

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-505024

(P2004-505024A)

(43) 公表日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(51) Int.Cl.⁷

A01N 1/02

F I

A01N 1/02

テーマコード (参考)

4H011

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 78 頁)

(21) 出願番号	特願2002-515080 (P2002-515080)	(71) 出願人	500395761
(86) (22) 出願日	平成13年5月9日 (2001.5.9)		ウイスコンシン アラムニ リサーチ フ
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月22日 (2003.1.22)		ァンデーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/014939		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53
(87) 国際公開番号	W02002/009515		707-7365 マディソン ノース
(87) 国際公開日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		ウォルナット ストリート 614 ビー
(31) 優先権主張番号	09/625,735		オーボックス 7365
(32) 優先日	平成12年7月26日 (2000.7.26)	(74) 代理人	100059959
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 稔
		(74) 代理人	100067013
			弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的物質用の保存及び貯蔵媒体

(57) 【要約】

(1) 少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物 (混合物中のポリヒドロキシ化合物の合計量は混合物が水溶液である場合には混合物の約5質量%から約60質量%までであり、又、混合物が固体形態である場合には約10質量%から約95質量%までである)、及び(2) リン酸イオン (混合物中のリン酸イオンの合計量はリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシ基のモル比が約0.025から約0.625までであるような量である) を含む生物学的物質を保存する際の使用のための保護剤混合物; (1) 生物学的物質、(2) 少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物 (媒体中のポリヒドロキシ化合物の合計量は媒体の約5質量%から約60質量%までである)、及び(3) リン酸イオン (混合物中のリン酸イオンの合計量はリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシ基のモル比が約0.025から約0.625までであるような量である) を含む保存媒体; 保存媒体の保存方法; 及び得られる保存された生物学的物質組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的物質を保存するための水性保存媒体であって、以下の成分、

(a) 生物学的物質、

(b) 少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物であって、前記媒体中の合計量が、該媒体の約 5 質量% から約 60 質量% までであるポリヒドロキシ化合物、及び

(c) リン酸イオンであって、該媒体中の合計量が、リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約 0.025 から約 0.625 までであるような量であるリン酸イオン、

を含むことを特徴とする水性保存媒体。

10

【請求項 2】

前記媒体の pH が、約 5 から約 10 までである請求の範囲第 1 項記載の水性保存媒体。

【請求項 3】

前記ポリヒドロキシ化合物が、単糖類、二糖類、及び多糖類からなる群から選ばれる請求の範囲第 1 項記載の水性保存媒体。

【請求項 4】

前記ポリヒドロキシ化合物が、トレハロースである請求の範囲第 3 項記載の水性保存媒体。

【請求項 5】

前記媒体中のポリヒドロキシ化合物の合計量が、該媒体の約 10 質量% から約 30 質量% までである請求の範囲第 1 項記載の水性保存媒体。

20

【請求項 6】

前記媒体中のポリヒドロキシ化合物の合計量が、該媒体の約 10 質量% から約 30 質量% までである請求の範囲第 3 項記載の水性保存媒体。

【請求項 7】

リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が、約 0.0375 から約 0.625 までである請求の範囲第 1 項記載の水性保存媒体。

【請求項 8】

前記生物学的物質が、細胞、タンパク質、及び酵素からなる群から選ばれる請求の範囲第 1 項記載の水性保存媒体。

30

【請求項 9】

生物学的物質を保存するための水性保存媒体であって、以下の成分、

(a) 生物学的物質、

(b) トレハロースであって、前記媒体の約 5 質量% から約 60 質量% までの量で存在するトレハロース、及び

(c) リン酸イオンであって、該媒体中のリン酸イオンの合計量が、リン酸イオン対トレハロースのモル比が約 0.2 から約 5 までであるような量であるリン酸イオン、

を含むことを特徴とする水性保存媒体。

【請求項 10】

前記トレハロースが、該媒体の約 10 質量% から約 30 質量% までの量で存在する請求の範囲第 9 項記載の水性保存媒体。

40

【請求項 11】

前記 pH が、約 5 から約 10 までである請求の範囲第 10 項記載の水性保存媒体。

【請求項 12】

リン酸イオン対トレハロースの前記モル比が、約 0.3 から約 5 までである請求の範囲第 9 項記載の水性保存媒体。

【請求項 13】

前記生物学的物質が、細胞、タンパク質、及び酵素からなる群から選ばれる請求の範囲第 9 項記載の水性保存媒体。

【請求項 14】

50

保存された生物学的物質組成物の調製方法であって、以下の工程、

(a) 水性保存媒体を生成する工程であって、前記媒体が、(i)生物学的物質、(ii)少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物であって、前記媒体中の合計量が、該媒体の約5質量%から約60質量%までであるポリヒドロキシ化合物、及び(iii)リン酸イオンであって、該媒体中の合計量が、リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約0.025から約0.625までであるような量であるリン酸イオン、

を含む工程、そして

(b) 少なくとも一種の保存方法を使用して水性保存媒体を保存する工程、
を有することを特徴とする方法。

10

【請求項15】

前記保存方法が、凍結、凍結乾燥、周囲空気乾燥、真空乾燥、及び噴霧乾燥からなる群から選ばれた一種以上の方法である請求の範囲第14項記載の方法。

【請求項16】

前記媒体のpHが、約5から約10までである請求の範囲第14項記載の方法。

【請求項17】

前記ポリヒドロキシ化合物が、単糖類、二糖類、及び多糖類からなる群から選ばれる請求の範囲第14項記載の方法。

【請求項18】

前記ポリヒドロキシ化合物が、トレハロースである請求の範囲第14項記載の方法。

20

【請求項19】

前記媒体中の前記ポリヒドロキシ化合物の合計量が、該媒体の約10質量%から約30質量%までである請求の範囲第14項記載の方法。

【請求項20】

前記媒体中の前記ポリヒドロキシ化合物の合計量が、該媒体の約10質量%から約30質量%までである請求の範囲第17項記載の方法。

【請求項21】

リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基の前記モル比が、約0.0375から約0.625までである請求の範囲第14項記載の方法。

【請求項22】

前記生物学的物質が、細胞、タンパク質、及び酵素からなる群から選ばれる請求の範囲第14項記載の方法。

30

【請求項23】

保存された生物学的物質組成物の調製方法であって、以下の工程、

(a) 水性保存媒体を生成する工程であって、前記媒体が、(i)生物学的物質、(ii)トレハロースであって、該媒体中のポリヒドロキシ化合物の合計量が、該媒体の約5質量%から約60質量%までであるトレハロース、及び(iii)リン酸イオンであって、該媒体中の合計量が、リン酸イオン対トレハロースのモル比が約0.2から約5までであるような量であるリン酸イオン、

を含む工程、そして

(b) 少なくとも一種の保存方法を使用して水性保存媒体を保存する工程、
を有することを特徴とする方法。

40

【請求項24】

前記保存方法が、凍結、凍結乾燥、周囲空気乾燥、真空乾燥、及び噴霧乾燥からなる群から選ばれた一種以上の方法である請求の範囲第23項記載の方法。

【請求項25】

前記トレハロースが、該媒体の約10質量%から約30質量%までの量で存在する請求の範囲第23項記載の方法。

【請求項26】

前記pHが、約5から約10までである請求の範囲第25項記載の方法。

50

【請求項 27】

リン酸イオン対トレハロースの前記モル比が、約 0.3 から約 5 までである請求の範囲第 26 項記載の方法。

【請求項 28】

前記生物学的物質が、細胞、タンパク質、及び酵素からなる群から選ばれる請求の範囲第 23 項記載の方法。

【請求項 29】

生物学的物質の保存用の固体形態の保護剤混合物であって、以下の成分、

(a) 少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物であって、前記混合物中の合計量が、該混合物の約 10 質量% から約 95 質量% までであるポリヒドロキシ化合物、及び

10

(b) リン酸イオンであって、該混合物中の合計量が、リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約 0.025 から約 0.625 までであるような量であるリン酸イオン、

を含むことを特徴とする保護剤混合物。

【請求項 30】

前記混合物中の該ポリヒドロキシ化合物の合計量が、該混合物の約 20 質量% から約 95 質量% までである請求の範囲第 29 項記載の保護剤混合物。

【請求項 31】

前記ポリヒドロキシ化合物が、単糖類及び多糖類からなる群から選ばれる請求の範囲第 29 項記載の保護剤混合物。

20

【請求項 32】

前記ポリヒドロキシ化合物が、トレハロースである請求の範囲第 31 項記載の保護剤混合物。

【請求項 33】

リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基の前記モル比が、約 0.0375 から約 0.625 までである請求の範囲第 29 項記載の保護剤混合物。

【請求項 34】

生物学的物質の保存用の固体形態の保護剤混合物であって、以下の成分、

(a) トレハロースであって、前記混合物中に、該混合物の約 10 質量% から約 95 質量% までの量で存在するトレハロース、及び

30

(b) リン酸イオンであって、該混合物中の合計量が、リン酸イオン対トレハロースのモル比が約 0.2 から約 5 までであるような量であるリン酸イオン、

を含むことを特徴とする保護剤混合物。

【請求項 35】

前記トレハロースが、該混合物の約 20 質量% から約 95 質量% までの量で存在する請求の範囲第 34 項記載の保護剤混合物。

【請求項 36】

リン酸イオン対トレハロースの前記モル比が、約 0.3 から約 5 までである請求の範囲第 34 項記載の保護剤混合物。

【請求項 37】

水溶液の形態の保護剤混合物であって、以下の成分、

(a) 少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物であって、前記混合物中の合計量が、該混合物の約 5 質量% から約 60 質量% までであるポリヒドロキシ化合物、及び

40

(b) リン酸イオンであって、前記混合物中の合計量が、リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約 0.025 から約 0.625 までであるような量であるリン酸イオン、

を含むことを特徴とする保護剤混合物。

【請求項 38】

前記混合物中の該ポリヒドロキシ化合物の合計量が、該混合物の約 10 質量% から約 30 質量% までである請求の範囲第 36 項記載の保護剤混合物。

50

【請求項 39】

前記ポリヒドロキシ化合物が、単糖類及び多糖類からなる群から選ばれる請求の範囲第 37 項記載の保護剤混合物。

【請求項 40】

前記ポリヒドロキシ化合物が、トレハロースである請求の範囲第 39 項記載の保護剤混合物。

【請求項 41】

リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基の前記モル比が、約 0.0375 から約 0.625 までである請求の範囲第 37 項記載の保護剤混合物。

【請求項 42】

水溶液の形態の保護剤混合物であって、以下の成分、

(a) トレハロースであって、前記混合物中に、該混合物の約 5 質量% から約 60 質量% までの量で存在するトレハロース、及び

(b) リン酸イオンであって、前記混合物中の合計量が、リン酸イオン対トレハロースのモル比が約 0.2 から約 5 までであるような量であるリン酸イオン、を含むことを特徴とする保護剤混合物。

【請求項 43】

前記トレハロースが、該混合物の約 10 質量% から約 30 質量% までの量で存在する請求の範囲第 42 項記載の保護剤混合物。

【請求項 44】

リン酸イオン対トレハロースの前記モル比が、約 0.3 から約 5 までである請求の範囲第 42 項記載の保護剤混合物。

【請求項 45】

請求の範囲第 14 項又は第 23 項記載の方法により製造された保存された生物学的物質組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は一般に凍結、乾燥、及び凍結乾燥による生物学的物質の保存及び安定化、更に詳しくは生物学的物質を保存するための保護剤混合物及び水性保存媒体、並びに生物学的物質の保存方法及び保存された生物学的物質組成物それ自体に関する。

【0002】

(背景技術)

生物学的分子の構造及び機能の保存は生物学、生化学、及び医療に基本的に重要である。生物学的物質、例えば、タンパク質、酵素、細胞、組織、核酸、精液、血液及びその成分、哺乳類の器官、及び食品はその後の使用のためにしばしば貯蔵され、保存される必要がある。これらの生物学的物質の保存は通常凍結もしくは乾燥、又はその二つの方法の組み合わせにより達成される。幾つかの普通使用される乾燥技術がある：移動するガス流への蒸発による乾燥（周囲空気乾燥）、周囲温度における真空下の乾燥（真空乾燥）、又は液滴の微細なミストを温かい空気と接触させることによる乾燥（噴霧乾燥）。乾燥が有害又は不要である場合に、簡単な凍結がしばしば行なわれる。或る種の生物学的物質は、サンプルが最初に凍結され、次いで真空下で低温で乾燥される 2 工程方法である凍結乾燥により最良に保存される。

殆どの生物学的物質の構造及び機能はそれらの水性環境に依存する。それ故、凍結方法及び乾燥方法から生じるそれらの水性環境の変化がしばしば生物学的物質に劇的な結果を有し得る。更に、凍結乾燥は凍結及び乾燥の両方のためのストレスを組み合わせる。この方法の凍結工程は望ましくない副作用、例えば、タンパク質及び酵素の変性、並びに細胞の破裂を有し得る。これらの作用はこれらの物質中の氷の結晶化により誘発された機械的ストレス、化学的ストレス、及び浸透圧ストレスから生じる。結果として、再水和後の生物学的物質の活性は完全に失われ、又はその物質が最早その意図される目的に有益ではない

10

20

30

40

50

ような有意な程度に失われる。

【0003】

再構成又は再水和後の副作用を防止又は低減するために、保護剤、例えば、低温保護剤又は凍結乾燥保護剤 (lyoprotectant) (凍結乾燥) が使用される。このような保護剤が有効であるためには、それらが保存方法中に見られる濃度で生物学的物質に無毒性である必要があり、しかも水及び生物学的物質と有利に相互作用する必要がある。種々の保護剤が種々の成功の程度で当業界で使用されていた。これらとして、魚タンパク質、或る種のポリマー、スキンミルク、グリセロール、ジメチルスルホキシド、及びトレハロースの如き二糖類が挙げられる。不運なことに、好適な保護剤及び低温保存プロトコルは制限された数の系のみについて開発されていた。

10

【0004】

蔗糖及びトレハロースの如き二糖類は天然の低温保護剤である。トレハロースが特に魅力的な低温保護剤である。何とならば、それは干ばつの期間中に停止された活気の状態に留まる植物及び動物から実際に単離されていたからである。トレハロースは周囲空気乾燥及び凍結乾燥の両方で種々の生物学的物質に有効な保護剤であることが示されていた。研究は、トレハロースの存在下で乾燥されたリポソームが再水和後にそれらの機能上及び構造上の保全性の両方を保持することを示していた (Crowe, J. H., Crowe, L. M. 及び Mouradian, R., Cryobiology, 20, 346-356 (1983) を参照のこと)。米国特許第 5,556,771 号明細書は逆転写酵素及び RNA ポリメラーゼを保存するためのトレハロース、又はポリビニルピロリドンと組み合わせてのトレハロースの使用を開示している。米国特許第 5,512,547 号明細書はボツリナム神経毒素を保存するためのトレハロースの使用を開示している。同様に、米国特許第 4,891,319 号明細書はトレハロースを使用してタンパク質及びその他の生物学的巨大分子、例えば、酵素、血清、血清補体、抗体、抗原、蛍光タンパク質及びワクチン成分を保存する方法を開示している。詳しくは、巨大分子及びトレハロースを含む水性混合物が水性系の 0.05 質量% から約 20 質量% までのトレハロースの存在下で凍結より上の温度で乾燥される。

20

【0005】

しかしながら、唯一の低温保護剤としてのトレハロースの使用と関連する幾つかの欠点がある。多くの生物学的物質を凍結乾燥により保存するために、多量のトレハロースが使用される必要がある。所定の保存媒体の 60 質量% より大きいトレハロースの濃度が時折必要である。これはコストがかかる。更に、高濃度のトレハロースは系中のその他の溶質の溶解性を低下する。

30

こうして、ポリマーゲル化剤、例えば、カルボキシメチルセルロース又はカルボキシエチルセルロースと組み合わせてトレハロースを使用することが提案されていた。ポリマーと組み合わせてのサッカリドが純粋なトレハロースよりも有効な低温保護剤であることがヒト血液について示唆されていた。米国特許第 5,171,661 号明細書; Sutton, R. L., J. Chem. Soc. Faraday Trans., 87, 3747 (1991) を参照のこと。不運なことに、ゲル化剤の有益な効果を確かめようとする試みは成功しなかった (G. Spieles, I. Heschel 及び G. Rau, Cryo-Letters 17, 43-52 (1996), J. H. Crowe, A. E. Oliver, F. A. Hoekstra 及び L. M. Crowe, Cryobiology 35, 20-30 (1997))。更に、この保護組み合わせは医療目的に使用し得ない。何とならば、ポリマーゲル化剤は人体により良く受け入れられないからである。結果として、この組み合わせは非常に有益ではなく、トレハロース単独の使用よりもあったとしても多くの実用的な改良を与えない。

40

【0006】

トレハロースの使用と関連する別の、更に重大な問題はトレハロース単独を使用して保存された生物学的物質、特に周囲温度以上の温度及び/又は湿った環境で貯蔵されたものが時間の延長された期間にわたって貯蔵安定性ではないことである。換言すれば、トレハロ

50

ースで保存された生物学的物質が、貯蔵条件の湿度及び温度に応じて、数時間又は数日のうちにそれらの活性を失い得る。

それ故、現在では、トレハロースによる凍結乾燥は広範囲の貯蔵条件にわたって生物学的物質、例えば、タンパク質、酵素、細胞、組織、核酸、精液、血液及びその成分、哺乳類の器官、並びに食品の延長された貯蔵期間についての使用が制限されている。何とならば、その物質が分解し、再構成後に十分な活性を有しないからであろう。実用的な観点から、これは医療製品には明らかに受け入れられない。何とならば、物質を最初の場所で保存することの理由の一つが貯蔵安定性製品を提供することであるからである。

