

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 6 月 28 日 (28.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/113796 A1

- (51) 国际专利分类号:
A01N 1/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/118381
- (22) 国际申请日: 2017 年 12 月 25 日 (25.12.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201611204901.8 2016 年 12 月 23 日 (23.12.2016) CN
- (71) 申请人: 西比曼生物科技(上海)有限公司
(**CELLULAR BIOMEDICINE GROUP (SHANGHAI) LTD.**) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。西比曼生物科技(无锡)有限公司(**CELLULAR BIOMEDICINE GROUP (WUXI) LTD.**) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市惠山区惠山大道 1619 号 2 号楼 301 室, Jiangsu 214174 (CN)。
- (72) 发明人: 王飞(**WANG, Fei**); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。何佳平(**HE, Jiaping**); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。赵荻骏(**ZHAO, Dijun**); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。刘维克多(**LIU, Victor**); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。杨丁柱(**YANG, Dingzhu**); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。

- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司(**XU & PARTNERS, LLC.**); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: CELL FREEZING MEDIUM FOR CLINICAL USE

(54) 发明名称: 一种可临床使用的细胞冻存液

(57) Abstract: Provided in the present invention is a cell freezing medium for clinical use. In particular, the cell freezing medium of the present invention comprises the following components: (1) human albumin; (2) a cryoprotectant, wherein the cryoprotectant comprises a combination of one or more of dimethyl sulfoxide, glycerol and ethylene glycol; (3) a saline buffer, wherein the saline buffer is a solution comprising ions Na⁺, K⁺, Mg⁺, Cl⁻ and CH₃COO⁻; (4) a vitamin; and (5) an amino acid, wherein the concentration of the human albumin is 1-20% (w/v). The cell, after long-term cryopreservation with the freezing medium of the present invention, has a high viability, and the cellular efficiency maintains a high uniformity. The grade of purity of the freezing medium of the present invention is the pharmaceutical grade or USP grade; and the freezing medium is safe and reliable for clinical use, and can be used for conventional adherent and suspension cells.

(57) 摘要: 本发明提供了一种可临床使用的细胞冻存液。具体地, 本发明的细胞冻存液包括以下组分: (1) 人白蛋白; (2) 冷冻保护剂; 所述的冷冻保护剂包括二甲基亚砷、甘油、乙二醇的一种或多种的组合; (3) 盐缓冲液; 所述的盐缓冲液为包含 Na⁺、K⁺、Mg⁺、Cl⁻ 和 CH₃COO⁻ 离子的溶液; (4) 维生素; 和 (5) 氨基酸; 其中, 所述人白蛋白浓度为 1%~20% (w/v)。经本发明冻存液长期冻存后的细胞, 其活率高, 且细胞效能保持一致性高。本发明的冻存液纯度级别为药品级或 USP 级, 临床使用安全可靠, 可用于常规的贴壁和悬浮细胞。

WO 2018/113796 A1

一种可临床使用的细胞冻存液

技术领域

5 本发明涉及生物技术领域，具体地，涉及一种用于细胞长期存储的及其临床使用的冻存液。

背景技术

在细胞培养达到需求量或目标后，需要对培养得到的细胞进行收集和保存。然而，常温和 4℃ 的条件都不足以长期保存细胞，需要对细胞进行超低温冻存保
10 存，这涉及到冻存液的使用。

目前，常规的冻存液都由血清、或动物来源蛋白、或不满足临床使用的普通化学试剂组成，这样的冻存液一方面对细胞的活率或者效能保持的效果较差，另一方面，由于其成分无法统一，因此难以满足临床使用的标准。

综上所述，本领域尚缺乏一种质量统一，适合临床使用的细胞冻存液。

15

发明内容

本发明的目的是提供一种质量统一，适合临床使用的细胞冻存液。

本发明的第一方面提供了一种可临床使用的细胞冻存液，所述的细胞冻存液包括以下组分：

- 20 (1) 人白蛋白；
- (2) 冷冻保护剂：所述的冷冻保护剂包括二甲基亚砷、甘油、乙二醇的一种或多种的组合；
- (3) 盐缓冲液；所述的盐缓冲液为包含 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^+ 、 Cl^- 和 CH_3COO^- 离子的溶液；
- (4) 维生素；和
- 25 (5) 氨基酸；

