

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901937788A1

Publication Date

20121020

Applicant

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Title

COMPOSIZIONE E METODO PER LA CRIOCONSERVAZIONE DI CELLULE

Richiedenti: **CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE;**
INTEGRATED SYSTEMS ENGINEERING S.R.L.

Titolo: **"Composizione e metodo per la
crioconservazione di cellule"**

Descrizione

La presente invenzione ha per oggetto una
composizione adatta alla crio-conservazione a breve e
5 a lungo termine di cellule di mammifero per scopi di
ricerca e per applicazioni nella medicina
rigenerativa.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è
un metodo per la crio-conservazione di cellule che
10 comprende i) l'internalizzazione di uno zucchero; ii)
l'esposizione delle cellule alla composizione di
crio-conservazione; iii) il congelamento delle
cellule in detta composizione di crio-conservazione.
La composizione di crio-conservazione e la metodica
15 oggetto della presente invenzione sono applicabili su
cellule conservate in sospensione così come su
cellule congelate in adesione.

Stato dell'arte

La medicina rigenerativa rappresenta un
20 approccio terapeutico finalizzato alla rigenerazione
biologica del tessuto/organo deteriorato, anziché
alla sua sostituzione con una protesi o un trapianto.

Le terapie cellulari rientrano in questo ambito. Inizialmente dirette verso situazioni per le quali non erano presenti alternative terapeutiche, le terapie cellulari si sono in seguito sviluppate in
5 maniera tale da prevedere un loro impiego esteso al trattamento di patologie degenerative largamente diffuse.

Le capacità di proliferazione e differenziamento che caratterizzano le cellule
10 staminali ha certamente contribuito a questo sviluppo. Infatti, la possibilità di disporre di popolazioni di cellule staminali totipotenti, in grado cioè di dare origine a qualsiasi tipo di cellula matura, amplia in maniera considerevole le
15 possibili ricadute della terapia cellulare nella medicina rigenerativa.

E' pertanto fortemente avvertita la necessità di poter conservare per utilizzi futuri cellule di mammifero, comprese cellule umane, non solo per
20 applicazioni nell'ambito della ricerca ma anche per applicazioni di medicina rigenerativa. A titolo di esempio, ad oggi sono state impiegate con successo cellule staminali nella medicina rigenerativa veterinaria, in particolare in patologie cutanee,
25 osteocondrali e tendinee del cavallo. Il vantaggio di

poter disporre di cellule staminali crio-conservate adatte a tali applicazioni è evidente. Un altro ambito dove vi è necessità di disporre di metodiche di conservazione adatte riguarda le cellule del
5 cordone ombelicale, cellule dalle enormi potenzialità che vengono conservate per possibili utilizzi futuri in trapianti autologhi e/o eterologhi.

Dallo stato dell'arte sono noti metodi di conservazione di cellule di mammifero che prevedono
10 il congelamento delle stesse in presenza di proteine come stabilizzanti e di un agente in grado di evitare la formazione di cristalli di ghiaccio che andrebbero a distruggere in maniera irreversibile la struttura della cellula stessa. E' consolidato l'utilizzo per
15 il congelamento di una composizione che comprende siero fetale bovino che apporta le proteine necessarie e dimetilsolfossido (DMSO) in concentrazioni generalmente pari al 10% quale crio-protettore. Il DMSO viene utilizzato in quanto è un
20 solvente particolarmente igroscopico in grado di attraversare la membrana cellulare. Laddove è necessario conservare le cellule per applicazioni nell'ambito della medicina rigenerativa, la conservazione deve avvenire secondo criteri ben
25 definiti che implicano il superamento di alcuni

limiti intrinseci alla metodica di congelamento oggi in uso. In particolare, va escluso il contatto delle cellule con proteine di specie diversa da quella del soggetto ricevente, di conseguenza non è ammesso
5 l'utilizzo del siero fetale bovino. Va anche escluso il contatto con sostanze dotate di tossicità, tra le quali figura appunto il DMSO. Inoltre il DMSO, per meccanismi ancora non del tutto chiariti, agisce da induttore del differenziamento cellulare, pertanto il
10 suo utilizzo nella conservazione di cellule totipotenti da mantenere nello stato indifferenziato è fortemente sconsigliato.

Con l'obiettivo di individuare sostanze alternative a quelle di norma utilizzate per il
15 congelamento di cellule, l'attenzione si è rivolta verso gli zuccheri. E' infatti noto che zuccheri, tra i quali il trealosio, esercitano un'attività stabilizzante sulle cellule. L'alta concentrazione di trealosio nei tessuti di alcuni organismi detti
20 criptobionti consente loro di sopravvivere in condizioni di mancanza di acqua ed a temperature molto elevate. Questi organismi, una volta reidratati, riprendono il loro normale ciclo vitale, senza presentare alcun danno. Grazie a tali proprietà
25 stabilizzanti, soluzioni contenenti trealosio vengono

utilizzate per prolungare la conservazione di tessuti e di organi. Ai fini di poter utilizzare le proprietà del trealosio per la conservazione di cellule, è necessario internalizzarlo nelle stesse cellule.

5 Infatti la membrana cellulare non è permeabile agli zuccheri. Diverse metodiche sono state sviluppate per favorire l'internalizzazione cellulare di sostanze esogene, tra le quali l'uso di proteine batteriche (α - emolisina) per la formazione di pori transienti,

10 la lipofezione, l'elettroporazione e la stimolazione dei recettori P2X7 mediante l'impiego dei rispettivi agonisti Adenosina 5-trifosfato (ATP) e/o suoi analoghi come 2'-3'-O-(4-Benzoilbenzoil)adenosina-5'-trifosfato (BzATP). Tuttavia queste metodiche,

15 efficaci e largamente utilizzate in molteplici ambiti, risultano essere troppo invasive e non applicabili in maniera propedeutica alla conservazione delle cellule.

US 7,314,755 descrive l'utilizzo di ATP per la

20 permeabilizzazione della membrana cellulare, permeabilizzazione ottenuta mediante l'azione esercitata dall'ATP sui recettori P2X7. I recettori P2X7 appartengono alla famiglia dei purinocettori per l'ATP e funzionano da canali-ionici ligando operati,

25 responsabili della formazione di pori di membrana

permeabili a molecole anche di grandi dimensioni. US
7,314,755 descrive un metodo che prevede l'ingresso
ATP-mediato di trealosio nella cellula, suggerendo
che cellule così trattate sono adatte alla
5 conservazione come cellule disidratate o congelate.
Non viene però suggerita alcuna formulazione di crio-
conservazione, ed é noto che pellet di cellule,
indipendentemente da eventuali trattamenti ai quali
le cellule stesse siano state preventivamente
10 esposte, non sono adatti alla crio-conservazione se
non risospesi in un solvente opportuno.

E' scopo della presente invenzione quello di
mettere a disposizione una composizione e un metodo
adatti alla crio-conservazione a lungo termine di
15 cellule di mammifero per scopi di ricerca e per
applicazioni nella medicina rigenerativa.

