



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109414008 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201780028522.4

(22)申请日 2017.05.15

(30)优先权数据

62/336,142 2016.05.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.11.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/032606 2017.05.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/197379 EN 2017.11.16

(71)申请人 密苏里大学管理机构

地址 美国密苏里州

(72)发明人 韩旭 袁野 R.M.罗伯茨

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

A01N 1/02(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61K 31/70(2006.01)

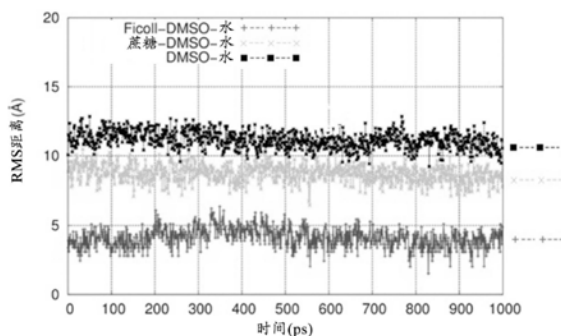
权利要求书3页 说明书21页 附图11页

(54)发明名称

防止重结晶的冷冻保存培养基和方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于在非低温冷冻温度下保存细胞的培养基。该培养基包含亲水且无毒的聚合物或其他高分子、含水液体和冷冻保护剂。高分子的分子在溶解于所述含水液体中时形成形状为球形的致密的三维结构。本发明的培养基可以用于在非低温温度下长期贮存细胞,结果类似于在低温温度下贮存所见到的结果。



1. 用于在非低温冷冻温度下保存细胞的培养基,其包含:  
亲水且无毒的高分子;  
含水液体;和  
冷冻保护剂;  
其中所述高分子在所述培养基中的浓度等于或大于约20% (w/v),且  
其中所述高分子的分子在溶解于所述含水液体中时形成形状为球形的致密的三维结构。
2. 权利要求1的培养基,其进一步包含悬浮于所述培养基中的所述细胞。
3. 权利要求2的培养基,其中在所述非低温冷冻温度下,所述致密且球形的结构在具有所述细胞的所述培养基的未冷冻部分中浓缩,并且其中拥挤效应防止在所述非低温温度下贮存期间的冰重结晶。
4. 权利要求1-3中任一项的培养基,其中所述培养基中所述高分子的浓度为约25% (w/v) 或更大。
5. 权利要求4的培养基,其中所述培养基中所述高分子的浓度为约35% (w/v) 或更大。
6. 权利要求5的培养基,其中所述培养基中所述高分子的浓度为约50% (w/v) 或更大。
7. 权利要求1-6中任一项的培养基,其中所述冷冻保护剂的浓度等于或大于所述培养基中所述高分子浓度的约20%,优选等于或大于约50%。
8. 权利要求7的培养基,其中所述培养基中所述冷冻保护剂的所述浓度等于或大于所述培养基中所述高分子浓度的约75%。
9. 权利要求8的培养基,其中所述培养基中所述冷冻保护剂的所述浓度等于或大于所述培养基中所述高分子浓度的约100%。
10. 权利要求1-9中任一项的培养基,其中所述高分子是聚合物。
11. 权利要求10的培养基,其中所述聚合物包含在溶解于所述含水液体中时形成形状呈大致球形的所述致密三维结构的分子。
12. 权利要求11的培养基,其中所述聚合物选自下组:球形亲水性多糖、聚合的环糊精或糖类、球状蛋白质 (globular protein) 或球形蛋白质 (spheroprotein)、通过将寡糖链附着到那些球状蛋白质形成的球形糖蛋白、那些球状蛋白质的其他衍生物及其组合。
13. 权利要求12的培养基,其中所述聚合物是亲水性多糖。
14. 权利要求13的培养基,其中所述聚合物是通过蔗糖和表氯环氧丙烷 (epichlorohydrin) 的共聚合形成的聚合物。
15. 权利要求1-14中任一项的培养基,其中所述冷冻保护剂选自下组:二甲基亚砷 (DMSO)、甘油、乙二醇、丙二醇及其组合。
16. 权利要求1-15中任一项的培养基,其中所述含水液体选自下组:细胞培养基、营养培养基、盐水及其组合。
17. 权利要求16的培养基,其中所述含水液体选自下组:血清、FBS (胎牛血清)、DMEM (Dulbecco改良Eagle培养基)、HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、FHM (冲洗-保持培养基)、PBS (磷酸盐缓冲盐水)、DPBS (Dulbecco磷酸盐缓冲盐水)、RPMI (Roswell Park Memorial Institute培养基)、BF5培养基、EX-CELL培养基、溶原性肉汤 (LB) 培养基、CaCl<sub>2</sub> 水溶液、NaCl水溶液、KCl水溶液及其组合。

18. 权利要求2-17中任一项的培养基,其中所述悬浮细胞是真核细胞,优选哺乳动物细胞。

19. 权利要求18的培养基,其中所述悬浮细胞是哺乳动物细胞,并且所述哺乳动物细胞选自下组:鼠细胞、猪细胞、人细胞及其组合。

20. 权利要求18或19的方法,其中所述哺乳动物细胞选自下组:干细胞、体细胞、繁殖细胞及其组合。

21. 权利要求2-17中任一项的培养基,其中所述悬浮细胞是原核细胞。

22. 权利要求1-21中任一项的培养基,其中所述致密的大致球形结构在其最宽尺寸上为约100nm(纳米)或更小。

23. 权利要求22的培养基,其中所述致密的大致球形结构包含在其最宽尺寸上范围为约1至50nm的结构。

24. 权利要求23所述的培养基,其中所述致密结构包含在其最宽尺寸上范围为约5至10nm的结构。

25. 权利要求1-24中任一项的培养基,其中所述培养基基本上不含血清、动物蛋白质或人蛋白质。

26. 在非低温冷冻温度下保存细胞的方法,其包括:

提供冷冻保存培养基,其包含亲水且无毒的高分子、冷冻保护剂和含水液体,其中所述高分子在所述培养基中的浓度大于约10% (w/v),并且其中所述高分子在溶解于所述含水液体中时形成高度致密的大致球形结构;

将所述细胞添加到所述培养基以形成培养基-细胞悬浮液;

将所述培养基-细胞悬浮液冷却至所述非低温冷冻温度,其中所述非低温冷冻温度为约-85°C或更高;并且

于或接近所述非低温冷冻温度或不同的非低温冷冻温度将所述培养基-细胞悬浮液维持长于三周的时间段,而将所述细胞的融解后细胞存活率维持为与将所述细胞在液氮中贮存所述时间段获得的融解后细胞存活率相等或大致相同。

27. 权利要求26的方法,其中所述高分子是聚合物。

28. 权利要求27的方法,其中所述冷冻保存培养基中所述聚合物的浓度范围为所述聚合物在所述含水液体中的溶解度的约10%。

29. 权利要求28的方法,其中所述冷冻保存培养基中所述聚合物的所述浓度为约20%至50%。

30. 权利要求26-29中任一项的方法,其中添加到所述培养基的细胞在所述细胞的第一悬浮液中,其中所述冷冻保存培养基与所述细胞的所述第一悬浮液的所述体积比为约10:1至1:5。

31. 权利要求30的方法,其中所述冷冻保存培养基与所述细胞的所述第一悬浮液的所述体积比为约3:2至1:5。

32. 权利要求26-31中任一项的方法,其中所述时间段为约三周并且延长长达至少约1年。

33. 权利要求32的方法,其中所述时间段是约1年或更多。

34. 权利要求33的方法,其中所述时间段是约5年或更多。

35. 权利要求34的方法,其中所述时间段是约10年或更多。
36. 权利要求26-35中任一项的方法,其中所述融解后细胞存活率等于或大于将所述细胞在液氮中贮存相同时间段所获得的融解后细胞存活率的约70%。
37. 权利要求26-36中任一项的方法,其中所述温度范围为约-100°C至-20°C。
38. 权利要求37的方法,其中所述温度范围为约-85°C至-65°C。
39. 权利要求38的方法,其中所述温度范围为约-80°C至-75°C。
40. 权利要求26-39中任一项的方法,其中以约0.01°C/min-1000°C/min的速率冷却所述培养基-细胞悬浮液。
41. 权利要求39的方法,其中以约0.1至10°C/min的速率冷却所述培养基-细胞悬浮液。
42. 权利要求41的方法,其中以约0.5至1°C/min的速率冷却所述培养基-细胞悬浮液。
43. 权利要求26-42中任一项的方法,其中在所述冷却步骤之后,所述培养基-细胞悬浮液部分冷冻,并且所述高分子在所述培养基-细胞悬浮液的未冷冻部分中的浓度为至少约25% (w/v)。
44. 权利要求43的方法,其中在所述冷却步骤后所述培养基-细胞悬浮液的所述未冷冻部分中的所述高分子的所述浓度为至少约40% (w/v)。

## 防止重结晶的冷冻保存培养基和方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请基于并要求2016年5月13日提交的美国临时申请序列号62/336,142的优先权,该临时申请通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

### 1. 发明领域

[0004] 本发明涉及低温生物学和冷冻保存领域。

[0005] 2. 相关技术的描述

[0006] 目前细胞储液的长期贮存通常需要使用液氮(LN<sub>2</sub>),由于通常使用的含有细胞膜渗透性冷冻保护剂的冷冻保存培养基在非低温温度,例如-80°C下冷冻时是热不稳定的,在大多数实验室深度冷冻器提供的贮存条件下,导致冰重结晶并导致细胞存活力随时间逐渐丧失。细胞贮存对LN<sub>2</sub>的依赖性显著增加运营费用,并引发了许多与工作效率和安全性受损相关的问题。

[0007] 两种通用方法广泛用于冷冻保存:平衡(慢速冷冻)和非平衡(玻璃化)冷却程序。玻璃化方法及其“缓慢玻璃化”变型不仅引入由使用高浓度(通常40-50%v/v)的渗透性冷冻保护剂所致的细胞渗透损伤和毒性,而且需要供应LN<sub>2</sub>或其他低温液体在低温温度,例如在1个大气压下的LN<sub>2</sub>饱和温度(-196°C)或LN<sub>2</sub>蒸汽(通常为-120°C)下实现和维持胞内和胞外溶液两者的玻璃化。对于慢速冷冻方法,首先将细胞加载相对低浓度(通常为10%v/v)的冷冻保护剂,然后缓慢冷却至中间非低温温度,例如在深度冷冻器中-80°C。在冷却期间,冰沉淀逐渐增加溶质浓度,使得在达到中间温度后,含有细胞的残留溶液高度浓缩并处于粘性液体状态。此类部分冷冻系统中的胞外冰是不稳定的,并且在冷却期间形成的小冰晶自发地开始合并并形成较大的晶体以使其表面能最小化并逐渐分布在整个样品中。此类事件,即所谓的重结晶对接触出现的大晶体的细胞造成严重的机械损伤,或者引入致命的胞内冰形成。尽管这种细胞破坏过程非常缓慢(通常在数周而不是数小时内发生),但是即使在低至-80°C的温度下,它也是渐进的。许多出版物在科学研究文章或冷冻保存培养基产品手册中证明,目前在-80°C深度冷冻器中的贮存仅适用于临时或短期使用目的。因此,为了在-80°C缓慢冷冻细胞后实现细胞的长期贮存,必需进行将样品冷却至低温温度的第二步。

[0008] 抗冻蛋白和某些小分子能够通过诱导热滞后来淬灭冰重结晶,但是此过程仅在刚好低于冰熔点的温度范围内发生并且在更低的温度下无效。

[0009] 已经开发了各种聚合物和相关方法,以通过在液氮中贮存后增加溶液粘度或改善细胞膜稳定性来改善融解后细胞存活力和功能。然而,目前,通过使用这些聚合物和方法在-80°C长期贮存后,对于研究和生物医学应用两者非常有价值的许多细胞类型的低存活率尚未有显著改善。用于冷冻保存的这些广泛使用的聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、羟乙基淀粉(HES)等的应用不足以防止在非低温温度下冷冻保护剂溶液的重结晶。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及用于在非低温冷冻温度下保存细胞的培养基,其包含在溶解于含水液

体中时形成形状为球形的致密三维结构的高分子。本发明还涉及包含本发明培养基的培养基-细胞悬浮液,其具有悬浮于培养基中的细胞。本发明还涉及使用本发明的培养基来保存细胞的方法。在非低温冷冻温度下,致密且球形的结构在具有细胞的培养基的未冷冻部分中浓缩,并且这种拥挤效应防止在非低温温度下贮存期间的冰重结晶。

[0012] 在本发明的某些方面,培养基包括亲水且无毒的高分子、含水液体和冷冻保护剂。高分子在培养基中的浓度可以等于或大于约20% (w/v)、约25% (w/v) 或更大、约35% (w/v) 或更大或约50% (w/v) 或更大。

[0013] 在本发明的某些方面,冷冻保护剂的浓度等于或大于培养基中高分子浓度的约20%、等于或大于培养基中高分子浓度的约50%、等于或大于培养基中高分子浓度的约75%、或等于或大于培养基中高分子浓度的约100%。

[0014] 在本发明的某些方面,高分子是聚合物。聚合物可以包含在溶解于所述含水液体中时形成形状呈大致球形的致密三维结构的分子。在此类实施方案中,聚合物选自下组:球形亲水性多糖、聚合的环糊精或糖类、球状蛋白质或球形蛋白质、通过将寡糖链附着到那些球状蛋白质形成的球形糖蛋白、那些球状蛋白质的其他衍生物及其组合。聚合物可以是亲水性多糖,并且可以通过蔗糖和表氯环氧丙烷(epichlorohydrin)的共聚形成。

[0015] 在本发明的某些方面,冷冻保护剂选自二甲基亚砜(DMSO)、甘油、乙二醇、丙二醇及其组合。在本发明的某些方面,含水液体选自下组:细胞培养基、营养培养基、盐水及其组合。含水液体可以选自下组:血清、FBS(胎牛血清)、DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、FHM(冲洗-保持培养基(flushing-holding medium))、PBS(磷酸盐缓冲盐水)、DPBS(Dulbecco磷酸盐缓冲盐水)、RPMI(Roswell Park Memorial Institute培养基)、BF5培养基、EX-CELL培养基、溶原性肉汤(LB)培养基、CaCl<sub>2</sub>水溶液、NaCl水溶液、KCl水溶液及其组合。

[0016] 在本发明的某些方面,悬浮细胞是真核细胞。真核细胞可以是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞可以选自下组:鼠细胞、猪细胞、人细胞及其组合。哺乳动物细胞可以选自下组:干细胞、体细胞、繁殖细胞及其组合。在本发明的其他方面,悬浮细胞是原核细胞。

[0017] 在本发明的某些方面,致密的大致球形结构在其最宽尺寸上为约100nm(纳米)或更小,包括在其最宽尺寸上范围为约1至50nm的结构或包含在其最宽尺寸上范围为约5至10nm的结构。

