



(21) 申请号 202111674623.3

(22) 申请日 2021.12.31

(66) 本国优先权数据

202011638910.4 2020.12.31 CN

(71) 申请人 广州辑因医疗科技有限公司

地址 510000 广东省广州市南沙区珠江街
南江二路6号10栋

(72) 发明人 方日国 于玲玲 袁鹏飞 马奎莹

(74) 专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688

专利代理师 闫桑田

(51) Int.Cl.

A01N 1/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种糖类组合物、糖基组合物以及冻存液

(57) 摘要

本申请公开了一种糖类组合物,包括海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖中的至少一种。本申请还提供一种糖基组合物和冻存液以及冻存液的应用。本申请提供的冻存液,选用低剂量的DMSO、右旋糖苷40,并将海藻糖、蔗糖、蜜二糖及甘露聚糖的组合替代胎牛血清(FBS)作为冻存液的基础配方进行组方,并添加维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸、Caspase9的抑制剂,使得经低温冻存的细胞按特定程序复苏后仍能保持良好的细胞活性。不仅可以减少病原菌的污染,更安全;同时避免了异源蛋白的掺入,并降低了DMSO的使用量,可以降低临床使用风险。

1. 一种糖类组合物,其特征在于,包括海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖中的至少一种。

2. 根据权利要求1所述糖类组合物,其特征在于,糖类组合物计,以相对于总重量100重量份数的糖类组合物计,包括:

海藻糖为0-100份,优选为0.1-50份;

蔗糖为0-100份,优选为0.1-50份;

蜜二糖为0-100份,优选为0.1-50份;

甘露聚糖为0-100份,优选为0.5-50份。

3. 根据权利要求1所述糖类组合物,其特征在于,所述糖类组合物由海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖组成。

4. 根据权利要求3所述糖类组合物,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的糖类组合物计,

海藻糖为0-100份,优选为0.1-50份;

蔗糖为0-100份,优选为0.1-50份;

蜜二糖为0-100份,优选为0.1-50份;

甘露聚糖为0-100份,优选为0.5-50份。

5. 一种糖基组合物,其特征在于,包括糖类组合物和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂中的至少一种。

6. 根据权利要求5所述糖基组合物,其特征在于,所述糖类组合物为权利要求1-4任一项所述的糖类组合物。

7. 根据权利要求5所述糖基组合物,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的糖基组合物计,包括:

糖类组合物为90-100份,优选为95-99.8495份;

维生素C为0-2份,优选为0.05-1份;

牛磺酸为0-2份,优选为0.05-1份;

L-精氨酸为0-2份,优选为0.05-1份;

白藜芦醇为0-2份,优选为0.000001-1份;

Caspase9抑制剂为0-2份,优选为0.0005-1份。

8. 根据权利要求5所述糖基组合物,其特征在于,所述糖基组合物由糖类组合物和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂组成。

9. 根据权利要求8所述糖基组合物,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的糖基组合物计,

糖类组合物为90-100份,优选为95-99.8495份;

维生素C为0-2份,优选为0.05-1份;

牛磺酸为0-2份,优选为0.05-1份;

L-精氨酸为0-2份,优选为0.05-1份;

白藜芦醇为0-2份,优选为0.000001-1份;

Caspase9抑制剂为0-2份,优选为0.0005-1份。

10. 一种冻存液,其特征在于,包括DMSO、右旋糖酐40以及权利要求5-9任一项所述的糖

基组合物。

11. 根据权利要求10所述冻存液, 其特征在于, 以相对于总重量100重量份数的冻存液计, 包括:

DMSO为2.5-20份, 优选为5-10份;

右旋糖酐40为2.5-20份, 优选为10-20份;

糖基组合物为60-95份, 优选为70-85份。

12. 根据权利要求10所述冻存液, 其特征在于, 所述冻存液由DMSO、右旋糖酐40、糖基组合物以及生理盐水组成。

13. 根据权利要求12所述冻存液, 其特征在于, 以相对于总重量100重量份数的冻存液计, 包括:

DMSO为2.5-20份, 优选为5-10份;

右旋糖酐40为2.5-20份, 优选为10-20份;

糖基组合物为60-95份, 优选为70-85份;

生理盐水为余量。

14. 一种权利要求10-13任一项所述冻存液在细胞冻存领域中的用途。

一种糖类组合、糖基组合以及冻存液

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药技术领域,具体涉及一种糖类组合、糖基组合以及冻存液。

背景技术

[0002] 低温保存技术是目前广泛采用的长时间保存细胞等生物样本的方法。通常低温保存是将活的生物样本利用冷冻保护剂并采用特殊的方法冷却至低温(-196℃),后长期保存。待需要之时,将生物样本按照适合方法加热解冻,仍可获得活的生物样本。随着免疫治疗与基因治疗成为现阶段众多研究者研究的热点,相关的免疫细胞及干细胞的冷冻储存显得尤为重要。

