



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년10월31일
(11) 등록번호 10-0771388
(24) 등록일자 2007년10월24일

(51) Int. Cl.

A01N 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7000995

(22) 출원일자 2003년01월23일

심사청구일자 2006년05월08일

번역문제출일자 2003년01월23일

(65) 공개번호 10-2003-0031561

공개일자 2003년04월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2001/014939

국제출원일자 2001년05월09일

(87) 국제공개번호 WO 2002/09515

국제공개일자 2002년02월07일

(30) 우선권주장

09/625,735 2000년07월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO 95/20399 A

EP 0580444 A

전체 청구항 수 : 총 39 항

심사관 : 장정숙

(54) 생물학적 물질용 보존 및 저장 배지

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(1)(여기서, 당해 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은, 혼합물이 수용액인 경우, 혼합물의 약 5 내지 약 60중량%이고, 혼합물이 고체 형태인 경우, 혼합물의 약 10 내지 약 95중량%이다) 및

포스페이트 이온(2)(여기서, 당해 혼합물 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 약 0.025 내지 약 0.625로 되도록 하는 양이다)을 포함하는, 생물학적 물질 보존용 보호제 혼합물;

생물학적 물질(1),

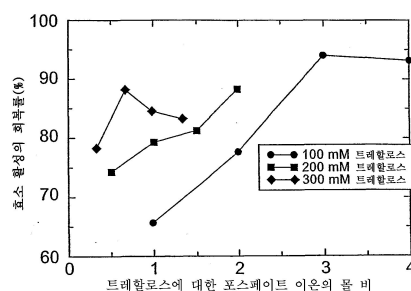
하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(2)(여기서, 당해 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 배지의 약 5 내지 약 60중량%이다) 및

포스페이트 이온(3)(여기서, 당해 배지 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 약 0.025 내지 약 0.625로 되도록 하는 양이다)을 포함하는 보존 배지;

당해 보존 배지의 보존방법 및

수득된 보존된 생물학적 물질 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

콘래드폴비

미국위스콘신주53711매디슨데이지드라이브4325

코르티호라티오

아르헨티나부에노스아이레스아야쿠초56(1824)라누스

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 싱가포르, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨, 안티구와바부다, 알제리, 벨리제, 모잠비크

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨, 모잠비크

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고

특허청구의 범위

청구항 1

생물학적 물질(a),

하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(b) 및

포스페이트 이온(c)을 포함하는 생물학적 물질 보존용 수성 보존 배지로서,

당해 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 배지의 5 내지 60중량%이고, 당해 배지 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.0625 내지 0.625로 되도록 하는 양인 생물학적 물질 보존용 수성 보존 배지.

청구항 2

제1항에 있어서, pH가 5 내지 10인 수성 보존 배지.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물이 단당류, 이당류 및 다당류로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 수성 보존 배지.

청구항 4

제3항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물이 트레할로스인 수성 보존 배지.

청구항 5

제1항에 있어서, 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량이 배지의 10 내지 30중량%인 수성 보존 배지.

청구항 6

제3항에 있어서, 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량이 배지의 10 내지 30중량%인 수성 보존 배지.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 생물학적 물질이 세포, 단백질 및 효소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 수성 보존 배지.

청구항 9

생물학적 물질(a),

트레할로스(b) 및

포스페이트 이온(c)을 포함하는 생물학적 물질 보존용 수성 보존 배지로서,

트레할로스는 당해 배지의 5 내지 60중량%의 양으로 존재하고, 당해 배지 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 트레할로스에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.5 내지 5로 되도록 하는 양인 생물학적 물질 보존용 수성 보존 배지.

청구항 10

제9항에 있어서, 트레할로스가 배지의 10 내지 30중량%의 양으로 존재하는 수성 보존 배지.

청구항 11

제10항에 있어서, pH가 5 내지 10인 수성 보존 배지.

청구항 12

삭제

청구항 13

제9항에 있어서, 생물학적 물질이 세포, 단백질 및 효소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 수성 보존 배지.

청구항 14

생물학적 물질(i),

하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(ii) 및

포스페이트 이온(iii)을 포함하는 수성 보존 배지를 제조하는 단계(a) 및

하나 이상의 보존방법을 사용하여 수성 보존 배지를 보존하는 단계(b)를 포함하는, 보존된 생물학적 물질 조성물의 제조방법으로서,

당해 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 배지의 5 내지 60중량%이고, 당해 배지 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.0625 내지 0.625로 되도록 하는 양인 보존된 생물학적 물질 조성물의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 보존방법이 동결, 동결건조, 대기건조, 진공건조 및 분무건조로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 방법인 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 배지의 pH가 5 내지 10인 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물이 단당류, 이당류 및 다당류로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제조방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물이 트레할로스인 제조방법.

청구항 19

제14항에 있어서, 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량이 배지의 10 내지 30중량%인 제조방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량이 배지의 10 내지 30중량%인 제조방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

제14항에 있어서, 생물학적 물질이 세포, 단백질 및 효소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제조방법.

청구항 23

생물학적 물질(i),

트레할로스(ii) 및

포스페이트 이온(iii)을 포함하는 수성 보존 배지를 제조하는 단계(a) 및

하나 이상의 보존방법을 사용하여 수성 보존 배지를 보존하는 단계(b)를 포함하는, 보존된 생물학적 물질 조성물의 제조방법으로서,

당해 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 배지의 5 내지 60중량%이고, 당해 배지 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 트레할로스에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.5 내지 5로 되도록 하는 양인 보존된 생물학적 물질 조성물의 제조방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 보존방법이 동결, 동결건조, 대기건조, 진공건조 및 분무건조로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 방법인 제조방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 트레할로스가 배지의 10 내지 30중량%의 양으로 존재하는 제조방법.

청구항 26

제25항에 있어서, pH가 5 내지 10인 제조방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

제23항에 있어서, 생물학적 물질이 세포, 단백질 및 효소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제조방법.

청구항 29

하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(a) 및

포스페이트 이온(b)을 포함하는, 생물학적 물질을 보존하는 데 사용되는 고체 형태의 보호제 혼합물로서,

당해 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 혼합물의 10 내지 95중량%이고, 당해 혼합물 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.025 내지 0.625로 되도록 하는 양인, 생물학적 물질을 보존하는 데 사용되는 고체 형태의 보호제 혼합물.

청구항 30

제29항에 있어서, 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량이 혼합물의 20 내지 95중량%인 보호제 혼합물.

청구항 31

제29항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물이 단당류 및 다당류로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 보호제 혼합물.

청구항 32

제31항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물이 트레할로스인 보호제 혼합물.

청구항 33

제29항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.0375 내지 0.625인 보호제 혼합물.

청구항 34

트레할로스(a) 및

포스페이트 이온(b)을 포함하는, 생물학적 물질을 보존하는 데 사용되는 고체 형태의 보호제 혼합물로서,

트레할로스는 당해 혼합물의 10 내지 95중량%의 양으로 존재하고, 당해 혼합물 중의 포스페이트 이온의 전체량

은, 트레할로스에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.2 내지 5로 되도록 하는 양인, 생물학적 물질을 보존하는데 사용되는 고체 형태의 보호제 혼합물.

청구항 35

제34항에 있어서, 트레할로스가 20 내지 95중량%의 양으로 존재하는 보호제 혼합물.

청구항 36

제34항에 있어서, 트레할로스에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.3 내지 5인 보호제 혼합물.

청구항 37

하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(a) 및

포스페이트 이온(b)을 포함하는, 수용액 형태의 보호제 혼합물로서,

당해 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 혼합물의 5 내지 60중량%이고, 당해 혼합물 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.0625 내지 0.625로 되도록 하는 양인, 수용액 형태의 보호제 혼합물.

청구항 38

제37항에 있어서, 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량이 혼합물의 10 내지 30중량%인 보호제 혼합물.

청구항 39

제37항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물이 단당류 및 다당류로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 보호제 혼합물.

청구항 40

삭제

청구항 41

제37항에 있어서, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.0375 내지 0.625인 보호제 혼합물.

청구항 42

트레할로스(a) 및

포스페이트 이온(b)을 포함하는, 수용액 형태의 보호제 혼합물로서,

트레할로스는 당해 혼합물의 5 내지 60중량%의 양으로 존재하고, 당해 혼합물 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 트레할로스에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 0.5 내지 5로 되도록 하는 양인, 수용액 형태의 보호제 혼합물.

청구항 43

제42항에 있어서, 트레할로스가 혼합물의 10 내지 30중량%의 양으로 존재하는 보호제 혼합물.

청구항 44

삭제

청구항 45

제14항 또는 제23항의 방법으로 제조한 보존된 생물학적 물질 조성물.

