

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7162310号
(P7162310)

(45)発行日 令和4年10月28日(2022.10.28)

(24)登録日 令和4年10月20日(2022.10.20)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 5/08 (2006.01)

C 0 7 K 5/08

A 2 3 L 3/3526(2006.01)

A 2 3 L 3/3526 5 0 1

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 0 7 K 7/06

Z N A

C 0 9 K 3/00 (2006.01)

C 0 9 K 3/00 1 0 2

C 1 2 N 1/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/04

請求項の数 19 (全70頁)

(21)出願番号 特願2020-569008(P2020-569008)

(86)(22)出願日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(65)公表番号 特表2022-521109(P2022-521109
A)

(43)公表日 令和4年4月6日(2022.4.6)

(86)国際出願番号 PCT/KR2019/017575

(87)国際公開番号 WO2021/112320

(87)国際公開日 令和3年6月10日(2021.6.10)

審査請求日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(31)優先権主張番号 10-2019-0160221

(32)優先日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 510273880

コリア ユニバーシティ リサーチ アンド
ビジネス ファウンデーションKOREA UNIVERSITY RE
SEARCH AND BUSINESS
FOUNDATION大韓民国、02841 ソウル、ソンプ
クweg、アナム-ロ 145

(73)特許権者 515004614

グワンジュ インスティテュート オブ
サイエンス アンド テクノロジー大韓民国 500-712 グワンジュ
ブクweg チョンドン-グwegロ 123

(74)代理人 100137095

弁理士 江部 武史

最終頁に続く

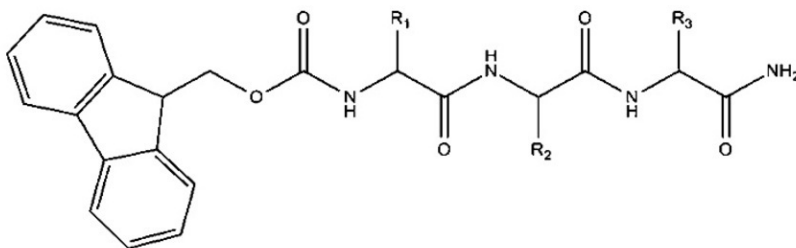
(54)【発明の名称】 自己組織化化合物を含む抗凍結組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

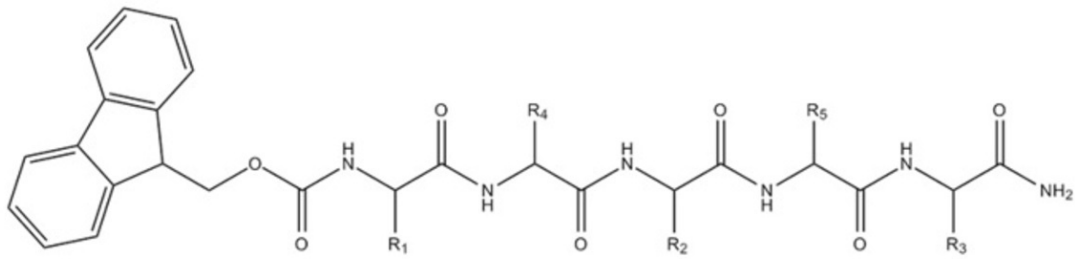
下記の化学式1又は化学式2で表される化合物を含む、結氷制御用組成物。

【化1】



【化学式1】

【化 2】



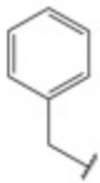
【化学式 2】

10

(前記の化学式 1 又は 2 中、

 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

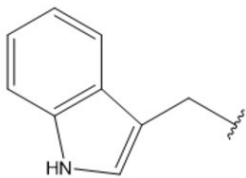
【化 3】



20

または

【化 4】



であり、

 R_3 は

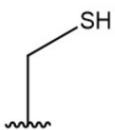
【化 5】



30

、

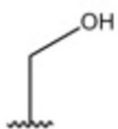
【化 6】



40

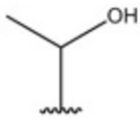
、

【化 7】

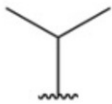


50

、
【化 8】

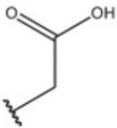


または
【化 9】



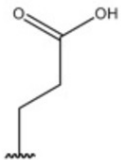
10

であり、
R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して
【化 10】



20

または
【化 11】



である。)
【請求項 2】

30

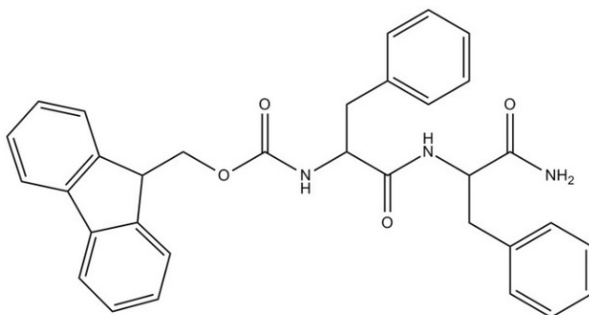
前記化合物は、自己組織化 (self-assembly) されてフィブリル (fibril) またはシート (sheet) 状の構造物を形成する、請求項 1 に記載の結氷制御用組成物。

【請求項 3】

下記化学式 3 で表される化合物をさらに含み、このとき、前記組成物は、前記化学式 1 で表される前記化合物を含み、前記化学式 3 で表される前記化合物及び前記化学式 1 で表される前記化合物を 2 : 1 (mole : mole) の割合で含む、請求項 1 に記載の結氷制御用組成物。

【化 12】

40



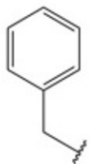
【化学式 3】

50

【請求項 4】

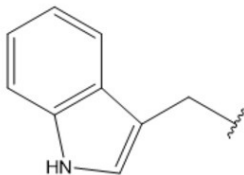
前記化学式 1 中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

【化 1 3】



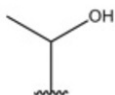
または

【化 1 4】



であり、 R_3 は

【化 1 5】

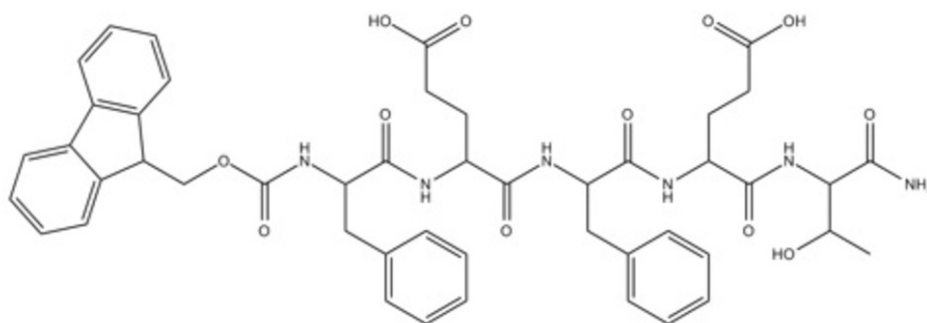


である、請求項 3 に記載の結氷制御用組成物。

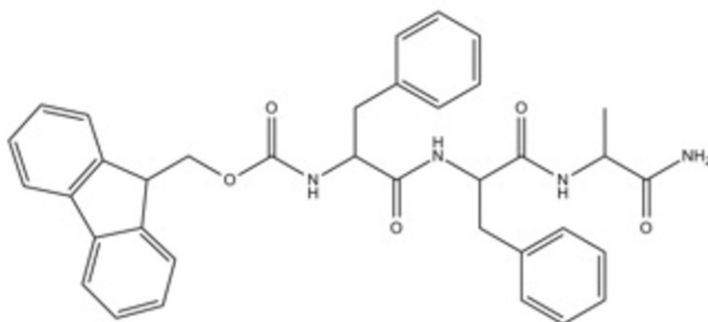
【請求項 5】

下記化合物のうちの少なくとも一つを含む、請求項 1 に記載の結氷制御用組成物。

【化 1 6】



【化 1 7】



10

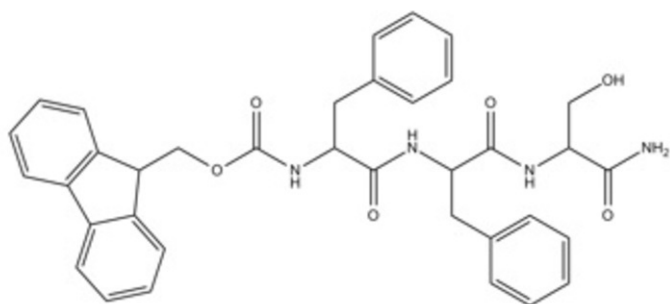
20

30

40

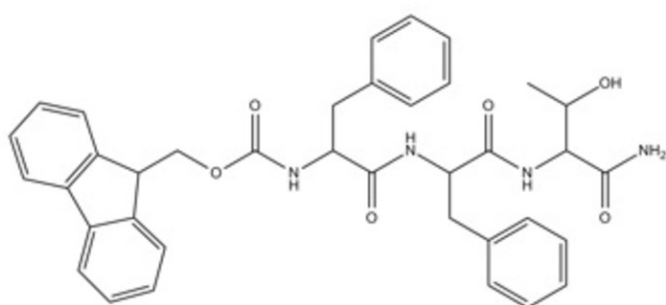
50

【化 1 8】



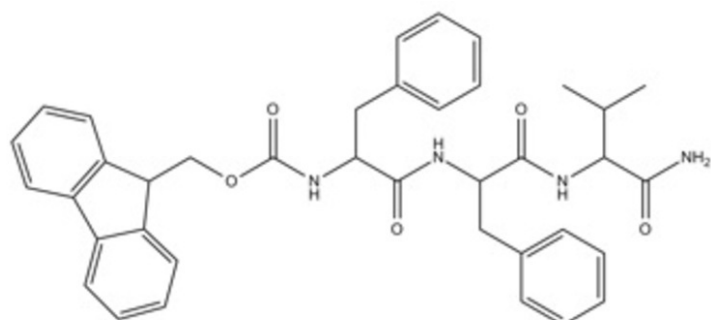
10

【化 1 9】



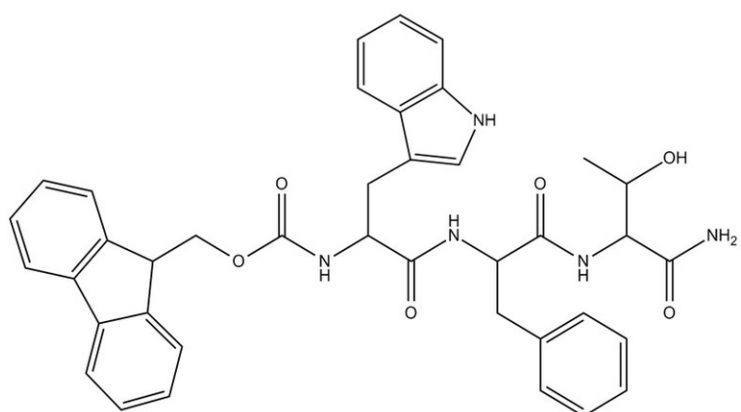
20

【化 2 0】



30

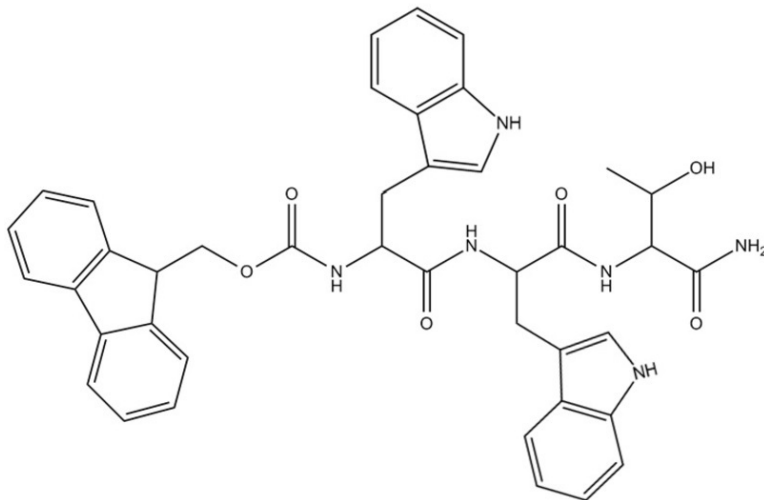
【化 2 1】



40

50

【化 2 2】

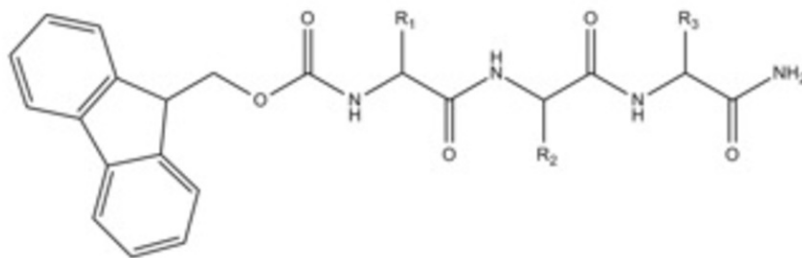


10

【請求項 6】

下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を含む、細胞凍結用組成物。

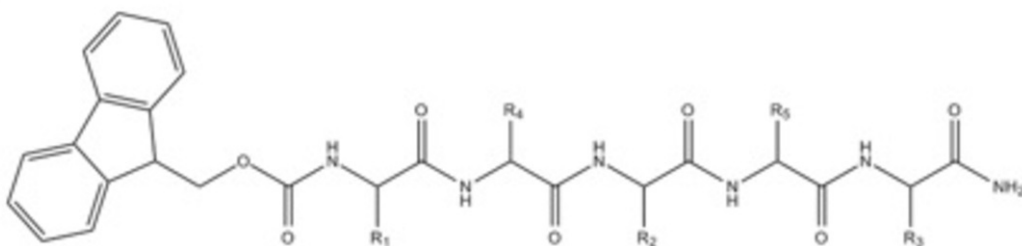
【化 2 3】



20

【化学式 1】

【化 2 4】



30

【化学式 2】

(前記の化学式 1 又は 2 中、

R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

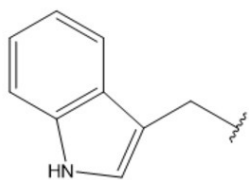
【化 2 5】



40

50

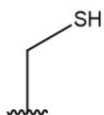
または
【化 2 6】



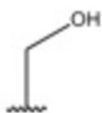
であり、
R₃ は
【化 2 7】



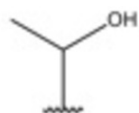
、
【化 2 8】



、
【化 2 9】



、
【化 3 0】



または
【化 3 1】



であり、
R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して

10

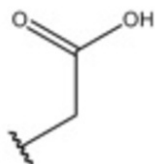
20

30

40

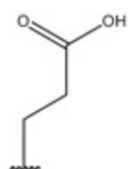
50

【化 3 2】



または

【化 3 3】



10

である。)

【請求項 7】

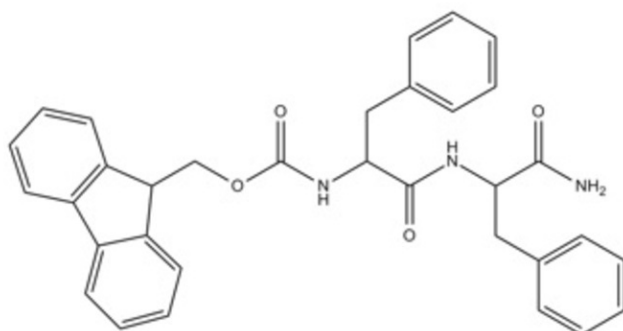
前記化合物は、自己組織化 (self-assembly) されてフィブリル (fibril) またはシート (sheet) 状の構造物を形成する、請求項 6 に記載の細胞凍結用組成物。

【請求項 8】

20

下記化学式 3 で表される化合物をさらに含み、このとき、前記組成物は、前記化学式 1 で表される前記化合物を含み、前記化学式 3 で表される前記化合物及び前記化学式 1 で表される前記化合物を 2 : 1 (mole : mole) の割合で含む、請求項 6 に記載の細胞凍結用組成物。

【化 3 4】



30

【化学式 3】

【請求項 9】

前記化学式 1 中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

【化 3 5】

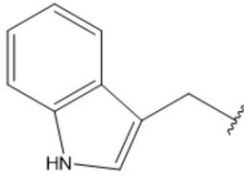
40



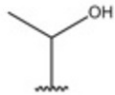
または

50

【化 3 6】

であり、 R_3 は

【化 3 7】

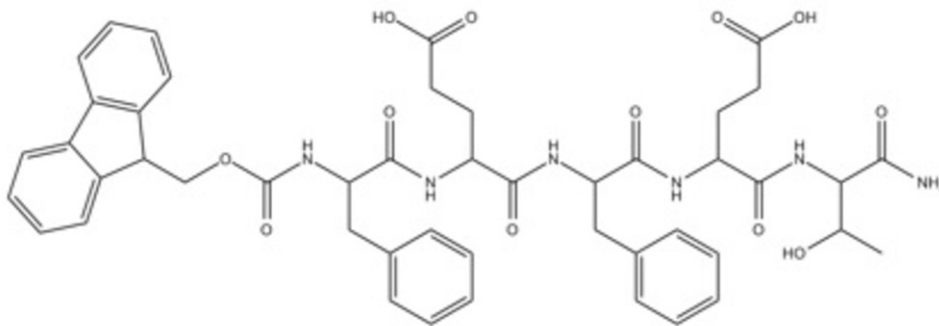


である、請求項 8 に記載の細胞凍結用組成物。

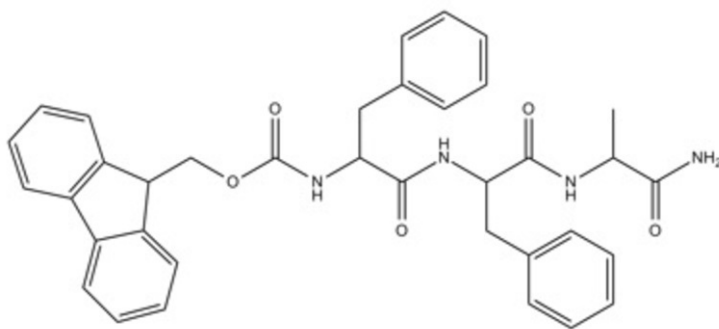
【請求項 10】

下記化合物のうちの少なくとも一つを含む、請求項 6 に記載の細胞凍結用組成物。

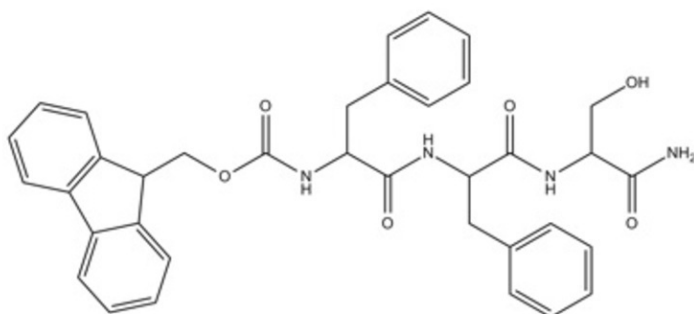
【化 3 8】



【化 3 9】



【化 4 0】



10

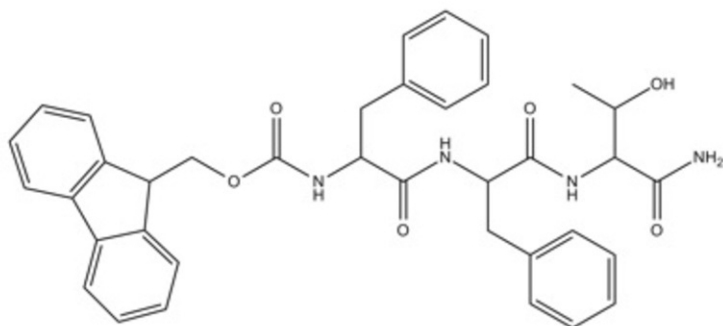
20

30

40

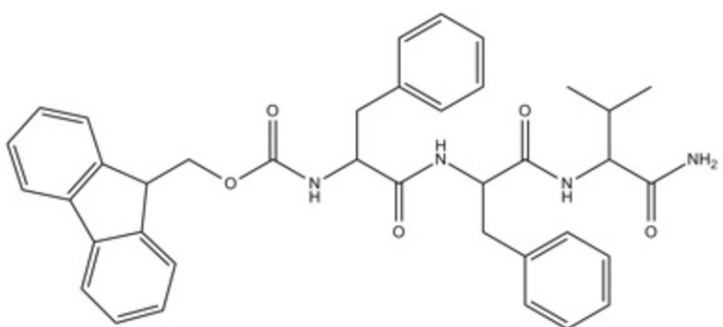
50

【化 4 1】



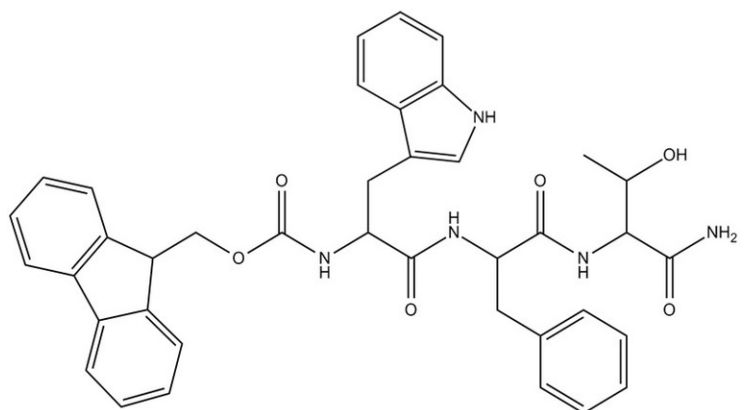
10

【化 4 2】



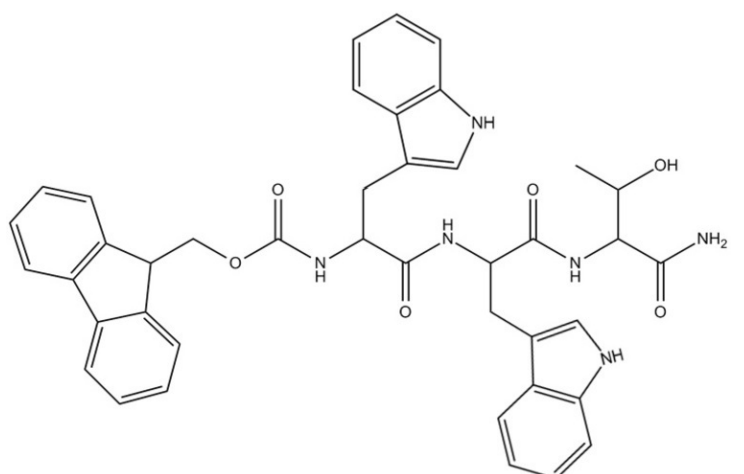
20

【化 4 3】



30

【化 4 4】



40

50

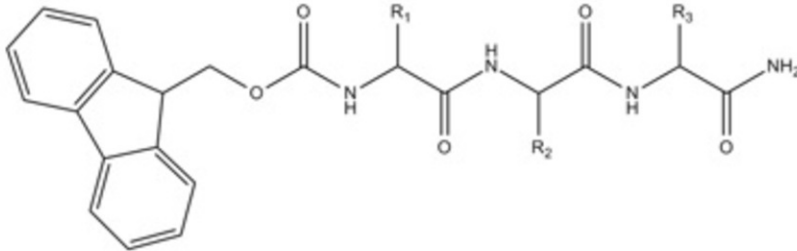
【請求項 1 1】

前記細胞は、精子、卵子、上皮細胞、神経細胞、表皮細胞、角質細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、B細胞、T細胞、赤血球、マクロファージ、単核球、線維芽細胞、筋肉細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、または成体幹細胞である、請求項 6 に記載の細胞凍結用組成物。