[0003] 现有冻存保护剂主要成分由DMSO、右旋糖苷、胎牛血清等构成,其有明显的两个缺点,一是绝大部分的冻存液都是采用胎牛血清FBS作为冻存保护剂的主要原料,该冻存保护剂的最大缺陷在于使细胞存在动物血清来源的异种蛋白,难以避免病原菌的污染。二是虽然选用DMSO作为冻存保护剂是细胞冻存的金标准,但高浓度DMSO不适合用于临床使用的细胞冷冻保存,因为它可能对机体产生毒性,而导致广泛的不良事件。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术的缺点及不足之处,本申请提供一种糖类组合、糖基组合以及冻存液。细胞在冻存时大量水分从细胞器中渗出,在低温条件下形成冰晶,从而对细胞本身造成损害,冰重结晶(IR)是低温保存下诱导细胞损伤的重要原因,进而导致了冻存复苏过程中细胞活率的降低。所述冻存液可以得经低温冻存的细胞按特定程序复苏,并且复苏后仍能保持良好的细胞活性。另外使用本申请所述的冻存液可以减少病原菌的污染,更安全;同时避免异源蛋白的掺入,并降低了DMSO的使用量,可以降低临床使用风险。

[0005] 本申请提供如下技术方案。

[0006] 1、一种糖类组合,其特征在于,包括海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖中的至少一种。

[0007] 2、根据项1所述糖类组合,其特征在于,糖类组合计,以相对于总重量100重量份数的糖类组合计,包括:

[0008] 海藻糖为0-100份,优选为0.1-50份;

[0009] 蔗糖为0-100份,优选为0.1-50份;

[0010] 蜜二糖为0-100份,优选为0.1-50份;

[0011] 甘露聚糖为0-100份,优选为0.5-50份。

[0012] 3、根据项1所述糖类组合,其特征在于,所述糖类组合由海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖组成。

[0013] 4、根据项3所述糖类组合,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的糖类组合计,

- [0014] 海藻糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0015] 蔗糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0016] 蜜二糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0017] 甘露聚糖为0-100份,优选为0.5-50份。
- [0018] 5、一种糖基组合,其特征在于,包括糖类组合和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂中的至少一种。
- [0019] 6、根据项5所述糖基组合,其特征在于,所述糖类组合为项1-4 任一项所述的糖类组合。
- [0020] 7、根据项5所述糖基组合,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的糖基组合物计,包括:
- [0021] 糖类组合为90-100份,优选为95-99.8495份;
- [0022] 维生素C为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0023] 牛磺酸为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0024] L-精氨酸为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0025] 白藜芦醇为0-2份,优选为0.000001-1份;
- [0026] Caspase9抑制剂为0-2份,优选为0.0005-1份。
- [0027] 8、根据项5所述糖基组合,其特征在于,所述糖基组合由糖类组合和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂组成。
- [0028] 9、根据项8所述糖基组合,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的糖基组合物计,
- [0029] 糖类组合为90-100份,优选为95-99.8495份;
- [0030] 维生素C为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0031] 牛磺酸为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0032] L-精氨酸为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0033] 白藜芦醇为0-2份,优选为0.000001-1份;
- [0034] Caspase9抑制剂为0-2份,优选为0.0005-1份。
- [0035] 10、一种冻存液,其特征在于,包括DMSO、右旋糖酐40以及项5-9 任一项所述的糖基组合。
- [0036] 11、根据项10所述冻存液,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的冻存液计,包括:
- [0037] DMSO为2.5-20份,优选为5-10份;
- [0038] 右旋糖酐40为2.5-20份,优选为10-20份;
- [0039] 糖基组合为60-95份,优选为70-85份。
- [0040] 12、根据项10所述冻存液,其特征在于,所述冻存液由DMSO、右旋糖酐40、糖基组合物以及生理盐水组成。
- [0041] 13、根据项12所述冻存液,其特征在于,以相对于总重量100重量份数的冻存液计,包括:
- [0042] DMSO为2.5-20份,优选为5-10份;
- [0043] 右旋糖酐40为2.5-20份,优选为10-20份;

[0044] 糖基组合物为60-95份,优选为70-85份;

[0045] 生理盐水为余量。

[0046] 14、一种项10-13任一项所述冻存液在细胞冻存领域中的用途。

[0047] 本申请提供的冻存液,首先将海藻糖、蔗糖、蜜二糖及甘露聚糖组合成糖类组合物,作为冻存液的基础配方,用于替代传统冻存体系中所用的胎牛血清(FBS)。进一步用糖类组合物添加维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸、Caspase9的抑制剂得到糖基组合物。将糖类组合物或糖基组合物添加低剂量的DMSO、右旋糖苷40,得到冻存液。

[0048] 本申请所述的冻存液使细胞经低温冻存并按特定程序复苏后,仍能保持良好的细胞活性,同时避免了使用FBS等外源蛋白带来的异源蛋白污染或病原菌污染问题。另外低剂量DMSO的使用,进一步降低了临床使用风险,使得冻存体系更加安全。此外,基于糖基组合物配制的冻存液相比于糖类组合物配制的冻存液,进一步提高了活细胞的回收率。