[0018] 在本发明的某些方面,培养基基本上不含血清、动物蛋白质或人蛋白质。

[0019] 本发明的某些方面涉及在非低温冷冻温度下保存细胞的方法,其包括:提供冷冻保存培养基,其包含亲水且无毒的高分子、冷冻保护剂和含水液体。在某些实施方案中,高分子在所述培养基中的浓度大于约10% (w/v),并且高分子在溶解于所述含水液体中时形成高度致密的大致球形结构。将细胞添加到培养基中以形成培养基-细胞悬浮液。将培养基-细胞悬浮液冷却至非低温冷冻温度,其中非低温冷冻温度为约-85℃或更大。可以于或接近所述非低温冷冻温度或不同的非低温冷冻温度将所述培养基-细胞悬浮液维持长于三周的时间段,而将所述细胞的融解后细胞存活率维持为与将所述细胞在液氮中贮存所述时间段获得的融解后细胞存活率相等或大致相同。在该方法的某些方面,高分子是聚合物。

[0020] 在方法的某些方面,冷冻保存培养基中聚合物或其它高分子的浓度范围为聚合物在含水液体中的溶解度的约10%,或范围为20%至50%。

[0021] 在方法的某些方面,添加到培养基的细胞在细胞的第一悬浮液中,其中冷冻保存培养基与细胞的第一悬浮液的所述体积比为约10:1至1:5或3:2至1:5。

[0022] 在本发明的某些方面,将培养基-细胞悬浮液贮存约3周的时间段并延长长达至少1年,而将所述细胞的融解后细胞存活率维持为与将所述细胞在液氮中贮存所述时间段获得的融解后细胞存活率相等或大致相同。在某些实施方案中,时间段是1年或更多、5年或更多、或10年或更多。

[0023] 在某些实施方案中,融解后细胞存活率等于或大于将所述细胞在液氮中贮存相同时间段获得的存活率的约70%。

[0024] 在某些实施方案中,非低温温度范围为-100°C至-20°C,范围为-85°C至-65°C,或范围为-80°C至-75°C。

[0025] 在某些实施方案中,以约0.01°C/min-1000°C/min的速率、约0.1-10°C/min的速率或约0.5-1°C/min的速率冷却培养基-细胞悬浮液。

[0026] 在某些实施方案中,在所述冷却步骤之后,所述培养基-细胞悬浮液部分冷冻,并且所述高分子在所述培养基-细胞悬浮液的未冷冻部分中的浓度为至少约25% (w/v) 或浓度为至少约40% (w/v)。

[0027] 本发明的其它方面连同其附带的优点和新颖特征将部分地在下面的描述中阐述,并且在检查以下内容后部分地对于本领域技术人员将变得显而易见,或者可以从本发明的实践中习得。借助于所附权利要求中特别指出的手段和组合,可以实现和获得本发明的目的和优点。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明涉及用于在非低温冷冻温度下保存细胞的培养基。培养基包含亲水且无毒的聚合物或其他高分子、含水液体和冷冻保护剂。聚合物或其它高分子的分子当溶解于含水液体中时形成形状为球形的致密的三维结构。

[0030] 如实施例中更详细描述,令人惊讶地发现,当将细胞悬浮于本发明的培养基中时所得的混合物(在本文中也称为培养基-细胞悬浮液)可以在非低温冷冻温度下贮存出乎意料长的时间段,结果类似于用液氮在低温温度贮存获得的结果。认为这是由于高分子拥挤效应,发现所述高分子拥挤效应源自本发明培养基中的高分子形成的高度致密且机械上较强的三维结构。在非低温冷冻温度下,三维结构也占据培养基-细胞悬浮液的培养基的未冷冻部分的大部分或在所述未冷冻部分中高度浓缩。培养基的未冷冻部分与冷冻期间形成的冰晶以及细胞处于相平衡,并且此种拥挤效应防止在非低温冷冻温度下贮存期间的冰重结晶。在某些实施方案中,培养基-细胞悬浮液的培养基的未冷冻部分中的聚合物或其他高分子的浓度为至少约25% (w/v)、至少约35% (w/v)、至少约40% (w/v) 或其中的任何值或范围。

[0031] 此种新发现的高分子拥挤效应由实施例1中更详细描述模拟支持。如图1所示,模拟表明当将本发明的培养基冷却至-80°C时,许多个别高度致密且机械强度高的高分子球体的独特的网络作为机械屏障形成,所述机械屏障淬灭冰核的生长。如图2所示,聚合物的存在导致原子位置的较低RMS距离,指示人工放置在模拟盒中的冰核周围的水分子的较高热稳定性。在发现此种高分子拥挤效应之前,尚不会预期冷冻保存培养基可以在非低温温度下在长时间内维持细胞存活力,其与低温冷冻的细胞存活力相似。

[0032] 实施例2提供了由高分子拥挤效应引起的降低的冰重结晶的扫描电子显微术 (SEM) 证据。如图3所示,本发明的培养基将冰晶形态保持为颗粒,并且容易鉴定单一冰晶(图3(B))。这与10%DMSO培养基中合并大块或片形冰晶成对比(图3(A))。这通过简单的光学观察得到支持,如比较(A)对照和(B)本发明的培养基的图4所示。

[0033] 本发明的高分子可以是任何亲水且无毒的高分子,其当溶解于含水液体中时形成形状为球形的致密的三维结构。优选地,致密结构在其最宽尺寸上是约100nm(纳米)或更小。在某些实施方案中,致密结构包括在其最宽尺寸上范围为约1至50nm,在其最宽尺寸上范围为约5至10nm,或其间的任何值或范围的结构。应当理解,并非培养基中包含的所有高分子都必须在期望范围内。术语“球形”不要求高分子形成完美球形的结构。确切地,高分子形成形状为大体上球形的结构。

[0034] 在某些实施方案中,高分子是聚合物。聚合物可以是亲水性多糖或类似的结构化高分子,其具有当溶解于含水液体中时形成形状为球形的致密三维结构的分子。合适的高分子包括球形亲水性多糖、形成大球形分子的环糊精或任何糖的聚合、球状蛋白质或球形蛋白质(例如白蛋白,例如牛血清白蛋白(BSA))、通过将寡糖链附着到那些球状蛋白质或那些球状蛋白质的其它衍生物形成的球形糖蛋白。亲水性纳米粒子也可以是合适的高分子。一种合适的聚合物是在没有任何离子化基团的情况下通过蔗糖和表氯环氧丙烷的共聚合形成的聚合物,诸如由GE Healthcare Bio-Sciences AB以商标名FICOLL销售的那些。

[0035] 在某些实施方案中,高分子具有约300,000至约500,000,优选400,000的分子量,例如以商标名Ficoll 400销售的。在其他实施方案中,高分子具有约60,000至约80,000,优选约70,000的分子量,例如以商标名Ficoll 70销售的。

[0036] 在培养基的某些实施方案中,在添加细胞之前,聚合物或其他高分子以大于约10%(w/v)或更大、约20%(w/v)或更大、约25%(w/v)或更大、约35%(w/v)或更大、或约50%(w/v)或更大,或其中的任何范围或值的浓度存在。在某些实施方案中,聚合物或其他高分子的浓度高达聚合物(或其他高分子)在含水液体或水中的溶解度。

[0037] 冷冻保护剂可以是本领域已知的任何冷冻保护剂。优选地,冷冻保护剂是细胞渗透性有机小分子。适用于本发明的冷冻保护剂包括二甲基亚砜(DMSO)、甘油、乙二醇、丙二醇及其组合。

[0038] 本发明的培养基允许使用比标准冷冻保存培养基中要使用的更低量的冷冻保护剂。冷冻保护剂可以以等于或大于培养基中聚合物(或其它高分子)浓度的约20%、等于或大于培养基中所述聚合物浓度的约50%、等于或大于培养基中所述聚合物浓度的约75%、或等于或大于培养基中所述聚合物浓度的约100%、或其中的任何值或范围存在于培养基中。聚合物(或其它高分子)和含水液体与冷冻保护剂的体积比为10:1至1:1、5:1至1:1、或其间的任何范围或值。

[0039] 含水液体可以是适用于悬浮细胞的任何含水液体,并且可以是选自下组的液体:细胞培养基、营养培养基、盐水及其组合。适用于本发明的含水液体包括血清、FBS(胎牛血清)、DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、FHM(冲洗-保持培养基)、PBS(磷酸盐缓冲盐水)、DPBS(Dulbecco磷酸盐缓冲盐水)、RPMI(Roswell Park Memorial Institute培养基)、BF5培养基、EX-CELL培养基、溶原性肉汤(LB)培养基、CaCl<sub>2</sub>水溶液、NaCl水溶液、KCl水溶液及其组合。培养基可以基本上不含血清、动物蛋白质

或人蛋白质。

[0040] 本发明的培养基适用于任何类型的细胞。例如,悬浮的细胞可以是真核细胞。真核细胞可以是哺乳动物细胞,例如选自鼠细胞、猪细胞、人细胞及其组合的哺乳动物细胞。哺乳动物细胞可以是任何类型的细胞,包括选自下组的细胞:干细胞、体细胞、繁殖细胞及其组合。繁殖细胞可以包括例如胚胎和卵母细胞。可以使用的其他真核细胞包括昆虫细胞。在其他实施方案中,细胞可以是原核细胞。原核细胞可以是细菌,例如大肠杆菌(E.coli)、链球菌(Streptococcus)和葡萄球菌(Staphylococcus)。

[0041] 细胞可以分成单个细胞或可以是团块。细胞可以作为分离的细胞或在悬浮液中添加。术语“细胞”还可以涵盖包含多种细胞的其他细胞材料,包括组织。

[0042] 对于哺乳动物细胞的悬浮液,它们的细胞浓度可以在每0.5-1ml细胞悬浮液样品 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞的范围内。对于卵母细胞和胚胎,细胞密度(数目)较低,通常一个样品中约 $10^2$ 至 $10^5$ 个细胞(样品体积为0.25-0.5ml左右),这是因为难以获得数百万个胚胎或卵母细胞。在某些实施方案中,可以在一个样品(例如,含有胚胎或卵母细胞的0.5ml吸管)中仅保留数百个胚胎或卵母细胞,并且在一些实施方案中,样品中胚胎或卵母细胞的数目为20左右。原核生物(例如大肠杆菌)可以以高密度获得。在冷冻之前,细胞浓度可以达到每ml $10^9$ 至 $10^{10}$ 个细胞。

[0043] 本发明还涉及在本发明的培养基中在非低温冷冻温度下保存细胞的方法。当在本文中使用时,术语非低温冷冻温度可以是高于在1个大气压下LN<sub>2</sub>饱和温度(-196°C)或LN<sub>2</sub>蒸气(通常为-120°C)的任何温度。非低温冷冻通常在设置于-80°C的冷冻器中发生,温度可以低至-85°C,但是也可以由于可源自打开冷冻器门或将未冷冻的材料放入冷冻器中所致的温度变化而升至-80°C以上。本发明的培养基还允许细胞通过干冰维持冷冻,同时维持可接受的细胞存活率。合适的非低温冷冻温度可以包括约-100°C至-20°C、约-85°C至-65°C、或约-80°C至-75°C的温度,以及它们之间的任何值和范围。。

[0044] 方法包括提供包含亲水且无毒的高分子、冷冻保护剂和含水液体的冷冻保存培养基,其中高分子当溶解于所述含水液体中时形成高度致密的球形结构,将所述培养基添加到细胞悬浮液,或将细胞或细胞悬浮液添加到所述培养基中,或以添加所述培养基或细胞悬浮液的部分的任何顺序,以形成培养基-细胞悬浮液,并将培养基-细胞悬浮液冷却至非低温冷冻温度。

[0045] 如本领域技术人员将容易理解的,在冷冻前的培养基-细胞悬浮液中细胞的总浓度可以根据意图用途而广泛变化。在某些实施方案中,冷冻前冷冻保存培养基中细胞的浓度是整个系统中单一或稀疏分布的细胞、 $10^{2-4}$ 个细胞/ml、 $10^{5-6}$ 个细胞/ml、 $10^7$ 个或更多细胞/ml,或甚至整个组织或其间的任何值或范围。在某些实施方案中,细胞作为细胞悬浮液添加,并且冷冻保存培养基与细胞悬浮液的体积比的范围可以为约10:1至约1:5、约2:1至约1:2、约3:2至1:1,或其间的任何值和范围。

[0046] 冷却步骤通常会牵涉缓慢冷却。在此类实施方案中,可以将培养基-细胞悬浮液以约0.01°C/min至约1000°C/min、约0.1至约10°C/min、约0.5至1°C/min、或其间的任何值或范围的速率冷却。

[0047] 如上文和实施例更详细讨论的,在冷却步骤之后,聚合物或其它高分子在培养基-细胞悬浮液的未冷冻部分中浓缩。在某些实施方案中,培养基的未冷冻部分中的聚合物

或其他高分子的浓度为至少约25% (w/v)、至少约35% (w/v)、至少约40% (w/v) 或其中的任何值或范围。

[0048] 可以于非低温冷冻温度将培养基-细胞悬浮液维持较长的时间段。应当理解,尽管可以于或接近初始非低温冷冻温度将培养基-细胞悬浮液维持其被冷冻的整个时间,但是在冷冻期期间温度可以在不同的非低温冷冻温度之间变化。在贮存期间,也可以将培养基-细胞悬浮液冷却至低温冷冻温度一段时间,并且对于时间段的剩余部分,升温回到非低温温度范围(例如,若一名使用者在液氮中贮存细胞,然后由另一名使用者在深度冷冻器中贮存;或者在液氮中贮存细胞,但是在干冷冻器(-78°C以上)中温热和运输)。

[0049] 如上所讨论,可以于非低温冷冻温度将培养基-细胞悬浮液维持长得令人惊讶的时间段,而将细胞的融解后细胞存活率维持为与将细胞在液氮中贮存相同时间段获得的融解后细胞存活率大致相同。与本发明一致,可以于非低温冷冻温度将培养基-细胞悬浮液维持超过三周、约三周并延长长达至少1年、约1年或更多、约5年或更多、或约10年或更多、以及其中的任何时间段或时间段的范围。

[0050] 如实施例中所证明的,在冷冻期结束时,在培养基-细胞悬浮液中贮存的细胞具有与将所述细胞在液氮中贮存相同时间段获得的融解后细胞存活率大致相同的融解后细胞存活率。细胞存活率可以是在液氮中贮存相同时间段的细胞的存活率的至少约80%、至少约90%、约100%或更高以及它们之间的任何值或范围。在不使用本发明的培养基的情况下,例如仅使用10%DMSO作为冷冻保护剂,5%至30%(占幸免于液氮中贮存的那些细胞的数目)的细胞(取决于细胞类型,参见图6A、B和D)在-80°C贮存约2-3个月后存活,贮存1年后约0%存活(如图6A所示,58周)。因此使用本发明的培养基贮存的细胞的存活率显著高于在不使用本发明的培养基的情况下于-80°C贮存的细胞的存活率。

[0051] 可以以允许聚合物以期望的浓度溶解的任何顺序将聚合物(或其它高分子)和冷冻保护剂彼此以及与液体组合。在某些实施方案中,首先将聚合物溶解于含水液体中以形成第一混合物,然后添加冷冻保护剂,或者可以颠倒该顺序。在其他实施方案中,同时添加冷冻保护剂和聚合物,或者可以添加少量的每种,直至达到期望的比率。Ficoll/含水液体与冷冻保护剂的体积比的范围可以为约10:1至1:5、约5:1至1:1、约2:1至1:1或其间的任何值或范围。