Descrizione dell'invenzione

La presente invenzione descrive una
composizione adatta alla crio-conservazione a breve e
20 a lungo termine di cellule di mammifero
preventivamente trattate con zuccheri,
preferibilmente con trealosio, per scopi di ricerca e
per applicazioni nella medicina rigenerativa. E'
inoltre descritto un metodo per la crio-conservazione
25 che comprende i) l'internalizzazione di uno zucchero,

preferibilmente di trealosio, mediata da esposizione a shock osmotici e/o a shock termici; ii) l'esposizione di dette cellule alla composizione di crio-conservazione; iii) il congelamento di dette
5 cellule in detta composizione di crio-conservazione. La composizione di crio-conservazione e la metodica oggetto della presente invenzione sono applicabili su cellule da conservarsi in sospensione così come su cellule da conservarsi in adesione.

10 La descrizione è integrata dagli esempi che seguono e che formano parte integrante della stessa.

Descrizione delle figure

Figura **1**: rappresentazione grafica del congelamento programmato tramite *Rate Freezer*.

15 Figura **2**: analisi di vitalità cellulare effettuata su cellule neurali staminali fetali umane derivate dal midollo spinale, linea CB660sp. In **A** e **B** sono riportati i dati di vitalità cellulare prima del congelamento, al momento dello scongelamento ($t=0h$),
20 e 24h dopo lo scongelamento, ottenuti congelando con una metodica che non comprende, in A, o comprende, in B, l'utilizzo di ATP. In **C** è riportata un'immagine rappresentativa della coltura a 24h dallo scongelamento.

25 Figura **3**: analisi di vitalità cellulare

effettuata su cellule staminali neurali murine di origine embrionale . In **A** sono riportati i dati di vitalità cellulare prima del congelamento, al momento dello scongelamento ($t=0h$), e 24h dopo lo
 5 scongelamento, in **B** un'immagine rappresentativa della coltura a 24h dallo scongelamento.

Figura **4**: analisi di vitalità cellulare effettuata su cellule di glioma umano, G179. In **A** e **B** sono riportati i dati di vitalità cellulare prima del
 10 congelamento, al momento dello scongelamento ($t=0h$), e 24h dopo lo scongelamento, ottenuti congelando con una metodica che non comprende, in A, o comprende, in B, l'utilizzo di ATP.

Figura **5**: analisi di vitalità cellulare effettuata su cellule staminali neurali umane AF22. In **A** sono riportati i dati di vitalità cellulare prima del congelamento, al momento dello
 15 scongelamento ($t=0h$), e 24h dopo lo scongelamento, in **B** un'immagine rappresentativa della coltura a 24h
 20 dallo scongelamento.

Descrizione dettagliata dell'invenzione:

E' oggetto della presente invenzione una composizione adatta alla crio-conservazione di cellule di mammifero, comprese cellule umane,
 25 somatiche o germinali. Detta composizione di crio-

conservazione comprende uno zucchero non presente fisiologicamente nelle cellule di mammifero e opzionalmente DMSO in quantità minore o uguale al 2% v/v. Detta soluzione di crio-conservazione non
5 contiene proteine di origine animale. Detta composizione di crio-conservazione comprende: NaCl da 50 a 150 mM, preferibilmente circa 145 mM; KCl 1-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; gluconato sale sodico
10 0.5-6 mM, preferibilmente circa 3 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 25 mM; mioinositolo 100-1000 μ M, preferibilmente circa 500 μ M, un inibitore delle caspasi, preferibilmente Z-VAD-FMK 100-1000 nM, preferibilmente circa 500 nM, GIBCO MEM Amino Acids
15 100X, GIBCO MEM Vitamin Solution 100X; uno zucchero non presente fisiologicamente nelle cellule 100-1000 mM, preferibilmente trealosio circa 500 mM. Opzionalmente, detta composizione di crio-conservazione potrà contenere DMSO in quantità
20 minore o uguale al 2% v/v. Detta composizione di crio-conservazione avrà un'osmolarità compresa tra 1100 e 1400 mOsm, preferibilmente detta osmolarità sarà di circa 1278 mOsm

Il metodo di crio-conservazione comprende
25 l'esposizione di cellule che abbiano preventivamente

internalizzato uno zucchero a detta composizione di crio-conservazione. In una forma di realizzazione, detta composizione di crio-conservazione viene mantenuta in ghiaccio prima dell'utilizzo.

5 I migliori risultati in termini di efficacia della procedura di crio-conservazione sono stati ottenuti utilizzando detta composizione di crio-conservazione secondo la metodica che viene qui di seguito descritta e che è parte integrante della
10 presente invenzione.

Il metodo di crio-conservazione comprende:

1) l'internalizzazione nelle cellule di uno zucchero non presente fisiologicamente in dette cellule, laddove l'internalizzazione è mediata da
15 esposizione a shock osmotico e/o shock termico ed, opzionalmente, ad esposizione ad ATP o analoghi dell'ATP;

2) l'esposizione di dette cellule alla composizione di crio-conservazione;

20 3) il congelamento di dette cellule.

Detto processo 1) di internalizzazione dello zucchero comprende due fasi: a) modifica delle conduttanze ioniche di membrana con conseguente aumento della fluidità e trasporto passivo delle
25 molecole presenti nell'ambiente extracellulare; b)

ingresso dello zucchero.

In detta fase a) le cellule vengono private del terreno di coltura ed esposte ad un ciclo di lavaggi che comprende: i) lavaggio con PBS (soluzione salina 5 fosfato); ii) opzionalmente, lavaggio rapido con soluzione salina, detta soluzione A, che comprende EDTA, preferibilmente ad una T compresa tra 0°C e +4°C; iii) opzionalmente, rapido lavaggio con soluzione di distacco, preferibilmente comprendente 10 tripsina EDTA o AccutaseTM; iv) opzionalmente, aggiunta di una soluzione salina, detta soluzione B che, in una forma di realizzazione, può contenere un agente porante, preferibilmente ATP o suoi analoghi. Detta soluzione B verrà mantenuta sulle cellule per 15 un tempo compreso tra i 5 e i 30 minuti, preferibilmente per 15 minuti, ad una T compresa tra i 4 e i 50°C, preferibilmente a circa 37°C.

Laddove le cellule vengono conservate in adesione, detta fase a) comprende detti passaggi i), 20 ii) e, in detto passaggio iv) si aggiunge detta soluzione B che, in una forma di realizzazione, può contenere un agente porante, preferibilmente ATP o suoi analoghi.

