(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119923459 A
(43)申请公布日 2025.05.02

(21)申请号 202380068426.8
(22)申请日 2023.07.27
(30)优先权数据
2022-120891 2022.07.28 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/027582 2023.07.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/024892 JA 2024.02.01
(71)申请人 公立大学法人山阳小野田市立山口东京理科大学
地址 日本山口县
(72)发明人 原屈口道子
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 杨宏军 焦成美
(51)Int.Cl.
C12N 1/04(2006.01)
C12N 5/00(2006.01)

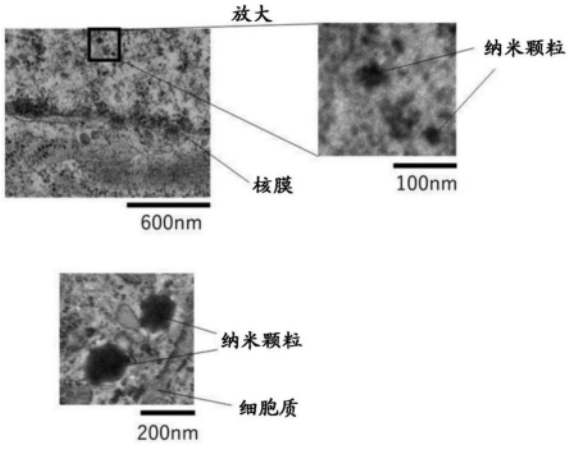
权利要求书1页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

冷冻保存用组合物、冷冻保存方法、及经冷冻的细胞或生物体组织

(57)摘要

本发明的课题为提供减少由冷冻保存导致的细胞受损的冷冻保存用组合物、提供减少由冷冻保存导致的细胞受损的冷冻保存方法。制作细胞或生物体组织的冷冻保存用组合物，所述细胞或生物体组织的冷冻保存用组合物包含纳米颗粒，所述纳米颗粒以两亲性分子作为构成成分，前述两亲性分子为单层或双层。



CN 119923459 A

1.细胞或生物体组织的冷冻保存用组合物,其包含纳米颗粒,所述纳米颗粒以两亲性分子作为构成成分,所述两亲性分子为单层或双层。

2.如权利要求1所述的冷冻保存用组合物,其中,所述纳米颗粒为阳离子性纳米颗粒。

3.如权利要求1或2所述的冷冻保存用组合物,其特征在于,所述两亲性分子为Gemini型表面活性剂。

4.如权利要求1或2所述的冷冻保存用组合物,其中,所述纳米颗粒的Zeta电位为10mV以上50mV以下。

5.如权利要求1或2所述的冷冻保存用组合物,其中,所述纳米颗粒的体积平均粒径为30nm以上300nm以下。

6.如权利要求1或2所述的冷冻保存用组合物,其中,所述纳米颗粒内包阿魏酸或活性维生素C。

7.细胞或生物体组织的冷冻保存方法,其包括:

将细胞或生物体组织与权利要求1～6中任一项所述的冷冻保存用组合物混合并将纳米颗粒导入细胞或生物体组织内的工序;和

将已导入所述纳米颗粒的细胞或生物体组织冷冻的工序。

8.经冷冻的细胞或生物体组织,其包含纳米颗粒,所述纳米颗粒以两亲性分子作为构成成分,所述两亲性分子为单层或双层。

冷冻保存用组合物、冷冻保存方法、及经冷冻的细胞或生物体组织

技术领域

[0001] 本发明涉及冷冻保存用组合物、冷冻保存方法、经冷冻的细胞或生物体组织。

背景技术

[0002] 再生医疗是使用细胞等治疗疾病、外伤等的治疗方法。近年来,再生医疗被用作心肌梗塞、慢性动脉阻塞、白血病等各种各样的疾病、脊髓损伤、外伤性软骨缺损等外伤的治疗方法。一直以来,从传输性、长期保存性、便利性等的观点考虑,用于再生医疗的细胞等使用经冷冻保存的细胞。然而,将细胞冷冻保存时,容易发生细胞存活率的降低、细胞的功能受损(例如,干细胞的情况下为干细胞比例的降低)、增殖阻遏等现象(以下,也将这些现象总称为“细胞受损”。)。作为其主要原因,可以考虑在细胞经过冷冻时细胞内所含的水分结晶化,结晶使得细胞壁、细胞器等损伤,或者在细胞经解冻时细胞内的水分部分丧失从而细胞的形状变化。

[0003] 作为将细胞冷冻而进行保存的细胞冷冻保存法之一,已知如专利文献1中所记载的那样,在含有二甲基亚砜(DMSO)等低分子化合物的缓冲溶液中对细胞进行冷冻的方法。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本专利第5773347号公报

发明内容

[0007] 发明所要解决的课题

[0008] 但是,就使用DMSO的方法而言,细胞解冻后的细胞存活率低,存在改善的余地。本发明是在这样的情况下完成的。

[0009] 本发明的一个实施方式所要解决的课题为提供减少由冷冻保存导致的细胞受损的、细胞或生物体组织的冷冻保存用组合物。

[0010] 本发明的另一个实施方式所要解决的课题为提供减少由冷冻保存导致的细胞受损的、细胞或生物体组织的冷冻保存方法。

[0011] 用于解决课题的手段

[0012] 用于解决前述课题的具体手段包含下述方案。

[0013] <1>细胞或生物体组织的冷冻保存用组合物,其包含纳米颗粒,所述纳米颗粒以两亲性分子作为构成成分,前述两亲性分子为单层或双层。

[0014] <2>如上述<1>所述的冷冻保存用组合物,其中,前述纳米颗粒为阳离子性纳米颗粒。

[0015] <3>如上述<1>或<2>所述的冷冻保存用组合物,其特征在于,前述两亲性分子为Gemini型表面活性剂。

[0016] <4>如上述<1>或<2>所述的冷冻保存用组合物,其中,前述纳米颗粒的Zeta

电位为10mV以上50mV以下。

[0017] ＜5＞如上述＜1＞或＜2＞所述的冷冻保存用组合物,其中,前述纳米颗粒的体积平均粒径为30nm以上300nm以下。

[0018] ＜6＞如上述＜1＞或＜2＞所述的冷冻保存用组合物,其中,前述纳米颗粒内包阿魏酸或活性维生素C。

[0019] ＜7＞细胞或生物体组织的冷冻保存方法,其包括:

