



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105491883 B

(45)授权公告日 2018.11.02

(21)申请号 201480044962.5

(22)申请日 2014.06.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105491883 A

(43)申请公布日 2016.04.13

(30)优先权数据
61/834,517 2013.06.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.02.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/042396 2014.06.13

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/002729 EN 2015.01.08

(73)专利权人 生物马特里卡公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 朱蒂·穆勒-科恩 保罗·迪亚兹

罗尔夫·穆勒 瓦斯科·利贝拉尔
阿尔伯特·佩雷斯-拉达格

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51)Int.Cl.
A01N 1/02(2006.01)
A61K 31/17(2006.01)
A61K 31/4706(2006.01)

(56)对比文件
US 2011081363 A1,2011.04.07,
US 2012028933 A1,2012.02.02,
CN 102947082 A,2013.02.27,
US 6872357 B1,2005.03.29,
CN 1747971 A,2006.03.15,
CN 101360822 A,2009.02.04,

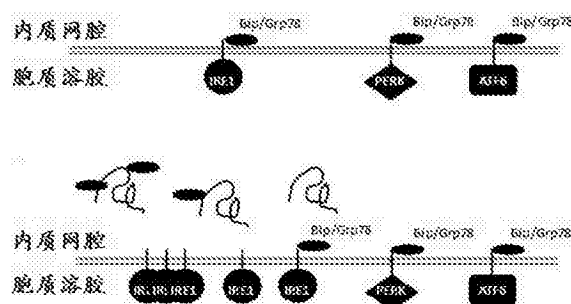
审查员 白小琳

权利要求书2页 说明书43页 附图5页

(54)发明名称
细胞稳定化

(57)摘要

本发明涉及细胞在环境温度下的稳定化。更具体地,本发明涉及允许细胞脱水和再水化并且显著提高功能性细胞在室温下干燥储存后的恢复性的制剂、组合物、试剂盒和方法。



1. 一种脱水制剂,其包含:
 - (i) pH缓冲液;
 - (ii) 合成氨基酸,其选自羟脯氨酸和甜菜碱;
 - (iii) 水溶性聚合物,其为聚乙烯醇;以及
 - (iv) 丙氨酸-谷氨酰胺。
2. 根据权利要求1所述的脱水制剂,其进一步包含非还原糖、至少一种凋亡抑制剂或氨基酸。
3. 权利要求1的脱水制剂,其中所述pH缓冲液选自下组:柠檬酸、酒石酸、苹果酸、磺基水杨酸、磺基间苯二甲酸、草酸、硼酸盐、CAPS (3-(环己基氨基)-1-丙磺酸)、CAPSO (3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸)、EPPS (4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪丙磺酸)、HEPES (4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙磺酸)、MES (2-(N-吗啉基)乙磺酸)、MOPS (3-(N-吗啉基)丙磺酸)、MOPSO (3-吗啉基-2-羟基丙磺酸)、PIPES (1,4-哌嗪二乙磺酸)、TAPS (N-[三(羟基甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸)、TAPSO (2-羟基-3-[三(羟基甲基)甲基氨基]-1-丙磺酸)、TES (N-[三(羟基甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸)、bicine (N,N-双(2-羟基乙基)甘氨酸)、tricine (N-[三(羟基甲基)甲基]甘氨酸)、三(三(羟基甲基)氨基甲烷)和bis-tris (2-[双(2-羟基乙基)氨基]-2-(羟基甲基)-1,3-丙二醇)。
4. 权利要求2的脱水制剂,其中所述氨基酸选自下组:甘氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和脯氨酸。
5. 权利要求2的脱水制剂,其中所述至少一种凋亡抑制剂是可逆凋亡抑制剂。
6. 权利要求1的脱水制剂,其中所述制剂包含丙氨酸-谷氨酰胺、甜菜碱、Bis-Tris和聚乙烯醇。
7. 权利要求1的脱水制剂,其中所述制剂包含丙氨酸-谷氨酰胺、甜菜碱、MES和聚乙烯醇。
8. 权利要求1的脱水制剂,其中所述制剂进一步包含螯合剂。
9. 权利要求8的脱水制剂,其中所述螯合剂选自下组:二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、反式-1,2-二氨基环己烷-N,N,N',N'-四乙酸(CDTA)、1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、N-(2-羟基乙基)乙二胺-N,N',N'-三乙酸、葡萄糖酸钠和次氨基三乙酸(NTA)。
10. 权利要求8的脱水制剂,其中所述制剂包含丙氨酸-谷氨酰胺、EDTA、Tris-HCl、反式-4-羟基-L-脯氨酸和聚乙烯醇。
11. 一种在没有冷冻的情况下将一种或多种细胞在环境温度下基本干燥储存的方法,其包括:
 - (i) 将所述一种或多种细胞与包含至少一种凋亡抑制剂的预脱水制剂一起温育;
 - (ii) 从所述一种或多种细胞中去除所述预脱水制剂;以及
 - (iii) 在脱水制剂的存在下使所述一种或多种细胞脱水,以产生一种或多种基本干燥储存的细胞,所述脱水制剂包含:
 - (a) pH缓冲液;
 - (b) 合成氨基酸,其选自羟脯氨酸和甜菜碱;

(c) 水溶性聚合物, 其为聚乙烯醇; 以及

(d) 丙氨酸-谷氨酰胺。

12. 根据权利要求11的方法, 其中所述脱水制剂包含: 丙氨酸-谷氨酰胺, 甜菜碱, Bis-Tris 和聚乙烯醇; 或丙氨酸-谷氨酰胺, 甜菜碱, MES和聚乙烯醇。

13. 根据权利要求11的方法, 其中所述脱水制剂还包含非还原糖、至少一种凋亡抑制剂或氨基酸。

14. 根据权利要求11所述的方法, 其进一步包括在将一种或多种细胞与所述预脱水制剂一起温育之前将所述一种或多种细胞固定至固体支持体上。

15. 根据权利要求11所述的方法, 其进一步包括采用包含至少一种凋亡抑制剂的再水化制剂将所述一种或多种基本干燥储存的细胞再水化, 以产生再水化的细胞。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂与所述再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂相同。

17. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述一种或多种基本干燥储存的细胞在基本干燥储存至少1小时后再水化时, 再水化的细胞表现出至少一种与脱水和基本干燥储存之前的细胞基本相同的功能性质。

18. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述制剂进一步包含螯合剂。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述螯合剂选自下组: 二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二醇四乙酸 (EGTA)、反式-1,2-二氨基环己烷-N,N,N',N'-四乙酸 (CDTA)、1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸 (BAPTA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)、N-(2-羟基乙基)乙二胺-N,N',N'-三乙酸、葡萄糖酸钠和次氨基三乙酸 (NTA)。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述脱水制剂包含丙氨酸-谷氨酰胺、EDTA、Tris-HCl、反式-4-羟基-L-脯氨酸和聚乙烯醇。

21. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述至少一种凋亡抑制剂是可逆凋亡抑制剂。

细胞稳定化

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求于2013年6月13日提交的美国临时申请号61/834,517的权益,该临时申请通过引用全文并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及细胞的稳定化。

[0004] 相关领域的描述

[0005] 有核细胞(例如,真核细胞)的长期储存通常需要在毒性冷冻保护剂DMSO的存在下超低的温度。除了由冷藏系统的常见失效导致的损失之外,活细胞从冷冻状态的恢复是有挑战性的,且通常仅少部分的投入细胞存活。

[0006] 在过去的20年中,已花费数百万美元的研究基金来尝试开发用于在环境温度下稳定化真核细胞的替代方法。这些努力背后的动力是环境温度稳定化的真核细胞储备物用于生物医学研究、产品开发以及在诊断学、再生医学、治疗学、血液供应物流学和细胞移植中直接应用的优势。

[0007] 基于对可在干燥状态下存活多年的极端微生物如缓步动物、轮虫或卤虫(brine shrimp)的研究,有人假设可以在真核细胞培养物中开发模拟这一分子现象的技术和方案。遗憾的是,即使在数十年的研究之后,仍未实现细胞的实用干燥储存稳定化。所描述的最好的稳定化技术采用海藻糖——一种非还原糖分子作为干燥介质。载有海藻糖的哺乳动物细胞可被干燥但需要几乎立即再水化,并且即使那样存活率仍然有限。已经证明,干燥细胞储存即使持续几分钟也会导致彻底的细胞死亡。

[0008] 因此,存在开发允许细胞在环境温度下基本干燥储存且再水化时保持活力的制剂、组合物和方法的需要。

发明内容

[0009] 本文所述的制剂、组合物和方法有利地使细胞在基本干燥的条件下储存时维持存活状态,使得细胞在干燥储存至少一小时,且在某些实施方案中至少一周的时间段后再水化时保持至少一种功能性质,例如,细胞活力,从而在无需冷冻或冻干的情况下显著增加可用于运输和储存活细胞的时间。在本发明的一个方面,提供了组合物,其包含在没有冷冻或任选地没有冻干的情况下基本干燥储存的细胞,其中该细胞在基本干燥储存至少1小时后再水化时,再水化的细胞表现出至少一种与脱水和基本干燥储存之前的细胞基本相同的功能性质。

[0010] 在某些实施方案中,所述组合物包含至少一种干燥储存稳定剂,该干燥储存稳定剂优选地选自氨基酸、合成氨基酸、肽、非还原糖、螯合剂、水溶性聚合物和四氢嘧啶。在一个实施方案中,不存在为糖分子(例如,海藻糖)的稳定剂,或者如果存在为糖分子的稳定剂,则还存在另一种不是糖分子的稳定剂。

[0011] 在某些其他实施方案中,提供了包含至少一种凋亡抑制剂、优选可逆凋亡抑制剂

的组合物。示例性的凋亡抑制剂选自PERK-eIF2- α 抑制剂、ASK1抑制剂、NRF2-KEAP1抑制剂、JNK抑制剂、p38MAP激酶抑制剂、IRE1抑制剂、GSK3抑制剂、MEK抑制剂、PI3K通路抑制剂、钙蛋白酶抑制剂以及胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0012] 在另一个方面,提供了组合物,其中在脱水之前用包含至少一种凋亡抑制剂的预脱水制剂处理细胞以产生预处理的细胞。在某些实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂选自PERK-eIF2- α 抑制剂、ASK1抑制剂、NRF2-KEAP1抑制剂、JNK抑制剂、p38MAP激酶抑制剂、IRE1抑制剂、GSK3抑制剂、MEK抑制剂、PI3K通路抑制剂、钙蛋白酶抑制剂以及胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0013] 在一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是PERK-eIF2- α 抑制剂。

[0014] 在另一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是ASK1抑制剂。

[0015] 在又一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是NRF2-KEAP1抑制剂。

[0016] 在又一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是GSK3抑制剂。

[0017] 在一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是MEK抑制剂。

[0018] 在另一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂。

[0019] 在又一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂和p38MAP激酶抑制剂。

[0020] 在又一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是PI3K抑制剂。

[0021] 在一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是IRE-1抑制剂。

[0022] 在另一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是钙蛋白酶抑制剂。

[0023] 在又一个实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0024] 在某些实施方案中,所述预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种ER蛋白伴侣诱导剂。

[0025] 在某些其他实施方案中,所述预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种自噬诱导剂。

[0026] 在又一个实施方案中,所述预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种存活蛋白。

[0027] 在本发明的另一个方面,提供了包含再水化的细胞的组合物,其中该再水化的细胞是在没有冷冻或冻干的情况下基本干燥储存的细胞,其中该细胞在基本干燥储存至少1小时后再水化时,该再水化的细胞表现出至少一种与脱水和基本干燥储存之前的细胞基本相同的功能性质。

[0028] 在某些实施方案中,所述细胞的再水化在再水化制剂的存在下发生,并且优选地该再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂。

[0029] 在某些其他实施方案中,所述再水化缓冲液中的至少一种凋亡抑制剂选自PERK-eIF2- α 抑制剂、ASK1抑制剂、NRF2-KEAP1抑制剂、JNK抑制剂、p38MAP激酶抑制剂、IRE1抑制剂、GSK3抑制剂、MEK抑制剂、PI3K通路抑制剂、钙蛋白酶抑制剂以及胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0030] 在其他实施方案中,所述再水化制剂包含凋亡抑制剂以及选自ER蛋白伴侣诱导剂、自噬诱导剂和存活蛋白中的一种或多种。

[0031] 在一个实施方案中,再水化后的至少一种功能性质包括代谢活性。

[0032] 在某些实施方案中,所述代谢活性通过测定ATP含量或胱天蛋白酶测定试验来度

量。

[0033] 在某些其他实施方案中,再水化后的代谢活性在细胞再水化后24小时、细胞再水化后48小时、细胞再水化后72小时或细胞再水化后一周测量。

[0034] 在其他实施方案中,所述组合物在再水化前以脱水形式稳定化至少24小时,在再水化前以脱水形式稳定化至少48小时,在再水化前以脱水形式稳定化至少72小时,或在再水化前以脱水形式稳定化至少一周。

[0035] 在其他方面,提供了脱水制剂,其包含pH缓冲液;合成氨基酸、水溶性聚合物;以及第一氨基酸或肽。在某些实施方案中,所述脱水制剂进一步包含非还原糖、至少一种凋亡抑制剂或第二氨基酸。

[0036] 在又一个方面,提供了在没有冻干的情况下将一种或多种细胞在环境温度下基本干燥储存的方法,该方法包括:将一种或多种细胞在脱水制剂中温育,以及在脱水制剂的存在下使该一种或多种预处理的细胞脱水,以产生一种或多种基本干燥储存的细胞。在其他方面,提供了在没有冻干的情况下将一种或多种细胞在环境温度下基本干燥储存的方法,该方法包括:将所述一种或多种细胞与包含凋亡抑制剂的预脱水制剂一起温育以产生一种或多种预处理的细胞,去除所述预脱水制剂;以及在脱水制剂的存在下使所述一种或多种预处理的细胞脱水,以产生一种或多种基本干燥储存的细胞。

[0037] 在一个实施方案中,所述方法中使用的脱水制剂包含至少一种干燥储存稳定剂,并且在没有使用预脱水制剂时可进一步包含至少一种凋亡抑制剂(在一个实施方案中其为可逆凋亡抑制剂)。

[0038] 在另一个实施方案中,所述方法进一步包括在将一种或多种细胞与所述预脱水制剂一起温育之前将所述一种或多种细胞固定至固体支持体上。

[0039] 在又一个实施方案中,所述方法进一步包括采用包含至少一种凋亡抑制剂的再水化制剂将所述一种或多种基本干燥储存的细胞再水化,以产生再水化的细胞。

[0040] 在某些实施方案中,所述预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂与所述再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂相同,而在其他实施方案中,所述预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂与所述再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂不同。

附图说明

[0041] 图1是ER应激通路的三种近端ER跨膜传感器的示意图,(A) GRP78结合的失活状态,(B) GRP78的释放导致激活IRE1。

[0042] 图2是ER应激通路(A)、由凋亡抑制剂抑制的ER应激通路的阻断步骤和靶标(B)的示意图。

[0043] 图3示出了采用本文所述的制剂和方法基本干燥储存的间充质干细胞(MSC)保持在再水化时分化成脂肪细胞(B图)、骨细胞(C图)和软骨细胞(D图)的能力。

[0044] 图4示出了HeLa细胞在脱水和室温下储存5小时后的长期活力。(A)干燥5小时并随后进行五天的再水化后的细胞活力。(B)每毫升的活细胞数目。将细胞接种到新鲜的细胞培养板中,并采用根据本文公开的一个实施方案的组合物对各组进行处理。

[0045] 图5示出了相对于未处理的对照的胰天蛋白酶3/7活化。胰天蛋白酶活化计算为在标准组织培养条件下培养的测试样品中的活性与未处理的细胞的活性之比。使测试的细胞

脱水并在室温下干燥储存5小时,随后进行5天的再水化。

[0046] 图6示出了细胞在脱水、干燥状态储存7小时并且储存后再水化后的存活。在重新接种后3天以及再水化后共7天评价细胞活力。不同的稳定化制剂影响细胞存活以及细胞增殖。未受到保护的对照和海藻糖稳定化的细胞没有产生任何存活的细胞。

[0047] 发明详述

[0048] 不希望受任何理论的限制,预期本文所述的某些实施方案的制剂和组合物稳定化细胞膜和细胞的细胞器的完整性,同时还阻断凋亡(例如,通过在脱水前的限定阶段和在再水化时阻断特定ER应激通路),以提供在环境温度下储存至少一个小时的基本干燥的细胞,该基本干燥的细胞在被再水化至少一小时的时间段后保持至少一种功能性质。在某些实施方案中,采用凋亡抑制剂阻断特定ER应激通路。在其他实施方案中,采用凋亡抑制剂结合ER蛋白伴侣诱导剂来阻断特定ER应激通路,以驱使ER应激通路朝向适应性反应而非凋亡。

[0049] 在某些实施方案中,采用脱水制剂使细胞脱水,该脱水制剂优选地包含至少一种干燥储存稳定剂和至少一种凋亡抑制剂。

[0050] 在某些其他实施方案中,在将细胞在脱水制剂的存在下脱水以产生基本干燥储存的细胞之前,采用包含凋亡抑制剂的预脱水制剂预处理细胞预定的一段时间,例如1小时。将基本干燥储存的细胞在再水化制剂的存在下再水化,该再水化制剂优选地包含凋亡抑制剂,该凋亡抑制剂可与预脱水制剂中的凋亡抑制剂相同或不同。在特定的一段时间,例如1小时之后,去除再水化制剂,并且可根据预期的最终用途,将细胞在生长培养基或其他合适的溶液和缓冲液中再水化。

[0051] 定义

[0052] 除非另外定义,本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。本文引用的所有专利、专利申请和出版物均通过引用全文并入本文。

[0053] 如本文所用的,术语“真核细胞”是指在真核生物(优选人类)的真核细胞发育的任何给定阶段(包括受精的卵母细胞、母细胞以及其他胚胎阶段、胎儿或成人)的体液或组织中存在的至少一种有核细胞。可采用本发明的制剂、组合物和方法在环境温度下基本干燥储存的示例性细胞包括但不限于成纤维细胞、角质形成细胞、软骨细胞、黑素细胞、成骨细胞、骨细胞、肌细胞、心肌细胞、神经元、雪旺细胞、胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、T细胞、B细胞、记忆细胞、网织红细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、巨核细胞、树突细胞、脂肪细胞、胰岛细胞、卵母细胞、精母细胞、胎盘脐带血细胞、母细胞、合子、上皮细胞(例如,乳腺细胞、子宫内膜细胞、胰腺腺泡细胞、杯状细胞、朗格汉斯细胞、成釉细胞和帕内特细胞)、牙细胞(odontocytes)、肝细胞、脂细胞、壁细胞、肺细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、循环肿瘤细胞、视网膜光感受器和色素细胞、晶状体细胞以及干细胞(包括多能或全能胚胎干细胞、胎儿干细胞、iPS细胞和间充质干细胞)或其混合物。干细胞可以以未分化或部分分化状态在环境温度下基本干燥储存。