Si passa quindi a detta fase b), dove dette 25 cellule vengono esposte a una soluzione di

internalizzazione, detta soluzione C, che comprende uno zucchero non presente fisiologicamente nelle cellule di mammifero, preferibilmente trealosio. Detta soluzione C viene preferibilmente mantenuta a T compresa tra 0°C e +4°C e dette cellule vengono incubate in detta soluzione di internalizzazione per un tempo compreso tra 5 e 60 minuti, preferibilmente per circa 15 minuti a una T compresa tra i 4 e i 50°C, preferibilmente a circa 37°C. Per favorire l'internalizzazione dello zucchero si interviene meccanicamente, ad esempio con leggeri urti sulle pareti della piastra o della flask nella quale le cellule sono adese.

Laddove le cellule vengono conservate in adesione, in detta fase b), mantenendo dette cellule in detta soluzione B, viene aggiunta detta soluzione di internalizzazione C; il volume di soluzione C sarà superiore a quello di soluzione B, preferibilmente detta soluzione C e detta soluzione B saranno in rapporto 2:1.

Nella successiva fase 2), laddove le cellule vengono congelate in sospensione, dette cellule vengono risospese nella composizione di crio-conservazione dopo aver ottenuto per sedimentazione un pellet cellulare, anche mediante l'utilizzo di una

centrifuga, centrifugando circa 5 minuti a circa 1500 rpm a circa 25°C. Detto pellet cellulare è preferibilmente costituito da un numero di cellule compreso tra $3 \cdot 10^6$ e $5 \cdot 10^6$, preferibilmente circa 5 $4 \cdot 10^6$. laddove le cellule vengono congelate in adesione, la composizione di crio-conservazione viene aggiunta direttamente sulle cellule, private della soluzione B e della soluzione di internalizzazione.

Nella fase 3), dette cellule in composizione di crio-conservazione vengono congelate, preferibilmente 10 mediante *Rate Freezer*, ovvero in un sistema di abbassamento controllato della temperatura. In una forma preferita di realizzazione, la temperature viene abbassata di $\sim 1^\circ\text{C}/\text{min}$. Per controllare la 15 nucleazione ed il rilascio del calore latente durante il congelamento il Rate Freezer viene preferibilmente programmato con la rampa rappresentata in Figura 1 e che comprende: (1) mantenimento della temperatura per 3 min a 4.0°C , (2) $-1.0^\circ\text{C}/\text{min}$ a -4.0°C , (3) - 20 $35.0^\circ\text{C}/\text{min}$ a -35.0°C , (4) $+25.0^\circ\text{C}/\text{min}$ a -16.0°C , (5) $+2.0^\circ\text{C}/\text{min}$ a -12.0°C , (6) $-1.0^\circ\text{C}/\text{min}$ a -40.0°C , (7) - $5.0^\circ\text{C}/\text{min}$ a -60.0°C , (8) $-10.0^\circ/\text{min}$ a -90.0°C .

Le cellule vengono quindi mantenute in azoto liquido, in vapori di azoto o a -80°C .

25 Detta soluzione A è preferibilmente preparata

in acqua deionizzata, preferibilmente in acqua di grado MilliQ Millipore, e comprende: NaCl da 50 a 200 mM, preferibilmente circa 120 mM; KCl 5-20 mM, preferibilmente circa 10 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM; EDTA 5-30 mM, preferibilmente circa 10 mM. Detta soluzione A ha un'osmolarità compresa tra 300 e 350 mOsm, preferibilmente circa 327 mOsm.

10 Detta soluzione B è preferibilmente preparata in acqua deionizzata, preferibilmente in acqua di grado MilliQ Millipore, e comprende: NaCl da 5 a 20 mM, preferibilmente circa 10 mM; KCl 50-200 mM, preferibilmente circa 120 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM, opzionalmente potrà essere impiegato ATP 1-15 mM, preferibilmente circa 5 mM. In alternativa all'ATP, la soluzione B potrà contenere analoghi dell'ATP, quali il BzATP [2', 3'-O-(benzoil-4-benzoil) ATP] in concentrazioni ricomprese tra 5 e 30 μ M, preferibilmente circa 15 μ M. In un'ulteriore forma di realizzazione, ATP e BzATP potranno essere co-presenti in detta soluzione B. Detta soluzione B ha un'osmolarità compresa tra 25 300 e 350 mOsm, preferibilmente circa 327mOsm.

Detta soluzione di internalizzazione C comprende: NaCl da 5 a 20 mM, preferibilmente circa 10 mM; KCl 50-200 mM, preferibilmente circa 120 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM; trealosio 100-1000 M, preferibilmente circa 500 mM. Tali componenti sono disciolte in PBS. Detta soluzione C ha un'osmolarità compresa tra 1.100 e 1.350 mOsm, preferibilmente circa 1.219 mOsm.

10 In una forma di realizzazione, laddove si proceda con detta fase iv) e con l'esposizione a detta soluzione B, nella successiva fase b) la soluzione di internalizzazione C usata comprenderà NaCl da 50 a 200 mM, preferibilmente circa 120 mM; 15 KCl 5-20 mM, preferibilmente circa 10 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM; trealosio 100-1000 M, preferibilmente circa 500 mM. Tali componenti sono disciolte in PBS. Detta soluzione C ha un'osmolarità 20 compresa tra 1.100 e 1.350 mOsm, preferibilmente circa 1.219 mOsm.

In una forma di realizzazione, la temperatura di utilizzo delle soluzioni A, B, C e della composizione di crio-conservazione è pari alla 25 temperatura di incubazione delle cellule,

preferibilmente circa 37°C. In un'ulteriore forma di realizzazione, laddove si volesse aggiungere allo shock osmotico anche uno shock termico, dette soluzioni vengono utilizzate fredde.

5 La composizione di crio-conservazione e la metodica qui rivendicate trovano applicazione per la crio-conservazione di linee cellulari immortalizzate, così come di cellule staminali totipotenti o pluripotenti, anche umane. In particolare, detta
10 composizione di crio-conservazione e detta metodica trovano impiego con successo nella crio-conservazione di cellule staminali neurali murine, ad esempio le NS46C. Un impiego di successo si è anche osservato nella crio-conservazione di cellule staminali neurali
15 umane, ad esempio nella crio-conservazione di cellule staminali neurali umane derivate dal midollo spinale fetale, quali le CB660sp oppure delle cellule staminali neurali umane AF22, ottenute da cellule staminali pluripotenti indotte (iPS).

20 Cellule crio-conservate nella composizione di crio-conservazione e secondo la metodica della presente invenzione potranno trovare impiego nella ricerca e nella medicina rigenerativa. Dette cellule, non essendo entrate in contatto con siero fetale
25 bovino, non contengono antigeni eventualmente

responsabili di una risposta immunitaria non desiderata. Inoltre, l'assenza di DMSO fa sì che le stesse non vadano incontro ad un differenziamento indesiderato, ma sia possibile indirizzarne il differenziamento quando scongelate. Infine, utilizzando la composizione e la metodica qui rivendicate, le cellule risultano stabilizzate e non vanno incontro alle alterazioni cromosomiche che tipicamente si riscontrano seguendo metodiche di crio-conservazione tradizionali.