[0020] 将细胞或生物体组织与上述＜1＞～＜6＞中任一项所述的冷冻保存用组合物混合并将纳米颗粒导入细胞或生物体组织内的工序;和

[0021] 将已导入前述纳米颗粒的细胞或生物体组织冷冻的工序。

[0022] ＜8＞经冷冻的细胞或生物体组织,其包含纳米颗粒,所述纳米颗粒以两亲性分子作为构成成分,前述两亲性分子为单层或双层。

[0023] 发明效果

[0024] 根据本发明的一个实施方式,可提供减少由冷冻保存导致的细胞或生物体组织的受损的、细胞或生物体组织的冷冻保存用组合物。

[0025] 根据本发明的另一个实施方式,可提供减少由冷冻保存导致的细胞或生物体组织的受损的、细胞或生物体组织的冷冻保存方法。

附图说明

[0026] [图1]为示出试验例1中实施例3的组合物所含的纳米颗粒的粒径的分布的图。

[0027] [图2]为示出试验例3中使用透射电子显微镜观察已被导入细胞内的纳米颗粒的结果的图。

具体实施方式

[0028] 以下,对本发明的实施方式进行说明。这些说明及实施例是本发明的示例,并不限制本发明的范围。

[0029] 本说明书中使用“～”表示的数值范围表示包含“～”前后所记载的数值分别作为最小值及最大值的范围。

[0030] ＜细胞冷冻保存用组合物＞

[0031] 本实施方式涉及的细胞或生物体组织的冷冻保存用组合物(以下,也称为“本申请的冷冻保存用组合物”)包含以两亲性分子作为构成成分、前述两亲性分子为单层或双层的纳米颗粒(以下,也称为“本申请的纳米颗粒”)。

[0032] 若将本申请的冷冻保存用组合物与细胞或生物体组织混合,则本申请的纳米颗粒能够被导入细胞或构成生物体组织的细胞内。即,本申请的纳米颗粒被导入细胞内。

[0033] 就在本申请的纳米颗粒已被导入细胞内的状态下冷冻后的细胞或生物体组织而言,本申请的纳米颗粒针对施加于细胞的外力、温度变化示出缓和功能(缓冲功能),从而抑制细胞内所含的水分的结晶化及晶体成长,并且,细胞壁及细胞器等变得不易被损伤。另外,就在本申请的纳米颗粒已被导入细胞内的状态下冷冻后的细胞而言,即使在进行了解冻时,细胞的形状也因存在本申请的纳米颗粒而变得容易得到维持。可以认为其结果是减少由冷冻保存导致的受损。

[0034] 需要说明的是,一直以来,脂质体及胶束等纳米颗粒被用作药物传递系统等用于将药理成分导入对象部位的技术。相对于此,本公开文本涉及的发明着眼于本申请的纳米颗粒自身针对细胞的缓冲功能,基于下述见解:本申请的纳米颗粒所具备的物理性质有效地作用于由细胞的冷冻保存引起的细胞受损的减少。

[0035] [纳米颗粒]

[0036] 本申请的冷冻保存用组合物包含纳米颗粒,所述纳米颗粒以两亲性分子作为构成成分,前述两亲性分子为单层或双层。本申请的冷冻保存用组合物可以仅包含单层的纳米颗粒,可以仅包含双层的纳米颗粒,也可以包含单层的纳米颗粒和双层的纳米颗粒这两者。

[0037] 上述单层的纳米颗粒表示两亲性分子以形成单层的方式聚集而得的纳米颗粒。作为单层的纳米颗粒,具体而言可举出胶束。另外,上述双层的纳米颗粒表示包含两亲性分子呈双层而形成的双层膜的纳米颗粒。作为上述双层的纳米颗粒,具体而言可举出(1)以脂质作为构成成分并且包含该脂质的双层膜的囊泡即脂质体;(2)以除了脂质以外的表面活性剂作为构成成分并且包含该表面活性剂的双层膜的囊泡。上述包含双层膜的囊泡可以是具有1片双层膜的小单室脂质体(SUV)、大单室脂质体(LUV),也可以是具有2片以上双层膜的多囊脂质体(MVLs)。

[0038] 另外,本申请的纳米颗粒中包含胶束的情况下,该胶束优选为亲水基团聚集于外侧、疏水基团聚集于内侧的胶束。

[0039] 本申请的纳米颗粒的体积平均粒径可举出10nm以上300nm以下,可以是20nm以上200nm以下,也可以是30nm以上150nm以下。

[0040] 本申请的纳米颗粒的体积平均粒径越小则越容易分布于细胞的各处,对细胞进行了冷冻时,细胞的形状更容易得到维持。

[0041] 本申请的纳米颗粒的体积平均粒径为300nm以下时,本申请的纳米颗粒更容易被高效地导入细胞内。

[0042] 控制本申请的纳米颗粒的体积平均粒径的方法没有特别限定,例如,可举出通过在制造本申请的纳米颗粒时使用的过滤器的孔径进行调整的大小调节(sizing)等方法等。具体而言,可举出对本申请的纳米颗粒加压以使其通过具有细孔的过滤器、利用物理性的剪切力来将粒径均匀化的挤出(extrusion)处理。

[0043] 本申请的纳米颗粒可以是阳离子性纳米颗粒,可以是中性纳米颗粒,也可以是阴离子性纳米颗粒,更优选为阳离子性纳米颗粒。通常,细胞内相对于细胞外处于负(阴性)的电位。因此,本申请的纳米颗粒为阳离子性纳米颗粒时,通过离子间相互作用使得本申请的纳米颗粒容易被高效地导入细胞内的广泛区域。结果,进一步减少由冷冻保存导致的细胞受损。

[0044] 阳离子性纳米颗粒是指Zeta电位大于10mV的纳米颗粒。

[0045] 中性纳米颗粒是指Zeta电位为-10mV以上10mV以下的纳米颗粒。

[0046] 阴离子性纳米颗粒是指Zeta电位小于-10mV的纳米颗粒。

[0047] 本申请的纳米颗粒的Zeta电位优选10mV以上80mV以下,更优选15mV以上70mV以下,进一步优选20mV以上60mV以下,特别优选25mV以上50mV以下。

[0048] 本申请的纳米颗粒的Zeta电位为10mV以上时,本申请的纳米颗粒的膜适度地带正电荷。因此,本申请的纳米颗粒更容易被高效地导入细胞内,进一步减少由冷冻保存导致的

细胞受损。

[0049] 本申请的纳米颗粒的Zeta电位及体积平均粒径的测定可以例如按下述方式实施。

[0050] 将本申请的冷冻保存用组合物用磷酸缓冲生理盐水(PBS,pH7.4)稀释至100倍,采集1mL所得到的溶液,填充至测定用1mL样品池(cell)。接着,利用粒径·Zeta电位测定装置(ZETASIZER PRO,Malvern公司制)于室温(25℃)对其进行测定。

[0051] 本申请的纳米颗粒的表面电荷、即Zeta电位的值受到构成本申请的纳米颗粒的两亲性分子的电荷的影响。因此,制备所期望的Zeta电位的纳米颗粒时,可举出根据其Zeta电位适宜选择或变更而使用两亲性分子、制备本申请的纳米颗粒的方法。

[0052] 作为两亲性分子,可举出表面活性剂,可以是合成的表面活性剂,也可以是天然或生物体来源的表面活性剂。

[0053] 作为合成的表面活性剂,可举出Gemini型表面活性剂。Gemini型表面活性剂在1个分子中具有亲水基团和疏水基团,通过间隔基团介由亲水基团彼此连接,为具有2个表面活性单元的二聚体表面活性剂或具有3个表面活性单元的三聚体表面活性剂。

[0054] 作为构成Gemini型表面活性剂的疏水基团,可举出碳原子数8～24、优选碳原子数12～18、更优选碳原子数12或16的直链烃链,从纳米颗粒的稳定性的观点考虑,优选为直链的饱和烃链。另外,构成2个或3个疏水基团的直链烃链可以相同也可以不同,优选为相同。