【請求項 1 2】

下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を含む、食品凍結用組成物。

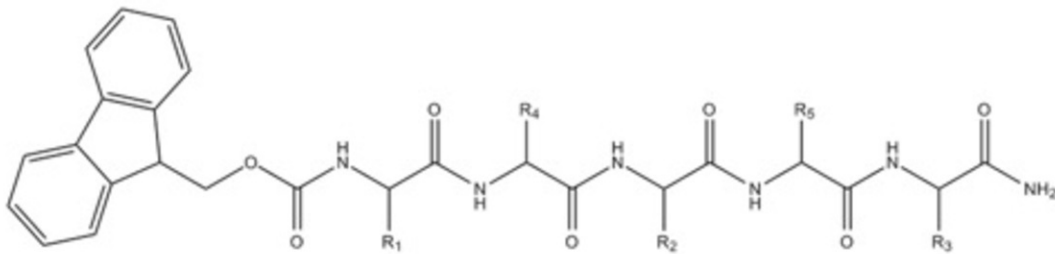
【化 4 5】



10

【化学式 1】

【化 4 6】



20

【化学式 2】

(前記の化学式 1 又は 2 中、

R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

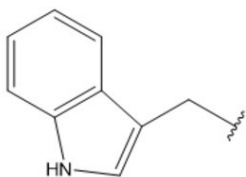
【化 4 7】



30

または

【化 4 8】



40

であり、

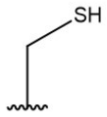
R_3 は

50

【化 4 9】

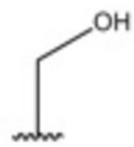


【化 5 0】



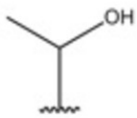
10

【化 5 1】



20

【化 5 2】

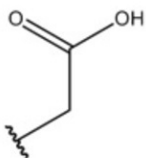


または
【化 5 3】



30

であり、
R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して
【化 5 4】

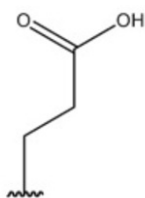


40

または

50

【化 5 5】



である。)

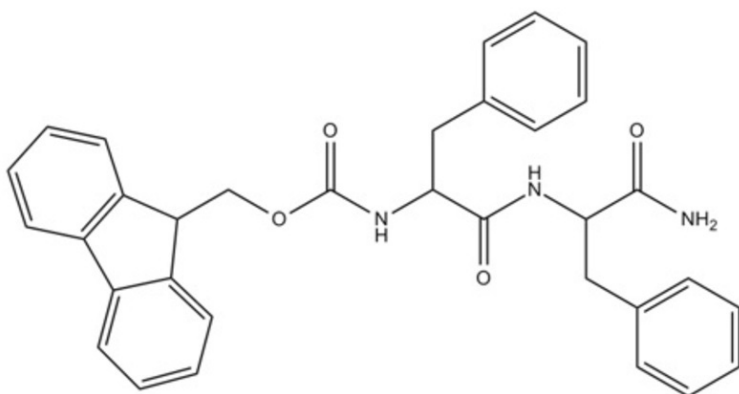
【請求項 1 3】

前記化合物は、自己組織化 (self-assembly) されてフィブリル (fibril) またはシート (sheet) 状の構造物を形成する、請求項 1 2 に記載の食品凍結用組成物。

【請求項 1 4】

下記化学式 3 で表される化合物をさらに含み、このとき、前記組成物は、前記化学式 1 で表される前記化合物を含み、前記化学式 3 で表される前記化合物及び前記化学式 1 で表される前記化合物を 2 : 1 (mole : mole) の割合で含む、請求項 1 2 に記載の食品凍結用組成物。

【化 5 6】

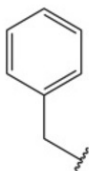


【化学式 3】

【請求項 1 5】

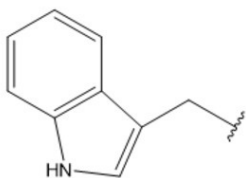
前記化学式 1 中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

【化 5 7】



または

【化 5 8】



10

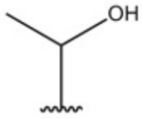
20

30

40

50

であり、 R_3 は
【化 5 9】



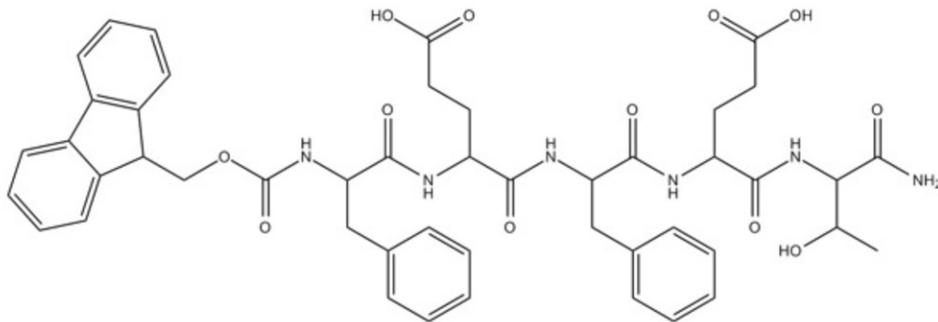
である、請求項 1 4 に記載の食品凍結用組成物。

【請求項 1 6】

下記化合物のうちの少なくとも一つを含む、請求項 1 2 に記載の食品凍結用組成物。

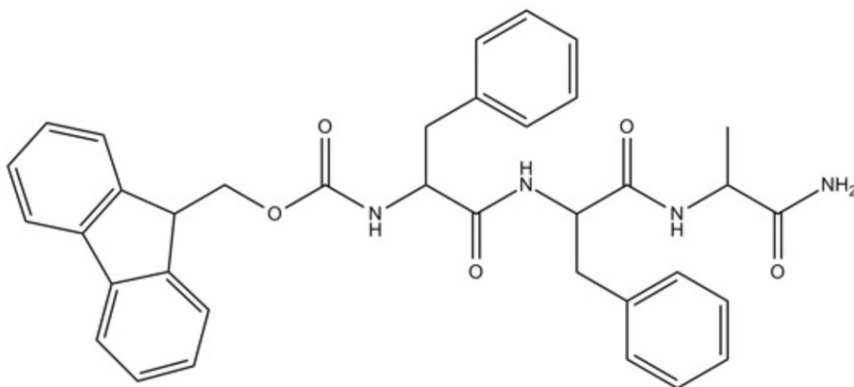
10

【化 6 0】



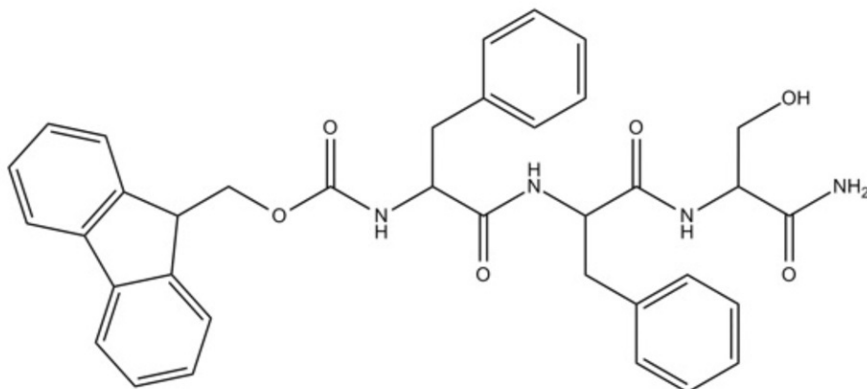
20

【化 6 1】



30

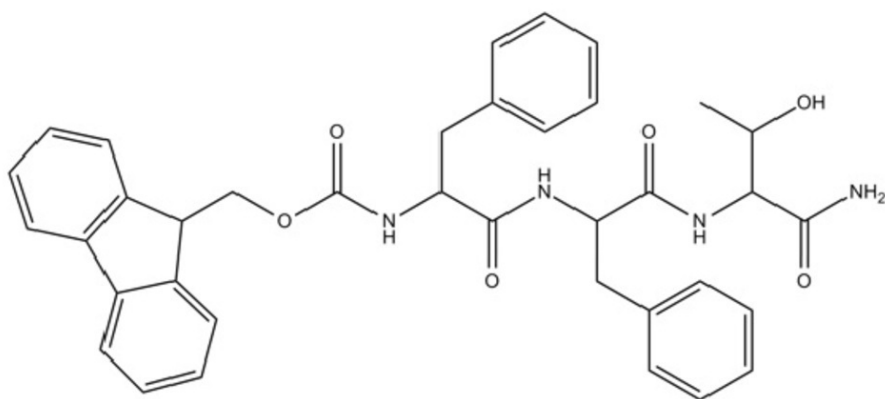
【化 6 2】



40

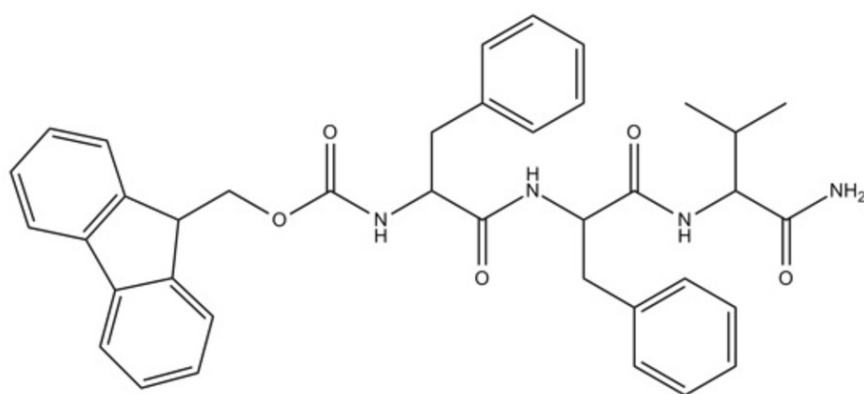
50

【化 6 3】



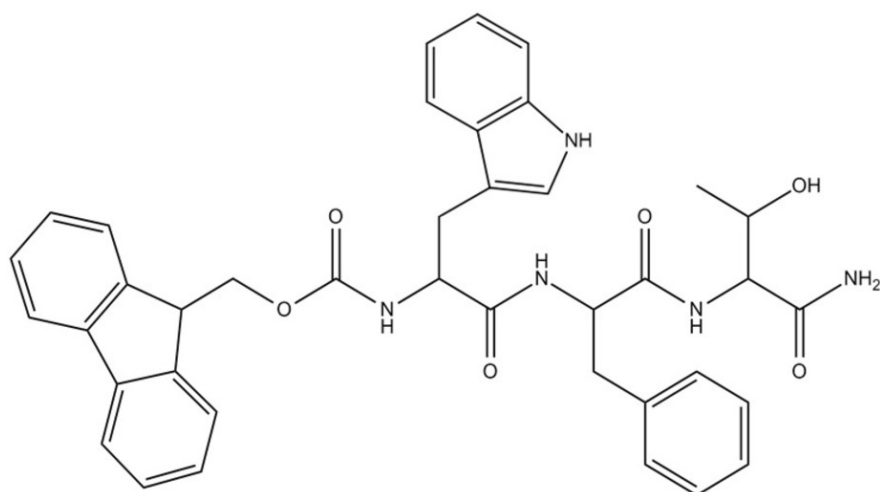
10

【化 6 4】



20

【化 6 5】

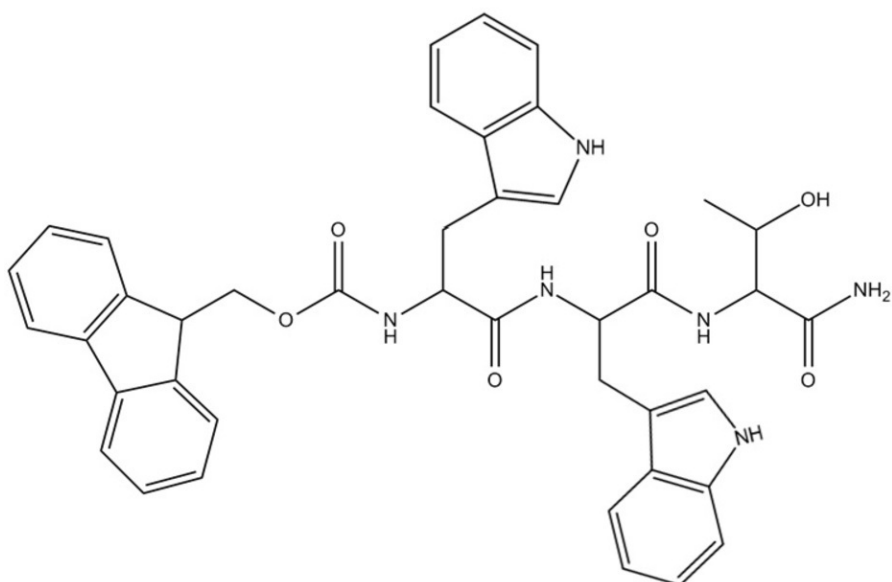


30

40

50

【化 6 6】



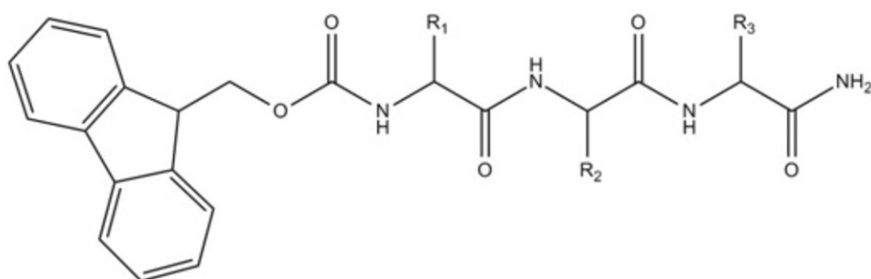
10

【請求項 1 7】

下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を溶媒に添加するステップを含む、結氷制御方法。

20

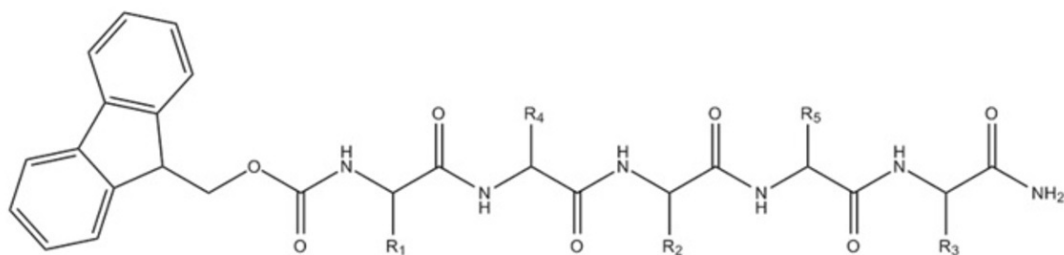
【化 6 7】



30

【化学式 1】

【化 6 8】



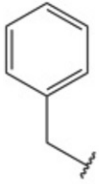
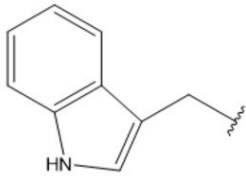
40

【化学式 2】

(前記の化学式 1 又は 2 中、
R₁ 及び R₂ は、それぞれ独立して

50

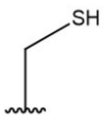
【化 6 9】

または
【化 7 0】

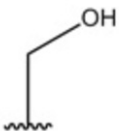
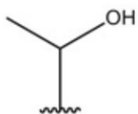
10

であり、
R₃は
【化 7 1】

20

、
【化 7 2】

30

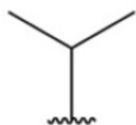
、
【化 7 3】、
【化 7 4】

40

または

50

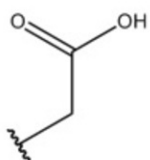
【化 7 5】



であり、

R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して

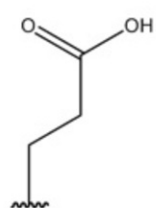
【化 7 6】



10

または

【化 7 7】



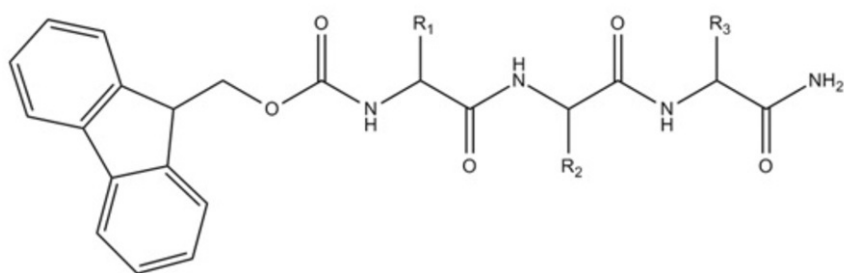
20

である。)

【請求項 1 8】

下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を細胞に処理するステップを含む、細胞凍結保存方法。

【化 7 8】



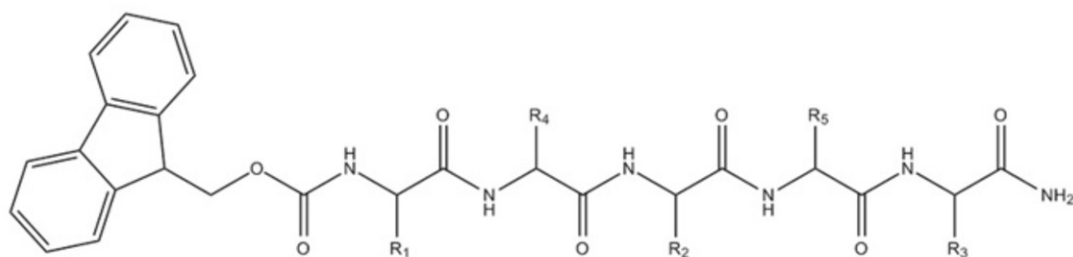
30

【化学式 1】

40

50

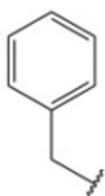
【化 7 9】



【化学式 2】

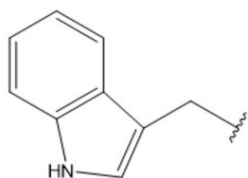
10

(前記の化学式 1 又は 2 中、
 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して
 【化 8 0】



20

または
 【化 8 1】

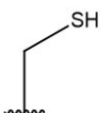


30

であり、
 R_3 は
 【化 8 2】

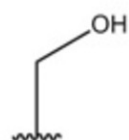


、
 【化 8 3】



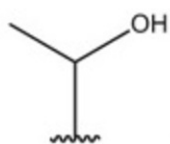
40

、
 【化 8 4】

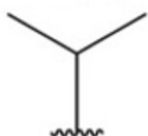


50

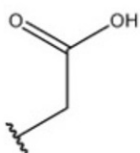
、
【化 8 5】



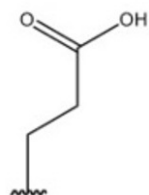
または
【化 8 6】



であり、
R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して
【化 8 7】



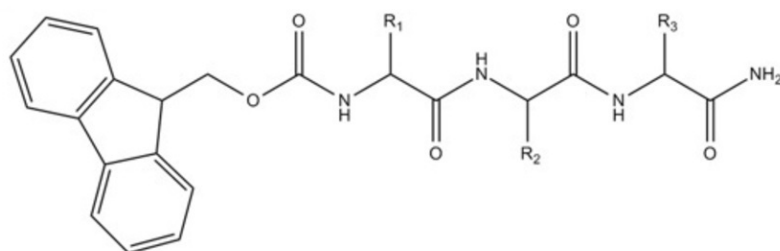
または
【化 8 8】



である。)
【請求項 1 9】

下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を食品に処理するステップを含む、食品凍結保存方法。

【化 8 9】



【化学式 1】

10

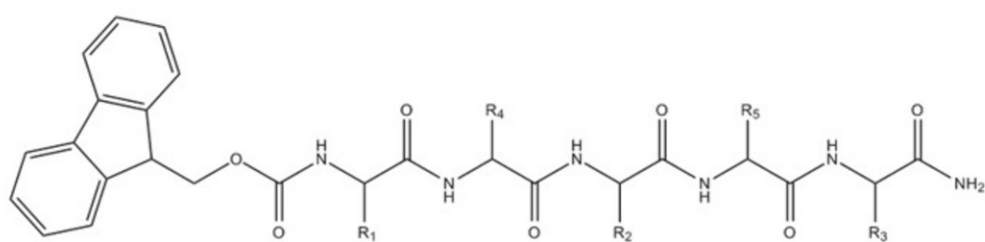
20

30

40

50

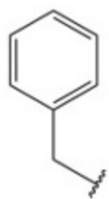
【化 9 0】



【化学式 2】

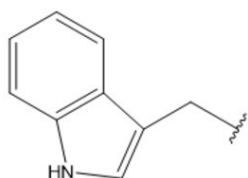
10

(前記の化学式 1 又は 2 中、
 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して
 【化 9 1】