ESEMPI:

Esempio 1: Vitalità dopo crio-conservazione di cellule staminali neurali umane.

Cellule staminali neurali umane derivate dal midollo spinale fetale CB660sp la cui derivazione è descritta in WO2005/121318 vengono congelate utilizzando una composizione di crio-conservazione che comprende: NaCl 145 mM; KCl 5 mM; glucosio 5 mM; gluconato sale sodico 3 mM; Hepes 25 mM; mioinositolo 500 µM, MEM Vitamin 100X, MEM Aminoacid 100X, Z-VAD-FMK 500 nM; trealosio 500 mM. Vengono utilizzate due diverse metodiche. La metodica a comprende:

1) internalizzazione dello zucchero, laddove le cellule vengono private del terreno di coltura ed esposte ad un ciclo di lavaggi a) che comprende:

i) lavaggio con PBS (soluzione salina fosfato); ii) lavaggio rapido con soluzione salina, detta soluzione A, che comprende EDTA, a 4°C; iii) rapido lavaggio con soluzione di distacco, comprendente Tripsina EDTA e/o AccutaseTM; b) esposizione alla soluzione C di internalizzazione precedentemente mantenuta a 4°C, incubando per circa 15 minuti a 37°C;

2) risospensione delle cellule nella composizione di crio-conservazione sopra descritta;

10 3) congelamento mediante *Rate Freezer* e conservazione in azoto liquido.

La metodica b comprende gli stessi passaggi descritti in a, ma detto passaggio 1) comprende in aggiunta uno step iv) dove viene aggiunta una
15 soluzione B per 15' a 37°C che opzionalmente comprende ATP.

Detta soluzione A comprende: NaCl 120 mM; KCl 10 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; EDTA 10 mM. Tali componenti sono disciolti in acqua deionizzata,
20 preferibilmente in acqua di grado MilliQ Millipore.

Detta soluzione B comprende: NaCl 10 mM; KCl 120 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM, ATP 5 mM. Tali componenti sono disciolti in acqua deionizzata, preferibilmente in acqua di grado MilliQ Millipore.

25 Detta soluzione C comprende: NaCl 10 mM; KCl

120 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; trealosio 500 mM.
Tali componenti sono disciolte in PBS.

Quando viene seguito il metodo b, detta
soluzione C comprende NaCl 120 mM; KCl 10 mM;
5 glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; trealosio 500 mM. Tali
componenti sono disciolte in PBS.

Al momento dello scongelamento, i tubi
contenenti le cellule vengono rimossi dall'azoto
liquido e immersi in un bagno d'acqua a 37°C per un
10 tempo pari a circa 2 minuti e mantenuti in costante
agitazione. Le cellule vengono quindi recuperate in
terreno di coltura, centrifugate per circa 5 minuti a
1.250 rpm a circa 25°C e quindi risospese in terreno
di coltura fresco. Le cellule vengono piastrate e
15 vengono condotti saggi di vitalità cellulare,
mediante conta di esclusione al Trypan blueTM e
mediante analisi citometrica.

La figura 2 riporta la vitalità cellulare
misurata al momento del congelamento, allo
20 scongelamento (t=0h) e 24 ore dopo lo scongelamento
(t=24h). Con entrambe le metodiche di conta
cellulare, le cellule al momento dello scongelamento
presentano una vitalità pari al 50% ed una vitalità
pari a 40% 24h dopo lo scongelamento. Le percentuali
25 riportate fanno riferimento al numero di cellule

vive rispetto al totale di cellule presenti.

Esempio 2: Vitalità dopo crio-conservazione di cellule neurali staminali fetali murine.

Cellule staminali neurali murine NS46C, derivate
 5 secondo la procedura descritta in WO2005/121318,
 vengono congelate utilizzando la composizione di
 crio-conservazione che comprende: NaCl 145 mM; KCl 5
 mM; glucosio 5 mM; gluconato sale sodico 3 mM; Hepes
 25 mM; mioinositolo 500 µM, Z-VAD-FMK 500 nM;
 10 trealosio 500 mM, DMSO 2% seguendo una metodica che
 comprende:

1) internalizzazione dello zucchero, laddove le
 cellule vengono private del terreno di coltura ed
 esposte ad un ciclo di lavaggi a) che comprende:
 15 i) lavaggio con PBS (soluzione salina fosfato); ii)
 lavaggio rapido con soluzione salina, detta soluzione
 A, che comprende EDTA, a 4°C; iii) rapido lavaggio
 con soluzione di distacco, comprendente *Accutase*TM;
 iv) aggiunta di una soluzione B che comprende ATP; b)
 20 esposizione alla soluzione C di internalizzazione
 mantenuta a 4°C incubando per circa 15 minuti a 37°C;

2) risospensione delle cellule nella composizione
 di crio-conservazione;

3) congelamento mediante *Rate Freezer* e
 25 conservazione in azoto liquido.

Detta soluzione A comprende: NaCl 120 mM; KCl 10 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; EDTA 10 mM. Tali componenti sono disciolti in acqua deionizzata preferibilmente MilliQ.

5 Detta soluzione B comprende: NaCl 10 mM; KCl 120 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM, ATP 5 mM. Tali componenti sono disciolti in acqua deionizzata preferibilmente MilliQ.

Detta soluzione C comprende: NaCl 120 mM; KCl 10 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; trealosio 500 mM. Tali componenti sono disciolte in PBS.

Al momento dello scongelamento, i tubi contenenti le cellule vengono rimossi dall'azoto liquido e immersi in un bagno d'acqua a 37°C per un tempo pari a circa 2 minuti e mantenuti in costante agitazione. Le cellule vengono quindi recuperate in terreno di coltura, centrifugate per circa 5 minuti a 1.250 rpm a circa 25°C e quindi risospese in terreno di coltura fresco. Le cellule vengono piastrate e vengono condotti saggi di vitalità cellulare, mediante conta di esclusione al Trypan blueTM e mediante analisi citometrica.

La figura 3 riporta la vitalità cellulare misurata al momento del congelamento, allo scongelamento t=0h e 24 ore dopo lo scongelamento.

Con entrambi i metodi, utilizzando la composizione di crio-conservazione qui descritta, le cellule al momento dello scongelamento presentano una vitalità pari al 47% ed una vitalità pari a 41% 24h dopo lo
5 scongelamento. Le percentuali riportate fanno riferimento al numero di cellule vive rispetto al totale di cellule presenti.

Esempio 3: Vitalità dopo crio-conservazione di cellule di glioma umano.