명세서

- <1> 발명의 분야 및 배경
- <2> 본 발명은 생물학적 물질을 동결, 건조 및 동결건조시켜 보존 및 안정화시키는 것에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 생물학적 물질을 보존하기 위한 보호제 혼합물 및 수성 보존 배지, 생물학적 물질의 보존방법 및 보존된 생물학적 물질 조성물 그 자체에 관한 것이다.
- <3> 생물학적 분자의 구조 및 기능의 보존은 생물학, 생화학 및 의학에 기본적으로 중요하다. 생물학적 물질, 예를 들면, 단백질, 효소, 세포, 조직, 핵산, 정액, 혈액 및 이의 구성성분, 포유동물 기관 및 식품은 종종 나중에 사용하도록 저장 및 보존해야 한다. 이들 생물학적 물질의 보존은 일반적으로 동결 또는 건조에 의해 달성되거나 이들 두 가지 공정을 조합하여 달성된다. 통상적으로 사용되는 건조 기술이 몇가지 있다: 이동하는 기체 스트림 속으로 증발시켜 건조시키는 기술(대기건조), 주위 온도에서 진공 건조시키는 기술(진공건조) 또는 미세 미스트 점적을 따뜻한 공기와 접촉시켜 건조시키는 기술(분무건조). 건조공정이 유해하거나 불필요한 경우, 종종 간단한 동결공정을 수행한다. 특정 생물학적 물질은, 먼저 샘플을 동결시킨 후 진공하에 저온에서 건조시키는 2단계 공정을 동결건조공정으로 가장 양호하게 보존된다.
- <4> 대부분의 생물학적 물질의 구조 및 기능은 이들의 수성 환경에 따라 달라진다. 따라서, 동결 및 건조 공정에 의한 수성 환경의 변화는 생물학적 물질에 대해 상당한 영향을 미치는 경우가 종종 있다. 또한, 동결건조시 동결 및 건조 둘 다에 의한 응력이 합쳐진다. 당해 방법의 동결 단계는 단백질과 효소의 변성 및 세포 파괴와 같은 바람직하지 않은 부작용을 일으킬 수 있다. 이러한 부작용은 당해 물질 중의 얼음의 결정화에 의해 유도된 기계적, 화학적 및 삼투압에 의한 응력으로부터 발생한다. 결과적으로, 재수화시 생물학적 물질의 활성이 완전히 소실되거나, 당해 물질이 더 이상 이의 의도한 목적에 유용하지 않을 정도로 상당히 소실된다.
- <5> 재구성 또는 재수화시의 역효과를 방지하거나 감소시키기 위해 보호제, 예를 들면, 동결방지제 또는 항냉동제(동결건조)를 사용한다. 이러한 보호제가 유효하기 위해서는 보존 과정 동안의 농도에서 생물학적 물질에 무독성이어야 하며, 물 및 생물학적 물질과 유리하게 상호작용해야 한다. 당해 분야에서 각종 보호제가 사용되어 왔으며 이들의 성공 정도는 다양하다. 여기에는 어류 단백질, 특정 중합체, 탈지유, 글리세롤, 디메틸 설폭사이드 및 이당류, 예를 들면, 트레할로스가 포함된다. 불행하게도, 적합한 보호제 및 냉동보존(cryopreservation) 프로토콜은 단지 한정된 수의 시스템에 대하여 개발되어 왔다.
- <6> 이당류, 예를 들면, 수크로스 및 트레할로스는 천연 동결방지제이다. 트레할로스는 실제로 가뭄기 동안 가사 상태인 동물 및 식물로부터 분리되므로 특히 관심을 끄는 동결방지제이다. 트레할로스는 대기건조 및 동결건조 둘 다에 있어서 다양한 생물학적 물질에 대한 유효한 보호제인 것으로 나타났다. 조사에 의하면 트레할로스 존재하에 건조된 리포솜은 재수화시 이의 기능적 및 구조적 본질을 모두 유지하는 것으로 나타났다[참조: Crowe, J.H. Crowe., L.M., and Mouriadian, R., Cryobiology, 20, 346-356(1983)]. 미국 특허 제5,556,771호에는 트레할로스 또는 트레할로스와 폴리비닐 피롤리돈과의 혼합물을 사용하여 리버스 트랜스크립타제 및 RNA 폴리머라제를 보존하는 것이 기재되어 있다. 미국 특허 제5,512,547호에는 트레할로스를 사용하여 보툴리눔 신경독소를 보존하는 것이 기재되어 있다. 또한, 미국 특허 제4,891,319호에는 트레할로스를 사용하여 단백질 및 기타 생물학적 거대분자, 예를 들면, 효소, 혈청, 혈청 보체, 항체, 항원, 형광 단백질 및 백신 구성성분을 보호하는 방법이 기재되어 있다. 특히, 거대분자 및 트레할로스를 함유하는 수성 혼합물을 수성 시스템의 0.05 내지 약 20중량%의 트레할로스의 존재하에 빙점보다 높은 온도에서 건조시킨다.
- <7> 그러나, 트레할로스를 단독의 동결방지제로서 사용하는 것과 관련하여 몇가지 단점이 있다. 동결건조로 다수의 생물학적 물질을 보존하기 위해서는 다량의 트레할로스를 사용해야 한다; 해당 보존 배지의 60중량%를 초과하는 농도의 트레할로스가 간혹 필요하다. 이 경우에는 비용이 많이 든다. 추가로, 트레할로스의 농도가 높으면 당해 시스템 내의 다른 용질의 용해도가 감소된다.
- <8> 따라서, 트레할로스를 중합체성 겔화제, 예를 들면, 카복시메틸셀룰로즈 또는 카복시에틸셀룰로즈와 조합하여 사용하는 것이 제안되었다. 사람 혈액의 경우, 순수한 트레할로스보다 중합체와 조합된 다당류가 훨씬 더 유효한 동결방지제인 것으로 제안되었다[참조: 미국 특허 제5,171,661호; Sutton, R.L., J. Chem. Soc. Faraday Trans., 87, 3747(1991)]. 불행하게도, 겔화제의 유리한 효과를 확인하고자 한 시도는 성공하지 못했다[참조: 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)]. 또한, 중합체 겔화제는 인체가 잘 수용하지 않기 때문에 당해 보호제 혼합물은 의약적 목적으로 사용할 수 없다. 결과적으로, 이러한 혼합물은 매우 유용하지는 않으며, 트레할로스만을 사용하는 경우보다, 설사 실질적으로 개선된다 하더라도 상당히 개선되지는 않는다.

- <9> 트레할로스의 사용과 관련하여 더욱 심각한 또 다른 문제는 트레할로스만을 사용하여 보존된 생물학적 물질, 특히 대기 온도 이상 및/또는 습윤 환경에서 저장된 것들은 장기간 동안 저장하기에는 안정하지 않다. 즉, 트레할로스를 사용하여 보존된 생물학적 물질은 저장 조건의 습도 및 온도에 따라, 수시간 또는 수일 내에 활성이 소실될 수 있다.
- <10> 따라서, 현재 트레할로스를 사용하는 동결건조는 생물학적 물질, 예를 들면, 단백질, 효소, 세포, 조직, 핵산, 정액, 혈액 및 이의 구성성분, 포유동물 기관 및 식품을 광범위한 저장 조건에서 장기 저장하는 데 사용하기에는, 당해 물질이 분해되고 재구성시 충분한 활성을 갖지 않기 때문에 제한적이다. 우선 당해 물질을 보존하는 이유 중 하나가 저장 안정성 제품을 제공하는 것이므로, 실질적인 관점에서 이는 의약품용으로 명백히 허용되지 않는다.
- <11> 현재 다양한 온도에서의 다수의 건조 기술이 유효하게 사용될 수 있는 것은 아니다. 이들 방법은 동결건조보다 덜 복잡하고 비용이 덜 들지만, 일반적으로 생물학적 물질을 더 파괴한다. 주위 온도에서 수행되는 방법을 사용하여 보존시키는 경우, 동결건조가 수행되는 경우보다 다수의 생물학적 물질에 총체적 구조 변화 및 바람직하지 않은 반응이 일어나기 쉽다. 결과적으로 현재 공지된 보호제가 사용되더라도, 다수의 재수화된 생물학적 물질의 활성은 그 자체로 불만족스럽고 동결건조로 보존하는 경우보다 상당히 더 낮다.
- <12> 따라서, 광범위한 생물학적 물질에 유용한 보호제 혼합물이 요구되고 있다. 동결건조공정 및 주위 온도 건조를 포함하는 건조공정 둘 다에 효율적으로 사용할 수 있는 보호제 혼합물이 더욱 요구되고 있다. 또한, 현재 사용되는 것들보다 더 저렴한 보호제 혼합물이 요구되고 있다. 마지막으로, 매우 중요하게도, 재료의 선적 및 저장 동안 나타날 수 있는 승온 및 다양한 정도의 습도에서 장기간에 걸쳐 생물학적 물질을 보존하면서, 재수화시 여전히 상당한 활성을 유지시키는 안전한 배지를 제공하는 보호제 혼합물이 요구되고 있다.
- <13> 이러한 모든 요구는 본 발명의 보호제 혼합물, 수성 보호 배지 및 이로써 수득된 보존된 생물학적 물질 조성물에 의해 충족된다.
- <14> 발명의 요약
- <15> 하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(a)(여기서, 당해 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은, 혼합물이 수용액인 경우, 혼합물의 약 5 내지 약 60중량%이고, 혼합물이 고체 형태인 경우, 약 10 내지 약 95중량%이다) 및
- <16> 포스페이트 이온(b)(여기서, 당해 혼합물 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 약 0.025 내지 약 0.625로 되도록 하는 양이다)을 포함하는, 생물학적 물질 보존용 보호제 혼합물을 광범위하고 다양한 생물학적 물질에 사용하여 수성 보존 배지를 제공할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이어서, 당해 수성 보존 배지를 동결, 동결건조 및 다른 건조 공정, 예를 들면, 분무건조, 진공건조 또는 대기건조를 포함하는 다수의 보존방법에서 사용하여 중요한 생물학적 물질의 안정하고 보존된 조성물을 제공할 수 있다. 당해 보존된 조성물은 대기 온도 이상 및/또는 상대 습도에서 장기간 동안 안정하다. 추가로, 보존된 생물학적 물질 조성물이 재수화되는 경우, 보존된 생물학적 물질의 구조적 및 기능적 본질은 생물학적 물질이 이의 의도된 목적을 위해 사용될 수 있는 정도로 유지된다.
- <17> 따라서, 본 발명은 또한 위에 기재된 보존 배지로부터, 보존된 생물학적 물질 조성물을 제조하는 방법 및 당해 보존된 생물학적 물질 조성물 자체를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- <18> 도 1은 다양한 양 및 몰 비의 포스페이트와 트레할로스를 사용하여 제조한 동결건조된 락테이트 데하이드로게나제 조성물로부터의 활성 회복률(%)을 나타낸 그래프이다.
- <19> 도 2는 다양한 양 및 몰 비의 포스페이트와 트레할로스를 사용하여 제조한 동결된 락테이트 데하이드로게나제 조성물로부터의 활성 회복률(%)을 나타낸 그래프이다.
- <20> 도 3은 다양한 양 및 몰 비의 포스페이트와 트레할로스를 사용하여 제조한 동결건조된 락테이트 데하이드로게나제 조성물로부터의 시간 경과에 따른 활성 회복률(%)을 나타낸 그래프이다.