20

または
 【化 9 2】

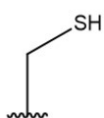


30

であり、
 R_3 は
 【化 9 3】



、
 【化 9 4】

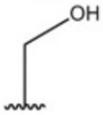


、

40

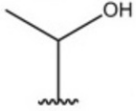
50

【化 9 5】



、

【化 9 6】



10

または

【化 9 7】

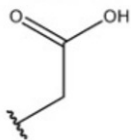


20

であり、

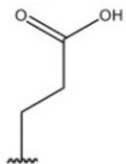
 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して

【化 9 8】



または

【化 9 9】



30

である。)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、自己組織化化合物を含む抗凍結組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

低温保護剤 (cryoprotective agent, CPA) は、溶液中に存在するとき、 0°C 下の温度にさらされる溶液における氷結晶の形成を低減するか、又は氷結晶の成長を阻害できる化合物である。CPA としては、小分子、合成ポリマー、および凍結防止剤タンパク質が主に用いられる。

【0003】

臓器移植は、生存率、生活の質および費用対効果の側面で末期臓器不全の最良の治療法

50

である。しかし、残念ながら、臓器移植の供給と需要の間には長い時間間隔が存在し、これは臓器移植を必要とする患者に長期間の待機時間中の生活の質の低下を招く、重大な医療障壁になっている。臓器供給の不足の理由の一つは、信頼できる保存方法の不在に起因する。

【0004】

臓器を適切に保存するためには、臓器を保存溶液で洗浄して血液を除去し、臓器を安定化させなければならない。保存溶液中で臓器を安定化させた後も、ドナーから摘出後に臓器の割り当て、輸送及び移植に利用可能な時間は通常6～12時間に限られている。この短い時間は、ほとんどの臓器が近距離の患者に移植されるように制限し、遠距離の患者への臓器移植の機会が著しく減少する結果をもたらす。このように、臨床的に利用可能な臓器の不足は、ほぼ全ての国で人間臓器の売買を禁止しているにもかかわらず、違法な臓器売買および人身売買の増加をもたらした。

10

【0005】

現在、臓器保存に使用されるCPAとしては、一般的に、特にエチレングリコール、1,2-プロパンジオール、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド、グリセロール、スクロース、ラクトース、またはD-マンニトールが用いられる。臓器保存温度での氷結晶の成長を低減または阻害するためには、CPAの有効濃度を通常60%以上と非常に高くしなければならない。この高濃度では、これらの化合物は保存しようとする組織に毒性を示すこともあり、移植前に昇温とともにCPAを大量に除去するときに不可逆的な細胞死を引き起こすことがあると知られている。

20

【0006】

氷結晶の形成を低減または阻害するのに使用される他のCPAとしては、合成ポリマー及び凍結防止剤タンパク質がある。これらは、前述したCPAと同様にそれぞれ欠点を持っている。例えば、自然界に存在する抗凍結タンパク質(antifreeze protein、AFP)、例えば魚類、植物または昆虫から単離されたタンパク質は、氷の形成を防止するのに非常に効果的であるが、現在利用可能な凍結防止剤のタンパク質は、純度が低く、生産単価が高いため、産業界で利用するには非効率的であると考えられる。

【0007】

一方、化学的凍結防止剤、例えば、DMSO(dimethyl sulfoxide)は、発熱、かゆみなどの副作用を引き起こすだけでなく、脳を退化させたり神経毒として作用するなどの生体毒性を示すことが知られている。このため、この化学的凍結防止剤は、細胞、組織、臓器または食品などの凍結に使用し難いという欠点を有する。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、細胞及び生体への毒性が低い、優れた結氷制御能を有する材料を提供することである。

【0009】

本発明の他の目的は、氷の再結晶化または氷結晶の直径の増加を抑制できる材料を開発することである。

40

【0010】

本発明のまた他の目的は、前記材料を含む結氷制御用組成物、細胞凍結用組成物、および食品凍結用組成物を提供することである。

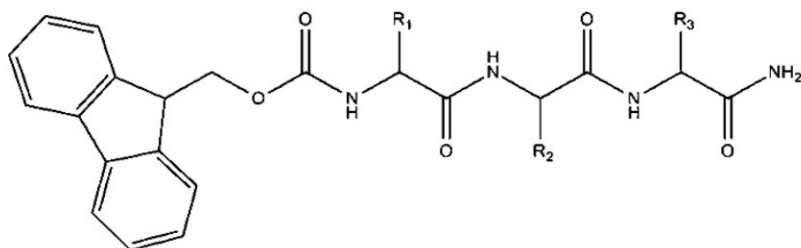
【課題を解決するための手段】

【0011】

1. 下記の化学式1又は化学式2で表される化合物を含む、結氷制御用組成物。

50

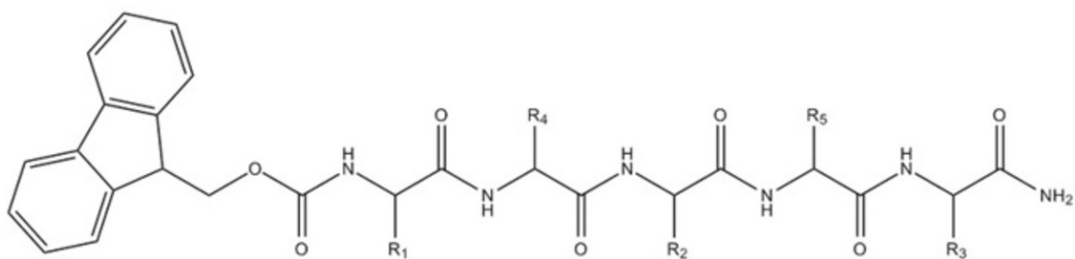
【化 1】



【化学式 1】

10

【化 2】



【化学式 2】

20

前記の化学式 1 又は 2 中、

 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

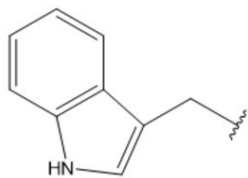
【化 3】



30

または

【化 4】



40

であり、

 R_3 は、

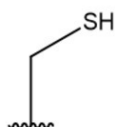
【化 5】



、

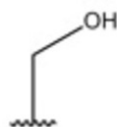
50

【化 6】



、

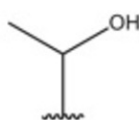
【化 7】



10

、

【化 8】



20

または

【化 9】

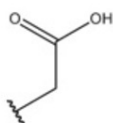


であり、

R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して

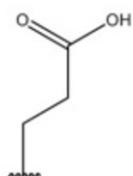
【化 10】

30



または

【化 11】



40

である。

【0012】

2. 項目 1 において、前記化合物は、自己組織化 (self-assembly) されてフィブリル (fibril) またはシート (sheet) 状の構造物を形成する、結氷制御用組成物。

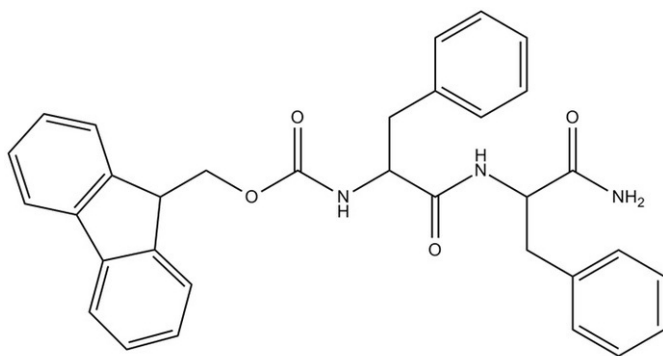
【0013】

3. 項目 1 において、下記化学式 3 で表される化合物をさらに含み、このとき、前記組成物は、前記化学式 1 で表される化合物を含み、化学式 3 で表される化合物及び化学式 1

50

で表される化合物を 2 : 1 (mole : mole) の割合で含む、結氷制御用組成物。

【化 1 2】



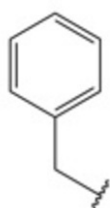
10

【化学式 3】

【0 0 1 4】

4. 項目 3 において、前記化学式 1 中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

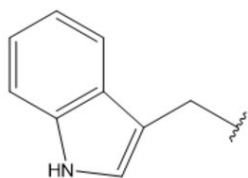
【化 1 3】



20

または

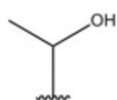
【化 1 4】



30

であり、 R_3 は、

【化 1 5】



である、結氷制御用組成物。

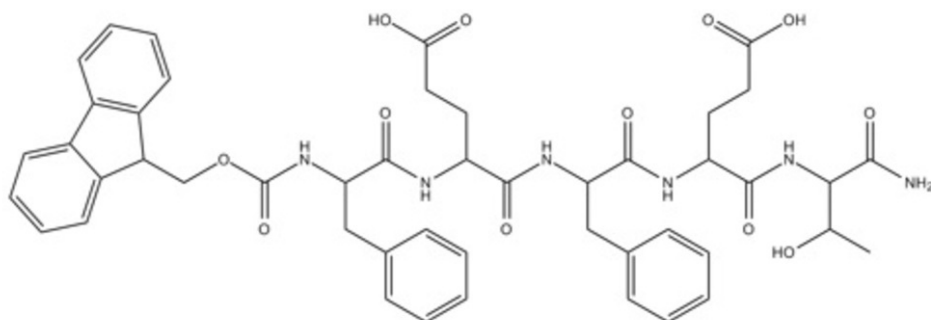
40

【0 0 1 5】

5. 項目 1 において、下記化合物のうちの少なくとも一つを含む、結氷制御用組成物。

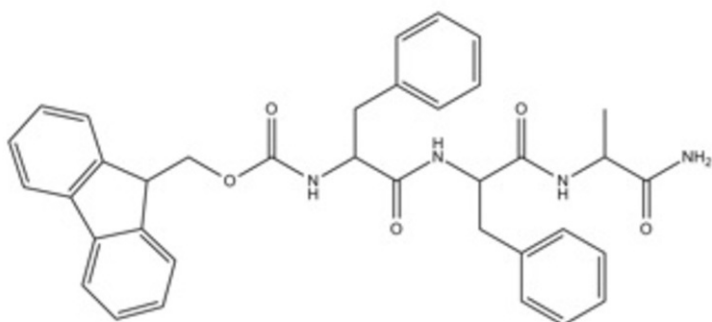
50

【化 1 6】



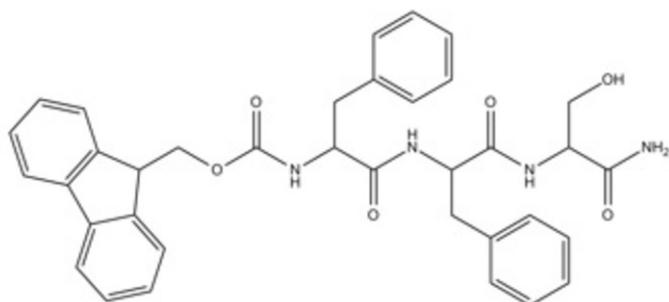
10

【化 1 7】



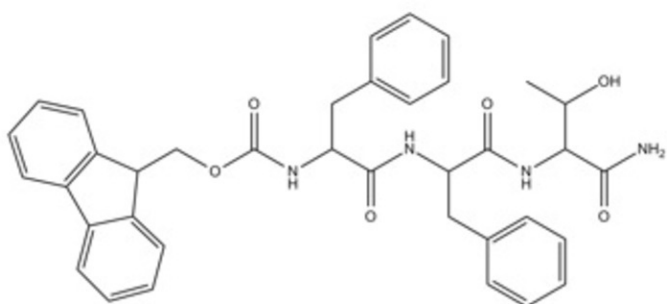
20

【化 1 8】



30

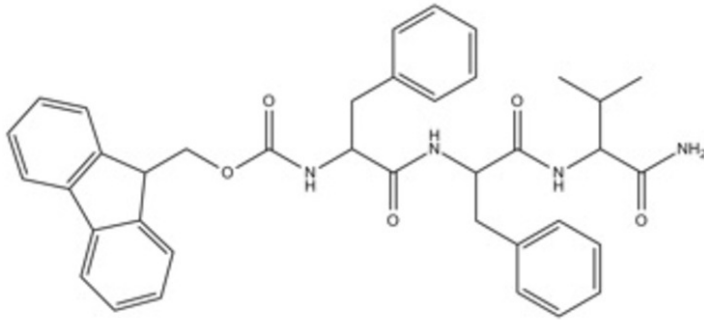
【化 1 9】



40

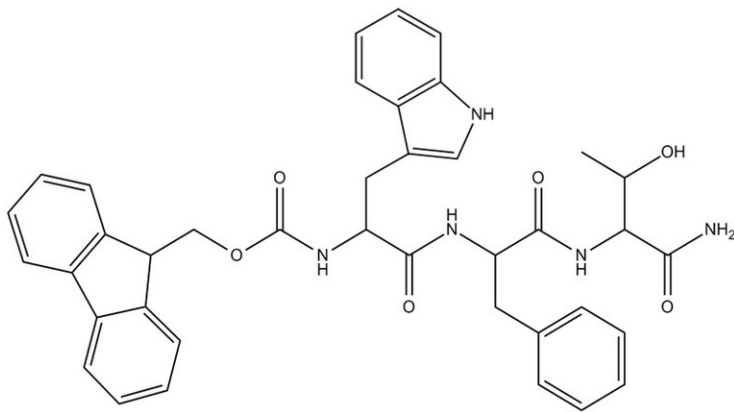
50

【化 2 0】



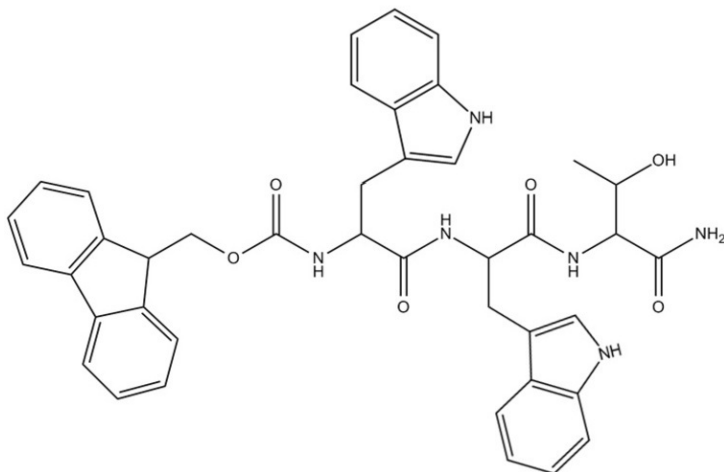
10

【化 2 1】



20

【化 2 2】



30

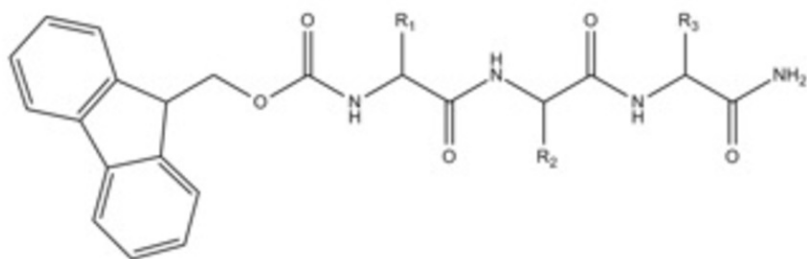
【0 0 1 6】

40

6. 下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を含む、細胞凍結用組成物。

50

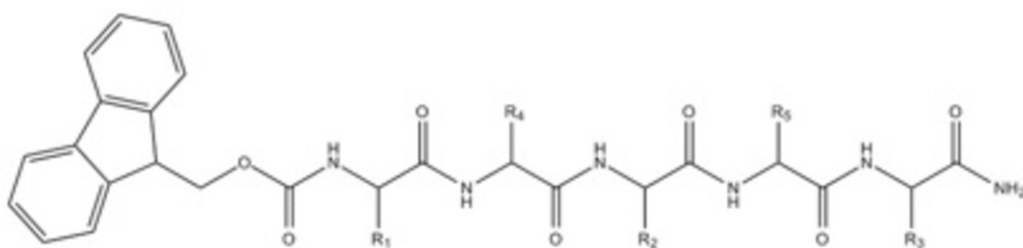
【化 2 3】



【化学式 1】

10

【化 2 4】



【化学式 2】

20

前記の化学式 1 又は 2 中、

 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

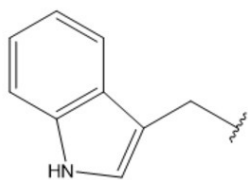
【化 2 5】



30

または

【化 2 6】



40

であり、

 R_3 は

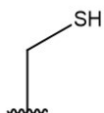
【化 2 7】



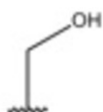
、

50

【化 2 8】

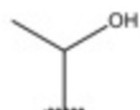


【化 2 9】



10

【化 3 0】



または

20

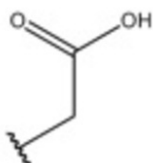
【化 3 1】



であり、

R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して

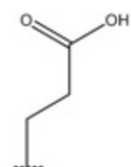
【化 3 2】



30

または

【化 3 3】



40

である。

【0 0 1 7】

7. 項目 6 において、前記化合物は、自己組織化 (self-assembly) されてフィブリル (fibril) またはシート (sheet) 状の構造物を形成する、細胞凍結用組成物。

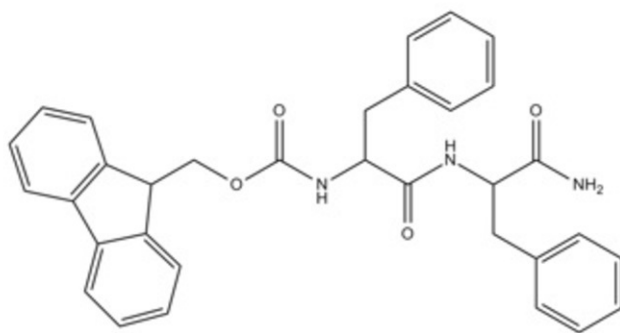
【0 0 1 8】

8. 項目 6 において、下記化学式 3 で表される化合物をさらに含み、このとき、前記組成物は、前記化学式 1 で表される化合物を含み、化学式 3 で表される化合物及び化学式 1