[0055] 作为构成Gemini型表面活性剂的亲水基团,可举出极性基团、离子性基团。作为使亲水基团中的抗衡离子生成的元素,可根据使用的水溶液适宜调整,可以举出溴(Br)、氯(Cl)、氮(N)、钠(Na)、磷(P)、硼(B)、碘(I)、氟(F)、硫(S)、氧(O)、碳(C)、铍(Be)、铁(Fe)、钙(Ca)、镁(Mg),也可以将它们适宜组合而使用。

[0056] 上述间隔基通常为烃链,优选具有为了赋予充分的距离以使疏水基团能够彼此独立地发挥作用的长度。作为上述间隔基的碳原子数没有特别限定,可举出2～12、优选为2～8、进一步优选为2～4、最优选2或3。

[0057] 作为天然及生物体来源的表面活性剂,可举出两亲性的脂质。作为两亲性的脂质,可以是不含磷的脂质,也可以是磷脂。另外,可以是阳离子性脂质,可以是中性脂质,可以是阴离子性脂质,也可以是它们的组合。

[0058] 作为不含磷的脂质,可举出N-(2,3-二油酰氧基-1-丙基)三甲基铵甲基硫酸盐(N-(2,3-dioleoyloxy-1-propyl)trimethylammoniummethyl sulfate)(DOTAP)、N-〔1-(2,3-油酰氧基)丙基〕-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、双十八烷基氨基甘氨酰精胺(dioctadecylamidoglycylspermine)(DOGS)等。另外,作为磷脂,可举出1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPhPE)等磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、二丁酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPhPC)等磷酸胆碱。

[0059] 两亲性分子可以由将标记物质(例如香豆素、FITC(异硫氰酸荧光素,Fluorescein Isothiocyanate)等荧光分子、马来酰亚胺基、PEG基等)导入分子内而得的表面活性剂构成。

[0060] 本申请的纳米颗粒优选含有胆固醇,更优选本申请的纳米颗粒的膜中含有胆固

醇。以在膜中含有胆固醇的方式构成本申请的纳米颗粒时,与不含胆固醇的膜相比,本申请的纳米颗粒中的膜的流动性提高。

[0061] [其他成分]

[0062] 本实施方式涉及的冷冻保存用组合物可以进一步含有除了本申请的纳米颗粒以外的其他成分(以下,也简称为“其他成分”。)。

[0063] 作为其他成分,例如,可举出本申请的纳米颗粒所内包的内包成分;分散介质、在制作本申请的纳米颗粒的过程中未形成单层或双层的两亲性分子或它们的凝集体等。

[0064] •内包成分

[0065] 内包成分是指被摄入至本申请的纳米颗粒的膜内、构成本申请的纳米颗粒的表面活性剂中的成分、内水相所内包的成分。

[0066] 作为内包成分,可举出标记物质(例如香豆素等荧光物质等)、脂溶性药物、水溶性药物、核酸、蛋白质、抗体、结晶性药物、生物体来源成分、水溶性维生素、水溶性维生素衍生物、脂溶性维生素、脂溶性维生素衍生物等成分。

[0067] 作为具体的内包成分,例如,可举出具有细胞的保护效果的活性型维生素C、活性型维生素A;作为保水成分的阿魏酸、透明质酸等。

[0068] 本申请的纳米颗粒优选内包选自由水溶性维生素、水溶性维生素衍生物、及阿魏酸组成的组中的至少1种,更优选内包阿魏酸及活性型维生素C中的至少一者。

[0069] 特别地,阿魏酸及活性型维生素C的抗氧化能力、水分保持性优异,因此,通过使本申请的纳米颗粒内包它们中的至少一者,由细胞冷冻保存导致的细胞受损进一步被抑制。

[0070] •分散介质

[0071] 本申请的纳米颗粒优选被分散于分散介质中而存在。

[0072] 作为分散介质,可举出水、缓冲液、水溶性溶剂、液体培养基等。分散介质可以单独使用1种,也可以同时使用2种以上。

[0073] 作为水,例如,可举出蒸馏水、离子交换水、超滤水、纯水等。

[0074] 相对于分散介质的总量而言,水的含量优选为70质量%以上,更优选80质量%以上90质量%以下,进一步优选90质量%以上100质量%以下。通过将水的含量设为上述数值范围内,本申请的纳米颗粒更稳定地存在。

[0075] 作为缓冲液,例如,可举出磷酸缓冲液(PBS)、三羟基甲基氨基甲烷缓冲液(TRIS)、羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES)、硼酸缓冲液、乙酸缓冲液等。

[0076] 缓冲液的浓度优选以渗透压值作为基准,在与人的血浆渗透压即285±5mOsm/L同等程度的范围内使用。

[0077] 缓冲液的pH没有特别限定,例如,从细胞存活性等的观点考虑,优选pH5以上pH10以下,更优选pH6以上pH9以下。

[0078] pH为使用pH计于25℃所测定的值(以下同样)。

[0079] 水溶性溶剂表示可与水混合的溶剂。

[0080] 作为水溶性溶剂,例如,从脂质的溶解性等的观点考虑,可举出甲醇、乙醇等醇。

[0081] 就水溶性溶剂而言,例如,可直接使用在本申请的纳米颗粒的制造工序中将所准备的脂质等两亲性分子溶解时使用的水溶性溶剂。

[0082] 作为液体培养基,例如,可举出干细胞的培养中所使用的已知的培养基。更具体而

言,作为液体培养基,例如,可举出DMEM(杜氏改良Eagle培养基,Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、DMEM:F-12(Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12)、EMEM(Eagle's minimal essential medium)及在这些培养基中添加有血小板源性生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、神经生长因子(NGF)等细胞生长因子的液体培养基等。

[0083] 液体培养基也可以是市售品。作为市售品,例如,可举出龙沙株式会社制的ADSC-BulletKit(注册商标)PT-4505等。

[0084] 液体培养基的pH(25℃条件下)可以是例如pH7.0～8.0,也可以是pH7.3～7.4。

[0085] 细胞冷冻保存用组合物的pH(25℃条件下)没有特别限定,例如,从细胞存活性等的观点考虑,优选pH4以上pH12以下,更优选pH5以上pH11以下。

[0086] •冷冻保存用组合物的制造方法

[0087] 本申请的冷冻保存用组合物的制造方法没有特别限定,可适用已知的方法。

[0088] 冷冻保存用组合物的制造方法可以是例如包括下述工序的制造方法:第1工序,将使构成本申请的纳米颗粒的膜等的成分(表面活性剂等材料(存在使本申请的纳米颗粒内包的内包成分的情况下,包含内包成分))溶解于水溶性溶剂而得的溶液与水或缓冲液混合,得到包含本申请的纳米颗粒的分散液;第2工序,对前述分散液进行过滤器处理。

[0089] 特别地,包括第2工序时,可调整本申请的纳米颗粒的粒径。

[0090] (第1工序)

[0091] 第1工序中,得到包含本申请的纳米颗粒中的至少一者的分散液。就该分散液而言,可以将使构成本申请的纳米颗粒的膜的成分溶解于水溶性溶剂(例如醇等)而得的溶液与水或缓冲液混合、控制条件(例如pH、温度)而进行制备。需要说明的是,关于构成本申请的纳米颗粒的两亲性分子,如上所述,因此省略在此处的说明。