【0007】

種々の室温乾燥技術の多くが現在有効に使用し得ない。これらの方法は、凍結乾燥よりも複雑ではなく、しかもコストがかからないが、一般に生物学的物質に対し一層破壊性である。多くの生物学的物質は凍結乾燥が使用される場合よりも周囲温度で行なわれる方法を使用して保存される場合に大きなコンホーメーションの変化及び望ましくない反応を受け易い。結果として、現在知られている保護剤が使用される場合でさえも、多くの再水和された生物学的物質の活性はそれ自体不満足であるとともに、また凍結乾燥により保存される場合よりも有意に小さい。

こうして、広範囲の生物学的物質に有益である保護剤混合物に対する要望がある。凍結乾燥方法及び周囲温度乾燥を伴う乾燥方法の両方に有効に使用し得る保護剤混合物に対する更なる要望が存する。又、現在使用される保護剤混合物よりもコストがかからない保護剤混合物に対する要望がある。最後に、非常に重要なことに、高温及び種々の程度の湿度（これらは物質の輸送及び貯蔵中に見られる）における時間の延長された期間にわたる生物学的物質の保存のための安定な媒体を提供するとともに、再水和後に有意な量の活性を依然として保持する保護剤混合物に対する要望がある。

これらの要望の全てが本発明の保護剤混合物、水性保護媒体及び得られる保存された生物学的物質組成物により満足される。

【0008】

（発明の開示）

生物学的物質の保存用の保護剤混合物であって、（a）少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物（混合物中のポリヒドロキシ化合物の合計量は混合物が水溶液である場合には混合物の約5質量%から約60質量%までであり、又、混合物が固体形態である場合には約10質量%から約95質量%までである）、及び（b）リン酸イオン（媒体中のリン酸イオンの合計量はリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約0.025から約0.625までであるような量である）を含む保護剤混合物は、多種の生物学的物質とともに使用されて水性保存媒体を得ることができることがわかった。次いでこの水性保存媒体は、凍結、凍結乾燥及びその他の乾燥方法、例えば、噴霧乾燥や、真空乾燥、又は周囲空気乾燥を含む、多くの保存方法に使用されて関係する生物学的物質の安定な、保存された組成物を得ることができる。この保存された組成物は周囲温度以上の温度及び/又は相対湿度における時間の延長された期間にわたって安定である。更に、保存された生物学的物質組成物が再水和される場合、保存された生物学的物質の構造上かつ機能上の保全性は生物学的物質がその意図される目的に使用し得るような程度に保持された。それ故、本発明は又上記保存媒体からの保存された生物学的物質組成物の調製方法だけでなく、保存された生物学的物質組成物それ自体を提供する。

【0009】

（発明を実施するための最良の形態）

本発明は、生物学的物質が本発明の保護剤混合物と合わされて水性保存媒体を生成し、これが順に本発明の水性媒体を（1）凍結乾燥、周囲空気乾燥、真空乾燥、及び噴霧乾燥を含む、種々の乾燥技術、又は（2）凍結の如き当業界で知られているその他の保存方法にかけることにより保存された生物学的物質組成物に生成される場合に、生物学的物質が実質的な活性を保持しつつ保存し得るという格別の発見に基づいている。本発明の保護剤混合物は（a）少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物（混合物中のポリヒドロキシ化合物

10

20

30

40

50

の合計量は混合物が水溶液である場合には混合物の約 5 質量% から約 60 質量% までであり、又、混合物が固体形態である場合には約 10 質量% から約 95 質量% までである)、及び (b) リン酸イオン (混合物中のリン酸イオンの合計量はリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約 0.025 から約 0.625 までであるような量である) を含む。本発明の水性保存媒体は (a) 生物学的物質、(b) 少なくとも一種のポリヒドロキシ化合物 (媒体中のポリヒドロキシ化合物の合計量は媒体の約 5 質量% から約 60 質量% までである)、及び (c) リン酸イオン (媒体中のリン酸イオンの合計量はリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約 0.025 から約 0.625 までであるような量である) を含む。

【0010】

10

生物学的物質

広範囲の生物学的物質が本発明の保護剤混合物とともに使用されて本発明の水性保存媒体を生成し得る。次いでこの保存媒体が本発明の方法にかけられて保存された生物学的物質組成物をつくることができる。

これらの生物学的物質として、

- (a) 酵素、例えば、ラクテートデヒドロゲナーゼ及びホスホフラクトキナーゼ、
- (b) タンパク質、例えば、インスリン、
- (c) 血清補体、
- (d) ワクチン、
- (e) 皮膚、静脈及び動脈を含む組織、
- (f) ウイルス、例えば、アデノウイルス、
- (g) 哺乳類の器官、例えば、肝臓、脾臓及び肺、
- (h) 血液、並びに赤血球、白血球及び血小板を含むその成分、
- (i) 原核生物細胞 (細菌を含む) 及び真核生物細胞を含む細胞、
- (j) 精液、
- (k) 核酸、及び脂質小胞を含むその他の生物学的物質、並びに
- (l) 食品、

20

が挙げられるが、これらに限定されない。

以上の特許請求の範囲に記載の本発明の保護剤混合物、水性保存媒体及び方法を使用して特許請求の範囲に記載の本発明の保存された生物学的物質組成物にし得る生物学的物質の非常に多数のうちの幾つかの単なる例示である。その後の使用のための保存が望ましい生物学的物質は保護剤混合物とともに使用されて、保存媒体を生成することができ、次いでこれが本発明の保存方法により保存されて保存された組成物を生成し得る。

30

【0011】

ポリヒドロキシ化合物

本発明に有益なポリヒドロキシ化合物として、天然及び合成の単糖類及び多糖類、その他の炭水化物、並びにポリアルコール及びそれらの誘導体が挙げられる。ここで、“多糖類” は二つ以上のモノサッカリド単位を含むサッカリドと定義される。個々のポリヒドロキシ化合物は単独で、又はその他の型のポリヒドロキシ化合物と組み合わせて使用し得る。多種の有益なポリヒドロキシ化合物から、モノサッカリド及びポリサッカリドの使用が好ましい。サッカリドのうち、二糖類、例えば、トレハロース、マルトース、ラクトース、及び蔗糖が本発明における使用に好ましく、トレハロースが最も好ましい。

40

本発明の保護剤混合物、保存媒体、及び保存された組成物中に存在するポリヒドロキシ化合物の量は使用のために選ばれる特定のポリヒドロキシ化合物、及び生物学的物質だけでなく、保存される生物学的物質の質量に依存する。これは所定の系について調節され、最適化し得る。

【0012】

一般に、ポリヒドロキシ化合物は、混合物が水溶液である場合には、混合物の約 5 質量% から約 60 質量% までの合計量で本発明の保護剤混合物中に存在する。保護剤混合物が固体、例えば、粉末として供給される場合、ポリヒドロキシ化合物は混合物の約 10 質量%

50

から約 9.5 質量 % までの合計量で存在すべきであり、混合物の約 2.0 質量 % から約 9.5 質量 % までの範囲の量が好ましい。保護剤混合物が水溶液である場合、ポリヒドロキシ化合物は混合物中のポリヒドロキシ化合物の合計量が混合物の約 5 質量 % から約 4.0 質量 % までであるような合計量で存在することが好ましく、混合物の約 1.0 質量 % から約 3.0 質量 % の範囲の量が特に好ましい。

同様に、ポリヒドロキシ化合物は水性保存媒体中のポリヒドロキシ化合物の合計量が水性保存媒体の約 5 質量 % から約 6.0 質量 % までであるような量で本発明の保存媒体中に存在すべきである。存在するポリヒドロキシ化合物の合計量は水性保存媒体の約 5 質量 % から約 4.0 質量 % であることが好ましく、水性保存媒体の約 1.0 質量 % から約 3.0 質量 % までの範囲の量が特に好ましい。

10

【0013】

上記範囲は、例えば、保存媒体中の生物学的物質の量及び使用に選ばれた保存方法に応じて変化し得ることが強調されるべきである。

本発明の水性保存媒体中のポリヒドロキシ化合物の上記の量の使用は液体水の部分的又は完全除去後に組成物の約 5 質量 % から約 9.5 質量 % のポリヒドロキシ化合物を有する保存された生物学的物質組成物をもたらすであろう。再度、この量は保存される生物学的物質の質量、存在するリン酸塩の量、及び保存中に系から除去される水の量に依存するであろう。保存された生物学的組成物中のポリヒドロキシ化合物の量は保護剤混合物及び / 又は水性保存媒体中に存在する量から測定し得る。又、保存された生物学的物質組成物中のポリヒドロキシ化合物の量は当業界で知られている分析方法、例えば、カラムクロマトグラ

20

【0014】

リン酸イオン

リン酸イオンのあらゆる源が本発明の保護剤混合物、保存媒体、保存方法、及び保存された組成物に使用し得る。いかなる特別な理論により束縛されたくないが、リン酸イオンはポリヒドロキシ化合物と錯体を生成し、これはリン酸イオンにより架橋された三次元の超分子構造中にポリヒドロキシ化合物の幾つかの分子を含み得る。水性保存媒体は同じ量のポリヒドロキシ化合物単独を含む系よりも極めて高い粘度を有し、保存された生物学的物質組成物はポリヒドロキシ化合物のみを含む組成物よりも高いガラス転移温度 (T_g) を有する。

30

先に記載したように、リン酸イオンは酸及び塩を含むあらゆる源から用意し得る。ナトリウム塩及びカリウム塩の使用が好ましい。カリウム塩が最も好ましい。何とならば、それらが低温で優れた溶解性特性を有し、無水結晶として結晶化するからである。それ故、リン酸イオンはナトリウム塩及び / 又はカリウム塩の使用により用意されることが好ましく、一塩基性リン酸カリウムと二塩基性リン酸カリウムの混合物が特に好ましい。

【0015】

所定の保護剤混合物及び / 又は保存媒体に最適であるリン酸イオンの量は保存すべき特定の生物学的物質、保護剤混合物及び / 又は保存媒体中のポリヒドロキシ化合物の量及び型、並びに系中の生物学的物質の量を含む幾つかの変数に依存する。一般に、リン酸イオンはリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約 0.025 から約 0.625 までであるような合計量で保護剤混合物及び / 又は水性保存媒体中に存在すべきである。リン酸イオンはリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比が約 0.0375 から約 0.625 までであるような量で存在することが好ましい。

40

リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比は保存方法中に実質的に一定に留まり、リン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基の実質的に同じモル比を有する保存された生物学的物質をもたらすであろう。こうして、保存された生物学的物質組成物中に存在するリン酸イオンの量は直接に水性保存媒体中に存在する量ということになる。又、保存された生物学的物質組成物中のリン酸イオンの量は、イオンクロマトグラフィー及びケミルミネセンスを含む、当業界で知られている方法により分析で

50

測定し得る。

【0016】

又、リン酸イオンの有益な量は上記の比に使用されるポリヒドロキシ化合物 1 モル当りに存在するヒドロキシル基の数を掛けることによりポリヒドロキシ化合物の 1 モル当りのリン酸イオンのモル数に基づいて決められる。例えば、トレハロース及び蔗糖は化合物 1 モル当り 8 モルのヒドロキシル基を有する。それ故、トレハロース又は蔗糖がポリヒドロキシ化合物として使用される場合、ヒドロキシル基 1 モル当りリン酸イオンの約 0.025 モルから約 0.625 モルの比が約 0.2 から約 5 までのリン酸イオン対蔗糖又はトレハロースのモル比を得るのに十分なリン酸イオンを添加することにより得られる。トレハロース又は蔗糖について、約 0.0375 から約 0.625 までの好ましいモル比は約 0.3 から約 5 までのリン酸イオン対蔗糖又はトレハロースのモル比と言い換えられる。

10

所定の生物学的物質の構造及び機能を安定化し、保存する際のリン酸イオンの有効性はリン酸イオン対ヒドロキシル基のモル比が 0 から増大するにつれて増大するが、或る点（最適比）までに過ぎず、その後追加のリン酸イオンの使用は有効性に増大を与えず、又はほんのわずかな増大を与えるに過ぎないことがわかった。既に説明したように、最適比は使用される生物学的物質の量及び型、保存媒体中のポリヒドロキシ化合物の量及び型、保存媒体の pH、並びに利用される保存技術を含む、幾つかの因子に依存する。

【0017】

本発明の所定の水性保存媒体について最適であることがわかったモル比よりも高いリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物中のヒドロキシル基のモル比におけるリン酸イオンの使用は、多くの状況で、保存後に、ポリヒドロキシ化合物のみを含む水性保存媒体から得られる保存された組成物に対し改良された構造上及び機能上の保全性、例えば、再水和における改良された活性、貯蔵安定性、又はコストもしくは加工上の利点を有する保存された生物学的物質組成物を依然としてもたらし得る。それ故、本発明の所定の水性保存媒体に関する比は再水和後に最適の安定性及び活性をもたらし比以下であることが好ましく、最適比の使用が最も好ましい。しかしながら、再水和後の保存された生物学的物質の最適の活性に必要とされる比よりも大きい比を有する水性保存媒体が使用し得る。

20

【0018】

その他の成分

本発明の保護剤混合物及び / 又は水性保存媒体はその他の成分を含み得る。例えば、それらは所定の生物学的物質について媒体の pH を最適値に維持するために緩衝剤を含んでもよい。混合物及び / 又は媒体中のリン酸イオンは同様に緩衝剤として作用し、こうして追加の非リン酸塩緩衝剤が必要とされなくてもよいことが注目されるべきである。リン酸塩緩衝剤が使用される場合、緩衝剤中に存在するリン酸イオンの量は混合物及び / 又は水性保存媒体だけでなく、得られる保存された生物学的物質組成物中のリン酸イオン対ポリヒドロキシ化合物のヒドロキシル基のモル比を決める際に含まれるべきである。所定の生物学的物質が最も安定である pH は当業界で知られている。一般に、本発明の保存媒体は約 5 から約 10 までの範囲の pH を有するべきであり、約 6 から約 9 までの範囲の pH が最も好ましい。

30

【0019】

保護剤混合物及び / 又は水性保存媒体は又一種以上の酸化防止剤、例えば、チオ硫酸ナトリウム、アスコルビン酸、クエン酸、及びクエン酸ナトリウムを含んでもよい。酸化防止剤が使用される場合、それは当業界で有益であることが知られている量で存在し得る。保護剤混合物及び / 又は水性保存媒体は又乾燥剤及び / 又は浸透圧保護剤として作用し得るその他の成分、例えば、メタノール、エタノール、グリセロール及び DMSO を含んでもよい。これらの成分は本発明の水性保存媒体からつくられた保存された生物学的物質組成物において残留水分を減少し、又は浸透圧ストレスを相殺する傾向があり、これらは或る場合に一層良好な貯蔵能力をもたらし得る。

40

【0020】

本発明の保護剤混合物、水性保存媒体及び保存された組成物の調製

50

本発明の保護剤混合物は以下のように調製し得る。ポリヒドロキシ化合物及びリン酸イオンの源が所望の比率で水溶液に添加される。リン酸イオン源はポリヒドロキシ化合物の添加の前にその溶液に溶解されることが好ましい。混合物は溶解を行なうために必要により加熱されてもよい。溶液は、均一な保護剤混合物が得られるまで、十分に混合されるべきである。次いでこの保護剤混合物が水溶液として貯蔵でき、又は当業界で知られている種々の方法にかけられて固体混合物、例えば、粉末を製造し得る。粉末は無水であってもよく、又は部分結晶性水和物質であってもよい。保護剤混合物が粉末の如き固体である場合、それが本発明の水性保存媒体をつくるのに使用される前にそれは水溶液で再構成されるべきである。しかしながら、固体混合物は生物学的物質を含む水溶液に直接添加されて水性の本媒体を生成し得る。

10

次いで水溶液の形態の保護剤混合物が生物学的物質の水溶液に添加される。保護剤混合物が水性緩衝液中で調製された場合、生物学的物質の水溶液は同緩衝液中で調製されることが好ましい。次いでこれらの2種の溶液が十分に混合されて、本発明の水性保存媒体を生成する。酸化防止剤が使用されている場合、それは一般に保護剤溶液の添加の前に生物学的物質の水溶液に添加される。

【0021】

本発明の水性保存媒体中に使用される生物学的物質の量は、例えば、保存すべき特定の生物学的物質、存在するリン酸イオン及びポリヒドロキシ化合物の量、使用される保存技術に応じて、所望により変化し得る。

次いで水性保存媒体が、凍結、凍結乾燥、真空乾燥、周囲空気乾燥、及び/又は噴霧乾燥を含む、当業界で知られている一種以上の技術により保存されて、本発明の保存された生物学的物質組成物を得ることができる。得られる保存された生物学的物質組成物は無水であってもよく、又は部分結晶性水和物質であってもよい。保存された生物学的物質はその性質が実質的に無水であることが好ましい。ここで、“実質的に無水”は保存された生物学的物質組成物がカールフィッシャー分析により測定して10%未満の水を含むことを意味する。

20

【0022】

(実施例)