50

で表される化合物を 2 : 1 (mole : mole) の割合で含む、細胞凍結用組成物。

【化 3 4】



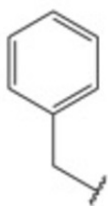
10

【化学式 3】

【0019】

9. 項目 8 において、前記化学式 1 中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

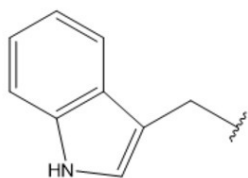
【化 3 5】



20

または

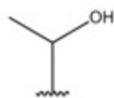
【化 3 6】



30

であり、 R_3 は

【化 3 7】



である、細胞凍結用組成物。

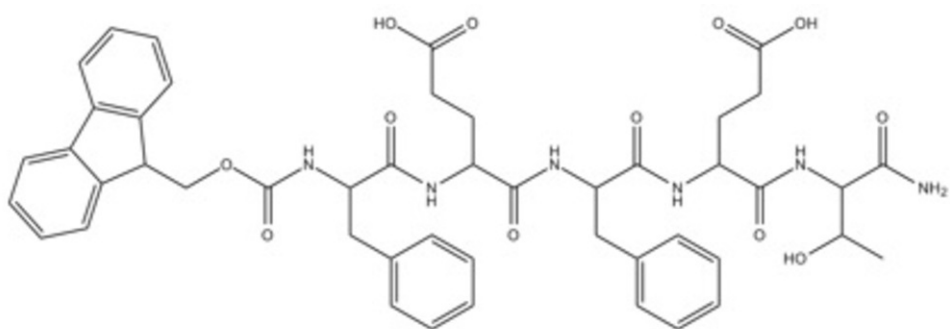
40

【0020】

10. 項目 6 において、下記化合物のうちの少なくとも一つを含む、細胞凍結用組成物。

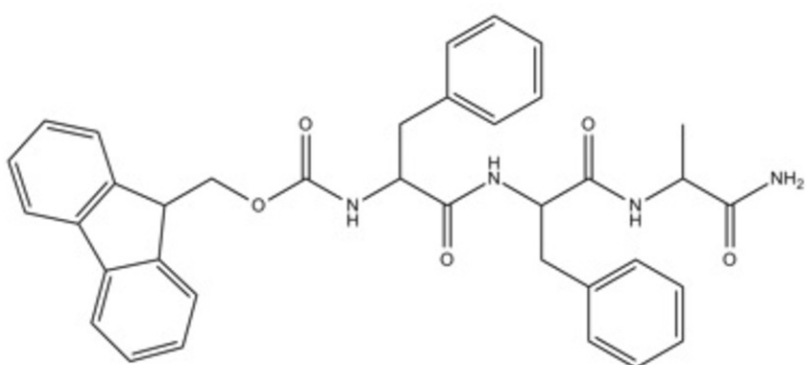
50

【化 3 8】



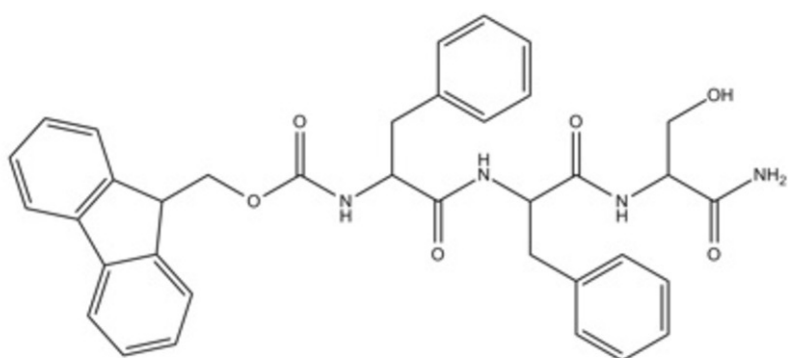
10

【化 3 9】



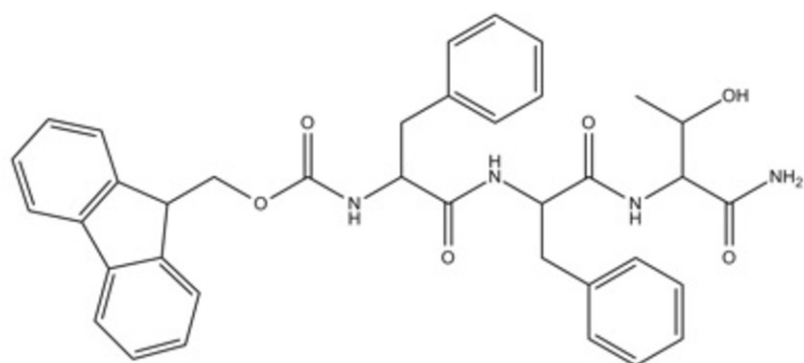
20

【化 4 0】



30

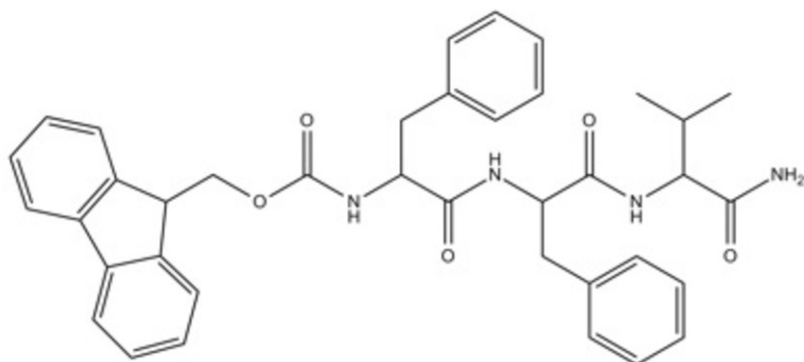
【化 4 1】



40

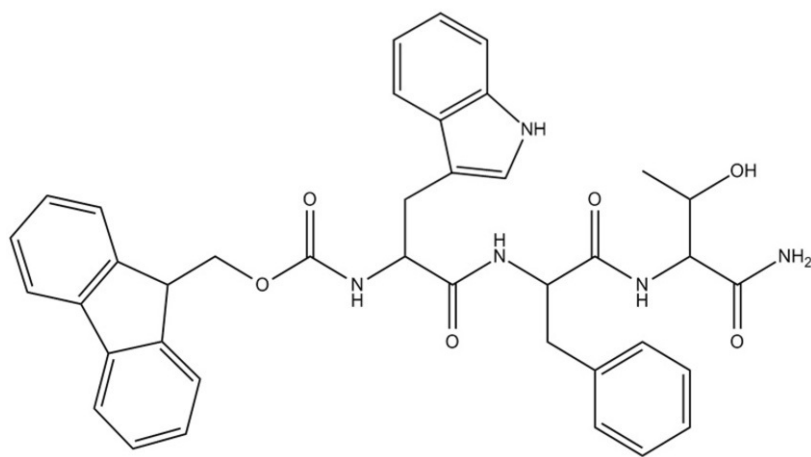
50

【化 4 2】



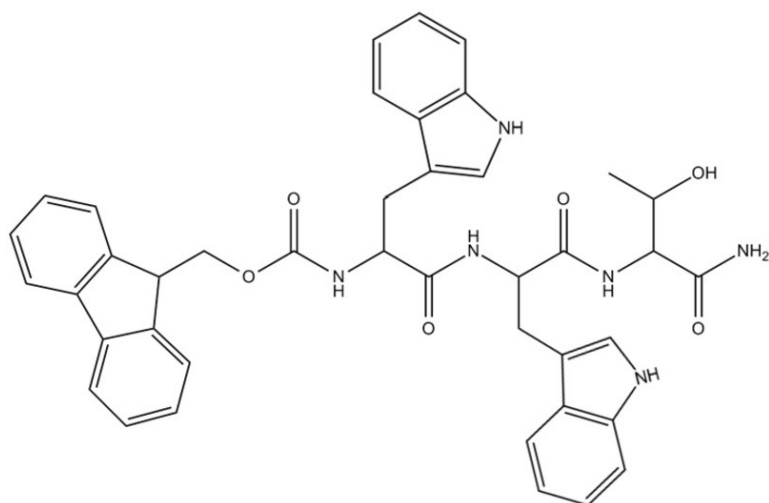
10

【化 4 3】



20

【化 4 4】



30

40

【0 0 2 1】

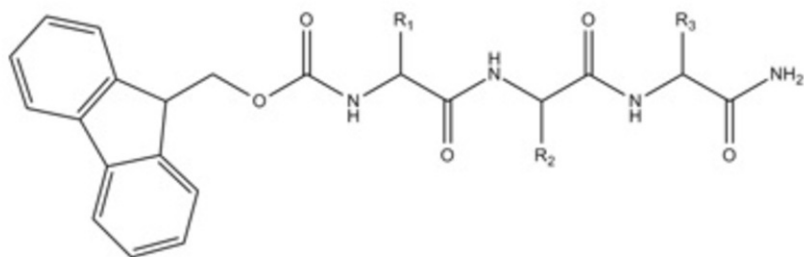
1 1. 項目 6 において、前記細胞は、精子、卵子、上皮細胞、神経細胞、表皮細胞、角質細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、B 細胞、T 細胞、赤血球、マクロファージ、単核球、線維芽細胞、筋肉細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、または成体幹細胞である、細胞凍結用組成物。

【0 0 2 2】

1 2. 下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を含む、食品凍結用組成物。

50

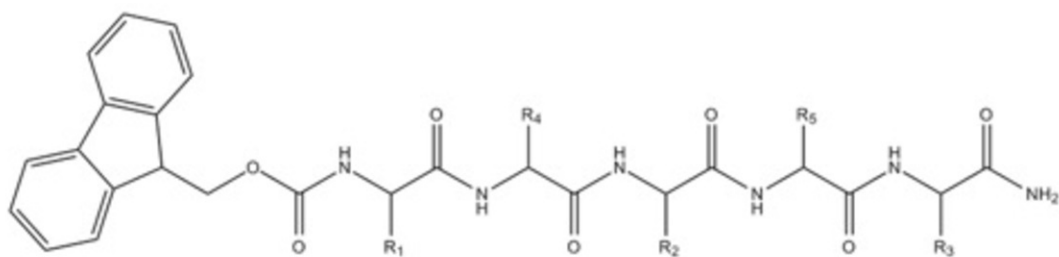
【化 4 5】



【化学式 1】

10

【化 4 6】



【化学式 2】

20

前記化学式 1 又は 2 中、

 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

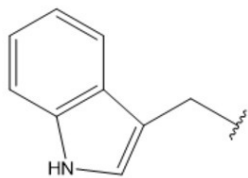
【化 4 7】



30

または

【化 4 8】



40

であり、

 R_3 は

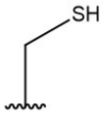
【化 4 9】



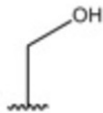
、

50

【化 5 0】

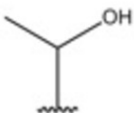


【化 5 1】



10

【化 5 2】



または

20

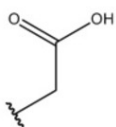
【化 5 3】



であり、

R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して

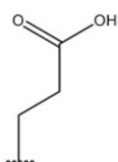
【化 5 4】



30

または

【化 5 5】



40

である。

【0 0 2 3】

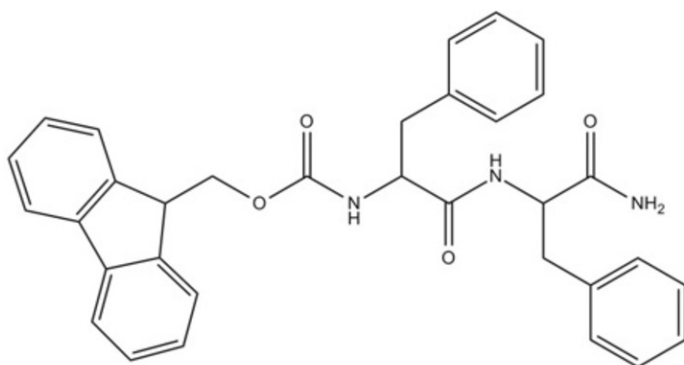
13. 項目 12 において、前記化合物は、自己組織化 (self-assembly) されてフィブリル (fibril) またはシート (sheet) 状の構造物を形成する、食品凍結用組成物。

【0 0 2 4】

14. 項目 12 において、下記化学式 3 で表される化合物をさらに含み、このとき、前記組成物は、前記化学式 1 で表される化合物を含み、化学式 3 で表される化合物及び化学式 1 で表される化合物を 2 : 1 (mole : mole) の割合で含む、食品凍結用組成物。

50

【化 5 6】



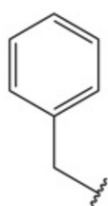
10

【化学式 3】

【 0 0 2 5】

15. 項目 14 において、前記化学式 1 中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

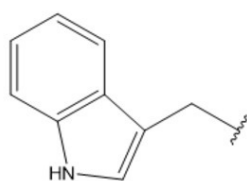
【化 5 7】



20

または

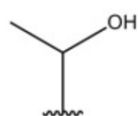
【化 5 8】



30

であり、 R_3 は

【化 5 9】



40

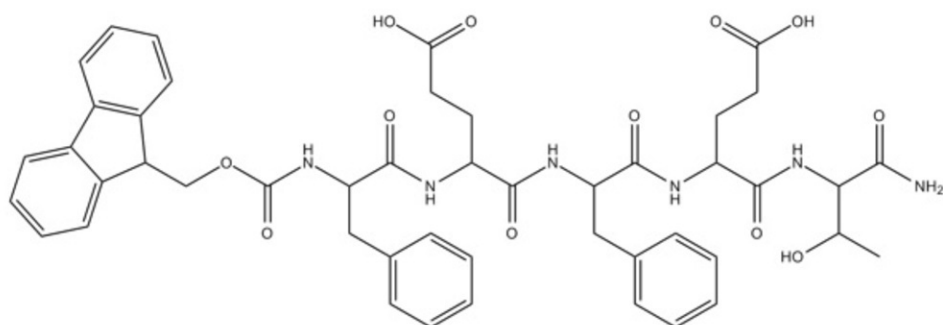
である、食品凍結用組成物。

【 0 0 2 6】

16. 項目 12 において、下記化合物のうちの少なくとも一つを含む、食品凍結用組成物。

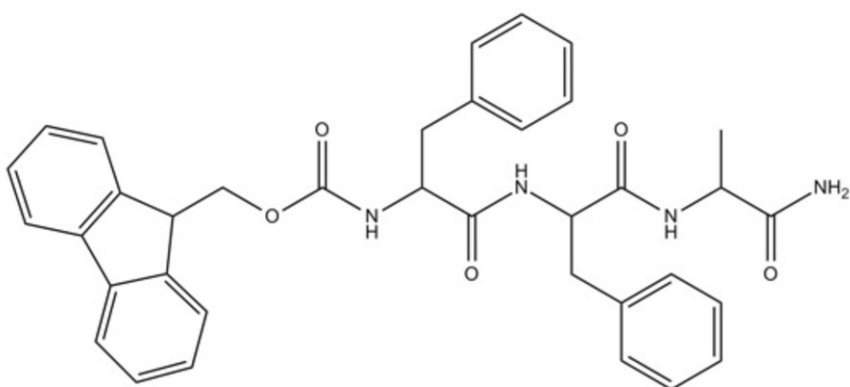
50

【化 6 0】



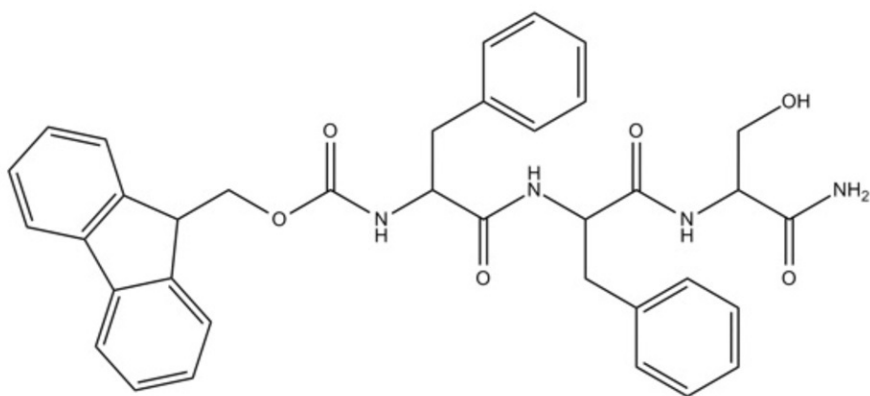
10

【化 6 1】



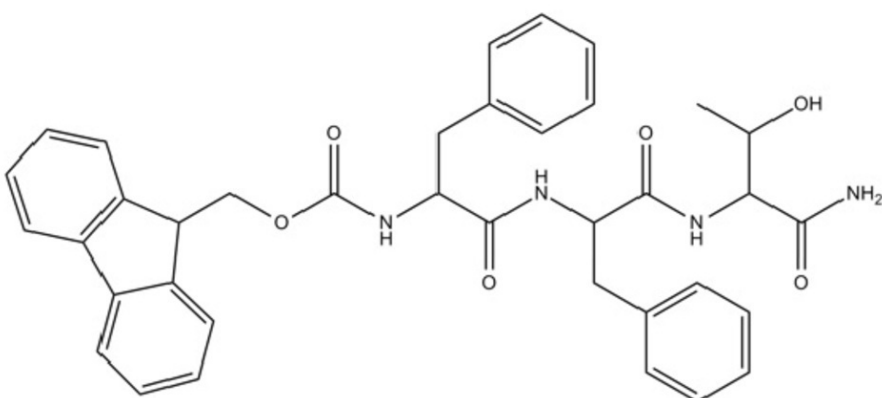
20

【化 6 2】



30

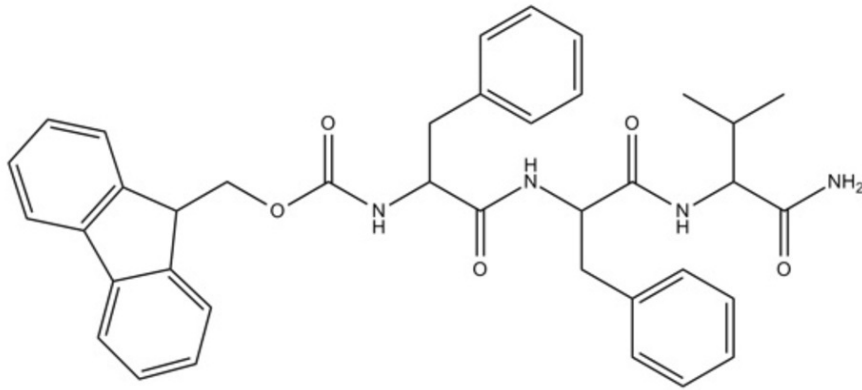
【化 6 3】



40

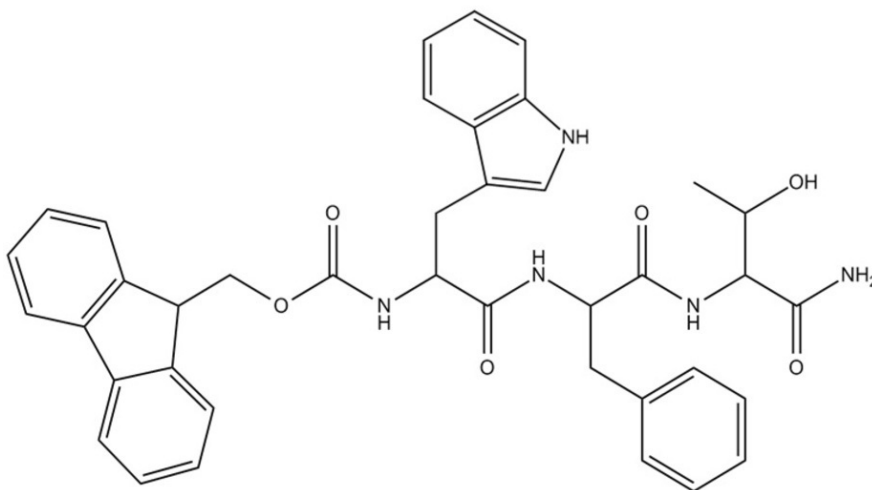
50

【化 6 4】



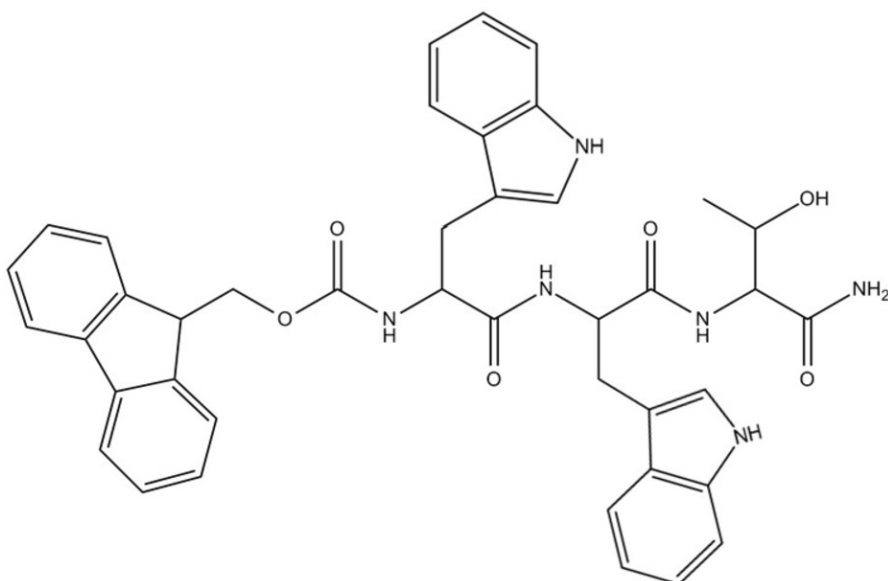
10

【化 6 5】



20

【化 6 6】



30

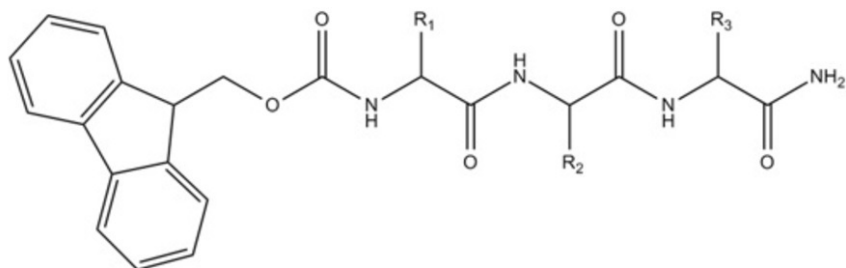
40

【 0 0 2 7】

17. 下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を溶媒に添加するステップを含む、結氷制御方法。

50

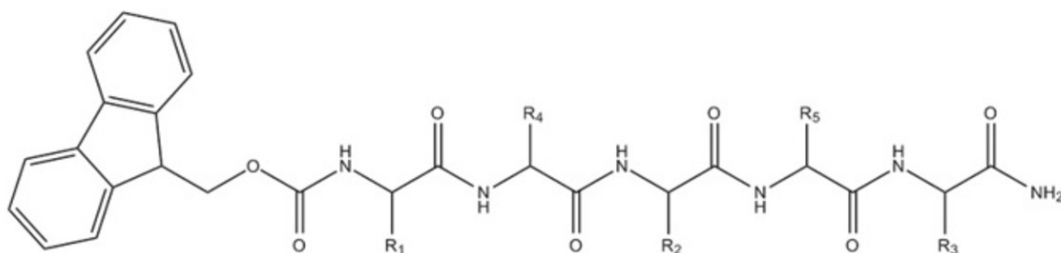
【化 6 7】



【化学式 1】

10

【化 6 8】



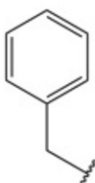
【化学式 2】

20

前記化学式 1 又は 2 中、

 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

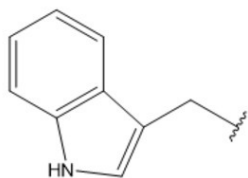
【化 6 9】



30

または

【化 7 0】



40

であり、

 R_3 は、

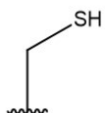
【化 7 1】



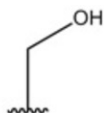
、

50

【化 7 2】

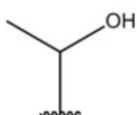


【化 7 3】



10

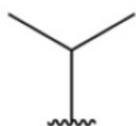
【化 7 4】



または

20

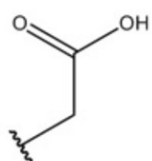
【化 7 5】



であり、

R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して

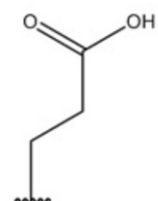
【化 7 6】



30

または

【化 7 7】



40

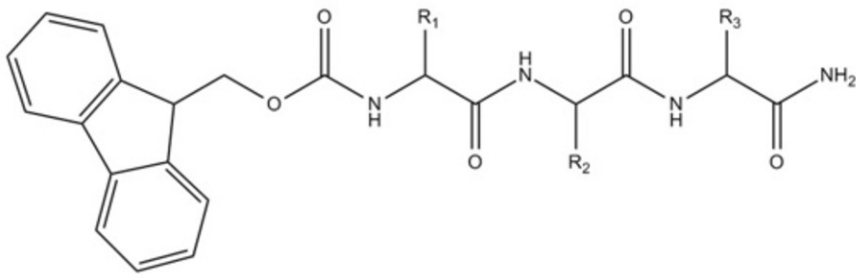
である。

【0 0 2 8】

18. 下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を細胞に処理するステップを含む、細胞凍結保存方法。