[0092] 例如包含脂质体的分散液可以通过将乙醇与脂质混合而溶解脂质、一边调整pH一边与水混合、搅拌来进行制备。

[0093] 第1工序中,存在并非有助于形成本申请的纳米颗粒的剩余的胆固醇、磷脂等两亲性分子、进一步使纳米颗粒内包的成分的情况下,可以利用透析膜等除去未封入的成分。

[0094] 第2工序中,利用过滤器对第1工序中得到的分散液进行挤出处理。

[0095] 通过进行挤出处理,能够调整本申请的纳米颗粒的大小(大小调节)。过滤器可根据目的等而选定所期望的孔径,对已上市的市售品进行适宜选择即可。

[0096] ＜冷冻保存方法＞

[0097] 本申请的冷冻保存方法包括以下工序:将细胞或生物体组织与本申请的冷冻保存用组合物混合,将本申请的纳米颗粒导入细胞内的工序(以下,也称为“导入工序”。);和将已导入本申请的纳米颗粒的细胞或生物体组织冷冻的工序(以下,也称为“冷冻工序”。)。需要说明的是,冷冻生物体组织的情况下,上述“导入细胞内”的含义为“导入构成生物体组织的细胞内”。

[0098] 根据本申请的冷冻保存方法,可减少由冷冻保存导致的细胞受损。

[0099] 成为本申请的冷冻保存方法的冷冻对象的细胞没有特别限定,可采用供冷冻保存的已知的细胞。例如,作为细胞,可举出来源于人脂肪组织的间充质干细胞(hAD-MSC)、来源

于人骨髓的间充质干细胞(hMSC-BM)这样的间充质干细胞、神经干细胞、皮肤干细胞、造血干细胞、牙髓干细胞、肝干细胞、肌干细胞、脂肪干细胞等成体干细胞;诱导多能干细胞(iPS细胞)、胚胎干细胞(ES细胞)等多能干细胞;淋巴细胞、嗜中性细胞等血液细胞;上皮细胞、内皮细胞、肌肉细胞、成纤维细胞(皮肤细胞等)、平滑肌细胞、黑色素细胞、毛细胞、肝细胞、胃粘膜细胞、肠细胞、脾细胞、胰腺细胞(胰腺外分泌细胞等)这样的器官固有的细胞;脑细胞、肺细胞、肾细胞及脂肪细胞等已分化的细胞;胚、受精卵、精子等生殖细胞。另外,作为本申请的冷冻保存方法的冷冻对象,也可举出类器官、细胞球、细胞片、由上述细胞构成的生物体组织。

[0100] [导入工序]

[0101] 导入工序中,将细胞或生物体组织与本申请的冷冻保存用组合物混合,将本申请的纳米颗粒导入细胞(冷冻生物体组织的情况下为构成生物体组织的细胞,以下同样)内。

[0102] 培养基没有特别限定,可举出干细胞的培养中所使用的已知的培养基。例如,作为培养基,可举出前文所述的液体培养基。

[0103] 将本申请的纳米颗粒导入细胞内的手段没有特别限定,例如,可举出下述(I)~(IV)等方法:

[0104] (I)向包含细胞的培养基中添加本申请的冷冻保存用组合物的方法

[0105] (II)将包含细胞的培养基离心分离,除去上清液后,添加本申请的冷冻保存用组合物的方法

[0106] (III)将从培养容器剥离的细胞添加至本申请的冷冻保存用组合物的方法。

[0107] (IV)通过电穿孔利用电压导入细胞内的方法。

[0108] [冷冻工序]

[0109] 冷冻工序中,将已导入本申请的纳米颗粒的细胞或生物体组织冷冻。

[0110] 对细胞或生物体组织进行冷冻的手段没有特别限定,可采用已知的冷冻方法。

[0111] 作为对细胞或生物体组织进行冷冻的温度,优选为-30℃~-196℃(优选-80℃~-196℃)的范围内。就对细胞或生物体组织进行冷冻的手段而言,例如,从进一步减少由冷冻保存导致的细胞受损的观点考虑,优选使用超低温冰箱或液氮对细胞或生物体组织进行冷冻。冷冻时间没有特别限定,可举出0.5天以上50年以下,1天以上10年以下,1周以上5年以下,1个月以上1年以下。

[0112] [其他工序]

[0113] 本申请的冷冻保存方法可以进一步包括除了上述导入工序及冷冻工序以外的其他工序。作为前述其他工序,例如,可举出将经冷冻的细胞在合适的温度下保存的保存工序等。

[0114] [冷冻细胞]

[0115] 本实施方式涉及的经冷冻的细胞或生物体组织为包含本申请的纳米颗粒的冷冻细胞或生物体组织。该经冷冻的细胞或生物体组织可以通过上述的本申请的冷冻保存方法进行制作。

[0116] [实施例]

[0117] 以下举出实施例进一步具体地说明本发明。对于以下的实施例所示的材料、使用量、比例、处理步骤等,只要不超出本发明的主旨,则可以进行适当变更。因此,本发明的范

围不应当根据以下所示的具体例作限定性解释。

[0118] ＜实施例1＞

[0119] •冷冻保存用组合物的制作

[0120] 按照以下的步骤,通过有机溶剂注入法制作以DOTAP作为构成成分的双层膜囊泡,作为实施例1。

[0121] (1)向烧杯中加入5.3ml PBS(于25℃的pH＝7.4),于25℃搅拌。

[0122] (2)在离心管中混合乙醇1990μL、胆固醇38.7mg、和作为两亲性分子的脂质即DOTAP 11.1mg,使该混合液的温度为前述脂质的相变温度以上的75℃,将胆固醇和前述脂质完全溶解。需要说明的是,进行后述的细胞导入性的评价时,进一步加入荧光标记香豆素,为了防止衰减而在遮光条件下实施调整、试验。需要说明的是,香豆素为疏水性,因此主要被摄入所形成的纳米颗粒中的膜中。

[0123] (3)用注射器取前述混合液的总量,快速混合至前述PBS中。

[0124] (4)将烧杯遮光,于25℃搅拌1小时。

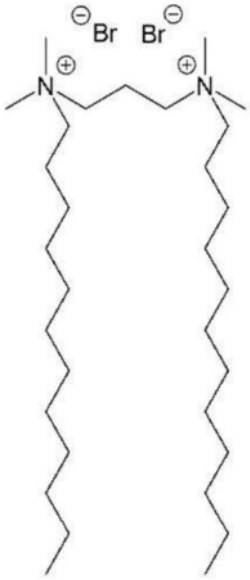
[0125] (5)使用透析膜(Spectra/Por RC Biotech Dialysis Membrane MWCO:8-10),在PBS中于室温透析4小时以上。由此,得到纳米颗粒的溶液。

[0126] (6)将得到的纳米颗粒的溶液置于Avestin公司制的LF-STB LiposoFast稳定器,一边将所使用的过滤器孔径以1000nm、800nm、400nm、200nm、100nm及50nm的顺序依次加压一边使溶液通过,由此进行大小调节。将得到的含有纳米颗粒的液体组合物作为实施例1的冷冻保存用组合物。细胞冷冻保存用组合物的pH(25℃条件下)为7.2。