[0054] 如本文所用的,术语“预处理的细胞”是指在脱水之前已经用包含至少一种凋亡抑制剂的预脱水制剂处理过的细胞。预处理的细胞预先载有凋亡抑制剂,以允许采用含有或缺少凋亡抑制剂的脱水制剂在没有ER应激通路活化的情况下基本干燥储存预处理的细胞。在某些实施方案中,在添加脱水制剂之前,将包含凋亡抑制剂的预脱水制剂从预处理的细

胞中去除,但细胞内凋亡抑制剂的浓度足以在没有ER应激通路活化的情况下基本干燥储存细胞。

[0055] 如本文所用的,术语“在环境温度下基本干燥储存”或“在环境温度下基本干燥储存的”是指采用本发明的制剂、组合物和方法,在没有冷冻或冻干的情况下将细胞在环境温度下储存,同时使细胞在再水化状态下保持至少一种功能性质的能力。基本干燥储存的细胞不一定需要消除所有的内部自由水,但优选去除至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或最多98%的内部自由水。根据待干燥储存的细胞的类型、所使用的预脱水和/或脱水制剂以及基本干燥储存的细胞的预期用途,可将基本干燥储存的细胞在环境温度下储存不同的时间段。可将细胞以脱水状态储存以下的时间段:1) 数小时,例如,1、2、6、12或18小时;2) 数天,例如,1天、2天、4天或6天;3) 数周,例如,1周、2周或3周;4) 数月,例如,1个月、2个月、4个月、6个月、8个月或11个月;以及5) 甚至数年,例如,1年、2年、5年、10年、20年或更多年。

[0056] 如本文所用的,术语“固定的”是指粘附于固体表面或与固体表面直接接触的基本干燥储存的细胞。可将细胞在添加脱水制剂和干燥之前固定,或可在预脱水步骤之前固定并在整个脱水过程中保持固定。合适的固体表面包括但不限于:载玻片、珠子、芯片、膜、片、网、柱、亲和树脂、海绵、塑料(包括96孔板)、培养皿和烧瓶、管、容器、器皿、天然基质(诸如但不限于胶原和藻酸盐水凝胶)或细胞可以借其生长的任何其他基层。

[0057] 如本文所用的,“凋亡抑制剂”是指能够下调、减少、抑制或以其他方式调节所期望的酶的量和/或活性或通路(优选地在ER应激通路中的步骤)以防止诱导细胞凋亡的任何化合物或试剂,包括ER蛋白伴侣诱导剂、自噬诱导剂以及内源或外源性存活蛋白。对这些酶或通路的抑制可通过本领域已知的多种机制中的任何机制来实现,该机制包括但不限于:直接与酶结合(优选以可逆的方式),或者短暂地抑制编码酶或靶标的基因的表达(例如,转录成mRNA,翻译成新生多肽,和/或最终多肽修饰成成熟蛋白质)。凋亡抑制剂包括本文所述的具体的凋亡抑制剂。

[0058] 如本文所用的,术语“抑制”是指化合物或试剂下调、减少、降低、抑制、灭活或至少部分地抑制酶的活性或者酶或蛋白质的表达的能力。优选地,该抑制是可逆的。

[0059] ER应激通路

[0060] 在某些实施方案中,所述预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂,该凋亡抑制剂阻断ER应激通路中的至少一个必要步骤。

[0061] 如图1A所示,高等真核生物的未折叠蛋白质反应(UPR)信号传导通过三个近端ER跨膜传感器—PERK、激酶/RNA酶IRE1和转录因子ATF6来引发(例如,参见Kaufman RJ (2002) J Clin Invest 110:1389-1398.doi:10.1172/jci0216886;Mori K (2000) Cell 101:451-454.doi:10.1016/s0092-8674(00)80855-7;Ron D,Walter P (2007) Nat Rev Mol Cell Biol 8:519-529.doi:10.1038/nrm219)。PERK的活化通过eIF2 α (α 翻译起始因子)的磷酸化导致蛋白质翻译在整体范围内的抑制(图1B;Harding等人,(2000) Mol Cell 5:897-904.doi:10.1016/s1097-2765(00)80330-5)。与此相伴,PERK通过增加转录因子ATF4的翻译促进UPR特异性基因的转录。IRE1通过从XBP1 mRNA上切除内含子产生选择性剪接的更有效形式的XBP1(例如,参见Calton等人(2002) Nature 415:92-96.doi:10.1038/415092a)。第三UPR传感器—ATF6,是一种ER跨膜蛋白质,在其胞质侧上具有转录激活结构域。

[0062] 如图2A所示,在ER应激事件中,ATF6经历蛋白质水解,由此从ER膜释放其胞质反式激活结构域。一旦被释放,该胞质反式激活结构域即进入细胞核(Haze等人,(1999) *Mol Biol Cell* 10:3787-3799.doi:10.1091/mbc.10.11.3787)并启动另外的UPR基因的转录。由UPR引起的ER应激的近端传感器的活化导致复杂的基因调节模式。因此UPR信号旨在通过上调ER蛋白伴侣如BiP、GRP94、钙网蛋白和Erdj4提高蛋白质折叠能力来减轻和减少ER中高水平的错折叠蛋白质(例如,参见Okada等人,(2002) *Biochem J* 366:585-594.doi:10.1042/bj20020391;Yoshida等人,(1998) *J Biol Chem* 273:33741-33749.doi:10.1074/jbc.273.50.33741)。然而,在ER中的正确蛋白质折叠无法得到恢复的事件中,基因如CHOP被上调并可导致凋亡通路的激活。

[0063] 1.GRP78/BiP

[0064] GRP78/BiP是内质网完整性和应激诱导的自噬所需的分子蛋白伴侣HSP家族的成员。GRP78在调节未折叠蛋白质反应(UPR)中起核心作用,并且是真核细胞中自噬的专性组分,并可在细胞适应和致癌存活中发挥重要作用。GRP78的一种客户蛋白质是蛋白质双链RNA激活的蛋白样内质网激酶(PERK),并且其与PERK的结合阻止PERK寡聚。GRP78还与客户蛋白质IRE1和ATF6结合以防止IRE1的寡聚和ATF6的活化。GRP78在促进ER内部多聚体蛋白质复合物的组装中发挥作用。

[0065] 2.IRE1

[0066] 需要肌醇的酶1(IRE1)是一种具有核酸内切酶活性的ser/thr蛋白质激酶。IRE1在作为对基于内质网的应激信号的响应而改变基因表达方面是重要的,并且通过其N末端结构域感测内质网的网眼中的未折叠蛋白质,从而导致酶的自活化。活性的核糖核酸内切酶结构域对XBP1mRNA进行剪接以产生新的C末端,从而将其转化成有效的未折叠蛋白质反应转录激活因子并触发生长停滞和凋亡。激酶结构域通过反式自磷酸化而得到激活,并且激酶活性对于核糖核酸内切酶结构域的活化是必需的。IRE1被广泛表达且在胰腺组织中观察到其高水平。IRE1是二硫键连接的同二聚体,且二聚体形成由N末端腔结构域内的疏水作用驱动并通过二硫键而稳定化。IRE1还与HSPA5(未折叠蛋白质反应的负调节物)结合。该相互作用可破坏同二聚体化作用并阻止IRE1的激活。

[0067] 3.PERK

[0068] 真核生物翻译起始因子2- α 激酶3,也称为PRKR样内质网激酶或蛋白质激酶R(PKR)样内质网激酶(PERK),是一种在人类中由EIF2AK3基因编码的酶。PERK对真核生物翻译起始因子2(EIF2)的 α 亚基进行磷酸化,导致其失活,并由此导致翻译引发的快速减少和对总体蛋白质合成的抑制。它是位于内质网(ER)中的I型膜蛋白,在内质网中它通过由错折叠蛋白质导致的ER应激而得到诱导。

[0069] 4.ATF6

[0070] 这种基因编码在内质网(ER)应激过程中激活未折叠蛋白质反应(UPR)的靶基因的转录因子。虽然它是转录因子,但这种蛋白质是不常见的,因为它作为嵌入ER中的跨膜蛋白质而合成。它起到ER应激传感器/转导器的作用,并且在ER应激诱导的蛋白质水解后,它通过存在于编码ER蛋白伴侣的基因的启动子中的顺式作用ER应激应答元件(ERSE)而起到细胞核转录因子的作用。该蛋白质已经被鉴定为静止的而非增殖性鳞状癌细胞的存活因子。

[0071] 5.ASK1

[0072] 凋亡信号调节激酶1 (ASK1) 也称为丝裂原活化蛋白激酶5 (MAP3K5), 它是MAP激酶家族的成员, 并且同样是丝裂原活化蛋白激酶通路的一部分。ASK1直接将MKK4 (SEK1) /MKK7和MKK3/MKK6磷酸化, 这随之响应于一系列应激如氧化应激、内质网应激和钙流入, 以不依赖Raf的方式激活c-Jun N末端激酶 (JNK) 和p38丝裂原活化蛋白激酶。

[0073] 在无应激条件下, ASK1通过其C末端卷曲螺旋域 (CCC) 进行寡聚 (对于其活化是必需的), 但由于减少的硫氧还蛋白 (Trx) 和钙以及整合素结合蛋白1 (CIB1) 的抑制作用, 其仍保持为无活性形式。Trx通过直接与其N末端卷曲螺旋域 (NCC) 结合而抑制ASK1激酶活性。Trx和CIB1分别以氧化还原或钙敏感性方式调节ASK1活化。两者似乎都与TNF- α 受体相关因子2 (TRAF2) ——一种ASK1活化剂相竞争。然后, TRAF2和TRAF6被募集到ASK1, 以形成更大分子量的复合物 (参见图2A)。随后, ASK1不仅通过CCC, 还通过NCC来形成同寡聚相互作用, 这导致ASK1通过在苏氨酸845处的自磷酸化而完全活化。

[0074] 6. JNK

[0075] c-Jun-N末端激酶 (JNK1/2/3) 是在哺乳动物细胞中发现的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联的三个主要组之一的下游组分, 其中另外两个由细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 和p38蛋白激酶 (p38. α 、 β 、 γ 、 δ) 组成。每一组的激酶均为包括MAPK的三模块级联的一部分, 该MAPK通过由MAPK激酶 (MAPKK) 引起的磷酸化而得到激活, 该MAPK激酶随之通过由MAPKK激酶 (MAPKKK) 引起的磷酸化而得到激活。已将JNK和p38的活化与凋亡的诱导相联系。通过采用多种细胞类型, 证明了JNK的持续活化诱导细胞死亡, 并且证明通过显性阴性 (DN) 抑制剂对JNK活化的阻滞阻止了由一系列凋亡刺激导致的杀伤。通过对靶向破坏jnk基因的小鼠的分析也证明了JNK在凋亡中的作用。JNK1和JNK2均缺乏的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 对由多种应激刺激导致的凋亡具有完全的抗性, 该应激刺激包括基因毒物、UV辐射和茴香霉素, 并且jnk3-/-神经元在对兴奋毒素的凋亡反应中表现出严重的缺陷。而且, 已证明JNK2对于在未成熟胸腺细胞中的抗-CD3诱导的凋亡是必需的。

[0076] 7. p38MAP激酶

[0077] p38MAP激酶 (α 、 β 、 γ 和 δ) 是MAPK家族的成员, 并且以下四种p38MAPK均已经在高等真核生物中进行克隆: p38- α /XMpk2/CSBP、p38- β /p38- β 22、p38- γ /SAPK3/ERK6和p38- δ /SAPK4。这四种蛋白质在其氨基酸序列上有60-70%相同, 并且均被MKK6 (MAPK激酶-6) 激活。已证明另一种MAPK激酶—MKK3 (MAPK激酶-3) 将p38- α 、p38- γ 和p38- δ (而非p38- β 2) 磷酸化并激活。哺乳动物p38MAPK家族通过细胞应激而激活, 该细胞应激包括UV辐射、热激和高渗透应激。

[0078] 由于越来越多的转录因子被认为是p38的直接靶标, 因此p38MAP激酶的活化还可直接影响基因转录。已经描述了ATF1、ATF2和ATF-6、MEF2A/C (肌细胞增强因子-2A/C)、SAP1A (信号传导淋巴细胞活化分子相关蛋白-1A) 以及E1k1 (ETS域转录因子-1) 的直接磷酸化和活化。

[0079] 8. MEK

[0080] “MEK1”和“MEK2”是丝裂原活化的ERK活化激酶的缩写 (其中ERK是细胞外信号调节蛋白激酶, MAPK的另一个名称)。MEK1和MEK2是双功能的丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸蛋白激酶, 并且也被称为MAP激酶。Ras-GTP激活Raf, Raf激活MEK1和MEK2, 而MEK1和MEK2激活MAP激酶 (MAPK)。一旦被激活, Raf和其他激酶将两个相邻的丝氨酸残基 (在MEK-1的情况下为S²¹⁸和

S²²²) 上的MEK磷酸化。这些磷酸化对于MEK活化为激酶是必需的。随之,MEK将在由单个氨基酸分开的两个残基上的MAP激酶磷酸化,该单个氨基酸为:酪氨酸(Y¹⁸⁵)和苏氨酸(T¹⁸³)。在将MAP激酶磷酸化之前,MEK似乎与MAP激酶紧密关联,表明MEK对MAP激酶的磷酸化可能需要两种蛋白质之间预先的强相互作用。

[0081] 9.PI3K-Akt通路

[0082] 磷脂酰肌醇3'-激酶(PI3K)-Akt信号传导通路被多种类型的细胞刺激或毒性损伤激活,并且调节基本的细胞功能如转录、翻译、增殖、生长和存活。生长因子与其受体酪氨酸激酶(RTK)或G蛋白偶联受体(GPCR)的结合分别刺激Ia和Ib类PI3K同种型。PI3K催化磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)在细胞膜处的产生。PIP3转而作为帮助激活Akt的第二信使。一旦成为活性的,Akt可通过使参与凋亡、蛋白质合成、代谢和细胞循环的底物磷酸化来控制关键的细胞过程。

[0083] 10.XBP-1

[0084] 该基因编码通过与被称为X盒的启动子元件结合而调节MHC II类基因的转录因子。该基因产物为bZIP蛋白,其也被鉴定为与T细胞白血病病毒I型启动子的启动子中的增强子结合的细胞转录因子。已经发现,未折叠蛋白质在内质网(ER)中积累时,该基因的mRNA通过经由核酸内切酶肌醇需求酶1(IRE1)介导的非常规剪接机制被加工成活性形式。所产生的来自剪接的mRNA的26nt的损失导致移码和同种型XBP1(S),该同种型XBP1(S)是功能活性转录因子。由未剪接的mRNA编码的同种型—XBP1(U)是组成型表达的,并且被认为起到XBP1(S)的负反馈调节物的作用,其关闭靶基因在ER应激的恢复阶段中的转录。XBP1的假基因已被鉴别出且位于5号染色体。

[0085] 11.eIF2- α

[0086] eIF2- α 是翻译起始因子,其通过与GTP和起始因子tRNA形成三元复合物而在蛋白质合成的早期步骤中起作用。该复合物与40S核糖体亚基结合,随后与mRNA结合形成43S起始前复合物。连接60S核糖体亚基以形成80S起始复合物之前,将与eIF-2结合的GTP水解并释放eIF-2-GDP二元复合物。为了eIF-2再循环并催化另一轮的引发,与eIF-2结合的GDP必须以经由eIF-2B催化的反应的方式与GTP交换。eIF2- α 被PERK、GCN2、HRI和PKR等至少4种激酶被磷酸化,并且磷酸化使eIF-2/GDP/eIF-2B复合物稳定化并阻止GDP/GTP交换反应,由此减少eIF-2在连续数轮引发之间的再循环并导致翻译的全面抑制。

[0087] 12.GSK3

[0088] 糖原合成酶激酶-3(GSK3)最初被鉴定为参与糖原代谢的控制的酶。近年来已经证明它在调节各种不同的细胞功能中具有关键作用,这些细胞功能包括蛋白质合成的引发、细胞增殖、细胞分化、凋亡,并且其作为Wnt信号传导级联的组分是胚胎发育所必需的。GSK3作为胰岛素信号传导通路中的核心负调节物且在胰岛素抗性中发挥作用。

[0089] 13.NRF2

[0090] 核因子(红系衍生2)样2也被称为NFE2L2或NRF2,是在人类中由NFE2L2基因所编码的转录因子。NRF2抗氧化反应通路是针对氧化应激的细胞毒性效应的主要细胞防御。NRF2增加了若干种抗氧化酶的表达。

[0091] NRF2是碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子。在正常或未应激的条件下,NRF2通过Kelch样-ECH-相关蛋白1(KEAP1)和滞蛋白3(Cullin 3)(其通过泛素化降解NRF2)保持在细

胞质中。在氧化应激下，NRF2不被降解，而是转移到细胞核中，在那里它引发抗氧化基因及其蛋白质的转录。

[0092] 14. KEAP1

[0093] 已经证明Ke1ch样ECH相关蛋白1 (KEAP1) 与NRF2 (抗氧化反应的主要调节物) 相互作用。在静态下，NRF2通过与KEAP1结合而锚定在细胞质中，KEAP1转而促进泛素化和随后的NRF2蛋白质水解。这种结合和NRF2在细胞质中的进一步降解是KEAP1对NRF2的抑制效应的机制。

[0094] 15. ATF4

[0095] 激活转录因子4 (tax-响应性增强子元件B67) 也称为ATF4，是人类中由ATF4基因编码的蛋白质。该基因编码最初被鉴定为广泛表达的哺乳动物DNA结合蛋白的转录因子，该DNA结合蛋白可以结合HTLV-1的LTR中的tax-响应性增强子元件。编码的蛋白质还被分离并被称为cAMP反应元件结合蛋白2 (CREB-2)。由该基因编码的蛋白质属于DNA结合蛋白家族，该家族包括转录因子的AP-1家族、cAMP反应元件结合蛋白 (CREB) 和CREB样蛋白。这些转录因子共享蛋白质-蛋白质相互作用中涉及的亮氨酸拉链区，该亮氨酸拉链区位于充当DNA结合域的一段碱性氨基酸的C末端。已描述了编码相同蛋白质的两个替代转录物。两个假基因位于X染色体上含有较大反向重复的区域中的q28处。