50

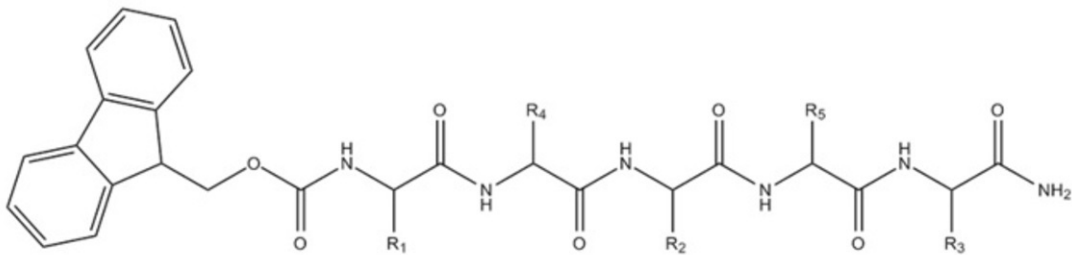
【化 7 8】



【化学式 1】

10

【化 7 9】



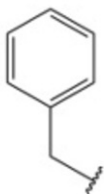
【化学式 2】

20

前記化学式 1 又は 2 中、

 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

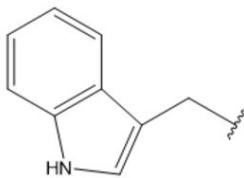
【化 8 0】



30

または

【化 8 1】



40

であり、

 R_3 は、

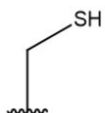
【化 8 2】



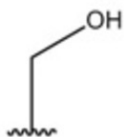
、

50

【化 8 3】

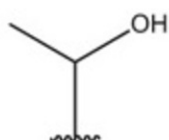


【化 8 4】



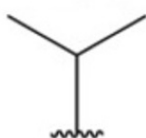
10

【化 8 5】



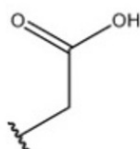
20

または
【化 8 6】



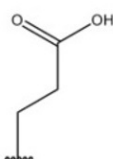
であり、
R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して
【化 8 7】

30



または
【化 8 8】

40

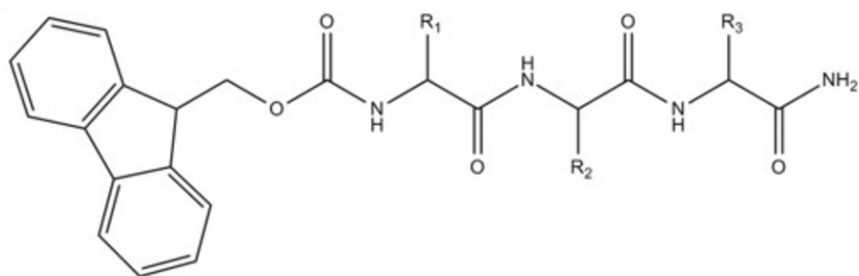


である。
【0 0 2 9】

19. 下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を食品に処理するステップを含む、食品凍結保存方法。

50

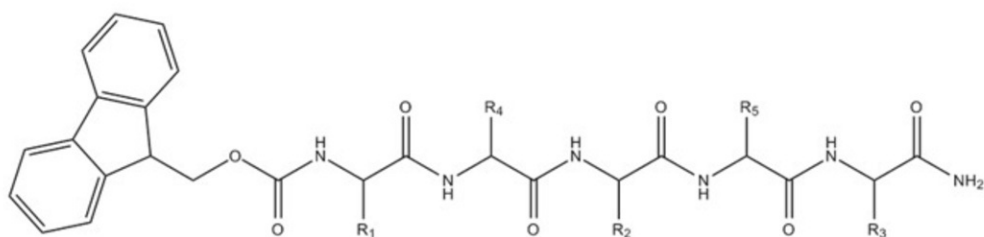
【化 8 9】



【化学式 1】

10

【化 9 0】



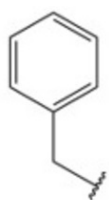
【化学式 2】

20

前記化学式 1 又は 2 中、

 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

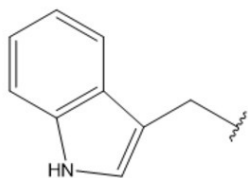
【化 9 1】



30

または

【化 9 2】



40

であり、

 R_3 は、

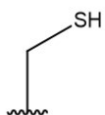
50

【化 9 3】



、

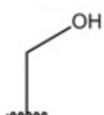
【化 9 4】



10

、

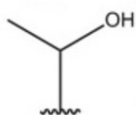
【化 9 5】



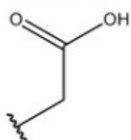
20

、

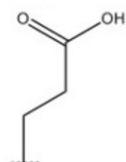
【化 9 6】

または
【化 9 7】

30

であり、
R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して
【化 9 8】

40

または
【化 9 9】

50

である。

【発明の効果】

【0030】

本発明によると、細胞及び生体への毒性が低いながらも、優れた結氷制御能を有する材料を提供することができる。

【0031】

本発明による結氷制御材料は、氷の再結晶化または氷結晶の直径の増加を抑制することができる。

【0032】

本発明によると、本発明による材料を含む結氷制御用組成物、細胞凍結用組成物、および食品凍結用組成物を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は、a) Fmoc-FF、b) Fmoc-FFT、c) Fmoc-FFV、d) Fmoc-FFA、e) Fmoc-FFS、f) Fmoc-FEFET、g) Fmoc-WFT、h) Fmoc-WWT、およびi) Naph-FFTのHPLCスペクトルである。

【図2】図2は、a) Fmoc-FF、b) Fmoc-FFT、c) Fmoc-FFV、d) Fmoc-FFA、e) Fmoc-FFS、f) Fmoc-FEFET、g) Fmoc-WFT、h) Fmoc-WWT、およびi) Naph-FFTのMALDI-TOF/TOF MSスペクトルである。

【図3】図3は、a) は、水溶液中でのFmoc-FFの二次構造を示すCDスペクトルであり、b) は、臨界ミセル凝集のFmoc-FF濃度を示すものであり、c) は、Fmoc-FFのTEM画像であることを示す。

【図4】図4は、水溶液中でのa) Fmoc-FFT、b) Fmoc-FFV、c) Fmoc-FFA、およびFmoc-FFSのCDスペクトルである。

【図5】図5は、a) は、Fmoc-FFTのTEM、b) は、Fmoc-FFTの超低温(cryogenic)-TEM、c) は、Fmoc-FFTのSTEM画像であり、d) は、Fmoc-FFVのTEM画像(左上、蛍光顕微鏡)、e) は、Fmoc-FFAのTEM及び超低温-TEM画像(左上、蛍光顕微鏡)、f) は、水溶液中でのFmoc-FFSのTEM画像であることを示す。

【図6】図6は、a) は、水溶液中でのFmoc-FEFETの二次構造を示すCDスペクトルであり、b) は、臨界ミセル凝集のFmoc-FEFET濃度であり、c) は、Fmoc-FEFETのTEM画像であり、d) は、Fmoc-FEFETの超低温-TEM画像であり、フィブリルの形成を示している。

【図7】図7は、a) は、臨界ミセル凝集のFmoc-FF及びFmoc-FFTの共組織化構造体の濃度であり、b) は、Fmoc-FF及びFmoc-FFTの共組織化構造体の水力学半径をDLSで確認した結果であり、c) は、Fmoc-FF及びFmoc-FFTの共組織化構造体のTEM画像であることを示す。

【図8】図8は、a) は、Fmoc-WFTのCDスペクトル、b) は、Fmoc-WWTのCDスペクトル、c) は、Naph-FFTのCDスペクトルであり、d) は、Fmoc-WFTのTEM画像、e) は、Fmoc-WWTのTEM画像、f) は、Naph-FFTのTEM画像であることを示す。

【図9】図9は、a) は、16.7 nmの直径のMPA-Auナノ粒子の16.7 nmのスペクトルのTEM画像であり、b) は、MPA-AuNP、MPA-AuNP+2 μM BSA、およびMPA-AuNP+2 μM PEGの凍結/解凍後の消光スペクトルであり、凍結-誘導組織化は、消光スペクトルで定量することができる。

【図10】図10は、自己組織化ナノ構造体の凍結/解凍の前(a)及び後(b)の吸収スペクトルの変化を示すものであり、c) は、マイクロウェルプレートで各材料(0.5 mMの50 μL)と混合されたMPA-AuNP溶液(300 μMの350 μL)を凍結

10

20

30

40

50

／解凍の前と後に撮影した写真であり、d) は、c) でのAu N P凝集を吸収割合として定量したものである。

【図11】図11は、氷を30分間再結晶化させ、すべての材料の再結晶化ドメインのMLGSをDFOM画像から計算したものであり、a) 及びb) は、視界から最も大きいドメインを10個選定し、平均を出して測定した。

【図12】図12は、Fmoc-FF、Fmoc-FFT、Fmoc-FFV、Fmoc-FFA、およびFmoc-FFSのIRI活性を示すものであり、a) は、30分間再結晶化された氷の再結晶化を示すDFOMを時間順に示すものであり、b) は、a) からの画像を用いて、各材料の再結晶化ドメインのMLGSを計算したものである。

【図13】図13は、Fmoc-FF、Fmoc-FFT、Fmoc-FFET、およびFmoc-FF:Fmoc-FFTの共組織化のMLGSを示すものである。

【図14】図14は、Fmoc-FF、Fmoc-FFT、Fmoc-WFT、Fmoc-WWT、およびNaph-FFTのIRI活性を示すものであり、氷の再結晶化を示すDFOMは時間に応じて撮影され、氷は30分間再結晶化させた。b) は、a) の画像から計算された各材料の再結晶化ドメインのMLGSである。

【図15】図15は、a) は、様々な試料濃度におけるmESCのCCK-分析法で決定された細胞生存率を示すグラフであり、b) は、クリスタルバイオレット染色で確認したものであることを示す。

【図16】図16は、mESCのCCK-分析法で確認した細胞生存率である。

【図17】図17は、a) は、mESCを各試料で凍結保存した後、37℃で解凍して細胞生存率を確認したものであり、平均+SD形式で示している。b) は、試料で凍結保存した後、4日間mESCの分化を確認したものである。

【図18】図18は、凍結保存後4日間のmESCの分化を凍結保存溶液の濃度によって確認した結果である。

【図19】図19は、凍結／解凍精子の生殖能をFmoc-FF及びFmoc-FFTの共組織化体に対して確認した結果である。

【図20】図20は、試料を使用して凍結保存した精子を注入し、卵子のa) 胚およびb) 胚盤胞への発達を確認したものである。

【図21】図21は、C57BL/6由来の2-細胞胚の*in vitro*および*in vivo*での発達を示すものである。

【図22】図22は、牛肉(a)を凍結する前にFmoc-FFTを処理した場合(d、e)とそうでない場合(b、c)における、氷結晶の大きさ及び組織を確認したSEM画像(b、d)、光学顕微鏡(c、eの左)、およびTEM画像(c、eの右)である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

以下、添付の図面を参照して、本発明をより具体的に説明するが、本発明の全てではなく、いくつかの具体例を例示する。実際、これらの発明は、様々な形態で具体化することができ、本明細書に示す具体例のみに限定されて解釈されるものではない。本明細書及び請求の範囲で使用される単数形は、特に他の明示がない限り複数の対象を含む。

【0035】

本発明では、「抗凍結タンパク質」または「AFP」は、相互交換して使用可能であり、AFPは、様々な動物、植物、カビ及びバクテリアから発見される。これらのタンパク質は、氷結晶に結合することにより、氷の成長および再結晶化を抑制することが知られている。このAFPの性質は、低温で生物学的試料を保存するのに利用されてきた。自然界に存在する抗凍結タンパク質(Anti-freeze protein, AFP)は、 α ヘリックスまたは β シートの二次構造を有するが、前記二次構造で氷の結晶面と接触する位置に、水分子と水素結合または疎水性の相互作用が可能なアミノ酸であるT、S及びVが配列されていることが知られている。この配列は、氷の結晶面に存在する水分子と一定の間隔をおいて相互作用して、氷結晶面の外側(液状)の水分子と氷結晶面の分子との間の相互作用を抑制することにより、氷の成長または氷の再結晶化を防止または低下する。本発明者らは、こ

の技術的背景をもとに、自己組織化によりペプチドと類似した配列を持つことができる化合物を用いてペプチド類似構造体を製造し、この構造体が結氷制御能があることを確認することにより本発明を完成した。

【0036】

本発明に係る結氷制御用組成物は、Fmoc（フルオレニルメチルオキシカルボニル、Fluorenylmethyloxycarbonyl）に2個～5個のアミノ酸、例えば、2個、3個、4個または5個のアミノ酸がペプチド結合で連結されている化合物を含む。前記化合物は、「ペプチド類似化合物」、「本発明に係る試料」「本発明の試料」「本発明に係る化合物」「本発明の化合物」または「試料」と称する。また、前記化合物が自己組織化して形成される構造体は「自己組織化ナノ構造体」と称する。

10

【0037】

本発明の一実施形態では、前記化合物に含まれたアミノ酸残基は、アルギニン（Arg, R）、ヒスチジン（His, H）、リシン（Lys, K）、アスパラギン酸（Asp, D）、グルタミン酸（Glu, E）、セリン（Ser, S）、トレオニン（Thr, T）、アスパラギン（Asn, N）、グルタミン（Gln, Q）、システイン（Cys, C）、グリシン（Gly, G）、プロリン（Pro, P）、アラニン（Ala, A）、バリン（Val, V）、イソロイシン（Ile, I）、ロイシン（Leu, L）、メチオニン（Met, M）、フェニルアラニン（Phe, F）、チロシン（Tyr, Y）、およびトリプトファン（Trp, W）からなる群より選択される一つ以上のアミノ酸残基である。本発明の他の実施形態では、前記アミノ酸はThr、Ala、Val、Ser、Cys、Asp、Glu、Phe及びTrpからなる群より選択される一つ以上のアミノ酸残基である。

20

【0038】

本発明の一実施形態では、本発明に係る化合物はFmoc-FFX₁、Fmoc-WFX₁、Fmoc-WWX₁、FmocFWX₁、Fmoc-FX₂FX₃X₁、Fmoc-WX₂FX₃X₁、Fmoc-WX₂WX₃X₁、FmocFX₂WX₃X₁で表される構造を有する。前記X₁は、アミノ酸T、V、A、S及びCからなる群より選択されるいずれか一つであり、前記X₂及びX₃は、それぞれ独立してアミノ酸DまたはEである。

【0039】

本発明に係る化合物のうちFmoc-FFにおいて、Fmocは分子間 π - π stackingを誘導し、Phe-Pheは π - π stacking及び水素結合を誘導して自己組織化（self-assembly）され、タンパク質二次構造と類似した α ヘリックスまたは β シートを形成する。この配列により、水と相互作用できるアミノ酸残基が自己組織化体の外側に配列され、氷の界面と親水性の相互作用、疎水性の相互作用、または水素結合を形成することができる。また、Fmoc-FFにおいて、少なくとも1つのPheはTrpで置換することができ、置換された化合物Fmoc-FWX、Fmoc-WFXまたはFmoc-WWXは、親化合物であるFmoc-FFXと比較して、同一又は類似の程度の結氷制御活性を有することが確認された。

30

【0040】

本発明の一実施形態では、前記X₁は、水と相互作用できるアミノ酸であって、特にThr、Ala、Val、SerまたはCysであり、本発明の他の実施形態では、前記X₁はThrまたはAlaである。本発明の発明者らは、X₁がThr、Ala、ValまたはSerである場合には、いずれも氷の再結晶化を抑制したり、結氷を制御できることを確認した。驚くべきことに、X₁が水と親水性の相互作用、または水素結合を形成できるアミノ酸残基であるSerの場合と比較して、疎水性の官能基と親水性の官能基の両方を有するThrの場合に、より良い氷再結晶化の阻害活性、及び／又は結氷制御活性を示すことを確認した。また、X₁がSerである場合と比較して、疎水性の官能基のみを有するAlaである場合に、より良い氷再結晶化の阻害活性、及び／又は結氷制御活性を示すことを確認した。

40

【0041】

50

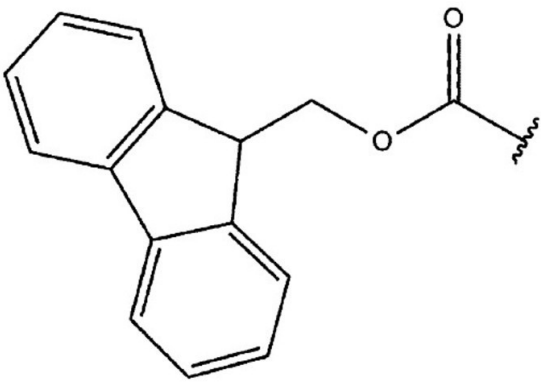
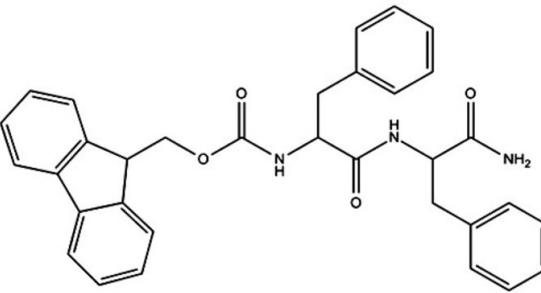
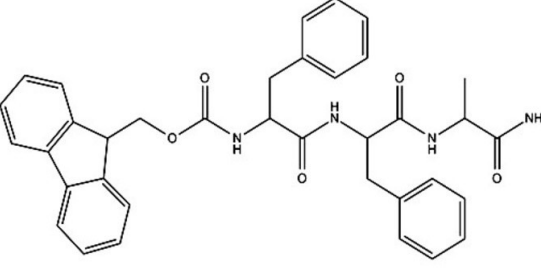
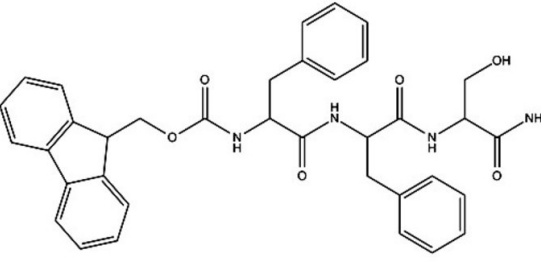
また、 X_2 及び X_3 は、それぞれの化合物の親水性レベルを高めて自己組織化ナノ構造体の水溶性を高めるために追加で導入されたものである。本発明の一実施形態では、 X_2 及び X_3 は、それぞれ独立して Asp または Glu であり、本発明の他の実施形態では X_2 及び X_3 は、それぞれ独立して Glu である。

【0042】

本発明に係る化合物は、本明細書で以下のように命名される。

【0043】

【表 1】

化合物	名前
	Fmoc-
	Fmoc-FF
	Fmoc-FFA
	Fmoc-FFS

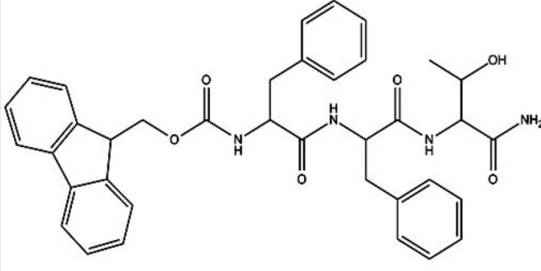
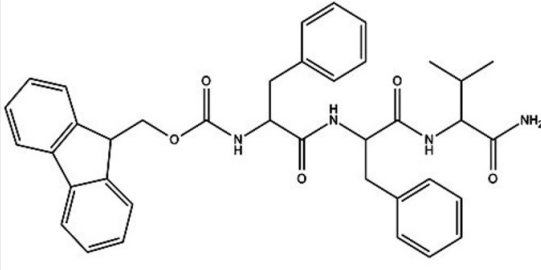
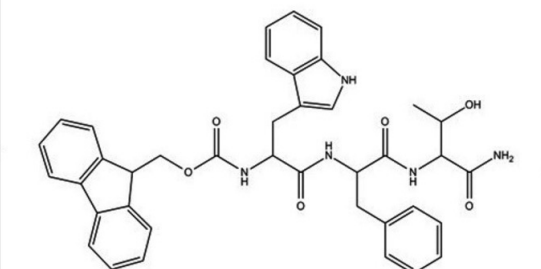
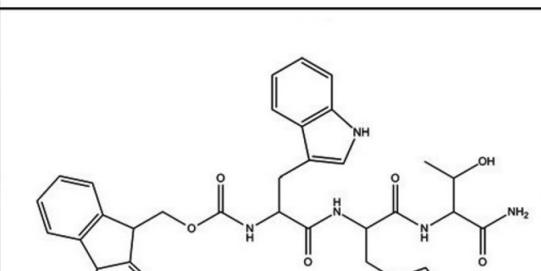
10