[0127] ＜实施例2～5＞

[0128] 将两亲性分子的种类从DOTAP变更为DOPE、Gemini型、DPPC、DSPE,除此以外,设为与实施例1同样的规格,得到实施例2～5的冷冻保存用组合物。“Gemini型”表示“Gemini型表面活性剂”。需要说明的是,实施例3、后述的实施例8及13中使用的Gemini型表面活性剂的分子结构如下所示。其是具有2个表面活性单元的二聚体表面活性剂,疏水基团由碳原子数12的烃链组成,间隔基团的碳原子数由3组成,作为使抗衡离子生成的元素由溴及氮组成。

[0129] [化学式1]

[0130] 

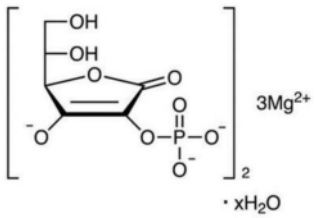
[0131] ＜实施例6～15＞

[0132] 将制作实施例1的冷冻保存用组合物的操作(1)设为如下所示的操作(1')，除此以外，通过与实施例1～5相同的方法得到实施例6～15的冷冻保存用组合物。实施例6～10依次以DOTAP、DOPE、Gemini型、DPPC、DSPE作为构成成分，是包含含有阿魏酸的纳米颗粒的冷冻保存用组合物，实施例11～15依次以DOTAP、DOPE、Gemini型、DPPC、DSPE作为构成成分，是包含含有活性型维生素C的纳米颗粒的冷冻保存用组合物。

[0133] (1')向烧杯中加入PBS(于25℃的pH＝7.4)5.3ml，作为内包成分溶解10μM阿魏酸或活性型维生素C，于25℃搅拌。

[0134] 实施例11～15中使用的活性型维生素C是指具有下述分子结构的化合物。

[0135] [化学式2]

[0136] 

[0137] ＜比较例1＞

[0138] 比较例1中，将10体积％的二甲基亚砜(DMSO)、40体积％胎牛血清(FBS)及50体积％干细胞培养基的混合液1mL制成冷冻保存用组合物。

[0139] ＜比较例2＞

[0140] 比较例2中，将不含纳米颗粒的ZNQ公司制的CELLBANKER(注册商标)1(1mL)制成冷冻保存用组合物。

[0141] 〔试验例1〕

[0142] ＜体积平均粒径及Zeta电位＞

[0143] 对于各实施例的冷冻保存用组合物，测定体积平均粒径及Zeta电位。具体而言，将实施例1～5的冷冻保存用组合物用磷酸缓冲生理盐水(PBS、pH7.4)稀释至100倍，将得到的溶液采集1mL，填充至测定用1mL样品池。然后，对其利用粒径・Zeta电位测定装置(ZETASIZER PRO、Malvern公司制)于室温(25℃)进行测定。其结果示于表1。另外，实施例1

的冷冻保存用组合物所含的纳米颗粒的粒径的分布示于图1。

[0144] [表1]

[0145]

	阳离子性纳米颗粒			中性纳米颗粒	
	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5
颗粒组成（主要成分）	DOTAP	DOPE	Gemini型	DPPC	DSPE
粒径大小范围(nm)	20.8~307	31.4~296	19.7~271	39.7~304	52.2~286
平均粒径(nm)	111	109	105	114	108
Z电位(mV)	36.8	30.4	42.5	-0.0076	-0.0541

[0146] 〔试验例2〕

[0147] ＜细胞导入性的评价＞

[0148] 对于实施例1～5的冷冻保存用组合物,基于下述的步骤对冷冻保存用组合物所含的纳米颗粒的细胞导入性进行评价。

[0149] (1)将冻融后的来源于人脂肪组织的间充质干细胞(hAD-MSC)以2000个细胞/孔接种于包被胶原蛋白的8孔腔室载玻片。

[0150] (2)向孔内加入以荧光色素香豆素标记的实施例1～5的冷冻保存用组合物,于37℃孵育30分钟。

[0151] (3)细胞核的染色使用了DAPI溶液(4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐溶液)。

[0152] (4)使用荧光显微镜(KEYENCE Japan公司制、BZ-9000)放大至20倍,分别测定将曝光时间设为1/2秒、将黑平衡(Black balance)设为42时观测到的细胞质及细胞核的荧光强度。将相对于存在于细胞质内且为细胞核外的区域的纳米颗粒所内包的香豆素荧光强度OUT而言的、存在于细胞核内的纳米颗粒所内包的香豆素荧光强度IN之比(IN/OUT)的值示于表2中的细胞导入性的评价项目[荧光强度比(细胞核/细胞质)]。

[0153] [表2]

[0154]

	阳离子性纳米颗粒			中性纳米颗粒	
	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5
颗粒组成（主要成分）	DOTAP	DOPE	Gemini型	DPPC	DSPE
荧光强度比（核/细胞质）	0.348	0.311	0.425	0.105	0.114

[0155] 如表2所示,荧光强度比(细胞核/细胞质)的值为正数,由此可知,实施例1～5的冷冻保存用组合物所含的纳米颗粒的一部分不止被导入细胞质,而且已被导入至细胞核内。

[0156] 〔试验例3〕

[0157] ＜透射电子显微镜＞

[0158] 使用透射电子显微镜观察通过试验例2的方法被导入细胞内的纳米颗粒。就来源于健康人的脂肪组织的间充质干细胞(hAD-MSC)而言,使用含有生长因子的专用培养基5mL,以约5000个细胞/cm^2的密度接种于3.5cm^2培养皿。使用金纳米颗粒(Cytodiagnostics公司)标记实施例3(Gemini型)的冷冻保存用组合物。将经标记的冷冻保存用组合物暴露于ADSC 30分钟。为了制备透射电子显微镜用样品,作为前固定,使用含有2%戊二醛的磷酸缓冲液,将ADSC于4℃固定一夜。用磷酸缓冲液洗涤经固定的样品后,作为后固定,使用2%锇水溶液于4℃固定2小时。作为脱水,使乙醇的浓度从30%阶段性地上升至100%,分别处理15分钟。将样品于60℃经48小时包埋于环氧树脂,使用超薄切片机制作80-90nm的超薄切片,装载于Cu 200目(mesh)。使用透射电子显微镜H-7600,于100kV进行观察。结果示于图2。

[0159] 如图2所示的那样,实施例3的冷冻保存用组合物所含的纳米颗粒被摄入至细胞质内。另外,粒径小的纳米颗粒的一部分被摄入至核内。

[0160] 〔试验例4〕

[0161] ＜使用冷冻保存用组合物的细胞的冷冻保存和解冻处理＞

[0162] •细胞的冷冻保存

[0163] (1)用胰蛋白酶处理70％～90％汇合的来源于人脂肪组织的间充质干细胞(hAD-MSC),从培养容器剥离并进行离心,得到细胞沉淀物。

[0164] (2)针对上述的约5×10^6个细胞,加入各实施例的冷冻保存用组合物10μL导入细胞,添加细胞培养液990μL,得到细胞悬浮液。比较例的情况下,添加各实施例的冷冻保存用组合物1mL,得到细胞悬浮液。