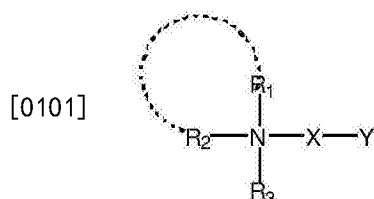
[0096] 干燥储存稳定剂

[0097] 1. 天然和合成的氨基酸

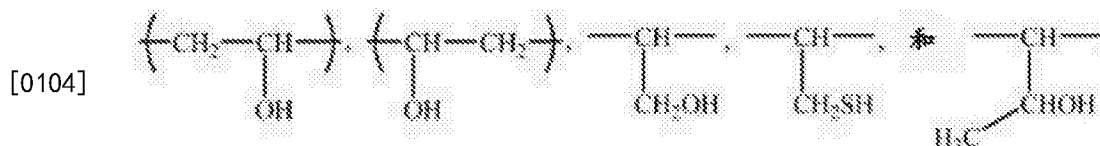
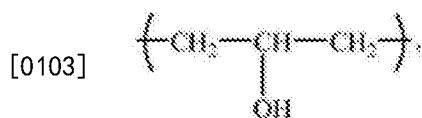
[0098] 同样如本文所述的，某些实施方案中脱水制剂可在用于将功能性细胞在环境温度下基本干燥储存的脱水制剂中包含至少一种氨基酸或合成氨基酸。

[0099] 在某些实施方案中，该天然氨基酸选自甘氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和脯氨酸。

[0100] 在某些其他实施方案中，该脱水制剂和组合物可含有一种或多种具有通式I的合成氨基酸，



[0102] 其中R₁、R₂、R₃独立地选自芳基、芳烷基、-H、-CH₃和-CH₂-CH₃，其中当R₁和R₂为CH₃或CH₂-CH₃时，R₃为H或不存在，其中X选自-CH₂-，-CH₂CH₂-，-CH₂CH₂CH₂-，-CH₂CH₂CH₂CH₂-，



[0105] 并且其中Y选自COO和SO₃。

[0106] 在所述组合物中有用的示例性合成氨基酸包括在W02010132508和美国专利8,519,125中描述的那些，这些文献的内容通过引用全文并入本文。可在本发明组合物中采用

的合成氨基酸包括羟脯氨酸和甜菜碱(N,N,N-三甲基甘氨酸)。

[0107] 2. 肽

[0108] 在某些实施方案中,本文所述的用于将细胞在环境温度下基本干燥储存的脱水制剂可含有肽。有利的是,已确定包含稳定量(例如,约10mM到200mM)的小二肽或二肽类似物的某些脱水制剂(包括表1中列出的那些)出乎意料地能够将细胞在环境温度下基本干燥储存,并且储存持续超过这些细胞的冷藏的时间段。示例性的二肽具有氨基酸序列丙氨酸-谷氨酰胺。

[0109] 3. 三糖

[0110] 如本文所述,本文所述的某些实施方案中,所述制剂可在用于将细胞在环境温度下基本干燥储存的脱水制剂或组合物中包含至少一种三糖。三糖是由两个糖苷键连接的三个单糖组成的寡糖。糖苷键可在组分单糖上的任意羟基基团之间形成,且不同的键组合(区域选择性)和立体化学(α -或 β -)产生三糖,该三糖为具有不同的化学和物理性质的非对映异构体。可基于本公开内容并根据本领域的常规实践来完成稳定储存组合物中所包含的一种或多种特定三糖的选择,并且该选择可受到包括其他制剂组分在内的多个因素的影响。示例性的三糖包括但不限于麦芽三糖、异麦芽三糖、棉子糖、松三糖(melezitriose)、黑曲霉三糖和酮糖。在用于细胞的基本干燥储存的某些实施方案(包括表1中列出的制剂)中,该三糖是松三糖并且优选浓度为约1%-20%,更优选约5.0-15%,其中“约”可理解为表示量的变化,该量的变化可以是比所述量高或低少于25%,更优选少于20%,且更优选少于15%、10%、5%或1%。

[0111] 4. 水溶性聚合物

[0112] 如本文所述,某些实施方案可在用于全血样品中核酸和/或多肽分子的基本稳定储存的制剂和组合物中包含至少一种水溶性聚合物。这样的水溶性聚合物包括聚乙烯吡咯烷和聚乙烯醇,并且可以理解,技术人员根据本公开内容可选择用于基本干燥储存的制剂和组合物的其他水溶性聚合物,因为其可基于所采用的组合物的其他组分和被储存的特定细胞类型而变化。某些实施方案(包括但不限于在表1中所示的那些)预期包含浓度(基于体积,即vol/vol)为约0.1-10%(vol/vol),更优选约0.1-5%(vol/vol),且更优选1.0%(vol/vol)的水溶性聚合物,其中“约”可理解为表示量的变化,该量的变化可以是比所述量高或低少于50%,更优选少于40%,更优选少于30%,且更优选少于20%、15%、10%或5%。在某些实施方案中,该水溶性聚合物为分子量范围为约30-70,000道尔顿且约87-90%水解的聚乙烯醇,其中“约”可理解为表示量的变化,该量的变化可以是比所述量高或低少于50%,更优选少于40%,更优选少于30%,且更优选少于20%、15%、10%或5%。

[0113] 5. 非还原糖

[0114] 同样如本文所述,某些实施方案可在环境温度下的预脱水和/或脱水制剂以及组合物中包含至少一种非还原糖。非还原糖为缺少功能性醛基的糖分子。示例性的非还原糖包括蔗糖和海藻糖。在用于细胞的基本干燥储存的实施方案中,该非还原糖为以约1.0-200mM,优选约50mM-200mM,且更优选约150mM的浓度存在的海藻糖,其中“约”可理解为表示量的变化,该量的变化可以是比所述量高或低少于25%,更优选少于20%,且更优选少于15%、10%、5%或1%。

[0115] 6. 聚醚

[0116] 根据某些实施方案,聚醚可包含在本文所述的用于将功能性细胞在环境温度下基本稳定储存的脱水制剂中。聚醚通常是指在其主链中含有多于一个醚官能团的聚合物。聚醚是通过醇脱水形成的相对稳定的化合物。用于在所述制剂、组合物和方法中使用的示例性的聚醚包括但不限于聚乙二醇、聚丙二醇和聚苯醚。在某些实施方案中,聚醚的分子量为约5,000到15,000道尔顿。

[0117] 7. 四氢嘧啶

[0118] 在某些实施方案中,所述干燥储存稳定剂是四氢嘧啶。示例性的四氢嘧啶为5-羟基四氢嘧啶(5-hydroxyectoine)。在某些脱水制剂和组合物中,使用约10mM到约200mM浓度的5-羟基四氢嘧啶。

[0119] 制剂试剂

[0120] 1. pH缓冲液

[0121] 根据某些实施方案,本文所述的、用于将功能性细胞在环境温度下基本干燥储存的脱水制剂和组合物可包含一种或多种pH缓冲液,该pH缓冲液可以是由于其抵抗溶液(如pH缓冲液存在于其中的水溶液)的pH变化的能力而被本领域所知的大量化合物中的任意化合物。可基于本公开内容并根据本领域中的常规实践来完成包含在稳定储存组合物中的一种或多种特定pH缓冲液的选择,并且该选择可受到多种因素的影响,该因素包括期望维持的pH、生物样品的性质、将要采用的溶剂条件、将要使用的制剂的其他组分以及其他标准。例如,通常使用在质子解离常数(pK_a)为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0pH单位内的pH下的pH缓冲液,质子解离常数是缓冲液的特征。

[0122] pH缓冲液的非限制性实例包括柠檬酸、酒石酸、苹果酸、磺基水杨酸、磺基间苯二甲酸、草酸、硼酸盐、CAPS(3-(环己基氨基)-1-丙磺酸)、CAPSO(3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸)、EPPS(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪丙磺酸)、HEPES(4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙磺酸)、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉基)丙磺酸)、MOPSO(3-吗啉基-2-羟基丙磺酸)、PIPES(1,4-哌嗪二乙磺酸)、TAPS(N-[三(羟基甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸)、TAPSO(2-羟基-3-[三(羟基甲基)甲基氨基]-1-丙磺酸)、TES(N-[三(羟基甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸)、bicine(N,N-双(2-羟基乙基)甘氨酸)、tricine(N-[三(羟基甲基)甲基]甘氨酸)、三(三(羟基甲基)氨基甲烷)和双-三(2-[双(2-羟基乙基)氨基]-2-(羟基甲基)-1,3-丙二醇)。本文中涉及的某些实施方案(包括表X中列出的那些中的多个)可以以pH为约4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9或9.0的制剂为特征,其中“约”可理解为表示量的变化,该量的变化可以是比所述pH值高或低少于1,优选少于0.5,优选少于0.25,且更优选少于0.1个pH单位。

[0123] 2. 螯合剂

[0124] 根据某些实施方案,螯合剂(Chelating agent)或螯合剂(Chelator)可包含在本文所述的、用于血液样品中的完整活细胞的基本稳定储存的组合物中,并且由于其与金属阳离子复合并阻碍金属阳离子的反应性的能力而被熟悉本领域的技术人员所知。示例性的螯合剂包括二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、反式-1,2-二氨基环己烷-N,N,N',N'-四乙酸(CDTA)、1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四

乙酸 (BAPTA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)、N-(2-羟基乙基) 乙二胺-N,N',N'-三乙酸、葡萄糖酸钠和次氨基三乙酸 (NTA)。一种螯合剂是葡萄糖酸钠并且以约1.0-50mM,更优选约10-40mM,且更优选约25mM的浓度存在,其中“约”可理解为表示量的变化,该量的变化可以是比所述量高或低少于25%,更优选少于20%,且更优选少于15%、10%、5%或1%。

[0125] 表1

[0126] 用于将功能性细胞在环境温度下基本干燥储存的示例性脱水制剂

[0127]

MCS1	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, pH 7.5
MCS2	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, pH 7.25
MCS3	10mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M MLS-0315763.002 pH 7.4
MCS4	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 7.2

[0128]

MCS5	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001 pH 7.2
MCS6	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 7.2
MCS7	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 7.3
MCS8	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 100 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M 胱天蛋白酶-1 抑制剂 II pH 7.3
MCS9	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 100 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M Q-VD-Oph, pH 7.3
MCS10	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% PVA, 10 %蔗糖, 6%松三糖
MCS11	50 mM Tris-HCl (pH 8), 1% PVA, 10 %蔗糖, 6%松三糖, 30 μ M salubrinal
MCS12	50 mM Tris-HCl (pH 8), 1% PVA, 10 %蔗糖, 6%松三糖, 30 μ M salubrinal, 5 μ M 熊果苷
MCS13	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 100 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, 5 μ M 熊果苷, pH 7.3
MCS14	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 150 mM 海藻糖, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 7.3
MCS15	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2% HES, 100 mM 海藻糖, 5 mM KCl, 60 mM NaCl, 30 μ M salubrinal, pH 7.26
MCS16	10 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 6.9
MCS17	50 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 6.8
MCS18	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 6.8
MCS19	10 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA

[0129]

MCS20	50 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA
MCS21	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA
MCS22	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 6.8
MCS23	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M MLS-0315763.002 (22.5 μ M 总 DMSO), pH 6.8
MCS24	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 6.8
MCS25	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 6.75
MCS26	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 6.8
MCS27	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 100 mM 海藻糖, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 6.8
MCS28	200 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 6.8
MCS29	200 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M MLS-0315763.002 (22.5 μ M 总 DMSO), pH 6.86
MCS30	200 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 6.9
MCS31	200 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 7.05
MCS32	200 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 7.0
MCS33	200 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5),

[0130]

	1% PVA, 30 μ M salubrinal , pH 6.8
MCS34	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 100 mM 海藻糖, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 6.9
MCS35	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 6.9
MCS36	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 100 mM 海藻糖, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 7.08
MCS37	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 100 mM 海藻糖, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 6.86
MCS38	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM L-脯氨酸, 1% PVA, pH 6.95
MCS39	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 反式-4-羟基-L-脯氨酸, 1% PVA, pH 6.85
MCS40	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 甘氨酸, 1% PVA, pH 6.96
MCS41	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 脯氨酸, 1% PVA, pH 6.8
MCS42	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 反式-4-羟基 L-脯氨酸, 1% PVA, pH 6.8
MCS43	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 甘氨酸, 1% PVA, pH 6.8
MCS44	100 mM L-谷氨酰胺, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 6.85
MCS45	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M TDCA, pH 6.7
MCS46	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M TDCA, ,pH 6.83
MCS47	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M TDCA, pH 7.03

[0131]

MCS48	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M TDCA, pH 7.03
MCS49	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M 胰天蛋白酶-1 抑制剂 II, pH 7.06
MCS50	100 mM L-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M Q-VD-Oph, pH 7.0
MCS51	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 μ M salubrinal, 1% PVA
MCS52	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M 胰天蛋白酶-1 抑制剂 II
MCS53	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 μ M Q-VD-Oph, 1% PVA
MCS54	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM 海藻糖, 30 μ M Q-VD-Oph, 1% PVA
MCS55	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 5 mM 甜菜碱, pH 6.8
MCS56	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA
MCS57	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 100 mM 羟基四氢嘧啶, 1% PVA, pH 7.0
MCS58	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 65 mM NaCl, 100 mM 羟基四氢嘧啶, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 6.93
MCS59	50 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 7.15
MCS60	100 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 7.2
MCS61	200 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 7.12
MCS62	100 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH

[0132]

	7.5), 1% HES, pH 7.14
MCS63	100 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% HES, 1% PVA, pH 7.06
MCS64	50 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 羟基脯氨酸, 1% PVA, pH 7.09
MCS65	50 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 甜菜碱, 1% PVA, pH 6.94
MCS66	100 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 7.12
MCS67	50 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM 谷胱甘肽, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 6.93
MCS68	50 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM L-谷氨酰胺, 1% PVA, pH 7.2
MCS69	50 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM L-谷氨酰胺, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 7.0
MCS70	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 50 mM NaCl, 100 mM 海藻糖, 50 mM 羟基四氢嘧啶, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 7.12
MCS71	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 50 mM NaCl, 100 mM 海藻糖, 50 mM 羟基四氢嘧啶, 1% PVA, pH 7.07
MCS72	50 mM 羟基四氢嘧啶, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM ALA-GLN, 1% PVA, pH 6.96
MCS73	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 6.8
MCS74	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% HES, pH 6.8
MCS75	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 50 mM 海藻糖, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, pH 7.18
MCS76	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 6.8

[0133]

MCS77	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M TDCA, pH 6.8
MCS78	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M MLS-0315763.002, pH 6.8
MCS79	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 6.8
MCS80	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 6.8
MCS81	100 mM 谷胱甘肽, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA, 30 μ M BIM-0306464.0001, pH 6.8
MCS82	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 50 mM NaCl, 100 mM 海藻糖, 50 mM 谷氨酰胺, 1% PVA, pH 7.3
MCS83	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 50 mM NaCl, 100 mM 海藻糖, 50 mM 谷氨酰胺, 1% PVA, 30 μ M salubrinal, pH 7.3
MCS84	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 50 mM NaCl, 100 mM 羟基四氢嘧啶, 50 mM 谷氨酰胺, 1% PVA, pH 7.3
MCS85	10 mM HEPES, 5 mM KCl, 50 mM NaCl, 100 mM 羟基四氢嘧啶, 50 mM 谷氨酰胺, 1% PVA, pH 7.3
MCS86	100 mM 谷氨酸, 5 mM EDTA, 10 mM NH ₄ Cl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA
MCS87	5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% PVA
MCS88	100 mM Ala-谷氨酰胺, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% PVA
MCS89	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PVA
MCS90	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA
MCS91	100 mM 甜菜碱 5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5

[0134]

	mM EDTA, 1% PVA
MCS92	100 mM Ala-谷氨酰胺, 50 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% PVA
MCS93	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM 脯氨酸, 10 mM HEPES (pH 7.5) 5 mM EDTA, 1% PVA
MCS94	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% HES
MCS95	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% PEO
MCS96	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA 1% PEG-8000
MCS97	100 mM Ala-谷氨酰胺, 5 mM 脯氨酸, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA 1% PVP-10
MCS100	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), pH 6.8
MCS101	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PEG8000, 1% HES, 1% PVA, 1% PEO, 1% PVP-10, pH 6.8
MCS102	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% PEG8000, 100 mM 甜菜碱, 5mM EDTA, 1% PVP-10, pH 8
MCS103	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% HES, 10 mM 脯氨酸, 1% PEO, pH 8
MCS104	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% PVA, 100 mM 甜菜碱, 10 mM 脯氨酸, 1% PEO, 1% PVP-10, pH 6.8
MCS105	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM 甜菜碱, 10 mM 脯氨酸, 1% PVA, 1% HES, 1% PEG8000, pH 8
MCS106	100 mM Ala-谷氨酰胺, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM 甜菜碱, 10 mM 脯氨酸, 1% PEO, 1% PVP-10, pH 6.8
MCS107	100 mM Ala-谷氨酰胺, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM 甜菜碱, 5 mM EDTA, 1% PVA, 1% HES, pH 6.8
MCS108	100 mM Ala-谷氨酰胺, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM

[0135]