[0052] 本发明证明,向典型的冷冻保存溶液添加本发明的亲水且无毒的高分子显著改善非低温冷冻温度下的系统热稳定性。认为这通过在缓慢冷冻程序后由高分子实现的高分子拥挤效应而发生。因此,使用本发明的冷冻保存培养基提供在-80°C各种细胞的可靠冷冻保存至少一年,融解后存活力、铺板效率和细胞表型的完全保留与用LN<sub>2</sub>贮存实现的相当。用本发明的培养基实现的这些结果例示完全消除对LN<sub>2</sub>的需要的非低温细胞贮存方法的实用性。

[0053] 通过以下非限制性实施例例示本发明的某些方面。

[0054] 实施例1:分子动力学研究,证明了致密的3-D结构化亲水性多糖分子在防止冰重结晶中的高分子拥挤效应

[0055] 制备分子系统的三种模拟盒,包括Ficoll 70-DMSO-水、蔗糖-DMSO-水和DMSO-水以进行分子动力学模拟。对于所有这些系统,将系统温度固定为-80°C。每种组分的浓度由这些三元系统的预先测量的相图确定。对于具有Ficoll和DMSO质量比为1:1的Ficoll 70-

DMSO-水系统,相图确定于 $-80^{\circ}\text{C}$ ,Ficoll、DMSO和液态水的浓度分别为35%、35%和30% (w/w) 以与固体水(冰相)达到相平衡。换言之,对于本发明的培养基,在其与DMSO和细胞悬浮液混合后,将新混合物缓慢冷却至 $-80^{\circ}\text{C}$ ,然后显著提高Ficoll浓度。图1 (A) 描绘了在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下Ficoll-DMSO-水系统的高分子拥挤行为的分子动力学演示,其中冰核置于中心以测试系统稳定性。左边照片是整个模拟盒。右边照片是显示冰核的系统的横截面视图。图1 (B) 描绘了在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下均匀分布的蔗糖-DMSO-水系统的分子动力学演示,其中冰核置于中心以测试系统稳定性。左边照片是整个模拟盒。右边照片是显示冰核的系统的横截面视图。图1 (C) 描绘了在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下均匀分布的DMSO-水系统的分子动力学演示,其中冰核置于中心以测试系统稳定性。左边照片是整个模拟盒。右边照片是显示冰核的系统的横截面视图。

[0056] 重要的是,如图1 (A) 中表明,形成了许多个别Ficoll球体(直径约5nm)的独特网络。

[0057] 根据相图,对于具有蔗糖和DMSO重量比为1:1的蔗糖-DMSO-水系统,蔗糖、DMSO和水浓度当它们与冰相达到相平衡时分别为36%、36%和28% (w/w);对于冷冻前具有DMSO和水重量比为1:9(如在广泛使用的冷冻保存方法中)的DMSO-水系统,它们的相平衡浓度分别为58%和42%。这三种情况Ficoll-DMSO-水(图1 (A))、蔗糖-DMSO-水(图1 (C))和DMSO-水(图1 (C))的模拟盒的尺寸分别为 $156.929\times 159.481\times 159.300 \text{ \AA}$ 、 $163.532\times 169.882\times 159.953 \text{ \AA}$ 和 $140.624\times 145.061\times 135.631 \text{ \AA}$ ,而总原子数分别为235,440、242,118和175,744。

[0058] 为了证明上述系统的热稳定性,将典型的立方冰核(以形成10nm立方体的一组512个水分子呈现)人工置于每个模拟盒的中心,如图1所示,模拟在冷冻或贮存期间在上述未冷冻的溶液中开始冰成核但未进一步发展的情况。通过分子动力学分析这三种不同系统中此冰核的稳定性。使用由Sandia National Laboratories销售的常用的大规模原子/分子大规模并行模拟器(LAMMPS)进行模拟。使用VMD(视觉分子动力学(visual molecular dynamics))显现数据以及数据处理。在进行模拟之前,用能量最小化程序进行所有这些分子系统,以找到更好的初始启动配置。一旦找到潜在的最小化结构,整个系统在拥有期望的固定密度和温度的状态下平衡。整个模拟在1fs的相同时间步骤情况下以用于平衡的15,400个步骤和用于数据取样的另外504,000个步骤进行。

[0059] 通过原子位置的均方根(RMS)距离以及这三个系统的最终平衡结构测量冰核周围液态水分子的活性,并且图2中显示了结果,其中Ficoll-DMSO-水为底部曲线,蔗糖-DMSO-水在中间曲线中,并且DMSO-水在顶部曲线中。证明了DMSO-水系统产生最大的RMS距离值,证明了最低的热不稳定性。蔗糖-DMSO-水系统显示略微降低的RMS距离值。具有Ficoll存在的系统显著降低了RMS值,换言之,导致核周围水分子的最高热稳定性。因此,可以得出结论,Ficoll球体的存在可以显著减弱液态水分子与冰核之间直接相互作用的机会,并且此种机制导致在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下防止冰重结晶。由于包括PVP、PEG、HES、PVA等的分子的无定形结构,在技术上难以将它们纳入分子动力学模型中,但可以预测它们相当均匀分布的线性分子或所得的松散3-D结构将产生与蔗糖-DMSO-水系统的RMS距离相比相似的RMS距离值,并且导致与具有Ficoll高度致密的球形分子的系统相比低得多的热稳定性。

[0060] 实施例2:在非低温温度下防止冷冻保存溶液的重结晶

[0061] 进行扫描电子显微术(SEM)以证明本发明的培养基显著改善样品中冰晶的热稳定性的能力。

[0062] 在本发明培养基的一个实施方案中,以体积比3:2将DMEM培养基中20% (w/v) Ficoll 70和20% (v/v) DMSO的溶液与细胞悬浮液的替代物,例如不含任何细胞的DMEM培养基逐渐混合,并且转移至1.5ml冷冻瓶。然后将这些小瓶加载到广泛使用的冷冻容器(Nalgene Mr.Frosty)中,将所述冷冻容器安装到-80℃冷冻器中以提供约1℃/min冷却速率直到次日。然后,将这些小瓶转移到冷冻器中的预冷且密封的小瓶容器中并贮存5周。为了比较,也将作为DMEM培养基中的10% (v/v) DMSO溶液的对照组冷却并以相同的方法贮存相同的时间段。在5周结束时,将冷冻管直接插入LN<sub>2</sub>中以固定冰晶形态并在LN<sub>2</sub>内破裂。固定且破裂的样品在铜阶段(copper stage)由LN<sub>2</sub>覆盖,然后转移到SEM系统的真空室中。在LN<sub>2</sub>蒸发并且室压低于10<sup>-2</sup>Pa之后,通过SEM扫描样品的表面以观察破裂表面的冰形态。图3显示了在相同的放大和条长度为500μm的情况下,贮存5周后的破裂样品的SEM观察。图3A显示了正常冷冻的冷冻保存溶液的SEM观察,并且图3B显示了掺入相同冷冻保护剂的本发明培养基的SEM观察。如图3A所示,对于仅含有10%DMSO的对照溶液,冰晶在贮存5周后已合并成大块或片,并且难以鉴定任何单一冰晶。相反,如图3B所示,本发明的培养基保留作为颗粒的冰晶形态,并且容易鉴定单一冰晶。如图4所示,对贮存五周的样品的简单光学观察支持相同的结论:对照溶液(10%DMSO和90%DMEM)(A)由于大尺寸的重结晶冰而不是不透明的(照片中的小瓶显示的颜色更白),而如上所述,本发明的培养基与DMEM的混合物(B)由于较少量和较小尺寸的冰晶而产生更透明(即较少白色)的冷冻溶液。

[0063] 实施例3:使用差示扫描量热法检查热稳定性

[0064] 水溶液中Ficoll(一种致密的球形亲水性多糖)的拥挤可以限制微尺度扩散并限制高分子的结构重构。为了探索其在调节冰重结晶方面的潜力,使用差示扫描量热法(DSC)来在非低温温度下检测DMSO和Ficoll(Ficoll 70和Ficoll 400)水溶液的热稳定性。为了比较,还测试类似的含有DMSO和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或蔗糖(代表了用于冷冻保存的常用聚合物和小分子)的三元系统。为了在缓慢冷冻过程结束时对残留溶液进行建模,用相同的总溶质浓度(50%w/w)制备高度浓缩的溶液,其由1:1重量比的非渗透性溶质之一和渗透性冷冻保护剂DMSO构成。使用Pyris Diamond DSC(Perkin-Elmer Corp)遵循检测玻璃化和脱玻璃化的标准DSC程序。将8μl体积的每种模型溶液密封在设计用于液体样品的标准10μl铝坩埚(Perkin-Elmer Corp)中,然后在DSC仪的样品架中加载。将所有样品从1℃以100℃/min冷却至-160℃以实现完全玻璃化,这通过在冷却期间和加热程序后所有样品在-130℃附近的连续热容变化来证实,并且样品无一在冷却过程期间经历任何结晶。在-160℃保持1分钟后,将样品以10℃/min的升温速率加热至20℃。在所有样品中检测到脱玻璃化,并且使用Perkin-Elmer Corp.提供的Pyris™热分析软件将相应放热曲线的起始温度确定为脱玻璃化温度值。表1显示了在缓慢冷冻过程结束时对含有一种聚合物(或蔗糖)和DMSO的水溶液的未冷冻残留部分建模的高度浓缩溶液的脱玻璃化温度(T<sub>d</sub>)。每种溶液的总溶质重量百分比固定为50%w/w。

[0065] 表1

[0066]

溶质浓度(w/w)	T <sub>d</sub>
25%Ficoll 70,25%DMSO	-67.0℃
25%Ficoll 400,25%DMSO	-75.7℃

25%PVP 40,25%DMSO	-91.5℃
25%PVP 360,25%DMSO	-101.8℃
25%蔗糖,25%DMSO	-110.1℃
50%DMSO	-118.2℃
16.7%Ficoll 70,33.3%DMSO	-90.6℃

[0067] 由于重结晶涉及不产生可检测的潜热释放的自发过程,这些模型溶液的热稳定性通过其脱玻化温度(Td)评估。此种方法是可能的,因为Td总是低于但接近重结晶开始的温度。因此,若在缓慢升温期间对这些模型溶液中任一种测量的Td高于-80℃,如对含有Ficoll 70(Td,-67℃)或Ficoll 400(Td,-75.7℃)的溶液所观察到的,则认为它是热稳定的并且在-80℃不会发生重结晶(表1)。在两种Ficoll聚合物中,Ficoll 70似乎在提供潜在有用的冷冻保存培养基方面是优越的,因为DMSO以1:1的重量比其显示较高的Td值。这些结果提示当冷冻保存培养基更浓缩时,在较低浓度(例如各10%)Ficoll 70和DMSO的情况下启动缓慢冷却以通过冷却到-80℃实现足够的高分子拥挤,这潜在防止胞外溶液的重结晶并且因此实现-80℃的长期细胞贮存。

[0068] 实施例4:在-80℃长期贮存后检测O2K猪iPSC细胞的存活力和多能特征

[0069] 检查了本发明的培养基在商业深度冷冻器中长期贮存期间保持猪诱导多能干细胞(iPSC)的O2K系的存活力和多能特征的能力。猪iPSC的O2K系是幼稚型多能干细胞,其在自我更新方面依赖于白血病抑制因子(LIF)和STAT3信号传导,其可以分散到单细胞中而不显著丧失存活力。对于日常维护,在补充有三种抑制剂(CHIR99021(Stemgent)、PD032591(Stemgent)和PD173074)、2μg/ml多西环素(Stemgent)和1000单位/ml人LIF(Millipore)的N2B27(Gibco)培养基中在六孔培养板(Nunc)中的经层粘连蛋白(Gibco)包被的基质或经照射的小鼠胚胎成纤维细胞上培养O2K piPSC。于37℃用Accutase(Millipore)分散7min后每三天传代O2K piPSC。用由Innovative Cell Technologies,Inc以商品名Accutase®出售的细胞分离溶液将细胞集落分散成单细胞。通过离心(200×g,5分钟)收集分离的细胞,并重悬于冷却的培养基中。本发明的培养基的不同实施方案制备为:10%(w/v)Ficoll 70和20%(v/v)DMSO、20%(w/v)Ficoll 70和20%(v/v)DMSO、30%(w/v)Ficoll和20%(v/v)DMSO。这些培养基基于FBS(血清)或Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM/F12,无血清),换言之,排除Ficoll 70和DMSO,培养基的液体部分是FBS或DMEM。将这些培养基中的每种逐滴添加到其培养基中的细胞悬浮液(细胞悬浮液与所有添加的培养基滴之间的总体积比为约3:2)。混合后,DMSO的培养基-细胞悬浮液中的最终浓度为约10%v/v,并且Ficoll 70在冷冻前分别为5%、10%或15%w/v。此类混合程序是改变由通过将整个冷冻保存培养基与细胞悬浮液直接混合而产生的渗透损伤引起的细胞损伤。然后,将冷冻管置于冷冻器(Mr.Frosty,Nalgene)中,如广泛用于许多细胞类型的当前冷冻保存。将后者置于-80℃的冷冻器中过夜,以提供约1℃/min的冷却速率。次日,将小瓶贮存在-80℃的冷冻器中两周。对照组是用类似程序处理的细胞以达到相同的DMSO终浓度(10%),只是冷冻保存培养基基于单独的FBS并且不含Ficoll,如通常用于干细胞LN<sub>2</sub>贮存。通过相同的缓慢冷冻程序冷却这些对照样品,然后在-80℃(作为阴性对照)或在LN<sub>2</sub>杜瓦瓶(dewar)(作为阳性对照)中贮存。

[0070] 对于融解,将所有冷冻管在37℃水浴中快速温热约1分钟直至冰块消失。然后,将

培养基-细胞悬浮液转移到15ml离心管并与5ml温热的培养基缓慢混合。离心(200×g,5分钟)后,除去上清液,并且将细胞团粒重悬于1ml新鲜培养基中。

[0071] 将融解并培养的细胞在6孔板中铺板并培养过夜。在第一次培养基更换后,在每孔内的五个不同区域里获得贴壁集落的图像。铺板效率(plating efficiency)以集落/初始铺板细胞数目×100%评估。然后,通过Accutase将集落完全分散,并通过使用TC10自动细胞计数器(Bio-Rad)评估总细胞数。

[0072] 对于(A)基于FBS的培养基和(B)基于无血清DMEM/F12的培养基,图5中显示了贮存两周后的结果。在每个图内,柱形值是平均值±SEM(n=3),不同的字母(a、b、c)指示显著不同(P<0.05)的值。

[0073] 仅在包含细胞悬浮液和20%Ficoll和20%DMSO培养基的混合物(最终混合后且冷冻前的Ficoll浓度是10%,如图5中显示和上文解释)的培养基-细胞悬浮液内于-80℃冷冻保存的细胞提供了与LN<sub>2</sub>贮存控制的铺板效率相当的铺板效率。Ficoll的较低和较高浓度提供显著恶化的存活。在任何测试的冷冻条件下,FBS的存在不影响结果。然后,使用20%Ficoll 70和20%DMSO培养基以与细胞悬浮液混合,用于以下的较长期贮存和其他细胞类型。