実施例1

前もって決めた量のポリヒドロキシ化合物及びリン酸イオンを添加し、混合して均一な溶液を生成することにより、水溶液形態の種々の保護剤混合物をバターフィールド緩衝液(7.2のpHを有する0.6mMリン酸カリウム緩衝水)中でつくった。次いで所定の保護剤混合物を1:1の質量比でL.アシドフィルス細胞溶液に添加し、得られる水性保護媒体を十分に混合し、室温で30分間インキュベートした。L.アシドフィルス細胞溶液を以下のように調製した。15.3質量%の乾燥質量を有する濃縮L.アシドフィルス細菌培養物を1.9%のチオ硫酸ナトリウムと混合してL.アシドフィルス細胞溶液を生成し、室温で30分間インキュベートした。

30

次いで上記様式でつくった夫々の水性保護媒体のサンプルを凍結、凍結乾燥又は真空乾燥にかけた。

【0023】

凍結されたサンプルについて、水性保存媒体を25ゲージのシリンジニードルにより液体窒素にドリップした。液滴が通常直径2-3mmのペレットを形成し、これらが約10秒以内に完全に凍結した。次いで保存された細胞組成物のこれらのサンプルを開放雰囲気中で室温で解凍した。

40

凍結乾燥されたサンプルを先に詳述したように凍結にかけ、得られるペレットをビルチス12EK凍結乾燥機中で-45以下の温度に前もって冷却した棚の上に置いた。更に、保存媒体の小サンプルを計量してそれらの密度を測定し、次いでガラス皿中で薄層として凍結乾燥した。これらのサンプルを凍結乾燥の前後に計量して凍結乾燥中に夫々のサンプルにより失われた水の量を計算し、それ故、再水和に必要とされる水の量を測定した。

【0024】

50

凍結乾燥したサンプルの全てを下記の凍結乾燥プロトコルにかけ、この場合、圧力及び温度は設定値である。サンプルを先に説明したように凍結乾燥機に入れた後、凍結乾燥機を0ミリの圧力で排気した。サンプルを1200分間にわたって-45で0ミリの圧力に保持し、その後温度及び圧力を50分間の期間にわたって夫々-40及び20ミリの圧力に上昇させた。次いでサンプルを600分間にわたって-40及び20ミリの圧力に保った。次いで温度を50分間の期間にわたって-35に上昇させ、次いでサンプルを600分間にわたって-35及び20ミリの圧力に保った。次に温度及び圧力を50分間にわたって夫々-30及び50ミリの圧力に上昇させ、次いでサンプルを600分間にわたって-30及び50ミリの圧力に保った。時間のその期間の終了時に、温度及び圧力を50分間にわたって夫々-25及び100ミリの圧力に上昇させ、サンプルを600分間にわたって-25及び100ミリの圧力に保った。次いで温度を50分間にわたって-20に上昇させ、次いでサンプルを600分間にわたって-20及び100ミリの圧力に保った。次に温度を100分間にわたって-10に上昇させ、サンプルを600分間にわたってその温度及び100ミリの圧力に保った。

10

【0025】

次いでサンプルを50ミリの圧力で0.5/分の速度で40の最終温度に上昇させた。次いでサンプルを1200-2400分間にわたって0ミリの圧力で最終温度に保った。次いで凍結乾燥機を窒素ガスで排気し、保存された細胞組成物サンプルを除去し、50mlのプラスチック遠心分離管中にシールし、37のインキュベーター中に貯蔵した。真空乾燥にかけたサンプルについて、保存媒体0.2mlを1.8mlのプラスチック微小遠心分離管に入れた。次いでサンプルをサバント・インストルメンツSVC-100Hスピードバク・コンセントレーター真空乾燥機に入れ、85ミリの最終圧力で約4日にわたって室温で回転蒸発させて、保存された細胞組成物を得た。次いで管をシールし、デシケーター中で室温で貯蔵した。

20

サンプルをつくり、凍結、真空乾燥又は凍結乾燥にかけた時点で、水性保存媒体からの追加のサンプルを採取し、希釈し、通常の注入塗布技術を使用して寒天培地に塗布して保存方法を行なう前に保存媒体中の生存細胞数を測定した。最初に、サンプルを希釈して約100の細胞/mlの細胞濃度を得た。次いで希釈された保存媒体1ml又は2mlをペトリ皿に入れ、45で液体寒天増殖培地(55g/LのMRSラクトバチルス・ブロー及び0.1%のL-システインを含む15g/Lの寒天)と混合した。皿を冷却し、寒天を固化し、その時点で皿を倒立させ、37で2-3日にわたって嫌気増殖チャンバー(ガスパック・ジャー)に入れ、その時点でコロニーが寒天中に見えた。原則として、夫々のコロニーは保存媒体中の単一生存細胞に相当する。

30

【0026】

種々の時点で、凍結乾燥及び真空乾燥により調製された保存された細胞組成物の一部をバタフィールド緩衝液中で再水和した。凍結乾燥したサンプルをそれらの初期濃度の約1/100まで再水和し、30分間インキュベートし、希釈し、上記のように塗布した。真空乾燥したサンプルをそれらの初期濃度の約1/5まで再水和し、混合してペレットを十分に溶解し、希釈し、上記のように塗布した。全てのサンプルを少なくとも3回反復で塗布した。これらの実験について、0時はサンプルが乾燥機から除去された時点である。保存媒体のサンプルを液体窒素中で凍結することにより調製された保存された細胞組成物を室温における完全な解凍が起こった後に上記のように塗布した。

40

サンプルの所定の組に関する結果を下記の表1に示し、表中、数字は再水和後に回復された初期活性の%を表す。“溶液”欄は所定の保存媒体中の生存細胞の量を示し、“細胞単独”サンプル中の生存細胞の量が100%と定義される。

【0027】

【表1】

サンプル	溶液	凍結	真空乾燥			凍結乾燥				
			時間=0	9日	27日	時間=0	9日	28日	64日	101日
細胞単独	100	105	0	0	NA ³	56	0	NA	NA	NA
20%トレハロース+チオ	96	97	10	7	NA	44	31	21	5	NA
20%トレハロース+ホウ酸塩(0.3) ¹ +チオ ²	83	93	27	26	17	69	16	14	6	NA
20%トレハロース+N aH ₂ PO ₄ (0.1)+チオ	89	88	12	6	NA	55	28	13	3	NA
20%トレハロース+N aH ₂ PO ₄ (0.3)+チオ	94	88	5	1	NA	45	24	7	0	NA
20%トレハロース+N aH ₂ PO ₄ (0.5)+チオ	77	95	3	2	NA	51	26	0	NA	NA
20%トレハロース+N aH ₂ PO ₄ (1.0)+チオ	92	86	3	2	NA	71	4	NA	NA	NA
20%トレハロース+チオ+NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0)pH5.6	103	105	51	48	39	84	72	58	17	0
20%トレハロース+チオ+NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0)pH4.9	106	107	4	3	NA	82	65	24	0	NA
20%トレハロース+チオ+NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0)pH8.6	93	106	52	59	73	82	76	70	67	57
20%トレハロース+チオ+NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (1.0)pH5.3	96	104	23	18	5	87	70	47	7	NA

10

20

30

40

【 0 0 2 8 】

¹ 括弧中の数字はトレハロース1モル当りのリン酸イオンのモル数を示す。² “チオ”は1.9%のチオ硫酸ナトリウムの略語である。³ NA: 10%未満の回復のサンプルはその後の時点でアッセイされなかった。

実施例 2

種々の量のポリヒドロキシ化合物とともにリン酸イオン、炭酸イオン、又は硫酸イオンを使用して、実施例1の操作を繰り返した。サンプルの所定の組に関する結果を下記の表 2

50

に示し、表中、数字は再水和後に回復された初期活性の％を表す。“溶液”欄は所定の保存媒体中の生存細胞の量を示し、“細胞単独”サンプル中の生存細胞の量が100％と定義される。

【0029】

【表2】

サンプル	溶液	凍結	真空乾燥			凍結乾燥 ⁴				
			時間=0	19日	34日	時間=0	19日	38日	74日	99日
細胞単独	100	102	2			46	0	NA	NA	NA
20%トレハロース+チオ	83	88	14	18	NA ⁴	52	13	13	5	NA
20%蔗糖+チオ	100	103	4	NA	NA	80	33	19	20	15
20%トレハロース+ホウ酸塩(0.3) ¹ +チオ ²	101	90	37	21	21	49	0	NA	NA	NA
20%蔗糖+ホウ酸塩(0.3)+チオ	93	108	35	27	NA	55	3	NA	NA	NA
20%トレハロース ³ +Na ₂ CO ₃ (1.0)+チオ	1	59	0	NA	NA	27	8	NA	NA	NA
20%蔗糖 ³ +Na ₂ CO ₃ (1.0)+チオ	1	34	0	NA	NA	16	0	NA	NA	NA
20%トレハロース+Na ₂ SO ₄ (0.75)+チオ	87	92	24	21	18	73	1	NA	NA	NA
20%蔗糖+Na ₂ SO ₄ (0.75)+チオ	91	86	8	NA	NA	66	7	NA	NA	NA
20%トレハロース+チオ+NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0)pH6.5	85	86	65	61	68	74	54	46	37	26
20%蔗糖+チオ+NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0)pH6.5	93	90	51	34	NA	74	43	29	27	12

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

¹ 括弧中の数字はポリヒドロキシ化合物 1 モル当りのリン酸イオン、炭酸イオン又は硫酸イオンのモル数を示す。² “ チオ ” は 1 . 9 % のチオ硫酸ナトリウムの略語である。³ p H はこれらのサンプルについて調節されなかった。指示薬紙は p H を約 1 1 と推定した。これはおそらく不十分な回復の原因である。⁴ N A : 1 0 % 未満の回復のサンプルはその後の時点でアッセイされなかった。

実施例 3

凍結乾燥したサンプルを 5 0 に乾燥した以外は、種々の量のリン酸イオンの種々の源、及び種々の量のトレハロースを含む保存媒体を使用して、実施例 1 の操作を繰り返した。加えて、凍結乾燥したサンプル中の残留水をカールフィッシャー (K F) 分析により測定し、ガラス転移温度 (T_g) を得た。サンプルの所定の組に関する結果を下記の表 3 に示し、表中、数字は再水和後に回復された初期活性の % を表す。“ 溶液 ” 欄は所定の保存媒体中の生存細胞の量を示し、“ 細胞単独 ” サンプル中の生存細胞の量が 1 0 0 % と定義される。

10

【 0 0 3 1 】

【 表 3 】

サンプル	水%	Tg	溶液	凍結	真空乾燥			凍結乾燥			
	KFによる	(°C)			時間=3	19日	95日	時間=0	21日	48日	92日
細胞単独	0.8	47	100	10	0	NA	NA	22	0	NA	NA
20%トレハロース+チオ	0.7	88	105	104	9	NA	NA	50	10	NA	NA
20%トレハロース+チオ ² +Na ₂ H ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (0.5) ¹ pH8.6	5.3	32	*	105	68	78	50	44	27	15	5
20%トレハロース+チオ+Na ₂ H ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH8.6	3.2	85	105	114	75	89	70	66	63	55	48
20%トレハロース+チオ+Na ₂ H ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH8.6+メタノール	1.6	46	87	87	51	59	5	69	41	27	13
20%トレハロース+チオ+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1)pH8.6	3.5	82	97	110	70	63	54	70	60	61	49
5%トレハロース+チオ+Na ₂ H ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1)pH8.6	3.8	44	108	110	35	19	27	51	26	9	NA

10

20

30

【0032】

注：¹ 括弧中の数字はトレハロース1モル当りのリン酸イオンのモル数を表す。² “チオ”は1.9%のチオ硫酸ナトリウムの略号である。*このサンプルは不当に希釈され、400%より大きい回復をもたらした。

実施例4

凍結乾燥したサンプルを50の温度に乾燥した以外は、保存媒体中に種々の量のトレハロース及び異なるリン酸イオン源を使用して、実施例1の操作を繰り返した。2種のサンプルでは、エタノールを乾燥剤として保存媒体に添加し、一方、一種のサンプルでは、L-アシドフィルス細胞を“洗浄”(遠心分離、デカントそして再懸濁)して残留増殖培地を除去した。又、異なる緩衝液を含む媒体を試験した。サンプルの所定の組に関する結果を下記の表4に示し、表中、数字は再水和後に回復された初期活性の%を表す。“溶液”欄は所定の保存媒体中の生存細胞の量を示し、“細胞単独”サンプル中の生存細胞の量が

50

100%と定義される。

【0033】

【表4】

サンプル	溶液	凍結	真空乾燥			凍結乾燥 ³			
			40日		68日	時間=0	14日	40日	68日
細胞単独	100	116	0	NA		36	0	NA	
20%トレハロース+チオ ²	89	98	22	8		73	28	4	
17.5%トレハロース+チオ+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ¹ , pH6.5	101	120	41	55	65	85	23	22	7
17.5%トレハロース+チオ+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH8.5+エタノール(1モル/モルP)	98	112	0	NA		48	9	NA	
17.5%トレハロース+チオ+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH8.5+エタノール(2モル/モルP)	89	95	0	NA		14	0	NA	
20%トレハロース+チオ+K ₂ HPO ₄ (1)	106	97	55	44	30	77	50	63	54
20%トレハロース+チオ+K ₂ HPO ₄ (1)+クエン酸/NH ₃ OH緩衝	59	49	4	NA		47	15	27	29
20%トレハロース+チオ+K ₂ HPO ₄ (1)+乳酸/NH ₃ OH緩衝	59	48	3	NA		27	6	NA	
17.5%トレハロース+チオ+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH6.5洗浄細胞	97	122	40	41	24	80	30	20	6

10

20

30

40

¹ 括弧中の数字はトレハロース1モル当りのリン酸イオンのモル数を表す。² “チオ”は1.9%のチオ硫酸ナトリウムの略号である。³ NA: 10%未満の回復のサンプルをその後の時点でアッセイしなかった。

【0034】

実施例5

50

サンプルを 50 の温度に凍結乾燥した以外は、トレハロース、リン酸イオン、及び種々の酸化防止剤を使用して、又は使用しないで、実施例 1 の操作を繰り返した。サンプルの所定の組に関する結果を下記の表 5 に示し、表中、数字は再水和後に回復された初期活性の % を表す。“溶液”欄は所定の保存媒体中の生存細胞の量を示し、“細胞単独”サンプル中の生存細胞の量が 100 % と定義される。

【 0 0 3 5 】

【表 5】

サンプル	溶液	凍結	真空乾燥			凍結乾燥		
			時間=0	9日	25日	時間=0	9日	25日
細胞単独	100	100	0	0	0	1	0	0
20%トレハロース+KH ₂ P Q ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3}	99	85	25	30	15	65	51	33
20%トレハロース+KH ₂ P Q ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3} +チオ ²	80	71	46	35	20	73	42	19
20%トレハロース+KH ₂ P Q ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3} +アスコ ルビン酸	95	82	33	30	16	61	38	25
20%トレハロース+KH ₂ P Q ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3} +クエン 酸	80	75	16	24	11	49	17	3
20%トレハロース+KH ₂ P Q ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3} +クエン 酸ナトリウム	88	76	42	24	10	74	46	12

10

20

30

注：¹ 括弧中の数字はトレハロース 1 モル当りのリン酸イオンのモル数を表す。² “チオ”はチオ硫酸ナトリウムの略号である。³ トレハロース - リン酸塩の pH は 6.5 を目標としたが、酸化防止剤又は細胞の添加後に測定しなかった。最終 pH はおそらく 6.0 ~ 6.5 であった。

40

【 0 0 3 6 】

実施例 6

ペディオコッカス種を L . アシドフィルス細胞に代えて使用し、凍結乾燥したサンプルを 25 の温度に乾燥し、又は更に 50 に乾燥した以外は、実施例 1 の操作を繰り返した。サンプルの所定の組に関する結果を下記の表 6 に示し、表中、数字は再水和後に回復された初期活性の % を表す。“溶液”欄は所定の保存媒体中の生存細胞の量を示し、“細胞単独 + チオ”サンプル中の生存細胞の量が 100 % と定義される。

【 0 0 3 7 】

【表 6】

50

サンプル	溶液	凍結	真空乾燥			凍結乾燥		凍結乾燥			
			時間=0	31日	60日	T最終=	T最終=	T最終=		T最終=	
						25°C	50°C	25°C	50°C		
						時間=0	時間=0	31日	60日	31日	59日
細胞単独+チオ	100	118	73	62	75	96	73	5		2	
20%トレハロース+チオ ²	121	121	84	61	32	117	115	55	19	48	25
20%トレハロース+チオ+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3}	114	113	104	95	89	100	113	96	78	97	97
20%トレハロース+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3} +2%クエン酸	102	122	99	93	81	118	94	75	65	88	81

10

20

30

注：¹ 括弧中の数字はトレハロース1モル当りのリン酸イオンのモル数を表す。² “チオ”は1.9%のチオ硫酸ナトリウムの略号である。³ トレハロース-リン酸塩のpHは細胞と混合する前に6.5と測定した。最終pHはおそらく6.5未満であった。

【0038】

実施例7

L-ラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH、EC1.1.1.27、型II、ウサギの筋肉)を4でpH7.5の100mMリン酸カリウム緩衝液中で一夜透析した。シグマ・ケミカル社(セントルイス、ミズーリー)から購入したタンパク質測定キットであるシグマ・ダイアグノスチックを使用し、Ohnishi及びBarr, “ビウレット試薬及びフェノール試薬を使用するタンパク質を定量するための簡素化方法”, Analytical Biochem. 86:193-200 (1978)の改良ビウレット方法を使用して、全タンパク質含量をアッセイした。バリアンUVスペクトロフォトメーターを使用してタンパク質アッセイを室温で725nmにおける特徴的な吸収で行なった。反応混合物は100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)、0.150mM NADH、及び1.20mMピルビン酸を含んでいた。