- <21> 도 4는 다양한 양 및 물 비의 포스페이트와 트레할로스를 사용하여 제조한 동결건조된 락테이트 데하이드로게나제 조성물로부터의 시간 경과에 따른 활성 회복률(%)을 나타낸 그래프이다.
- <22> 도 5는 다양한 양 및 물 비의 포스페이트와 트레할로스를 사용하여 제조한 동결건조된 락테이트 데하이드로게나제 조성물로부터의 시간 경과에 따른 활성 회복률(%)을 나타낸 그래프이다.
- <23> 도 6은 본 발명의 각종 보호제 혼합물의 유리 전이 온도를 나타낸 그래프이다.
- <24> 바람직한 양태의 기재
- <25> 본 발명은 생물학적 물질을 본 발명의 보호제 혼합물과 조합하여 수성 보존 배지를 형성시키는 경우, 생물학적 물질이 실질적인 활성을 유지하면서 보존될 수 있으며, 또한 본 발명의 수성 보존 배지에 동결건조, 대기건조, 진공건조 및 분무건조를 포함하는 각종 건조 기술(1) 또는 당해 분야에 공지된 다른 보존방법, 예를 들면, 동결 공정(2)을 수행하여, 보존된 생물학적 물질 조성물로 제조할 수 있다는 놀라운 발견을 근거로 한다. 본 발명의 보호제 혼합물은 하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(a)(여기서, 당해 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은, 혼합물이 수용액인 경우, 혼합물의 약 5 내지 약 60중량%이고, 혼합물이 고체 형태인 경우, 약 10 내지 약 95중량%이다) 및 포스페이트 이온(b)(여기서, 당해 혼합물 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 약 0.025 내지 약 0.625로 되도록 하는 양이다)을 포함한다. 본 발명의 수성 보존 배지는 생물학적 물질(a), 하나 이상의 폴리하이드록시 화합물(여기서, 당해 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 배지의 약 5 내지 약 60중량%이다) 및 포스페이트 이온(c)(여기서, 당해 배지 중의 포스페이트 이온의 전체량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 약 0.025 내지 약 0.625로 되도록 하는 양이다)을 포함한다.
- <26> 생물학적 물질
- <27> 광범위한 범위의 생물학적 물질을 본 발명의 보호제 혼합물과 함께 사용하여 본 발명의 수성 보존 배지를 제조할 수 있다. 이어서, 당해 보존 배지에 본 발명의 방법을 수행하여, 보존된 생물학적 물질 조성물을 제조할 수 있다. 이들 생물학적 물질은
- <28> 효소, 예를 들면, 락테이트 데하이드로게나제 및 포스포프락토키나제(a),
- <29> 단백질, 예를 들면, 인슐린(b),
- <30> 혈청 보체(c),
- <31> 백신(d),
- <32> 피부, 정맥 및 동맥을 포함하는 조직(e),
- <33> 바이러스, 예를 들면, 아데노바이러스(f),
- <34> 포유 동물 기관, 예를 들면, 간, 췌장 및 폐(g),
- <35> 혈액 및, 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 포함하는 혈액의 구성성분(h),
- <36> 원핵 세포(세균 포함) 및 진핵 세포를 포함하는 세포(i),
- <37> 정액(j),
- <38> 핵산 및 지질 비이클을 포함하는 기타 생물학적 물질(k) 및
- <39> 식품(l)을 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다.
- <40> 위의 기재는 단지 본 발명의 보호제 혼합물, 수성 보존 배지 및 방법을 사용하여, 청구된 본 발명의 보존된 생물학적 물질 조성물로 제조할 수 있는 다수의 생물학적 물질 중 일부를 예시한 것이다. 나중에 사용하기 위해 보존해야 하는 임의의 생물학적 물질을, 보호제 혼합물과 함께 사용하여 보존 배지를 형성시킬 수 있으며, 이어서 이를 본 발명의 보존방법으로 보존시켜 보존된 조성물을 형성시킬 수 있다.
- <41> 폴리하이드록시 화합물

- <42> 본 발명에 유용한 폴리하이드록시 화합물은 천연 및 합성 단당류 및 다당류, 기타 탄수화물, 및 다가 알콜 및 이의 유도체를 포함한다. 여기서, "다당류"는 둘 이상의 단당류 단위를 함유하는 당류로서 정의된다. 각각의 폴리하이드록시 화합물을 단독으로 사용하거나, 다른 종류의 폴리하이드록시 화합물과 조합하여 사용할 수 있다. 광범위하고 유용한 폴리하이드록시 화합물 중에서, 단당류 및 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. 당류 중에서 이당류, 예를 들면, 트레할로스, 말토스, 락토스 및 수크로스가 본 발명에 사용하기에 바람직하며, 트레할로스가 가장 바람직하다.
- <43> 본 발명의 보호제 혼합물, 보존 배지 및 보존된 조성물에 존재하는 폴리하이드록시 화합물의 양은 사용하기 위해 선택한 특정 폴리하이드록시 화합물 및 생물학적 물질 뿐만 아니라, 보존되는 생물학적 물질의 질량에 따라 달라진다. 이의 양은 주어진 시스템에 따라 조절되고, 최적화될 수 있다.
- <44> 일반적으로, 본 발명의 보호제 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은, 당해 혼합물이 수용액인 경우, 혼합물의 약 5 내지 약 60중량%이다. 보호제 혼합물이 고체, 예를 들면, 분말로서 제공되는 경우, 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 혼합물의 약 10 내지 약 95중량%이어야 하고, 바람직하게는 혼합물의 약 20 내지 약 95중량%이다. 보호제 혼합물이 수용액인 경우, 혼합물 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 바람직하게는 혼합물의 약 5 내지 약 40중량%이고, 특히 바람직하게는 혼합물의 약 10 내지 약 30중량%이다.
- <45> 또한, 본 발명의 수성 보존 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 전체량은, 수성 보존 배지의 약 5 내지 약 60중량% 이어야 한다. 존재하는 폴리하이드록시 화합물의 전체량은 바람직하게는 수성 보존 배지의 약 5 내지 약 40중량%이고, 특히 바람직하게는 수성 보존 배지의 약 10 내지 약 30중량%이어야 한다.
- <46> 상기 범위는, 예를 들면, 보존 배지 중의 생물학적 물질의 양 및 사용하기 위해 선택한 보존방법에 따라 달라질 수 있다는 사실을 강조한다.
- <47> 액체인 물을 일부 또는 완전히 제거할 경우, 본 발명의 수성 보존 배지에 폴리하이드록시 화합물을 상기 양으로 사용하면, 폴리하이드록시 화합물이 약 5 내지 약 95중량%인 보존된 생물학적 물질 조성물이 수득된다. 다시 말하지만, 당해 양은 보존되는 생물학적 물질의 질량, 존재하는 포스페이트의 양, 및 보존 동안 시스템으로부터 제거된 물의 양에 따라 달라진다. 보존된 생물학적 조성물 중의 폴리하이드록시 화합물의 양은 보호제 혼합물 및/또는 수성 보존 배지에 존재하는 양으로부터 측정할 수 있다. 또한, 보존된 생물학적 물질 조성물 중의 폴리하이드록시 화합물의 양은 컬럼 크로마토그래피와 같은 당해 분야에 공지된 분석방법을 사용하여 측정할 수 있다.
- <48> 포스페이트 이온
- <49> 임의의 포스페이트 이온 공급원을 본 발명의 보호제 혼합물, 보존 배지, 보존방법 및 보존된 조성물에 사용할 수 있다. 어떤 특정 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 포스페이트 이온은 폴리하이드록시 화합물과 착물을 형성하고, 당해 착물은 포스페이트 이온에 의해 가교결합된 3차원 초분자 구조(supermolecular structure) 중에 수 개의 폴리하이드록시 화합물 분자를 함유할 수 있는 것으로 생각된다. 당해 수성 보존 배지는 동량의 폴리하이드록시 화합물만을 함유하는 시스템보다 점도가 훨씬 더 높고, 보존된 생물학적 물질 조성물은 폴리하이드록시 화합물만을 함유하는 조성물보다 유리 전이 온도(T_g)가 더 높다.
- <50> 위에 언급한 바와 같이, 포스페이트 이온은 산 및 염을 포함하는 임의의 공급원으로부터 제공될 수 있다. 나트륨염 및 칼륨염을 사용하는 것이 바람직하다. 칼륨염이 저온에서 용해 특성이 우수하고, 무수 결정으로서 결정화되기 때문에 가장 바람직하다. 따라서, 나트륨염 및/또는 칼륨염을 사용하여 포스페이트 이온을 제공하는 것이 바람직하고, 일염기성 및 이염기성 인산칼륨의 혼합물을 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- <51> 당해 보호제 혼합물 및/또는 보존 배지에 대한 포스페이트 이온의 최적량은, 보존하고자 하는 특정 생물학적 물질, 보호제 혼합물 및/또는 보존 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 양과 종류, 및 당해 시스템 중의 생물학적 물질의 양을 포함하는 몇가지 변수에 따라 달라진다. 일반적으로, 보호제 혼합물 및/또는 수성 보존 배지 중의 포스페이트 이온의 총량은, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 약 0.025 내지 약 0.625가 되도록 하는 양이어야 한다. 바람직하게는, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 약 0.0375 내지 약 0.625가 되도록 하는 양이어야 한다.
- <52> 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비는 보존과정 전체에 걸쳐서 실질적으로 일정하게 유지되어, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 몰 비가 실

질적으로 동일한 보존된 생물학적 물질이 수득된다. 따라서, 보존된 생물학적 물질 조성물 중에 존재하는 포스페이트 이온의 양은 수성 보존 배지 중에 존재하는 양에 그대로 따라간다. 또한, 보존된 생물학적 물질 조성물 중의 포스페이트 이온의 양은 이온 크로마토그래피 및 화학발광법을 포함하는 당해 분야의 공지된 방법으로 분석 측정할 수 있다.

<53> 또한, 폴리하이드록시 화합물 1mol당 포스페이트 이온의 mol 수를 기준으로 한 포스페이트 이온의 유용한 양은, 상기 물 비와, 사용된 폴리하이드록시 화합물 1mol당 존재하는 하이드록실 그룹의 수를 곱하여 측정할 수 있다. 예를 들면, 트레할로스 및 수크로스는 화합물 1mol당 8mol의 하이드록실 그룹을 갖는다. 따라서, 트레할로스 또는 수크로스를 폴리하이드록시 화합물로서 사용하는 경우, 트레할로스 또는 수크로스에 대한 포스페이트 이온의 물 비가 약 0.2 내지 약 5가 되게 하기에 충분한 포스페이트 이온을 가하여, 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 물 비가 약 0.025 내지 약 0.625가 되게 할 수 있다. 트레할로스 또는 수크로스의 경우, 바람직한 물 비가 약 0.0375 내지 약 0.625인 것은 트레할로스 또는 수크로스에 대한 포스페이트 이온의 물 비가 약 0.3 내지 약 5인 것으로 해석된다.

<54> 당해 생물학적 물질의 구조 및 기능을 안정화시키고 보존하는 데 있어서 포스페이트 이온의 유효성은 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 물 비가 0으로부터 증가함에 따라 증가하지만, 단지 특정 지점(최적 비)까지만 증가하며 그 이후에는 포스페이트 이온을 추가로 사용하더라도 유효성이 전혀 증가하지 않거나 단지 약간만 증가한다. 앞서 논의한 바와 같이, 최적 비는 사용된 생물학적 물질의 양과 종류, 보존 배지 중의 폴리하이드록시 화합물의 양과 종류, 보존 배지의 pH 및 사용하는 보존 기술을 포함하는 몇가지 인자에 따라 달라진다.