附图说明

[0049] 图1为糖基组合物(实施例4)与单一糖配方(实施例1-3)、市售成品冻存液(Cryostor CS10)(对比例3)冻存复苏后细胞活率对比。

[0050] 图2为实施例5与糖基组合物(实施例4)、市售成品冻存液(Cryostor CS10)(对比例3)冻存复苏后细胞活率对比。

[0051] 图3为实施例5与糖基组合物(实施例4)、市售成品冻存液(Cryostor CS10)(对比例3)冻存复苏后活细胞数量对比。

[0052] 图4为对实施例5优化比较复苏后细胞活率。

具体实施方式

[0053] 以下对本申请的示范性实施例做出说明,其中包括本申请实施例的各种细节以助于理解,应当将它们认为仅仅是示范性的。因此,本领域普通技术人员应当认识到,可以对这个这里描述的实施例做出各种改变和修改,而不会背离本申请的范围和精神。同样,为了清楚和简明,以下的描述中省略了对公知功能和结构的描述。

[0054] 本申请提供一种糖类组合物,包括海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖中的至少一种。

[0055] 所述糖类组合物可以包括海藻糖。

[0056] 所述糖类组合物可以包括海藻糖和蔗糖。

[0057] 所述糖类组合物可以包括海藻糖和蜜二糖。

[0058] 所述糖类组合物可以包括海藻糖和甘露聚糖。

[0059] 所述糖类组合物可以包括海藻糖、蔗糖和蜜二糖。

[0060] 所述糖类组合物可以包括海藻糖、蔗糖和甘露聚糖。

[0061] 所述糖类组合物可以包括海藻糖、甘露聚糖和蜜二糖。

[0062] 所述糖类组合物可以包括海藻糖、蔗糖、蜜二糖和甘露聚糖。

[0063] 所述糖类组合物可以包括蔗糖。

[0064] 所述糖类组合物可以包括蔗糖和蜜二糖。

[0065] 所述糖类组合物可以包括蔗糖和甘露聚糖。

- [0066] 所述糖类组合可以包括蔗糖、蜜二糖和甘露聚糖。
- [0067] 所述糖类组合可以包括蜜二糖。
- [0068] 所述糖类组合可以包括蜜二糖和甘露聚糖。
- [0069] 所述糖类组合可以包括甘露聚糖。
- [0070] 在本申请中,所述糖类组合,以相对于总重量100重量份数的糖类组合计,包括:
- [0071] 海藻糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0072] 蔗糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0073] 蜜二糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0074] 甘露聚糖为0-100份,优选为0.5-50份。
- [0075] 在本申请,所述糖类组合由海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖组成。以相对于总重量100重量份数的糖类组合计,糖类组合成分包括,
- [0076] 海藻糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0077] 蔗糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0078] 蜜二糖为0-100份,优选为0.1-50份;
- [0079] 甘露聚糖为0-100份,优选为0.5-50份。
- [0080] 在所述糖类组合中,所述海藻糖的含量可以为0份、10份、20份、30份、40份、50份、60份、70份、80份、90份、100份。
- [0081] 所述蔗糖的含量可以为0份、10份、20份、30份、40份、50份、60份、70份、80份、90份、100份。
- [0082] 所述蜜二糖的含量可以为0份、10份、20份、30份、40份、50份、60份、70份、80份、90份、100份。
- [0083] 所述甘露聚糖的含量可以为0份、10份、20份、30份、40份、50份、60份、70份、80份、90份、100份。
- [0084] 本申请提供一种糖类组合物的制备方法,包括:按上述比例分别称取海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖,然后将海藻糖、蔗糖、蜜二糖以及甘露聚糖混合均匀,得到所述糖类组合。
- [0085] 本申请提供一种糖基组合,包括糖类组合和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂中的至少一种。此处的糖类组合为前述的糖类组合。
- [0086] 所述糖基组合可以包括糖类组合和维生素C。
- [0087] 所述糖基组合可以包括糖类组合和白藜芦醇。
- [0088] 所述糖基组合可以包括糖类组合和牛磺酸。
- [0089] 所述糖基组合可以包括糖类组合和L-精氨酸。
- [0090] 所述糖基组合可以包括糖类组合和Caspase9抑制剂。
- [0091] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C和白藜芦醇。
- [0092] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C和牛磺酸。
- [0093] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C和L-精氨酸。
- [0094] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C和Caspase9抑制剂。
- [0095] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、白藜芦醇和Caspase9抑制剂。