40

サンプルを調製するために、透析したLDHを透析に使用されたのと同じリン酸カリウム緩衝液で希釈した。得られる酵素溶液は100mMのリン酸イオン濃度、及び50μg/mlのLDH濃度を有していた。次いで保護剤混合物の三つの組をつくった。混合物の組は夫々200mM、400mM及び600mMのトレハロース濃度を有していた。夫々の混合物の組は夫々100mM、300mM、500mM及び700mMの濃度のリン酸イ

50

オンを含む、4種の別々の保護剤サンプルからなった。トレハロースを所定の量のリン酸イオンを含むリン酸塩水溶液に溶解することによりこれらのサンプルをつくった。

次いでLDH溶液2mlを12種の保護剤混合物の夫々2mlと混合して100mM、200mM、又は300mMのトレハロース濃度、25 μ g/mlのLDH濃度、及び100mM、200mM、300mM又は400mMのリン酸イオン濃度を有する水性保存媒体の溶液4mlを得た。上記サンプル調製を表7に示す。

【0039】

【表7】

(組1)				
サンプル	1	2	3	4
酵素溶液	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩
低温保護 溶液	200mM トレハロース 100mM リン酸塩	200mM トレハロース 100+200mM リン酸塩	200mM トレハロース 100+400mM リン酸塩	200mM トレハロース 100+600mM リン酸塩
混合物 溶液	25 μ g/ml LDH 100mM トレハロース 100mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 100mM トレハロース 200mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 100mM トレハロース 300mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 100mM トレハロース 400mM リン酸塩
(組2)				
サンプル	1	2	3	4
酵素溶液	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩
低温保護 溶液	400mM トレハロース 100mM リン酸塩	400mM トレハロース 100+200mM リン酸塩	400mM トレハロース 100+400mM リン酸塩	400mM トレハロース 100+600mM リン酸塩
混合物 溶液	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 100mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 200mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 300mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 400mM リン酸塩
(組3)				
サンプル	1	2	3	4
酵素溶液	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩
低温保護 溶液	600mM トレハロース 100mM リン酸塩	600mM トレハロース 100+200mM リン酸塩	600mM トレハロース 100+400mM リン酸塩	600mM トレハロース 100+600mM リン酸塩
混合物 溶液	25 μ g/ml LDH 300mM トレハロース 100mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 300mM トレハロース 200mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 300mM トレハロース 300mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 300mM トレハロース 400mM リン酸塩

10

20

30

40

【0040】

次いで48のバイアルを保存媒体の上記サンプルの夫々について調製した。夫々のバイアルを標識し、計量し、保存媒体1mlを夫々のバイアルにピペットで入れた。次いで夫々のバイアルを再度計量した。次いでサンプルを液体窒素中のバイアルの浸漬(“急冷”)又は-45以下の温度における凍結乾燥機中の前もって冷却した棚の上の配置(“遅い凍結”)により凍結した。凍結乾燥したサンプルの全てをピルチス12EL凍結乾燥機中の下記の凍結乾燥プロトコルにかけ、この場合、全ての圧力温度を設定値に設定する。サ

50

サンプルを先に説明したように凍結乾燥機に入れた後に、凍結乾燥機を 0 ミリトルの圧力で排気した。サンプルを 600 分間にわたって -45 及び 0 ミリトルに保ち、その後に温度及び圧力を 50 分間の期間にわたって夫々 -40 及び 20 ミリトルに上昇させた。次いでサンプルを 600 分間にわたって -40 及び 20 ミリトルに保った。次いで温度を 50 分間の期間にわたって -35 に上昇させ、次いでサンプルを 600 分間にわたって -35 及び 20 ミリトルに保った。次に温度及び圧力を 50 分間にわたって夫々 -30 及び 50 ミリトルに上昇させ、次いでサンプルを 600 分間にわたって -30 及び 50 ミリトルに保った。時間のその期間の終了時に、温度及び圧力を 50 分間にわたって夫々 -25 及び 100 ミリトルに上昇させ、サンプルを 600 分間にわたって -25 及び 100 ミリトルに保った。次いで温度を 50 分間にわたって -20 に上昇させ、次いでサンプルを 600 分間にわたって -20 及び 100 ミリトルに保った。次に温度を 100 分間にわたって -10 に上昇させ、サンプルを 600 分間にわたってその温度及び 100 ミリトルに保った。

10

【0041】

次いでサンプルを 700 分間の期間にわたって 50 ミリトルで 25 の温度に上昇させた。次いでサンプルを荷卸しまで 2140 分間にわたって 0 ミリトルでその最終温度に保った。次いで凍結乾燥機を窒素ガスで排気し、バイアル中の保存された LDH サンプルを除去し、LDH 活性について測定した。活性を測定する前に、夫々のサンプルを計量して水損失の量を測定し、失われた水の量の精製水（ミリポア社からのミリQシステム）で再水和した。次いで先に説明したのと同じ方法を使用して LDH 活性を測定した。サンプルの所定の組に関する結果を図 1（凍結乾燥）及び図 2（凍結）に示す。

20

【0042】

実施例 8

L-ラクテートデヒドロゲナーゼ（LDH、EC 1.1.1.27、型 II、ウサギの筋肉）を 4 で pH 7.5 の 100 mM リン酸カリウム緩衝液中で一夜透析した。シグマ・ケミカル社（セントルイス、ミズーリー）から購入したタンパク質測定キットであるシグマ・ダイアグノスチックを使用し、Ohnishi 及び Barr, “ビウレット試薬及びフェノール試薬を使用するタンパク質を定量するための簡素化方法”, Analytical Biochem. 86: 193-200 (1978) の改良ビウレット方法を使用して、全タンパク質含量をアッセイした。バリアン UV スペクトロフォトメーターを使用してタンパク質アッセイを室温で 725 nm における特徴的な吸収で行なった。反応混合物は 100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）、0.150 mM NADH、及び 1.20 mM ピルビン酸を含んでいた。

30

【0043】

サンプルを調製するために、LDH を四つの 50 ml の容器に添加し、透析に使用されたのと同じリン酸カリウム緩衝液で希釈して溶液 25 ml をつくった。サンプルの夫々において、酵素濃度は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。次いで 25 ml の容積を有する 4 種の保護剤混合物を 50 ml の容器中で調製した。夫々の混合物は 400 mM のトレハロース、及び種々の量のリン酸イオンを含んでいた。第一混合物（基準）をつくるために、トレハロースを 10 mM リン酸カリウム溶液に溶解した。第二混合物について、トレハロースを 100 mM リン酸カリウム溶液に溶解した。トレハロースを 500 mM リン酸カリウム溶液及び 900 mM リン酸カリウム溶液の夫々に溶解することにより第三混合物及び第四混合物をつくった。

40

次いで LDH サンプルを保護剤混合物と混合して 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LDH 濃度、200 mM のトレハロース濃度並びに種々の LDH 濃度及びリン酸イオン濃度を有する水性保存媒体の溶液 50 ml を得た。サンプル 1-4 に関するリン酸イオン濃度は夫々 10 mM、100 mM、300 mM、及び 500 mM であり、サンプル 1 について 0.05、サンプル 2 について 0.5、サンプル 3 について 1.5、又サンプル 4 について 2.5 のリン酸イオン対トレハロースのモル比であった。上記サンプル調製を下記の表 8 に示す。

【0044】

50

【表 8】

サンプル	1	2	3	4
LDH溶液	50 μ g/ml LDH 10mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩	50 μ g/ml LDH 100mM リン酸塩
保護剤混合物	400mM トレハロース 10mM リン酸塩	400mM トレハロース 100mM リン酸塩	400mM トレハロース 500mM リン酸塩	400mM トレハロース 900mM リン酸塩
保存 媒体	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 10mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 100mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 300mM リン酸塩	25 μ g/ml LDH 200mM トレハロース 500mM リン酸塩

10

20

【0045】

次いで40のバイアルを保存媒体の上記の四つのサンプルの夫々について調製した。夫々のバイアルを標識し、計量し、保存媒体1mlを夫々のバイアルにピペットで入れた。次いで夫々のバイアルを再度計量した。次いで実施例7に記載されたのと同じプロトコルを使用してサンプルを凍結乾燥した。

30

凍結乾燥が完結した後、バイアル中の保存されたLDHサンプルを除去し、バイアルをシールし、37のインキュベーター、30のインキュベーター又は4の冷蔵庫中で貯蔵した。

次いでLDH活性をサンプルについて周期的に測定した。活性を測定する前に、夫々のサンプルを計量して水損失の量を測定し、失われた水の量の精製水（ミリポア社からのミリQシステム）で再水和した。次いで先に説明したのと同じ方法を使用してLDH活性を測定した。

サンプルの所定の組に関する結果を図3-5に示し、図中、“Z”はリン酸イオン対トレハロースのモル比である。

40

【0046】

実施例9

実施例1の操作を繰り返した。結果を下記の表9に示し、表中、数字は再水和後に回復された初期活性の%を表す。“溶液”欄は所定の保存媒体中の生存細胞の量を示し、“細胞単独”サンプル中の生存細胞の量が100%と定義される。

【0047】

【表9】

サンプル	溶液	凍結	凍結乾燥 T=3日
細胞単独	100	105	0
20%トレハロース	91	89	11
20%トレハロース+チオ ²	89	77	8
20%トレハロース+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ¹ , pH6.4	72	78	39
20%トレハロース+チオ+KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH6.4	54	61	41
細胞+KHPO ₄ /K ₂ HPO ₄ (上記サンプル4、5と同じ細胞 1g当りのリン酸塩)	89	90	7
20%トレハロース+チオ+K ₂ HPO ₄ (1)	75	81	39

10

20

注：¹ 括弧中の数字はトレハロース1モル当りのリン酸イオンのモル数を表す。² “チオ”は1.9%のチオ硫酸ナトリウムの略号である。

【0048】

実施例10

モル基準で7.5%の蔗糖又はトレハロースと一リン酸カリウムもしくは二リン酸カリウムにより得られた種々の量のリン酸イオンとを含む水性保護剤混合物を調製し、夫々の混合物25μlをアルミニウム示差走査熱量測定パンにシールした。次いでサンプルを液体窒素中の浸漬により急冷し、示差走査熱量測定器（これは-140℃に前もって冷却されていた）に装填した。次いでサンプルを50℃の温度まで5℃/分の速度で走査し、ガラス転移温度（T_g）を測定した。夫々のサンプルに関する結果を図6に示す。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】

種々の量及びモル比のリン酸塩及びトレハロースを使用してつくられた凍結乾燥されたラクテートデヒドロゲナーゼ組成物から回復された活性%のグラフである。

【図2】

種々の量及びモル比のリン酸塩及びトレハロースを使用してつくられた凍結されたラクテートデヒドロゲナーゼ組成物から回復された活性%のグラフである。

【図3】

種々の量及びモル比のリン酸塩及びトレハロースを使用してつくられた凍結乾燥されたラクテートデヒドロゲナーゼ組成物から経時回復された活性%のグラフである。

40

【図4】

種々の量及びモル比のリン酸塩及びトレハロースを使用してつくられた凍結乾燥されたラクテートデヒドロゲナーゼ組成物から経時回復された活性%のグラフである。

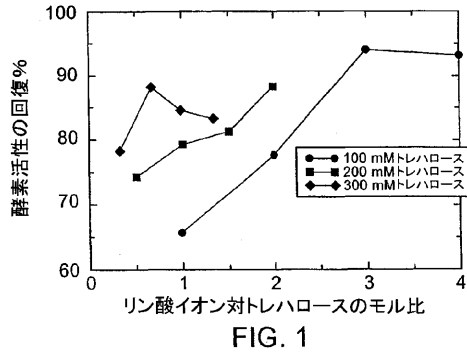
【図5】

種々の量及びモル比のリン酸塩及びトレハロースを使用してつくられた凍結乾燥されたラクテートデヒドロゲナーゼ組成物から経時回復された活性%のグラフである。

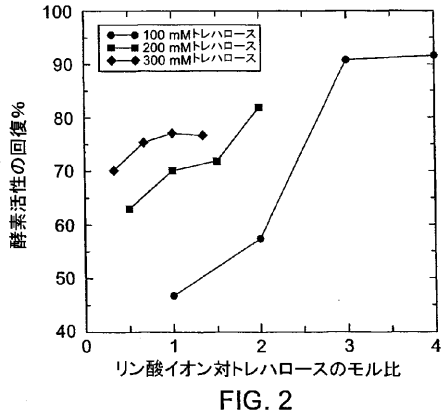
【図6】

本発明の種々の保護剤混合物に関するガラス転移温度のグラフである。

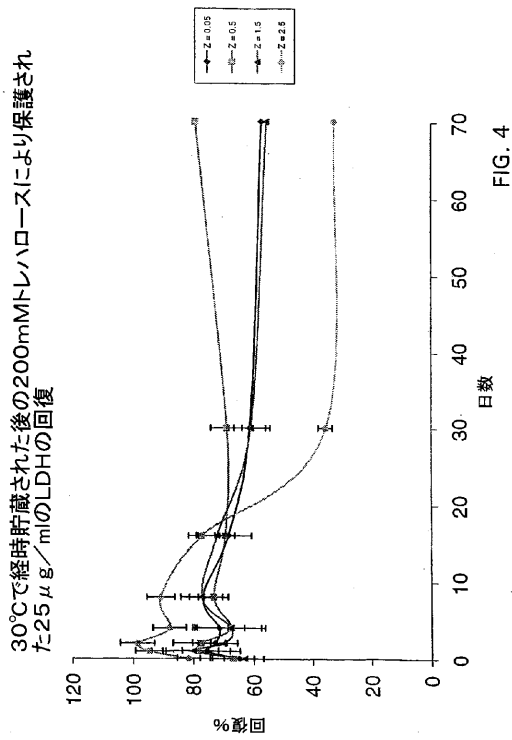
【 図 1 】



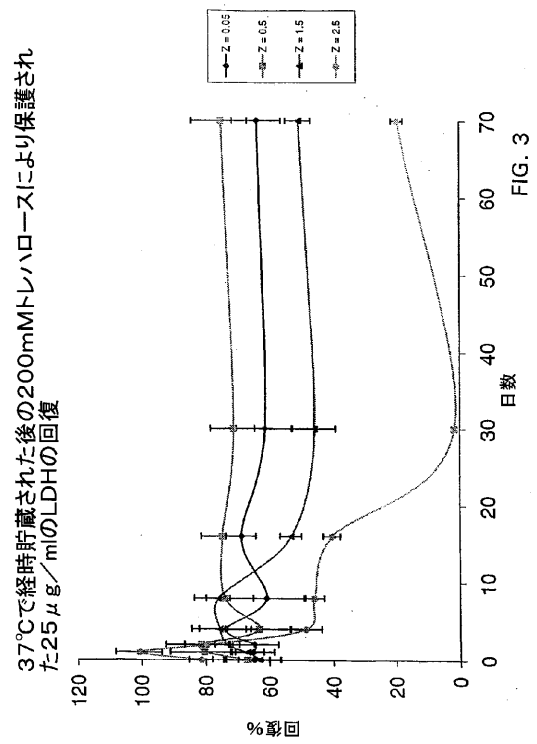
【 図 2 】



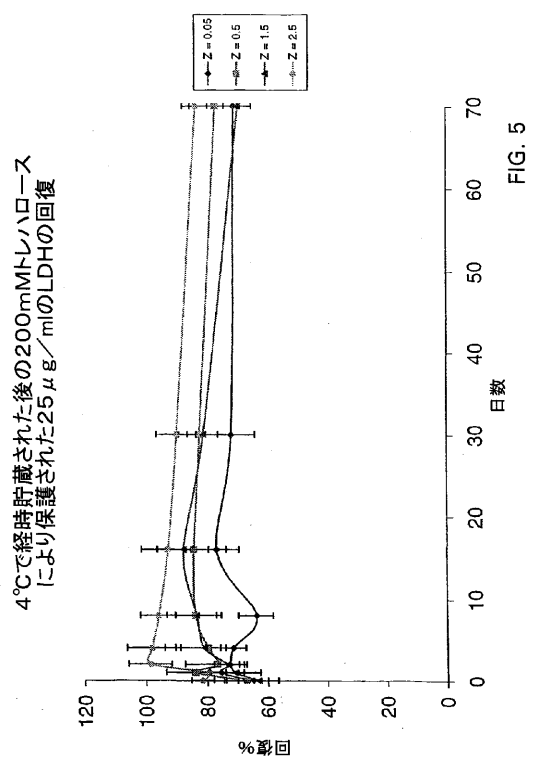
【 図 4 】



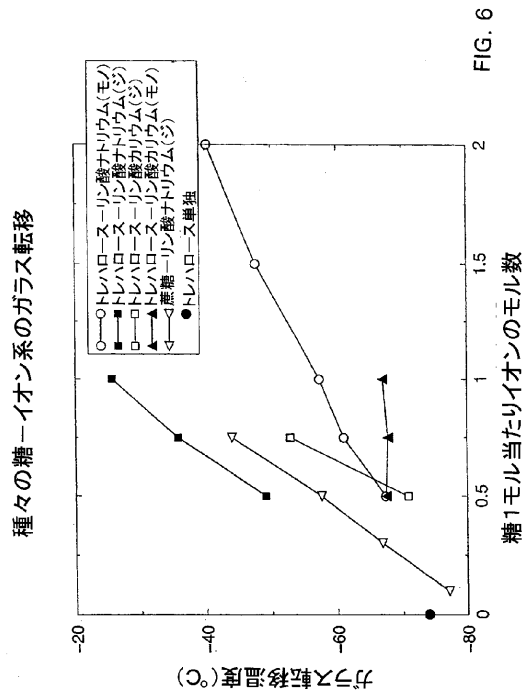
【 図 3 】



【 図 5 】



【図 6】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/09515 A1

- (51) International Patent Classification: **A01N 1/02**
- (21) International Application Number: PCT/US01/14939
- (22) International Filing Date: 9 May 2001 (09.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/625,735 26 July 2000 (26.07.2000) US
- (71) Applicant: **WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION** [US/US]; 614 North Walnut Street, Madison, WI 53707 (US).
- (72) Inventors: **DEPABLO, Juan, J.**; 2514 Chamberlain Avenue, Madison, WI 53705 (US). **MILLER, Danforth, P.**; 1016 Sylvan Drive, San Carlos, CA 94070 (US). **CONRAD, Paul, B.**; 4325 Daisy Drive, Madison, WI 53711 (US). **CORTI, Horatio**; Ayacucho 56 (1824) Lanus, Buenos Aires (AG).
- (74) Agent: **WARD, Jeffrey, S.**; Michael Best & Friedrich LLP, P.O. Box 1806, Madison, WI 53701-1806 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/09515 A1

(54) Title: PRESERVATION AND STORAGE MEDIUM FOR BIOLOGICAL MATERIALS

(57) Abstract: A protectant mixture for use in preserving biological material comprising (1) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 5 % to about 60 % by weight of the mixture where the mixture is an aqueous solution and is from about 10 % to about 95 % where the mixture is in solid form, and (2) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxy groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625; a preservation medium comprising (1) a biological material, (2) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 5 % to about 60 % by weight of the medium, and (3) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxy groups in the polyhydroxy compounds is from about 0.025 to about 0.625; methods of preserving the preservation medium; and the resulting preserved biological material composition.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

PRESERVATION AND STORAGE MEDIUM FOR BIOLOGICAL MATERIALS**FIELD AND BACKGROUND OF THE INVENTION**

5 The present invention relates generally to preserving and stabilizing biological materials by freezing, drying, and freeze-drying, and more specifically to protectant mixtures and aqueous preservation media for preserving biological materials, as well as methods of preserving biological materials and the preserved biological material
10 compositions themselves.