[0074] 在图6A中显示在第2、5、10和58周后融解的O2K猪iPSC的结果。图6显示了在三种条件下冷冻保存的细胞的结果:以左柱形显示的10%v/v DMSO并且在LN<sub>2</sub>中贮存、在中心柱形中显示的10%v/v DMSO并且-80℃冷冻器中贮存、和右柱形中的在-80℃冷冻器中贮存的包含细胞悬浮液与20%Ficoll 70和20%DMSO介质的混合物的培养基-细胞悬浮液。柱形值是指平均值±SEM(n=3),不同的字母(a,b)指示相同检查点时的结果内显著不同(P<0.05)的值。

[0075] 即便到第2周结束,相对于其他两种处理,在-80℃不使用本发明的培养基冷冻保存的细胞附着、增殖和提供集落(红色柱形)的能力已显著下降。这些下降在贮存时间内是逐渐的,使得在10周时,恢复非常低,并且在贮存58周后根本不形成集落,结果与重结晶过程引起逐渐而非立即细胞损伤的构思一致。相反,在细胞悬浮液和本发明培养基的所述实施方案的混合物中-80℃贮存的猪iPSC相对于LN<sub>2</sub>存储随时间显示铺板效率(图6A,左图)或增殖能力(图6A,右图)的无明显降低。

[0076] 对于融解细胞的多能性测试,在融解后,允许细胞建立集落,传代并在盖玻片上生长。将样本在PBS中的4%v/v多聚甲醛中在室温下固定15分钟,清洗,并暴露于PBS中的5%v/v山羊血清或5%v/v驴血清、1%w/v牛血清白蛋白、0.1%v/v Triton X-100(Fisher)达30分钟。然后将固定的样本与一抗在4℃温育过夜。清洗后,将它们暴露于二抗。仅暴露于二抗的集落充当对照。使用具有DAPI的VECTASHIELD封固剂(Vector Laboratories)封固盖玻片。一抗是:POU5F1(1:100,Santa Cruz Biotechnology)、SOX2(1:1000;Millipore)、NANOG(1:200;Abcam)、SSEA1(1:50;Developmental Studies Hybridoma Bank[DSHB])。如图9A所示,来自使用本发明方法的-80℃贮存的细胞也保留多能表型。

[0077] 实施例5:在-80℃长期贮存后检查ID6猪iPSC细胞的存活力和多能特征

[0078] 在图7A中显示培养期间ID6猪iPSC的形态。细胞形成扁平的粘性集落,其细胞通常在彼此解离时死亡,除非采取特殊的预防措施。因此,在历史上已经将它们传代并在LN<sub>2</sub>中以块冷冻保存。然而,冷冻细胞块存在限制,因为冷冻保护剂不太有效地穿透它们,并且在

冷冻保存后仅小部分细胞可以存活。铺板效率通常较低,并且集落繁殖也是困难的。

[0079] 为了克服上述技术问题,在冷冻前通过使用“温和解离试剂”(Stem Cell Technologies)将ID6细胞分散成较小的细胞聚集体6分钟,并在冷冻前补充10 $\mu$ M ROCK抑制剂。以此方式分离的细胞通常提供6-8个细胞的块,如图7B所示。

[0080] 为了维持,在补充有20%敲除血清替代物(KOSR,Gibco)和4ng/ml人FGF2的标准hESC培养基(hESCM)中的六孔培养板中,在经照射的小鼠胚胎成纤维细胞(iMEF)饲养层上培养ID6piPSC。用于冷却、贮存和融解的程序与实施例4中描述的相同。在贮存5和15周后将样品融解。将来自每个处理组中的三个样品的融解细胞转移到经iMEF包被的6孔板,来自一个小瓶的细胞在两个孔之间平均分开。在融解和铺板后第4天,以40倍放大率捕获每个培养孔的不同区域的五个图像,以确定相对于已经在LN<sub>2</sub>中贮存的对照组的集落区域。然后,将细胞在磷酸盐缓冲盐水(PBS,Hyclone)中的4%v/v多聚甲醛中固定2分钟,并针对碱性磷酸酶活性染色以增加对比度。以8倍放大率拍摄9张图像以覆盖孔的整个区域并用于测量存在的集落总数。通过Image J软件分析所有图像。图6B中显示了结果。如从实施例4(图6A)观察到,在-80 $^{\circ}$ C使用本发明的培养基冷冻保存的细胞(右柱形)与LN<sub>2</sub>中的贮存(左柱形)提供相似的每孔集落数目(图6B,左图)和相似的集落大小(图6B,右图),并且冷冻保存效率随时间没有下降(图6B)。对于在不使用本发明培养基的情况下在-80 $^{\circ}$ C贮存的细胞(中心柱形,图6B),即使在仅仅5周后,随时间观察到融解后细胞存活和集落大小的显著下降,因此不再追踪更长的贮存期。对于融解细胞的多能性测试,遵循实施例4中描述的相同程序,只是一抗不包括NANOG。如图9B所示,来自使用本发明方法的-80 $^{\circ}$ C贮存的细胞也保留多能表型。

[0081] 实施例6:在-80 $^{\circ}$ C下长期贮存后检测人iPSC细胞的活力和多能特征

[0082] 本发明的培养基还能够为人iPSC提供有效的冷冻保存。人iPSC系源自人脐带成纤维细胞,其通过使用附加体质粒转染用五种因子(POU4F1、SOX2、KLF4、LIN28和MYCL)和TP53shRNA重编程。在限定的mTeSR1培养基(STEMCELL Technologies)中,在经基质胶(Matrigel)(BD Bioscience)包被的六孔培养板(Nunc)上培养细胞。人iPSC细胞系的细胞集落形态与实施例5中的ID6细胞相似。因此,在冷冻之前,如实施例5中所述,也将细胞集落分散成较小的细胞聚集体。冷却、贮存、融解、融解后存活力测试的程序与实施例5中描述的几乎相同,只是将融解的细胞转移到经基质胶包被的6孔板中。如图6C所示,对于对照组(不使用本发明的培养基的液氮贮存,左柱形)和处理组(使用本发明的培养基的-80 $^{\circ}$ C贮存,右柱形),贮存65周后的融解后存活和集落大小几乎相同。除了用SSEA4替换SSEA1之外遵循实施例4中描述的类似程序对融解细胞的多能性测试也证明在65周时段后-80 $^{\circ}$ C冷冻保存的细胞保留多能表型(参见图9C)。

[0083] 实施例7:在-80 $^{\circ}$ C长期贮存后检查人ESC细胞的存活力和多能特征

[0084] H1hESC(WA01)于2002年从WiCell Research Institute, Madison WI获得。培养、维持、分散、冷却、贮存、融解和融解后存活力测试的程序与实施例6中描述的相同。在图6D中显示了结果,并且当使用本发明的培养基(左图中的右柱形)时-80 $^{\circ}$ C贮存5和15周后的融解后存活力显示无下降,并且与来自液氮贮存(左图中的左柱形)的融解后存活力相当。在不使用本发明的培养基(两个通道中的中心柱形)的情况下,细胞存活力和集落大小两者均显著降低。如图6D右图所示,使用本发明的培养基导致降低的集落大小,尽管结果仍然比不使用本发明培养基的-80 $^{\circ}$ C贮存的那些结果好100%。

[0085] 或者,我们接下来在RHO-激酶抑制剂(ROCK1, Y-27632)(其保护hESC免于细胞死亡)存在下使用H1hESC集落的TrypLE分散,以在混合和冷冻之前实现单细胞的悬浮(图7C)。我们还测试本发明的培养基用于液氮贮存用途,以测试其使用是否会影响低温贮存效率。冷却、贮存、融解程序与上述相同。对于融解后存活力和功能测试,进行流式细胞术以提供更详细的比较。通过在37°C以TrypLE(Invitrogen)处理7分钟将hESC分散为单细胞,在Foxp3固定/透化溶液(eBioscience)中在冰上固定1小时,并在5%(v/v)驴血清中孵育15分钟以减少抗体的任何非特异性结合。然后将细胞暴露于封闭缓冲液中的针对POU5F1的抗体(1:200, Santa Cruz Biotechnology)或针对IgG的抗体(0.4 $\mu$ g/mL; Santa Cruz Biotechnology)达1小时。所有步骤均在冰上黑暗中进行,并且在每个步骤之间通过透化溶液(eBioscience)清洗细胞三次。对于每个细胞群,在Accuri C6流式细胞仪(BD Biosciences)中分析至少10000个细胞。通过FlowJo(版本X)软件分析数据。在图8中显示了结果。

[0086] 第一,使用不同的基础培养基(左图中的FBS和右图中的DMEM)来制备本发明的培养基不会引起融解后细胞存活和铺板效率的任何显著差异。因此,本发明的培养基可以完全不含血清;第二,使用本发明的培养基在没有任何负面影响的情况下确实略微改善液氮中的冷冻保存效率,比较在中左柱形(使用本发明的培养基用于液氮贮存)和左柱形(使用仅10%DMSO用于液氮贮存)上表明的数据;第三,使用本发明的培养基(右柱形)的-80°C贮存产生与来自液氮贮存(左柱形)的那些几乎相同的细胞存活和融解后铺板效率;最后,在不使用本发明培养基的情况下-80°C贮存导致比其它处理显著降低的融解后的铺板效率和存活力(中右柱形)。

[0087] 对于来自使用本发明培养基时-80°C贮存的融解后H1hESC细胞,图9D显示在从冷冻保存的H1hESC分化的胚胎样体(EB)中表达的谱系标志物:KRT7(滋养上胚层)、DESMIN(中胚层)、NESTIN(上胚层)和SOX17(内胚层),进行的免疫组织化学程序类似于上述实施例(特征性生物标志物明显不同)。为了通过EB形成实现hESC的自发分化,通过分散酶/机械解离分散融解后hESC的集落并转移到低附着板(Corning)中的EB分化培养基中,所述EB分化培养基由DMEM/F12、15%FBS、1%非必需氨基酸、1mM L-谷氨酰胺和0.1mM $\beta$ -巯基乙醇组成。在悬浮液中生长5天后,将EB接种到明胶包被的板上,并在相同的培养基中再培养9天,然后固定以用于免疫组织化学。

[0088] 图9E还显示了从使用本发明的培养基在-80°C保存的冷冻保存的H1 hESC分化的心肌细胞:上图,跳动的心肌细胞集落;下图,心脏标志物TNNT2的表达。比例尺=200 $\mu$ m。通过使用试剂盒(心肌细胞分化试剂盒;Gibco)的组分并遵循制造商的说明将融解后的hESC分化成心肌细胞。简言之,在mTeSR1培养基(STEMCELL Technologies)中的基质胶(BD Bioscience)包被的板上培养的hESC集落用心肌细胞分化培养基A(Gibco)处理两天,然后用心肌细胞分化培养基B(Gibco)再处理两天。然后,将细胞在心肌细胞维持培养基中再培养8天,此时出现自发收缩的心肌细胞。也通过免疫组织化学(程序类似于上述实施例中的程序)确认心肌细胞标志物TNNT2的表达。

[0089] 实施例8。

[0090] 也用使用不同方法分离的ID6猪iPSC上胚层型细胞进行使用本发明的培养基的实验。在分散酶处理后将集落(图7A)分成大块(约100个细胞),随后使用切割工具以产生均匀

尺寸的块,并且在图7D中显示。(在图7中,比例尺=500 $\mu$ m)。尽管此类方法历来是传代此类细胞的标准方法,但是它不再是冷冻保存之前处理上胚层型干细胞的优选方法。更优选使用就前述实施例讨论并且如图7B和图7C所描绘的解离方法,并且当使用本发明的培养基贮存时,通过此类手段解离的细胞显示阳性结果,如上文讨论。然而,为了直接保存由分散酶/切割处理产生的较大的集落,在与本发明的培养基混合之前将一定量的冷冻保护剂预加载到大集落中的潜在处理是已知的,并且可以在以后开发,可以预期当所得细胞在本发明的培养基中贮存时产生更好的结果。此改善的原因在于本发明的培养基中Ficoll的存在减缓或延迟冷冻保护剂渗透到大集落的内层中。因此,在混合本发明的培养基之前将一定量的冷冻保护剂单独加载到大集落中的预处理将解决此问题。图10确认没有上述预处理的切割方法不是应用本发明方法的优选方法。图10显示了在集落的机械解离和冷冻保存2周后形成的集落。图10A和10B分别描绘了在-80 $^{\circ}$ C和LN<sub>2</sub>贮存条件下在没有本发明培养基的情况下贮存的图7D的大集落。图10C描绘了在没有上述预处理的情况下在本发明培养基中-80 $^{\circ}$ C贮存的细胞。

[0091] 实施例9:在-80 $^{\circ}$ C的三种有价值的细胞类型的中期低温保存上的效力。

[0092] 精子、外周血单个核细胞(PBMC)和大肠杆菌是典型的细胞类型,即使在贮存期延长至数年时,它们也可以在液氮中成功冷冻保存而不在低温保存期间逐渐丧失细胞存活力。然而,它们使用自制或商品化的冷冻保存培养基在-80 $^{\circ}$ C贮存导致即使在中期贮存期(例如几个月)后也显著丧失存活力和功能,并且此类损失的速率和程度取决于细胞类型。使用下面描述的实施例,我们证明当对这些细胞类型采用本发明的冷冻保存时那些损失得以阻止。

[0093] 实施例9.1:本发明的培养基与商品化冷冻保存培养基用于在-80 $^{\circ}$ C贮存猪精子的比较。

[0094] 猪精液的保存效率的改善对于猪育种改善是至关重要的,并且对食品业高度有价值。使用液氮杜瓦瓶、干式冷冻容器(dry shipper)或昂贵得多的低温冷冻器在液氮或其蒸气中冷冻保存或运输猪精液是非常昂贵的并且在大多数农场操作中使用是不切实际的。因此,在4 $^{\circ}$ C左右将新鲜收集的精液与商品化的膨胀剂(extender)溶液(无冷冻保护剂)广泛混合,但所述方法仅能维持精子存活力约1周。

[0095] 为了克服该限制,使用本发明的培养基在-80 $^{\circ}$ C进行猪精液冷冻保存,这使得收集器能够有效冷却并且在干冰上(在许多超市中可用)运输精子悬浮液,并在常规的-80 $^{\circ}$ C深度冷冻器中贮存。收集公猪精液的富含精子的级份(约100ml),并且通过精子过滤器过滤两次,并在室温下放置1.5小时。将过滤的精液样品(每个样品25ml)转移到50ml锥形管中,并通过用25ml精子清洗培养基以1:1(v/v)温和混合清洗,然后以1000X g离心7分钟。除去每个样品的上清液,然后将5ml商品化的精子膨胀剂(BF5,其主要成分包括蛋黄和葡萄糖等)与离心的精子温和混合作为标准延伸或悬浮程序。将每种悬浮液样品在冷冻器中预冷却至4 $^{\circ}$ C,然后冷冻。对于对照,将商品化公猪精液冷冻保存培养基(BF5加4%v/v细胞培养级甘油)(其仅对于液氮中的猪精液的贮存是有效的)以最终体积比为1:1逐滴添加到悬浮液,并且产生约为10ml的终体积。将新悬浮液等分取样到0.5ml吸管(10-20根吸管)中,并且将吸管放在干冰上1小时,然后在-80 $^{\circ}$ C冷冻器中贮存。对于处理组,BF5用作新冷冻培养基的基础培养基(正如在先前实施例中使用DMEM作为干细胞的基础培养基)。制备两个处理组:用