[0165] (3)将上述细胞悬浮液分注于冻存管(CryoTube),冷冻保存于-80℃的超低温冰箱中。

[0166] •经冷冻保存的细胞的解冻

[0167] (1)一边将包含经过上述冷冻保存(1个月以内)的细胞的冻存管于37℃的温浴中摇动一边迅速解冻细胞。

[0168] (2)将解冻后的细胞悬浮液与干细胞专用培养基10mL混合,得到混合液。

[0169] (3)将上述混合液离心分离(1,200rpm、5分钟、4℃),用抽吸器除去上清液后,在适量的上述培养基中悬浮。

[0170] ＜细胞存活率的评价＞

[0171] 使用细胞增殖分析试剂盒(MTT Cell Viability Assay Kit,AR1156、BTI:COSMO BIO CO.,LTD.制),基于下述步骤评价细胞冷冻保存前后的细胞存活率。

[0172] (1)将使用实施例3、6～15的冷冻保存用组合物进行冷冻保存后经解冻处理的细胞以2000个细胞/孔接种于96孔板。

[0173] (2)向各孔中加入前述试剂盒中的MTT标准试剂10μL,于37℃孵育4小时。

[0174] (3)向各孔中加入甲臜溶液100μL,于37℃孵育18小时。

[0175] (4)使用微孔板吸光度检测仪,测定吸收波长570nm处的色素的吸光度A。

[0176] (5)使用细胞冷冻前的hMSC-AT进行上述(1)～(3)的操作,然后使用微孔板吸光度检测仪,测定吸收波长570nm处的色素的吸光度B。

[0177] (6)将相对于冷冻保存前的吸光度B而言的、上述(4)中得到的解冻后的吸光度A的比例(＝A/B×100％)作为细胞存活率。结果示于表3、4。

[0178] [表3]

[0179]

	中性纳米颗粒		阳离子性纳米颗粒				比较例	
	实施例9	实施例10	实施例6	实施例7	实施例8	实施例3	比较例1	比较例2
颗粒组成(主要成分)	DPPC	DSPE	DOTAP	DOPE	Gemini型	Gemini型	10% DMSO	CELLBANKER
内包物质	阿魏酸					无		
冷冻后的存活率(％)	73.8	75.4	88.5	81.7	94.5	86.8	69.8	71.5

[0180] [表4]

[0181]

	中性纳米颗粒		阳离子性纳米颗粒				比较例	
	实施例14	实施例15	实施例11	实施例12	实施例13	实施例3	比较例1	比较例2
颗粒组成(主要成分)	DPPC	DSPE	DOTAP	DOPE	Gemini型	Gemini型	10% DMSO	CELLBANKER
内包物质	活性型维生素C					无		
冷冻后的存活率(％)	77.1	78.3	84.1	87.9	95.8	89.5	68.7	72.4

[0182] 如表3、4所示,可知使用实施例3的冷冻保存用组合物、内包阿魏酸或活性型维生素C的实施例6～15的冷冻保存用组合物进行冷冻时,与使用比较例的冷冻保存用组合物进行冷冻时相比,细胞存活率高,也即,可减少由冷冻保存导致的细胞受损。

[0183] 〔试验例5〕

[0184] ＜干细胞的比例的评价＞

[0185] 使用实施例3、6～15的冷冻保存用组合物对细胞进行冷冻保存,基于下述的步骤,使用Human Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Kit(FMC020、R&D systems公司制)评价干细胞率。该试剂盒以CD90作为阳性标志物,以CD45、CD34、CD11b、CD79A及HLA-DR作为阴性标志物。

[0186] (1)将使用实施例3、6～15的冷冻保存用组合物冷冻保存后经解冻处理的5×10^6个细胞与上述试剂盒所附带的流式细胞术用染色缓冲液100μL混合,将其移至流式细胞仪用管中,制成细胞悬浮液。

[0187] (2)向上述细胞悬浮液中加入上述试剂盒所附带的2种荧光色素标记抗体的溶液(1种阳性标志物的抗体液和1种混合有阴性标志物的抗体液)各10μL,将其在暗处于室温(25℃)孵育45分钟。

[0188] (3)用上述流式细胞术用染色缓冲液2mL洗涤孵育后的细胞悬浮液。

[0189] (4)使用流式细胞仪进行流式细胞术分析,对细胞冷冻保存后的显示CD90(+)、CD45(-)、CD34(-)、CD11b(-)、CD79A(-)及HLA-DR(-)的性状的细胞进行定量。将使用实施例3、6～15的冷冻保存用组合物进行冷冻保存的情况下的该细胞的比例作为“干细胞的比例”示于表5、6。

[0190] 根据表5、6可知,使用包含实施例3、6～15的纳米颗粒的冷冻保存用组合物进行冷冻保存的情况下,与使用比较例的冷冻保存用组合物的情况相比,干细胞的比例高,也即,对基于冷冻保存的干细胞功能的保持是有用的。

[0191] [表5]

[0192]

	中性纳米颗粒		阳离子性纳米颗粒				比较例	
	实施例9	实施例10	实施例6	实施例7	实施例8	实施例3	比较例1	比较例2
颗粒组成(主要成分)	DPPC	DSPE	DOTAP	DOPE	Gemini型	Gemini型	10% DMSO	CELLBANKER
内包物质	阿魏酸					无		
冷冻后的干细胞比例(%)	73.4	69.8	84.5	81.4	90.3	85.3	59.1	69.8

[0193] [表6]

[0194]

	中性纳米颗粒		阳离子性纳米颗粒				比较例	
	实施例14	实施例15	实施例11	实施例12	实施例13	实施例3	比较例1	比较例2
颗粒组成(主要成分)	DPPC	DSPE	DOTAP	DOPE	Gemini型	Gemini型	10% DMSO	CELLBANKER
内包物质	活性型维生素C					无		
冷冻后的干细胞比例(%)	72.5	66.8	82.7	82.6	90.9	83.4	58.7	67.1

[0195] 〔试验例6〕

[0196] ＜Gemini型表面活性剂的比较＞

[0197] 上述试验中使用实施例3、8、13的冷冻保存用组合物,即作为Gemini型表面活性剂使用了疏水基团的烃链的碳原子数为12、间隔基团的碳原子数由3组成、形成抗衡离子的元素由溴及氮组成的Gemini型表面活性剂。因此,作为Gemini型表面活性剂,改变2个烷基链的碳原子数、间隔基的碳原子数、及形成抗衡离子的元素,通过与实施例1同样的方法制作实施例16～19的冷冻保存用组合物,与实施例3的冷冻保存用组合物一同通过与试验例4相

同的方法调查冷冻后的存活率。结果示于表7。表7中,12-3-12__Br表示各自2个烃链的碳原子数为12、间隔基的碳原子数为3、使抗衡离子生成的元素为溴和氮,16-3-16__Cl表示各自2个烃链的碳原子数为16、间隔基的碳原子数为3、抗衡离子为氯和氮。

[0198] [表7]

[0199]