<55> 포스페이트 이온을, 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 물 비가 본 발명의 해당 수성 보존 배지에 최적인 것으로 밝혀진 물 비보다 더 높게 되는 양으로 사용하는 경우, 단지 폴리하이드록시 화합물만을 함유하는 수성 보존 배지로부터 수득된 보존된 조성물보다, 보존시 여전히 다수의 상황에서, 구조적 및 기능적 본질, 예를 들면, 재수화시의 활성, 저장 안정성 또는 비용 또는 가공 면에서의 이점이 향상된다. 따라서, 본 발명의 해당 수성 보존 배지에 대한 비는 재수화시의 최적 안정성 및 활성을 제공하는 비 이하인 것이 바람직하며, 최적의 비를 사용하는 것이 가장 바람직하다. 그러나, 재수화시 보존된 생물학적 물질의 최적 활성에 필요한 것보다 더 높은 비를 갖는 수성 보존 배지를 사용할 수 있다.

<56> 기타 성분

<57> 본 발명의 보호제 혼합물 및/또는 수성 보존 배지는 기타 성분을 함유할 수 있다. 예를 들면, 이들은 배지의 pH를 해당 생물학적 물질에 대한 최적 값으로 유지시키기 위해 완충액을 함유할 수 있다. 당해 혼합물 및/또는 배지 중의 포스페이트 이온도 완충제로서 작용하여, 추가의 비-포스페이트 완충액(non-phosphate buffer)이 필요하지 않을 수 있다는 것을 주지해야 한다. 포스페이트 완충액이 사용되는 경우, 완충액 중에 존재하는 포스페이트 이온의 양은 혼합물 및/또는 수성 보존 배지 뿐만 아니라, 수득된 생물학적 물질 조성물에서 폴리하이드록시 화합물 중의 하이드록실 그룹에 대한 포스페이트 이온의 물 비를 측정할 때 포함되어야 한다. 해당 생물학적 물질이 가장 안정한 pH는 당해 분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 본 발명의 보존 배지의 pH 범위는 약 5 내지 약 10이어야 하고, 가장 바람직한 범위는 약 6 내지 약 9이다.

<58> 보호제 혼합물 및/또는 수성 보존 배지는 또한 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 나트륨 티오설페이트, 아스코르브산, 시트르산 및 나트륨 시트레이트를 함유할 수 있다. 산화방지제가 사용되는 경우, 산화방지제는 당해 분야에 공지된 유용한 양으로 존재할 수 있다.

<59> 보호제 혼합물 및/또는 수성 보존 배지는 또한, 건조제 및/또는 삼투억제제(osmoprotectant)로서 작용할 수 있는 기타 성분, 예를 들면, 메탄올, 에탄올, 글리세롤 및 DMSO를 함유할 수 있다. 이들 성분은 본 발명의 수성 보존 배지로부터 제조된, 보존된 생물학적 물질 조성물에서 잔류 수분 또는 균형 삼투압에 의한 응력(balance osmotic stress)을 감소시키는 경향이 있고, 이로써 어떤 경우에는 저장 능력이 더욱 양호해 질 수 있다.

<60> 본 발명의 보호제 혼합물, 수성 보존 배지 및 보존된 조성물의 제조

<61> 본 발명의 보호제 혼합물은 다음과 같이 제조할 수 있다. 폴리하이드록시 화합물 및 포스페이트 이온 공급원을 목적하는 비율로 수용액에 가한다. 포스페이트 이온 공급원을 용액에 용해시킨 후 폴리하이드록시 화합물을 가하는 것이 바람직하다. 경우에 따라, 당해 혼합물을 가열하여 용해시킬 수 있다. 당해 용액을 완전히 혼합하여 균일한 보호제 혼합물을 수득해야 한다. 이어서, 당해 보호제 혼합물을 수용액으로서 저장하거나, 당해 분야에 공지되어 있는 각종 방법을 수행하여 고체 혼합물, 예를 들면, 분말을 제조할 수 있다. 분말은 무수 상태이거나 부분 결정성 수화물일 수 있다. 보호제 혼합물이 고체, 예를 들면, 분말인 경우, 이를 수용액으로 재구

성한 후, 이를 사용하여 본 발명의 수성 보존 배지를 제조해야 한다. 그러나, 고체 혼합물을 생물학적 물질을 함유하는 수용액에 직접 가하여 수성 보존 배지를 형성시킬 수 있다.

<62> 이어서, 수용액 형태의 보호제 혼합물을 생물학적 물질의 수용액에 가한다. 보호제 혼합물이 수성 완충액 중에서 제조된 경우, 생물학적 물질의 수용액을 바람직하게는 동일한 완충액 중에서 제조한다. 이어서, 이들 두 가지 용액을 완전히 혼합하여 본 발명의 수성 보존 배지를 형성시킨다. 산화방지제가 사용되는 경우, 일반적으로 이를 생물학적 물질의 수용액에 가한 후, 보호제 용액을 가한다.

<63> 본 발명의 수성 보존 배지 중에 사용된 생물학적 물질의 양은, 예를 들면, 보존할 특정 생물학적 물질, 존재하는 포스페이트 이온과 폴리하이드록시 화합물의 양 및 사용할 보존 기술에 따라 원하는 대로 변화시킬 수 있다.

<64> 이어서, 동결, 동결건조, 진공건조, 대기건조 및/또는 분무건조를 포함하는 당해 분야에 공지되어 있는 하나 이상의 기술을 사용하여 수성 보존 배지를 보존하여 본 발명의 보존된 생물학적 물질 조성물을 제공할 수 있다. 수득된 보존된 생물학적 물질 조성물은 무수 상태이거나 부분 결정성 수화물일 수 있다. 바람직하게는, 보존된 생물학적 물질은 본래 실질적으로 무수 상태이다. 본원에서 "실질적으로 무수"라는 것은 칼 피셔(Karl Fischer) 분석법으로 측정된 보존된 생물학적 물질 조성물의 수분 함량이 10% 미만임을 의미한다.

<65> 실시예 1

<66> 버터필드 완충액(Butterfield's buffer)(pH가 7.2인 0.6mM 인산칼륨 완충액)에 소정량의 폴리하이드록시 화합물과 포스페이트 이온을 가하고 혼합하여 균질 용액을 제조함으로써 수용액 형태의 각종 보호제 혼합물을 제조한다. 이어서, 해당 보호제 혼합물을 락토바실러스 아시도필러스(L. acidophilus) 세포 용액에 1:1 질량 비로 가하고, 수득된 수성 보호 배지를 완전히 혼합한 후, 실온에서 30분 동안 배양한다. L. 아시도필러스 세포 용액은 다음과 같이 제조한다: 건조 질량이 15.3중량%인 농축 L. 아시도필러스 세균 배양물을 1.9%의 나트륨 티오설페이트와 혼합하여 L. 아시도필러스 세포 용액을 제조하고 실온에서 30분 동안 배양한다.

<67> 이어서, 위와 같은 방식으로 제조한 각각의 수성 보호 배지 샘플에 동결, 동결건조 또는 진공건조 공정을 수행한다.

<68> 동결된 샘플의 경우, 수성 보존 배지를 25게이지의 주사 바늘을 통해 액체 질소에 적가한다. 점적은 일반적으로 직경이 2 내지 3mm인 펠렛을 형성하고, 약 10초 내에 완전히 동결된다. 이어서, 보존된 세포 조성물 샘플을 실온의 개방된 대기 중에서 해동시킨다.

<69> 동결건조된 샘플은 위에 상세하게 기재된 바와 같이 동결시키고, 수득된 펠렛을 -45℃ 이하의 온도에서 예냉시킨 선반 위의 버티스(Virtis) 12EL 동결건조기 속에 넣는다. 추가로, 소형 보존 배지 샘플을 계량하여 이의 밀도를 측정 한 후, 유리 접시에 박층으로서 동결건조시킨다. 이들 샘플을 동결건조 전후에 계량하여 동결건조 동안의 각각의 샘플의 소실된 수분량을 계산하여, 재수화에 필요한 수분량을 측정한다.

<70> 모든 동결건조된 샘플에 아래의 동결건조 프로토콜(여기서, 압력 및 온도는 고정된 점이다)을 수행한다. 샘플을 위에 논의한 바와 같이 동결건조기에 넣은 후, 동결건조기를 0mtorr의 압력으로 탈기시킨다. 샘플을 -45℃ 및 0mtorr에서 1200분 동안 유지시킨 후, 각각 50분에 걸쳐서 온도 및 압력을 -40℃ 및 20mtorr로 상승시킨다. 이어서, 샘플을 -40℃ 및 20mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도를 50분에 걸쳐서 -35℃로 상승시킨 후, -35℃ 및 20mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도 및 압력을 각각 50분에 걸쳐서 -30℃ 및 50mtorr로 상승시킨 후, 샘플을 -30℃ 및 50mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 당해 유지 시간의 말기에 온도 및 압력을 각각 50분에 걸쳐서 -25℃ 및 100mtorr로 상승시키고, 샘플을 -25℃ 및 100mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도를 50분에 걸쳐서 -20℃로 상승시킨 후, 샘플을 -20℃ 및 100mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도를 100분에 걸쳐서 -10℃로 상승시키고, 샘플을 -10℃ 및 100mtorr에서 600분 동안 유지시킨다.

<71> 이어서, 샘플을 50mtorr에서 0.5℃/분의 속도로 최종 온도 40℃로 상승시킨다. 이어서, 샘플을 당해 최종 온도 및 0mtorr에서 1200 내지 2400분 동안 유지시킨다. 이어서, 동결건조기를 질소 기체를 사용하여 배출(venting)시키고, 보존된 세포 조성물 샘플을 꺼내어 50ml 용량의 플라스틱 원심분리관 속에 밀봉한 후, 37℃의 배양기 속에 저장한다.

<72> 진공건조된 샘플의 경우, 보존 배지 0.2ml를 1.8ml 용량의 플라스틱 미세원심분리관 속에 넣는다. 이어서, 샘플을 새반트 인스트루먼트(Savant Instruments) SVC-100H 스피드백 컨센트레이터(SpeedVac Concentrator) 진공

건조기에 넣고 실온에서 약 4일 동안 최종 압력 85mtorr에서 회전 증발시켜, 보존된 세포 조성물을 수득한다. 이어서, 당해 판을 밀봉하고 데시케이터 속에서 실온에서 저장한다.

