘플을 증류수를 이용하여 3 일 동안 투석하였다. 최종적으로 샘플을 동결 건조하여 백색 고체 (s-HA-4 (52.8 mg))을 수득하였으며, NMR 및 분자량 분석을 통해 황산화 반응의 확인과 분자량을 결정하였다.

[0040] 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 합성된, 황산화된 히알루론산은 약 500kDa의 분자량을 갖는 것으로 나타났으며, 목표한 바에 따라 2개의 수산화기가 황산화기로 치환되거나 (s-HA2) 4개의 수산화기가 황산화 기로 치환(s-HA4)되었음을 확인하였다 (도 2).

[0042] 실시예 3. 세포동결보존실험

[0043] 3.1 DMSO

[0044] HUVEC cells subculture를 통해 5×10^4 개 세포 이상 확보 ($n=1 : 1 \times 10^4$ 개 세포), Freezing solution [FBS(9 ml)+DMSO(1 ml)] 제조하였다. 1 ml 를 취한 후 1×10^4 개 pellet 상태로 있는 세포에 첨가하였다(in falcon tube). 세포가 들어 있는 Freezing solution 1ml를 vial에 옮긴 후 Freezing container에 넣었다. : 1 vial 당 [1×10^5 개/Freezing solution 1 ml] 총 5개, Container를 통해 vial 의 온도를 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 급속냉동고에서 -80°C 까지 냉각시키고, 1일 후 액체 질소통으로 옮겨 보관하였다. 일정기간(7일, 30일)이 지난 후 37°C 온탕조에서 2 분 동안 해동시키고 1000 rpm으로 5 분간 원심분리하여 세포를 수거하여, 세포 수에 맞는 적당한 접시에 시딩하였다: 1) stock vial를 온탕조에 2분간 녹인다. 세포가 들어있는 동결용 용액을 15 ml 튜브에 옮기고 9 ml 배지와 섞어줌, 3) 1000 rpm에서 5분간 원심분리 진행 후 상층액을 제거하므로써 동결용 용액을 제거해줌, 4) 세포 펠릿에 새 배지를 넣고 세포를 계수한 후 접시에 시딩, MTS 를 통해 세포 생존률 측정, one solution MTS 용액으로 교체하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0046] 3.2 히알루론산 및 황산화된 히알루론산

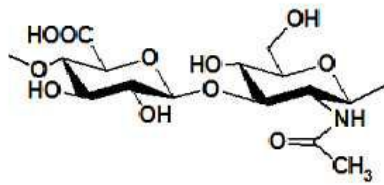
[0047] HUVEC cells subculture를 통해 5×10^4 개 세포 이상 확보하였고 ($n=1 : 1 \times 10^4$ 개 세포), 동결용 용액 [FBS(9 ml)+1 mg/ml, 5 mg/ml, 또는 10 mg/ml 히알루론산 또는 황산화된 히알루론산 용액(1 ml)] 제조하였다. 1 ml 를 취한 후 1×10^4 개 펠릿상태로 있는 세포에 첨가하였다(in falcon tube). 세포가 들어 있는 동결용 용액 1ml를 vial에 옮긴 후 동결 용기에 넣었다. : 1 vial 당 [1×10^5 개/동결용 용액 1 ml] 총 5개, 용기를 통해 vial 의 온도를 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 급속 냉동고에서 -80°C 까지 냉각시켰다. 1일 후 액체 질소통으로 옮겨 보관하였으며, 일정기간(7일, 30일)이 지난 후 37°C 온탕조에서 2 분동안 해동시킨 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 수거하였으며, 그 후, 세포 수에 맞는 적당한 접시에 시딩하였다: 1) stock vial를 온탕조에 2분간 녹인다. 세포가 들어있는 동결용 용액을 15 ml 튜브에 옮기고 9 ml 배지와 섞어줌, 3) 1000 rpm으로 5분간 원심분리 진행 후 상층액을 제거하므로써 동결용 용액 제거해줌, 4) 세포 펠릿에 새 배지를 넣고 세포 계수 후 접시에 시딩, MTS 를 통해 세포 생존률 측정, one solution MTS 용액으로 교체하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0048] 그 결과, 동결보존 후 7일이 지난 시점 (도 4) 및 30일이 지난 시점 (도 5)에서 모두 황산화된 히알루론산이 황

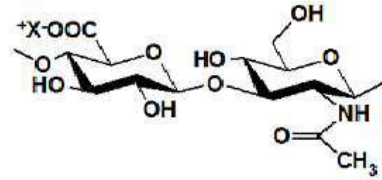
산화되지않은 히알루론산 군 또는 DMSO 처리 군에 비하여 세포 생존률이 같거나 높게 나타났으며, 특히 2개의 수산화기가 황산화기로 치환된 군에서는 농도 의존적으로 세포생존률이 증가하는 것으로 나타났다.