	EDTA, 1% PVA, 1% PEO, 1% PEG8000, pH 8
MCS109	100 mM Ala-谷氨酰胺, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM 甜菜碱, 10 mM 脯氨酸, 1% PEO, 1% PEG8000, pH 6.8
MCS110	100 mM Ala-谷氨酰胺, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 脯氨酸, 1% PVA, 1% PVP-10, pH 8
MCS111	10 mM Ala-谷氨酰胺, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% HES, 10 mM 脯氨酸, 1% PEG8000, 1% PVP-10, pH 6.8
MCS112	10 mM ALA-GLN, 10 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, pH6
MCS113	10 mM ALA-GLN, 80 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.25 mM EDTA, 0.75% PVA, 0.75% HES, pH7
MCS114	10 mM ALA-GLN, 150 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5 mM EDTA, 1.5% PVA, 1.5% HES, pH8
MCS115	80 mM ALA-GLN, 10 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.25 mM EDTA, 0.75% PVA, 1.5% HES, pH6
MCS116	80 mM ALA-GLN, 80 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5 mM EDTA, 1.5% PVA, pH7
MCS117	80 mM ALA-GLN, 150 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.75% HES, pH8
MCS118	150 mM ALA-GLN, 10 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1.5% PVA, 0.75% HES, pH7
MCS119	150 mM ALA-GLN, 80 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.25 mM EDTA, 1.5% HES, pH8
MCS120	150 mM ALA-GLN, 150 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5 mM EDTA, 0.75% PVA, pH6
MCS121	10 mM ALA-GLN, 10 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5 mM EDTA, 0.75% PVA, 0.75% HES, pH8
MCS122	10 mM ALA-GLN, 80 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5),

[0136]

	1 mM EDTA, 1.5% PVA, 1.5% HES, pH6
MCS123	10 mM ALA-GLN, 150 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.25 mM EDTA, pH7
MCS124	80 mM ALA-GLN, 10 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5 mM EDTA, 1.5% HES, pH7
MCS125	80 mM ALA-GLN, 80 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.75% PVA, pH8
MCS126	80 mM ALA-GLN, 150 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.25 mM EDTA, 1.5% PVA, 0.75% HES, pH6
MCS127	150 mM ALA-GLN, 10 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.25 mM EDTA, 1.5% PVA, pH8
MCS128	150 mM ALA-GLN, 80 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5 mM EDTA, 0.75% HES, pH6
MCS129	150 mM ALA-GLN, 150 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.75% PVA, 1.5% HES, pH7
MCS130	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), pH 6
MCS131	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), pH 8
MCS132	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜 碱, pH 6
MCS133	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜 碱 pH 8
MCS134	150 mM ALA-GLN, 10 mM TrisHCl, pH 6.0
MCS136	150 mM 甜菜碱, 10 mM TrisHCl, pH 6.0
MCS137	150 mM 甜菜碱, 10 mM TrisHCl, pH 8.0
MCS138	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% PVA, pH 6.0
MCS139	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% PVA, pH 8.0
MCS140	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜 碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS141	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜

[0137]

	碱, 1.5% PVA, pH 8
MCS142	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% PVA, pH 6
MCS143	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% PVA, pH 8
MCS144	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS145	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 8
MCS146	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% HES, pH 6.0
MCS147	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% HES, pH 8.0
MCS148	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 1.5% HES, pH 6
MCS149	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 1.5% HES, pH 8
MCS150	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% PVA, pH 6
MCS151	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5% PVA, pH 8
MCS152	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS153	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 8
MCS154	300 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3% HES pH 8
MCS155	82.5 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM 甜菜碱, 0.15% PVA, pH 6
MCS156	82.5 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 0.15% PVA, pH 6
MCS157	82.5 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS158	82.5 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS159	15 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM 甜菜碱,

[0138]

	0.825% PVA, pH 6
MCS160	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM 甜菜碱, 0.825% PVA, pH 6
MCS161	15 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 0.825% PVA, pH 6
MCS162	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 0.825% PVA, pH 6
MCS163	15 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 82.5 mM 甜菜碱, 0.15% PVA, pH 6
MCS164	15 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 82.5 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS165	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 82.5 mM 甜菜碱, 0.15% PVA, pH 6
MCS166	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 82.5 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS167	82.5 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 82.5 mM 甜菜碱, 0.825% PVA, pH 6
MCS168	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, 0.15% PVA, pH 6
MCS169	15 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM 甜菜碱, 1.5% PVA, pH 6
MCS170	150 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM 甜菜碱, pH 6
MCS171	150 mM ALA-GLN, 10 mM Bis-Tris-HCl, 150 mM 甜菜碱, pH 6
MCS172	150 mM ALA-GLN, 10 mM MES, 150 mM 甜菜碱, pH 6
MCS173	300 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), pH 6
MCS174	300 mM ALA-GLN, 10 mM Bis-Tris-HCl, pH 6
MCS175	300 mM ALA-GLN, 10 mM MES, pH 6

[0139]

MCS176	300 mM 甜菜碱, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), pH 6
MCS177	300 mM 甜菜碱, 10 mM Bis-Tris-HCl, pH 6
MCS178	300 mM 甜菜碱, 10 mM MES, pH 6
MCS179	300 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM 甜菜碱, pH 6
MCS180	300 mM ALA-GLN, 10 mM Bis-Tris-HCl, 300 mM 甜菜碱, pH 6
MCS181	300 mM ALA-GLN, 10 mM MES, 300 mM 甜菜碱, pH 6
MCS182	450 mM ALA-GLN, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 450 mM 甜菜碱, pH 6
MCS183	450 mM ALA-GLN, 10 mM Bis-Tris-HCl, 450 mM 甜菜碱, pH 6
MCS184	450 mM ALA-GLN, 10 mM MES, 450 mM 甜菜碱, pH 6
MCS185	10 mM TrisHCl, 1% PVA, pH 6.0
MCS186	75 mM ALA-GLN, 75 mM 甜菜碱, 10 mM TrisHCl, pH 6.0
MCS187	75 mM ALA-GLN, 10 mM TrisHCl, 0.5% PVA pH 6.0
MCS188	75 mM 甜菜碱, 10 mM TrisHCl, 0.5% PVA
MCS189	50 mM ALA-GLN, 50 mM 甜菜碱, 10 mM TrisHCl, 0.33% PVA, pH 6.0
MCS190	150 mM ALA-GLN, 10 mM Bis-Tris, pH 6.0
MCS191	150 mM 甜菜碱, pH 6.0
MCS192	10 mM Bis-Tris, 1% PVA, pH 6.0
MCS193	75 mM ALA-GLN, 75 mM 甜菜碱, 10 mM Bis-Tris, pH 6.0
MCS194	75 mM ALA-GLN, 10 mM Bis-Tris, 0.5 % PVA, pH 6.0
MCS195	75 mM 甜菜碱, 10 mM Bis-Tris, 0.5% PVA, pH 6.0
MCS196	50 mM ALA-GLN, 50 mM 甜菜碱, 10 mM Bis-Tris, 0.33% PVA, pH 6.0
MCS197	150 mM ALA-GLN, 10 mM MES, pH 6.0
MCS198	150 mM 甜菜碱, 10 mM MES, pH 6.0

[0140]	MCS199	10 mM MES, 1% PVA, pH 6.0
	MCS200	75 mM ALA-GLN, 75 mM 甜菜碱, 10 mM MES, pH 6.0
	MCS201	75 mM ALA-GLN, 10 mM MES, 0.5% PVA, pH 6.0
	MCS202	75 mM 甜菜碱, 10 mM Mes, 0.5% PVA, pH 6.0
	MCS203	50 mM ALA-GLN, 50 mM 甜菜碱, 10 mM MES, 0.33% PVA, pH 6.0

[0141] 脱水过程

[0142] 本发明的MCS脱水制剂能够在存在或不存在采用预脱水制剂的先前处理的情况下,在脱水过程中维持细胞膜和细胞器的完整性以及细胞的总体形态,以使得细胞在基本干燥储存后再水化时,细胞保持至少一种如脱水之前的细胞的功能性质,例如,细胞活力。

[0143] 例如,可通过简单的目测来确定脱水细胞的干燥,以确保所有水分均已蒸发或去除。在一些实施方案中,可优选地包括水分指示物,以确定已经实现的干燥程度。将细胞基本干燥的时间可根据MCS脱水制剂中存在的试剂而变化。根据制剂组分和细胞所固定的器皿的几何形状,细胞最适宜在约一到三小时的时间段内脱水。细胞在约32℃-39℃的温度范围内,优选在约37℃下脱水,并可在培养箱中或在采用控制温度、氧气水平和相对湿度的环境室的更加受控的条件下脱水。通过调节相对湿度可调节脱水的速率。例如,在包含水溶性聚合物(例如,PVA)的MCS制剂中脱水的细胞将花费更长的时间来脱水,所以可降低相对湿度以有利于优化脱水时间。另外,多种干细胞的基本干燥储存在5%的氧气浓度下进行,以确保细胞维持在基本在免疫学上未分化的状态。

[0144] 可采用在细胞上方保持活跃的空气流动同时控制温度和湿度的其他脱水方法。

[0145] 可采用可气密密封的罩或袋来储存基本干燥的细胞,以使得内容物可被密封以在与用于细胞脱水的条件相似的气候条件下储存。基本干燥储存的细胞最适宜在恒温如室温下储存。

[0146] 凋亡抑制剂

[0147] 在某些实施方案中,本文所述的预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂。在某些实施方案中,该至少一种凋亡抑制剂阻断细胞凋亡的诱导。在其他实施方案中,该凋亡抑制剂阻断ER应激通路中的至少一个步骤,且优选为可逆抑制剂。

[0148] 在某些实施方案中,所述脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂。在其他实施方案中,所述预脱水制剂或再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂,并且在其他实施方案中,所述预脱水制剂和再水化制剂各自包含至少一种凋亡抑制剂。在预脱水制剂和再水化制剂中存在的至少一种凋亡抑制剂可以是相同的或可以是不同的。在某些其他实施方案中,所述预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂包含至少两种凋亡抑制剂。

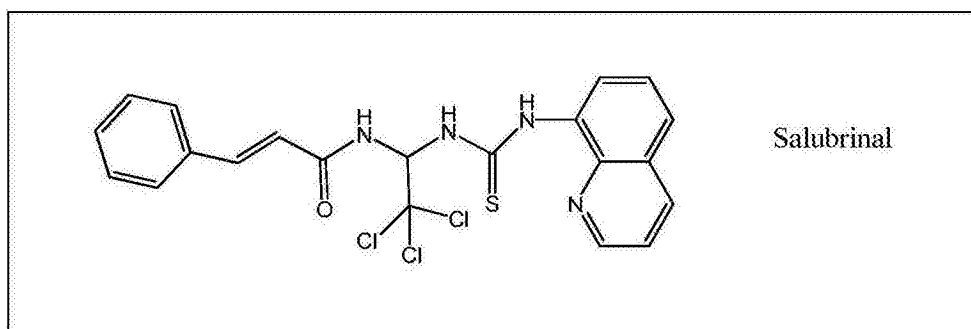
[0149] 凋亡抑制剂(包括本文所举例的那些)通常可通过多个商业制造商和供应商(包括但不限于Calbiochem、SelleckChem、Sigma-Aldrich、EMD Millipore、LCLabs和medchemexpress)商购获得,或可采用已知的方法(包括本文公开的那些方法)合成。每种凋亡抑制剂的最佳浓度可通过滴定在预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂中的凋亡抑制剂的量来确定,这完全在本领域技术人员的技能范围内。

[0150] 示例性的凋亡抑制剂包括：

[0151] 1. PERK-eIF2- α 抑制剂

[0152] 在某些实施方案中，所述至少一种凋亡抑制剂阻断PERK-eIF2- α 通路。示例性的PERK-eIF2- α 通路抑制剂是salubrinal、Sal-003 (3-苯基-N-[2,2,2-三氯-1-[(4-氯苯基)硫代氨基甲酰氨基]乙基]丙-2-烯酰胺)、GSK 2606414 (7-甲基-5-(1-{[3-(三氟甲基)苯基]乙酰基}-2,3-二氢-1H-吡啶-5-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺)、GSK 2656157 (1-(5-(4-氨基-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)-4-氟吡啶-1-基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙酮)和ISRIB(反式-N,N'-(环己烷-1,4-二基)双(2-(4-氯苯氧基)乙酰胺))。

[0153]



[0154] Salubrinal是eIF2- α 磷酸酶的特异性抑制剂。Salubrinal间接地抑制eIF2,这是由于其 α -亚基的减少的脱磷酸化导致通常由诸如氧化应激或内质网中未折叠蛋白质的积累等事件所触发的应激响应通路的激活。

[0155] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些实施方案中,可以将salubrinal以约1nM到约2.0 μ M的浓度范围,优选约1nM到900nM,更优选约10nM到250nM,并且更优选约30nM添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0156] 2. ASK1抑制剂

[0157] 在其他实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是ASK1抑制剂,其阻断JNK和p38MAP激酶的下游活化。多种合适的ASK1抑制剂是已知的(例如,参见美国专利号8,178,555、8,378,108、8,440,665和8,598,360)或者是可商购的,例如,MLS-0315763(国立卫生研究院(National Institute of Health))。示例性的ASK1抑制剂包括但不限于苯并二氮杂萘酮(benzodiazepinone)抑制剂(Kim等人,(2009) J. Biol. Chem. 284:1593-1603)、NDQI-1和MLS-0315763。

[0158] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些实施方案中,可以将NDQI-1以约50nM到约3.0 μ M的浓度范围,优选约250nM到2.0 μ M,更优选约400nM到2.0 μ M,并且更优选约1.0 μ M添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0159] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些其他实施方案中,可以将MLS-0315763以约1nM到约500nM的浓度范围,优选约1nM到250nM,更优选约1nM到100nM,并且更优选约10nM添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0160] 3. NRF2-KEAP1抑制剂

[0161] 在某些实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂阻断NRF2-KEAP1通路。

[0162] 示例性的NRF2-KEAP1通路抑制剂包括但不限于鼠尾草酸、三萜类化合物、萝卜硫素(sulphoraphane)和叔丁基氢醌。

[0163] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些实施方

案中,可以将萝卜硫素以约50nM到约1.0 μ M的浓度范围,优选约50nM到500nM,更优选约100nM到400nM,并且更优选约220nM添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0164] 4.JNK抑制剂

[0165] 在某些实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂。考虑将任何JNK抑制剂用于本发明的制剂、组合物和方法中。JNK抑制剂通常是本领域技术人员已知的(例如,参见美国专利号6,949,544、7,129,242、7,326,418、8,143,271以及8,530,480)。

[0166] 示例性的JNK抑制剂包括但不限于SP600125(葱并[1-9-cd]吡唑-6(2H)-酮)、JNK-IN-8(3-[[4-(二甲基氨基)-1-氧代-2-丁烯-1-基]氨基]-N-[3-甲基-4-[[4-(3-吡啶基)-2-嘧啶基]氨基]苯基]-苯甲酰胺)和JNK-抑制剂IX(N-(3-氰基-4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩-2-基)-1-萘甲酰胺)。

[0167] 在进一步的实施方案中,JNK抑制剂与p38MAP激酶抑制剂组合使用以阻断ASK1的下游活化。

[0168] 5.p38MAP激酶抑制剂

[0169] 在某些其他实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是p38MAP激酶抑制剂。p38MAP激酶抑制剂通常是众所周知的(例如,参见美国专利号7,521,460、7,592,455、7,728,013以及7,795,256)。

[0170] 示例性的p38MAP激酶抑制剂包括但不限于SB203580(4-(4-(4-氟苯基)-2-(4-(甲基亚磺酰基)苯基)-1H-咪唑-5-基)吡啶)、LY2228820(5-(2-叔丁基-4-(4-氟苯基)-1H-咪唑-5-基)-3-新戊基-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-胺二甲磺酸盐)、PD169316(4-(4-氟苯基)-2-(4-硝基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)、PH-797804(3-(4-(2,4-二氟苄氧基)-3-溴-6-甲基-2-氧代吡啶-1(2H)-基)-N,4-二甲基苯甲酰胺)、SB202190(4-(4-(4-氟苯基)-5-(吡啶-4-基)-1H-咪唑-2-基)苯酚)、BIRB 796(达马莫德;1-(3-叔丁基-1-对甲苯基-1H-吡唑-5-基)-3-(4-(2-吗啉基乙氧基)萘-1-基)脲)、VX-702(1-(5-氨基甲酰基-6-(2,4-二氟苯基)吡啶-2-基)-1-(2,6-二氟苯基)脲)、TAK-715(N-[4-[2-乙基-4-(3-甲基苯基)-5-噻唑基]-2-吡啶基]-苯甲酰胺)。

[0171] 在某些其他实施方案中,所述预脱水制剂和/或再水化制剂包含JNK抑制剂和p38MAP激酶抑制剂以阻断下游ASK1依赖性信号传导。

[0172] 6.GSK3抑制剂

[0173] 在某些实施方案中,所述预脱水制剂和/或再水化制剂包含阻断GSK3的凋亡抑制剂。多种GSK3抑制剂适于在本文所述的制剂和方法中使用。GSK3抑制剂是本领域技术人员公知的(例如,参见美国专利号6,057,117、6,153,618、6,417,185、6,465,231、6,489,344、6,608,632、6,800,632、6,949,547、7,045,519、7,037,918、7,425,557、8,143,271以及8,664,244),并且多种GSK3抑制剂是可商购的,例如,CHIR98014、N-6-[2-[[4-(2,4-二氯苯基)-5-(1H-咪唑-2-基)-2-嘧啶基]氨基]乙基]-3-硝基-2,6-吡啶二胺(Selleckchem.com;目录号S2745)以及丙戊酸(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO;目录号P4543)。

[0174] 特别优选的GSK3抑制剂包括但不限于CHIR98014、丙戊酸盐、CT 99021和CT 20026。

[0175] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些实施方案中,可以将CHIR98014以约0.25 μ M到约3.0 μ M的浓度范围,优选约0.5 μ M到2.75 μ M,更优选

约1.0 μ M到2.0 μ M,并且更优选约1.25 μ M添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0176] 7. IRE-1抑制剂

[0177] 在某些实施方案中,所述预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂包含阻断IRE1的凋亡抑制剂。IRE1抑制剂是已知的(例如,参见美国专利号8,372,861)。

[0178] 示例性的IRE1抑制剂包括但不限于IRE1抑制剂I(N-[(2-羟基萘-1-基)亚甲基]噻吩-2-磺酰胺)、IRE1抑制剂II(3'-甲酰基-4'-羟基-5'-甲氧基联苯基-3-甲酰胺)以及IRE1抑制剂III(8-甲酰基-7-羟基-4-甲基香豆素,7-羟基-4-甲基-2-氧代-2H-色烯-8-甲醛)。