于处理A的冷冻保存培养基是与4%v/v细胞培养级甘油和20%w/v Ficoll 70混合的BF5；用于处理B的冷冻保存培养基是与4%v/v细胞培养级甘油和10%w/v Ficoll 70混合的BF5。对于这两种处理，将BF5中的精子悬浮液以1:1比率与含有Ficoll的新冷冻培养基（分别为A和B）混合，然后等分取样到0.5ml吸管中，放在干冰上冷冻并在深冷冻器中贮存（与对照相同）。

[0096] 贮存两个月后，通过将吸管直接插入室温水中来融解来自三组的吸管。对于每组，将来自两根吸管的悬浮液稀释10倍并培养2小时以评估融解后的运动性，并且收集来自其他吸管的细胞，并与IVF培养基中的约100个猪卵母细胞共培养，用于IVF效率评估。下表2中列出结果。

[0097] 直接得出结论，处理A（本发明的典型实施方案），例如使用具有20%w/vFicoll 70和4%v/v甘油添加作为渗透性冷冻保护剂的基础培养基并将其以1:1比率与细胞悬浮液混合显著改善贮存两个月后的猪精子的融解后的运动性，其存活率和IVF效率与来自液氮贮存的结果相当。相反，若培养基不含Ficoll或含有不足够量的Ficoll，则在-80℃冷冻器中贮存两个月后，融解后的运动性和功能性受到严重损伤。

[0098] 表2：冷冻保存培养基处理A、冷冻保存培养基处理B、和对照冷冻保存培养基，其用于在-80℃贮存猪精子达2个月。

[0099]

组	融解后的运动性	IVF测试
对照 (BF5 + 4%甘油)	15%进行性非常低运动性	不形成胚泡
处理A (BF5+4%甘油+20% Ficoll 70)	40%进行性高运动性	成功胚泡形成(> 20%)
处理B (BF5+4%甘油+10% Ficoll 70)	20%进行性低运动性	最小的胚泡形成(< 5%)

[0100] 所有冷冻保存培养基与细胞悬浮液以1:1的体积比混合。

[0101] 实施例9.2：本发明的培养基和广泛使用的DMSO+FBS培养基用于在-80℃贮存猪PBMC的比较。

[0102] PBMC对于血库高度有价值，并且广泛用于与免疫学（包括自身免疫性疾病）、传染病、血液恶性、疫苗开发等相关的研究或生物学应用中。使用DMSO、FBS或BSA和基础培养

基(例如DMEM)的组合,这些细胞可以在液氮或其蒸气中成功冷冻保存多年而不损失细胞存活力。然而,当它们在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的冷冻器中贮存时,已经观察到逐渐的细胞损失,并且在稍微超过一年的贮存后,恢复是最小的。并且,使用干冰盒来运输先前保存在液氮或其蒸气中的那些样品导致由于在转变期间重结晶(从 $-120^{\circ}\text{C}$ 或更低温度升温至 $-78^{\circ}\text{C}$ 或更高)所致的不可避免的细胞损失。对于许多小型诊所或医院,在不使用昂贵的液氮设施的情况下建立PBMC的细胞原液在技术上是不可可能的。此外,PBMC冷冻保存培养基中使用的高浓度FBS(通常为 $40\% \text{v/v}$ )也显著增加相关成本,因为FBS的价格(每升约800至1,000美元)远高于DMEM或其他简单基础培养基(每升约20美元),更重要的是,作为动物产品的FBS产生污染和监管问题。

[0103] 为了解决这些实际问题,使用本发明的培养基在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻器中进行猪PBMC冷冻保存而不使用任何FBS。首先将约10ml猪血液与等体积的PBS+2%FBS混合,并通过使用顶层通过标准密度梯度离心( $1200\text{g}$ ,10分钟)收集细胞。将富集的细胞清洗并再次离心( $450\text{g}$ ,10分钟),并且在培养箱中在提供有稀释的GM-CSF(人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)的商品化培养基(RPMI)中于 $37^{\circ}\text{C}$ 和 $5\% \text{CO}_2$ 下培养6天。然后收集细胞并通过离心浓缩并重悬于RPMI中。将新悬浮液在每个1ml冷冻瓶中等分为0.5ml(每小瓶约 $10^5$ 个细胞)。通过将0.5ml培养基滴加到冷冻管中的细胞悬浮液中含有 $20\% \text{v/v}$  DMSO、 $40\% \text{v/v}$  FBS和 $40\% \text{v/v}$  DMEM的传统冷冻保存培养基处理对照组,使得细胞悬浮液和冷冻保存培养基之间的最终体积比为1:1。处理组用不含任何FBS的本发明培养基处理,所述培养基基于DMEM,具有 $20\% \text{v/v}$  DMSO和 $20\% \text{w/v}$  Ficoll 70的添加,并且还在冷冻管中以1:1的终体积比逐滴与细胞悬浮液混合。

[0104] 混合后,将冷冻瓶安装在商品化冷冻盒Mr.Frosty中,将盒在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的实验室冷冻器中冷却过夜,然后将冷冻瓶置于同一冷冻器中的贮存盒中贮存。贮存两个月后,将冷冻管在 $37^{\circ}\text{C}$ 水浴中融解。使用TC20<sup>TM</sup>自动细胞计数器测定冷冻前和融解后所有样品的细胞存活力。这两组的融解后的存活力和冷冻前的存活力之间的比率列于下表3中。结果清楚地证明本发明的培养基导致细胞的高恢复率,与在液氮中保存PBMC时的公开数据相当,更重要的是,有效地防止当使用传统的DMSO+FBS培养基时的组结果中显示的两个月贮存期期间的细胞损失。本发明的培养基也是无血清的(没有任何FBS)。

[0105] 表3:本发明的培养基和标准DMSO+FBS培养基,用于在 $-80^{\circ}\text{C}$ 贮存猪PBMC两个月。

[0106]

组	融解后存活力与冷冻前存活力的比率
对照 ( $20\% \text{v/v}$ DMSO, $40\% \text{v/v}$ FBS和 $40\% \text{v/v}$ DMEM)	$50.2 \pm 8.5\%$
处理 (DMEM + $20\% \text{v/v}$ DMSO和 $20\% \text{w/v}$ Ficoll 70)	$84.0 \pm 12.7\%$

[0107] 两种冷冻保存培养基与细胞悬浮液以1:1的体积比混合。

[0108] 实施例9.3:在-80℃贮存大肠杆菌感受态细胞(典型的原核细胞)方面本发明的培养基和广泛使用的培养基之间的比较。

[0109] 大肠杆菌感受态细胞是最常用的细菌细胞类型,用于分子生物学研究和技术开发中的DNA转化。使用DMSO在液氮中冷冻保存大肠杆菌感受态细胞是一种广泛使用的长期贮存方案。尽管许多实验室使用高浓度的甘油在-80℃深度冷冻器中临时贮存,但保存的细胞原液将在几个月后到期,并且使用高浓度的甘油(高粘度)在操作中存在问题。

[0110] 为了改善在深度冷冻器中长期贮存大肠杆菌感受态细胞的效率,当将细胞在-80℃贮存两个月时,与使用低浓度DMSO和高浓度甘油的处理相比测试本发明的培养基。将NEB®5-alpha F' Iq感受态大肠杆菌的预培养物稀释(在-37℃下在LB培养基中1:50),培养至OD达到0.6,然后在冰上冷却。将样品转移到离心管中并以3000rpm离心5分钟,然后将团粒重悬于25ml DI水中。对所有样品重复此清洗步骤三次。将最终的团粒合并物重悬于0.1M CaCl<sub>2</sub>水溶液中,并在每个0.5ml冷冻瓶中等分为0.1ml并在冰上冷却。制备三种冷冻保存培养基用于三种不同的处理:处理A为DI水中的14%v/v DMSO和0.1M CaCl<sub>2</sub>;处理B为DI水中的40%v/v甘油和0.1M CaCl<sub>2</sub>;处理C(本发明的培养基)为DI水中的14%v/v DMSO、20%w/v Ficoll 70和0.1M CaCl<sub>2</sub>。对于每个处理的所有样品(在冰上预冷却0.1ml细胞悬浮液,如上所述),将0.1ml相应的冷冻保存培养基直接添加到细胞悬浮液中(即体积比也是1:1),然后通过温和摇动完成混合,并且将样品在冰上保持20分钟。然后将冷冻管安装在样品贮存盒(10x5x2cm)中,并直接安装在-80℃冷冻器中进行冷却和贮存(冷却速率为约15-20℃/min)。

[0111] 在分别为1天、1个月和2个月的贮存期后,将来自每个处理组的冷冻管融解以比较贮存期对不同处理间的细胞存活力损失的影响。在对大肠杆菌感受态细胞进行标准培养和计数方案后测定每个样品的集落形成单位(CFU)的值。对于这些处理在1天、1个和2个月的贮存后的CFU值列于下表4中。如表4证明,处理A和B两者的融解后集落形成效率逐渐降低。相比之下,处理C仍然令人满意地维持集落形成效率,这对于大量分子生物学实验室将其大肠杆菌储液在深度冷冻器中维持是有益的。源自处理A的CFU值远低于其他两个(低一个数量级),因为处理A通常用于大肠杆菌的液氮贮存,但不能用于-80℃的贮存。使用处理C的1天贮存导致比处理B低的CFU值,但是从关于长贮存期(特别是长于两个月)的观点来看,其优势是明显的。它还确立本发明的培养基对原核细胞的有用性。

[0112] 表4:用于在-80℃贮存大肠杆菌1个月和2个月的不同冷冻保存培养基。

[0113]

组 (都具有0.1M CaCl <sub>2</sub> )	融解后CFU (第1天)	融解后CFU (第30天)	融解后CFU (第60天)
处理A (DI水 + 14% v/v DMSO)	$7.4 \pm 0.7 \times 10^6$	$5.7 \pm 1.0 \times 10^5$	$3.2 \pm 0.4 \times 10^5$
处理B (DI水+ 40% v/v甘油)	$11.5 \pm 1.2 \times 10^6$	$7.3 \pm 0.5 \times 10^6$	$4.2 \pm 0.3 \times 10^6$
处理C (DI水+14% v/v DMSO + 20% w/v Ficoll 70)	$8.4 \pm 0.8 \times 10^6$	$8.2 \pm 0.4 \times 10^6$	$8.5 \pm 0.6 \times 10^6$

[0114] 所有冷冻保存培养基与细胞悬浮液以1:1的体积比混合。

[0115] 在上述实施例中显示的结果的汇总中,本发明是用于在-80℃下长期贮存人和猪多能干细胞的简单可靠的方法,其基于使用含有高浓度的Ficoll 70(一种蔗糖的合成聚合物)(认为以前它尚未用于此目的或相当目的)的本发明的培养基。认为方法的成功可归因于Ficoll聚合物在非低温温度下改善渗透性冷冻保护剂的热稳定性并防止相应的冰重结晶的能力,所述冰重结晶通常在非低温温度下长期贮存期间引起细胞损失。分子机制可能是由于Ficoll 70的物理性质,Ficoll 70由半径为约5nm的小球体构成。缓慢冷却将导致在-80℃保持未冷冻的溶液中的高分子拥挤,因此填充的Ficoll 70球体形成阻碍小冰晶的扩大的机械屏障。此外,Ficoll70可以避免冷冻保存溶液中的FBS,从而避免细胞暴露于动物产物。从上述内容可以看出,本发明良好适用于实现上文阐述的所有目的和目标,以及显而易见且本发明固有的其他优点。

[0116] 由于在不脱离本发明的范围的情况下可以对本发明做出许多可能的实施例,应当理解,本文阐述或在附图中显示的所有内容都应当解释为示例性的,而不是限制性的。

[0117] 虽然已经显示和讨论具体的实施方案,但是当然可以进行各种修改,并且本发明不限于本文描述的部分和步骤的具体形式或布置,除非此类限制包括在所附权利要求书中。此外,应当理解,某些特征和子组合是有用的,并且可以在不参考其他特征和子组合的情况下使用。这被权利要求书的范围涵盖并且在权利要求书的范围内。

[0118] 附图简述

[0119] 图1A描述了在-80℃下Ficoll-DMSO-水系统的高分子拥挤行为的分子动力学演示,以及它们与生长的冰核的相互作用。

[0120] 图1B描绘了在-80℃下均匀分布的蔗糖-DMSO-水系统的分子动力学演示,以及它们与生长的冰核的相互作用。

[0121] 图1C描绘了在-80℃下均匀分布的DMSO-水系统的分子动力学演示,以及它们与生长的冰核的相互作用。

[0122] 图2描绘了分子动力学模拟结果,图1中所示的具有生长的冰核的三个系统的水原子位置的均方根(RMS)距离的数值。DMSO-水为顶部曲线;蔗糖-DMSO-水为中间曲线;和Ficoll-DMSO-水为底部曲线。

[0123] 图3A描绘了正常冷冻的冷冻保存溶液的破裂样品的SEM观察。

[0124] 图3B描绘了本发明的培养基的破裂样品的SEM观察。

[0125] 图4描绘了在-80℃下贮存5周后(A)冷冻的正常冷冻保存溶液和(B)本发明培养基的样品的光学观察。

[0126] 图5描绘了(A)基于FBS或(B)基于无血清DMEM/F12的培养基中在Ficoll170的培养基-细胞悬浮液中以不同的混合后浓度(即,在将本发明的培养基与细胞悬浮液混合的实施方案之后计算浓度值)冷冻保存的幼稚型O2K猪iPSC的细胞恢复的评估。

[0127] 图6描绘了在延长的贮存期内从(A)幼稚型O2K猪iPSC、(B)上胚层型ID6猪iPSC、(C)上胚层型人iPSC和(D)上胚层H1型hESC的融解后集落恢复。对于每个贮存期:左柱形:在液氮中贮存的细胞。中心柱形:在不使用本发明的培养基的情况下在-80℃冷冻器中贮存的细胞。右柱形:使用本发明的培养基在-80℃冷冻器中贮存的细胞。

[0128] 图7描绘了通过不同方法解离上胚层型干细胞。

[0129] 图8描绘了在借助ROCKi通过胰蛋白酶进行单细胞解离后对H1hESC进行的四种不同冷冻保存方案的功绩的比较。左柱形是在液氮中贮存的细胞。对于每个贮存期:中左柱形代表在液氮中使用本发明的培养基进行冷冻保存,显示它适用于-80℃和液氮贮存两者或其间的任何温度。右中柱形是在不使用本发明的培养基的情况下在-80℃冷冻器中贮存的细胞。右柱形是使用本发明的培养基在-80℃冷冻器中贮存的细胞。

[0130] 图9描绘了从-80℃使用本发明的培养基进行的冷冻保存的恢复后,所有上述四种干细胞类型(与图6中为相同顺序)的多能性特征的生物标志物的表达。

[0131] 图10描绘了ID6猪iPSC集落的形态,所述集落在冷冻保存2周后破碎成大块(约100个细胞)。

[0132] 参考文献

[0133] Mazur,P.Cryobiology:the freezing of biological systems.Science 168, 939-949 (1970) .

[0134] Mazur,P.Freezing of living cells:mechanisms and implications.Am J Physiol.247,125-142 (1984) .

[0135] Valeri,C.R.&Pivacek,L.E.Effects of the temperature,the duration of frozen storage,and the freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells.Transfusion 36,303-308 (1996) .