- [0096] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、白藜芦醇和牛磺酸。
- [0097] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、白藜芦醇和L-精氨酸。
- [0098] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、牛磺酸和L-精氨酸。
- [0099] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、牛磺酸和Caspase9 抑制剂。
- [0100] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、L-精氨酸和Caspase9 抑制剂。
- [0101] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、白藜芦醇、牛磺酸和 L-精氨酸。
- [0102] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、和Caspase9抑制剂。
- [0103] 所述糖基组合可以包括糖类组合和白藜芦醇。
- [0104] 所述糖基组合可以包括糖类组合、白藜芦醇和牛磺酸。
- [0105] 所述糖基组合可以包括糖类组合、白藜芦醇和L-精氨酸。
- [0106] 所述糖基组合可以包括糖类组合、白藜芦醇和Caspase9抑制剂。
- [0107] 所述糖基组合可以包括糖类组合、白藜芦醇、牛磺酸和L-精氨酸。
- [0108] 所述糖基组合可以包括糖类组合、白藜芦醇、牛磺酸和Caspase9 抑制剂。
- [0109] 所述糖基组合可以包括糖类组合、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸和 Caspase9抑制剂。
- [0110] 所述糖基组合可以包括糖类组合和牛磺酸。
- [0111] 所述糖基组合可以包括糖类组合、牛磺酸和L-精氨酸。
- [0112] 所述糖基组合可以包括糖类组合、牛磺酸和Caspase9抑制剂。
- [0113] 所述糖基组合可以包括糖类组合、牛磺酸、L-精氨酸和Caspase9 抑制剂。
- [0114] 所述糖基组合可以包括糖类组合和L-精氨酸。
- [0115] 所述糖基组合可以包括糖类组合、L-精氨酸和Caspase9抑制剂。
- [0116] 所述糖基组合可以包括糖类组合和Caspase9抑制剂。
- [0117] 所述糖基组合可以包括糖类组合、维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、 L-精氨酸和Caspase9抑制剂。
- [0118] 在本申请中,以相对于总重量100重量份数的糖基组合计,包括:
- [0119] 糖类组合为90-100份,优选为95-99.8495份;
- [0120] 维生素C为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0121] 牛磺酸为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0122] L-精氨酸为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0123] 白藜芦醇为0-2份,优选为0.000001-1份;
- [0124] Caspase9抑制剂为0-2份,优选为0.0005-1份。
- [0125] 在本申请中,所述糖基组合由糖类组合和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂组成。
- [0126] 在本申请中,以相对于总重量100重量份数的糖基组合计,
- [0127] 糖类组合为90-100份,优选为95-99.8495份;
- [0128] 维生素C为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0129] 牛磺酸为0-2份,优选为0.05-1份;
- [0130] L-精氨酸为0-2份,优选为0.05-1份;

[0131] 白藜芦醇为0-2份,优选为;0.000001-1份

[0132] Caspase9抑制剂为0-2份,优选为0.0005-1份。

[0133] 在所述糖基组合中,所述糖类组合物的含量可以为90份、91份、92 份、93份、94份、95份、95.5份、96份、96.5份、97份、97.5份、98份、98.5份、99份、99.5份或100份。

[0134] 所述维生素C的含量可以为0份、0.05份、0.06份、0.07份、0.08份、0.09份、0.1份、0.11份、0.12份、0.13份、0.14份、0.15份、0.16份、0.17 份、0.18份、0.19份、0.2份、0.21份、0.22份、0.23份、0.24份、0.25份、0.26份、0.27份、0.28份、0.29份、0.3份、0.31份、0.32份、0.33份、0.34 份、0.35份、0.36份、0.37份、0.38份、0.39份、0.4份、0.41份、0.42份、0.43份、0.44份、0.45份、0.46份、0.47份、0.48份、0.49份、0.5份、0.51 份、0.52份、0.53份、0.54份、0.55份、0.56份、0.57份、0.58份、0.59份、0.6份、0.61份、0.62份、0.63份、0.64份、0.65份、0.66份、0.67份、0.68 份、0.69份、0.7份、0.71份、0.72份、0.73份、0.74份、0.75份、0.76份、0.77份、0.78份、0.79份、0.8份、0.81份、0.82份、0.83份、0.84份、0.85 份、0.86份、0.87份、0.88份、0.89份、0.9份、0.91份、0.92份、0.93份、0.94份、0.95份、0.96份、0.97份、0.98份、0.99份、1份、1.5份、2份。

[0135] 所述牛磺酸的含量可以为0份、0.05份、0.06份、0.07份、0.08份、0.09 份、0.1份、0.11份、0.12份、0.13份、0.14份、0.15份、0.16份、0.17份、0.18份、0.19份、0.2份、0.21份、0.22份、0.23份、0.24份、0.25份、0.26 份、0.27份、0.28份、0.29份、0.3份、0.31份、0.32份、0.33份、0.34份、0.35份、0.36份、0.37份、0.38份、0.39份、0.4份、0.41份、0.42份、0.43份、0.44份、0.45份、0.46份、0.47份、0.48份、0.49份、0.5份、0.51份、0.52份、0.53份、0.54份、0.55份、0.56份、0.57份、0.58份、0.59份、0.6 份、0.61份、0.62份、0.63份、0.64份、0.65份、0.66份、0.67份、0.68份、0.69份、0.7份、0.71份、0.72份、0.73份、0.74份、0.75份、0.76份、0.77 份、0.78份、0.79份、0.8份、0.81份、0.82份、0.83份、0.84份、0.85份、0.86份、0.87份、0.88份、0.89份、0.9份、0.91份、0.92份、0.93份、0.94 份、0.95份、0.96份、0.97份、0.98份、0.99份、1份、1.5份、2份。

[0136] 所述L-精氨酸的含量可以为0份、0.05份、0.06份、0.07份、0.08份、0.09份、0.1份、0.11份、0.12份、0.13份、0.14份、0.15份、0.16份、0.17 份、0.18份、0.19份、0.2份、0.21份、0.22份、0.23份、0.24份、0.25份、0.26份、0.27份、0.28份、0.29份、0.3份、0.31份、0.32份、0.33份、0.34 份、0.35份、0.36份、0.37份、0.38份、0.39份、0.4份、0.41份、0.42份、0.43份、0.44份、0.45份、0.46份、0.47份、0.48份、0.49份、0.5份、0.51 份、0.52份、0.53份、0.54份、0.55份、0.56份、0.57份、0.58份、0.59份、0.6份、0.61份、0.62份、0.63份、0.64份、0.65份、0.66份、0.67份、0.68 份、0.69份、0.7份、0.71份、0.72份、0.73份、0.74份、0.75份、0.76份、0.77份、0.78份、0.79份、0.8份、0.81份、0.82份、0.83份、0.84份、0.85 份、0.86份、0.87份、0.88份、0.89份、0.9份、0.91份、0.92份、0.93份、0.94份、0.95份、0.96份、0.97份、0.98份、0.99份、1份、1.5份、2份。