<73> 샘플을 제조하여 동결, 진공건조 또는 동결건조시킬 때, 수성 보존 배지로부터 추가의 샘플을 취하여 희석시키고, 표준 부어심기 평판배양(pour-plating) 기술을 사용하여 한천 배지 상에 평판배양하여, 보존 배지 중의 생존 세포 수를 측정 한 후, 보존 과정을 수행한다. 먼저, 샘플을 희석시켜 약 100개의 세포/ml의 세포 농도가 되게 한다. 이어서, 희석시킨 보존 배지 1ml 또는 2ml를 페트리 디쉬에 넣고 45℃에서 액체 한천 성장 배지[55g/ℓ MRS 락토바실러스 액체 배지 및 0.1% L-시스테인을 포함하는 한천 15g/ℓ]와 혼합한다. 당해 페트리 디쉬를 냉각시키고 한천을 고화시키되, 이때 페트리 디쉬를 비협기성 성장 챔버[가스팩 자(GasPak jar)] 속에서 2 내지 3일 동안 37℃에서 거꾸로 방치하며, 이때 육안으로 한천에 콜로니가 보인다. 원칙적으로, 각각의 콜로니는 보존 배지 내의 하나의 생존 세포를 나타낸다.

<74> 동결건조 및 진공건조시켜 제조된, 보존된 세포 조성물 일부를 다양한 시점에서 버터필드 완충액 속에서 재수화시킨다. 동결건조된 샘플은 이들의 최초의 농도의 약 1/100로 재수화시키고 30분 동안 배양하고 희석시킨 후, 위에 기재된 바와 같이 평판배양한다. 진공건조된 샘플은 이들의 최초의 농도의 약 1/5로 재수화시키고, 혼합하여 펠렛을 완전히 용해시키고 희석시킨 후, 위에 기재된 바와 같이 평판배양한다. 모든 샘플을 3만복 이상 평판배양한다. 당해 시험의 경우, 0시간은 샘플을 건조기로부터 꺼낸 시점이다. 실온에서 완전히 해동시킨 후, 액체 질소 중에서 보존 배지 샘플을 동결시켜 제조한 보존된 세포 조성물을 위에 기재한 바와 같이 평판배양한다.

<75> 해당 샘플 세트에 대한 결과를 표 1에 나타내었으며, 여기서 숫자는 재수화시의 초기 활성의 회복률(%)을 나타낸다. "용액"란에 해당 보존 배지 중의 생존 세포의 양이 기재되어 있고, "세포 단독" 샘플 내의 생존 세포의 양을 100%로서 정의한다.

표 1

샘플	용액	동결	진공건조			동결건조				
			시간=0	9 일	27 일	시간=0	9 일	28 일	64 일	101 일
세포 단독	100	105	0	0	NA ³	56	0	NA	NA	NA
20% 트레할로스 + thio	96	97	10	7	NA	44	31	21	5	NA
20% 트레할로스 + 보레이트 (0.3) ¹ + thio ²	83	93	27	26	17	69	16	14	6	NA
20% 트레할로스 + NaH ₂ PO ₄ (0.1)+thio	89	88	12	6	NA	55	28	13	3	NA
20% 트레할로스 + NaH ₂ PO ₄ (0.3)+thio	94	88	5	1	NA	45	24	7	0	NA
20% 트레할로스 + NaH ₂ PO ₄ (0.5)+thio	77	95	3	2	NA	51	26	0	NA	NA
20% 트레할로스 + NaH ₂ PO ₄ (1.0)+thio	92	86	3	2	NA	71	4	NA	NA	NA
20% 트레할로스 + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0) pH 5.6	103	105	51	48	39	84	72	58	17	0
20% 트레할로스 + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0), pH 4.9	106	107	4	3	NA	82	65	24	0	NA
20% 트레할로스 + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0), pH 6.6	93	106	52	59	73	82	76	70	67	57
20% 트레할로스 + thio + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (1.0) pH 5.3	96	104	23	18	5	87	70	47	7	NA

¹ 발효 속의 숫자는 트레할로스 1mol당 포스페이트 이온의 mol 수를 나타냄.

² thio*는 1.9% 나트륨 티오설파이트에 대한 약칭임.

³ NA: 회복률<10%인 샘플은 이후의 시점에서 검정하지 않음.

<76>

<77> 실시예 2

<78> 포스페이트, 카보네이트 또는 설페이트 이온을 폴리하이드록시 화합물과 함께 다양한 양으로 사용하여 실시예 1

의 방법을 반복 수행한다. 해당 샘플 세트에 대한 결과를 표 2에 나타내었으며, 여기서 숫자는 재수화시의 초기 활성의 회복률(%)을 나타낸다. "용액"란에 해당 보존 배지 중의 생존 세포의 양이 기재되어 있고, "세포 단독" 샘플 내의 생존 세포의 양을 100%로서 정의한다.

표 2

샘플	용액	동결	진공건조			동결건조 ⁴				
			시간=0	19일	34일	시간=0	19일	38일	74일	99일
세포 단독	100	102	2			46	0	NA	NA	NA
20% 트레할로스 + thio	83	88	14	18	NA ⁴	52	13	13	5	NA
20% 수크로스 + thio	100	103	4	NA	NA	80	33	19	20	15
20% 트레할로스 + 보레이트 (0.3) ¹ + thio ²	101	90	37	21	21	49	0	NA	NA	NA
20% 수크로스 + 보레이트 (0.3) + thio	93	108	35	27	NA	55	3	NA	NA	NA
20% 트레할로스 ³ + Na ₂ CO ₃ (1.0) + thio	1	59	0	NA	NA	27	8	NA	NA	NA
20% 수크로스 ³ + Na ₂ CO ₃ (1.0) + thio	1	34	0	NA	NA	16	0	NA	NA	NA
20% 트레할로스 + Na ₂ SO ₄ (0.75) + thio	87	92	24	21	18	73	1	NA	NA	NA
20% 수크로스 + Na ₂ SO ₄ (0.75) + thio	91	86	8	NA	NA	66	7	NA	NA	NA
20% 트레할로스 + 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% 수크로스 + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1.0), pH 6.5	93	90	51	34	NA	74	43	29	27	12

¹ 괄호 속의 숫자는 폴리하이드록시 화합물 1mol당 포스페이트, 카보네이트 또는 설페이트 이온의 mol 수를 나타냄.
² *thio*는 1.9% 나트륨 티오설페이트에 대한 약칭임.
³ 이들 샘플의 경우 pH는 조절하지 않음. 지시 증이로 평가한 결과 pH는 약 11임. 이는 불량한 회복률의 원인인 것 같음.
⁴ NA: 회복률<10%인 샘플은 이후의 시점에서 검정하지 않음.

실시예 3

다양한 양의 각종 포스페이트 이온 공급원 및 다양한 양의 트레할로스를 함유하는 보존 배지를 사용하여 실시예 1의 방법을 반복 수행하되, 단 동결건조된 샘플을 50℃로 건조시킨다. 추가로, 동결건조된 샘플의 잔류수를 칼 피셔(KF) 분석법으로 측정하고 유리 전이 온도(T_g)를 구한다. 해당 샘플 세트에 대한 결과를 표 3에 나타내었으며, 여기서 숫자는 재수화시의 초기 활성의 회복률(%)을 나타낸다. "용액"란에 해당 보존 배지 중의 생존 세포의 양이 기재되어 있고, "세포 단독" 샘플 내의 생존 세포의 양을 100%로서 정의한다.

표 3

샘플	물(%) (KF법)	T _g (°C)	용액	동결	진공건조			동결건조 ³			
					시간=3	19일	95일	시간=0	21일	48일	92일
세포 단독	0.8	47	100	10	0	NA	NA	22	0	NA	NA
20% 트레할로스+ thio	0.7	88	105	104	9	NA	NA	50	10	NA	NA
20%트레할로스 + thio ² + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HP O ₄ (0.5) ¹ , ph 6.6	5.3	32	*	105	68	78	50	44	27	15	5
20% 트레할로스+ thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HP O ₄ (1), pH 6.6	3.2	85	105	114	75	89	70	66	63	55	48
20%트레할로스 + thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HP O ₄ (1), pH 6.6 + 매탄올	1.6	46	87	87	51	59	5	69	41	27	13
20%트레할로스+ 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% 트레할로스+ thio + NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HP O ₄ (1), pH 6.6	3.8	44	108	110	35	19	27	51	26	9	NA

주: ¹ 발효 속의 숫자는 트레할로스 1mol당 포스페이트 이온의 mol 수를 나타냄.
² thio²는 1.9% 나트륨 티오설파이트에 대한 약칭임.
³ 이들 샘플은 부적합하게 회석되어 회복률>400%이다.

<82>

<83>

실시예 4

<84>

보존 배지 중에 다양한 양의 트레할로스 및 상이한 포스페이트 이온 공급원을 사용하여 실시예 1의 방법을 반복 수행하되, 단 동결건조된 샘플을 50℃의 온도로 건조시킨다. 2개 샘플의 경우, 에탄올을 보존 배지에 건조제로서 가하는 반면, 1개 샘플의 경우, L. 아시도필러스 세포를 "세척"(원심분리, 경사 및 재현탁)하여 잔존 성장 배지를 제거한다. 상이한 완충액을 함유하는 배지도 시험한다. 해당 샘플 세트에 대한 결과를 표 4에 나타내었으며, 여기서 숫자는 재수화시의 초기 활성의 회복률(%)을 나타낸다. "용액"란에 해당 보존 배지 중의 생존 세포의 양이 기재되어 있고, "세포 단독" 샘플 내의 생존 세포의 양을 100%로서 정의한다.

표 4

샘플	용액	동결	진공건조			동결건조 ³			
			40일	68일	시간=0	14일	40일	68일	
세포 단독	100	116	0	NA	36	0	NA		
20% 트레할로스 + thio ²	89	98	22	8	73	28	4		
17.5% 트레할로스 + thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ¹ , pH 6.5	101	120	41	55	65	85	23	22	7
17.5% 트레할로스 + thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.5 + 에탄올 (1 mol/mol P)	98	112	0	NA		48	9	NA	
17.5% 트레할로스 + thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.5 + 에탄올 (2 mol/mol P)	89	95	0	NA		14	0	NA	
20% 트레할로스 + thio + K ₂ HPO ₄ (1)	106	97	55	44	30	77	50	63	54
20% 트레할로스 + thio + K ₂ HPO ₄ (1) + 시트르산 /NH ₃ OH 완충액	59	49	4	NA		47	15	27	29
20% 트레할로스 + thio + K ₂ HPO ₄ (1) + 락트산 /NH ₃ OH 완충액	59	48	3	NA		27	6	NA	
17.5% 트레할로스 + thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.5 세척된 세포	97	122	40	41	24	80	30	20	6

¹ 발효 속의 숫자는 트레할로스 1mol당 포스페이트 이온의 mol 수를 나타냄.
² thio²는 1.9% 나트륨 티오설파이트에 대한 약칭임.
³ NA: 회복률<10%인 샘플은 이후의 시점에서 검정하지 않음.