[0136] Cohen,R.I.,Thompson,M.L.,Schryver,B.,Ehrhardt,R.O.Standardized

cryopreservation of pluripotent stem cells. *CurrProtoc Stem Cell Biol*. Unit 1C.14 (2014) .

[0137] Massie, I., Selden, C., Hodgson, H., Fuller, B. Storage temperatures for cold-chain delivery in cell therapy: a study of alginate-encapsulated liver cell spheroids stored at -80°C or -170°C for up to 1 year. *Tissue Eng Part C Methods*. 19:189-95 (2013)

[0138] Fahy, G. M. & Wowk, B. Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol*. 1257, 21-82 (2015) .

[0139] Jin, B., Mochida, K., Ogura, A., Koshimoto, C., Matsukawa, K., Kasai, M., Edashige, K. Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages. *Mol Reprod* 79, 785-94 (2012) .

[0140] Baudot, A. & Odagescu, V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. *Cryobiology* 48, 283-94 (2004) .

[0141] Forsyth, M. & MacFarlane, D. R. Recrystallization revisited. *Cryo-Letters* 7, 367-378 (1986) .

[0142] Gao, D. & Critser, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 41, 187-196 (2000) .

[0143] Venketesh, S. & Dayananda, C. Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. *Crit Rev Biotechnol*. 28, 57-82 (2008) .

[0144] Chantelle, J. et al. Small molecule ice recrystallization inhibitors enable freezing of human red blood cells with reduced glycerol concentrations. *Sci Rep* 5, 9692 (2015) .

[0145] Dauty, E., & Verkman, A. S. Molecular crowding reduces to a similar extent the diffusion of small solutes and macromolecules: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Mol. Recognit* 17, 441-447 (2004) .

[0146] Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*. 26, 597-604 (2001) .

[0147] Amit, M. et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental biology* 227, 271-278 (2000) .

[0148] Ezashi, T., Das, P. & Roberts, R. M. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4783-4788 (2005) .

[0149] Roberts, R. M., Yuan, Y., Genovese, N. & Ezashi, T. Livestock Models for Exploiting the Promise of Pluripotent Stem Cells. *ILAR Journal* 00 (2015) .

[0150] Ezashi, T., Yuan, Y. & Roberts, R. M. Pluripotent Stem Cells from Domesticated Mammals. *Annual review of animal biosciences* (2015) .

[0151] Telugu, B. P. et al. Leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine

embryos. *The Journal of biological chemistry* 286,28948–28953 (2011).

[0152] Lee, J.E. & Lee, D.R. Human Embryonic Stem Cells: Derivation, Maintenance and Cryopreservation. *International journal of stem cells* 4, 9–17 (2011).

[0153] Fujioka, T., Yasuchika, K., Nakamura, Y., Nakatsuji, N. & Suemori, H. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *The International journal of developmental biology* 48, 1149–1154 (2004).

[0154] Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Vajta, G. & Trounson, A.O. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human reproduction* 16, 2187–2194 (2001).

[0155] Richards, M., Fong, C.Y., Tan, S., Chan, W.K. & Bongso, A. An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells. *Stem cells* 22, 779–789 (2004).

[0156] Ezashi, T. et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 10993–10998 (2009).

[0157] McElroy, S.L. & Reijo Pera, R.A. Culturing human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *CSH protocols* 2008, pdb prot5044 (2008).

[0158] Martin-Ibanez, R. et al. Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Human reproduction* 23, 2744–2754 (2008).

[0159] Kurosawa, H. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 114, 577–581 (2012).

[0160] Watanabe, K. et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 25, 681–686 (2007).

[0161] Baharvand, H., Salekdeh, G.H., Taei, A. & Mollamohammadi, S. An efficient and easy-to-use cryopreservation protocol for human ES and iPS cells. *Nature protocols* 5, 588–594 (2010).

[0162] Okita, K. et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature methods* 8, 409–412 (2011).

[0163] Lee, K. et al. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 7260–7265 (2014).

[0164] Girish, V. & Vijayalakshmi, A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian journal of cancer* 41, 47 (2004).

[0165] Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C., Storage of Boar Semen, *Animal Reproduction Science* 62, 143–172 (2000).

[0166] Yang, Jun, et al. The effects of storage temperature on PBMC gene

expression, BMC Immunology 17,6-21 (2016).

[0167] Cody, William L., et al. Skim Milk Enhances the Preservation of Thawed - 80°C Bacterial Stocks, J Microbiol Methods 75,135-138 (2008).