[0137] 所述白藜芦醇的含量可以为0份、0.05份、0.06份、0.07份、0.08份、0.09份、0.1份、0.11份、0.12份、0.13份、0.14份、0.15份、0.16份、0.17 份、0.18份、0.19份、0.2份、0.21份、0.22份、0.23份、0.24份、0.25份、0.26份、0.27份、0.28份、0.29份、0.3份、0.31份、0.32份、0.33份、0.34 份、0.35份、0.36份、0.37份、0.38份、0.39份、0.4份、0.41份、0.42份、0.43份、0.44份、0.45份、0.46份、0.47份、0.48份、0.49份、0.5份、0.51 份、0.52份、0.53份、

0.54份、0.55份、0.56份、0.57份、0.58份、0.59份、0.6份、0.61份、0.62份、0.63份、0.64份、0.65份、0.66份、0.67份、0.68份、0.69份、0.7份、0.71份、0.72份、0.73份、0.74份、0.75份、0.76份、0.77份、0.78份、0.79份、0.8份、0.81份、0.82份、0.83份、0.84份、0.85份、0.86份、0.87份、0.88份、0.89份、0.9份、0.91份、0.92份、0.93份、0.94份、0.95份、0.96份、0.97份、0.98份、0.99份、1份、1.5份、2份。

[0138] 所述Caspase9抑制剂的含量可以为0份、0.05份、0.06份、0.07份、0.08份、0.09份、0.1份、0.11份、0.12份、0.13份、0.14份、0.15份、0.16份、0.17份、0.18份、0.19份、0.2份、0.21份、0.22份、0.23份、0.24份、0.25份、0.26份、0.27份、0.28份、0.29份、0.3份、0.31份、0.32份、0.33份、0.34份、0.35份、0.36份、0.37份、0.38份、0.39份、0.4份、0.41份、0.42份、0.43份、0.44份、0.45份、0.46份、0.47份、0.48份、0.49份、0.5份、0.51份、0.52份、0.53份、0.54份、0.55份、0.56份、0.57份、0.58份、0.59份、0.6份、0.61份、0.62份、0.63份、0.64份、0.65份、0.66份、0.67份、0.68份、0.69份、0.7份、0.71份、0.72份、0.73份、0.74份、0.75份、0.76份、0.77份、0.78份、0.79份、0.8份、0.81份、0.82份、0.83份、0.84份、0.85份、0.86份、0.87份、0.88份、0.89份、0.9份、0.91份、0.92份、0.93份、0.94份、0.95份、0.96份、0.97份、0.98份、0.99份、1份、1.5份、2份。

[0139] 本申请提供一种糖基组合物的制备方法,包括按上述比例称取糖类组合物和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂,然后将所述糖类组合物和维生素C、白藜芦醇、牛磺酸、L-精氨酸或Caspase9抑制剂混合均匀,得到所述糖基组合物。

[0140] 本申请提供一种冻存液,包括DMSO、右旋糖酐40以及所述的糖基组合物。

[0141] 在本申请中,以相对于总重量100重量份数的冻存液计,包括:

[0142] DMSO为2.5-20份,优选为5-10份;

[0143] 右旋糖酐40为2.5-20份,优选为10-20份;

[0144] 糖基组合物为60-95份,优选为70-85份。

[0145] 在本申请中,所述冻存液由括DMSO、右旋糖酐40、糖基组合物以及生理盐水组成。

[0146] 在本申请中,以相对于总重量100重量份数的冻存液计,

[0147] DMSO为2.5-20份,优选为5-10份;

[0148] 右旋糖酐40为2.5-20份,优选为10-20份;

[0149] 糖基组合物为60-95份,优选为70-85份;

[0150] 生理盐水为余量。

[0151] 本申请提供一种冻存液的制备方法,包括:将右旋糖酐40以及所述的糖基组合物分别配制成储存液,然后按上述比例量取DMSO、右旋糖酐40储存液、糖基组合物储存液以及生理盐水,然后将DMSO、右旋糖酐40储存液、糖基组合物储存液以及生理盐水混合均匀,得到所述冻存液。

[0152] 本申请提供一种所述冻存液在细胞冻存领域中的用途。

[0153] 实施例

[0154] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊要求,均为常规方法。

[0155] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0156] K562细胞购自于ATCC细胞库。

[0157] Cryostor CS10冻存液:购买于STEMCELL公司。

[0158] APCAnnexinV:购买于BioLegend公司。

[0159] A:第一储存液的配制:

[0160] 称取海藻糖:5.07g,蔗糖:10.25g,蜜二糖:5.07g,甘露聚糖:5g,右旋糖酐40:10g,将称量完成的各成分分别转入50ml的离心管中。并加入注射用生理盐水,分别定容至50ml。然后分别采用0.22 μ m滤膜除菌过滤后,分装转移至无菌试剂瓶中,即可配成海藻糖储存液、蔗糖储存液、蜜二糖储存液、甘露聚糖储存液以及右旋糖酐40储存液。4℃保存,6个月内使用。适用于实施例1-实施例3(实施例1-3配成的冻存液的体积为100ml)。