[0179] 8. 胱天蛋白酶-1抑制剂

[0180] 在某些实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0181] 用于在本文所述的制剂、组合物和方法中使用的示例性胱天蛋白酶-1抑制剂包括但不限于胱天蛋白酶-1抑制剂II(Ac-YVAD-氯甲基甲酮)、N-(2-喹啉基)缬氨酰-天冬氨酰-(2,6-二氟苯氧基)甲基甲酮(其中天冬氨酰残基是 α -甲基化或非 α -甲基化的)、VX-765((S)-1-((S)-2-(4-氨基-3-氯苯甲酰氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-N-((2R,3S)-2-乙氧基-5-氧代-四氢呋喃-3-基)吡咯烷-2-甲酰胺)和ZVAD-氟甲基甲酮。

[0182] 9. 钙蛋白酶抑制剂

[0183] 在某些实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是钙蛋白酶抑制剂。存在至少15种不同的钙蛋白酶同种型(钙蛋白酶1-15)。钙蛋白酶抑制剂是本领域技术人员公知的(例如,参见美国专利号5,541,290、6,448,245、7,001,770、7,476,754以及7,932,266)。本发明的预脱水制剂和/或再水化制剂可包含任何合适的钙蛋白酶抑制剂或钙蛋白酶抑制剂的组合。

[0184] 用于在本文所述的制剂、组合物和方法中使用的特别优选的钙蛋白酶抑制剂包括但不限于钙蛋白酶抑制剂I(N-乙酰基-Leu-Leu-正亮氨酸-CHO)、钙蛋白酶抑制剂II(N-乙酰基-Leu-Leu-Met)、钙蛋白酶抑制剂III(Z-Val-Phe-CHO)、钙蛋白酶抑制剂IV(Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂V(吗啉基酰脲基;-Val-高苯丙氨酸-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂VI(4-氟苯基磺酰基-Val-Leu-CHO)、钙蛋白酶抑制剂X(Z-Leu- α -氨基丁酸-CONHC₂H₅)、钙蛋白酶抑制剂XI(Z-L- α -氨基丁酸-CONH(CH₂)₃-吗啉)和钙蛋白酶抑制剂XII(Z-L-正缬氨酸-CONH-CH₂-2-吡啶基)。

[0185] 10. MEK抑制剂

[0186] 在某些实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是MEK1或MEK2抑制剂。MEK1和MEK2抑制剂是已知的(例如,参见美国专利号6,310,060、6,440,966、6,638,945、7,001,905、7,169,816、7,745,663、7,803,839、7,897,624、8,394,822、8492,427以及8,642,584),并且是可商购的。

[0187] 示例性的MEK抑制剂包括但不限于PD0325901,N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺;MEK162(5-[(4-溴-2-氟苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺)、PD184352(2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟苯甲酰胺)、pimasertib((S)-N-(2,3-二羟基丙基)-3-(2-氟-4-碘苯基氨基)异烟酰胺)、司美替尼(6-(4-溴-2-氯苯基氨基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基-3H-苯并[d]咪唑-5-甲酰胺)、曲美替尼(N-(3-(3-环丙基-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-6,8-二甲基-2,4,7-三氧代-3,4,6,7-四氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-1(2H)-基)苯基)乙酰胺)、

PD98059 (2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4H-苯并吡喃-4-酮)、U0126-EtOH ((2Z,3Z)-2,3-双(氨基(2-氨基苯硫基)亚甲基)琥珀腈,乙醇)。

[0188] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些实施方案中,可以将PD0325901以约1nM到约1.0 μ M的浓度范围,优选约10nM到500nM,更优选约20nM到250nM,并且更优选约50nM添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0189] 11.PI3K通路抑制剂

[0190] 在某些其他实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是PI3K抑制剂。

[0191] 用于在本文所述的制剂、组合物和方法中使用的示例性PI3K抑制剂包括但不限于dactolisib(2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)苯基]丙腈)、GDC-0941(2-(1H-吡唑-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)-1-哌嗪基]甲基]-4-(4-吗啉基)噻吩并[3,2-d]嘧啶)、LY294002(2-(4-吗啉基)-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、idealalisib(5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹唑啉酮)、burparlisib(5-(2,6-二吗啉基嘧啶-4-基)-4-(三氟甲基)吡啶-2-胺)、GDC-0032(4-[5,6-二氢-2-[3-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-1,2,4-三唑-5-基]咪唑并[1,2-d][1,4]苯并氧氮杂萘-9-基]- α,α -二甲基-1H-吡唑-1-乙酰胺)、PI-103(3-(4-(4-吗啉基)吡啶并[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基)苯酚)、NU7441(8-(4-二苯并噻吩基)-2-(4-吗啉基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、GSK2636771(2-甲基-1-[[2-甲基-3-(三氟甲基)苯基]甲基]-6-(4-吗啉基)-1H-苯并咪唑-4-甲酸)、IPI-145(8-氯-2-苯基-3-[(1S)-1-(9H-嘌呤-6-基氨基)乙基]-1-(2H)-异喹啉酮)、XL147(N-(3-(苯并[c][1,2,5]噻二唑-5-基氨基)喹喔啉-2-基)-4-甲基苯磺酰胺)、TGX-221(7-甲基-2-(4-吗啉基)-9-[1-(苯基氨基)乙基]-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮)、PIK-90(N-(7,8-二甲氧基-2,3-二氢-咪唑并[1,2-c]喹唑啉-5-基)-烟酰胺)、渥曼青霉素(11-(乙氧基)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-八氢-1-(甲氧基甲基)-9a,11b-二甲基-, (1S,6bR,9aS,11R,11bR)-3H-氟[4,3,2-de]茚并[4,5-h]-2-苯并吡喃-3,6,9-三酮)、VS-5584(5-[8-甲基-9-(1-甲基乙基)-2-(4-吗啉基)-9H-嘌呤-6-基]-2-嘧啶胺)和TG-100703(3-(2,4-二氨基-6-蝶啶基)-苯酚)。

[0192] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些实施方案中,可以将LY294002以约10nM到约2.0 μ M的浓度范围,优选约20nM到1.0 μ M,更优选约50nM到500nM,并且更优选约120nM添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0193] ER蛋白伴侣诱导剂

[0194] 在某些方面,所述预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和ER蛋白伴侣诱导剂。用于在本文所述的制剂、组合物和方法中使用的合适的ER蛋白伴侣诱导剂包括但不限于BIX、丙戊酸盐和锂。

[0195] 1.BIX

[0196] BiP诱导剂X(BIX)在筛选诱导GRP78/BiP表达的化合物时得到鉴定。BIX优先诱导BiP,轻微诱导GRP94(94kDa葡萄糖调节蛋白质)、钙网蛋白和C/EBP同源蛋白。通过BiP基因上游的ER应激响应元件的激活经由ATF6(活化转录因子6)通路来介导BIX对BiP mRNA的诱导。

[0197] 2.丙戊酸盐

[0198] 丙戊酸(2-丙戊酸)已被批准用于癫痫、双相躁狂症和偏头痛的预防和治疗。丙戊

酸在室温下为液体,但它可以与碱如氢氧化钠反应以形成盐丙戊酸钠,其为固体。丙戊酸盐的作用机制尚未完全清楚,但已经证明其抑制CYP2C9、葡萄糖醛基转移酶和环氧化物水解酶并导致大脑中 γ -氨基丁酸(GABA)水平增加。丙戊酸盐的施用增加了GRP78/BiP的表达,从而使三种近端跨膜传感器PERK、IRE1和ATF6稳定在有利的失活状态。

[0199] 3. 锂

[0200] 元素锂用于治疗多种情绪障碍。锂的施用增加了GRP78/BiP的表达,从而使三种近端跨膜传感器PERK、IRE1和ATF6稳定在期望的失活状态。

[0201] 自噬诱导剂

[0202] 在某些其他方面,所述预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和自噬诱导剂。自噬诱导剂是一系列不同的化合物,其有利地促进不需要的或错折叠的蛋白质的溶酶体降解,从而提高UPR对细胞的效果。尽管不希望受到任何理论的束缚,但有人认为凋亡抑制剂和自噬诱导剂的组合阻断ER应激通路,同时进一步促进可能由于脱水而产生的错折叠蛋白质的降解,从而有助于以保持至少一种如脱水前细胞的功能性质的方式将细胞再水化。

[0203] 示例性的自噬诱导剂包括但不限于氟司必林、三氟拉嗪、匹莫齐特、尼卡地平、尼古地平、洛哌丁胺、胺碘酮、雷帕霉素、白藜芦醇和SMER。

[0204] 在将细胞基本干燥储存多于24小时(例如,48或120小时)的时间段的某些实施方案中,可以将雷帕霉素以约1nM到约1.0 μ M的浓度范围,优选约20nM到200nM,更优选约20nM到80nM,并且更优选约20nM添加至预脱水制剂和/或再水化制剂中。

[0205] 存活蛋白

[0206] 在另一个方面,所述预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂包含存活蛋白。示例性的存活蛋白为Bcl-xL。

[0207] Bcl-xL是BCL-2家族的成员,并且是位于线粒体中的跨膜蛋白。据报道Bcl以两种形式存在,即长的形式Bcl-xL和较短的剪接变体形式Bcl-xS。Bcl-xL在内源性凋亡通路的水平下起作用,而外源性通路(Fas/TNF死亡受体)直接导致胱天蛋白酶激活,从而防止线粒体内容物如细胞色素c的释放,细胞色素c将导致胱天蛋白酶激活。促-存活和抗-存活Bcl-2家族蛋白质的相对量决定细胞是否将经历细胞死亡是凋亡领域中的一个已确定的概念。

[0208] 在某些实施方案中,采用脂质体制剂将Bcl-xL递送至细胞以确保足够的Bcl-xL细胞内摄取。

[0209] 预脱水制剂

[0210] 在某些方面,用于细胞的基本干燥储存的组合物和方法包括另外的步骤:在脱水之前用预脱水制剂处理细胞。在一个实施方案中,该预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂,优选可逆凋亡抑制剂。在另一个实施方案中,该预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种ER蛋白伴侣诱导剂、至少一种自噬诱导剂或至少一种存活蛋白。

[0211] 在某些实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂选自PERK-eIF2- α 抑制剂、ASK1抑制剂、NRF2-KEAP1抑制剂、JNK抑制剂、p38MAP激酶抑制剂、IRE1抑制剂、GSK3抑制剂、MEK抑制剂、PI3K通路抑制剂、钙蛋白酶抑制剂以及胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0212] 在一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是PERK-eIF2- α 抑制剂。在某些实施方案中,该PERK-eIF2- α 抑制剂选自salubrinal、Sal-003(3-苯基-N-[2,2,

2-三氯-1-[(4-氯苯基)硫代氨基甲酰氨基]乙基]丙-2-烯酰胺)、GSK 2606414 (7-甲基-5-(1-[[3-(三氟甲基)苯基]乙酰基]-2,3-二氢-1H-吡啶-5-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺)、GSK 2656157 (1-(5-(4-氨基-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)-4-氟吡啶-1-基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙酮)和ISRIB (反式-N,N'-(环己烷-1,4-二基)双(2-(4-氯苯氧基)乙酰胺)。在某些其他实施方案中,该PERK-eIF2- α 抑制剂是salubrinal。

[0213] 在另一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是ASK1抑制剂,优选NDQI-1或MLS-0315763。

[0214] 在又一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是NRF2-KEAP1抑制剂。在某些实施方案中,该NRF2-KEAP1抑制剂选自鼠尾草酸、三萜类化合物、萝卜硫素和叔丁基氢醌。

[0215] 在又一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是GSK3抑制剂。在某些实施方案中,该GSK3抑制剂选自CHIR98014 (N6-[2-[[4-(2,4-二氯苯基)-5-(1H-咪唑-2-基)-2-嘧啶基]氨基]乙基]-3-硝基-2,6-吡啶二胺)、丙戊酸盐、CT 99021和CT 20026。

[0216] 在进一步的实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是MEK抑制剂。在某些实施方案中,该MEK抑制剂选自PD0325901, N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺; MEK162 (5-[(4-溴-2-氟苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺)、PD184352 (2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟苯甲酰胺)、pimasertib ((S)-N-(2,3-二羟基丙基)-3-(2-氟-4-碘苯基氨基)异烟酰胺)、司美替尼 (6-(4-溴-2-氯苯基氨基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基-3H-苯并[d]咪唑-5-甲酰胺)、曲美替尼 (N-(3-(3-环丙基-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-6,8-二甲基-2,4,7-三氧代-3,4,6,7-四氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-1(2H)-基)苯基)乙酰胺)、PD98059 (2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4H-苯并吡喃-4-酮)以及U0126-EtOH ((2Z,3Z)-2,3-双(氨基(2-氨基苯硫基)亚甲基)琥珀腈,乙醇)。

[0217] 在又一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂。在某些实施方案中,该JNK抑制剂选自SP600125 (葱并[1-9-cd]吡啶-6(2H)-酮)、JNK-IN-8 (3-[[4-(二甲基氨基)-1-氧代-2-丁烯-1-基]氨基]-N-[3-甲基-4-[[4-(3-吡啶基)-2-嘧啶基]氨基]苯基]-苯甲酰胺); JNK-抑制剂IX (N-(3-氰基-4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩-2-基)-1-萘甲酰胺)。

[0218] 在另一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂和p38MAP激酶抑制剂。在某些实施方案中,该p38MAP激酶抑制剂选自SB203580 (4-(4-(4-氟苯基)-2-(4-(甲基亚磺酰基)苯基)-1H-咪唑-5-基)吡啶)、LY228820 (5-(2-叔丁基-4-(4-氟苯基)-1H-咪唑-5-基)-3-新戊基-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-胺二甲磺酸盐)、PD169316 (4-(4-氟苯基)-2-(4-硝基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)、PH-797804 (3-(4-(2,4-二氟苄氧基)-3-溴-6-甲基-2-氧代吡啶-1(2H)-基)-N,4-二甲基苯甲酰胺)、SB202190 (4-(4-(4-氟苯基)-5-(吡啶-4-基)-1H-咪唑-2-基)苯酚)、BIRB 796 (达马莫德; 1-(3-叔丁基-1-对甲苯基-1H-吡啶-5-基)-3-(4-(2-吗啉基乙氧基)萘-1-基)脲)、VX-702 (1-(5-氨基甲酰基-6-(2,4-二氟苯基)吡啶-2-基)-1-(2,6-二氟苯基)脲)以及TAK-715 (N-[4-[2-乙基-4-(3-甲基苯基)-5-噻唑基]-2-吡啶基]-苯甲酰胺)。

[0219] 在进一步的实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是PI3K抑制剂。

在某些实施方案中,该PI3K抑制剂选自dactolisib(2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)苯基]丙腈)、GDC-0941(2-(1H-吡啶-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)-1-哌嗪基]甲基]-4-(4-吗啉基)噻吩并[3,2-d]嘧啶)、LY294002(2-(4-吗啉基)-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、idealalisib(5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹唑啉酮)、burparlisib(5-(2,6-二吗啉基嘧啶-4-基)-4-(三氟甲基)吡啶-2-胺)、GDC-0032(4-[5,6-二氢-2-[3-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-1,2,4-三唑-5-基]咪唑并[1,2-d][1,4]苯并氧氮杂萘-9-基]- α,α -二甲基-1H-吡啶-1-乙酰胺)、PI-103(3-(4-(4-吗啉基)吡啶并[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基)苯酚)、NU7441(8-(4-二苯并噻吩基)-2-(4-吗啉基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、GSK2636771(2-甲基-1-[[2-甲基-3-(三氟甲基)苯基]甲基]-6-(4-吗啉基)-1H-苯并咪唑-4-甲酸)、IPI-145(8-氯-2-苯基-3-[(1S)-1-(9H-嘌呤-6-基氨基)乙基]-1-(2H)-异喹啉酮)、XL147(N-(3-(苯并[c][1,2,5]噻二唑-5-基氨基)喹啉-2-基)-4-甲基苯磺酰胺)、TGX-221(7-甲基-2-(4-吗啉基)-9-[1-(苯基氨基)乙基]-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮)、PIK-90(N-(7,8-二甲氧基-2,3-二氢-咪唑并[1,2-c]喹唑啉-5-基)-烟酰胺)、渥曼青霉素(11-(乙酰氧基)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-八氢-1-(甲氧基甲基)-9a,11b-二甲基-, (1S,6bR,9aS,11R,11bR)-3H-氟[4,3,2-de]茛并[4,5-h]-2-苯并吡喃-3,6,9-三酮)、VS-5584(5-[8-甲基-9-(1-甲基乙基)-2-(4-吗啉基)-9H-嘌呤-6-基]-2-嘧啶胺)和TG-100703(3-(2,4-二氨基-6-蝶啶基)-苯酚)。

[0220] 在一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是IRE-1抑制剂。在某些实施方案中,该IRE-1抑制剂选自IRE1抑制剂I(N-[(2-羟基萘-1-基)亚甲基]噻吩-2-磺酰胺)、IRE1抑制剂II(3'-甲酰基-4基(羟基-5基(甲氧基联苯基-3-甲酰胺)以及IRE1抑制剂III(8-甲酰基-7-羟基-4-甲基香豆素,7-羟基-4-甲基-2-氧代-2H-色烯-8-甲醛)。

[0221] 在一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是钙蛋白酶抑制剂。在某些实施方案中,该钙蛋白酶抑制剂选自钙蛋白酶抑制剂I(N-乙酰基-Leu-Leu-正亮氨酸-CHO)、钙蛋白酶抑制剂II(N-乙酰基-Leu-Leu-Met)、钙蛋白酶抑制剂III(Z-Val-Phe-CHO)、钙蛋白酶抑制剂IV(Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂V(吗啉基酰脲基;-Val-高苯丙氨酸-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂VI(4-氟苯基磺酰基-Val-Leu-CHO)、钙蛋白酶抑制剂X(Z-Leu- α -氨基丁酸-CONHC₂H₅)、钙蛋白酶抑制剂XI(Z-L- α -氨基丁酸-CONH(CH₂)₃-吗啉)和钙蛋白酶抑制剂XII(Z-L-正缬氨酸-CONH-CH₂-2-吡啶基)。

[0222] 在一个实施方案中,该预脱水制剂中的至少一种凋亡抑制剂是胱天蛋白酶-1抑制剂。在某些实施方案中,该胱天蛋白酶-1抑制剂选自胱天蛋白酶-1抑制剂II(Ac-YVAD-氯甲基甲酮)、N-(2-喹啉基)缬氨酰-天冬氨酰-(2,6-二氟苯氧基)甲基甲酮(其中天冬氨酰残基是 α -甲基化或非 α -甲基化的)、VX-765((S)-1-((S)-2-(4-氨基-3-氯苯甲酰氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-N-((2R,3S)-2-乙氧基-5-氧代-四氢呋喃-3-基)吡咯烷-2-甲酰胺)和ZVAD-氟甲基甲酮。