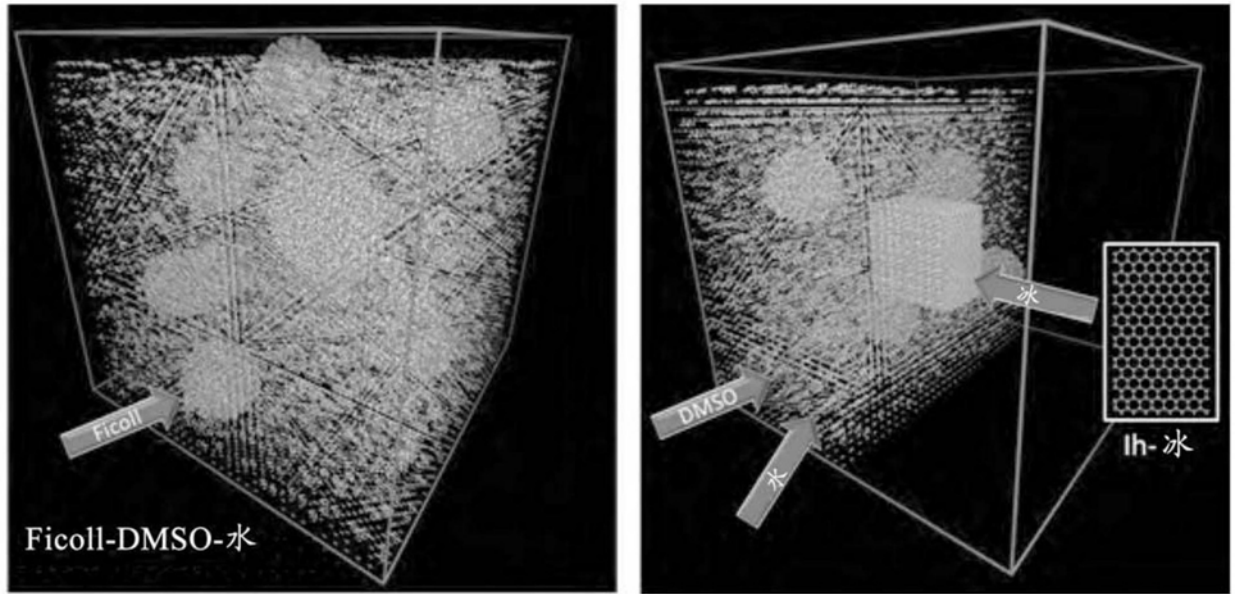


图1A

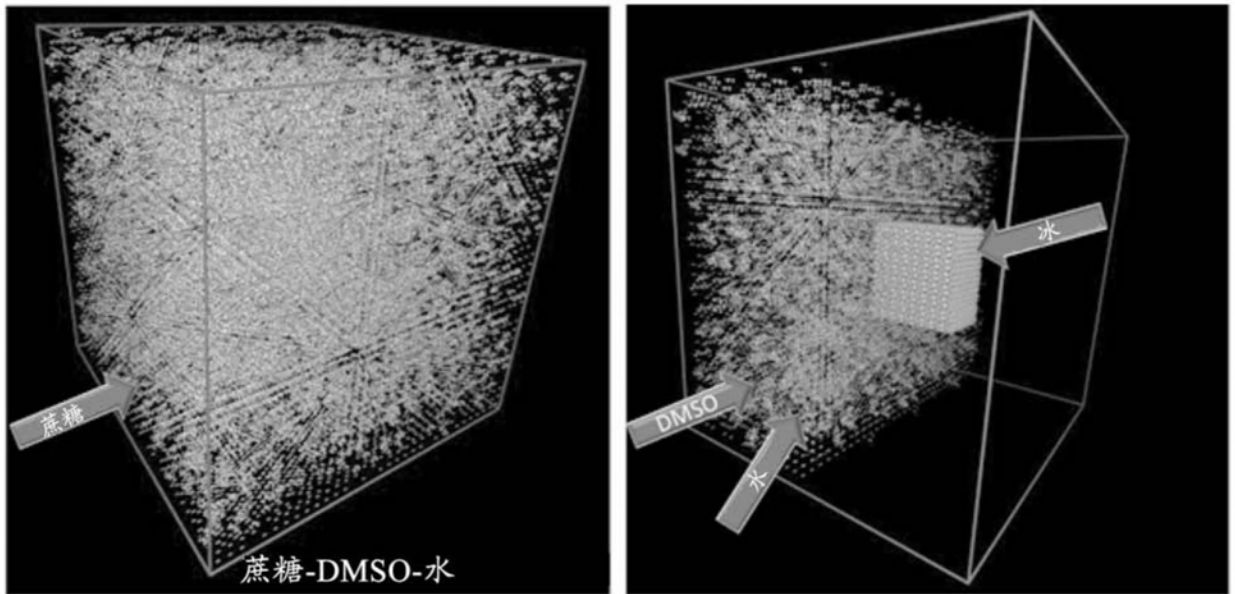


图1B

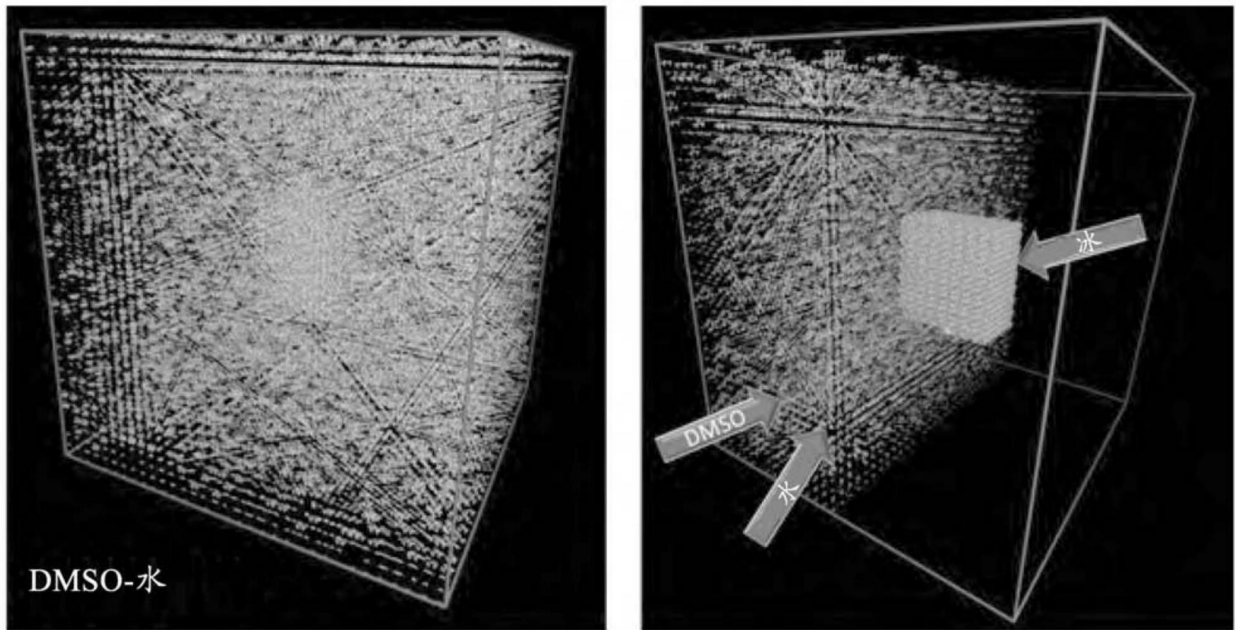


图1C

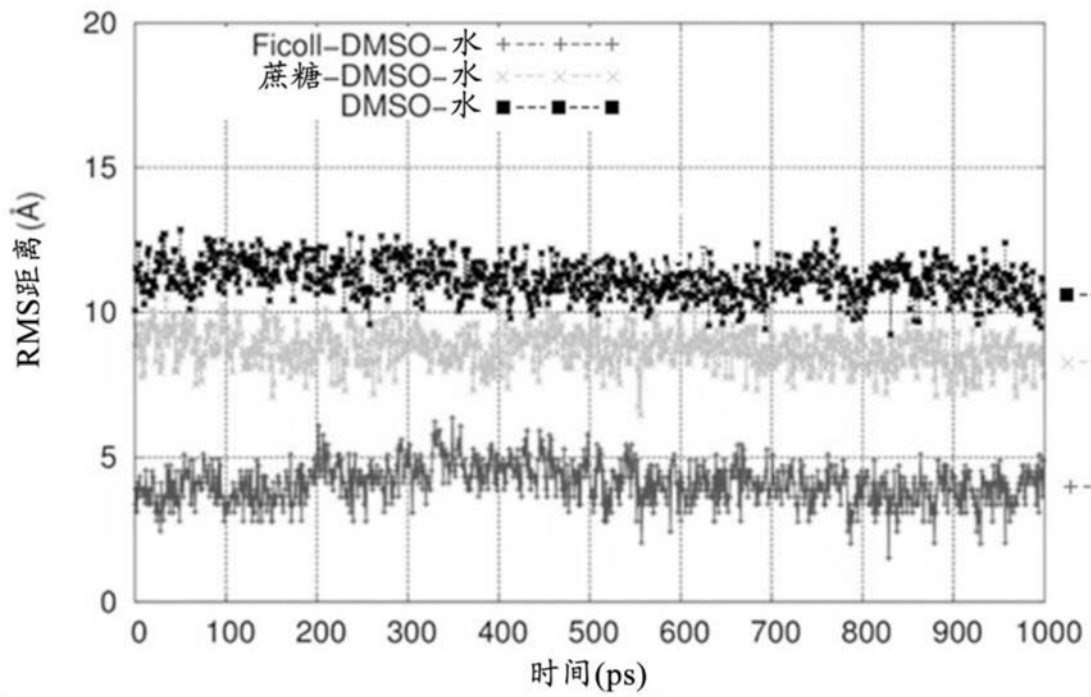


图2

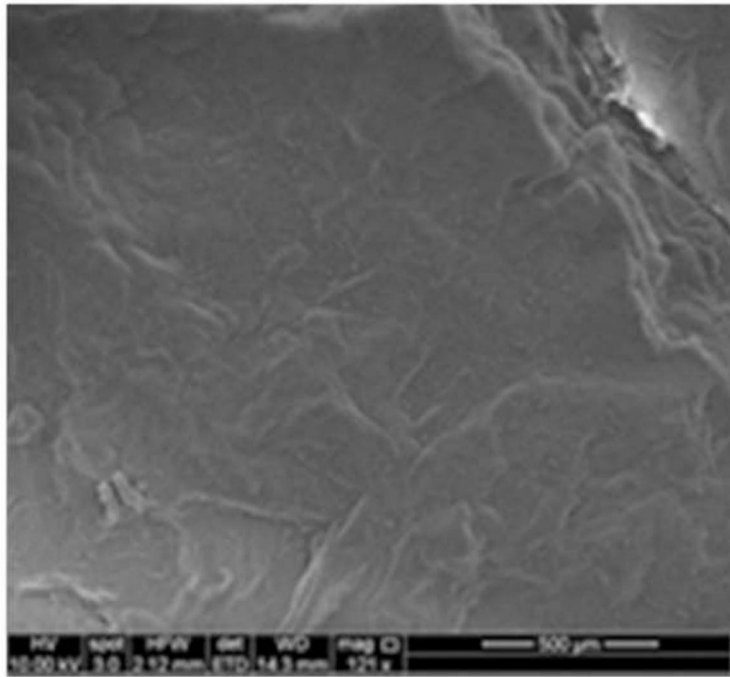


图3A

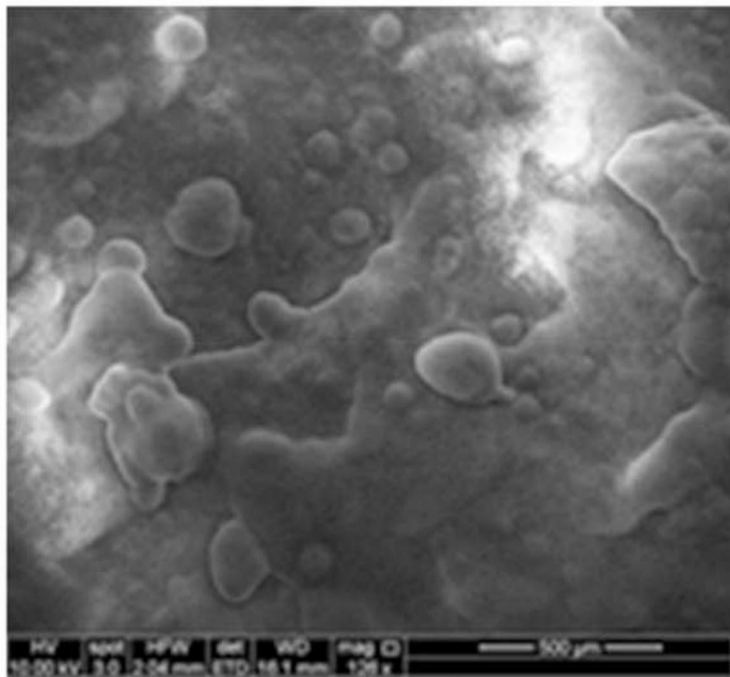


图3B

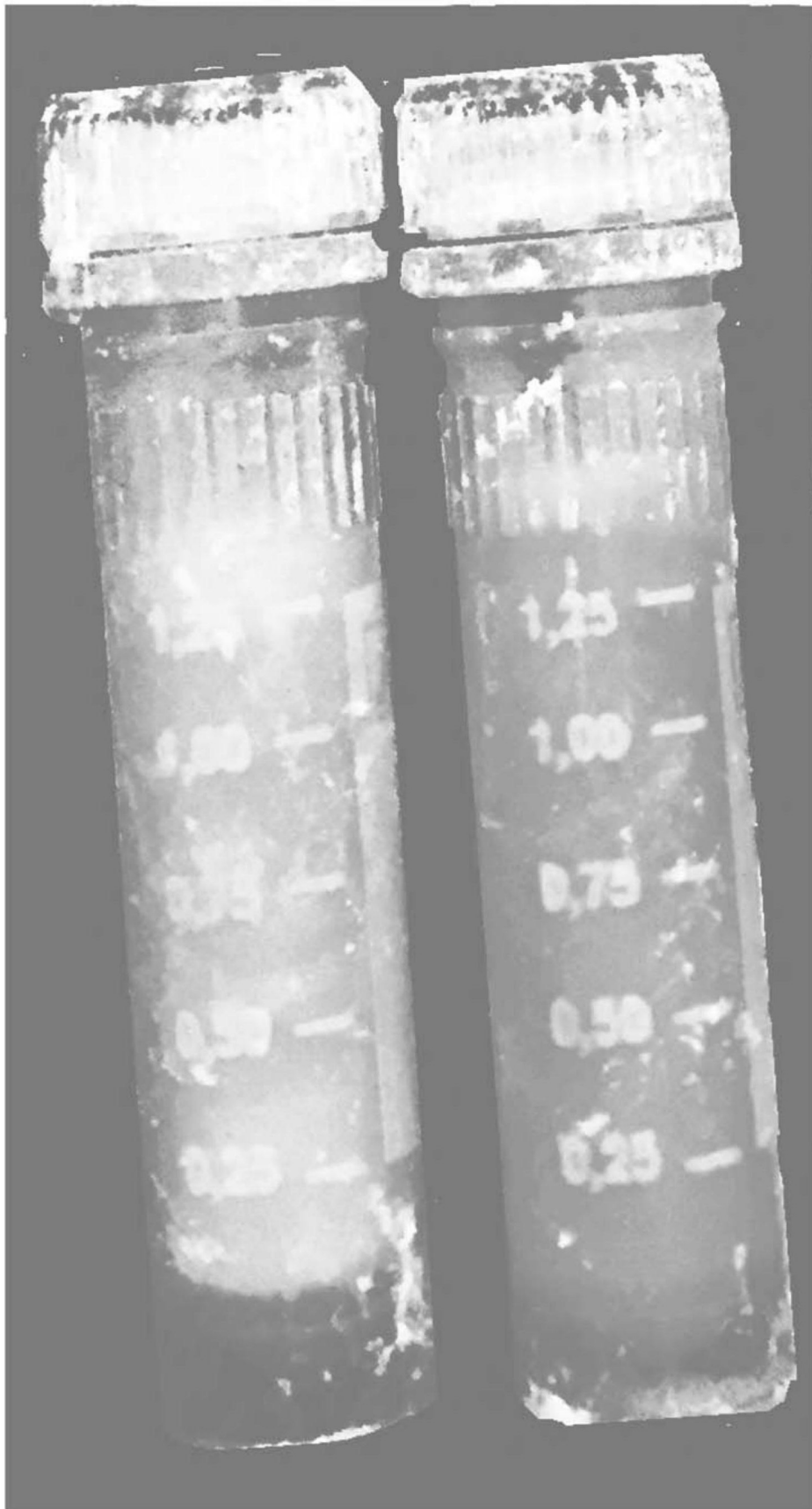