10 Cellule di glioma umano G179 vengono congelate utilizzando una composizione di crio-conservazione che comprende: NaCl 145 mM; KCl 5 mM; glucosio 5 mM; gluconato sale sodico 3 mM; Hepes 25 mM; mioinositolo 500 µM, Z-VAD-FMK 500 nM; trealosio 500 mM. Le
15 cellule vengono conservate in azoto liquido. Si utilizzano due metodiche di conservazione. la metodica a comprende:

1) internalizzazione dello zucchero, laddove le cellule vengono private del terreno di coltura ed
20 esposte ad un ciclo di lavaggi a) che comprende:
i) lavaggio con PBS (soluzione salina fosfato); ii) lavaggio rapido con soluzione salina, detta soluzione A, che comprende EDTA, a 4°C; iii) rapido lavaggio con soluzione di distacco, comprendente accutase; b)
25 esposizione alla soluzione C di internalizzazione

mantenuta a 4°C incubando per circa 15 minuti a 37°C;

2) risospensione delle cellule nella composizione di crio-conservazione;

3) congelamento mediante *Rate Freezer* e
5 conservazione in azoto liquido.

La metodica b comprende gli stessi passaggi descritti in a, ma detto passaggio 1 comprende uno step iv) di aggiunta di una soluzione B che comprende ATP.

10 Detta soluzione A comprende: NaCl 120 mM; KCl 10 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; EDTA 10 mM.

 Detta soluzione B comprende: NaCl 10 mM; KCl 120 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM, ATP 5 mM.

 Detta soluzione C comprende: NaCl 10 mM; KCl
15 120 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; trealosio 500 mM.
Tali componenti sono disciolte in PBS.

 Seguendo la metodica b, detta soluzione C comprende NaCl 120 mM; KCl 10 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; trealosio 500 mM. Tali componenti sono
20 disciolte in PBS.

 Al momento dello scongelamento, i tubi contenenti le cellule vengono rimossi dall'azoto liquido e immersi in un bagno d'acqua a 37°C per un tempo pari a circa 2 minuti e mantenuti in costante
25 agitazione. Le cellule vengono quindi recuperate in

terreno di coltura, centrifugate per circa 5 minuti a 1.250 rpm a circa 25°C e quindi risospese in terreno di coltura fresco. Le cellule vengono piastrate e vengono condotti saggi di vitalità cellulare, 5 mediante conta di esclusione al Trypan blueTM e mediante analisi citometrica.

La figura 4 riporta la vitalità cellulare misurata al momento del congelamento, allo scongelamento t=0h e 24 ore dopo lo scongelamento. 10 Con entrambi i metodi, utilizzando la composizione di crio-conservazione qui descritta, le cellule al momento dello scongelamento presentano una vitalità pari al 40% ed una vitalità pari a 30% 24h dopo lo scongelamento. Le percentuali riportate fanno 15 riferimento al numero di cellule vive rispetto al totale di cellule presenti.

Esempio 4: Vitalità dopo crio-conservazione di cellule staminali neurali umane.

Cellule staminali neurali umane AF22, ottenute 20 da cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), sono congelate utilizzando una composizione di crio-conservazione che comprende: NaCl 145 mM; KCl 5 mM; glucosio 5 mM; gluconato sale sodico 3 mM; Hepes 25 mM; mioinositolo 500 µM, Z-VAD-FMK 500 nM, MEM Amino 25 Acids 100X, MEM Vitamin Solution 100X; trealosio 500

mM secondo una metodica che comprende:

1) internalizzazione dello zucchero, laddove le cellule vengono private del terreno di coltura ed esposte ad un ciclo di lavaggi a) che comprende:
 5 i) lavaggio con PBS (soluzione salina fosfato); ii) lavaggio rapido con soluzione salina, detta soluzione A, che comprende EDTA, a 4°C; iii) rapido lavaggio con soluzione di distacco, comprendente accutase; b) esposizione alla soluzione C di internalizzazione
 10 mantenuta a 4°C incubando per circa 15 minuti a 37°C;

2) risospensione delle cellule nella composizione di crio-conservazione;

3) congelamento mediante *Rate Freezer* e conservazione in azoto liquido.

15 Detta soluzione A comprende: NaCl 120 mM; KCl 10 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; EDTA 10 mM.

 Detta soluzione B comprende: NaCl 10 mM; KCl 120 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM, ATP 5 mM.

 Detta soluzione C comprende: NaCl 10 mM; KCl
 20 120 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; trealosio 500 mM. Tali componenti sono disciolte in PBS. Seguendo la metodica b, detta soluzione C comprende NaCl 120 mM; KCl 10 mM; glucosio 5 mM; Hepes 20 mM; trealosio 500 mM. Tali componenti sono disciolte in PBS.

25 Al momento dello scongelamento, i tubi

contenenti le cellule vengono rimossi dall'azoto liquido e immersi in un bagno d'acqua a 37°C per un tempo pari a circa 2 minuti e mantenuti in costante agitazione. Le cellule vengono quindi recuperate in terreno di coltura, centrifugate per circa 5 minuti a 1.500 rpm a circa 25°C e quindi risospese in terreno di coltura fresco. Le cellule vengono piastrate e vengono condotti saggi di vitalità cellulare, mediante conta di esclusione al Trypan blueTM e mediante analisi citometrica.

La figura 5 riporta la vitalità cellulare misurata al momento del congelamento, allo scongelamento t=0h e 24 ore dopo lo scongelamento. Le cellule al momento dello scongelamento presentano una vitalità pari al 58% ed una vitalità pari a 91% 24h dopo lo scongelamento. Le percentuali riportate fanno riferimento al numero di cellule vive rispetto al totale di cellule presenti.

RIVENDICAZIONI

1.Composizione di crio-conservazione di cellule di mammifero che comprende uno zucchero non presente fisiologicamente in dette cellule di mammifero e non
5 contiene proteine di origine animale.

2.Composizione secondo la rivendicazione 1 che comprende: NaCl da 50 a 150 mM; KCl 1-20 mM; glucosio 2-20 mM; gluconato sale sodico 0.5-6 mM; Hepes 5-50 mM; uno zucchero non presente fisiologicamente in
10 dette cellule di mammifero 100-1000 mM.

3.Composizione secondo una delle rivendicazioni 1 o 2 che comprende anche: mioinositolo 100-1000 μ M e un inibitore delle caspasi, preferibilmente Z-VAD-FMK 100-1000 nM.

15 4.Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 che comprende: NaCl circa 145 mM; KCl circa 5 mM; glucosio circa 5 mM; gluconato sale sodico circa 3 mM; Hepes circa 25 mM; uno zucchero non presente fisiologicamente in dette
20 cellule di mammifero circa 500mM; mioinositolo circa 500 μ M, Z-VAD-FMK circa 500 nM, GIBCO MEM Amino Acids 100X, GIBCO MEM Vitamin Solution 100X.

5.Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, avente un'osmolarità
25 compresa tra 1100 e 1400 mOsm, preferibilmente pari a

circa 1278 mOsm.

6.Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, dove detto zucchero non presente fisiologicamente in dette cellule di
5 mammifero è trealosio.

7.Composizione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 6 che comprende anche DMSO in quantità minore o uguale al 2% v/v.