 The preservation of the structure and function of biological molecules is of fundamental importance to biology, biochemistry, and medicine. Biological materials, such as proteins, enzymes, cells, tissues, nucleic acid, semen, blood and its components, mammalian organs, and foodstuffs must often be stored and preserved for later use.
15 Preservation of these biological materials is usually achieved by either freezing or drying, or a combination of the two processes. There are several commonly-used drying techniques: drying by evaporation into a moving gas stream (ambient air-drying), drying under vacuum at ambient temperatures (vacuum-drying), or drying by contacting a fine mist of droplets with warm air (spray-drying). Simple freezing is often done when

WO 02/09515

PCT/US01/14939

drying is either harmful or unnecessary. Certain biological materials are best preserved by freeze-drying (lyophilization), a two-step process in which the sample is first frozen and then dried at low temperature under vacuum.

The structure and function of most biological materials is dependent upon their aqueous environment. Therefore, changes to their aqueous environment resulting from freezing and drying processes can often have drastic consequences for a biological material. Furthermore, freeze-drying combines the stresses due to both freezing and drying. The freezing step of this process can have undesirable side effects, such as the denaturation of proteins and enzymes, and rupture of cells. These effects result from mechanical, chemical, and osmotic stresses induced by crystallization of ice in these materials. As a result, the activity of the biological material upon rehydration is lost either in its entirety, or to such a significant extent that the material is no longer useful for its intended purpose.

To prevent or reduce the adverse effects upon reconstitution or rehydration, protective agents, such as cryoprotectants or lyoprotectants (freeze-drying) are used. For such protective agents to be effective, they must be non-toxic to the biological material at the concentrations encountered during the preservation process, and must interact favorably with water and with the biological material. Various protective agents have been used in the art, with varying degrees of success. These include fish proteins, certain polymers, skim milk, glycerol, dimethyl sulfoxide, and disaccharides, such as trehalose. Unfortunately, suitable protective agents and cryopreservation protocols have been developed only for a limited number of systems.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

Disaccharides, such as sucrose and trehalose, are natural cryoprotectants.

Trehalose is a particularly attractive cryoprotectant because it has actually been isolated from plants and animals that remain in a state of suspended animation during periods of drought. Trehalose has been shown to be an effective protectant for a variety of
5 biological materials, both in ambient air-drying and freeze-drying. Research has shown, (see Crowe, J.H., Crowe, L.M., and Mouriadian, R., Cryobiology, 20, 346-356 (1983)), that liposomes dried in the presence of trehalose retain both their functional and structural integrity upon rehydration. U.S. Patent No. 5,556,771 discloses the use of trehalose, or trehalose in combination with polyvinylpyrrolidone to preserve reverse
10 transcriptase and RNA polymerase. U.S. Patent No. 5,512,547 discloses the use of trehalose to preserve botulinum neurotoxin. Likewise, U.S. Patent No. 4,891,319 discloses a method of protecting proteins and other biological macromolecules, such as enzymes, serum, serum complement, antibodies, antigens, fluorescent proteins and vaccine components using trehalose. Specifically, an aqueous mixture containing the
15 macromolecule and trehalose is dried at a temperature above freezing in the presence of 0.05 to about 20% trehalose by weight of the aqueous system.

However, there are some drawbacks associated with the use of trehalose as the sole cryoprotectant. To preserve many biological materials by freeze-drying, large amounts of trehalose must be used; concentrations of trehalose greater than 60% by
20 weight of a given preservation medium are sometimes necessary. This is costly. Further, a high concentration of trehalose reduces the solubility of other solutes in the system.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

Thus, it has been proposed to use trehalose in combination with a polymeric gelling agent, such as carboxymethylcellulose or carboxyethylcellulose. It has been suggested for human blood that saccharides combined with polymers are even more effective cryoprotectants than pure trehalose. See U.S. Patent No. 5,171,661; Sutton, 5 R.L., J.Chem.Soc.Faraday Trans., 87, 3747 (1991). Unfortunately, attempts to confirm the beneficial effect of the gelling agents have been unsuccessful. (G. Spieles, I. Heschel, and G. Rau, Cryo-Letters 17, 43-52 (1996), J.H. Crowe, A.E. Oliver, F.A. Hoekstra, and L.M. Crowe, Cryobiology 35, 20-30 (1997).). Moreover, this protective combination cannot be used for medical purposes, because the polymer gelling agents 10 are not accepted well by the human body. As a result, this combination is not very useful, and does not provide much, if any, practical improvement over the use of trehalose alone.

Another, more serious problem associated with the use of trehalose is that biological materials preserved using trehalose alone are not storage stable for extended 15 periods of time, especially those stored at superambient temperatures and/or in humid environments. In other words, biological materials preserved with trehalose can lose their activity in a matter of hours or days, depending on the humidity and temperature of the storage conditions.

Therefore, at present, freeze-drying with trehalose is of limited use for extended 20 term storage of biological materials, such as proteins, enzymes, cells, tissues, nucleic acid, semen, blood and its components, mammalian organs, and foodstuffs, over a wide range of storage conditions, because the material will degrade, and will not have sufficient activity upon reconstitution. From a practical standpoint, this is clearly

WO 02/09515

PCT/US01/14939

unacceptable for medical products, as one of the reasons for preserving the materials in the first place is to provide a storage-stable product.

Nor can many of the various room temperature drying techniques be effectively used at present. These methods, while less complicated and less costly than freeze-drying, are generally more destructive to biological materials. Many biological materials are more prone to gross conformational changes and unwanted reactions when preserved using methods that take place at ambient temperature than when freeze-drying is used. As a result, even where presently known protective agents are used, the activity of many rehydrated biological materials is both unsatisfactory in its own right, and significantly less than if preserved by freeze-drying.

Thus, a need exists for a protectant mixture that is useful for a wide range of biological materials. A further need exists for a protectant mixture that can be effectively used in both freeze-drying processes and drying processes involving ambient-temperature drying. There is also a need for a protectant mixture that is less costly than those presently being used. Finally, and very importantly, there is a need for a protectant mixture that provides stable media for preservation of biological materials over extended periods of time at elevated temperatures and varying degrees of humidity, which can be encountered during shipping and storage of materials, while still retaining a significant amount of activity upon rehydration.

All of these needs are met by the protectant mixture, aqueous protective medium and resulting preserved biological material compositions of the present invention.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

SUMMARY OF THE INVENTION

It has been found that a protectant mixture for use in preserving biological materials, comprising: (a) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 5% to about 60% by weight of the mixture if the mixture is an aqueous solution and from about 10% to about 95% by weight if the mixture is in solid form; and (b) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the medium is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625, can be used with a wide variety of biological materials to provide an aqueous preservation medium.

This aqueous preservation medium can then be used in a multiplicity of preservation processes, including freezing, freeze-drying and other drying processes, such as spray-drying, vacuum-drying, or ambient air-drying, to provide a stable, preserved composition of the biological material of interest. This preserved composition is stable for extended periods of time at superambient temperatures and/or relative humidity.

Further, when the preserved biological material composition is rehydrated, the structural and functional integrity of the preserved biological material has been retained to such an extent that the biological material can be used for its intended purpose.

Therefore, the present invention also provides a method for preparing a preserved biological material composition from the above-noted preservation medium, as well as the preserved biological material composition itself.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a graph of percent activity recovered from freeze-dried lactate dehydrogenase compositions made using varying amounts and molar ratios of

WO 02/09515

PCT/US01/14939

phosphate and trehalose.

Fig. 2 is a graph of percent activity recovered from frozen lactate dehydrogenase compositions made using varying amounts and molar ratios of phosphate and trehalose.

Fig. 3 is a graph of percent activity recovered over time from freeze-dried lactate dehydrogenase compositions made using varying amounts and molar ratios of phosphate and trehalose.

Fig. 4 is a graph of percent activity recovered over time from freeze-dried lactate dehydrogenase compositions made using varying amounts and molar ratios of phosphate and trehalose.

Fig. 5 is a graph of percent activity recovered over time from freeze-dried lactate dehydrogenase compositions made using varying amounts and molar ratios of phosphate and trehalose.

Fig. 6 is a graph of glass transition temperatures for various protectant mixtures of the invention.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention is based on the remarkable discovery that biological materials can be preserved while retaining substantial activity, when the biological material is combined with the protectant mixture of the present invention to form an aqueous preservation medium, which in turn is formed into a preserved biological material composition by subjecting the aqueous preservation medium of the present invention to (1) various drying techniques, including freeze-drying, ambient air-drying, vacuum-drying, and spray-drying, or (2) other preservation methods known in the art, such as freezing. The protectant mixture of the present invention comprises: (a) at least

WO 02/09515

PCT/US01/14939

one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 5% to about 60% by weight of the mixture if the mixture is an aqueous solution and from about 10% to about 95% by weight if the mixture is in solid form; and (b) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is

5 such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625. The aqueous preservation medium of the present invention comprises: (a) a biological material; (b) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 5% to about 60% by weight of the medium; and (c) phosphate ions, where the

10 total amount of phosphate ions in the medium is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625.

Biological Materials

A wide range of biological materials can be used with the inventive protectant mixtures to form the aqueous preservation medium of the present invention. This

15 preservation medium can then be subjected to the processes of the present invention to make a preserved biological material composition. These biological materials, include, without limitation:

- (a) enzymes, such as lactate dehydrogenase and phosphofructokinase;
- 20 (b) proteins, such as insulin;
- (c) serum complement;
- (d) vaccines;
- (e) tissue, including skin, veins and arteries;

WO 02/09515

PCT/US01/14939

- (f) viruses, such as adenovirus;
- (g) mammalian organs, such as the liver, pancreas and lungs;
- (h) blood, and its components, including red blood cells, white blood cells and platelets;
- 5 (i) cells, including prokaryotic cells (including bacteria) and eukaryotic cells;
- (j) semen;
- (k) other biological materials, including nucleic acids, and lipid vesicles; and
- (l) foodstuffs.

The above is merely exemplary of some of the myriad of biological materials
10 that can be made into the preserved biological material compositions of the claimed invention using the protectant mixture, aqueous preservation medium and process of the claimed invention. Any biological material for which preservation for later use is desirable can be used with the protectant mixture, to form the preservation media, which can then be preserved by the preservation methods of the invention to form
15 preserved compositions.

Polyhydroxy Compound

Polyhydroxy compounds useful in the present invention include natural and synthetic monosaccharides and polysaccharides, other carbohydrates, and polyalcohols and their derivatives. Here, "polysaccharides" are defined as saccharides containing
20 two or more monosaccharide units. The individual polyhydroxy compounds can be used singly, or in combination with other types of polyhydroxy compounds. From the wide variety of useful polyhydroxy compounds, the use of monosaccharides and polysaccharides is preferred. Of the saccharides, disaccharides, such as trehalose,

WO 02/09515

PCT/US01/14939

maltose, lactose, and sucrose are preferred for use in the present invention, with trehalose being most preferred.

The amount of polyhydroxy compound present in the protectant mixture, preservation medium, and preserved composition of the present invention depends upon the specific polyhydroxy compounds, and biological material selected for use, as well as the mass of biological material being preserved. This can be adjusted and optimized for a given system.

Generally, the polyhydroxy compounds are present in the protectant mixture of the present invention in a total amount of from about 5% to about 60% by weight of the mixture, where the mixture is an aqueous solution. Where the protectant mixture is supplied as a solid, for example as a powder, the polyhydroxy compounds should be present in a total amount of from about 10% to about 95% by weight of the mixture, with an amount in the range of about 20% to about 95% by weight of the mixture being preferred. Where the protectant mixture is an aqueous solution, the polyhydroxy compounds are preferably present in a total amount such that the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 5% to about 40% by weight of the mixture, with an amount in the range of about 10% to about 30% by weight of the mixture being particularly preferred.

Likewise, the polyhydroxy compounds should be present in the preservation medium of the present invention in an amount such that the total amount of polyhydroxy compounds in the aqueous preservation medium is from about 5% to about 60% by weight of the aqueous preservation medium. Preferably, the total amount of polyhydroxy compound present should be from about 5% to about 40% by weight of

WO 02/09515

PCT/US01/14939

the aqueous preservation medium, with an amount in the range of about 10% to about 30% by weight of the aqueous preservation medium being particularly preferred.

It should be emphasized that the above ranges can be varied, for example, depending upon the amount of biological material in the preservation medium and the preservation method chosen for use.

Use of the above amounts of polyhydroxy compound in the aqueous preservation medium of the present invention will upon partial or complete removal of liquid water, result in a preserved biological material composition having from about 5% to about 95% polyhydroxy compound by weight of the composition. Again, this amount will depend on the mass of the biological material being preserved, the amount of phosphate present, and the amount of water removed from the system during preservation. The amount of polyhydroxy compound in the preserved biological composition can be determined from the amount present in the protectant mixture and/or aqueous preservation medium. Alternatively, the amount of polyhydroxy compound in the preserved biological material composition can be determined by analytical methods known in the art, such as column chromatography.

Phosphate Ions

Any source of phosphate ions can be used in the protectant mixture, preservation medium, preservation process, and preserved composition of the present invention.

While not wishing to be bound by any particular theory, it is believed that the phosphate ions form a complex with the polyhydroxy compound, which may contain several molecules of the polyhydroxy compound in a three-dimensional supermolecular structure cross-linked by the phosphate ions. The aqueous preservation medium has a

WO 02/09515

PCT/US01/14939

much higher viscosity than a system containing the polyhydroxy compound alone in the same amount, and the preserved biological material composition has a higher glass transition temperature (T_g) than a composition containing only the polyhydroxy compound.

5 As stated earlier, the phosphate ions can be provided from any source, including acids and salts. The use of sodium and potassium salts are preferred. Potassium salts are most preferred, because they have excellent solubility characteristics at low temperature, and crystallize as anhydrous crystals. Therefore, the phosphate ions are preferably provided through the use of sodium and/or potassium salts, with the use of a
10 mixture of monobasic and dibasic potassium phosphate being particularly preferred.

The amount of phosphate ion that is optimal for a given protectant mixture and/or preservation medium depends on several variables, including the specific biological material to be preserved, the amount and type of polyhydroxy compound in the protectant mixture and/or preservation medium, and the amount of biological
15 material in the system. Generally, phosphate ions should be present in the protectant mixture and/or aqueous preservation medium in a total amount such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625. Preferably, the phosphate ions are present in an amount such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from
20 about 0.0375 to about 0.625.

The molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound will remain substantially constant throughout the preservation process, resulting in a preserved biological material having substantially the same molar ratio of

WO 02/09515

PCT/US01/14939

phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound. Thus, the amount of phosphate ions present in the preserved biological material composition follows directly from the amount present in the aqueous preservation medium. Alternatively, the amount of phosphate ions in the preserved biological material composition can be
5 determined analytically by methods known in the art, including ion chromatography and chemiluminescence.

The useful amount of phosphate ions can also be determined on the basis of moles of phosphate ion per moles of the polyhydroxy compound by multiplying the above ratios by the number of hydroxyl groups present per mole of the polyhydroxy
10 compound being used. For example, trehalose and sucrose have 8 moles of hydroxyl groups per mole of compound. Therefore, where trehalose or sucrose is used as the polyhydroxy compound, the ratio of from about 0.025 to about 0.625 moles of phosphate ions per mole of hydroxyl groups can be achieved by adding sufficient phosphate ions to achieve a molar ratio of phosphate ions to sucrose or trehalose of
15 about 0.2 to about 5. For trehalose or sucrose, the preferred molar ratio of from about 0.0375 to about 0.625 translates to a molar ratio of phosphate ions to sucrose or trehalose of from about 0.3 to about 5.