20

30

40

50

	Fmoc-FFT
	Fmoc-FFV
	Fmoc-WFT
	Fmoc-WWT

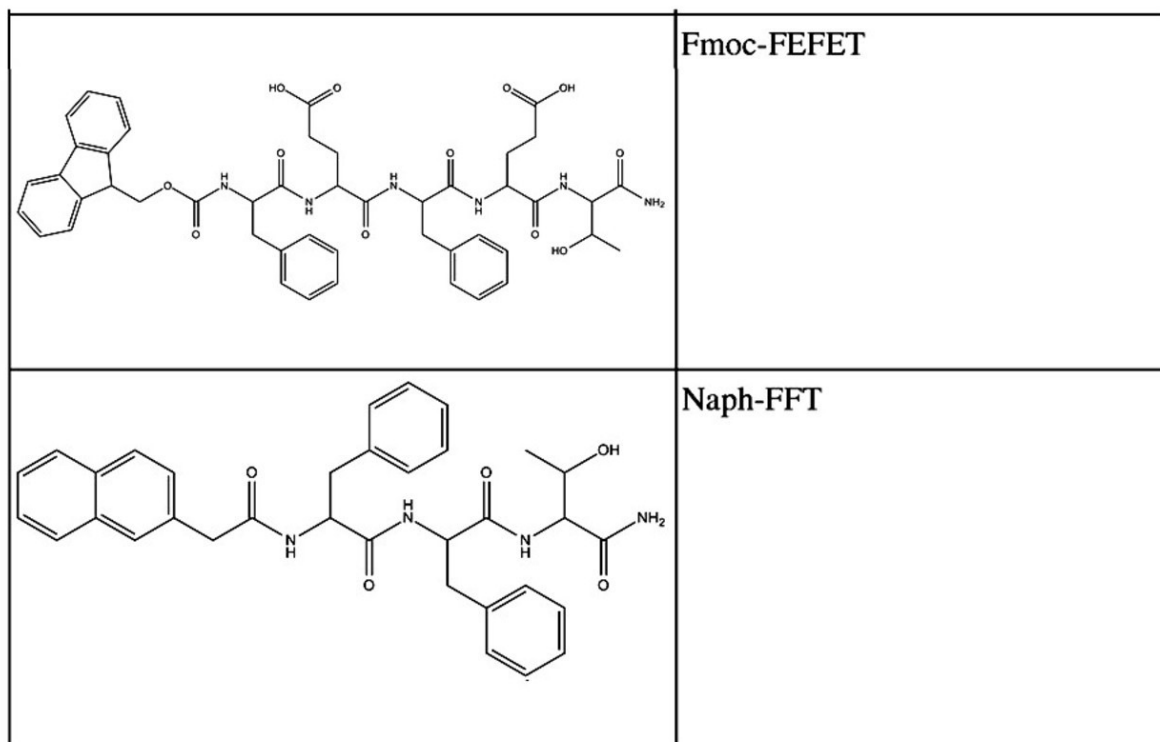
10

20

30

40

50



【 0 0 4 4 】

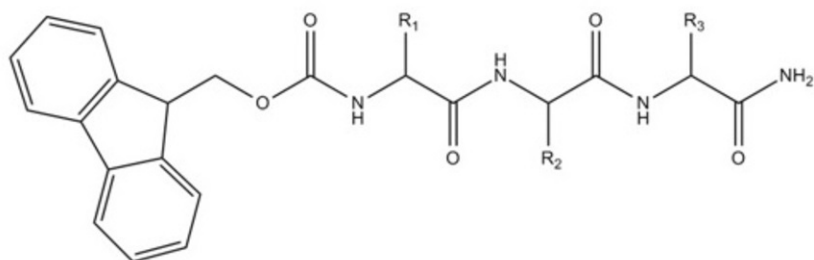
本発明の一実施形態では、角錐面 (pyramidal plane) と w f A F P の高い結合力を模倣するために、本発明の自己組織化構造体が結晶面と効果的に結合できるように T h r を約 $17.5 \text{ \AA}$ の間隔で配列しようとした (Knight, C. A., Cheng, C. C., & DeVries, A. L. (1991). Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophysical Journal*, 59(2), 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.)。また、A F P 特性に關与する氷結晶－結合面は、底面 (basal plane) [0001]、第1の角柱面 (primary prism plane) [1010]、第2の角柱面 (secondary prism plane) [1120]、ピラミッド面 (pyramidal plane) [2021] である。このうち、basal plane は遅い結晶成長を見せるのに対して、角柱面 (prismatic faces) は速い結晶成長を見せ、pyramidal plane の場合は、氷結晶の成長過程で露出することが知られている (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.)。また、カレイ (winter flounder) に由来する w f A F P 1 の場合は、basal plane と比べて pyramidal plane に結合したとき、より低い安定化エネルギーを有する。実際、w f A F P 1 表面に規則的に存在する T h r 間の間隔が $16.5 \text{ \AA}$ を有し、これは氷の角錐面 (pyramidal plane) [2021] の酸素－酸素の間隔と一致し、氷結晶の成長抑制の過程で大きな影響を与えることが知られている。そこで、Fmoc-FF と Fmoc-FFT を 2 : 1 のモル比で混合することにより、[(Fmoc-FF)(Fmoc-FF)(Fmoc-FFT)] の配列で自己組織化されるようにした。この自己組織化体を含む組成物は、一つの化合物からなる自己組織化構造体に比べて、同等または優れた結氷制御活性及

び／又は再結晶化阻害活性を示した。

【 0 0 4 5 】

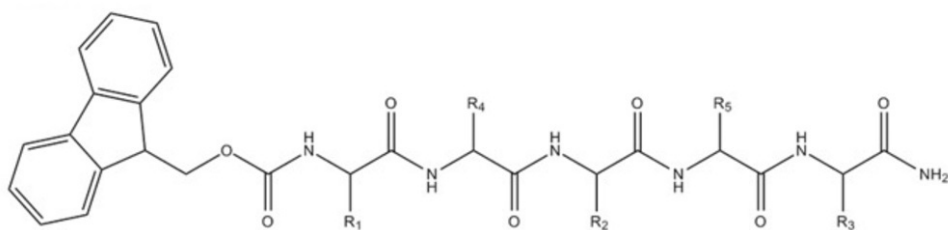
本発明の一実施形態では、下記の化学式 1 又は化学式 2 で表される化合物を含む、結氷制御用組成物を提供する。

【化 1 0 0】



【化学式 1】

【化 1 0 1】

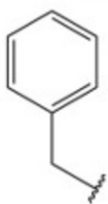


【化学式 2】

前記化学式 1 又は 2 中、

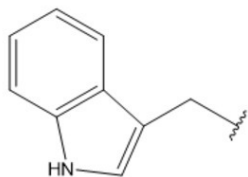
R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して

【化 1 0 2】



または

【化 1 0 3】



であり、

R_3 は

10

20

30

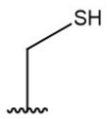
40

50

【化 1 0 4】

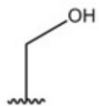


【化 1 0 5】

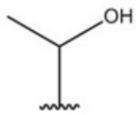


10

【化 1 0 6】

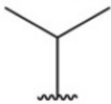


【化 1 0 7】



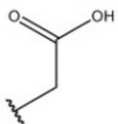
20

または
【化 1 0 8】



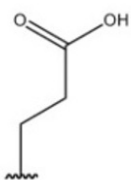
30

であり、
R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して
【化 1 0 9】



40

または
【化 1 1 0】



である。

50

【0046】

本発明で使用する用語「氷の再結晶化」は、小さな氷結晶から更に大きな氷結晶に成長する過程を意味し、オストヴァルト熟成（Ostwald ripening）は、常温と結晶間の表面エネルギーの差による圧力によって発生する再結晶化を意味し、融解－拡散－再凍結または昇華－拡散－凝縮のメカニズムで進行され得る。

【0047】

本発明で使用する用語「抗凍結」、「凍結制御」、「結氷制御」、「凍結抑制」および「結氷抑制」は、相互交換して使用可能であり、氷点を下げたり、氷が形成されないようにするか氷の形成速度を遅らせたり、氷の再結晶化が行われないうにしたり、氷再結晶化の速度を遅らせたり、氷結晶の大きさを小さく維持する作用を意味する。

10

【0048】

本発明の結氷制御用組成物は、従来知られている結氷制御能を有する物質をさらに含むことができる。例えば、本発明の一実施形態では、結氷制御用組成物は、本発明に係る自己組織化ナノ構造体の他にも、DMSO（dimethyl sulfoxide）、グリセロール、1，2－プロパンジオール、スクロース、グルコース、プロリン、ガラクトース、ラクトース、グリシンベタイン又はフルクトースをさらに含むことができる。本発明の一実施形態では、細胞または食品の凍結保存に用いられる場合には、細胞毒性の低い、スクロース、グルコース、ラクトース、グリシンベタイン又はフルクトースをさらに含むことができる。

【0049】

本発明の一実施形態では、前記化学式1又は化学式2で表される化合物を含む細胞凍結用組成物を提供する。細胞を凍結する過程および解凍する過程で、氷の再結晶化が起こり得る。氷の再結晶化が発生する場合には、氷の結晶が成長するにつれて、細胞膜が損傷し、細胞の脱水が進行されて細胞組織に損傷を与える。本発明に係る自己組織化ナノ構造体を含む組成物は、氷の成長または再結晶化を抑制させ、細胞凍結保存時の氷結晶の成長により細胞が死滅することを防ぐことができる。

20

【0050】

本発明に係る組成物は、氷結晶の成長抑制効果に優れるだけでなく、細胞毒性が低く、細胞、組織または臓器の凍結保存に有用に使用することができる。前記細胞は、例えば、これらに限定されないが、微生物を含む原核細胞、植物、動物、菌類、原生生物を含む真核生物の細胞、例えば、精子、卵子、上皮細胞、神経細胞、表皮細胞、角質細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、B細胞、T細胞、赤血球、マクロファージ、単核球、線維芽細胞、筋肉細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、または成体幹細胞であってもよい。本発明の一実施形態では、前記組織は、膜上皮組織および腺上皮組織を含む上皮組織；疎性結合組織、脂肪組織、緻密繊維結合組織、細網結合組織、軟骨、骨組織、血液、およびリンパを含む結合組織；ニューロン及び神経膠を含む神経組織；並びに、平滑筋、心筋及び骨格筋を含む筋肉組織であってもよいが、これらに限定されるものではない。本発明の一実施形態では、前記臓器は、甲状腺、血管、肺、食道、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、大腸、気管、心臓、尿管および子宮を含むが、これらに制限されるものではない。

30

【0051】

細胞、組織または臓器を凍結保存する方法は、凍結保存する対象に、本発明に係る有効量の自己組織化ナノ構造体を接触または添加し、凍結保存のための温度に冷却するステップを含む。細胞、組織または臓器の凍結保存方法は、当該技術分野で公知の技術を用いて行うことができ、例えば、急速冷却器または液体窒素を用いることができるが、これらに限定されるものではない。

40

【0052】

本発明の一実施形態では、本発明に係る組成物は、精子及び卵子を含む生殖細胞、および幹細胞の凍結保存に用いることができる。生殖細胞の冷凍保存は、生殖補助技術（assisted reproductive technology, ARTs）として、また家畜の場合には、繁殖管理のための重要な技術として、バイオテクノロジーで広く研究されている。一方、解凍後は精子の質が低下して生殖能が低下することになるが、主な原因としては、急激な温度変化、

50

氷の形成および浸透圧などが挙げられる。本発明に係る生体適合性を有する自己組織化ナノ構造体を用いると、氷の形成及び／又は再結晶化が抑制される。これにより、細胞内、溶媒内または培地内での局所的な濃度の増加に起因する浸透圧の変化を最小限に抑えることができ、結果として、凍結後に解凍された精子の生存率および生殖能を上昇できることを確認した。

【0053】

本発明の一実施形態では、前記の化学式1又は化学式2で表される化合物を含む食品凍結保存用の組成物を提供する。食品を凍結及び／又は解凍する過程において、水分から発生した氷結晶が成長するが、これは食品に存在する細胞及び／又は組織を破壊して食感の低下を引き起こす。本発明に係る自己組織化ナノ構造体は、結氷を抑制したり、氷の再結晶化を抑制するので、氷結晶の成長、及びそれによる浸透圧の変化による食品の品質低下を最小限に抑えることができる。

【0054】

食品の凍結保存方法は、凍結保存する対象に、本発明に係る有効量の自己組織化ナノ構造体を接触または添加し、凍結保存のための温度に冷却するステップを含む。凍結保存方法は、当該技術分野で公知の技術を用いることができ、例えば、急速冷却器または液体窒素を用いることができるが、これらに限定されるものではない。

【0055】

通常の技術者は、「約」の使用を避けられない場合があることを理解するだろう。本明細書で用語「約」は、誤差の範囲内の数値を含むものと理解すべきである。

【0056】

本発明で使用する用語「実質的に同一」は、誤差の範囲内で同一であるか、又は認識できない程度の差があることを意味する。本発明で使用する用語「実質的にない」又はそれと類似した表現は、0または誤差の範囲内に0が含まれる場合、若しくは通常の技術者の認識上無視できる場合を指す。

【0057】

実施例

製造例1. Fmoc-FFの製造

Fmoc-FFは、CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System、Discoverで標準固相ペプチド合成 (solid-phase peptide synthesis、SPPS) 方法を用いて、リンクアミド (Link Amide) MBHA樹脂上で合成した。DCM (dichloromethan) により樹脂を洗浄した後、攪拌培養器で30分間DMF (dimethylformamide) 及びDCMが1:1で混合された溶液で樹脂を膨張させた。樹脂のFmoc部分をDMF中で20%ピペリジンで3分間マイクロ波で除去し、DMF、DCM及びNMP (N-Methyl-2pyrrolidone) で完全に洗浄した。その後、Fmoc-Phe-OH (5.0当量)、HBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate) (4.9当量) およびDIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) (5.0当量) と混合されたNMP溶液を樹脂に添加し、10分間マイクロ波で処理した。その後、Fmoc-Phe-OHをFmoc-FF樹脂の順に樹脂上のペプチドのN-末端とカップリングさせた。それぞれのカップリング及び保護基の除去工程に対して、カイザーテスト (Kaiser test) により自由アミノ基の存在を確認した。樹脂に切断溶液 (TFA (Trifluoroacetic acid) : TIS (Triisopropylsilane) : H₂O = 95 : 2.5 : 2.5) を攪拌培養器で2時間処理した。過量のTFAは、アルゴンガスで除去し、生成物を冷たいEt₂Oで沈殿させた後、4000rpmで5分間遠心分離した。ペプチドは、逆相HPLCでC18カラム (SUPELCO、Discovery (登録商標) BIO Wide Pore C18、5μm、10x250mm) で2mL min⁻¹の速度で水 (0.1% TFA) 及びアセトニトリル (0.1% TFA) の線形勾配を用いてペプチドを精製し、230nm及び254nmでUV吸収スペクトルで確認した。Fmoc-FFの分子量 (557 [M+Na]⁺) は、MALDI-TOF/TOF質量分析計で確認した。

【0058】

製造例 2. Fmoc-FFX の製造

Fmoc-FFX は、CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System、Discover で標準固相ペプチド合成方法を用いて、リンクアミド (Rink Amide) MBHA 樹脂上で合成した。DCM により樹脂を洗浄した後、攪拌培養器で 30 分間 DMF 及び DCM が 1 : 1 で混合された溶液で樹脂を膨張させた。樹脂の Fmoc 部分を DMF 中で 20 % ピペリジンで 3 分間マイクロ波で除去し、DMF、DCM 及び NMP で完全に洗浄した。その後、それぞれ Fmoc-Thr (tBu)-OH (5.0 当量)、Fmoc-FFV のためには Fmoc-Val-OH (5.0 当量)、Fmoc-FFA のためには Fmoc-Ala-OH (5.0 当量)、Fmoc-FFS のためには Fmoc-Ser (tBu)-OH (5.0 当量) ; HBTU (4.9 当量) ; および DIPEA (5.0 当量) と混合された NMP 溶液を樹脂に添加し、10 分間マイクロ波で処理した。その後、Fmoc-Phe-OH を Fmoc-FF-樹脂の順に樹脂上のペプチドの N-末端とカップリングさせた。それぞれのカップリング及び保護基の除去工程に対して、カイザーテスト (Kaiser test) により自由アミノ基の存在を確認した。樹脂に切断溶液 (TFA : TIS : H₂O = 95 : 2.5 : 2.5) を攪拌培養器で 2 時間処理した。過量の TFA は、アルゴンガスで除去し、生成物を冷たい Et₂O で沈殿させた後、4000 rpm で 5 分間遠心分離した。ペプチドは、逆相 HPLC で C18 カラム (SUPELCO、Discovery (登録商標) BIO Wide Pore C18、5 µm、10x250mm) で 2 mL min⁻¹ の速度で水 (0.1 % TFA) 及びアセトニトリル (0.1 % TFA) の線形勾配を用いてペプチドを精製し、230 nm 及び 254 nm で UV 吸収スペクトルで確認した。Fmoc-FFT の分子量 (657 [M+Na]⁺)、Fmoc-FFV の分子量 (655 [M+Na]⁺、671 [M+K]⁺)、Fmoc-FFA の分子量 (627 [M+Na]⁺)、および Fmoc-FFS の分子量 (643 [M+Na]⁺、659 [M+K]⁺) は、MALDI-TOF / TOF 質量分析計で確認した。

【0059】

製造例 3. Fmoc-FEFT の製造

Fmoc-FEFT は、CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System、Discover で標準固相ペプチド合成方法を用いて、リンクアミド (Rink Amide) MBHA 樹脂上で合成した。DCM により樹脂を洗浄した後、攪拌培養器で 30 分間 DMF 及び DCM が 1 : 1 で混合された溶液で樹脂を膨張させた。樹脂の Fmoc 部分を DMF 中で 20 % ピペリジンで 3 分間マイクロ波で除去し、DMF、DCM 及び NMP で完全に洗浄した。その後、それぞれ Fmoc-Thr (tBu)-OH (5.0 当量) ; HBTU (4.9 当量) ; および DIPEA (5.0 当量) と混合された NMP 溶液を樹脂に添加し、10 分間マイクロ波で処理した。その後、Fmoc-Glu (OtBu)-OH 及び Fmoc-Phe-OH を Fmoc-FEFT-樹脂の順に樹脂上のペプチドの N-末端とカップリングさせた。それぞれのカップリング及び保護基の除去工程に対して、カイザーテスト (Kaiser test) により自由アミノ基の存在を確認した。樹脂に切断溶液 (TFA : TIS : H₂O = 95 : 2.5 : 2.5) を攪拌培養器で 2 時間処理した。過量の TFA は、アルゴンガスで除去し、生成物を冷たい Et₂O で沈殿させた後、4000 rpm で 5 分間遠心分離した。ペプチドは、逆相 HPLC で C18 カラム (SUPELCO、Discovery (登録商標) BIO Wide Pore C18、5 µm、10x250mm) で 2 mL min⁻¹ の速度で水 (0.1 % TFA) 及びアセトニトリル (0.1 % TFA) の線形勾配を用いてペプチドを精製し、230 nm 及び 254 nm で UV 吸収スペクトルで確認した。Fmoc-FEFT の分子量 (915 [M+Na]⁺、932 [M+K]⁺) は、MALDI-TOF / TOF 質量分析計で確認した。

【0060】

製造例 4. Fmoc-WFT の製造

Fmoc-WFT は、CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System、Discover で標準固相ペプチド合成方法を用いて、リンクアミド (Rink Amide) MBHA 樹脂上で合成した。DCM により樹脂を洗浄した後、攪拌培養器で 30 分間 DMF 及び DCM が 1

：1で混合された溶液で樹脂を膨張させた。樹脂のFmoc部分をDMF中で20%ピペリジンで3分間マイクロ波で除去し、DMF、DCM及びNMPで完全に洗浄した。その後、それぞれFmoc-Thr(tBu)-OH(5.0当量)；HBTU(4.9当量)；およびDIPEA(5.0当量)と混合されたNMP溶液を樹脂に添加し、10分間マイクロ波で処理した。その後、Fmoc-Trp-OH及びFmoc-Phe-OHをFmoc-WFT樹脂の順に樹脂上のペプチドのN-末端とカップリングさせた。それぞれのカップリング及び保護基の除去工程に対して、カイザーテスト(Kaiser test)により自由アミノ基の存在を確認した。樹脂に切断溶液(TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5)を攪拌培養器で2時間処理した。過量のTFAは、アルゴンガスで除去し、生成物を冷たいEt₂Oで沈殿させた後、4000rpmで5分間遠心分離した。ペプチドは、逆相HPLCでC18カラム(SUPELCO、Discovery(登録商標) BIO Wide Pore C18、5μm、10x250mm)で2mL min⁻¹の速度で水(0.1%TFA)及びアセトニトリル(0.1%TFA)の線形勾配を用いてペプチドを精製し、230nm及び254nmでUV吸収スペクトルで確認した。Fmoc-WFTの分子量(674[M+H]⁺、696[M+Na]⁺)は、MALDI-TOF/TOF質量分析計で確認した。

10

【0061】

製造例5.Fmoc-WWTの製造

Fmoc-WWTは、CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System、Discoverで標準固相ペプチド合成方法を用いて、リンクアミド(Rink Amide) MBHA樹脂上で合成した。DCMにより樹脂を洗浄した後、攪拌培養器で30分間DMF及びDCMが1:1で混合された溶液で樹脂を膨張させた。樹脂のFmoc部分をDMF中で20%ピペリジンで3分間マイクロ波で除去し、DMF、DCM及びNMPで完全に洗浄した。その後、それぞれFmoc-Thr(tBu)-OH(5.0当量)；HBTU(4.9当量)；およびDIPEA(5.0当量)と混合されたNMP溶液を樹脂に添加し、10分間マイクロ波で処理した。その後、Fmoc-Trp-OHをFmoc-WWT樹脂の順に樹脂上のペプチドのN-末端とカップリングさせた。それぞれのカップリング及び保護基の除去工程に対して、カイザーテスト(Kaiser test)により自由アミノ基の存在を確認した。樹脂に切断溶液(TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5)を攪拌培養器で2時間処理した。過量のTFAは、アルゴンガスで除去し、生成物を冷たいEt₂Oで沈殿させた後、4000rpmで5分間遠心分離した。ペプチドは、逆相HPLCでC18カラム(SUPELCO、Discovery(登録商標) BIO Wide Pore C18、5μm、10x250mm)で2mL min⁻¹の速度で水(0.1%TFA)及びアセトニトリル(0.1%TFA)の線形勾配を用いてペプチドを精製し、230nm及び254nmでUV吸収スペクトルで確認した。Fmoc-WWTの分子量(714[M+H]⁺、736[M+Na]⁺、752[M+K]⁺)は、MALDI-TOF/TOF質量分析計で確認した。