8.La composizione secondo una qualsiasi delle
10 rivendicazioni da 1 a 7 per l'uso nella crio-conservazione di cellule di mammifero, comprese cellule staminali e/o germinali.

9.La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7 per l'uso nella crio-
15 conservazione di cellule staminali neurali murine, preferibilmente di cellule NS46C.

10.La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7 per l'uso nella crio-conservazione di cellule staminali neurali umane,
20 derivate dal midollo spinale fetale o ottenute da cellule staminali pluripotenti indotte, preferibilmente dette cellule sono cellule CB660sp o cellule AF22.

11.Un metodo per la crio-conservazione di cellule
25 di mammifero, comprese cellule staminali e/o

germinali, che comprende:

i) l'internalizzazione in dette cellule di uno zucchero non presente fisiologicamente in dette cellule;

5 ii) l'esposizione di dette cellule ottenute nel passaggio i) ad una composizione di crio-conservazione che comprende uno zucchero non presente fisiologicamente in dette cellule e non contiene proteine di origine animale;

10 iii) il congelamento di dette cellule.

12.Metodo secondo la rivendicazione 11, dove dette cellule vengono crio-conservate in sospensione o in adesione.

13.Metodo secondo le rivendicazioni 11 o 12, dove
15 detta internalizzazione di detto zucchero è ottenuta mediante shock osmotico e/o shock termico e, opzionalmente, esposizione ad ATP o suoi analoghi.

14.Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11 a 13, dove detta internalizzazione di detto zucchero
20 avviene privando le cellule del terreno di coltura ed esponendole ad un ciclo di lavaggi seguito dall'esposizione di dette cellule ad una soluzione di internalizzazione che comprende uno zucchero non presente fisiologicamente in dette cellule.

25 15.Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11

a 14, dove detto ciclo di lavaggi comprende:
i)lavaggio con PBS, soluzione salina fosfato;
ii)opzionalmente, lavaggio rapido con soluzione
salina A, che comprende EDTA, preferibilmente ad una
5 T compresa tra 0°C e +4°C; iii)opzionalmente, rapido
lavaggio con soluzione di distacco, preferibilmente
comprendente tripsina EDTA o AccutaseTM;
iv)opzionalmente, aggiunta di una soluzione salina B
che, opzionalmente, contiene un agente porante,
10 preferibilmente ATP o suoi analoghi.

16.Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11
a 15, dove dette cellule vengono conservate in
adesione e, mantenendo dette cellule in detta
soluzione B, viene aggiunta sulle stesse detta
15 soluzione di internalizzazione in volume superiore a
quello di detta soluzione B, preferibilmente detta
soluzione di internalizzazione e detta soluzione B
saranno in rapporto di circa 2:1.

17.Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11
20 a 16, dove detta soluzione di internalizzazione viene
mantenuta a T compresa tra 0°C e +4°C e dette cellule
vengono incubate in detta soluzione per un tempo
compreso tra 5 e 60 minuti, preferibilmente per circa
15 minuti a una T compresa tra i 4 e i 50°C,
25 preferibilmente a circa 37°C.

18. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11 a 17, dove:

- detta soluzione A, preferibilmente preparata in acqua deionizzata, preferibilmente in acqua di grado MilliQ Millipore, comprende: NaCl da 50 a 200 mM, preferibilmente circa 120 mM; KCl 5-20 mM, preferibilmente circa 10 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM; EDTA 5-30 mM, preferibilmente circa 10 mM; detta soluzione A ha un'osmolarità compresa tra 300 e 350 mOsm, preferibilmente circa 327mOsm;

- detta soluzione B, preferibilmente preparata in acqua deionizzata, preferibilmente in acqua di grado MilliQ Millipore, comprende: NaCl da 5 a 20 mM, preferibilmente circa 10 mM; KCl 50-200 mM, preferibilmente circa 120 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM, opzionalmente potrà essere impiegato ATP 1-15 mM, preferibilmente circa 5 mM o, in alternativa o in aggiunta a detto ATP, BzATP [2', 3'-O-(4benzoilbenzoil) ATP] in concentrazioni comprese tra 5 e 30 μ M, preferibilmente circa 15 μ M; detta soluzione B ha un'osmolarità compresa tra 300 e 350 mOsm,

preferibilmente circa 327mOsm;

- detta soluzione di internalizzazione C, preparata in PBS, comprende: NaCl da 5 a 200 mM, preferibilmente circa 10 mM; KCl 50-200 mM, preferibilmente circa 120 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM; trealosio 100-1000 M, preferibilmente circa 500 mM. Tali componenti sono disciolte in PBS; detta soluzione ha un'osmolarità compresa tra 1.100 e 1.350 mOsm, preferibilmente circa 1.219 mOsm.

19. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11 a 18, dove, laddove in detto ciclo di lavaggi si espongano dette cellule a detta soluzione B che comprende ATP, detta soluzione di internalizzazione C, preparata in PBS, comprende: NaCl 50-200 mM, preferibilmente circa 120 mM; KCl 5-200 mM, preferibilmente circa 10 mM; glucosio 2-20 mM, preferibilmente circa 5 mM; Hepes 5-50 mM, preferibilmente circa 20 mM; trealosio 100-1000 M, preferibilmente circa 500 mM; detta soluzione di internalizzazione ha un'osmolarità compresa tra 1.100 e 1.350 mOsm, preferibilmente circa 1.278 mOsm.

20. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11 a 19, dove al termine di detta internalizzazione

dette cellule vengono risospese in una composizione di crio-conservazione dopo aver ottenuto per sedimentazione un pellet cellulare, anche mediante l'utilizzo di una centrifuga.

5 21.Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11 a 20, dove al termine di detta internalizzazione a dette cellule in adesione la composizione di crio-conservazione viene aggiunta su dette cellule private della soluzione B e della soluzione di
10 internalizzazione.

22.Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11 a 20, dove dette cellule esposte a detta composizione di crio-conservazione vengono congelate, preferibilmente mediante *Rate Freezer*.

15 23.Metodo secondo una delle rivendicazioni da 11 a 22, dove detta composizione di crio-conservazione è la composizione di crio-conservazione rivendicata in una delle rivendicazioni da 1 a 7.

20 24.Cellule di mammifero, comprese cellule umane, somatiche e/o germinali, crio-conservate secondo il metodo rivendicato in una delle rivendicazioni da 11 a 23 per l'uso nella medicina rigenerativa.