[0223] 在另一个方面,该预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种ER蛋白伴侣诱导剂。在某些实施方案中,该ER蛋白伴侣诱导剂选自BIX、丙戊酸盐和锂。

[0224] 在另一个方面,该预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种自噬诱导剂。在某些实施方案中,该自噬诱导剂选自氟司必林、三氟拉嗪、匹莫齐特、尼卡地平、尼古地平、洛哌丁胺、胺碘酮、雷帕霉素、白藜芦醇和SMER。

[0225] 在另一个方面,该预脱水制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种存活蛋白。在一个实施方案中,该存活蛋白为Bcl-xL。

[0226] 再水化制剂

[0227] 在某些其他方面,用于细胞的基本干燥储存的组合物和方法进一步包括采用再水化制剂将基本干燥储存的细胞再水化。在一个实施方案中,该再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂,优选可逆凋亡抑制剂。在另一个实施方案中,该再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种ER蛋白伴侣诱导剂。

[0228] 在某些实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂选自PERK-eIF2- α 抑制剂、ASK1抑制剂、NRF2-KEAP1抑制剂、JNK抑制剂、p38MAP激酶抑制剂、IRE1抑制剂、GSK3抑制剂、MEK抑制剂、PI3K通路抑制剂、钙蛋白酶抑制剂以及胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0229] 在一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是PERK-eIF2- α 抑制剂。在某些实施方案中,该PERK-eIF2- α 抑制剂选自salubrinal、Sal-003 (3-苯基-N-[2,2,2-三氯-1-[(4-氯苯基)硫代氨基甲酰氨基]乙基]丙-2-烯酰胺)、GSK 2606414 (7-甲基-5-(1-[[3-(三氟甲基)苯基]乙酰基]-2,3-二氢-1H-吡啶-5-基]-7H-吡咯并[2,3d]嘧啶-4-胺)、GSK 2656157 (1-(5-(4-氨基-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)-4-氟吡啶-1-基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙酮)和ISRIB (反式-N,N'-(环己烷-1,4-二基)双(2-(4-氯苯氧基)乙酰胺)。在某些其他实施方案中,该PERK-eIF2- α 抑制剂是salubrinal。

[0230] 在另一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是ASK1抑制剂,优选NDQI-1或MLS-0315763。

[0231] 在又一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是NRF2-KEAP1抑制剂。在某些实施方案中,该NRF2-KEAP1抑制剂选自鼠尾草酸、三萜类化合物、萝卜硫素和叔丁基氢醌。

[0232] 在又一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是GSK3抑制剂。在某些实施方案中,该GSK3抑制剂选自CHIR98014 (N6-[2-[[4-(2,4-二氯苯基)-5-(1H-咪唑-2-基)-2-嘧啶基]氨基]乙基]-3-硝基-2,6-吡啶二胺)、丙戊酸盐、CT 99021和CT 20026。

[0233] 在进一步的实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是MEK抑制剂。在某些实施方案中,该MEK抑制剂选自PD0325901, N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺; MEK162 (5-[(4-溴-2-氟苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺)、PD184352 (2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟苯甲酰胺)、pimasertib ((S)-N-(2,3-二羟基丙基)-3-(2-氟-4-碘苯基氨基)异烟酰胺)、司美替尼 (6-(4-溴-2-氯苯基氨基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基-3H-苯并[d]咪唑-5-甲酰胺)、曲美替尼 (N-(3-(3-环丙基-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-6,8-二甲基-2,4,7-三氧代-3,4,6,7-四氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-1(2H)-基)苯基)乙酰胺)、PD98059 (2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4H-苯并吡喃-4-酮)以及U0126-EtOH ((2Z,3Z)-2,3-双(氨基(2-氨基苯硫基)亚甲基)琥珀腈,乙醇)。

[0234] 在又一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂。在某些实施方案中,该JNK抑制剂选自SP600125 (蒽并[1-9-cd]吡啶-6(2H)-酮)、JNK-IN-8 (3-[[4-(二甲基氨基)-1-氧代-2-丁烯-1-基]氨基]-N-[3-甲基-4-[[4-(3-吡啶基)-2-嘧啶基]氨基]苯基]-苯甲酰胺); JNK-抑制剂IX (N-(3-氰基-4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩-2-基)-

1-萘甲酰胺)。

[0235] 在另一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂和p38MAP激酶抑制剂。在某些实施方案中,该p38MAP激酶抑制剂选自SB203580 (4-(4-(4-氟苯基)-2-(4-(甲基亚磺酰基)苯基)-1H-咪唑-5-基)吡啶)、LY2228820 (5-(2-叔丁基-4-(4-氟苯基)-1H-咪唑-5-基)-3-新戊基-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-胺二甲磺酸盐)、PD169316 (4-(4-氟苯基)-2-(4-硝基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)、PH-797804 (3-(4-(2,4-二氟苄氧基)-3-溴-6-甲基-2-氧代吡啶-1(2H)-基)-N,4-二甲基苯甲酰胺)、SB202190 (4-(4-(4-氟苯基)-5-(吡啶-4-基)-1H-咪唑-2-基)苯酚)、BIRB 796 (达马莫德;1-(3-叔丁基-1-对甲苯基-1H-吡唑-5-基)-3-(4-(2-吗啉基乙氧基)萘-1-基)脲)、VX-702 (1-(5-氨基甲酰基-6-(2,4-二氟苯基)吡啶-2-基)-1-(2,6-二氟苯基)脲)以及TAK-715 (N-[4-[2-乙基-4-(3-甲基苯基)-5-噻唑基]-2-吡啶基]-苯甲酰胺)。

[0236] 在进一步的实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是PI3K抑制剂。在某些实施方案中,该PI3K抑制剂选自dactolisib (2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)苯基]丙腈)、GDC-0941 (2-(1H-吡唑-4-基)-6-[4-(甲基磺酰基)-1-哌嗪基]甲基]-4-(4-吗啉基)噻吩并[3,2-d]嘧啶)、LY294002 (2-(4-吗啉基)-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、idealalisib (5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹唑啉酮)、burparlisib (5-(2,6-二吗啉基嘧啶-4-基)-4-(三氟甲基)吡啶-2-胺)、GDC-0032 (4-[5,6-二氢-2-[3-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-1,2,4-三唑-5-基]咪唑并[1,2-d][1,4]苯并氧氮杂萘-9-基]- α,α -二甲基-1H-吡唑-1-乙酰胺)、PI-103 (3-(4-(4-吗啉基)吡啶并[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基)苯酚)、NU7441 (8-(4-二苯并噻吩基)-2-(4-吗啉基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、GSK2636771 (2-甲基-1-[[2-甲基-3-(三氟甲基)苯基]甲基]-6-(4-吗啉基)-1H-苯并咪唑-4-甲酸)、IPI-145 (8-氯-2-苯基-3-[(1S)-1-(9H-嘌呤-6-基氨基)乙基]-1-(2H)-异喹啉酮)、XL147 (N-(3-(苯并[c][1,2,5]噻二唑-5-基氨基)喹啉-2-基)-4-甲基苯磺酰胺)、TGX-221 (7-甲基-2-(4-吗啉基)-9-[1-(苯基氨基)乙基]-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮)、PIK-90 (N-(7,8-二甲氧基-2,3-二氢-咪唑并[1,2-c]喹唑啉-5-基)-烟酰胺)、渥曼青霉素 (11-(乙酰氧基)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-八氢-1-(甲氧基甲基)-9a,11b-二甲基-, (1S,6bR,9aS,11R,11bR)-3H-氟[4,3,2-de]茚并[4,5-h]-2-苯并吡喃-3,6,9-三酮)、VS-5584 (5-[8-甲基-9-(1-甲基乙基)-2-(4-吗啉基)-9H-嘌呤-6-基]-2-嘧啶胺)和TG-100703 (3-(2,4-二氨基-6-蝶啶基)-苯酚)。

[0237] 在一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是IRE-1抑制剂。在某些实施方案中,该IRE-1抑制剂选自IRE1抑制剂I (N-[(2-羟基萘-1-基)亚甲基]噻吩-2-磺酰胺)、IRE1抑制剂II (3'-甲酰基-4'-羟基-5'-甲氧基联苯基-3-甲酰胺)以及IRE1抑制剂III (8-甲酰基-7-羟基-4-甲基香豆素,7-羟基-4-甲基-2-氧代-2H-色烯-8-甲醛)。

[0238] 在一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是钙蛋白酶抑制剂。在某些实施方案中,该钙蛋白酶抑制剂选自钙蛋白酶抑制剂I (N-乙酰基-Leu-Leu-正亮氨酸-CHO)、钙蛋白酶抑制剂II (N-乙酰基-Leu-Leu-Met)、钙蛋白酶抑制剂III (Z-Val-Phe-CHO)、钙蛋白酶抑制剂IV (Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂V (吗啉基酰脲基;-Val-高苯丙氨酸-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂VI (4-氟苯基磺酰基-Val-Leu-CHO)、钙蛋白酶抑制剂X (Z-Leu- α -氨基丁酸-CONHC₂H₅)、钙蛋白酶抑制剂XI (Z-L- α -氨基丁酸-CONH(CH₂)₃-吗啉)和

钙蛋白酶抑制剂XII (Z-L-正缬氨酸-CONH-CH₂-2-吡啶基)。

[0239] 在一个实施方案中,该再水化制剂中的至少一种凋亡抑制剂是胱天蛋白酶-1抑制剂。在某些实施方案中,该胱天蛋白酶-1抑制剂选自胱天蛋白酶-1抑制剂II (Ac-YVAD-氯甲基甲酮)、N-(2-喹啉基)缬氨酰-天冬氨酰-(2,6-二氟苯氧基)甲基甲酮(其中天冬氨酰残基是 α -甲基化或非 α -甲基化的)、VX-765((S)-1-((S)-2-(4-氨基-3-氯苯甲酰氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-N-((2R,3S)-2-乙氧基-5-氧代-四氢呋喃-3-基)吡咯烷-2-甲酰胺)和ZVAD-氟甲基甲酮。

[0240] 在另一个方面,该再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种ER蛋白伴侣诱导剂。在某些实施方案中,该ER蛋白伴侣诱导剂选自BIX、丙戊酸盐和锂。

[0241] 在另一个方面,该再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种自噬诱导剂。在某些实施方案中,该自噬诱导剂选自氟司必林、三氟拉嗪、匹莫齐特、尼卡地平、尼古地平、洛哌丁胺、胺碘酮、雷帕霉素、白藜芦醇和SMER。

[0242] 在另一个方面,该再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种存活蛋白。在一个实施方案中,该存活蛋白为Bcl-xL。

[0243] 方法

[0244] 在本发明的另一个方面,提供了在没有冷冻或冻干的情况下将一种或多种细胞在环境温度下基本干燥储存的方法,该方法包括:将所述一种或多种细胞与包含干燥储存稳定剂的脱水制剂一起温育;以及在脱水制剂的存在下使该一种或多种预处理的细胞脱水,以产生一种或多种基本干燥储存的细胞。在某些实施方案中,该脱水制剂进一步包含至少一种凋亡抑制剂,并且该方法可进一步包括采用包含至少一种凋亡抑制剂的再水化缓冲液将一种或多种基本干燥储存的细胞再水化。

[0245] 在本发明的另一个方面,提供了在没有冷冻或冻干的情况下将一种或多种细胞在环境温度下基本干燥储存的方法,该方法包括:将所述一种或多种细胞与包含凋亡抑制剂的预脱水制剂一起温育以产生一种或多种预处理的细胞,去除所述预脱水制剂;以及在脱水制剂的存在下使该一种或多种预处理的细胞脱水,以产生一种或多种基本干燥储存的细胞。在某些实施方案中,该方法可进一步包括采用包含至少一种凋亡抑制剂的再水化缓冲液将一种或多种基本干燥储存的细胞再水化。

[0246] 多种凋亡抑制剂可在高浓度下或长时间暴露时对细胞产生毒性作用。相反,细胞暴露于预脱水制剂或再水化制剂的时间太短或凋亡抑制剂浓度太低将不会在脱水期间产生期望的额外的处理效果。因此,对于采用预脱水步骤和再水化步骤将细胞基本干燥储存的方法,需要适当地控制暴露时间以实现期望的抑制效果。

[0247] 在某些实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂选自PERK-eIF2- α 抑制剂、ASK1抑制剂、NRF2-KEAP1抑制剂、JNK抑制剂、p38MAP激酶抑制剂、IRE1抑制剂、GSK3抑制剂、MEK抑制剂、PI3K通路抑制剂、钙蛋白酶抑制剂以及胱天蛋白酶-1抑制剂。

[0248] 在一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是PERK-eIF2- α 抑制剂。在某些实施方案中,该PERK-eIF2- α 抑制剂选自salubrinal、Sal-003(3-苯基-N-[2,2,2-三氯-1-[(4-氯苯基)硫代氨基甲酰氨基]乙基]丙-2-烯酰胺)、GSK 2606414(7-甲基-5-(1-[[3-(三氟甲基)苯基]乙酰基]-2,3-二氢-1H-吡啶-5-基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺)、GSK 2656157(1-(5-(4-氨基-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)-4-氟吡啶-1-

基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙酮)和ISRIB(反式-N,N'-(环己烷-1,4-二基)双(2-(4-氯苯氧基)乙酰胺)。在某些其他实施方案中,该PERK-eIF2- α 抑制剂是salubrinal。

[0249] 在另一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是ASK1抑制剂,优选NDQI-1或MLS-0315763。

[0250] 在又一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是NRF2-KEAP1抑制剂。在某些实施方案中,该NRF2-KEAP1抑制剂选自鼠尾草酸、三萜类化合物、萝卜硫素和叔丁基氢醌。

[0251] 在又一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是GSK3抑制剂。在某些实施方案中,该GSK3抑制剂选自CHIR98014(N6-[2-[[4-(2,4-二氯苯基)-5-(1H-咪唑-2-基)-2-嘧啶基]氨基]乙基]-3-硝基-2,6-吡啶二胺)、丙戊酸盐、CT 99021和CT 20026。

[0252] 在进一步的实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是MEK抑制剂。在某些实施方案中,该MEK抑制剂选自PD0325901,N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺;MEK162(5-[(4-溴-2-氟苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺)、PD184352(2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟苯甲酰胺)、pimasertib((S)-N-(2,3-二羟基丙基)-3-(2-氟-4-碘苯基氨基)异烟酰胺)、司美替尼(6-(4-溴-2-氯苯基氨基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基-3H-苯并[d]咪唑-5-甲酰胺)、曲美替尼(N-(3-(3-环丙基-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-6,8-二甲基-2,4,7-三氧代-3,4,6,7-四氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-1(2H)-基)苯基)乙酰胺)、PD98059(2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4H-苯并吡喃-4-酮)以及U0126-EtOH((2Z,3Z)-2,3-双(氨基(2-氨基苯硫基)亚甲基)琥珀腈,乙醇)。

[0253] 在又一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂。在某些实施方案中,该JNK抑制剂选自SP600125(蒽并[1-9-cd]吡啶-6(2H)-酮)、JNK-IN-8(3-[[4-(二甲基氨基)-1-氧代-2-丁烯-1-基]氨基]-N-[3-甲基-4-[[4-(3-吡啶基)-2-嘧啶基]氨基]苯基]-苯甲酰胺);JNK-抑制剂IX(N-(3-氰基-4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩-2-基)-1-萘甲酰胺)。

[0254] 在另一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是JNK抑制剂和p38MAP激酶抑制剂。在某些实施方案中,该p38MAP激酶抑制剂选自SB203580(4-(4-(4-氟苯基)-2-(4-(甲基亚磺酰基)苯基)-1H-咪唑-5-基)吡啶)、LY228820(5-(2-叔丁基-4-(4-氟苯基)-1H-咪唑-5-基)-3-新戊基-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-胺二甲磺酸盐)、PD169316(4-(4-氟苯基)-2-(4-硝基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)、PH-797804(3-(4-(2,4-二氟苄氧基)-3-溴-6-甲基-2-氧代吡啶-1(2H)-基)-N,4-二甲基苯甲酰胺)、SB202190(4-(4-(4-氟苯基)-5-(吡啶-4-基)-1H-咪唑-2-基)苯酚)、BIRB 796(达马莫德;1-(3-叔丁基-1-对甲苯基-1H-吡啶-5-基)-3-(4-(2-吗啉基乙氧基)萘-1-基)脲)、VX-702(1-(5-氨基甲酰基-6-(2,4-二氟苯基)吡啶-2-基)-1-(2,6-二氟苯基)脲)以及TAK-715(N-[4-[2-乙基-4-(3-甲基苯基)-5-噻唑基]-2-吡啶基]-苯甲酰胺)。

[0255] 在进一步的实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是PI3K抑制剂。在某些实施方案中,该PI3K抑制剂选自dactolisib(2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)苯基]丙腈)、GDC-0941(2-(1H-吡啶-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)-1-哌嗪基]甲基]-4-(4-吗啉基)噻吩并[3,2-d]嘧啶)、LY294002(2-(4-吗啉

基)-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、idealalisib(5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹唑啉酮)、burparlisib(5-(2,6-二吗啉基嘧啶-4-基)-4-(三氟甲基)吡啶-2-胺)、GDC-0032(4-[5,6-二氢-2-[3-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-1,2,4-三唑-5-基]咪唑并[1,2-d][1,4]苯并氧氮杂萘-9-基]- α,α -二甲基-1H-吡唑-1-乙酰胺)、PI-103(3-(4-(4-吗啉基)吡啶并[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基)苯酚)、NU7441(8-(4-二苯并噻吩基)-2-(4-吗啉基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、GSK2636771(2-甲基-1-[[2-甲基-3-(三氟甲基)苯基]甲基]-6-(4-吗啉基)-1H-苯并咪唑-4-甲酸)、IPI-145(8-氯-2-苯基-3-[(1S)-1-(9H-嘌呤-6-基氨基)乙基]-1-(2H)-异喹啉酮)、XL147(N-(3-(苯并[c][1,2,5]噻二唑-5-基氨基)喹啉-2-基)-4-甲基苯磺酰胺)、TGX-221(7-甲基-2-(4-吗啉基)-9-[1-(苯基氨基)乙基]-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮)、PIK-90(N-(7,8-二甲氧基-2,3-二氢-咪唑并[1,2-c]喹唑啉-5-基)-烟酰胺)、渥曼青霉素(11-(乙酰氧基)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-八氢-1-(甲氧基甲基)-9a,11b-二甲基-, (1S,6bR,9aS,11R,11bR)-3H-氟[4,3,2-de]茚并[4,5-h]-2-苯并吡喃-3,6,9-三酮)、VS-5584(5-[8-甲基-9-(1-甲基乙基)-2-(4-吗啉基)-9H-嘌呤-6-基]-2-嘧啶胺)和TG-100703(3-(2,4-二氨基-6-蝶啶基)-苯酚)。