It has been found that the effectiveness of the phosphate ions in stabilizing and preserving the structure and function of a given biological material increases as the
20 molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups increases from zero, but only up to a point (the optimum ratio), after which the use of additional phosphate ion provides no or only a slight increase in effectiveness. As discussed previously, the optimal ratio depends on several factors, including the amount and type of biological material used,

WO 02/09515

PCT/US01/14939

the amount and type of polyhydroxy compounds in the preservation medium, the pH of the preservation medium, and the preservation technique to be utilized.

The use of phosphate ions at a molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound that is higher than that found to be optimal for a given aqueous preservation medium of the present invention may, in many circumstances, still result, upon preservation, in a preserved biological material composition having improved structural and functional integrity, such as improved activity on rehydration, storage stability, or advantages in cost or processing over a preserved composition resulting from an aqueous preservation medium containing only the polyhydroxy compound. Therefore, it is preferred that the ratio for a given aqueous preservation medium of the present invention be less than or equal to that resulting in optimal stability and activity upon rehydration, with the use of the optimum ratio being most preferred. However, an aqueous preservation medium having a ratio greater than that needed for optimal activity of the preserved biological material upon rehydration can be used.

Other Components

The protectant mixture and/or aqueous preservation medium of the present invention can contain other components. For example, they may contain a buffer to maintain the pH of the medium at an optimal value for a given biological material. It should be noted that the phosphate ions in the mixture and/or medium function as a buffer as well, so additional non-phosphate buffers may not be needed. If a phosphate buffer is used, the amount of phosphate ions present in the buffer should be included in determining the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups of the polyhydroxy

WO 02/09515

PCT/US01/14939

compound in the mixture and/or aqueous preservation medium, as well as the resulting preserved biological material composition. The pH at which a given biological material is most stable is known in the art. Generally, the preservation media of the present invention should have a pH in the range from about 5 to about 10, with a pH in the
5 range from about 6 to about 9 being most preferred.

The protectant mixture and/or aqueous preservation medium may also contain one or more antioxidants, such as sodium thiosulfate, ascorbic acid, citric acid, and sodium citrate. If an antioxidant is used, it can be present in an amount known to be useful in the art.

10 The protectant mixture and/or aqueous preservation medium may also contain other components that may act as drying agents and/or osmoprotectants, such as methanol, ethanol, glycerol and DMSO. These components tend to reduce residual moisture or balance osmotic stresses in the preserved biological material compositions made from the aqueous preservation media of the present invention, which may in some
15 cases result in better storage capability.

Preparation of the Protectant Mixture, Aqueous Preservation Medium and Preserved Composition of the Present Invention

The protectant mixture of the present invention can be prepared as follows. The polyhydroxy compound and the source of phosphate ions are added in the desired
20 proportion to an aqueous solution. It is preferred that the phosphate ion source be dissolved in the solution prior to the addition of the polyhydroxy compound. The mixture may be heated if necessary to effect dissolution. The solution should be mixed thoroughly, until a homogenous protectant mixture is obtained. This protectant mixture

WO 02/09515

PCT/US01/14939

can then be stored as an aqueous solution, or can be subjected to various processes known in the art to produce a solid mixture, such as a powder. The powder can be anhydrous or a partially crystalline hydrated material. Where the protectant mixture is a solid, such as a powder, it should be reconstituted with an aqueous solution before it is
5 used to make the aqueous preservation medium of the present invention. However, the solid mixture can be directly added to an aqueous solution containing the biological material to form the aqueous present medium.

The protectant mixture in the form of an aqueous solution is then added to an aqueous solution of the biological material. If the protectant mixture was prepared in an
10 aqueous buffer solution, the aqueous solution of biological materials is preferably prepared in the same buffer. These two solutions are then thoroughly mixed, to form the aqueous preservation medium of the present invention. If an antioxidant is being used, it is generally added to the aqueous solution of biological material before addition of the protectant solution.

15 The amount of biological material used in the aqueous preservation medium of the present invention can be varied as desired, depending for example upon the specific biological material to be preserved, the amounts of phosphate ions and polyhydroxy compound present, the preservation technique to be employed.

The aqueous preservation medium can then be preserved by one or more
20 techniques known in the art, including freezing, freeze-drying, vacuum-drying, ambient, air-drying, and/or spray-drying, to provide a preserved biological material composition of the present invention. The resulting preserved biological material composition can be anhydrous, or can be a partially crystalline hydrated material. It is preferred that the

WO 02/09515

PCT/US01/14939

preserved biological material be substantially anhydrous in nature. Here, "substantially anhydrous" means that the preserved biological material composition contains less than 10% water measured by Karl Fisher analysis.

EXAMPLE 1

5 Various protectant mixtures in aqueous solution form were made in Butterfield's buffer (0.6mM potassium phosphate buffered water having a pH of 7.2), by adding predetermined amounts of a polyhydroxy compound and phosphate ions, and mixing to form a homogenous solution. A given protectant mixture was then added to an *L. acidophilus* cell solution in a 1:1 mass ratio, and the resulting aqueous protective
10 medium was thoroughly mixed and allowed to incubate at room temperature for 30 minutes. The *L. acidophilus* cell solution was prepared as follows: concentrated *L. acidophilus* bacterial cultures having a 15.3 wt% dry mass were mixed with 1.9% sodium thiosulfate to form an *L. acidophilus* cell solution and allowed to incubate at room temperature for 30 minutes.

15 Samples of each aqueous protective medium made in the above manner were then subjected to either freezing, freeze-drying or vacuum-drying.

For the samples that were frozen, the aqueous preservation medium was dripped through a 25 gauge syringe needle into liquid nitrogen. The drops usually formed pellets of 2-3 mm in diameter, which froze completely within about 10 seconds. These
20 samples of preserved cell composition were then allowed to thaw in open atmosphere at room temperature.

The samples that were freeze-dried were subjected to freezing as detailed above, and the resulting pellets were placed in a Virtis 12EL freeze dryer on precooled shelves

WO 02/09515

PCT/US01/14939

at a temperature no greater than -45°C . Additionally, small samples of the preservation medium were weighed to determine their density, and then freeze-dried as a thin layer in glass dishes. These samples were weighed before and after freeze-drying to calculate the amount of water lost by each sample during freeze-drying, and hence to determine
5 the amount of water needed for rehydration.

All of the freeze-dried samples were subjected to the following freeze-drying protocol, where the pressures and temperatures are set points. After the samples were placed in the freeze dryer as discussed above, the freeze dryer was evacuated with a pressure of 0 mtorr. The samples were held at -45°C and 0 mtorr for 1200 minutes,
10 after which the temperature and pressure were increased to -40°C and 20 mtorr, respectively, over a period of 50 minutes. The samples were then held at -40°C and 20 mtorr for 600 minutes. The temperature was then increased to -35°C over a period of 50 minutes, and the samples were then held at -35°C and 20 mtorr for 600 minutes. The temperature and pressure were next increased to -30°C and 50 mtorr, respectively,
15 over 50 minutes and the samples were then held at -30°C and 50 mtorr for 600 minutes. At the end of that period of time, the temperature and pressure were increased to -25°C and 100 mtorr, respectively, over 50 minutes, and the samples were held at -25°C and 100 mtorr for 600 minutes. The temperature was then increased to -20°C over 50 minutes, and the samples were then held at -20°C and 100 mtorr for 600 minutes. The
20 temperature was next increased to -10°C over 100 minutes, and the samples were held at that temperature and 100 mtorr for 600 minutes.

The samples were then increased to a final temperature of 40°C at a rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, at 50 mtorr. The samples were then held at the final temperature at 0 mtorr

WO 02/09515

PCT/US01/14939

for 1200-2400 minutes. The freeze dryer was then vented with nitrogen gas, and the preserved cell composition samples were removed, sealed in 50 ml plastic centrifuge tubes, and stored in a 37°C incubator.

For the samples that were subjected to vacuum drying, 0.2 ml of the preservation medium was placed in a 1.8 ml plastic microcentrifuge tube. The samples were then placed into a Savant Instruments SVC-100H SpeedVac Concentrator vacuum dryer and rotary evaporated at room temperature for approximately 4 days at a final pressure of 85 mtorr, to obtain preserved cell compositions. The tubes were then sealed, and stored at room temperature in a desiccator.

At the time the samples were made and subjected to freezing, vacuum-drying or freeze-drying, additional samples from the aqueous preservation media were taken, diluted, and plated on agar medium using a standard pour-plating technique to determine the viable cell number in the preservation medium prior to any preservation process being conducted. First, the samples were diluted to achieve a cell concentration of about 100 cells/ml. One or two milliliters of the diluted preservation medium were then placed in a petri dish and mixed with liquid agar growth medium (15 g/L agar with 55 g/L MRS Lactobacillus Broth and 0.1% L-cysteine) at 45°C. The dish was allowed to cool, solidifying the agar, at which time the dishes were inverted and placed in an anaerobic growth chamber (GasPak jar) at 37°C for 2-3 days, at which time colonies were visible in the agar. In principle, each colony represents a single viable cell in the preservation medium.

At various times, portions of the preserved cell compositions prepared by freeze-drying and vacuum drying were rehydrated in Butterfield's buffer. Freeze-dried

WO 02/09515

PCT/US01/14939

samples were rehydrated to approximately $1/100^{\text{th}}$ of their original concentration, allowed to incubate for 30 minutes, diluted, and plated as described above. Vacuum-dried samples were rehydrated to approximately $1/5^{\text{th}}$ their original concentration, mixed to fully dissolve the pellet, diluted, and plated as described above. All samples
5 were plated in at least triplicate. For these experiments, time zero is the time at which the samples were removed from the dryers. The preserved cell compositions that were prepared by freezing samples of the preservation medium in liquid nitrogen were plated as described above after complete thawing at room temperature had occurred.

The results for a given set of samples are set forth below in Table 1, where the
10 numbers represent the percent of original activity that was recovered upon rehydration. The "solution" column provides the amount of viable cells in a given preservation medium, with the amount of viable cells in the "cells alone" sample being defined as 100%.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

Table 1

Sample	Solution	Frozen	Vacuum Dried			Freeze Dried				
			Time=0	9 days	27 days	Time=0	9 days	28 days	64 days	101 days
Cells Alone	100	105	0	0	NA ¹	56	0	NA	NA	NA
20% Trehalose	96	97	10	7	NA	44	31	21	5	NA
+ thio										
20% Trehalose + borate (0.3) ² + thio ³	83	93	27	26	17	69	16	14	6	NA
20% Trehalose + NaH ₂ PO ₄ (0.1) ² +thio	89	88	12	6	NA	55	28	13	3	NA
20% Trehalose + NaH ₂ PO ₄ (0.3) ² +thio	94	88	5	1	NA	45	24	7	0	NA
20% Trehalose + NaH ₂ PO ₄ (0.5) ² +thio	77	95	3	2	NA	51	26	0	NA	NA
20% Trehalose + NaH ₂ PO ₄ (1.0) ² +thio	92	86	3	2	NA	71	4	NA	NA	NA
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ H PO ₄ (1.0) pH 5.6	103	105	51	48	39	84	72	58	17	0
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ H PO ₄ (1.0), pH 4.9	106	107	4	3	NA	82	65	24	0	NA
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ H PO ₄ (1.0), pH 6.6	93	106	52	59	73	82	76	70	67	57
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (1.0) pH 5.3	96	104	23	18	5	87	70	47	7	NA

5 ¹Numbers in parenthesis indicate the moles of phosphate ions per mole of trehalose. ² "thio" is shorthand for 1.9% sodium thiosulfate. ³ NA: Samples with <10% recovery were not assayed at later time points.

EXAMPLE 2

The procedure of Example 1 was repeated, using phosphate, carbonate, or sulfate ions with polyhydroxy compounds in varying amounts. The results for a given set of samples are set forth below in Table 2, where the numbers represent the percent of original activity that was recovered upon rehydration. The "solution" column provides the amount of viable cells in a given preservation medium, with the amount of

WO 02/09515

PCT/US01/14939

viable cells in the "cells alone" sample being defined as 100%.

Table 2

Sample	Solution	Frozen	Vacuum Dried			Freeze Dried ¹				
			Time=0	19 days	34 days	Time=0	19 days	38 days	74 days	99 days
Cells Alone	100	102	2			46	0	NA	NA	NA
20% Trehalose + thio	83	88	14	18	NA ⁴	52	13	13	5	NA
20% Sucrose + thio	100	103	4	NA	NA	80	33	19	20	15
20% Trehalose + borate(0.3) + thio ²	101	90	37	21	21	49	0	NA	NA	NA
20% Sucrose + borate(0.3) + thio	93	108	35	27	NA	55	3	NA	NA	NA
20% Trehalose ³ + Na ₂ CO ₃ (1.0) + thio	1	59	0	NA	NA	27	8	NA	NA	NA
20% Sucrose ³ + Na ₂ CO ₃ (1.0) + thio	1	34	0	NA	NA	16	0	NA	NA	NA
20% Trehalose + Na ₂ SO ₄ (0.75) + thio	87	92	24	21	18	73	1	NA	NA	NA
20% Sucrose + Na ₂ SO ₄ (0.75) + thio	91	86	8	NA	NA	66	7	NA	NA	NA
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0), pH 6.5	85	86	65	61	68	74	54	46	37	26
20% Sucrose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0), pH 6.5	93	90	51	34	NA	74	43	29	27	12

- 5 ¹Numbers in parenthesis indicate the moles of phosphate, carbonate or sulfate ions per mole of polyhydroxy compound. ² "thio" is shorthand for 1.9% sodium thiosulfate. ³The pH was not controlled for these samples. Indicator paper estimated the pH at ~11. This is likely the source of the poor recovery. ⁴ NA: Samples with <10% recovery were not assayed at later time points.

EXAMPLE 3

- 10 The procedure of Example 1 was repeated, using preservation media containing various sources of phosphate ions in varying amounts, and varying amounts of trehalose, with the exception that the freeze-dried samples were dried to 50°C. In addition, the residual water in the freeze-dried samples was measured by Karl Fischer (KF) analysis, and the glass transition temperature (T_g) was obtained. The results for a
- 15 given set of samples are set forth below in Table 3, where the numbers represent the

WO 02/09515

PCT/US01/14939

percent of original activity that was recovered upon rehydration. The "solution" column provides the amount of viable cells in a given preservation medium, with the amount of viable cells in the "cells alone" sample being defined as 100%.

Table 3

Sample	% water by FF	T _f (°C)	Solution	Frozen	Vacuum Dried			Freeze Dried			
					Time=3	19 days	95 days	Time=0	21 days	45 days	92 days
Cells Alone	0.8	47	100	10	0	NA	NA	22	0	NA	NA
20% Trehalose + thio	0.7	88	105	104	9	NA	NA	50	10	NA	NA
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (0.5) ¹ , pH 6.6	5.3	32	*	105	68	78	50	44	27	15	5
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.6	3.2	85	105	114	75	89	70	66	63	55	48
20% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.6 + Methanol	1.6	46	87	87	51	59	5	69	41	27	13
20% Trehalose + thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.6	3.5	82	97	110	70	63	54	70	60	61	49
5% Trehalose + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.6	3.8	44	108	110	35	19	27	51	26	9	NA

Note: ¹ Numbers in parenthesis indicate the moles of phosphate ions per mole of trehalose. "thio" is shorthand for 1.9% sodium thiosulfate. *This sample was improperly diluted, resulting in a recovery >400%.

EXAMPLE 4

- 10 The procedure of Example 1 was repeated, using varying amounts of trehalose and different phosphate ion sources in the preservation medium, with the exception that the freeze-dried samples were dried to a temperature of 50°C. In two samples, ethanol was added as a drying agent to the preservation medium, while in one sample, the *L. acidophilus* cells were "washed" (centrifuged, decanted and resuspended) to remove
- 15 residual growth medium. Media containing different buffers were also tested. The results for a given set of samples are set forth below in Table 4, where the numbers represent the percent of original activity that was recovered upon rehydration. The

WO 02/09515

PCT/US01/14939

“solution” column provides the amount of viable cells in a given preservation medium, with the amount of viable cells in the “cells alone” sample being defined as 100%.

Table 4

Sample	Solution	Frozen	Vacuum Dried		Time=0	Freeze Dried ¹		40 days	68 days
			40 days	68 days		14 days	40 days		
Cells Alone	100	116	0	NA	36	0	NA		
20% Trehalose + thio ²	89	98	22	8	73	28	4		
17.5% Trehalose + thio + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^3$, pH 6.5	101	120	41	55	85	23	22	7	
17.5% Trehalose + thio + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)$, pH 6.5 + Ethanol (1 mol/mol P)	98	112	0	NA	48	9	NA		
17.5% Trehalose + thio + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)$, pH 6.5 + Ethanol (2 mol/mol P)	89	95	0	NA	14	0	NA		
20% Trehalose + thio + $\text{K}_2\text{HPO}_4(1)$	106	97	55	44	77	30	63	54	
20% Trehalose + thio + $\text{K}_2\text{HPO}_4(1)$ + citric acid/NH ₄ OH buffering	59	49	4	NA	47	15	27	29	
20% Trehalose + thio + $\text{K}_2\text{HPO}_4(1)$ + lactic acid/NH ₄ OH buffering	59	48	3	NA	27	6	NA		
17.5% Trehalose + thio + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)$, pH 6.5 Washed Cells	97	122	40	41	80	30	20	6	

¹ Numbers in parenthesis indicate the moles of phosphate ions per mole of trehalose. ² “thio” is shorthand for 1.5% sodium thiosulfate. ³ NA: Samples with <10% recovery were not assayed at later time points.