CLAIMS

1. Composition for cryopreserving mammalian cells which comprises a sugar not physiologically present in said mammalian cells and does not contain animal-derived proteins.
2. Composition according to claim 1 comprising: 50-150 mM NaCl; 1-20 mM KCl; 2-20 mM glucose; 0.5-6 mM gluconate sodium salt; 5-50 mM Hepes; 100-1000 mM of a sugar not physiologically present in said mammalian cells.
3. Composition according to one of claims 1 or 2 further comprising: 100-1000 μ M myo-inositol and a caspase inhibitors, preferably 100-1000 nM Z-VAD-FMK.
4. Composition according to any one of claims 1 to 3 comprising: about 145 mM NaCl; about 5 mM KCl; about 5 mM glucose; about 3 mM gluconate sodium salt, about 25 mM Hepes; about 500 mM of a sugar not physiologically present in said mammalian cells; about 500 μ M myo-inositol, about 500 nM Z-VAD-FMK; GIBCO MEMA Amino Acids 100X, GIBCO MEM Vitamin Solution 100X.
5. Composition according to any one of claims 1 to 4, having an osmolarity ranging from 1100 to 1400 mOsm, preferably equivalent to about 1278 mOsm.
6. Composition according to any one of claims 1 to 5, wherein said sugar not physiologically present in said mammalian cells is trehalose.

7. Composition according to one of claims 1 to 6 further comprising DMSO in an amount smaller than or equivalent to 2% v/v.

8. The composition according to any one of claims 1 to 7 to be used in cryopreserving mammalian cells, including stem and/or germ cells.

9. The composition according to any one of claims 1 to 7 to be used in cryopreserving mice neural stem cell, preferably NS46C cells.

10. The composition according to any one of claims 1 to 7 to be used in cryopreserving human neural stem cell, derived from foetal spinal cord or obtained from induced pluripotent stem cells, preferably said cells are CB660SP or AF22 cells.

11. A method for cryopreserving mammalian cells, including stem and/or germ cells, comprising:

i) internalizing in said cells a sugar not physiologically present in said cells;

ii) exposing said cells obtained in step i) to a cryopreservation composition comprising a sugar not physiologically present in said cells and not containing animal-derived proteins;

iii) freezing said cells.

12. Method according to claim 11, wherein said cells are cryopreserved in suspension or adhesion.

13. Method according to claim 11 or 12, wherein said internalization of said sugar is obtained by osmotic

shock and/or thermal shock and, optionally, exposure to ATP or equivalents thereof.

14. Method according to one of claims 11 to 13, wherein said internalization of said sugar occurs by depriving cells of culture medium and subjecting them to a washing cycle followed by exposing said cells to an internalization solution comprising a sugar not physiologically present in said cells.

15. Method according to one of claims 11 to 14, wherein said washing cycle comprises:

- i) washing with PBS, phosphate saline solution;
- ii) optionally, quick washing with saline solution A, comprising EDTA, preferably at a temperature ranging from 0°C to +4°C;
- iii) optionally, quick washing with detachment solution, preferably comprising trypsin EDTA or AccutaseTM;
- iv) optionally, adding a saline solution B which, optionally, contains an agent that open pores, preferably ATP or equivalents thereof.

16. Method according to one of claims 11 to 15, wherein said cells are preserved in adhesion and, by maintaining said cells in said solution B, said internalization solution is added on such cells in a volume greater than that of said solution B, preferably said internalization solution and said solution B will be in a ratio of about 2:1.

17. Method according to one of claims 11 to 16, wherein said internalization solution is kept at a temperature

ranging from 0°C to +4°C and said cells are incubated in said solution for a time period ranging from 5 to 60 minutes, preferably for about 15 minutes at a temperature ranging from 4 to 50°C, preferably at about 37°C.

18. Method according to one of claims 11 to 17, wherein:

- said solution A, preferably prepared in deionised water, preferably in MilliQ (Millipore) water, comprises: 50-200 mM, preferably about 120 mM, NaCl; 5-20 mM, preferably about 10 mM, KCl; 2-20 mM, preferably about 5 mM, glucose; 5-50 mM, preferably about 20 mM, Hepes; 5-30 mM, preferably about 10mM, EDTA; said solution A has an osmolarity ranging from 300 to 350 mOsm, preferably about 327 mOsm;

- said solution B, preferably prepared in deionised water, preferably in MilliQ (Millipore) water, comprises: 5-20 mM, preferably about 10 mM, NaCl; 50-200 mM, preferably about 120 mM, KCl; 2-20 mM, preferably about 5 mM, glucose; 5-50 mM, preferably about 20 mM, Hepes, optionally 1-15 mM, preferably about 5 mM, ATP could be employed or, alternatively or additionally to said ATP, BzATP [2', 3'-O-(4benzoylbenzoyl) ATP] in concentrations ranging from 5 to 30 µM, preferably about 15 µM; said solution B has an osmolarity ranging from 300 to 350 mOsm, preferably about 327 mOsm;

- said internalization solution C, prepared in PBS, comprises: 5-200 mM, preferably about 10 mM, NaCl; 50-200 mM, preferably about 120 mM, KCl; 2-20 mM, preferably

about 5 mM, glucose; 5-50 mM, preferably about 20 mM, Hepes, 100-1000 M, preferably about 500 mM, trehalose. Such components are dissolved in PBS, said solution has an osmolarity ranging from 1100 to 1350 mOsm, preferably about 1219 mOsm.

19. Method according to one of claims 11 to 18, wherein, if in said washing cycle said cells are exposed to said solution B comprising ATP, said internalization solution C, prepared in PBS, comprises: 50-200 mM, preferably about 120 mM, NaCl; 5-200 mM, preferably about 10 mM, KCl; 2-20 mM, preferably about 5 mM, glucose; 5-50 mM, preferably about 20 mM, Hepes; 100-1000 M, preferably about 500 mM, trehalose; said internalization solution has an osmolarity ranging from 1100 to 1350 mOsm, preferably about 1278 mOsm.

20. Method according to one of claims 11 to 19, wherein at the end of said internalization said cells are resuspended in a cryopreservation composition after obtaining a cell pellet by sedimentation, also by using a centrifuge.

21. Method according to one of claims 11 to 20, wherein at the end of said internalization to said cells in adhesion, the cryopreservation composition is added on said cells deprived of the solution B and of the internalization solution.

22. Method according to one of claims 11 to 20, wherein said cells exposed to said cryopreservation composition are frozen, preferably by Rate Freezer.

23. Method according to one of claims 11 to 22, wherein said cryopreservation composition is the cryopreservation composition claimed in one of claims 1 to 7.

24. Mammalian cells, including human, somatic and/or germ cells, cryopreserved according to the method claimed in one of claims 11 to 23 to be used in regenerative medicine.