[0256] 在一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是IRE-1抑制剂。在某些实施方案中,该IRE-1抑制剂选自IRE1抑制剂I(N-[(2-羟基萘-1-基)亚甲基]噻吩-2-磺酰胺)、IRE1抑制剂II(3'-甲酰基-4'-羟基-5'-甲氧基联苯基-3-甲酰胺)以及IRE1抑制剂III(8-甲酰基-7-羟基-4-甲基香豆素,7-羟基-4-甲基-2-氧代-2H-色烯-8-甲醛)。

[0257] 在一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是钙蛋白酶抑制剂。在某些实施方案中,该钙蛋白酶抑制剂选自钙蛋白酶抑制剂I(N-乙酰基-Leu-Leu-正亮氨酸-CHO)、钙蛋白酶抑制剂II(N-乙酰基-Leu-Leu-Met)、钙蛋白酶抑制剂III(Z-Val-Phe-CHO)、钙蛋白酶抑制剂IV(Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂V(吗啉基酰脲基;-Val-高苯丙氨酸-CH₂F)、钙蛋白酶抑制剂VI(4-氟苯基磺酰基-Val-Leu-CHO)、钙蛋白酶抑制剂X(Z-Leu- α -氨基丁酸-CONHC₂H₅)、钙蛋白酶抑制剂XI(Z-L- α -氨基丁酸-CONH(CH₂)₃-吗啉)和钙蛋白酶抑制剂XII(Z-L-正缬氨酸-CONH-CH₂-2-吡啶基)。

[0258] 在一个实施方案中,所述方法中使用的至少一种凋亡抑制剂是胱天蛋白酶-1抑制剂。在某些实施方案中,该胱天蛋白酶-1抑制剂选自胱天蛋白酶-1抑制剂II(Ac-YVAD-氯甲基甲酮)、N-(2-喹啉基)缬氨酰-天冬氨酰-(2,6-二氟苯氧基)甲基甲酮(其中天冬氨酰残基是 α -甲基化或非 α -甲基化的)、VX-765((S)-1-((S)-2-(4-氨基-3-氯苯甲酰氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-N-((2R,3S)-2-乙氧基-5-氧代-四氢呋喃-3-基)吡咯烷-2-甲酰胺)和ZVAD-氟甲基甲酮。

[0259] 在另一个方面,所述方法中使用的再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种ER蛋白伴侣诱导剂。在某些实施方案中,该ER蛋白伴侣诱导剂选自BIX、丙戊酸盐和锂。

[0260] 在另一个方面,所述方法中使用的再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种自噬诱导剂。在某些实施方案中,该自噬诱导剂选自氟司必林、三氟拉嗪、匹莫齐特、尼卡地平、尼古地平、洛哌丁胺、胺碘酮、雷帕霉素、白藜芦醇和SMER。

[0261] 在另一个方面,所述方法中使用的再水化制剂包含至少一种凋亡抑制剂和至少一种存活蛋白。在一个实施方案中,该存活蛋白为Bcl-xL。

[0262] 在某些实施方案中,所述至少一种凋亡抑制剂是可逆凋亡抑制剂。在所述方法中,

可使用可逆凋亡抑制剂在预脱水和/或再水化阶段中处理细胞以使细胞载有保护量的凋亡抑制剂,例如,以阻断一种或多种ER应激通路激活,以使得在预脱水制剂和/或再水化制剂去除和细胞重悬时可逆抑制剂最终从细胞中稀释以避免延长的暴露时间。

[0263] 试剂盒

[0264] 在某些其他方面,提供了试剂盒,其包含含有干燥储存稳定剂的液体脱水制剂,用于放置一种或多种细胞以进行基本干燥储存的样品容器,以及包含关于使用所述液体脱水制剂将一种或多种细胞基本干燥储存的使用说明的包装插页。在某些实施方案中,该脱水制剂进一步包含至少一种凋亡抑制剂,并且仍可进一步包含含有至少一种凋亡抑制剂的再水化缓冲液。

[0265] 在某些其他实施方案中,所述试剂盒进一步包含用于在脱水前固定一种或多种细胞的固体支持体,包含至少一种凋亡抑制剂的预脱水制剂,包含至少一种干燥储存稳定剂的、用于所述一种或多种细胞的基本干燥储存的脱水制剂,以及包含关于将所述一种或多种细胞固定至所述固体支持体以及关于采用所述预脱水制剂和脱水制剂将一种或多种细胞基本干燥储存的说明的包装插页。在又一个实施方案中,所述试剂盒可进一步包含再水化缓冲液,该再水化缓冲液包含至少一种凋亡抑制剂。

[0266] 用于筛选制剂的通用方案

[0267] 可采用以下方案来分析和选择用于细胞的基本干燥储存的预脱水制剂、脱水制剂和/或再水化制剂及其组合,该细胞在再水化后至少一小时保持至少一种功能性质。简而言之,将细胞接种到96孔板(20,000个细胞/孔)中的DMEM培养基或预脱水制剂(例如,DMEM培养基+至少一种凋亡抑制剂)中,并于37℃下温育1小时至最多24小时。温育后,将培养基从细胞中吸出并丢弃,并且向每个孔中添加10 μ l脱水制剂。将开放的96孔板在37℃下温育,如果干燥半满的96孔板则温育75分钟,或者如果干燥全满的96孔板则温育95分钟。将干燥的细胞在室温下储存1小时并采用可变量的包含至少一种凋亡抑制剂的再水化制剂或在完全DMEM培养基中再水化。将再水化的细胞在37℃的CO₂调节的培养箱中温育1小时或24小时的时间段。在指定的时间点,向再水化的细胞添加台盼蓝,并采用细胞计数器对细胞进行计数。通过台盼蓝染色的细胞的数目除以细胞总数来确定细胞存活百分比,从而确定非存活细胞的分数,并随后计算存活细胞的百分比。

[0268] 用于测定细胞的功能性质的试验

[0269] 本发明的基本干燥储存的细胞在再水化时保持至少一种该细胞在经历脱水前的功能性质。所述一种功能性质可选自:代谢活性,细胞活力,增殖、分化、响应于信号刺激(如生长因子引起的)以及表达预期细胞生物标志物(如RNA合成、蛋白质)的能力,和或分泌功能。这些功能性质可采用任何方法来检测或分析,该方法包括本文公开的方法以及本领域技术人员已知的其他方法。下文描述了用于检测再水化的干燥储存细胞的至少一种功能性质的示例性方法。

[0270] 1. 细胞活力测定

[0271] 可采用台盼蓝染色程序来测量细胞活力。台盼蓝是一种具有带负电荷的生色团的染料,除非细胞膜受损,否则其不与细胞相互作用,因此活细胞排斥该染料,而在显微镜下检查时受损的细胞呈蓝色。在Leitz Fluovert显微镜下一式三份在带有格室(Grid Chambers) (Hycor)的9mm KOVA载玻片上进行细胞计数。报告了相对于未处理的对照细胞的

细胞存活百分比。

[0272] 2. ATP含量测定

[0273] 可根据制造商的说明采用Cell Titer-Glo发光法细胞活力测定 (Cell Titer-Glo Luminiscent Cell viability Assay) (Promega) 来测定ATP含量。将Cell Titer-Glo Luminiscent试剂添加至细胞产生了与细胞内ATP的量成比例的发光信号。ATP的量与培养物中存在的细胞的数目成正比,因此它是一种在再水化的细胞制备物中测定活(代谢活性)细胞数目的均相法。

[0274] 3. 胱天蛋白酶测定

[0275] 可根据制造商的说明采用胱天蛋白酶-Glo 3/7测定 (Caspase-Glo3/7 Assay) (Promega) 来测量细胞凋亡的程度。简而言之,该测定提供含有四肽序列DEVD的促发光 (pro-luminescent) 胱天蛋白酶-3/7底物。该底物被裂解以释放氨基荧光素(一种用于产生光的荧光素酶底物)。单一胱天蛋白酶-Glo 3/7试剂的添加导致细胞裂解,随后导致底物的胱天蛋白酶裂解以及发光信号的产生。胱天蛋白酶活化的倍数计算为在标准组织培养条件下培养的测试样品中的活性与未处理的细胞的活性之比。

[0276] 以说明而非限制的方式提供以下的实施例。

[0277] 实施例1

[0278] 在再水化后五天,示例性制剂保持活细胞并防止基本干燥储存的细胞的细胞凋亡

[0279] 该实施例表明,在环境温度下基本干燥储存5小时后再水化后多达5天,本文所述的示例性预脱水制剂、脱水制剂和再水化制剂保持细胞活力并防止细胞被诱导凋亡。

[0280] 采用预定的预脱水制剂(SC1 (salubrinal) 和SC3 (MLS-0315763)) 将HeLa细胞基本干燥储存,然后用表1所示的制剂亚组处理,并在96孔板中脱水且在环境温度下储存5小时。采用再水化制剂(RC1 (salubrinal) 和RC3 (MLS-0315763)) 将细胞再水化,并且通过向96孔板中添加CellTiter-glo来测量ATP含量。在细胞裂解后,将50 μ l样品转移至白色384孔板中进行定量。通过测量ATP发光来测定基本干燥储存的细胞的细胞活力。

[0281] 此外,在再水化后5天测定那些显示阳性ATP活性的基本干燥储存的细胞的ATP含量。如表2所示,所有的无制剂对照细胞在第5天均是不存活的,而大部分的采用本文所述的制剂和方法基本干燥储存的细胞仍保持存活(高达90%的细胞活力),显示了完整的、代谢活性细胞的稳定化。

[0282] 还通过测量胱天蛋白酶活性对再水化的细胞进行分析,以确定基本干燥储存5天随后再水化5天是否导致细胞凋亡的诱导。将再水化5天的细胞暴露于胱天蛋白酶-glo (Promega) 以检测胱天蛋白酶3/7的活性。胱天蛋白酶活化计算为在标准组织培养条件下培养的测试样品中的活性与未处理的细胞的活性之比(表2)。一或低于一的结果被认为是表明不存在升高的胱天蛋白酶活性且表明没有观察到凋亡的结果。

[0283] 表2

[0284] 在再水化后五天,示例性制剂保持活细胞并防止基本干燥储存的细胞的细胞凋亡

[0285]

制剂	%细胞活力	胰天蛋白酶 3/7 活化的倍数
NF 对照	0	0.25
SC3 + MCS41 + RC3	88	0.7
SC3 + MCS21 + RC3	90	0.7
SC1 + MCS41 + RC1	79	1.0
SC1 + MCS43 + RC1	78	0.8
SC1 + MCS42 + RC1	60	0.5

[0286] 如表2所示,相对于背景值没有或几乎没有观察到可检测的胰天蛋白酶活性,表明在干燥储存5天并随后再水化至少5天后没有诱导凋亡。

[0287] 实施例2

[0288] 在基本干燥储存后再水化后七天,示例性制剂保持活细胞

[0289] 该实施例表明,本文所述的示例性制剂能够使活HeLa细胞在再水化后保持至少七小时。

[0290] 简而言之,采用预定的预脱水制剂(SC1 (salubrinal) 和SC3 (MLS-0315763)) 和表1所示的脱水制剂亚组将HeLa细胞基本干燥储存七小时,随后采用以下列出的再水化制剂(RC1 (salubrinal) 和RC3 (MLS-0315763)) 再水化。采用台盼蓝法,在再水化后七天对细胞活力进行评价。结果在表3和图4中示出。

[0291] 表3

[0292] 在基本干燥储存后再水化后七天,示例性制剂保持活细胞

[0293]	制剂	% HeLa 细胞活力
	NF 对照	0
	海藻糖	0
	SC1 + MCS41 + RC1	65
	SC1 + MCS42 + RC1	75
	SC1 + MCS43 + RC1	30
	SC3 + MCS41 + RC3	35

[0294] 如表3所示,在再水化七小时后,未受到保护的对照和海藻糖稳定化的细胞没有产生任何活细胞,而本发明的示例性制剂以不同程度保持HeLa细胞活力多达七小时,从而导致相对于金标准海藻糖干燥的细胞的显著的改善。

[0295] 实施例3

[0296] 在基本干燥储存至少120小时期间,包含靶向ER应激通路的示例性凋亡抑制剂的制剂保持细胞活力

[0297] 该实施例表明,当在本文所述的制剂、组合物和方法中使用,靶向ER应激通路的不同步骤的多种凋亡抑制剂能够将细胞在环境温度下基本干燥储存至少24小时。

[0298] 简而言之,将人新生儿成纤维细胞悬浮于Cascade培养基 (Cascade Media) 106中,并以每个试验100-5000个细胞的密度将100 μ l培养物接种在96孔板中,并且在环境气氛的环境下温育,同时保持升高的CO₂水平 (5%-10%) 和37℃的温度以及85-95%的相对湿度。将培养物调整为预脱水制剂的特定组成和每种凋亡抑制剂的培养基特定浓度。将细胞在37℃下温育至少一小时但不超过3小时的一段时间。彻底去除预脱水制剂,并且向每个孔中添加10-15 μ l的MCS脱水制剂41 (表1)。将细胞在37℃、5%CO₂、20%相对湿度下基本风干90分钟,在环境温度下储存24、48或120小时。在合适的时间,通过用再水化制剂处理将基本干燥储存的细胞再水化,该再水化制剂包含与100-200 μ l预脱水制剂中相同浓度的凋亡抑制剂。通过如本文所述测量ATP含量来确定细胞活力。

[0299] 结果在表4中示出:

[0300] 表4

[0301] 在基本干燥储存至少120小时期间,包含靶向ER应激通路的示例性凋亡抑制剂的制剂保持细胞活力

[0302] %细胞活力

[0303]

通路	靶标	抑制剂	24hr	48hr	120hr
----	----	-----	------	------	-------

NF对照	-	无	0.0	0.0	0.0
细胞	-	海藻糖	7.5	0.0	0.0
ER应激	ASK-1	MLS-0315763	103.4	76.1	55.9
ER应激	PI3K	LY294002	83.8	85.9	98.7
ER应激	GSK3b	CHIR98014	96.9	72.6	71.9
ER应激	ASK-1	NDQI-1	99.2	100.0	76.9
自噬诱导剂	mTor	雷帕霉素	88.4	73.2	90.0
ER应激	NRF2	L-萝卜硫素	98.8	65.3	50.9
ER应激	eIf2- α	Salubrinal	100.0	72.9	109.5
增殖	MEK 1/2	PD032591	100.0	85.1	95.7

[0304] 如表4所示,在干燥储存后120小时,靶向ER应激通路中的不同步骤的示例性凋亡抑制剂保持了大量活细胞,该活细胞保持至少一种功能性质。通过24hr的干燥储存,未处理的对照和用金标准海藻糖处理的细胞没有或几乎没有保持活细胞,而本文所述的制剂和方法导致显著的细胞活力,并且细胞在基本干燥储存至少120小时的时间内仍保持存活。

[0305] 实施例4

[0306] 在再水化后至少两周的时间内,基本干燥储存的间充质干细胞保持分化能力

[0307] 该实施例表明,间充质干细胞(MSC)在环境温度下基本干燥储存至少两周后保持其分化能力。

[0308] 将MSC采用100纳摩尔到2000纳摩尔的salubrinal和表1中所示的MSC制剂205基本干燥储存,并在室温下储存两周。将基本干燥储存的细胞在包含相似浓度的salubrinal的再水化制剂的存在下再水化,在典型的培养条件(37°C、5%CO₂、85-95%RH)下温育一小时,并在此时将培养基更换为MSC生长培养基并使之恢复且增殖48小时,并作为单层(图3A-C)或作为微团培养物(micromass cultures)(图3D)传代至12孔板中,之后暴露于由LifeTechnologies™提供的StemPro™脂肪形成(Adipogenesis)(B)、骨生成(Osteogenesis)(C)以及软骨形成(Chondrogenesis)(D)试剂盒培养基制品中;每3天用进料处理细胞21-30天。相对于未分化的MSC培养物(A)的表型的明显变化是显而易见的,其中明显的脂质小球与(B)中可见的脂肪细胞一致,含钙的沉积物与(C)中的骨细胞一致,且柱样生长与(D)中的软骨细胞一致,表明本文所述的制剂保持MSC的分化潜能的能力而并不妨碍MSC的分化潜能。

[0309] 除非上下文另有要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含”及其变化形式如“包括”和“含有”应理解为开放式包容性含义,即应理解为“包括但不限于”。

[0310] 贯穿本说明书对“一个实施方案”或“实施方案”或“方面”的提及意指结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,贯穿本说明书在各个位置中出现的措词“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定都指代相同的实施方案。此外,特定的特征、结构或特性可以在一个或多个实施方案中以任何合适的方式组合。

[0311] 尽管本文中已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将会想到多种变化、改变和替代。应当理解,本文中所述的本发明实施方案的各种替代方

案可用于实施本发明。目的在于以下述权利要求限定本发明的范围,并由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。