<85>

<86>

실시예 5

<87>

각종 산화방지제의 존재 또는 부재하에 트레할로스 및 포스페이트 이온을 사용하여 실시예 1의 방법을 반복 수행하되, 단 샘플을 50℃로 동결건조시킨다. 해당 샘플 세트에 대한 결과를 표 5에 나타내었으며, 여기서 숫자는 재수화시의 초기 활성의 회복률(%)을 나타낸다. "용액"란에 해당 보존 배지 중의 생존 세포의 양이 기재되어 있고, "세포 단독" 샘플 내의 생존 세포의 양을 100%로서 정의한다.

표 5

샘플	용액	동결	진공건조			동결건조		
			시간=0	9일	25일	시간=0	9일	25일
세포 단독	100	100	0	0	0	1	0	0
20% 트레할로스 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^{1,3}$	99	85	25	30	15	65	51	33
20% 트레할로스 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^{1,3}$ + thio ²	80	71	46	35	20	73	42	19
20% 트레할로스 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^{1,3}$ + 아스코르브산	95	82	33	30	16	61	38	25
20% 트레할로스 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^{1,3}$ + 시트르산	80	75	16	24	11	49	17	3
20% 트레할로스 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^{1,3}$ + 나트륨 시트레이트	88	76	42	24	10	74	46	12

주: ¹괄호 속의 숫자는 트레할로스 1mol당 포스페이트 이온의 mol 수를 나타냄.
²thio*는 나트륨 티오설파이트에 대한 약칭임.
³트레할로스-포스페이트의 pH는 6.5를 목표로 하지만, 산화방지제 또는 세포의 첨가 후 측정하지 않았다.
최종 pH는 6.0 내지 6.5일 가능성이 높다.

<88>

<89>

실시예 6

<90>

실시예 1의 방법을 반복 수행하되, 단 L. 아시도필러스 세포를 페디오코커스(Pediococcus) 종으로 대체하고, 동결건조된 샘플을 25℃의 온도로 건조시키거나 추가로 50℃ 건조시킨다. 해당 샘플 세트에 대한 결과를 표 6에 나타내었으며, 여기서 숫자는 재수화시의 초기 활성의 회복률(%)을 나타낸다. "용액"란에 해당 보존 배지 중의 생존 세포의 양이 기재되어 있고, "세포 단독 + thio" 샘플 내의 생존 세포의 양을 100%로서 정의한다.

표 6

샘플	용액	동결	진공건조			동결건조		동결건조			
			시간=0	31일	60일	T _{final} =25C 시간=0	T _{final} =50C 시간=0	T _{final} =25C 31일	T _{final} =25C 60일	T _{final} =50C 31일	T _{final} =50C 59일
세포 단독 + thio	100	118	73	62	75	96	73	5		2	
20% 트레할로스 + thio ²	121	121	84	61	32	117	115	55	19	48	25
20% 트레할로스 + thio + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^{1,3}$	114	113	104	95	89	100	113	96	78	97	97
20% 트레할로스 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4(1)^{1,3}$ + 2% 시트르산	102	122	99	93	81	118	94	75	65	88	81

주: ¹괄호 속의 숫자는 트레할로스 1mol당 포스페이트 이온의 mol 수를 나타냄.
²thio*는 1.9% 나트륨 티오설파이트에 대한 약칭임.
³트레할로스-포스페이트의 pH는 세포와 혼합하기 전에 6.5로 측정되었다.
최종 pH는 6.0 내지 6.5일 가능성이 높다.

<91>

<92>

실시예 7

<93>

L-락테이트 데하이드로게나제(LDH, EC 1.1.1.27, 유형 II, 래빗 근육)를 pH 7.5의 100mM 인산칼륨 완충액 중에서 4℃에서 밤새 투석시킨다. 전체 단백질 함량을 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Company)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 구입한 단백질 측정 키트인 시그마 다이아그노스틱(SIGMA DIAGNOSTIC) 및 오니시(Ohnishi)와 바르(Barr)의 개질된 뷰렛법[참조: "Simplified Method for Quantitating Protein using the Biuret and Phenol Reagents", Analytical Biochem. 86:193-200 (1978)]을 사용하여 검정한다. 단백질 검정은 배리언 UV 분광광도계(Varian UV Spectrophotometer)를 사용하여 실온에서 725nm에서의 특징적인 흡광도를 기준으로 수행한다. 반응 혼합물은 100mM 인산칼륨 완충액(pH 7.5), 0.150mM NADH 및 1.20mM 피루브산을 함유한다.

<94>

샘플을 제조하기 위해, 투석시킨 LDH를 투석에 사용한 것과 동일한 인산칼륨 완충액으로 희석시킨다. 수득된 효소 용액은 포스페이트 이온 농도가 100mM이고 LDH 농도가 50μg/ml이다. 이어서, 3개 세트의 보호제 혼합물을

제조한다. 혼합물 세트의 트레할로스 농도는 각각 200mM, 400mM 및 600mM이다. 각각의 혼합물 세트는, 포스페이트 이온 농도가 각각 100mM, 300mM, 500mM 및 700mM인 4개의 개별적인 보호제 샘플로 구성된다. 이들 샘플은 해당량의 포스페이트 이온을 함유하는 포스페이트 수용액에 트레할로스를 용해시켜 제조한다.

<95>

이어서, LDH 용액 2mL를 12개의 보호제 혼합물 각각 2mL와 혼합하여 트레할로스 농도가 100mM, 200mM 또는 300mM이고 LDH 농도가 25 μ g/mL이고 포스페이트 이온 농도가 100mM, 200mM, 300mM 또는 400mM인 수성 보존 배지 용액 4mL를 제공한다. 위의 샘플 제조는 표 7에 나타내었다.

표 7

(세트1)

샘플	1	2	3	4
효소 용액	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트
동결방지액	200 mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	200 mM 트레할로스 100+200 mM 포스페이트	200 mM 트레할로스 100+400 mM 포스페이트	200 mM 트레할로스 100+600 mM 포스페이트
혼합물 용액	25 μ g/ml LDH 100 mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 100 mM 트레할로스 200 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 100 mM 트레할로스 300 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 100 mM 트레할로스 400 mM 포스페이트

(세트2)

샘플	1	2	3	4
효소 용액	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트
동결방지액	400mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	400 mM 트레할로스 100+200 mM 포스페이트	400 mM 트레할로스 100+400 mM 포스페이트	400 mM 트레할로스 100+600 mM 포스페이트
혼합물 용액	25 μ g/ml LDH 200 mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 200 mM 트레할로스 200 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 200 mM 트레할로스 300 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 200 mM 트레할로스 400 mM 포스페이트

(세트3)

샘플	1	2	3	4
효소 용액	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트	50 μ g/ml LDH 100 mM 포스페이트
동결방지액	600 mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	600 mM 트레할로스 100+200 mM 포스페이트	600 mM 트레할로스 100+400 mM 포스페이트	600 mM 트레할로스 100+600 mM 포스페이트
혼합물 용액	25 μ g/ml LDH 300 mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 300 mM 트레할로스 200 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 300 mM 트레할로스 300 mM 포스페이트	25 μ g/ml LDH 300 mM 트레할로스 400 mM 포스페이트

<96>

<97>

이어서, 위의 보존 배지 샘플 각각에 대해 48개의 바이얼을 준비한다. 각각의 바이얼을 표지하고 계량한 후, 각각의 바이얼에 보존 배지 1mL를 피펫팅한다. 이어서, 각각의 바이얼을 다시 계량한다. 이어서, 샘플을 액체 질소 속에 바이얼을 침지시켜 동결["퀀칭(quick)"]시키거나 -45 $^{\circ}$ C 이하의 온도에서 예냉시킨 선반 위의 동결건조기 속에 방치["저속 동결(slow freeze)"]함으로써 동결시킨다. 모든 동결건조된 샘플을, 모든 압력 및 온도가 고정된 버티스 12EL 동결건조기 속에서 아래의 동결건조 프로토콜로 처리한다. 샘플을 위에 논의한 바와 같이 동결건조기에 넣은 후, 동결건조기를 0mtorr의 압력으로 탈기시킨다. 샘플을 -45 $^{\circ}$ C 및 0mtorr에서 600분 동안 유지시킨 후, 각각 50분에 걸쳐서 온도 및 압력을 -40 $^{\circ}$ C 및 20mtorr로 상승시킨다. 이어서, 샘플을 -40 $^{\circ}$ C

및 20mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도를 50분에 걸쳐서 -35℃로 상승시킨 후, 샘플을 -35℃ 및 20mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도 및 압력을 각각 50분에 걸쳐서 -30℃ 및 50mtorr로 상승시킨 후, 샘플을 -30℃ 및 50mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 당해 유지 시간의 말기에 온도 및 압력을 각각 50분에 걸쳐서 -25℃ 및 100mtorr로 상승시키고, 샘플을 -25℃ 및 100mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도를 50분에 걸쳐서 -20℃로 상승시킨 후, 샘플을 -20℃ 및 100mtorr에서 600분 동안 유지시킨다. 이어서, 온도를 100분에 걸쳐서 -10℃로 상승시키고, 샘플을 -10℃ 및 100mtorr에서 600분 동안 유지시킨다.

<98> 이어서, 샘플을 700분에 걸쳐서 50mtorr에서 25℃로 상승시킨다. 이어서, 샘플을 당해 최종 온도 및 0mtorr에서 2140분 동안 유지시키면서 언로딩(unloading)한다. 이어서, 동결건조기를 질소 기체를 사용하여 배출시키고, 바이얼 속의 보존된 LDH 샘플을 꺼내어 LDH 활성을 측정한다. 활성을 측정하기 전에 각각의 샘플을 계량하여 수분 손실량을 측정하고 당해 수분 손실량의 정제수[밀리큐 시스템(MilliQ System), 제조사: 밀리포어 코퍼레이션(Millipore Corp.)]로 재수화시킨다. 이어서, 위에서 논의한 방법과 동일한 방법을 사용하여 LDH 활성을 측정한다.

<99> 해당 샘플 세트에 대한 결과를 도 1(동결건조) 및 도 2(동결)에 나타내었다.