EXAMPLE 5

The procedure of Example 1 was repeated, using trehalose, phosphate ions, and various antioxidants or no antioxidant, with the exception that the samples were freeze-dried to a temperature of 50°C. The results for a given set of samples are set forth below in Table 5, where the numbers represent percent of original activity that was recovered upon rehydration. The “solution” column provides the amount of viable cells in a given preservation medium, with the amount of viable cells in the “cells alone” sample being defined as 100%.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

TABLE 5

Sample	Solution	Frozen	Vacuum Dried			Freeze Dried		
			Time=0	9 days	25 days	Time=0	9 days	25 days
Cells Alone	100	100	0	0	0	1	0	0
20% Trehalose + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,2}	99	85	25	30	15	65	51	33
20% Trehalose + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,2} + thio ³	80	71	46	35	20	73	42	19
20% Trehalose + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,2} + ascorbic acid	95	82	33	30	16	61	38	25
20% Trehalose + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,2} + citric acid	80	75	16	24	11	49	17	3
20% Trehalose + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,2} + sodium citrate	88	76	42	24	10	74	46	12

Note: ¹Numbers in parenthesis indicate the moles of phosphate ions per mole of trehalose. ²"thio" is shorthand for sodium thiosulfate. ³The pH of the trehalose-phosphate was targeted at 6.5 but was not measured after addition of antioxidant or cells. The final pH was most likely between 6.0 and 6.5.

5

EXAMPLE 6

The procedure of Example 1 was repeated, with the exceptions that a

Pediococcus species was substituted for *L. acidophilus* cells, and the freeze-dried

samples were dried to a temperature of 25°C or further dried to 50°C. The results for a

10 given set of samples are set forth below in Table 6, where the numbers represent percent

of original activity that was recovered upon rehydration. The "solution" column

provides the amount of viable cells in a given preservation medium, with the amount of

viable cells in the "cells alone + thio" sample being defined as 100%.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

TABLE 6

Sample	Solution	Frozen	Vacuum Dried			Freeze Dried		Freeze Dried			
			Time=0	31 days	60 days	T _{inf} =25°C Time=0	T _{inf} =50°C Time=0	T _{inf} =25°C 31 days	T _{inf} =25°C 60 days	T _{inf} =50°C 31 days	T _{inf} =50°C 59 days
Cells Alone + thio ²	100	118	73	62	75	96	73	5		2	
20% Trehalose + thio ²	121	121	84	61	32	117	115	55	19	48	25
20% Trehalose + thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ^{1,3}	114	113	104	95	89	100	113	96	78	97	97
20% Trehalose + KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄ (1) ^{1,3} + 2% Cholic Acid	102	122	99	93	81	118	94	75	65	88	81

5 Note: ¹Numbers in parenthesis indicate the moles of phosphate ions per mole of trehalose. ²"thio" is shorthand for 1.9% sodium thiosulfate. ³The pH of the trehalose-phosphate was measured at 6.5 prior to mixing with cells. The final pH was most likely below 6.5.

EXAMPLE 7

- L-Lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27, Type II, rabbit muscle) was
- 10 dialyzed overnight at 4°C in 100 mM potassium phosphate buffer solution at pH 7.5.
- The total protein content was assayed using SIGMA DIAGNOSTIC, a protein
- determination kit purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri),
- using the modified biuret method of Ohnishi and Barr, "Simplified Method for
- Quantitating Protein using the Biuret and Phenol Reagents," *Analytical Biochem.*
- 15 86:193-200 (1978). The protein assay was conducted at the characteristic absorption at
- 725 nm at room temperature using a Varian UV Spectrophotometer. The reaction
- mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.150 mM NADH,
- and 1.20 mM pyruvic acid.

To prepare the samples, the dialyzed LDH was diluted with the same potassium

WO 02/09515

PCT/US01/14939

phosphate buffer that had been used for dialysis. The resulting enzyme solution had a phosphate ion concentration of 100 mM, and a LDH concentration of 50 µg/ml. Three sets of protectant mixtures were then made. The mixture sets had a trehalose concentration of 200 mM, 400 mM and 600 mM, respectively. Each mixture set

5 consisted of four separate protectant samples, containing phosphate ions in a concentration of 100 mM, 300 mM, 500 mM and 700 mM, respectively. These samples were made by dissolving the trehalose in an aqueous phosphate solution containing a given amount of phosphate ions.

Two milliliters of the LDH solution were then mixed with 2 ml of each of the

10 twelve protectant mixtures to provide 4 ml solutions of aqueous preservation media having a trehalose concentration of either 100 mM, 200 mM, or 300 mM, LDH concentration of 25 µg/ml, and phosphate ion concentrations of 100 mM, 200 mM, 300 mM or 400 mM. The above sample preparation is shown in Table 7.

Table 7

(Set 1)

Sample	1	2	3	4
Enzyme Solution	50 µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50 µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50 µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50 µg/ml LDH 100 mM Phosphate
Cryoprotective Solution	200 mM Trehalose 100 mM Phosphate	200 mM Trehalose 100+200 mM Phosphate	200 mM Trehalose 100+400 mM Phosphate	200 mM Trehalose 100+600 mM Phosphate
Mixture Solution	25 µg/ml LDH 100 mM Trehalose 100 mM Phosphate	25 µg/ml LDH 100 mM Trehalose 200 mM Phosphate	25 µg/ml LDH 100 mM Trehalose 300 mM Phosphate	25 µg/ml LDH 100 mM Trehalose 400 mM Phosphate

WO 02/09515

PCT/US01/14939

(Set 2)

Sample	1	2	3	4
Enzyme Solution	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate
Cryoprotective Solution	400mM Trehalose 100 mM Phosphate	400 mM Trehalose 100+200 mM Phosphate	400 mM Trehalose 100+400 mM Phosphate	400 mM Trehalose 100+600 mM Phosphate
Mixture Solution	25µg/ml LDH 200 mM Trehalose 100 mM Phosphate	25µg/ml LDH 200 mM Trehalose 200 mM Phosphate	25µg/ml LDH 200 mM Trehalose 300 mM Phosphate	25µg/ml LDH 200 mM Trehalose 400 mM Phosphate

(Set 3)

Sample	1	2	3	4
Enzyme Solution	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate	50µg/ml LDH 100 mM Phosphate
Cryoprotective Solution	600 mM Trehalose 100 mM Phosphate	600 mM Trehalose 100+200 mM Phosphate	600 mM Trehalose 100+400 mM Phosphate	600 mM Trehalose 100+600 mM Phosphate
Mixture Solution	25µg/ml LDH 300 mM Trehalose 100 mM Phosphate	25µg/ml LDH 300 mM Trehalose 200 mM Phosphate	25µg/ml LDH 300 mM Trehalose 300 mM Phosphate	25µg/ml LDH 300 mM Trehalose 400 mM Phosphate

5 Forty-eight vials were then prepared for each of the above samples of
 preservation media. Each vial was labeled and weighed, and 1 ml of preservation
 medium was pipetted into each vial. Each vial was then reweighed. The samples were
 then frozen by immersion of the vials in liquid nitrogen ("quench") or by placement in
 the freeze-dryer on precooled shelves at a temperature no greater than -45°C ("slow
 10 freeze"). All of the freeze-dried samples were subjected to the following freeze-drying
 protocol in a Virtis 12EL freeze-dryer, where all pressures and temperatures are set
 points. After the samples were placed in the freeze-dryer as discussed above, the
 freeze-dryer was evacuated with a pressure of 0 mtorr. The samples were held at -45°C

WO 02/09515

PCT/US01/14939

and 0 mtorr for 600 minutes, after which the temperature and pressure were increased to
-40°C and 20 mtorr, respectively, over a period of 50 minutes. The samples were
then held at -40°C and 20 mtorr for 600 minutes. The temperature was then increased
to -35°C over a period of 50 minutes, and the samples were then held at -35°C and 20
5 mtorr for 600 minutes. The temperature and pressure were next increased to -30°C and
50 mtorr, respectively, over 50 minutes and the samples were then held at -30°C and 50
mtorr for 600 minutes. At the end of that period of time, the temperature and pressure
were increased to -25°C and 100 mtorr, respectively, over 50 minutes, and the samples
were held at -25°C and 100 mtorr for 600 minutes. The temperature was then increased
10 to -20°C over 50 minutes, and the samples were then held at -20°C and 100 mtorr for
600 minutes. The temperature was next increased to -10°C over 100 minutes, and the
samples were held at that temperature and 100 mtorr for 600 minutes.

The samples were then increased to a temperature of 25°C at 50 mtorr over a
period of 700 minutes. The samples were then held at the final temperature at 0 mtorr
15 for 2140 minutes until unloading. The freeze dryer was then vented with nitrogen gas,
and the preserved LDH samples in the vials were removed and measured for LDH
activity. Before the activity was measured, each sample was weighed to determine the
amount of water loss, and rehydrated with purified water (MilliQ System from
Millipore Corp.) in the amount of the water that was lost. LDH activity was then
20 determined using the same method discussed previously.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

The results for a given set of samples are set forth in Fig. 1 (freeze-drying) and Fig. 2 (freezing).

EXAMPLE 8

L-Lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27, Type II, rabbit muscle) was
5 dialyzed overnight at 4°C in 100 mM potassium phosphate buffer solution at pH 7.5.
The total protein content was assayed using SIGMA DIAGNOSTIC, a protein
determination kit purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri),
using the modified biuret method of Ohnishi and Barr, "Simplified Method for
Quantitating Protein using the Biuret and Phenol Reagents," *Analytical Biochem.*
10 86:193-200 (1978). The protein assay was conducted at the characteristic absorption at
725 nm at room temperature using a Varian UV Spectrophotometer. The reaction
mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH7.5), 0.150 mM NADH, and
1.20 mM pyruvic acid.

To prepare the samples, LDH was added to four 50 ml containers and diluted
15 with the same potassium phosphate buffer that had been used for dialysis to make a 25
ml solution. In each of the samples, the enzyme concentration was 50µg/ml. Four
protectant mixtures having a volume of 25 ml were then prepared in 50 ml containers.
Each mixture contained 400 mM of trehalose, and varying amounts of phosphate ion.
To make the first mixture (reference), the trehalose was dissolved in 10 mM potassium
20 phosphate solution. For the second mixture, the trehalose was dissolved in 100 mM
potassium phosphate solution. The third and fourth mixtures were made by dissolving
the trehalose in 500 mM potassium phosphate solution and 900 mM potassium
phosphate solution, respectively.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

The LDH samples were then mixed with the protectant mixtures to provide 50 ml solutions of aqueous preservation media having a LDH concentration of 25 μ g/ml, a trehalose concentration of 200 mM and varying LDH and phosphate ion concentrations. The phosphate ion concentration for samples 1-4 was 10 mM, 100 mM, 300 mM, and 500 mM, respectively, for a phosphate ion to trehalose molar ratio of 0.05 for Sample 1, 0.5 for Sample 2, 1.5 for Sample 3, and 2.5 for Sample 4. The above sample preparation is shown below in Table 8.

Table 8

Sample	1	2	3	4
LDH Solution	50 μ g/ml LDH 10 mM phosphate	50 μ g/ml LDH 100 mM phosphate	50 μ g/ml LDH 100 mM phosphate	50 μ g/ml LDH 100 mM phosphate
Protectant Mixture	400 mM trehalose 10 mM phosphate	400 mM trehalose 100 mM phosphate	400 mM trehalose 500 mM phosphate	400 mM trehalose 900 mM phosphate
Preservation Medium	25 μ g/ml LDH 200 mM trehalose 10mM phosphate	25 μ g/ml LDH 200 mM trehalose 100 mM phosphate	25 μ g/ml LDH 200 mM trehalose 300 mM phosphate	25 μ g/ml LDH 200 mM trehalose 500 mM phosphate

Forty vials were then prepared for each of the above four samples of preservation media. Each vial was labeled and weighed, and 1 ml of preservation medium was pipetted into each vial. Each vial was then reweighed. The samples were then freeze-dried using the same protocol as described in Example 7.

After freeze-drying was complete, the preserved LDH samples in the vials were removed, the vials were sealed, and stored in either a 37°C incubator, a 30°C incubator

WO 02/09515

PCT/US01/14939

or at 4°C in a refrigerator.

LDH activity was then measured periodically for the samples. Before the activity was measured, each sample was weighed to determine the amount of water loss, and rehydrated with purified water (MilliQ System from Millipore Corp.) in the amount of the water that was lost. LDH activity was then determined using the same method discussed previously.

The results for a given set of samples are set forth in Figs. 3-5, where "Z" is the molar ratio of phosphate ions to trehalose.

EXAMPLE 9

The procedure of Example 1 was repeated. The results are set forth below in Table 9, where the numbers represent percent of original activity that was recovered upon rehydration. The "solution" column provides the amount of viable cells in a given preservation medium, with the amount of viable cells in the "cells alone" sample being defined as 100%.

TABLE 9

Sample	Solution	Frozen	Freeze Dried T= 3 days
Cells Alone	100	105	0
20% Trehalose	91	89	11
20% Trehalose + thio ²	59	77	8
20% Trehalose + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ¹ , pH 6.4	72	78	39
20% Trehalose + thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.4	54	61	41
Cells + KHPO ₄ /K ₂ HPO ₄ (Same phosphate per g cells as Samples 4,5 above)	89	90	7
20% Trehalose + thio + K ₂ HPO ₄ (1)	75	81	39

Note: Numbers in parenthesis indicate the moles of phosphate ions per mole of trehalose. ²"thio" is shorthand for 1.9% sodium thiosulfate.

EXAMPLE 10

Aqueous protectant mixtures containing 7.5% of sucrose or trehalose on a molar basis and varying amounts of phosphate ions provided by either potassium

WO 02/09515

PCT/US01/14939

monophosphate or potassium diphosphate were prepared, and 25 microliters of each mixture was sealed into an aluminum Differential Scanning Calorimetry pan. The samples were then quenched by immersion in liquid nitrogen and loaded into the Differential Scanning Calorimeter, which had been precooled to -140°C . The samples
5 were then scanned at a rate of $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to a temperature of 50°C , and the glass transition temperature (T_g) was determined. The results for each sample are shown in Fig. 6.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

CLAIMS

WE CLAIM:

- 5 1. An aqueous preservation medium for preserving biological materials, comprising:
- (a) a biological material;
 - (b) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 5% to about 60% by weight of the
 - 10 medium; and
 - (c) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the medium is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625.
- 15 2. The aqueous preservation medium of claim 1, where the pH of the medium is from about 5 to about 10.
3. The aqueous preservation medium of claim 1, where the polyhydroxy compound is selected from a group consisting of monosaccharides, disaccharides, and polysaccharides.
- 20 4. The aqueous preservation medium of claim 3, where the polyhydroxy compound is trehalose.
5. The aqueous preservation medium of claim 1, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 10% to about 30% by weight of the medium.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

6. The aqueous preservation medium of claim 3, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 10% to about 30% by weight of the medium.
7. The aqueous preservation medium of claim 1, where the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.0375 to about 0.625.
8. The aqueous preservation medium of claim 1, where the biological material is selected from the group consisting of cells, proteins, and enzymes.
9. An aqueous preservation medium for preserving biological materials, comprising:
- (a) a biological material;
 - (b) trehalose, where the trehalose is present in an amount from about 5% to about 60% by weight of the medium; and
 - (c) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the medium is such that the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.2 to about 5.
10. The aqueous preservation medium of claim 9, where the trehalose is present in an amount from about 10% to about 30% by weight of the medium.
11. The aqueous preservation medium of claim 10, where the pH is from about 5 to about 10.
12. The aqueous preservation medium of claim 9, where the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.3 to about 5.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

13. The aqueous preservation medium of claim 9, where the biological material is selected from the group consisting of cells, proteins, and enzymes.

14. A method of preparing a preserved biological material composition, comprising:

- 5 (a) forming an aqueous preservation medium comprising (i) a biological material; (ii) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 5% to about 60% by weight of the medium; and (iii) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the medium is such that the molar ratio of phosphate ions to
10 moles of hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625; and
(b) preserving the aqueous preservation medium using at least one preservation process.

15 15. The method of claim 14, where the preservation processes are one or more processes selected from the group consisting of freezing, freeze-drying, ambient-air drying, vacuum-drying, and spray drying.

16. The method of claim 14, where the pH of the medium is from about 5 to about 10.

20 17. The method of claim 14, where the polyhydroxy compound is selected from a group consisting of monosaccharides, disaccharides, and polysaccharides.