도면

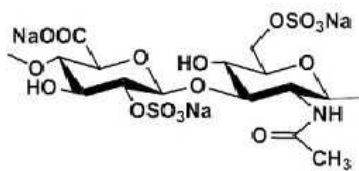
도면1



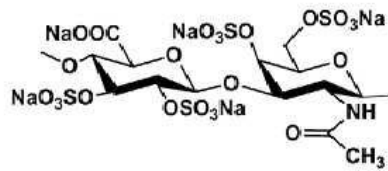
히알루론산 (HA)



히알루론산 염 (HA)
(X = 유기물염기 또는 무기물 1가 양이온)



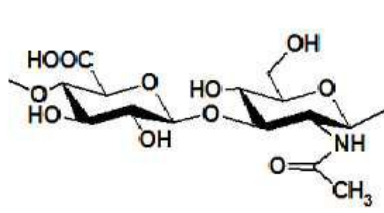
황산화 히알루론산 소듐
(s-HA2)



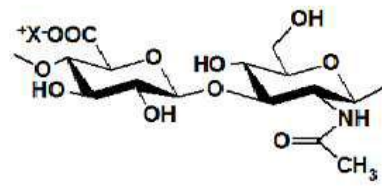
황산화 히알루론산 소듐
(s-HA4)



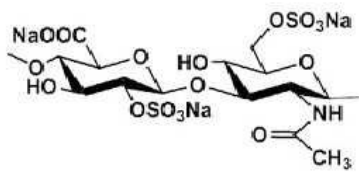
도면2



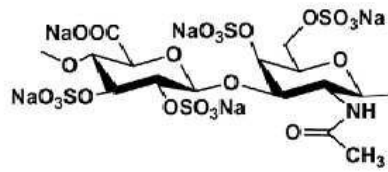
히알루론산 (HA)



히알루론산 염 (HA)
(X = 유기물염기 또는 무기물 1가 양이온)



황산화 히알루론산 소듐
(s-HA2)

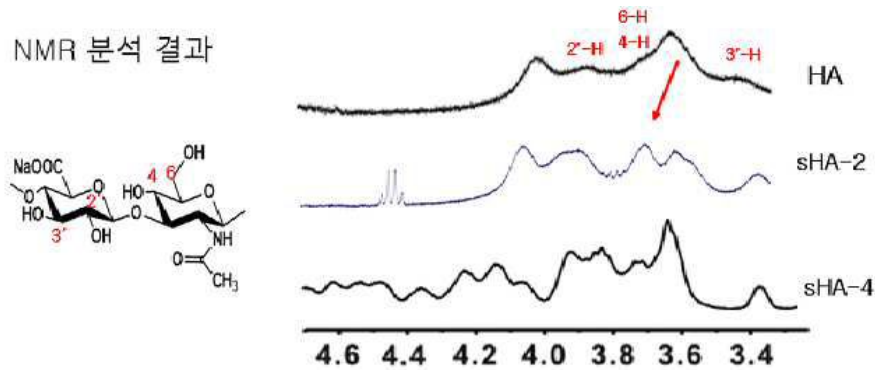


황산화 히알루론산 소듐
(s-HA4)