<100> 실시예 8

<101> L-락테이트 데하이드로게나제(LDH, EC 1.1.1.27, 유형 II, 래빗 근육)를 pH 7.5의 100mM 인산칼륨 완충액 중에서 4℃에서 밤새 투석시킨다. 전체 단백질 함량을 시그마 케미칼 캄파니(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 구입한 단백질 측정 키트인 시그마 다이아그노스틱 및 오니시와 바르의 개질된 뷰렛법[참조: "Simplified Method for Quantitating Protein using the Biuret and Phenol Reagents", Analytical Biochem. 86:193-200 (1978)]을 사용하여 검정한다. 단백질 검정은 배리언 UV 분광광도계를 사용하여 실온에서 725nm에서의 특징적인 흡광도를 기준으로 수행한다. 반응 혼합물은 100mM 인산칼륨 완충액(pH 7.5), 0.150mM NADH 및 1.20mM 피루브산을 함유한다.

<102> 샘플을 제조하기 위해, LDH를 4개의 50ml 용기에 첨가하고, 투석에 사용한 것과 동일한 인산칼륨 완충액으로 희석시켜 25ml 용액을 제조한다. 각각의 샘플에서, 효소 농도는 50μg/ml이다. 이어서, 용적이 25ml인 4개의 보호제 혼합물을 50ml 용기에서 제조한다. 각각의 혼합물은 400mM의 트레할로스 및 다양한 양의 포스페이트 이온을 함유한다. 제1 혼합물(참조용)을 제조하기 위해, 트레할로스를 10mM 인산칼륨 용액에 용해시킨다. 제2 혼합물의 경우, 트레할로스를 100mM 인산칼륨 용액에 용해시킨다. 제3 및 제4 혼합물은 트레할로스를 각각 500mM 인산칼륨 용액 및 900mM 인산칼륨 용액에 용해시켜 제조한다.

<103> 이어서, LDH 샘플을 보호제 혼합물과 혼합하여 LDH 농도가 25μg/ml이고 트레할로스 농도가 200mM이고 LDH와 포스페이트 이온 농도가 변화된 수성 보존 배지 50ml 용액을 제공한다. 포스페이트 이온 농도는, 샘플 1 내지 4의 경우 각각 10mM, 100mM, 300mM 및 500mM이고, 트레할로스에 대한 포스페이트 이온의 몰 비는, 샘플 1의 경우 0.05, 샘플 2의 경우 0.5, 샘플 3의 경우 1.5, 샘플 4의 경우 2.5이다. 위의 샘플 제조는 표 8에 나타내었다.

표 8

샘플	1	2	3	4
LDH 용액	50µg/ml LDH 10 mM 포스페이트	50µg/ml LDH 100 mM 포스페이트	50µg/ml LDH 100 mM 포스페이트	50µg/ml LDH 100 mM 포스페이트
보호제 혼합물	400 mM 트레할로스 10 mM 포스페이트	400 mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	400 mM 트레할로스 500 mM 포스페이트	400 mM 트레할로스 900 mM 포스페이트
보존 배지	25µg/ml LDH 200 mM 트레할로스 10mM 포스페이트	25µg/ml LDH 200 mM 트레할로스 100 mM 포스페이트	25µg/ml LDH 200 mM 트레할로스 300 mM 포스페이트	25µg/ml LDH 200 mM 트레할로스 500 mM 포스페이트

<104>

<105>

이어서, 위의 4가지 보존 배지 샘플 각각에 대해 40개의 바이얼을 준비한다. 각각의 바이얼을 표지하고 계량한 후, 각각의 바이얼에 보존 배지 1ml를 피펫팅한다. 이어서, 각각의 바이얼을 다시 계량한다. 샘플을 실시예 7에 기재한 바와 동일한 프로토콜을 사용하여 동결건조시킨다.

<106>

동결건조 완료 후, 바이얼 속의 보존된 LDH 샘플을 꺼내고, 바이얼을 밀봉한 후, 37℃ 배양기, 30℃ 배양기 또는 4℃ 냉장고에 저장한다.

<107>

이어서, 샘플의 LDH 활성을 주기적으로 측정한다. 활성을 측정하기 전에 각각의 샘플을 계량하여 수분 손실량을 측정하고 당해 수분 손실량의 정제수(밀리큐 시스템, 제조사: 밀리포어 코포레이션)로 재수화시킨다. 이어서, 위에서 논의한 방법과 동일한 방법을 사용하여 LDH 활성을 측정한다.

<108>

해당 샘플 세트에 대한 결과를 도 3 내지 도 5에 나타내었고, 여기서 "Z"는 트레할로스에 대한 포스페이트 이온의 몰 비이다.

<109>

실시예 9

<110>

실시예 1의 방법을 반복 수행한다. 결과는 표 9에 나타내었으며, 여기서 숫자는 재수화시의 초기 활성의 회복률(%)을 나타낸다. "용액"란에 해당 보존 배지 중의 생존 세포의 양이 기재되어 있고, "세포 단독" 샘플 내의 생존 세포의 양을 100%로서 정의한다.

표 9

샘플	용액	동결	동결건조 T=3일
세포 단독	100	105	0
20% 트레할로스	91	89	11
20% 트레할로스+ thio ²	89	77	8
20% 트레할로스+ KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1) ¹ , pH 6.4	72	78	39
20% 트레할로스+ thio + KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (1), pH 6.4	54	61	41
세포+ KHPO ₄ /K ₂ HPO ₄ (세포 1g 당 포스페이트의 양은 위의 샘플 4 및 5와 동일하다)	89	90	7
20% 트레할로스+ thio + K ₂ HPO ₄ (1)	75	81	39

¹ 괄호 속의 숫자는 트레할로스 1mol당 포스페이트 이온의 mol 수를 나타낸다.

² "thio"는 1.9% 나트륨 티오설파이트에 대한 약칭임.

<111>

<112>

실시예 10

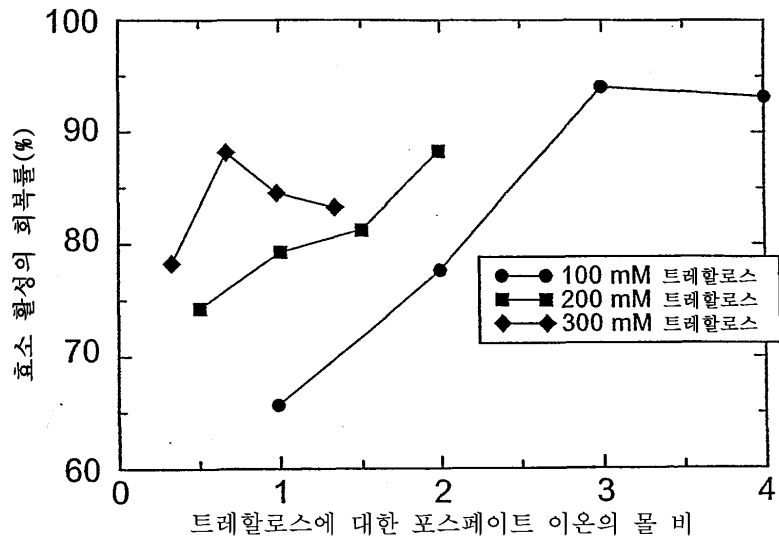
<113>

수크로스 또는 트레할로스 7.5%(물을 기준으로 함) 및, 일인산칼륨 또는 이인산칼륨에 의해 제공되는 다양한 양의 포스페이트 이온을 함유하는 수성 보호제 혼합물을 제조하고, 각각의 혼합물 25µl를 알루미늄 시차 주사 열량계 팬 속에 넣어 밀봉한다. 이어서, 샘플을 액체 질소에 침지시켜 쿨링시킨 후, -140℃로 예냉시킨 시차 주사 열량계에 적재한다. 이어서, 샘플을 5℃/분의 속도로 50℃까지 주사시키고, 유리 전이 온도(T_g)를

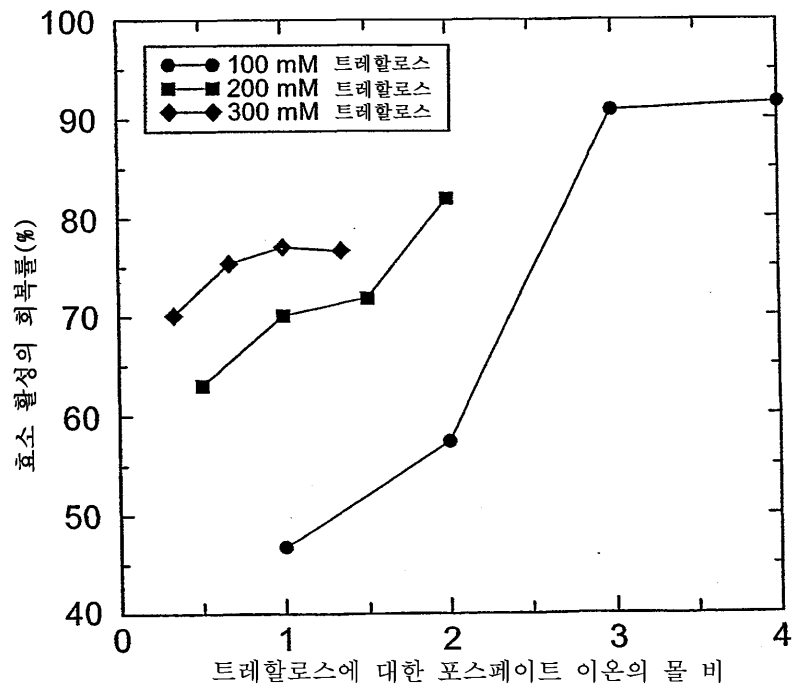
측정한다. 각각의 샘플에 대한 결과를 도 6에 나타내었다.