[0161] B:第二储存液的配置

[0162] 称取海藻糖:7.56g,蔗糖:6.84g,蜜二糖:6.84g,甘露聚糖:10g混合,并加水溶解,然后将溶解后的混合液转移到100ml的容量瓶中,之后加入注射用生理盐水,定容至100ml。然后采用0.22 μ m滤膜除菌过滤后,分装转移至无菌试剂瓶中,即可得到糖类组合物储存液。4℃保存,6个月内使用。

[0163] 称取右旋糖酐40,20g溶解,然后用生理盐水,定容至100ml。之后采用0.22 μ m滤膜除菌过滤,即可得到右旋糖酐40储存液。4℃保存,6个月内使用。

[0164] 称取维生素C,0.5g溶解然后用生理盐水定容到5ml,之后采用0.22 μ m 滤膜除菌过滤,得到维生素C储存液。

[0165] 称取白藜芦醇2.28mg溶解,然后用生理盐水定容到10ml,之后采用 0.22 μ m滤膜除菌过滤,得到白藜芦醇储存液。

[0166] 称取L-精氨酸0.5g溶解,然后用生理盐水定容到5ml,之后采用0.22 μ m 滤膜除菌过滤,得到L-精氨酸储存液。

[0167] 称取牛磺酸0.25溶解,然后用生理盐水定容到5ml,之后采用0.22 μ m 滤膜除菌过滤,得到牛磺酸储存液。

[0168] 称取Caspase9抑制剂1mg,加入213 μ l无菌DMSO溶解,得到Caspase9 抑制剂储存液。

[0169] 第二储存液适用于实施例4、实施例5、实施例6、实施例7、实施例8、实施例9、实施例10、实施例11、实施例12、实施例13、对比例2以及对比例3,配成的冻存液的体积为10ml。

[0170] 实施例1

[0171] 取10ml海藻糖储存液、2.5ml的DMSO、50ml右旋糖酐40储存液、37.5ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0172] 实施例2

[0173] 取10ml蔗糖储存液,并在其中加入5ml的DMSO、50ml右旋糖酐40、37.5ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0174] 实施例3

[0175] 取10ml蜜二糖储存液,并在其中加入5ml的DMSO、50ml右旋糖酐 40、37.5ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0176] 实施例4

[0177] 取1ml糖类组合物存储液、0.5ml DMSO,5ml右旋糖酐40储存液、3.5ml 的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0178] 实施例5

[0179] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl 维生素C储存液、100μl白藜芦醇储存液、100μl L-精氨酸储存液、200μl牛磺酸储存液、30μl Caspase9抑制剂储存液、2.97ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0180] 实施例6

[0181] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl 维生素C储存液、3.4ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0182] 实施例7

[0183] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl 白藜芦醇储存液、3.4ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0184] 实施例8

[0185] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl L-精氨酸储存液、3.4ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0186] 实施例9

[0187] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、30μl Caspase9抑制剂储存液、3.47ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0188] 实施例10

[0189] 取1ml糖类组合物、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液,100μl维生素C储存液、100μl白藜芦醇储存液、3.3ml的注射用生理盐水混合得到冻存液。

[0190] 实施例11

[0191] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl 维生素C储存液、100μl白藜芦醇储存液、100μl L-精氨酸储存液、3.2ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0192] 实施例12

[0193] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl 白藜芦醇储存液、100μl L-精氨酸储存液、30μl Caspase9抑制剂储存液、3.27ml 的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0194] 实施例13

[0195] 取1ml糖类组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl 白藜芦醇储存液、100μl L-精氨酸储存液、3.3ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0196] 对比例1

[0197] 取0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、4.5ml的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0198] 对比例2

[0199] 取1ml糖基组合物储存液、0.5ml DMSO、5ml右旋糖酐40储存液、100μl 白藜芦醇储存液、100μl牛磺酸储存液、30μl Caspase9抑制剂储存液、3.27ml 的注射用生理盐水,混合得到冻存液。

[0200] 对比例3为购自于STEMCELL公司的Cryostor CS10冻存液。

[0201] 表1为各实施例以及对比例的原料组成对比表

[0202]

	DM SO(g/10 0ml)	右旋 糖酐 40(g /100 ml)	糖基组合物								
			糖类组合物				维生 素 C(g/1 00ml)	白藜 芦醇 (g/10 0ml)	牛磺 酸 (g/1 00ml)	L-精 氨酸 (g/10 0ml)	Caspase9 抑 制剂 (g/100 ml)
			海藻糖 (g/100 ml)	蔗糖 (g/10 0ml)	蜜二 糖 (g/10 0ml)	甘露 聚糖 (g/10 0ml)					
实施例 1	5	10	1.13	0	0	0	0	0	0	0	0
实施例 2	5	10	0	2.05	0	0	0	0	0	0	0
实施例 3	5	10	0	0	1.71	0	0	0	0	0	0
实施例 4	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0	0	0	0	0

[0203]