图1A

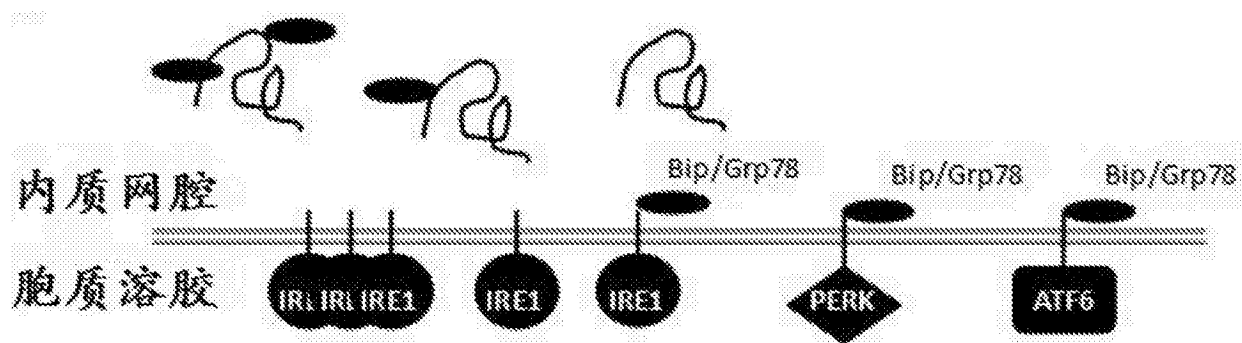


图1B

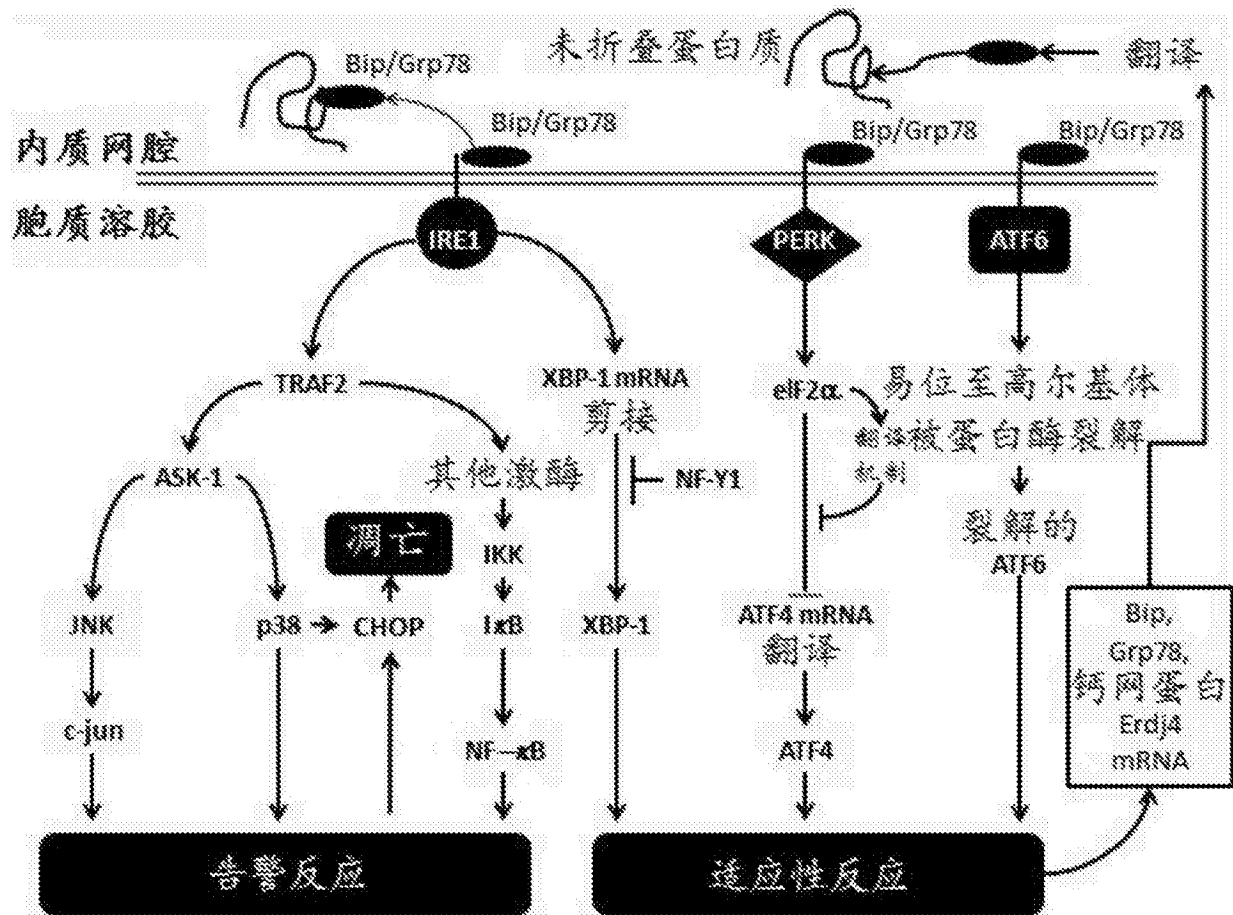


图2A

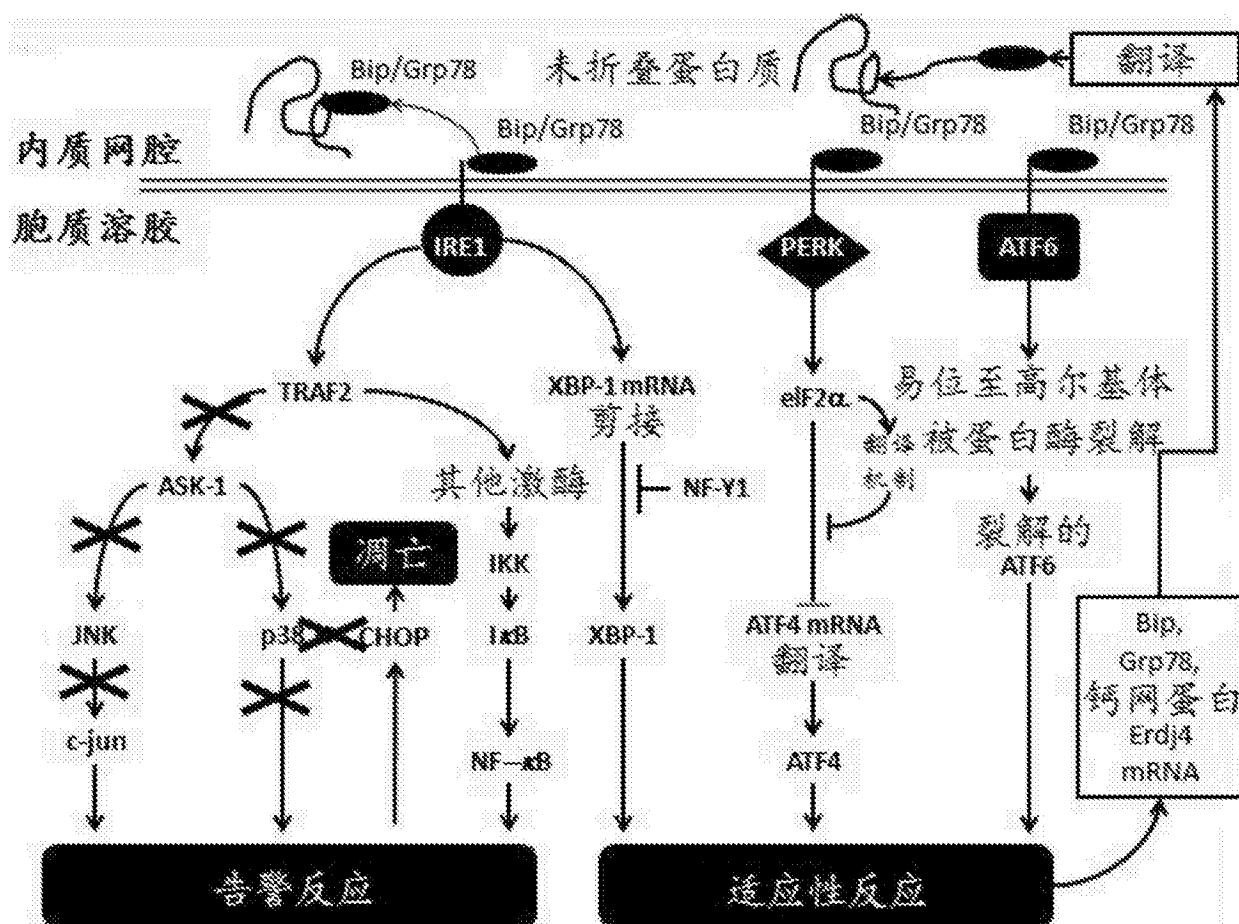


图2B

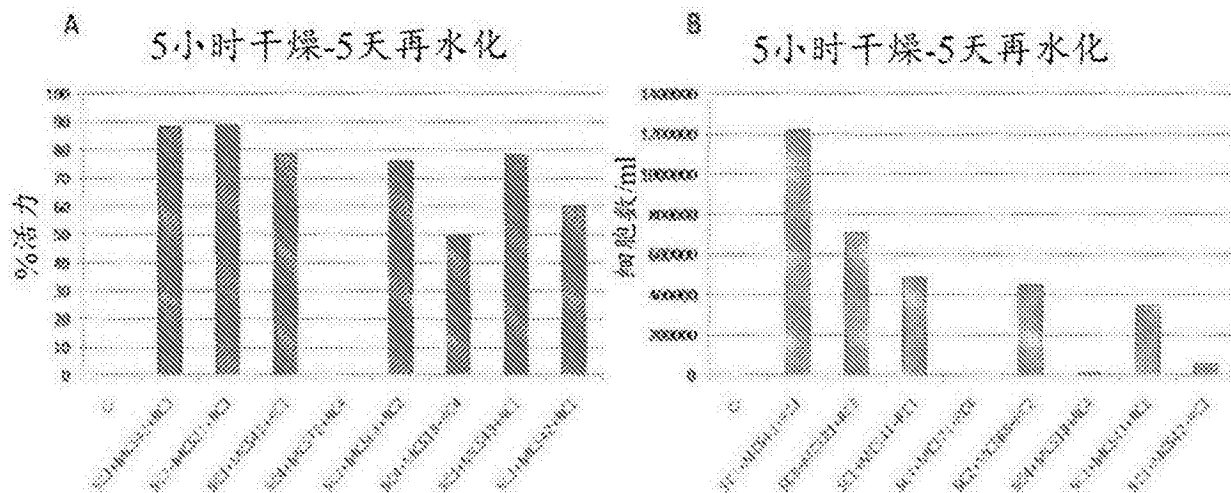


图3A-B

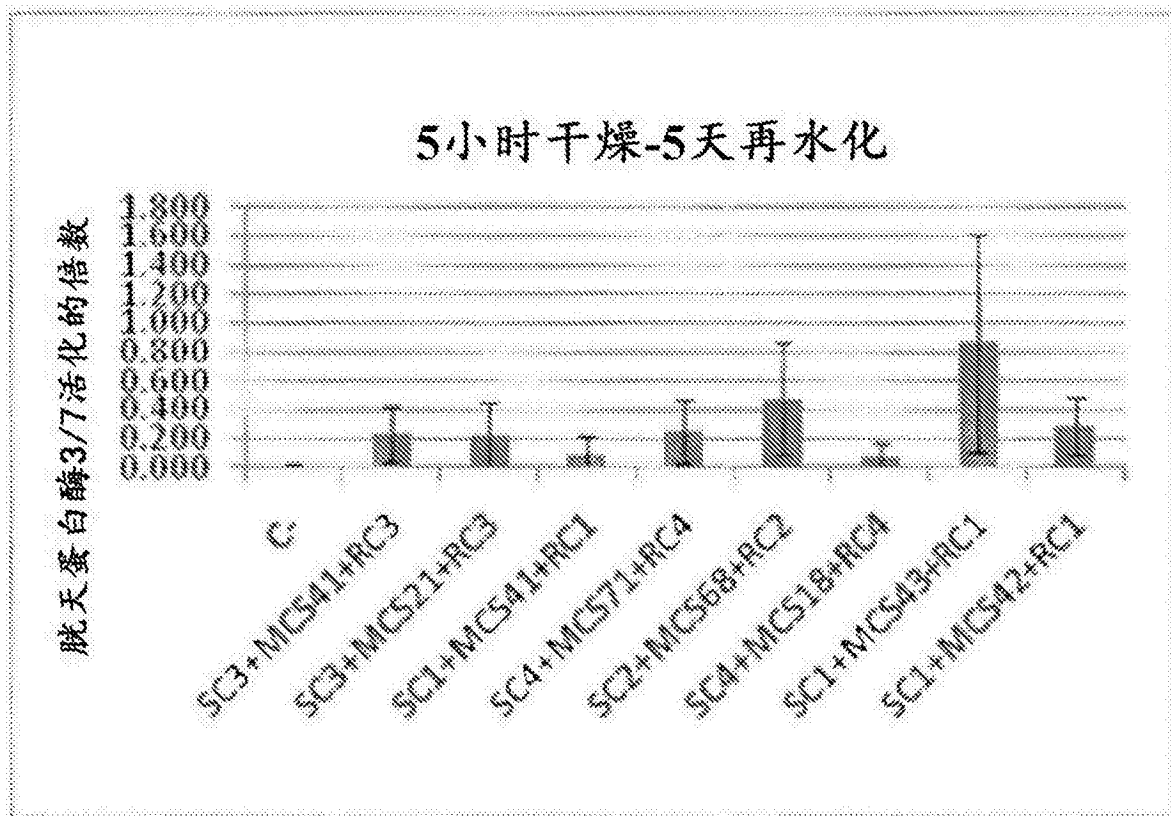


图4

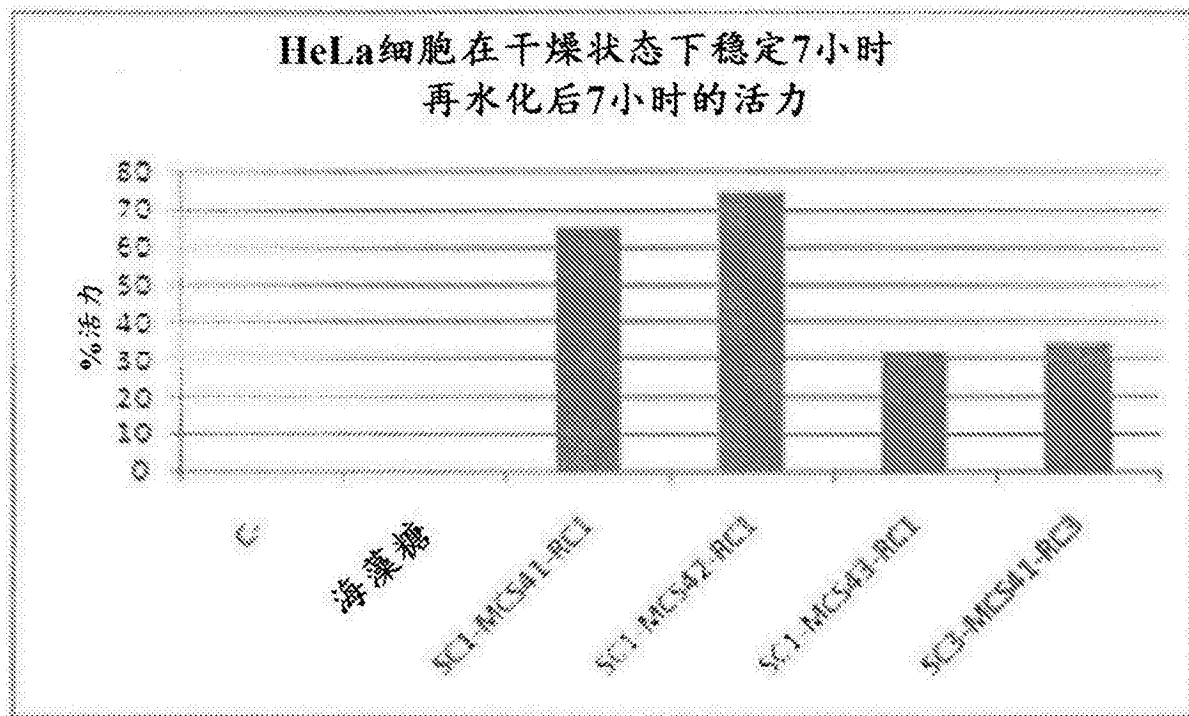


图5

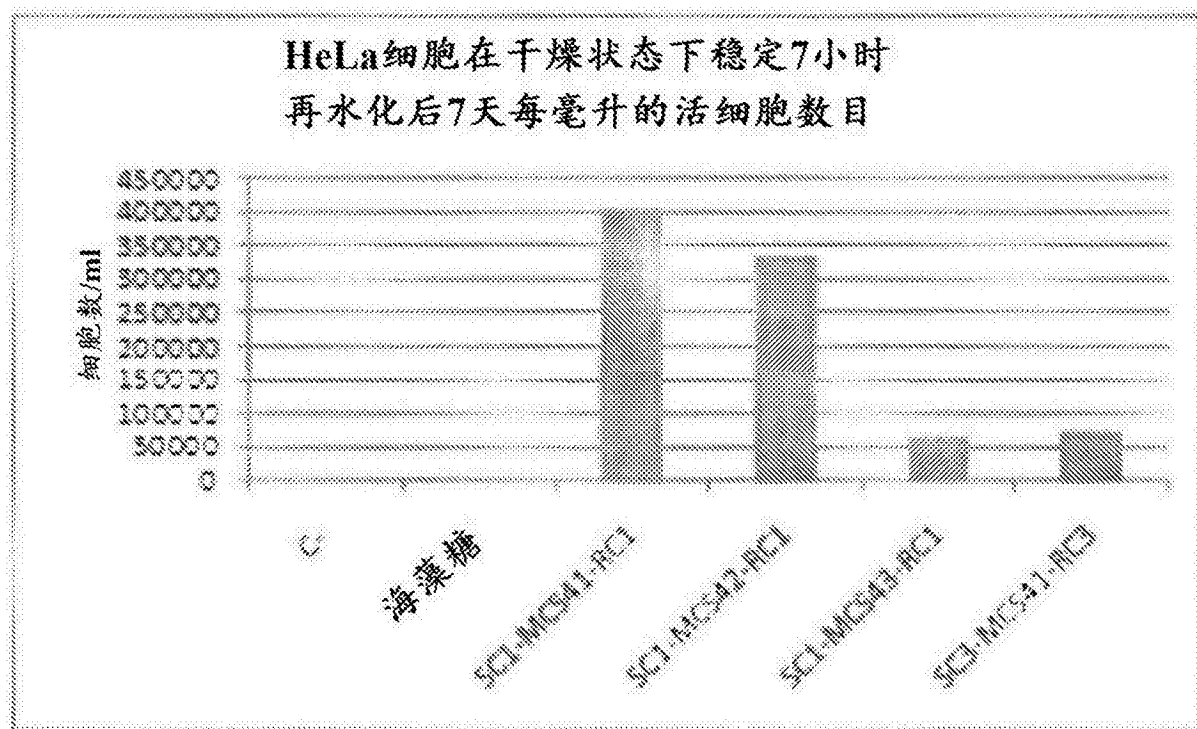


图6