도면

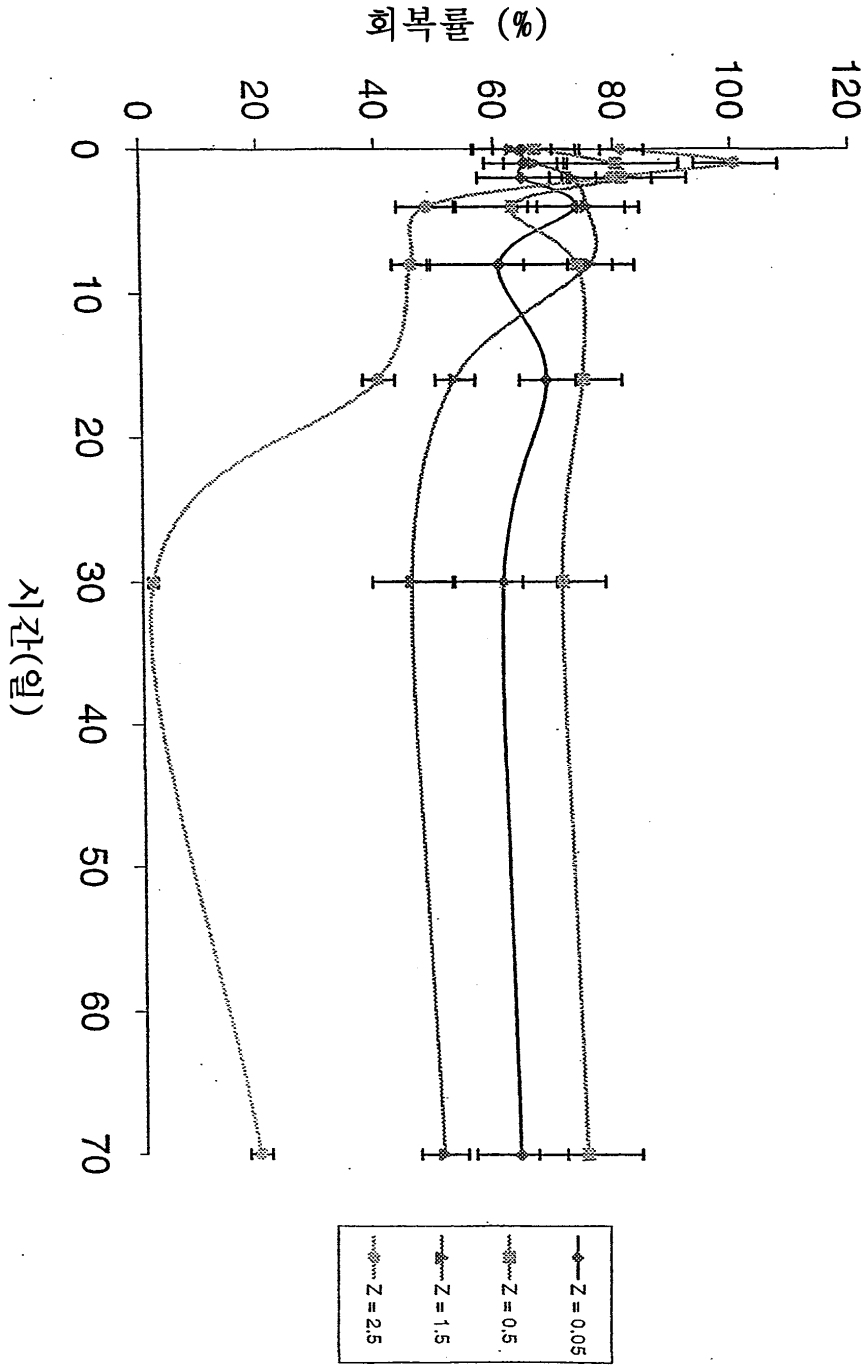
도면1



도면2

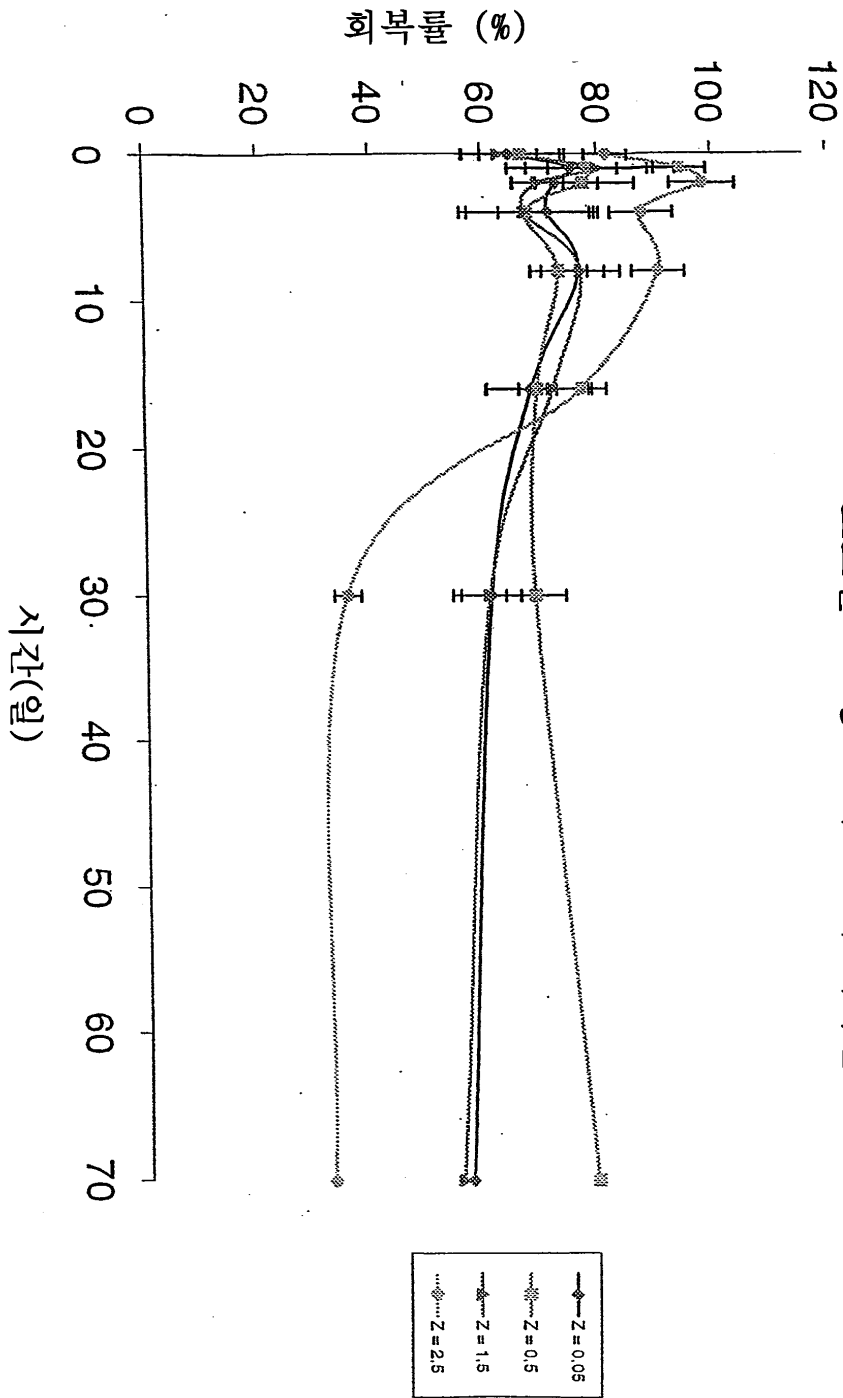


37°C에서 저장한 후 시간 경과에 따른, 200mM 트레할로스에 의해
보호된 25ug/ml 의 LDH의 회복률



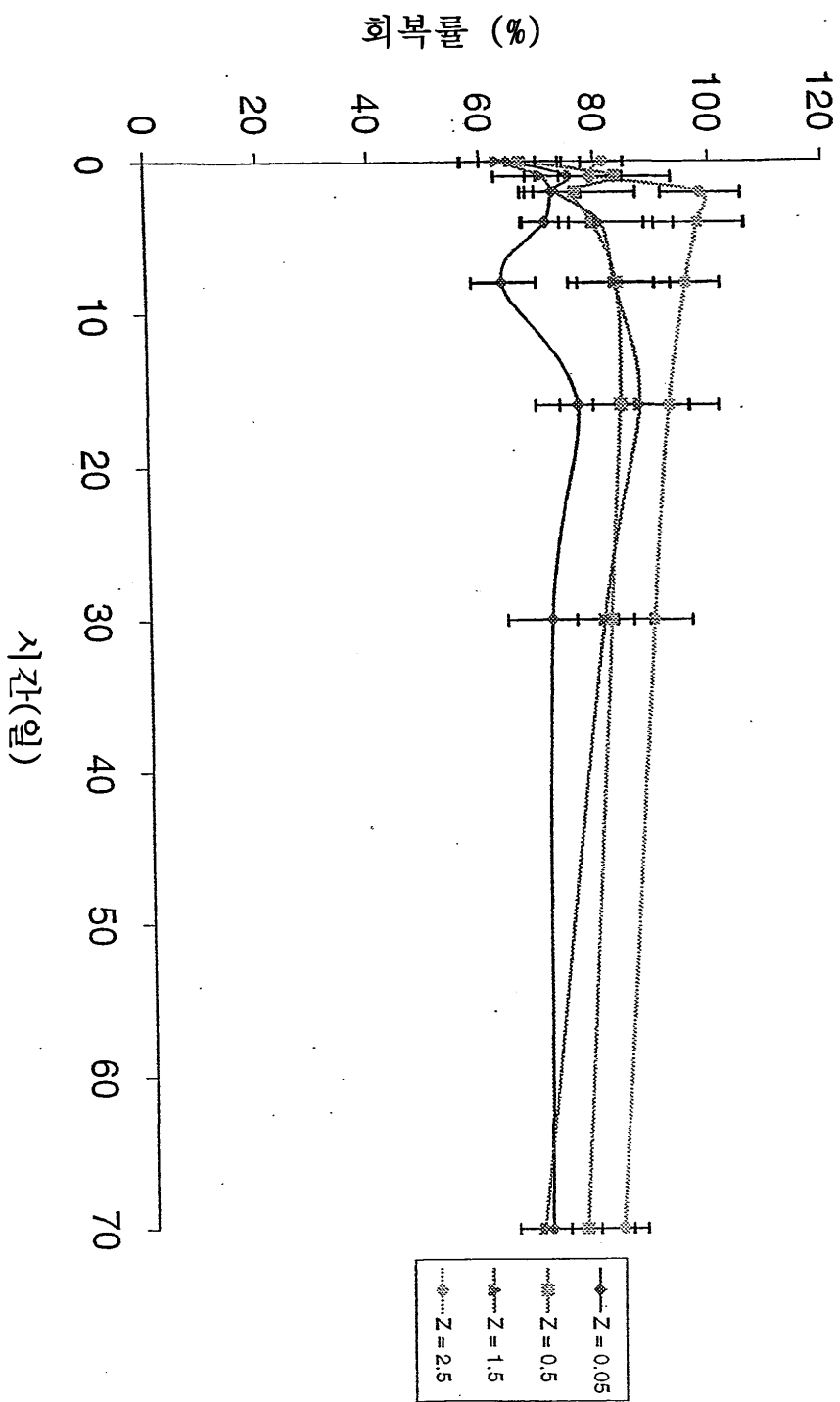
도면3

30℃에서 저장한 후 시간 경과에 따른, 200mM 트레할로스에 의해
보호된 25ug/ml 의 LDH의 회복률



도면4

4℃에서 저장한 후 시간 경과에 따른, 200mM 트레할로스에 의해
보호된 25ug/ml 의 LDH의 회복률



도면5

도면6