	Gemini型阳离子性纳米颗粒				
	实施例3	实施例16	实施例17	实施例18	实施例19
颗粒组成(主要成分)	12-2-12_Br	12-3-12_Br	12-3-12_Cl	16-3-16_Br	16-3-16_Cl
冷冻后的存活率(%)	76.5	85.6	78.2	75.8	82.1

[0200] 根据表7,不仅是烃链的碳原子数为12的Gemini型表面活性剂,使用含有由烃链的碳原子数为16的Gemini型表面活性剂构成的纳米颗粒的冷冻保存用组合物进行冷冻的情况下,也维持了高存活率。另外,使用氯而非溴作为Gemini型表面活性剂中的使抗衡离子生成的元素也维持了高存活率。另外,Gemini型表面活性剂中的间隔基的碳原子数为2、3时均维持了高存活率。

[0201] 〔试验例7〕

[0202] <长期的冷冻保存>

[0203] 通过与试验例4同样的方法将实施例3的冷冻保存用组合物导入细胞并进行冷冻处理,冷冻保存3、6、12个月的情况下,通过与试验例4同样的方法调查解冻后的存活率,结果示于表8。

[0204] [表8]

[0205]

	Gemini型阳离子性纳米颗粒			
	实施例3 (12-3-12_Br)			
保存时间(月)	0	3	6	12
冷冻后的存活率(%)	87.6	88.1	87.9	87.8

[0206] 根据表8,即使将实施例3的冷冻保存用组合物导入细胞,冷冻保存12个月,冷冻解冻后的存活率仍然维持高达87.8%。

[0207] 〔试验例8〕

[0208] <组合物向细胞外的排出>

[0209] 通过与试验例2同样的方法将实施例3的冷冻保存用组合物导入细胞并进行冷冻,对解冻后0、1、7、14天后的包含细胞质和核的荧光强度进行定量,由此调查导入的冷冻保存用组合物向细胞外的排出。结果示于表9。

[0210] [表9]

[0211]

	Gemini型阳离子性纳米颗粒			
	实施例3 (12-3-12_Br)			
解冻后的时间(天)	0	1	7	14
荧光强度(细胞整体)	0.753	0.565	0.066	0.001

[0212] 根据表9,在解冻后7天,荧光强度成为10分之1以下,在解冻后14天降低至几乎检测不到的水平。因此,确认到用实施例3的冷冻保存用组合物进行冷冻的情况下,该冷冻保存用组合物在解冻后被排出至细胞外。

[0213] 〔试验例9〕

[0214] ＜解冻后的细胞的倍增时间＞

[0215] 通过与试验例4同样的方法将实施例3的冷冻保存用组合物导入细胞并进行冷冻，测定解冻后0、7天后的细胞增殖并且总数增加至2倍的时间(细胞的倍增时间:PDT(群体倍增时间,Population Doubling Time))，结果示于表10。

[0216] 倍增时间基于下式算出。

[0217] PDT(Population Doubling Time)的计算方式:

[0218] 1)针对位于对数增殖期的2点进行细胞的测量。

[0219] 2)将第1点处的细胞密度的测定值设为N0,将第2点处的测定值设为N。

[0220] 另外,将自培养开始起到第1点为止的时间设为t0,将到第2点为止的时间设为t。

[0221] PDT＝(t-t0)log2/(logN-logN0)

[0222] [表10]

[0223]

	Gemini型阳离子性纳米颗粒	
	实施例3 (12-3-12_Br)	
解冻后的倍增时间测定开始时间点（第……天）	0	7
倍增时间 (hr)	63	62

[0224] 根据表10,即使自解冻起经过7天,细胞的倍增时间也得到了维持。因此,确认到即使使用实施例3的冷冻保存用组合物进行冷冻,细胞的增殖活性也未受到由冷冻保存导致的影响。

[0225] 〔试验例10〕

[0226] ＜胚胎、精子、血液细胞、3D类器官的冷冻后的存活率＞

[0227] 通过与试验例4同样的方法将实施例3的冷冻保存用组合物导入细胞。作为细胞种类,与来源于人脂肪组织的间充质干细胞一同使用胚胎、精子、血液细胞、3D类器官。并且,通过与试验例4同样的方法调查冷冻后的存活率,结果示于表11。

[0228] 使用的细胞如下所述。

[0229] • 胚胎(物种:小鼠,品系:C57BL/6J Jcl,阶段:2cell,胚胎个数:30个,购买机构:国立研究开发法人医药基盘・健康・营养研究所)

[0230] • 精子(物种:小鼠,品系:C57BL/6NCr Slc,个数:1麦管(straw),购买机构:国立研究开发法人医药基盘・健康・营养研究所)

[0231] • 血液细胞(物种:人,来源:急性单核细胞性白血病患者外周血,种类:单核细胞、购买机构:ATCC)

[0232] • 3D类器官(物种:人,来源:健康脂肪组织,种类:使用间充质干细胞,Corning(注册商标)Matrigel基底膜基质类器官形成用途的类器官培养,购买机构:龙沙公司)

[0233] [表11]

[0234]

	Gemini型阳离子性纳米颗粒					10% DMSO	CELLBANKER
	实施例3 (12-3-12_Br)					比较例1	比较例2
细胞种类	胚胎	精子	血液细胞	3D类器官	来源于人脂肪组织的间充质干细胞		
冷冻后的存活率（%）	86.5	81.7	89.5	86.8	88.2	58.4	69.1

[0235] 根据表11,确认到只要使用实施例3的冷冻保存用组合物,不仅间充质干细胞,对胚胎、精子、血液细胞等细胞、3D类器官进行冷冻的情况下,也能够维持高存活率。

[0236] 〔试验例11〕

[0237] ＜免疫缺陷小鼠中的移植效率的评价＞

[0238] 通过与试验例4同样的方法将实施例8的冷冻保存用组合物导入细胞,使用经冷冻及解冻的间充质干细胞,对免疫缺陷小鼠中的移植效率进行评价。

[0239] 就来源于健康人脂肪组织的间充质干细胞(ADSC)而言,添加细胞球培养用基质胶及专用培养基所附带的生长因子,自移植1周前起培养成细胞球状。将干细胞细胞球与移植用基质胶以1对1的比例混合。将包含1×10^7个细胞的ADSC的移植用混合液在冰上填充至注射器中,移植至免疫缺陷小鼠的背部皮下。用游标卡尺测量移植2周后的移植部位的纵横高度,算出体积(mm^3)。另外,使用精密电子天平称量在移植ADSC3周后摘出的移植片的重量(mg)。作为对照,使用在没有实施例8的组合物的情况下冷冻的ADSC。结果示于表12。

[0240] [表12]

[0241]

	对照	Gemini型阳离子性纳米颗粒
		实施例8
移植片的体积(mm^3)	1250	2020
移植片的重量(mg)	1060	2420

[0242] 根据表12,在将用实施例8的冷冻保存用组合物处置的细胞移植至小鼠的情况下,仍然维持了生理活性,确认到移植片的增大。

[0243] 〔试验例12〕

[0244] ＜致癌性的体外评价＞

[0245] 使用实施例3的冷冻保存用组合物,实施作为安全性指标的致癌性的体外评价、即软琼脂集落形成实验(soft-agar colony formation assay)。