18. The method of claim 14, where the polyhydroxy compound is trehalose.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

19. The method of claim 14, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 10% to about 30% by weight of the medium.
20. The method of claim 17, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 10% to about 30% by weight of the medium.
- 5 21. The method of claim 14, where the molar ratio of phosphate ions to moles of hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.0375 to about 0.625.
22. The method of claim 14, where the biological material is selected from the group consisting of cells, proteins, and enzymes.
- 10 23. A method of preparing a preserved biological material composition comprising:
- (a) forming an aqueous preservation medium comprising (i) a biological material; (ii) trehalose, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 5% to about 60% by weight of the medium; and (iii)
- 15 phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the medium is such that the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.2 to about 5; and
- (b) preserving the aqueous preservation medium using at least one preservation process.
- 20 24. The method of claim 23, where the preservation processes are one or more processes selected from the group consisting of freezing, freeze-drying, ambient-air drying, vacuum-drying, and spray drying.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

25. The method of claim 23, where the trehalose is present in an amount from about 10% to about 30% by weight of the medium.
26. The method of claim 25, where the pH is from about 5 to about 10.
27. The method of claim 26, where the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.3 to about 5.
28. The method of claim 23, where the biological material is selected from the group consisting of cells, proteins, and enzymes.
29. A protectant mixture in solid form for use in preserving biological materials, comprising:
- 10 (a) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 10% to about 95% by weight of the mixture; and
- (b) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625.
- 15 30. The protectant mixture of claim 29, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 20% to about 95% by weight of the mixture.
31. The protectant mixture of claim 29, where the polyhydroxy compound is selected from a group consisting of monosaccharides and polysaccharides.
- 20 32. The protectant mixture of claim 31, where the polyhydroxy compound is trehalose.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

33. The protectant mixture of claim 29, where the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.0375 to about 0.625.

34. A protectant mixture in solid form for use in preserving biological materials, comprising:

(a) trehalose, where the trehalose is present in the mixture in an amount from about 10% to about 95% by weight of the mixture; and

(b) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.2 to about 5.

35. The protectant mixture of claim 34, where the trehalose is present in an amount from about 20% to about 95% by weight of the mixture.

36. The protectant mixture of claim 34, where the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.3 to about 5.

37. A protectant mixture in the form of an aqueous solution, comprising:

(a) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 5% to about 60% by weight of the mixture; and

(b) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

38. The protectant mixture of claim 36, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 10% to about 30% by weight of the mixture.

39. The protectant mixture of claim 37, where the polyhydroxy compound is selected from a group consisting of monosaccharides and polysaccharides.

40. The protectant mixture of claim 39, where the polyhydroxy compound is trehalose.

41. The protectant mixture of claim 37, where the molar ratio of phosphate ions to hydroxyl groups in the polyhydroxy compound is from about 0.0375 to about 0.625.

42. A protectant mixture in the form of an aqueous solution, comprising:

(a) trehalose, where the trehalose is present in the mixture in an amount from about 5% to about 60% by weight of the mixture; and

(b) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.2 to about 5.

43. The protectant mixture of claim 42, where the trehalose is present in an amount from about 10% to about 30% by weight of the mixture.

44. The protectant mixture of claim 42, where the molar ratio of phosphate ions to trehalose is from about 0.3 to about 5.

45. A preserved biological material composition made by the method of claim 14 or claim 23.

WO 02/09515

PCT/US01/14939

1/5

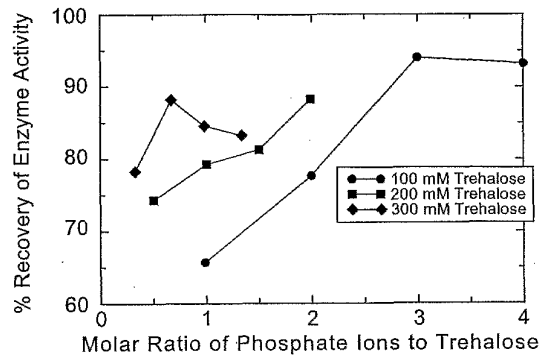


FIG. 1

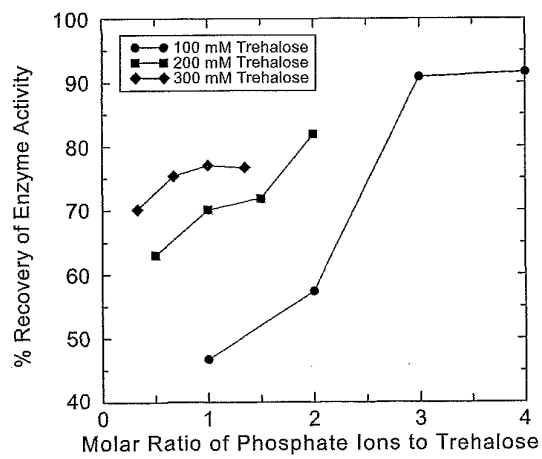


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/09515

PCT/US01/14939

2/5

Recovery of 25ug/ml LDH Protected by 200mM Trehalose after
being Stored at 37 Celcius Over Time

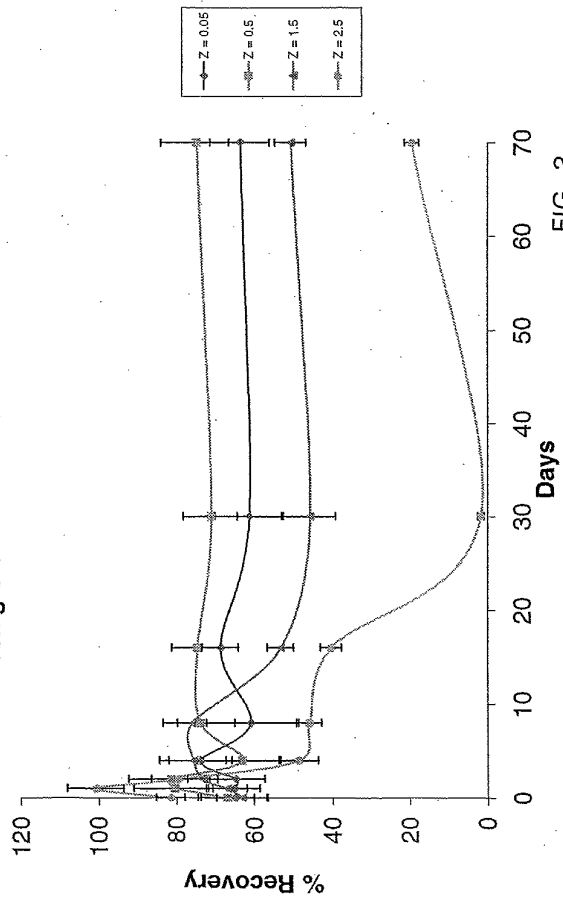


FIG. 3

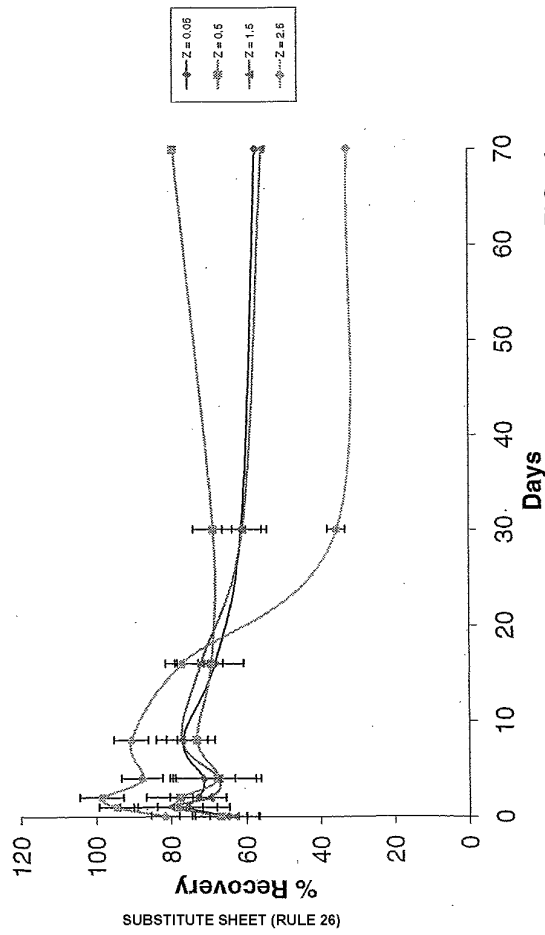
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/09515

PCT/US01/14939

3/5

Recovery of 25ug/ml LDH Protected by 200mM Trehalose after
being Stored at 30 Celcius Over Time.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/09515

PCT/US01/14939

4/5

Recovery of 25ug/ml LDH Protected by 200mM Trehalose after
being Stored at 4 Celcius Over Time.

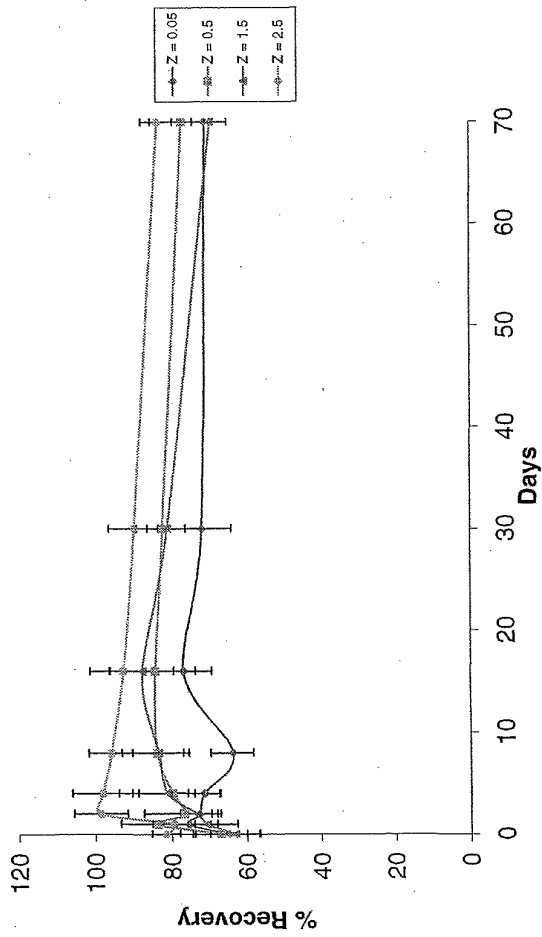


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/09515

PCT/US01/14939

5/5

Glass Transitions of Various Sugar-Ion Systems

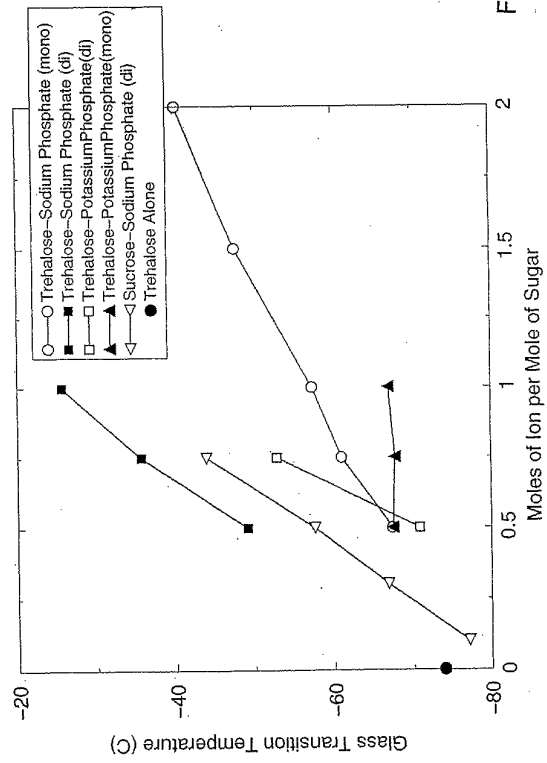


FIG. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/09515 A1

- (51) International Patent Classification^{*}: A01N 1/02 (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/14939 (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 9 May 2001 (09.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/625,735 26 July 2000 (26.07.2000) US
- (71) Applicant: WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION [US/US]; 614 North Walnut Street, Madison, WI 53707 (US).
- (72) Inventors: DEPABLO, Juan, J.; 2514 Chamberlain Avenue, Madison, WI 53705 (US). MILLER, Danforth, P.; 1016 Sylvan Drive, San Carlos, CA 94070 (US). CONRAD, Paul, B.; 4325 Daisy Drive, Madison, WI 53711 (US). CORTI, Horatio; Ayacucho 56 (1824) Lanus, Buenos Aires (AG).
- (74) Agent: WARD, Jeffrey, S.; Michael Best & Friedrich LLP, P.O. Box 1806, Madison, WI 53701-1806 (US).
- Published:
— with international search report
— with amended claims
- Date of publication of the amended claims: 27 June 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/09515 A1

(54) Title: PRESERVATION AND STORAGE MEDIUM FOR BIOLOGICAL MATERIALS

(57) Abstract: A protectant mixture for use in preserving biological material comprising (1) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the mixture is from about 5 % to about 60 % by weight of the mixture where the mixture is an aqueous solution and is from about 10 % to about 95 % where the mixture is in solid form, and (2) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxy groups in the polyhydroxy compound is from about 0.025 to about 0.625; a preservation medium comprising (1) a biological material, (2) at least one polyhydroxy compound, where the total amount of polyhydroxy compound in the medium is from about 5 % to about 60 % by weight of the medium, and (3) phosphate ions, where the total amount of phosphate ions in the mixture is such that the molar ratio of phosphate ions to hydroxy groups in the polyhydroxy compounds is from about 0.025 to about 0.625; methods of preserving the preservation medium; and the resulting preserved biological material composition.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
CT/US 01/14939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A01N1/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 20399 A (CIBA GEIGY AG ;ARVINTE TUDOR (CH)) 3 August 1995 (1995-08-03) page 1, paragraph 1 page 7, paragraph 3 - paragraph 8 page 8; example 1	1-28, 37-45
X	EP 0 580 444 A (MORISHITA PHARMA ;AJINOMOTO KK (JP)) 26 January 1994 (1994-01-26) page 2, line 17 - line 47 page 4; example 7 -/--	1-4,9, 12,14, 16-18, 23,37, 39-42, 44,45
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 January 2002		Date of mailing of the international search report 23/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lamers, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/14939

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 476 221 A (KANE ODILE B ET AL) 9 October 1984 (1984-10-09) column 2, line 10 - line 15 column 4, line 1 - line 12 -----	1-3,7,8, 14-17, 21,22, 37,39, 41,45
A	EP 0 356 257 A (CRYOPHARM CORP) 28 February 1990 (1990-02-28) column 3, line 28 -column 4, line 7 column 4, line 56 -column 7, line 10 example 6 -----	1-45
A	EP 0 508 496 A (CRYOPHARM CORP) 14 October 1992 (1992-10-14) claims 1-10 -----	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No.

rct/US 01/14939

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520399	A	03-08-1995	AT 201996 T 15-06-2001
			AU 1391595 A 15-08-1995
			CA 2181907 A1 03-08-1995
			DE 69521315 D1 19-07-2001
			DE 69521315 T2 31-10-2001
			DK 758905 T3 03-09-2001
			EP 0758905 A1 26-02-1997
			ES 2159621 T3 16-10-2001
			FI 962979 A 26-07-1996
			HU 74879 A2 28-02-1997
			WO 9520399 A1 03-08-1995
			JP 9508377 T 26-08-1997
			JP 2001026548 A 30-01-2001
			NO 963113 A 17-09-1996
			NZ 278433 A 24-03-1997
			ZA 9500577 A 26-07-1995
EP 0580444	A	26-01-1994	JP 6040801 A 15-02-1994
			DE 69308673 D1 17-04-1997
			DE 69308673 T2 16-10-1997
			EP 0580444 A1 26-01-1994
US 4476221	A	09-10-1984	FR 2529787 A1 13-01-1984
			FR 2542617 A2 21-09-1984
			AT 23092 T 15-11-1986
			CA 1200219 A1 04-02-1986
			DE 3367150 D1 04-12-1986
			EP 0099315 A2 25-01-1984
			JP 59021620 A 03-02-1984
			JP 63037086 B 22-07-1988
EP 0356257	A	28-02-1990	US 5045446 A 03-09-1991
			AT 120335 T 15-04-1995
			CA 1327763 A1 15-03-1994
			DE 68921945 D1 04-05-1995
			DE 68921945 T2 03-08-1995
			EP 0356257 A2 28-02-1990
			EP 0508496 A1 14-10-1992
			JP 2186981 A 23-07-1990
			JP 2809735 B2 15-10-1998
			US 5958670 A 28-09-1999
			US 5178884 A 12-01-1993
			US 5648206 A 15-07-1997
			US 6007978 A 28-12-1999
			US 5425951 A 20-06-1995
			ZA 8906467 A 30-05-1990
EP 0508496	A	14-10-1992	US 5045446 A 03-09-1991
			AT 120335 T 15-04-1995
			CA 1327763 A1 15-03-1994
			DE 68921945 D1 04-05-1995
			DE 68921945 T2 03-08-1995
			EP 0356257 A2 28-02-1990
			EP 0508496 A1 14-10-1992
			JP 2186981 A 23-07-1990
			JP 2809735 B2 15-10-1998
			US 5958670 A 28-09-1999
			US 5178884 A 12-01-1993

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersnational Application No
JP 2004-505024 A

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0508496 A		US 5648206 A	15-07-1997
		US 6007978 A	28-12-1999
		US 5425951 A	20-06-1995
		ZA 8906467 A	30-05-1990

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(72)発明者 デパブロ ジュアン ジェイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 0 5 マディソン チャンパレン アヴェニュー 2
5 1 4

(72)発明者 ミラー ダンフォース ピー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 7 0 サン カーロス シルヴァン ドライヴ 1 0
1 6

(72)発明者 コンラド ポール ビー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン デイジー ドライヴ 4 3 2 5

(72)発明者 コルティ ホラティオ

アルゼンチン ブエノス アイレス ラヌス アヤクチョ 5 6 (1 8 2 4)

F ターム(参考) 4H011 CA01 CB04 CD02