Figura 1

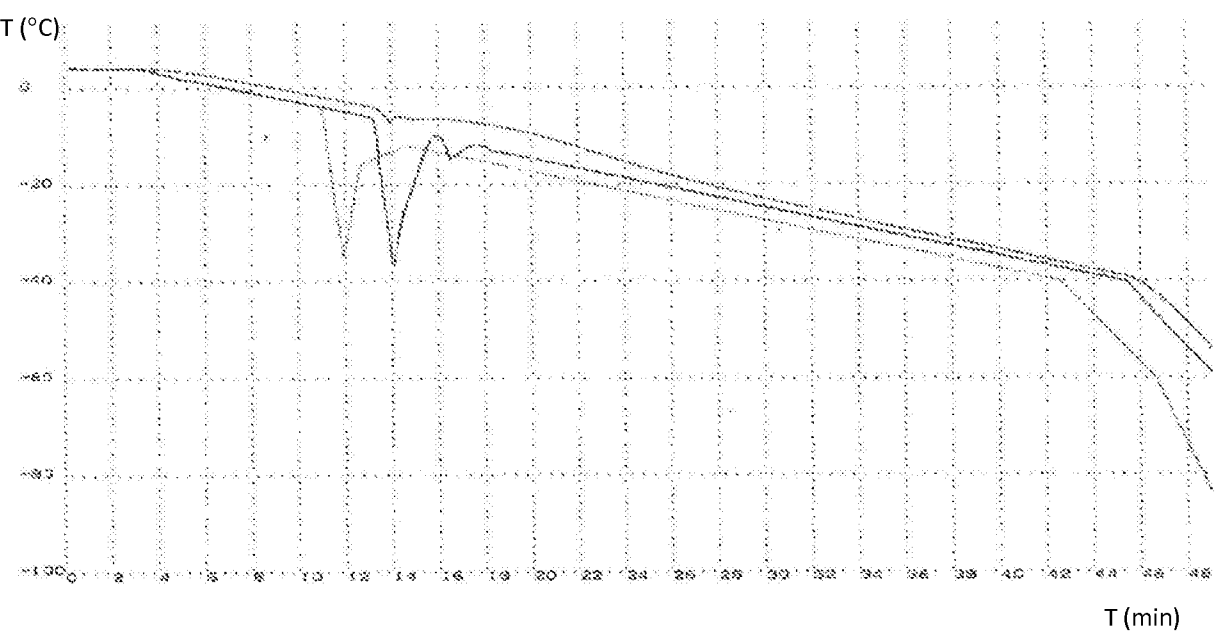
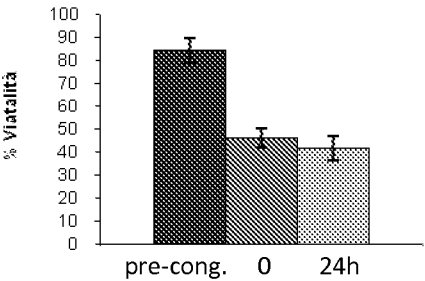
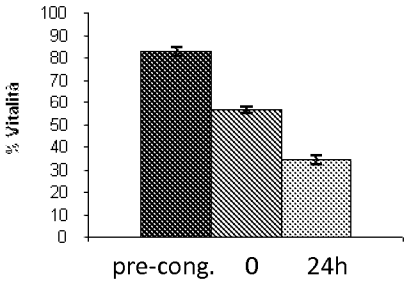


Figura 2

A



B



C

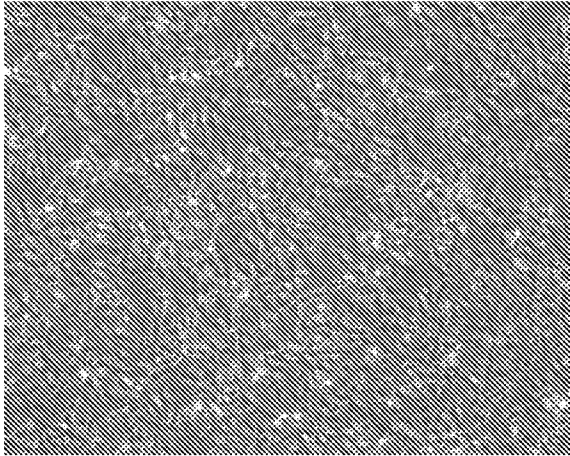
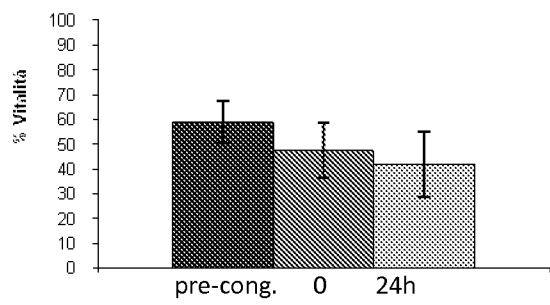


Figura 3

A



B

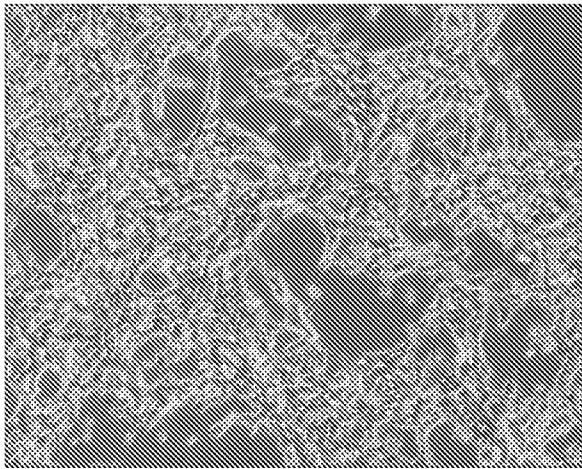
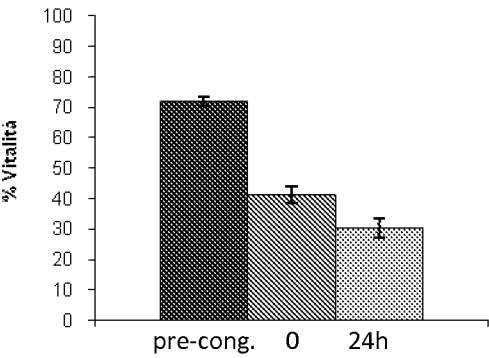


Figura 4

A



B

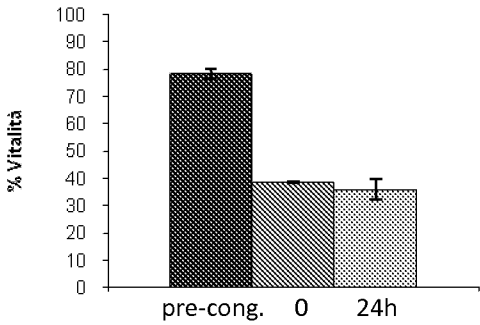
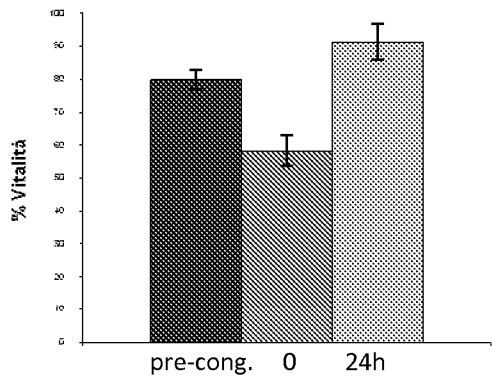


Figura 5

A



B

