

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
【部門区分】第3部門第2区分  
【発行日】平成17年7月7日(2005.7.7)

【公表番号】特表2004-505024(P2004-505024A)  
【公表日】平成16年2月19日(2004.2.19)  
【年通号数】公開・登録公報2004-007  
【出願番号】特願2002-515080(P2002-515080)  
【国際特許分類第7版】  
A 0 1 N 1/02  
【F I】  
A 0 1 N 1/02

【手続補正書】  
【提出日】平成15年9月30日(2003.9.30)  
【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】特許請求の範囲  
【補正方法】変更  
【補正の内容】

【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0.0625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。

【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。

【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】

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。

【請求項8】

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0.5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9】

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8項記載の水性保存媒体。

【請求項10】

前記pHが、約5から約10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11】

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8項記載の水性保存媒体。

【請求項12】

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0.0625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。

【請求項13】

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12項記載の方法。

【請求項14】

前記媒体のpHが、約5から約10までである請求の範囲第12項記載の方法。

【請求項15】

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12項記載の方法。

【請求項16】

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12項記載の方法。

【請求項17】

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12項記載の方法。

【請求項18】

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15項記載の方法。

【請求項19】

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12項記載の方法。

【請求項20】

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0.5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。

## 【請求項 2 1】

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 2 0 項記載の方法。

## 【請求項 2 2】

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 2 0 項記載の方法。

## 【請求項 2 3】

前記 pH が、約 5 から約 10 までである請求の範囲第 2 2 項記載の方法。

## 【請求項 2 4】

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 2 0 項記載の方法。

## 【請求項 2 5】

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

(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 2 6】

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 2 5 項記載の保護剤混合物。

## 【請求項 2 7】

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 2 5 項記載の保護剤混合物。

## 【請求項 2 8】

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 2 7 項記載の保護剤混合物。

## 【請求項 2 9】

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 2 5 項記載の保護剤混合物。

## 【請求項 3 0】

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

(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 3 1】

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 3 0 項記載の保護剤混合物。

## 【請求項 3 2】

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 3 0 項記載の保護剤混合物。

## 【請求項 3 3】

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

(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 0.0625 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 3 4】

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 3 3 項記載の保護剤混合物。

【請求項 3 5】

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 3 3 項記載の保護剤混合物。

【請求項 3 6】

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 3 3 項記載の保護剤混合物。

【請求項 3 7】

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0.5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 3 8】

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 3 7 項記載の保護剤混合物。

【請求項 3 9】

請求の範囲第 1 2 項又は第 2 0 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。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 4】

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パスカル(0ミリトル)の圧力で排気した。サンプルを1200分間にわたって-45 で0パスカル(0ミリトル)に保持し、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2.7パスカル(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2.7パスカル(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2.7パスカル(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6.7パスカル(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6.7パスカル(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13.3パスカル(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13.3パスカル(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13.3パスカル(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13.3パスカル(100ミリトル)に保った。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【 0 0 2 5 】

次いでサンプルを6.7パスカル（50ミリトル）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パスカル（0ミリトル）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、11.3パスカル（85ミリトル）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。

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・ブロース及び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で見えた。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。

## 【 手 続 補 正 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 4 0

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 0 4 0 】

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ビルチス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パスカル（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パスカル（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2.7パスカル（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2.7パスカル（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2.7パスカル（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6.7パスカル（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6.7パスカル（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13.3パスカル（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13.3パスカル（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13.3パスカル（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13.3パスカル（100ミリトル）に保った。

## 【 手 続 補 正 5 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 4 1

【 補 正 方 法 】 変 更

## 【補正の内容】

## 【 0 0 4 1 】

次いでサンプルを700分間の期間にわたって6.7パスカル（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パスカル（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。