图4A-4B

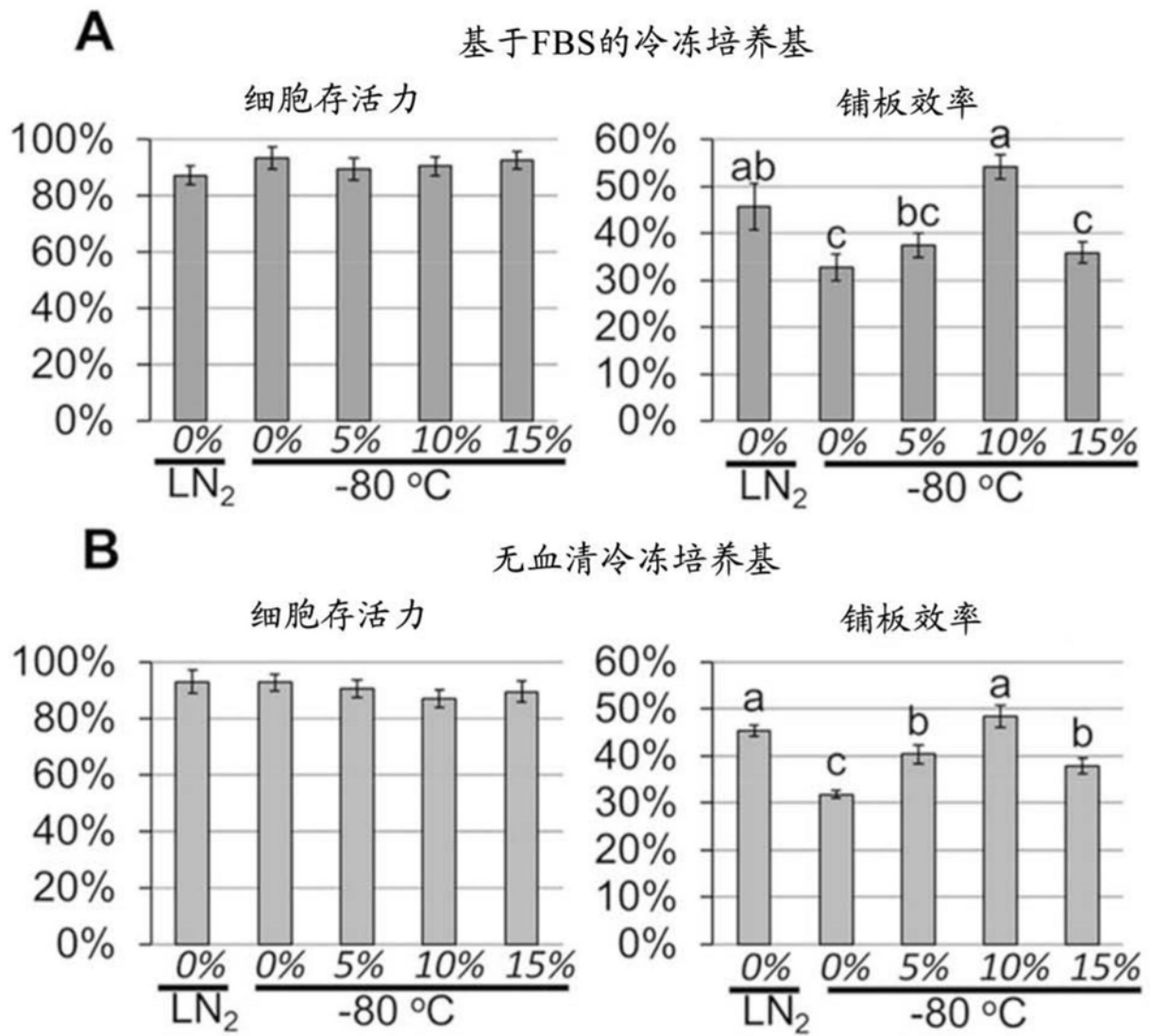


图5

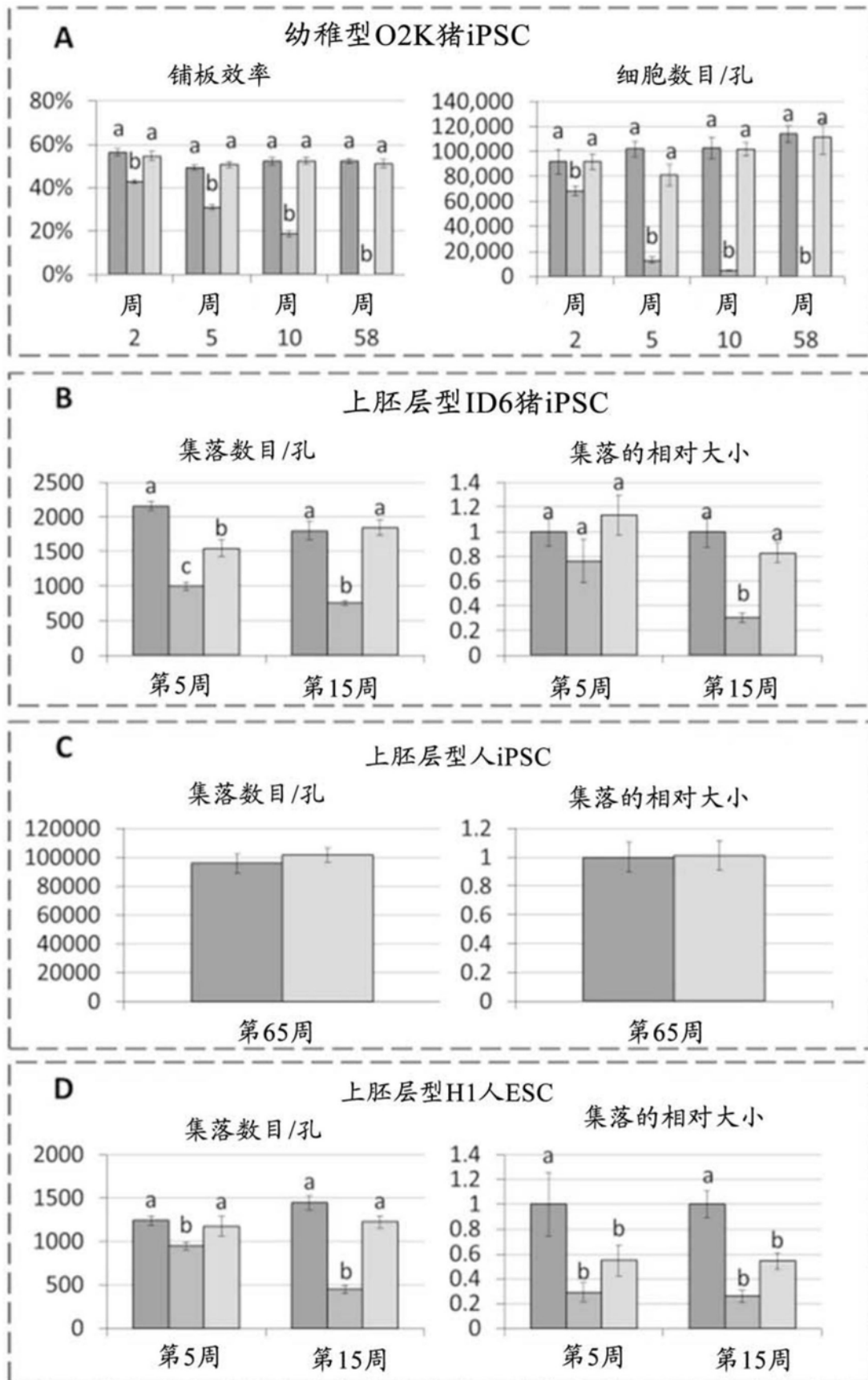


图6

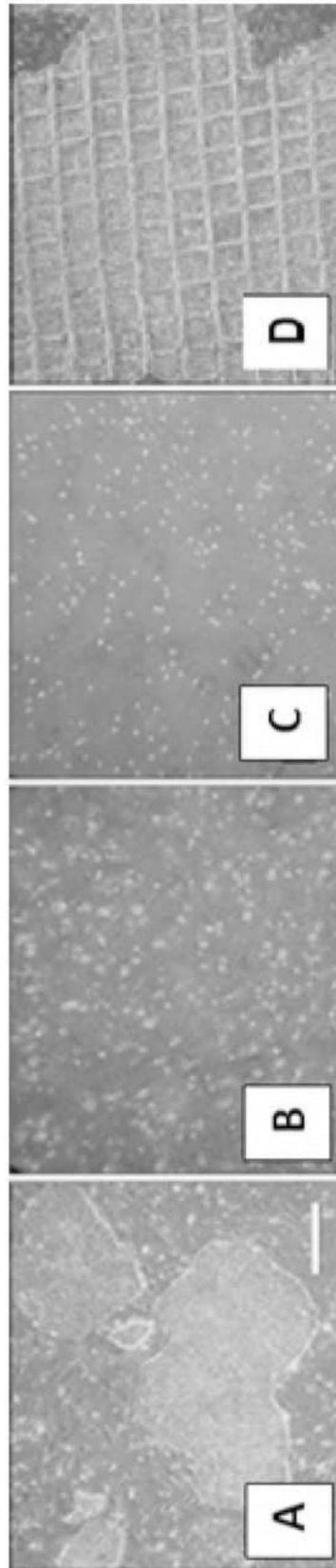


图7

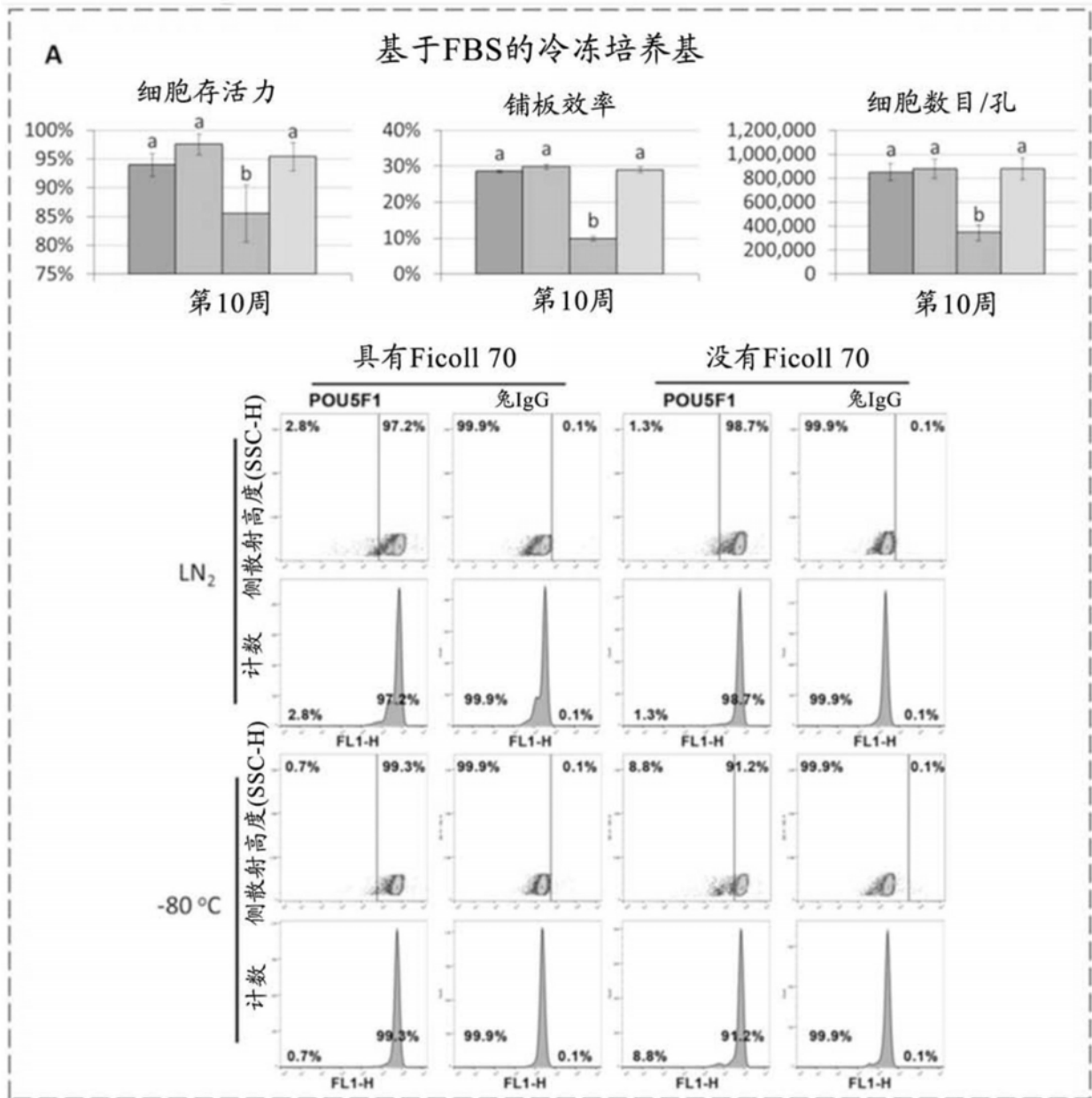


图8A

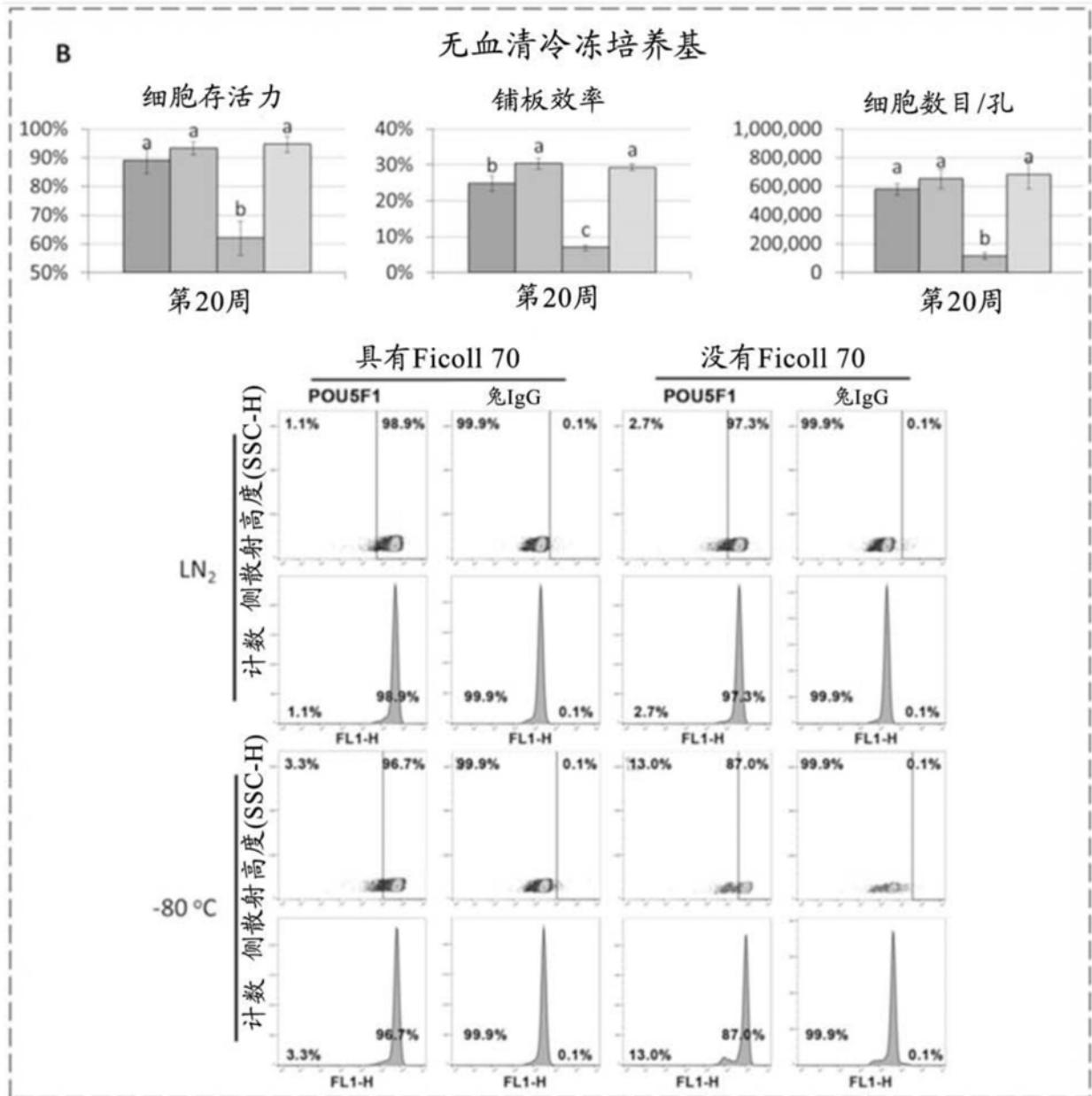


图8B

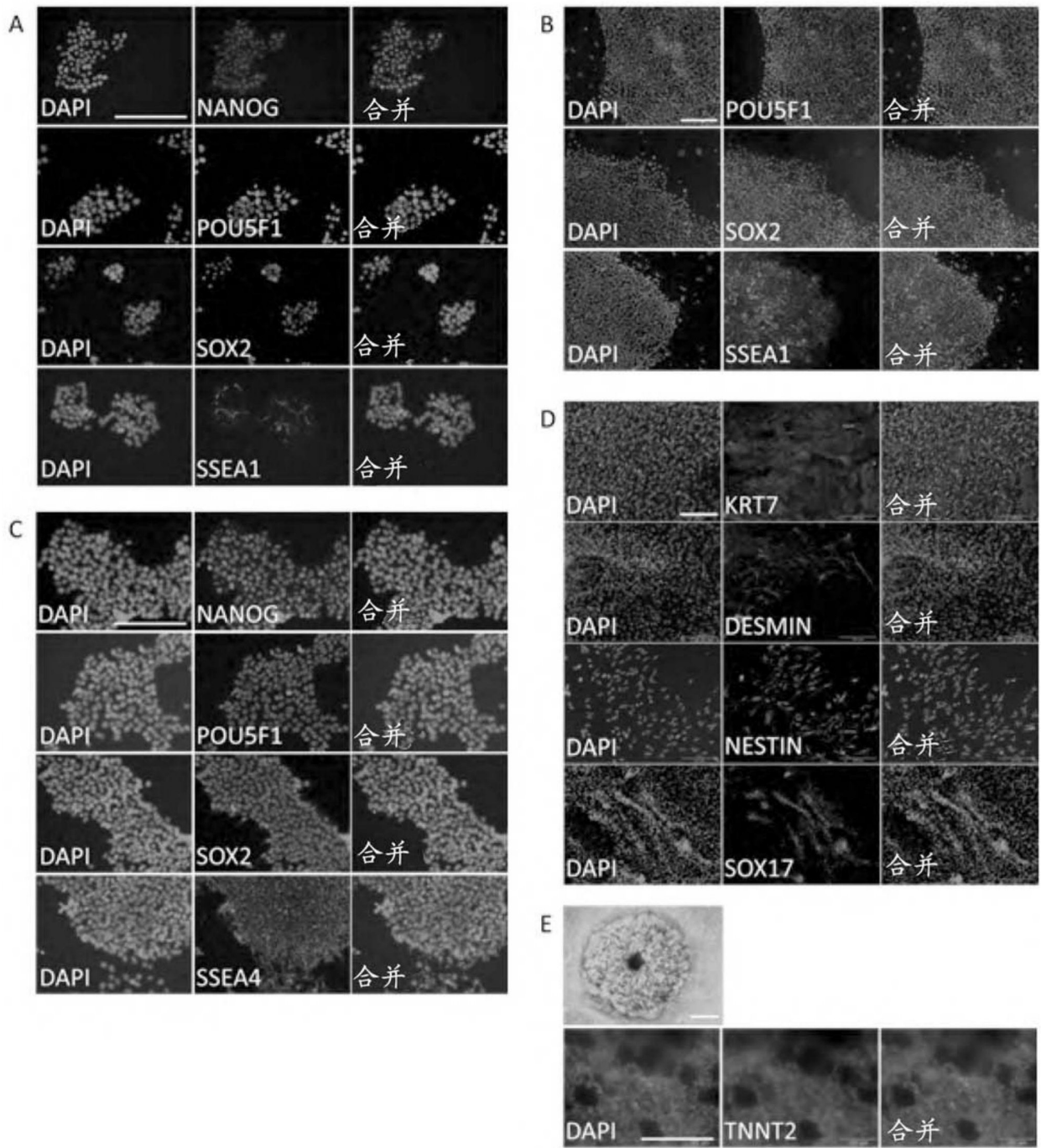


图9

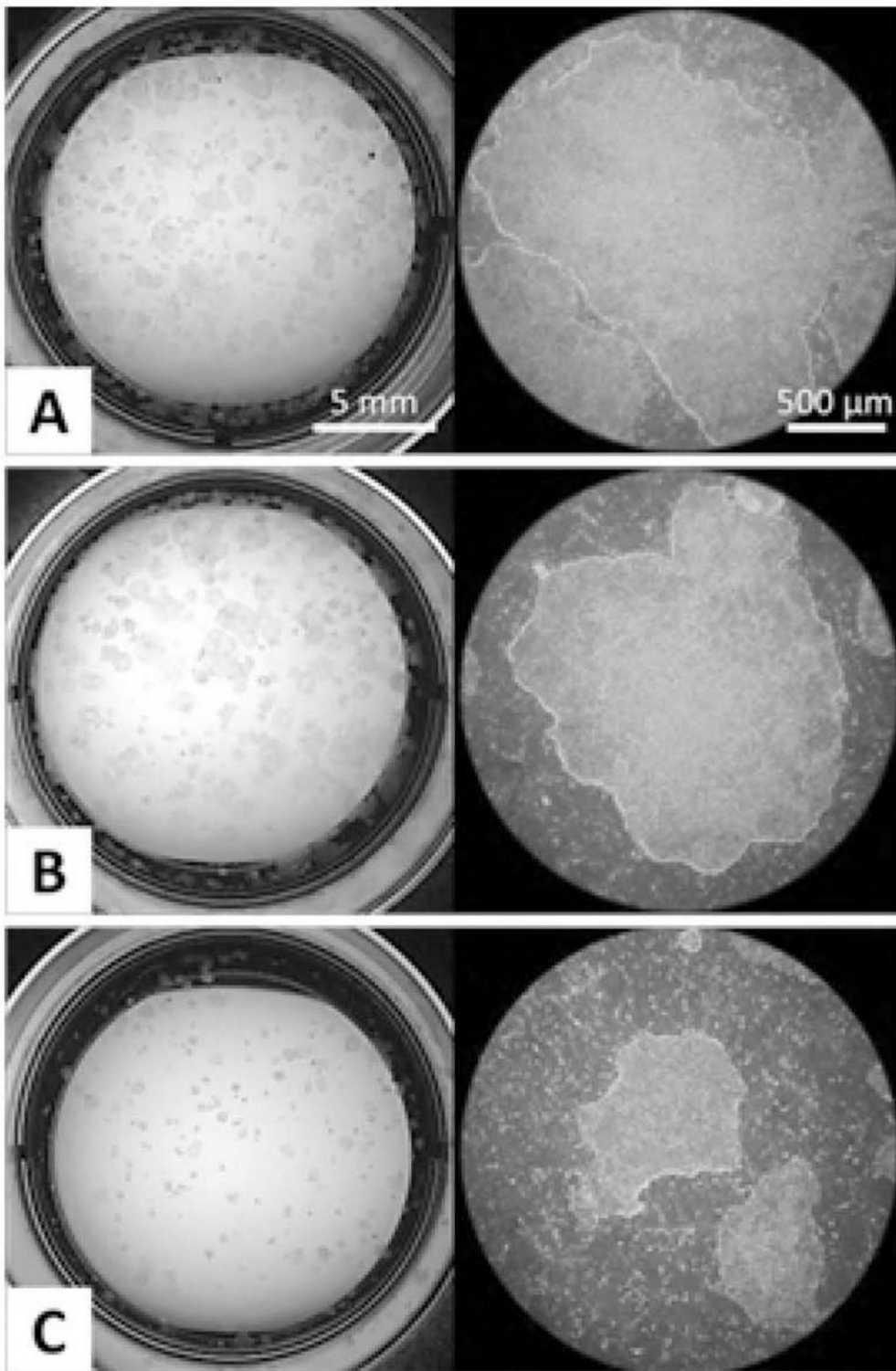


图10