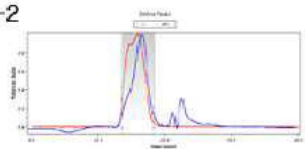
도면3

NMR 분석 결과



분자량 분석 결과

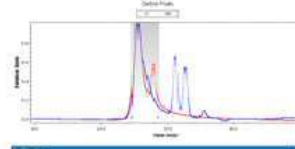
sHA-2



Peak Results	
Peak	Area
1	1.00
2	1.00
3	1.00
4	1.00
5	1.00
6	1.00
7	1.00
8	1.00
9	1.00
10	1.00
11	1.00
12	1.00
13	1.00
14	1.00
15	1.00
16	1.00
17	1.00
18	1.00
19	1.00
20	1.00
21	1.00
22	1.00
23	1.00
24	1.00
25	1.00
26	1.00
27	1.00
28	1.00
29	1.00
30	1.00
31	1.00
32	1.00
33	1.00
34	1.00
35	1.00
36	1.00
37	1.00
38	1.00
39	1.00
40	1.00
41	1.00
42	1.00
43	1.00
44	1.00
45	1.00
46	1.00
47	1.00
48	1.00
49	1.00
50	1.00
51	1.00
52	1.00
53	1.00
54	1.00
55	1.00
56	1.00
57	1.00
58	1.00
59	1.00
60	1.00
61	1.00
62	1.00
63	1.00
64	1.00
65	1.00
66	1.00
67	1.00
68	1.00
69	1.00
70	1.00
71	1.00
72	1.00
73	1.00
74	1.00
75	1.00
76	1.00
77	1.00
78	1.00
79	1.00
80	1.00
81	1.00
82	1.00
83	1.00
84	1.00
85	1.00
86	1.00
87	1.00
88	1.00
89	1.00
90	1.00
91	1.00
92	1.00
93	1.00
94	1.00
95	1.00
96	1.00
97	1.00
98	1.00
99	1.00
100	1.00

400 K

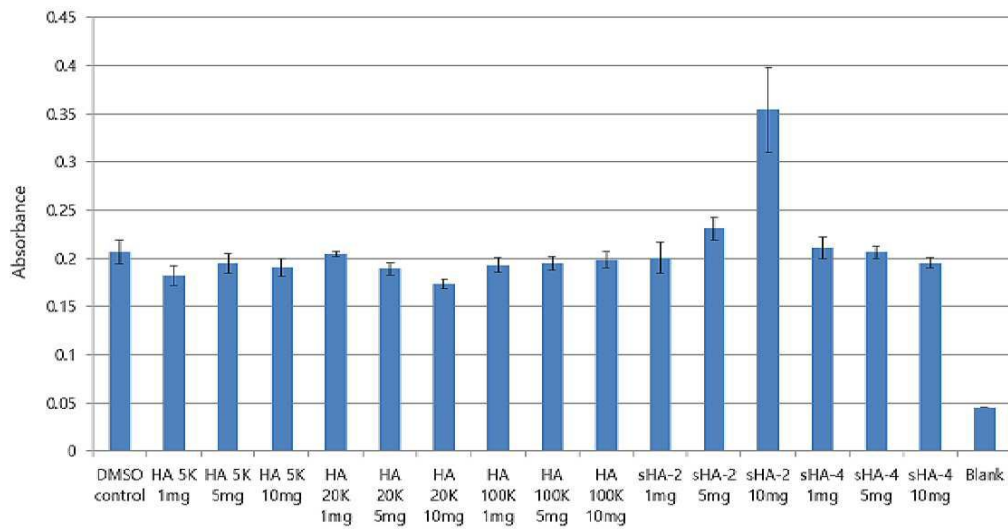
sHA-4



SEC Report (sHA-4-SEC) (Supernatant)

Peak	Area
1	1.00
2	1.00
3	1.00
4	1.00
5	1.00
6	1.00
7	1.00
8	1.00
9	1.00
10	1.00
11	1.00
12	1.00
13	1.00
14	1.00
15	1.00
16	1.00
17	1.00
18	1.00
19	1.00
20	1.00
21	1.00
22	1.00
23	1.00
24	1.00
25	1.00
26	1.00
27	1.00
28	1.00
29	1.00
30	1.00
31	1.00
32	1.00
33	1.00
34	1.00
35	1.00
36	1.00
37	1.00
38	1.00
39	1.00
40	1.00
41	1.00
42	1.00
43	1.00
44	1.00
45	1.00
46	1.00
47	1.00
48	1.00
49	1.00
50	1.00
51	1.00
52	1.00
53	1.00
54	1.00
55	1.00
56	1.00
57	1.00
58	1.00
59	1.00
60	1.00
61	1.00
62	1.00
63	1.00
64	1.00
65	1.00
66	1.00
67	1.00
68	1.00
69	1.00
70	1.00
71	1.00
72	1.00
73	1.00
74	1.00
75	1.00
76	1.00
77	1.00
78	1.00
79	1.00
80	1.00
81	1.00
82	1.00
83	1.00
84	1.00
85	1.00
86	1.00
87	1.00
88	1.00
89	1.00
90	1.00
91	1.00
92	1.00
93	1.00
94	1.00
95	1.00
96	1.00
97	1.00
98	1.00
99	1.00
100	1.00

도면4



도면5