20

30

【0062】

製造例6.Naph-FFTの製造

Naph-FFTは、CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System、Discoverで標準固相ペプチド合成方法を用いて、リンクアミド(Rink Amide) MBHA樹脂上で合成した。DCMにより樹脂を洗浄した後、攪拌培養器で30分間DMF及びDCMが1:1で混合された溶液で樹脂を膨張させた。樹脂のFmoc部分をDMF中で20%ピペリジンで3分間マイクロ波で除去し、DMF、DCM及びNMPで完全に洗浄した。その後、それぞれFmoc-Thr(tBu)-OH(5.0当量)；HBTU(4.9当量)；およびDIPEA(5.0当量)と混合されたNMP溶液を樹脂に添加し、10分間マイクロ波で処理した。その後、Fmoc-Phe-OHをNaph-FFT樹脂の順に樹脂上のペプチドのN-末端とカップリングさせた。Fmocは、同じカップリングプロセスにより1-ナフチル酢酸(1-Naphthylacetic acid)で置換させた。それぞれのカップリング及び保護基の除去工程に対して、カイザーテスト(Kaiser test)により自由アミノ基の存在を確認した。樹脂に切断溶液(TFA:TIS:H₂O=95:2.5:

40

50

2. 5) を攪拌培養器で2時間処理した。過量のTFAは、アルゴンガスで除去し、生成物を冷たいEt₂Oで沈殿させた後、4000 rpmで5分間遠心分離した。ペプチドは、逆相HPLCでC18カラム (SUPELCO、Discovery (登録商標) BIO Wide Pore C18、5 μm、10x250mm) で2 mL min⁻¹の速度で水 (0.1% TFA) 及びアセトニトリル (0.1% TFA) の線形勾配を用いてペプチドを精製し、230 nm及び254 nmでUV吸収スペクトルで確認した。Naph-FFTの分子量 (603 [M+N a]⁺、619 [M+K]⁺) は、MALDI-TOF/TOF質量分析計で確認した。

【0063】

前記の製造例1~6によってFmoc-FF、Fmoc-FFT、Fmoc-FFV、Fmoc-FFA、Fmoc-FFS、Fmoc-FEFET、Fmoc-WFT、Fmoc-WWT、およびNaph-FFTが成功的に製造されたことを、HPLC (図1) 及びMALDI/TOF-TOF (図2) により確認した。

【0064】

製造例7. ナノ構造体の形成

前記の製造例1~6で合成されたすべての化合物を、臨界濃度を考慮して精製水に10~20 μMの濃度で添加することにより、自己組織化されたナノ構造体を製造した。

【0065】

7. 1 Fmoc-FF

合成されたFmoc-FFは、CD分光法の実験で、195 nmにおける正の最大楕円率 (positive maximum ellipticity) と、220 nmにおける負の最小楕円率 (negative minimum ellipticity) を示したことから、水溶液中で典型的なβシート二次構造を有していることが分かった。また、濃度による発光強度 (emission intensity) の差から、17 μMの臨界ミセル濃度 (Critical micellar concentration、CMC) を有することが分かった。このFmoc-FFは、水溶液中で5 nmの厚さを有するフィブリルを形成することをTEM (transmission electron microscopy) 実験により確認した (図3)。

【0066】

7. 2 Fmoc-FFT、Fmoc-FFV、Fmoc-FFA及びFmoc-FFS

合成されたFmoc-FFをベースとするFmoc-FFT、Fmoc-FFV、Fmoc-FFA及びFmoc-FFSペプチドは、いずれもβシート二次構造を有することをCD分光法により確認した (図4)。しかし、自己組織化ナノ構造体の形態は、化合物によって異なっていた (図5)。Fmoc-FFにThr残基を導入したFmoc-FFTは、1Dフィブリル構造が維持されるのに対し、Fmoc-FFTにおけるThr残基のヒドロキシル基がメチル基で置換されたFmoc-FFVの場合には、疎水性の相互作用が強化されて2Dシート構造が形成された。メチル基もヒドロキシル基もないFmoc-FFAの場合も、2Dシート構造またはリボン構造が形成された。メチル基が除去されたFmoc-FFSの場合には、フィブリルをそのまま維持することが確認できた。

【0067】

7. 3 Fmoc-FEFET

Fmoc-FEFETは、Fmoc-FFTと比べてCMCが22.8 μmに増加したことから、溶解度が向上したことが確認できた。また、βシート二次構造を有し、水溶液中で非常によく分散されたフィブリルを形成することをcryo-TEMとTEMで確認した (図6)。

【0068】

7. 4 Fmoc-FF及びFmoc-FFTの共組織化 (co-assembly)

Fmoc-FF及びFmoc-FFTを2:1 (mole:mole) で混合し、Fmoc-FF:Fmoc-FFTの共組織化体を製造した。Fmoc-FF及びFmoc-FFTとCMCが類似していた。DLS分光法により、共組織化体が均一な分散性を有し、ナノ構造体の形態は、フィブリルをそのまま維持することをTEM実験により確認した (図7)。

【0069】

10

20

30

40

50

7.5 Fmoc-WFT、Fmoc-WWT及びNaph-FFT

Fmoc-WFT及びFmoc-WWTの場合は、それぞれランダムコイル、 α ヘリックス二次構造が優勢に形成されることを確認した。特に、FをすべてWで置換したFmoc-WWTの場合には、ヘリカルフィブリルが形成されることを確認した（図8）。

【0070】

実施例1. 結氷制御効果

実施例1.1 金ナノ粒子の色変化を利用した抗凍結効果の分析（TH、IRIの評価）

抗凍結活性として、熱履歴現象（thermal hysteresis、TH）は、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, 752-757に記載された方法で測定した。氷再結晶化の抑制（ice recrystallization inhibition、IRI）活性は、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)に基づいて測定した。より具体的には、金ナノ粒子が分散された溶液にAFPを分散させて溶液を冷凍した後、再度解凍するとき、AFPと氷結晶面の結合力が良い場合には、金ナノ粒子の分散性が良く、本来の溶液の色を維持するのに対して、結合力が弱くてAFPを析出して氷結晶が急速に生成される場合には、溶液は色変化を起こる。

【0071】

実施例1.1.1 金ナノ粒子の合成

クエン酸で安定化された金ナノ粒子（Cit-AuNP）を合成し、メルカプトプロピオン酸（mercaptopropionic acid、MPA）-AuNPを製造した。1mMの $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ を含有する20mLの保存用溶液を50mLの精製水（deionized water、DI water）に添加した。前記溶液を攪拌しながら沸点まで加熱した後、2mLの精製水中の30mMソジウムクエン酸を前記溶液にさらに添加し、20分間加熱した。溶液の色は明るい黄色からバーガンディ色に変化した。その後、溶液を攪拌しながら室温まで冷却し、さらに1時間攪拌した。MPA-capped AuNPの平均サイズは、約16.7nmで測定された。

【0072】

実施例1.1.2 比色分析（Colorimetric assay）

マイクロウェルプレートで0.5mMの試料を含む溶液50 μL を300 μM MPA-AuNP溶液350 μL にそれぞれ添加した。対照群として300 μM MPA-AuNP溶液350 μL を使用した。試料混合物が入れたマイクロウェルプレートを一65 $^{\circ}\text{C}$ で23分間冷却し、完全に溶けるまで室温で昇温した。凍結過程の間に5分ごとに試料を観察し、20分経過した時点からは1分ごとに確認した。凍結前および解凍後の色の変化を定量的に確認するために、凍結前および解凍後に各混合物の吸収スペクトルをUH5300分光計で測定した。スペクトルは、400nm/minスキャン速度で300nm～900nmで測定し、各混合物の凝集特性（E525/E650）を比較した。

【0073】

実施例1.1.3 BSA、PEGのTH及びIRI活性の測定

氷再結晶化の抑制効果を有することが知られているウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin、BSA）と、氷再結晶化の抑制効果のないポリエチレングリコール（Polyethylene glycol、PEG）を用いて、前記実験の信頼性を確認した。BSAの添加時は凝集が起こらず色の変化がなかったが、PEGの添加溶液は、色の変化が起きた。このことから、凝集が起こったことを確認した（図9）。この実験により、不凍効果の確認が可能なことを証明した。

【0074】

実施例1.1.4 Fmoc-FF、Fmoc-FFX、Fmoc-FFET、Fmoc-FF:FmocFFT=2:1、Fmoc-WFT、Fmoc-WWT、Naph

－ F F T の T H 及び I R I 活性の測定

525 nm で最も強い吸収を示す金粒子が溶液の冷凍／解凍後、特異的に F m o c - W F T 及び F m o c - W W T を添加した場合は凝集現象を示し、吸収ピークが 650 nm で、一部が赤色偏移されたことを確認することができた（図 10）。これは、この 2 つの試料の場合は、他の試料とは異なり、二次構造が β シート形態から外れているため、表面のトレオニン（T h r）、すなわち、氷と結合する残基の規則的な配列が変わるためであると説明することができる。

【0075】

実施例 1. 2 スプラット・アッセイ（splat assay）を用いた I R I 活性の分析

氷結晶の成長抑制効果をより明確に確認するために、I R I（Ice recrystallization inhibition）特性を分析した。氷再結晶化の分析は、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、及び 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 を参照して行った。より具体的には、10 μ L の試料を 1.5 m の高さから、予め -60℃ に冷却したカバーガラスの表面に落として薄い氷膜を生成した。薄い氷膜が形成されたカバーガラスを -20℃ に設定されたペルチェ（Peltier）冷却器に移し、カバーガラスの表面を 5 m i n⁻¹ の速度で -6℃ まで昇温し、試料を 30 分間アニーリングした。暗視野顕微鏡（D F O M）の画像を氷再結晶化の間に撮影し、画像から最も大きい 10 個の粒子を選択して平均値を計算することにより、I R I 活性を評価した。平均最大粒径（mean largest grain size、M L G S）の分析は、3 回繰り返し実験により行った。

【0076】

F m o c - F F T、F m o c - F F V、F m o c - F F A 及び F m o c - F F S は、I R I 効果を持つことを確認した。凍結後の解凍時、氷再結晶の過程から得られた D F O M 画像（図 12 a）を定量分析することにより、I R I 効果を決定した。最も高い I R I 活性を示したのは F m o c - F F T であり、その次には、F F A、F F V 及び F F S の順に I R I 活性があることを示した。このことから、親水性および疎水性の残基の両方が存在することが凍結抑制活性において重要なことを確認した。つまり、親水性基は、水と水素結合を形成し、疎水性基は、間に水を閉じ込める方法で氷の成長を抑制できると考えられる。

【0077】

F m o c - F E F E T ナノフィブリルの場合は、F m o c - F F T と比較して、同等または少し高い I R I 効果を有することを確認することができた。角錐面との結合を誘導した F m o c - F F と F m o c - F F T を共組織化したナノフィブリルの場合は、より少し高い I R I 効果を有することを確認することができた（図 13）。

【0078】

また、F m o c - F F T の F m o c をナフタレンで置換した N a p h - F F T、および少なくとも 1 つのフェニルアラニンをトリプトファン、すなわち疎水性アミノ酸で置き換えた F m o c - W F T 及び F m o c - W W T の場合も、いずれも I R I の効果を有することが示された（図 14）。

【0079】

実施例 2. 幹細胞および生殖細胞に対する毒性の評価及び凍結保存の効果

実施例 2. 1 細胞実験方法

実施例 2. 1. 1 動物

C 5 7 B L / 6 J マウス（OrientBio Korea）を精子ドナー（12～15 週齢）および卵子ドナー（8～10 週齢）として用いた。C 5 7 B L / 6 をベースとして遺伝的に変異

したマウスの10種を体外受精 (In Vitro Fertilization、IVF) および胚移植に用いた。ICRマウス (8~10週齢、SLC JAPAN) を2細胞胚の受容体として使用した。

【0080】

実施例2.1.2 培地

精子を凍結保存するために、本発明に係る凍結保存剤が添加された100mM L-グルタミン又は脱脂乳を含有する変更された18%ラフィノースペンタハイドレート/3%脱脂乳 (Difco、Becton Dickinson) 溶液を製造した。IVFの過程では、HTF (human tubal fluid) 培地を使用し、2細胞胚を胚盤胞ステップまで培養する間には、PSOM (potassium simplex optimized medium) を使用した。

【0081】

実施例2.1.3 精子の凍結及び解凍

60μLで分注された精子凍結保存溶液を35mmの培養皿に入れ、パラフィンオイルで覆った。雄マウスを頸部転位で犠牲にした後、精巣上体尾を除去して断片に分けた。凍結保存溶液に移す前に、顕微鏡で観察しながらすべての脂肪及び血液を除去した。培養皿を37℃で3分間維持し、毎分丁寧に攪拌して組織から精子が分散されるようにした。精子を準備する間、凍結用ストロー (freezing straw) に100μLの凍結保存溶液および15mmの空気を1mLの注射器を用いて注入した。精子懸濁液を凍結ストローに注入し、両端を密封した。密封されたストローを凍結用容器に移し、保存のために液体窒素に入れた。IVF実験前に試料を液体窒素から取り出し、37℃の恒温水槽で10分間解凍した。

【0082】

実施例2.1.4 体外受精

成体雌マウスに7.5IUのウマ絨毛性性腺刺激ホルモンを腹腔内注射して過排卵を誘導した。48時間後に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin、hCG) を7.5IU注入した。15時間後、マウスを犠牲にして輸卵管を迅速に除去し、パラフィンオイルが入れられた受精用の皿に移した。その後、2匹~3匹の雌マウスのらっぱ管膨大部から4~6個の卵子卵丘複合体を得、卵子にHTF培地90μLを加えた。

【0083】

様々な条件下で凍結された精子を解凍させ、卵子を含有するIVFドロップ (drop) に添加し、37℃で培養した (最終的な運動型精子の濃度: 200-400 sperm/μL)。6時間後、受精された卵子をHTFドロップで3回洗浄した。受精から24時間後、全卵子数に対する2細胞胚の合計数を百分率にして受精率を求めた。

【0084】

実施例2.1.5 胚培養及び着床

IVFを行った後、2細胞胚を胚盤胞ステップで培養する群と、ICR雌の輸卵管に着床させる群に分類した。出産後、子の数を記録した。

【0085】

実施例2.1.6 統計的分析

2つの群間の比較には、Student's t検定を用い、多数の群の比較には、一方または双方のANOVAsを用いた。すべてのデータは、平均±SEMで表記した。*は、統計的に有意なレベルを示す (*、 $P < 0.05$ 、and **、 $P < 0.01$)。 $P < 0.05$ は、統計的に有意なものと見なした。

【0086】

実施例2.1.7 マウス胚性幹細胞の培養

マウスES細胞を0.1%ゼラチン (Sigma) がコーティングされた60mm細胞培養皿で、分化を防ぐための2mM L-グルタミン (Mediatech Inc)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Mediatech Inc)、15%熱不活性化された牛胎児血清 (Hyclone)、20mM HEPES-pH 7.3 (Cellgro)、0.1mM MEM非必須アミノ酸 (Cellgro)、0.1mM 2-メルカプトエタノール (Sigma)、及び1000U/mL L

10

20

30

40

50

I F (Millipore) が添加された D M E M (Hyclone) 培地で培養した。

【0087】

実施例 2. 1. 8 マウス胚性幹細胞の生存率の分析

マウス E S 細胞を前記の様々な凍結保存溶液が入れられた 96 ウェルプレートでウェル当たり 8×10^4 細胞ずつ接種した。9 時間後、C C K - 8 試薬を添加し、E L I S A R e a d e r (TECAN) を用いて蛍光強度を測定した。

【0088】

実施例 2. 1. 9 マウス胚性幹細胞の凍結及び解凍

トリプシン化されたマウス E S 細胞 $250 \mu\text{L}$ 、F B S $200 \mu\text{L}$ 及び凍結保存溶液 $50 \mu\text{L}$ ($0.005 \mu\text{M}$ 、 $0.01 \mu\text{M}$ 、 $0.05 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$) を急速冷凍庫で 2 日間冷凍した後、L N 2 タンクで保存した。解凍は 37°C の恒温水槽で行った。細胞冷凍ストックの混合物は、 15 mL チューブの 4.5 mL 培地に接種し、 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。細胞ペレットに 1 mL 培地を添加し、6 ウェルプレートに接種した。

【0089】

実施例 2. 1. 10 クリスタルバイオレット染色

マウス E S 細胞を $2.5 \mu\text{M}$ ~ $10 \mu\text{M}$ 凍結保存溶液中で 12 時間培養した。細胞を P B S $500 \mu\text{L}$ で洗浄し、 4% P F A $500 \mu\text{L}$ を 15 分間添加した。固定された細胞を P B S $500 \mu\text{L}$ で 2 回洗浄し、 0.5% クリスタルバイオレット溶液を 30 分間添加した。染色された細胞は、水道水で洗浄した。

【0090】

実施例 2. 2 マウス胚性幹細胞 (Mouse embryonic stem cells、mESC) に対する毒性及び凍結保存効果

F m o c - F F、F m o c - F F T、F m o c - F F A、F m o c - F E F E T 及び F m o c - F F + F m o c - F F T (2 : 1 mole : mole) の幹細胞に対して凍結保存効果を確認した。

【0091】

実施例 2. 2. 1 C C K - 8 分析を用いた m E S C の細胞生存率の評価

化学的凍結防止剤である D M S O を対照群とし、前記 F m o c - F F、F m o c - F F T、F m o c - F F A、F m o c - F E F E T および F m o c - F F + F m o c - F F T (2 : 1 mole : mole) に対して、 $5 \sim 20 \mu\text{M}$ の範囲内で m E S C に処理し、C C K - 8 分析法を用いて細胞生存率を確認した。

【0092】

クリスタルバイオレット染色画像から確認できるように、D M S O は細胞に対して高い毒性を示した。これに対して、本発明に係る F m o c - F F、F m o c - F F T、F m o c - F F A、F m o c - F E F E T 及び F m o c - F F + F m o c - F F T (2 : 1 mole : mole) は、毒性を示さなかった (図 15 a - c)。このことから、本発明に係る材料は、生体適合性材料であることを確認した。

【0093】

また、F m o c - F F V、F m o c - F F S、F m o c - W F T、F m o c - W W T 及び N a p h - F F T もまた、m E S C に対して相当なレベルの細胞生存率を示すことを確認した (図 16)。

【0094】

実施例 2. 2. 2 m E S C に対する凍結保存活性

細胞保管溶液は、本発明に係る試料溶液 10% (v/v)、F B S 40% (v/v)、M e d i a 50% (v/v) で製造した。それを急速冷凍庫を用いて -80°C で凍結させた後 2 日間細胞を保管し、液体窒素タンクに 2 日以上保管した後、解凍して実験に用いた。また、L I F (leukemia inhibitory factor) と共に処理して細胞を培養することにより、幹細胞の分化能を確認した。対照群は、本発明に係る試料の代わりに精製水を添加した以外は、いずれも同様な条件で培養して分化させた。

【0095】

10

20

30

40

50

本発明に係る Fmoc-FF、Fmoc-FFT、Fmoc-FFA、Fmoc-FEFT および Fmoc-FF + Fmoc-FFT (2:1 mole:mole) を用いて凍結及び解凍する場合には、mESC の生存および増殖が円滑に行われるのに対し、対照群の場合には、ほとんどの細胞が死滅することが確認された (図 17 a)。また、mESC の細胞分化を 4 日後まで確認したところ (図 17 b)、本発明に係る材料は、幹細胞の凍結保存剤として使用でき、また高濃度でも細胞分化が良好に起こることを確認した (図 18)。

【0096】

実施例 2.3 生殖細胞精子 (sperm) の凍結保存効果

精子を 3% 脱脂乳；及び Fmoc-FF、Fmoc-FFT、Fmoc-FFA、Fmoc-FFS、Fmoc-FFV、Fmoc-WFT、Fmoc-WWT、Naph-FFT、または Fmoc-FF + Fmoc-FFT (2:1 mole:mole) と共に前記の実施例 2.2.2 の方法により凍結及び解凍した後、卵子に体外受精 (IVF, in vitro fertilization) して胚細胞の生成有無を確認することにより、凍結及び解凍された生殖細胞が生殖機能を維持するかを確認した。また、マウスに直接的に受精卵を移植することにより、凍結保存された精子が本来の機能を維持するののかについて検討した。

【0097】

まず、共組織化されたファイバー材料、Fmoc-FF + Fmoc-FFT (2:1 mole:mole) および 3% 脱脂乳で精子を凍結させた後、卵子に受精させて形成された受精卵 (fertilized egg) の数を確認した。2.5~7.5 μ M で 70% 以上、2.5~10 μ M で 50% 以上の受精卵が成功的に形成されたことを確認した (図 19)。

【0098】

また、前記本発明に係る 9 つの材料に対して、10~20 μ M を含む 3% 脱脂乳で精子を凍結し、卵母細胞に注入した後、接合体の成長 (Zygote Development) 過程で 2-細胞胚を分離した。その後、胚盤胞 (Blastosysts) への成熟過程を確認することにより、凍結保存効果を確認しようとした (図 20)。すべてのサンプルは、解凍した精子を卵子に受精する際、60% 以上の割合で 2-細胞胚が形成された。特異的に Fmoc-WWT の場合は、77% 以上の高効率で 2-細胞胚が生成されたことを確認した。分離された 2-細胞胚の胚盤胞の生成率は、いずれも 70% 以上を示した。特に角錐面と結合を誘導した、共組織化された Fmoc-FF + Fmoc-FFT (2:1 mole:mole) の場合は、70% 以上の割合で 2-細胞胚を形成し、92% 以上が胚盤胞を形成することを確認した。これは氷の成長を抑制するとともに、生成された氷の形状が針状ではない球状である氷の成長過程を誘導するためであると判断した。

【0099】

胚盤胞は、受精卵が子宮壁に着床するときの形態であるので、60 個の 2-細胞胚を 3 匹の雌マウス (C57BL/6) の子宮に注入したところ、生まれたマウスのうち 50~60% のマウスが健康に生存することを確認した (図 21)。