实施例 5	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0.1	0.000 023	0.1	0.1	0.0014
实施例 6	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0.1	0	0	0	0
实施例 7	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0	0.000 023	0	0	0
实施例 8	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0	0	0	0.1	0
实施例 9	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0	0	0	0	0.0014
实施例 10	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0.1	0.000 023	0	0	0
实施例 11	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0.1	0.000 023	0	0.1	0
实施例 12	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0	0.000 023	0	0.1	0.0014
实施例 13	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0	0.000 023	0	0.1	0
对比例 1	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对比例 2	5	10	0.76	0.68	0.68	1	0	0.000 023	0.1	0	0.0014

[0204] 试验例

[0205] 1、细胞活率

[0206] 选用经扩增培养后的K562细胞进行冻存。将实施例1-实施例13以及 对比例1-对比例3的冻存液,进行冻存实验。具体为用上述冻存液重悬经 400g,5分钟室温离心的K562细胞,利用1.8ml的冻存管冻存,细胞密度为 1×10^7 个/ml,冻存体积为1ml。细胞与冻存液混匀后加入冻存管内即可转移 至-80℃冰箱降温,-80℃冰箱冻存过夜后,再转移至液氮罐内储存(在液氮 管内储存7天或14天)。复苏流程,将恒温水浴锅开启,水温加热至 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 时,将细胞从液氮罐中取出,用盛有液氮的容器将细胞转移至水浴锅 旁。将细胞快速的转移至水浴锅内,轻轻晃动使其快速融化,整个融化过程 控制在2分钟内,结果如表2所示。本文所述的细胞活率为经流式细胞术同 时检测PI与Annexin V,其中PI与Annexin V双阴性细胞群体为活细胞群, 其比例为活细胞比例。本发明所述的活细胞数量为经AO/PI染色后利用细胞 计数仪(Nexcelom型号:K2)进行计数分析所得,结果如表2以及图1-图 4所示。

[0207] 表2采用各实施例及对比例的冻存液进行冻存试验后的K562细胞的活率以及活细胞数

[0208]

具体实施例	冻存 14 天细胞活率/%
实施例 1	66.17±3.15
实施例 2	69.54 ± 3.86
实施例 3	65.81 ± 4.40

[0209]

实施例 4	81.58 ± 2.42
实施例 5	81.76 ± 2.00
实施例 6	6.85 ± 0.13
实施例 7	81.2 ± 0.39
实施例 8	71.64 ± 1.61
实施例 9	82.17 ± 0.77
实施例 10	7.82 ± 2.0
实施例 11	80.24 ± 3.2
实施例 12	70.65 ± 2.09
实施例 13	70.07 ± 2.3
对比例 1	44.97 ± 8.7
对比例 2	70.67 ± 2.09
对比例 3	72.38 ± 10.86

[0210] 小结：从上表以及图1-图4可知，K562细胞低温冻存14天后经37℃ 水浴复苏，实施例4的细胞活率(81.58%±2.42%)显著高于对比例2 (44.97%±8.7%) 及对比例3 (70.67%±2.09%) 并且还高于市售冻存液(对 比例1) (72.38%±10.86%)，同时也高于单一糖配方组(实施例1： 61.25%±9.28%，实施例2:69.54%±3.86%，实施例3:65.81%±4.40%)。实 施例5与实施例4相比较虽然从细胞复苏活率上无显著差别，但在冻存相同细胞数量的情况下实施例5复苏后活细胞数量多于实施例4，代表实施例5 的复苏活细胞回收比例更高。通过对实施例5冻存液中添加的维生素C、白 藜芦醇、L-精氨酸、牛磺酸、Caspase9抑制剂进行单一去除或多个去除(实 施例10-20)，与实施例5相比去除后各组在不同的时间点均降低了细胞活 率。

[0211] 尽管以上结合对本申请的实施方案进行了描述，但本申请并不局限于上述的具体实施方案和应用领域，上述的具体实施方案仅仅是示意性的、指导性的，而不是限制性的。本领域的普通技术人员在本说明书的启示下和在不脱离本申请权利要求所保护的范围的情况下，还可以做出很多种的形式，这些均属于本申请保护之列。