[0246] 在高压釜中将1.8％琼脂溶液灭菌并使其溶解,于45℃的水浴保温。

[0247] 制作下层混合物(bottom mix)(2×DMEM 37.5ml,血清9ml,2.8％$NaHCO_3$5.25ml,10×青霉素/链霉素0.9ml),于45℃的水浴保温。

[0248] 将经充分保温的下层混合物与1.8％琼脂溶液在经灭菌的试剂瓶或管中以1.4vol:1vol的比例按2.5ml×必需片数分+α混合,于45℃的水浴保温(最终0.75％琼脂)。

[0249] 使用一次性的移液器将上述下层琼脂(bottom agar)各2.5ml注入35mm皿或6孔板,于4℃静置8分钟,凝固后于培养箱保温。

[0250] 将经充分保温的上层混合物(上层:2×DMEM 37.5ml,血清9ml,2.8％$NaHCO_3$5.25ml,10×青霉素/链霉素0.9ml,灭菌水19.5ml)与1.8％琼脂溶液在经灭菌的试剂瓶或管中以4vol:1vol的比例按1.5ml×必需片数分+α混合,于45℃的水浴保温(最终0.36％琼脂)。

[0251] 基于通常的步骤将来源于人脂肪组织的间充质干细胞剥离后,使其通过细胞筛网从而成为单个细胞,调整为2×10^5个细胞/ml。

[0252] 将细胞悬浮液100μl移至15ml管,使用一次性的移液器以3ml/管加入上层琼脂(top agar),以不起泡的方式吹吸,以各1.5ml铺展于底层琼脂上方。

[0253] 于4℃静置8分钟,凝固后于培养箱保温。

[0254] 在2周后对集落进行染色,计数。结果示于表13。

[0255] [表13]

[0256]

	Gemini型阳离子性纳米颗粒		
	实施例3（12-3-12_Br）		
保存时间（月）	0	3	6
集落数量	0	0	0

[0257] 根据表13,保存时间为0、3、6个月的情况均未产生集落,未确认到由于将实施例3的冷冻保存用组合物导入细胞导致的致癌性。

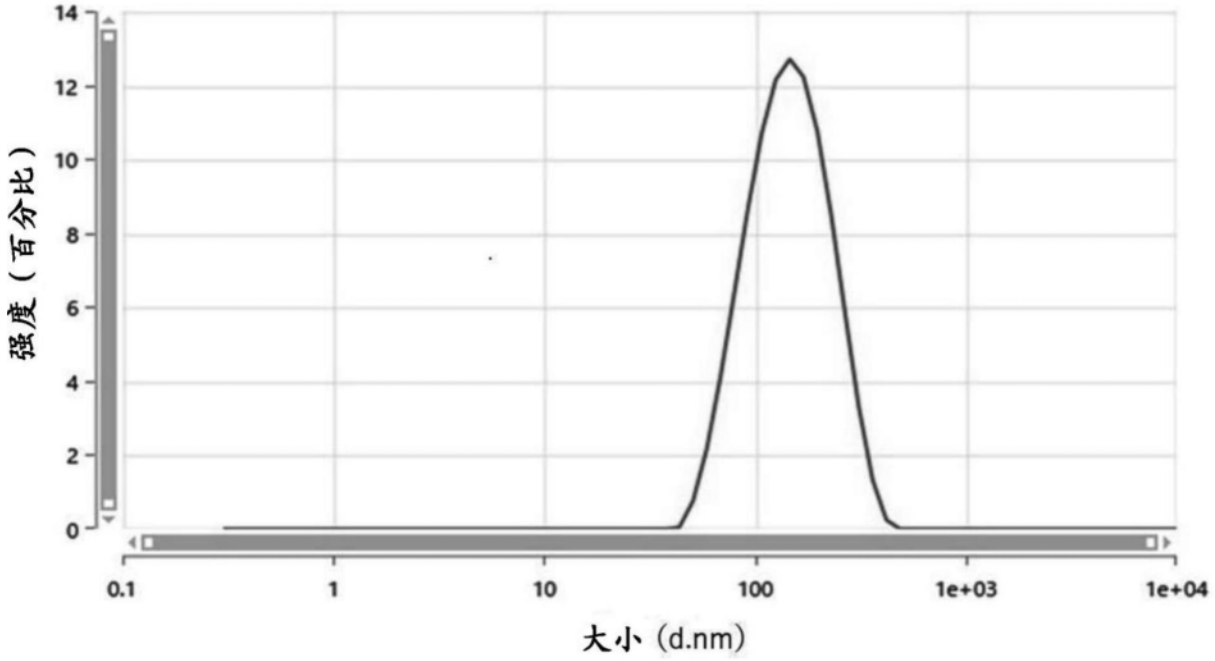

强度（百分比）
14
12
10
8
6
4
2
0
0.1
1
10
100
1e+03
1e+04
大小（d.nm）

图1

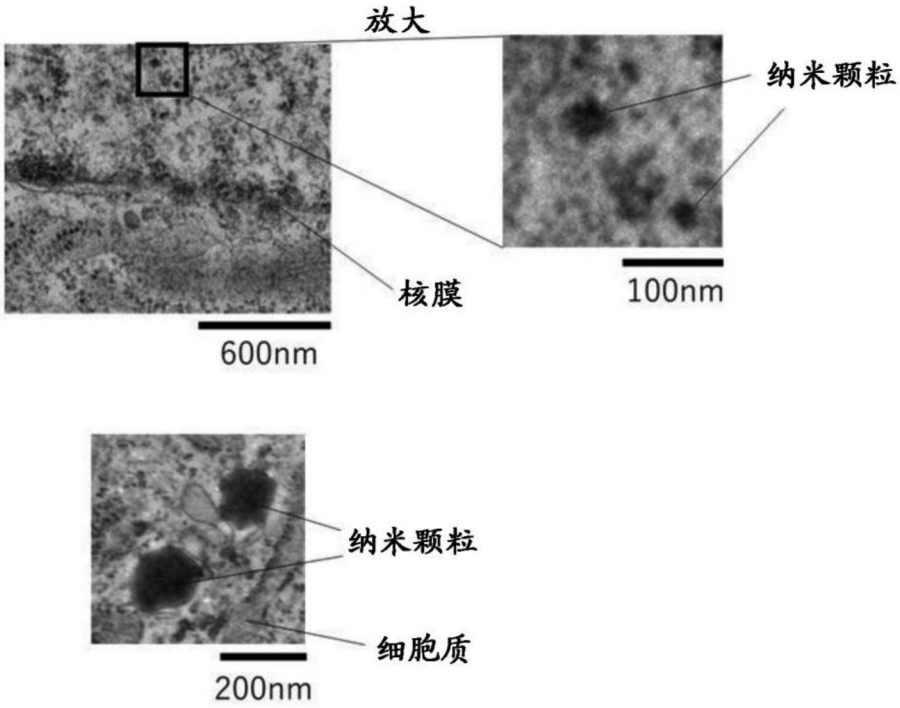

放大
纳米颗粒
核膜
600nm
100nm
纳米颗粒
细胞质
200nm

图2