【0100】

実施例 3. 食品に対する結氷制御効果

Fmoc-FFT が食品の凍結保存剤として使用可能であるかを判断するために、牛肉 (図 22 a) に Fmoc-FFT を添加した後、-20℃ で 1 日間冷凍し、室温で解凍した後、SEM 画像を観察した (図 22 b 及び d)。Fmoc-FFT を添加していない場合は、組織の表面が非常に荒くて大きな穴が発見されるのに対し (図 22 b)、Fmoc-FFT を添加した場合は、組織の表面が非常に滑らかで、組織の間の大きな穴があまり発見されなかった (図 22 d)。

【0101】

凍結及び解凍後の牛肉組織を確認するために、Fmoc-FFT を水に添加し、-20℃ で凍らせた後、氷の再結晶過程を光学顕微鏡で観察したところ、Fmoc-FFT を添加した場合は (図 22 e)、Fmoc-FFT を添加していない場合 (図 22 c) と比較して、再結晶氷の大きさが顕著に小さいことを確認した。

【0102】

10

20

30

40

50

また、組織の変化をより詳細に確認するために、解凍した組織を急速に液体窒素で凍らせて -20°C を維持したまま切り、内部組織を観察した。Fmoc-FFTを肉に添加した場合（図22eの右）は、Fmoc-FFTを添加していない場合（図22cの右）と比較して、再結晶氷の大きさが顕著に小さいことを確認した。Fmoc-FFTを添加していない場合は、組織の穴の大きさが $22 \pm 8.6 \mu\text{m}$ であり、添加した場合は、 $5 \pm 2.3 \mu\text{m}$ であった。

【0103】

例えば、特許請求の範囲の構築目的上、別添の特許請求の範囲は多少なりともその文字通りの意味より狭く構築されているものではなく、したがって明細書の代表的な実施形態が特許請求の範囲として読み取られることはない。したがって、本発明は説明のために記載されており、特許請求の範囲の範囲に限定を加えるものではないと理解される。したがって、本発明は、別添の特許請求の範囲によってのみ制限される。本出願で引用した全ての刊行物、交付された特許、特許出願、書籍及び学术论文はそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

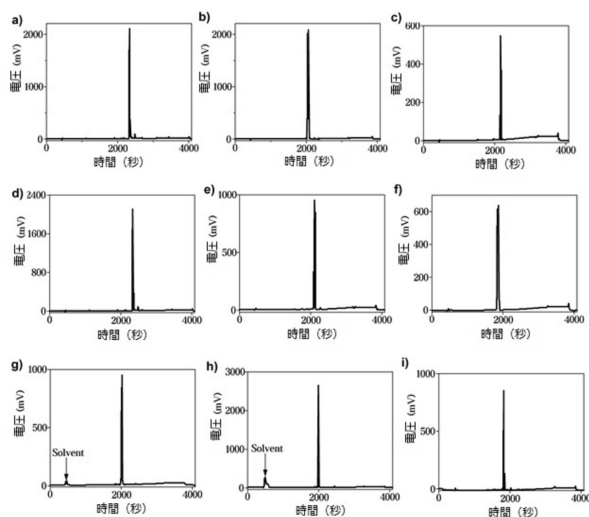
30

40

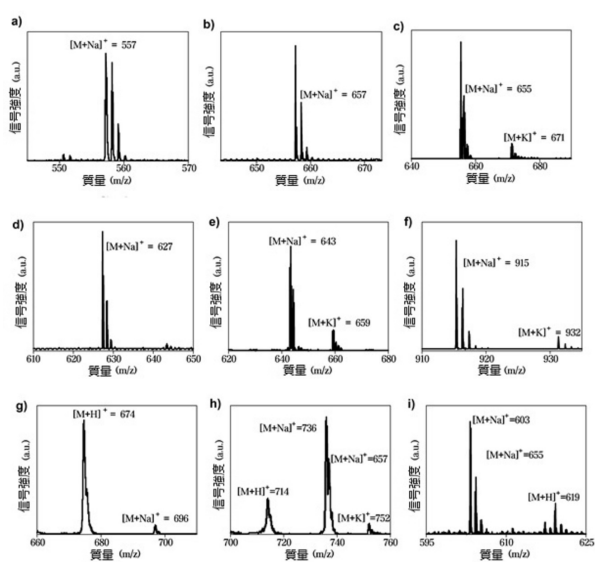
50

【図面】

【図 1】

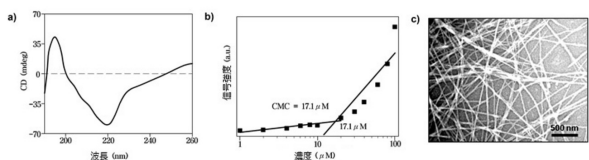


【図 2】

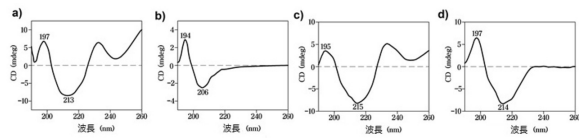


10

【図 3】



【図 4】



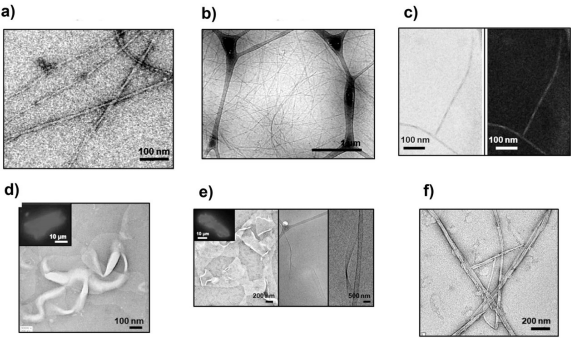
20

30

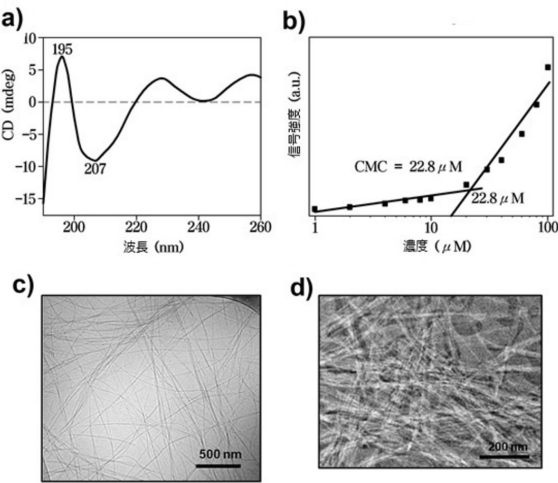
40

50

【図 5】

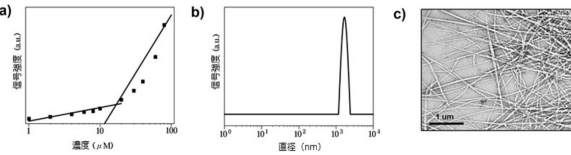


【図 6】

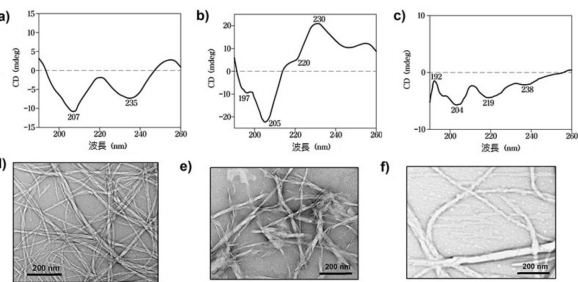


10

【図 7】



【図 8】



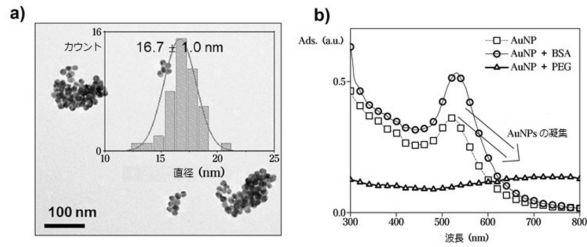
20

30

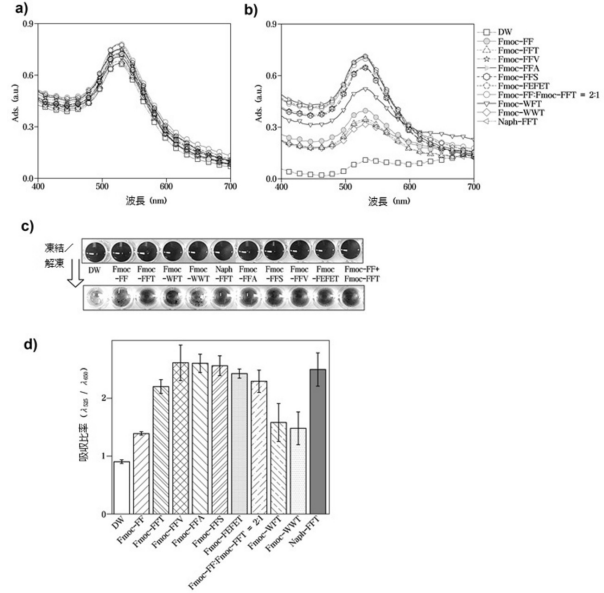
40

50

【図 9】

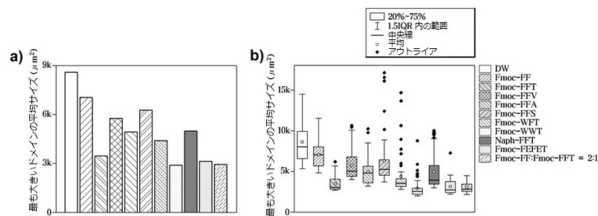


【図 10】

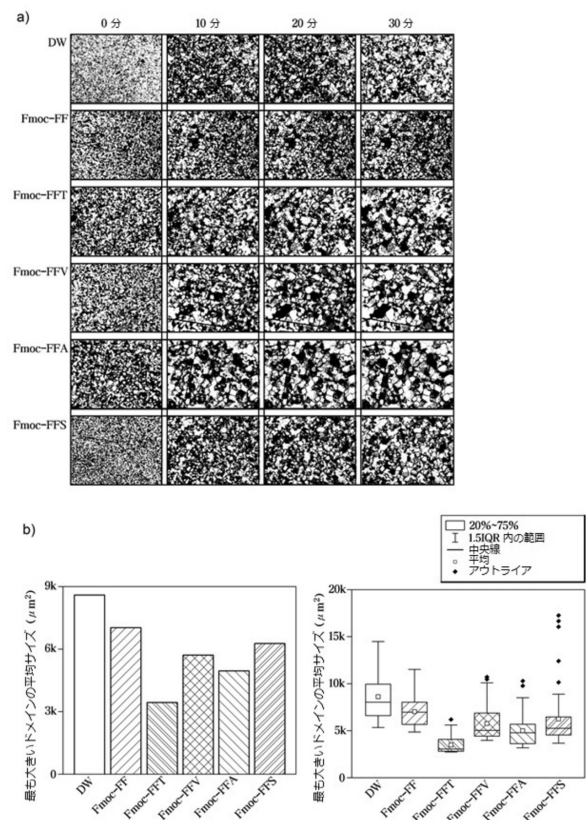


10

【図 11】



【図 12】

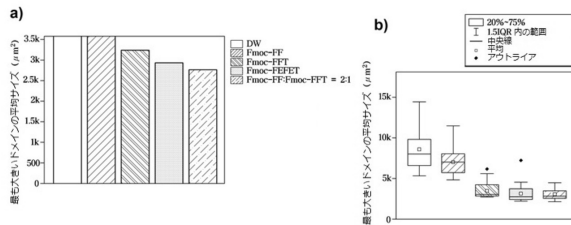


30

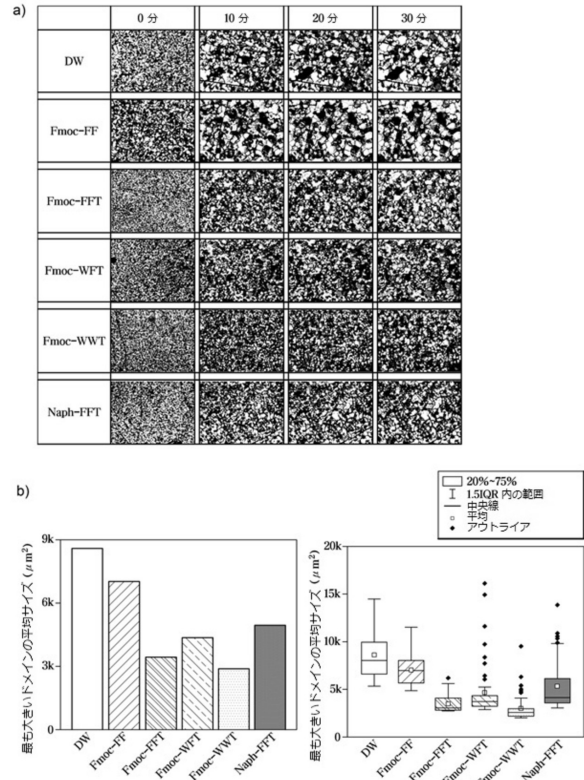
40

50

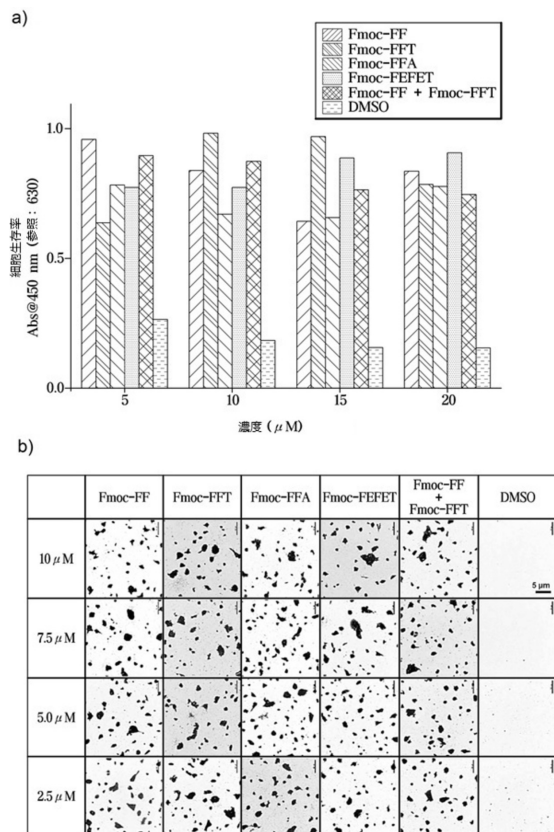
【図 13】



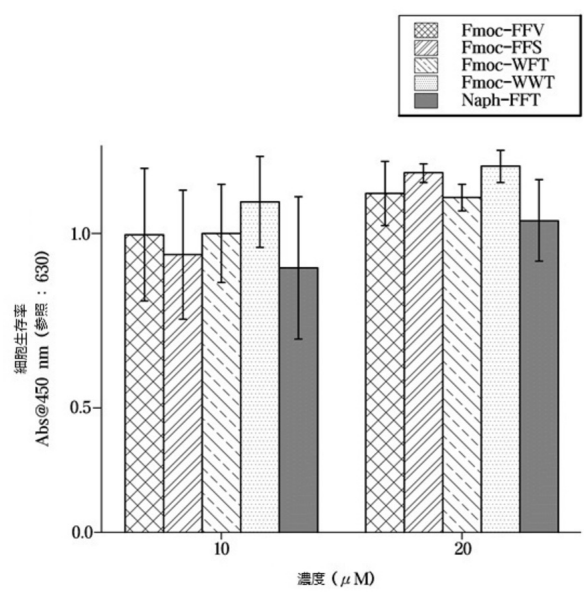
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

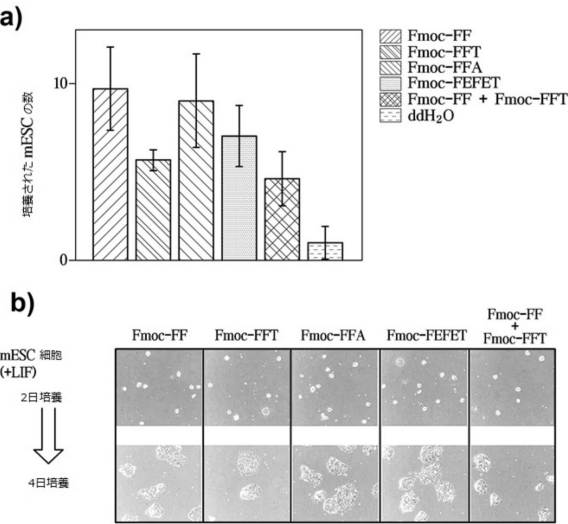
20

30

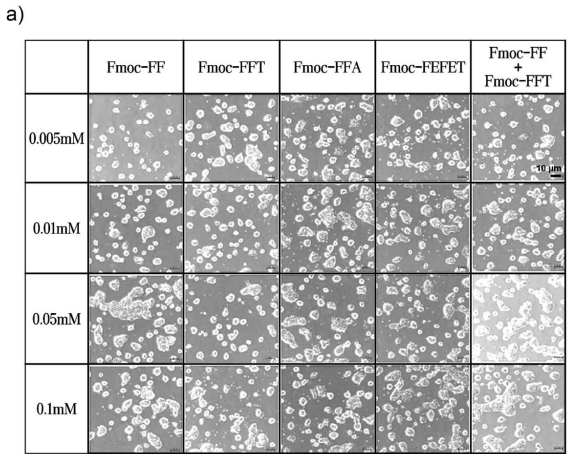
40

50

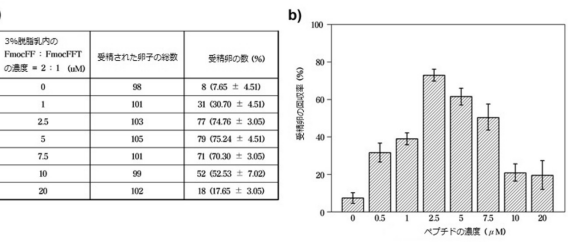
【図 17】



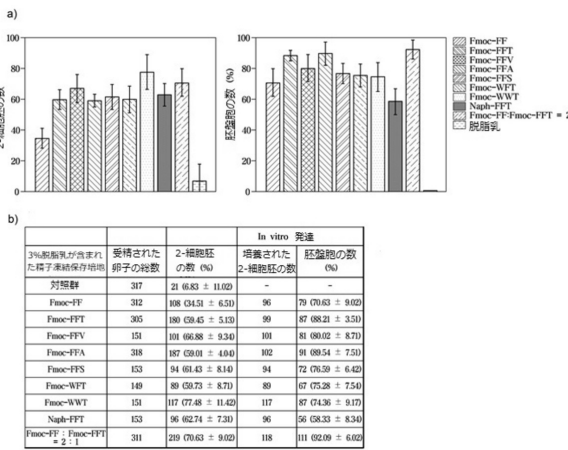
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

20

30

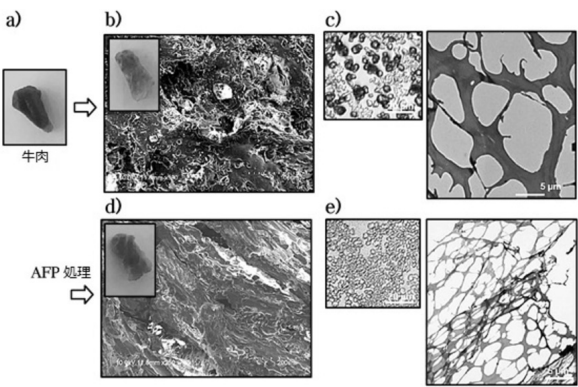
40

50

【図 2 1】

3%脱脂乳が含まれた精子凍結保存培地	In vitro 発達		In vivo 発達		
	培養された2-細胞胚の数	胚発生の数 (%)	移植された2-細胞胚の数	代理母の数	生存した子の数 (%)
Control	-	-	-	-	-
Fmoc-PFT	99	87 (88.21 ± 3.51)	60	3	29 (48.89 ± 3.51)
Fmoc-PFA	102	91 (89.54 ± 7.51)	60	3	31 (52.22 ± 4.51)
Fmoc-PF-Fmoc-PFT = Z1	118	111 (92.09 ± 6.02)	60	3	36 (60.56 ± 2.52)

【図 2 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100091627
弁理士 朝比 一夫
- (72)発明者 リ, ウン ジ
大韓民国 04148 ソウル, マボーク, ベクベオムーロ, 170, 102-1103, (ゴンドクードン, ゴンドク ザ シャープ アパートメント)
- (72)発明者 リ, チャン ワン
大韓民国 06636 ソウル, セオチョーグ, セオチョーダエロ 64-ギル, 83, 101-702 (セオチョードン, ワールド メリディアン)
- (72)発明者 アン, ドン ジュン
大韓民国 06637 ソウル, セオチョーグ, サイムダンーロ 19-ギル, 10, 102-802 (セオチョードン, セオチョ ヒュンダイ アパートメント)
- (72)発明者 キム, イン ヒェ
大韓民国 54043 ジェオラブクード, グンサンーシ, ジョチョンーロ, 214, 903-1502 (ギョンガムードン, ギョンガム ジェイル オー2 グランデ アパートメント)
- (72)発明者 リ, イェ ダム
大韓民国 03505 ソウル, ウンピョンーグ, ジュンサンーロ 1-ギル, 26, 102-803 (スセクードン, ディーエムシー チョング アパートメント)
- (72)発明者 キム, ハ ヨン
大韓民国 38489 ギョンサンブクード, ギョンサンーシ, ジルリャンーウップ, イリョンーロ, 747, 105-1103 (イアアン ギョンサン ジルリャン アパートメント)
- 審査官 山▲崎▼ 真奈
- (56)参考文献 特表2018-538359 (JP, A)
国際公開第2016/178426 (WO, A1)
特表2017-512829 (JP, A)
特表2008-521879 (JP, A)
国際公開第2012/023486 (WO, A1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)