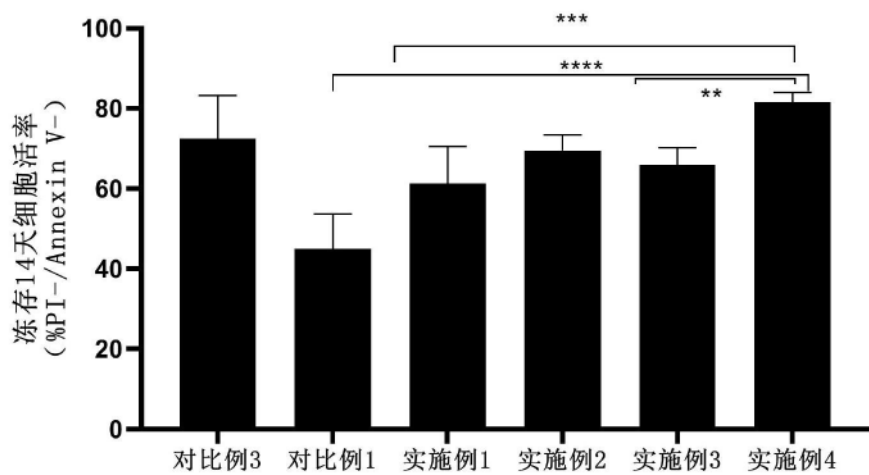


图1

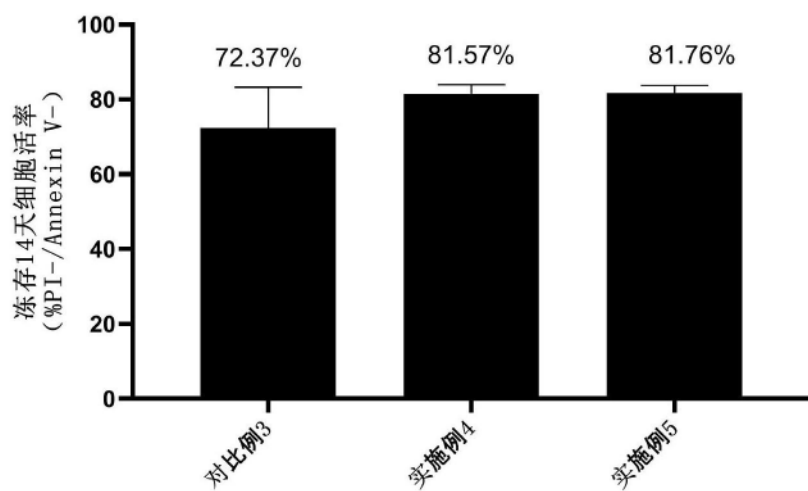


图2

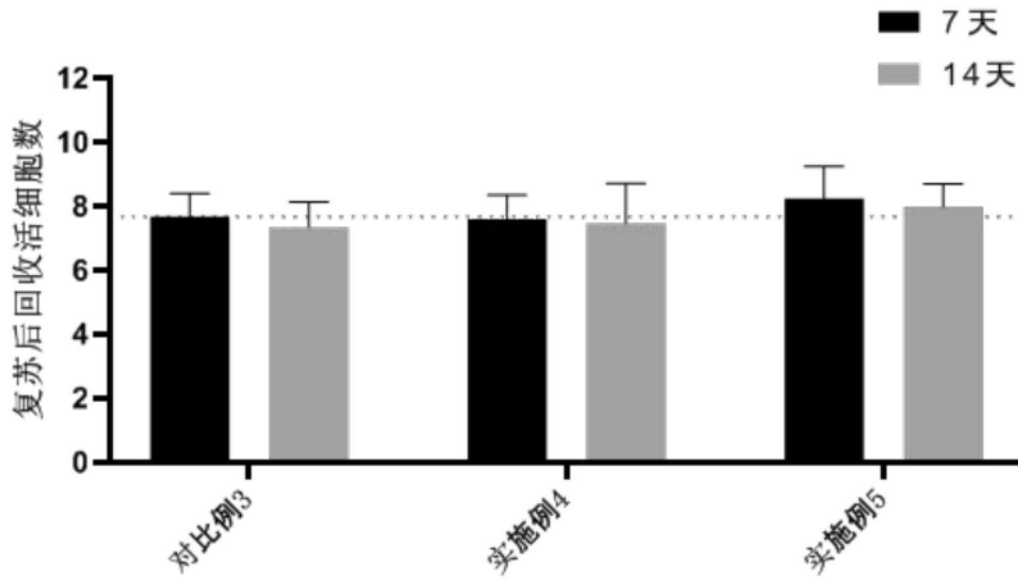


图3

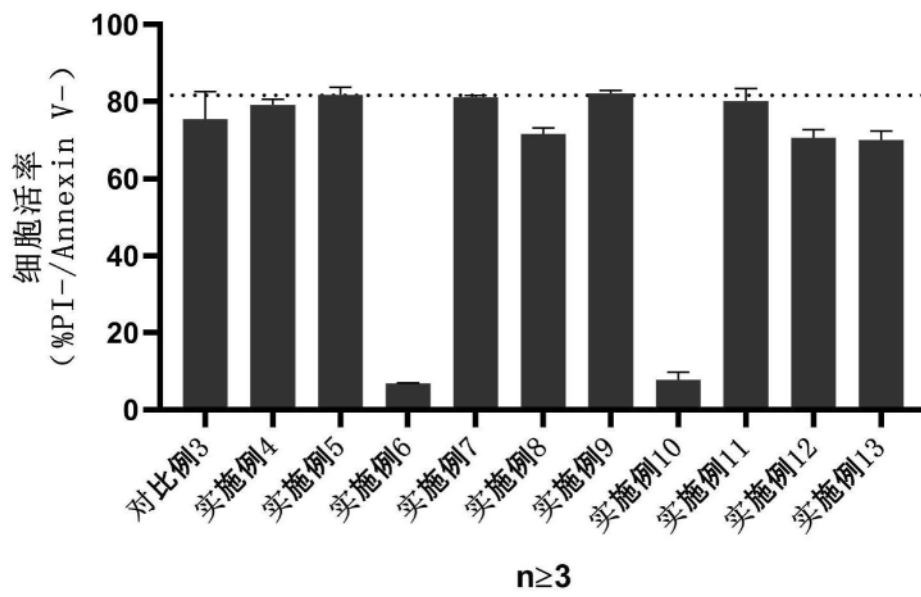


图4