其中，所述人白蛋白浓度为 1%~20% (w/v)。

在另一优选例中，所述的人白蛋白浓度为 3~15% (w/v)，更优选为 4~12% (w/v)。

在另一优选例中，所述的冷冻保护剂浓度为 0.4mol/L~2.2mol/L。

在另一优选例中，所述的冷冻保护剂选自下组：二甲基亚砷、甘油、乙二醇、或
30 其组合。

在另一优选例中，所述的冷冻保护剂为二甲基亚砷。

在另一优选例中，所述的细胞冻存液包括选自下组的一个或多个特征：

Na⁺离子的浓度为 0.1~0.2mol/L；

K⁺离子的浓度为 5~10mmol/L；

Mg²⁺离子的浓度为 1.5~5mmol/L；

5 Cl⁻离子的浓度为 0.1~0.3mol/L；

CH₃COO⁻离子的浓度为 40~60mmol/L。

在另一优选例中，所述盐缓冲液为复方电解质注射液。

在另一优选例中，所述的维生素浓度为 50mmol/L~150mmol/L；和/或所述氨基酸浓度为 0.1mol/L~0.5mol/L。

10 在另一优选例中，所述的人白蛋白选自下组：血浆提取人白蛋白、基因重组人白蛋白，或其组合。

在另一优选例中，所述的维生素选自下组：维生素 A、维生素 B、维生素 C、维生素 D、维生素 E、维生素 K，或其组合。

15 在另一优选例中，所述的维生素选自下组：维生素 A、维生素 B、维生素 C、维生素 E、或其组合。

在另一优选例中，所述的维生素选自下组：维生素 C、维生素 E、或其组合。

在另一优选例中，所述的氨基酸选自下组：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸，或其组合；
20 优选为赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸，或其组合。

在另一优选例中，所述的氨基酸选自下组：甘氨酸、精氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、或其组合。

25 本发明的第二方面提供了一种细胞混合物，所述混合物包括以下组分：细胞，和

如本发明第一方面所述的细胞冻存液；

优选地，所述的细胞是 Car-T 细胞、间充质干细胞，或其组合。

在另一优选例中，所述的细胞混合物是冻存后的细胞混合物。

在另一优选例中，所述的细胞混合物被用于长期保存细胞和/或建立细胞库。

30 本发明的第三方面提供了一种细胞的冻存方法，包括步骤：

(i) 将待冻存细胞与本发明第一方面所述的细胞冻存液进行混合，得到细胞

混合物；

(ii) 将步骤(i)得到的细胞混合物降温后，于液氮中保存。

在另一优选例中，所述步骤(i)中的待冻存细胞是通过以下步骤制备的：

(i-1) 提供一种活细胞，并计算活率和细胞密度；

5 (i-2) 将步骤(i-1)的细胞离心后去除上清液，弹开细胞沉淀。

在另一优选例中，所述步骤(ii)中采用程序降温法梯度降温至-80 度。

本发明的第四方面提供了一种试剂盒，所述的试剂盒用于细胞冻存，所述的试剂盒中包括如本发明第一方面所述的细胞冻存液。

10 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

15 图 1 为实施例 1 中 Car-T 细胞活率与冻存时间关系图。

图 2 为实施例 1 中 Car-T 功能表达能力与冻存时间关系图。

图 3 为实施例 2 中间充质干细胞活率与冻存时间关系图。

图 4 为实施例 2 中冻存 1 月和 3 个月后间充质干细胞和新鲜冻存前细胞分化对照图。

20 图 5 为实施例 3 中间充质干细胞活率与冻存时间关系图。

图 6 为实施例 3 中间充质干细胞的成软骨分化情况对比图。

图 7 为实施例 4 中间充质干细胞活率与冻存时间关系图。

图 8 为实施例 4 中间充质干细胞的成软骨分化情况对比图。

图 9 为对比例 1 中间充质干细胞活率与冻存时间关系图。

25 图 10 为对比例 1 中间充质干细胞的成软骨分化情况对比图。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究，首次发现，采用含有人白蛋白、维生素、氨基酸的冻存液保存细胞，如间充质干细胞，经过长时间保存后，细胞仍具有良
30 好的活率和功能表达能力。在此基础上，完成了本发明。

术语

人白蛋白

如本文所用术语“人白蛋白”包括血浆提取人白蛋白和基因重组人白蛋白，而在本发明的具体实施例和对比例中使用的“人白蛋白”指血浆提取人白蛋白，“重组人白蛋白”指基因重组人白蛋白。

间充质干细胞

如本文所用“间充质干细胞”是指来源于发育早期中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞，广泛存在于全身多种组织中，可在体外培养扩增，并能在特定条件控制下分化为神经细胞、成骨细胞、肌肉细胞、脂肪细胞等。

CAR-T 细胞

如本文所用“CAR-T 细胞”，即为嵌合抗原受体 T 细胞，是将能识别某种肿瘤抗原的抗体的抗原结合部与 CD3- ζ 链或 Fc ϵ RI γ 的胞内部分在体外偶联为一个嵌合蛋白，通过基因转导的方法转染患者的 T 细胞，使其表达嵌合抗原受体(CAR)。

细胞冻存

细胞冻存技术是生物学保存物种的重要手段。如果在不加任何条件下直接冻存细胞时，细胞内和外环境中的水都会形成冰晶，导致细胞内发生机械损伤、电解质升高、渗透压改变、脱水、PH 改变、蛋白变性等，严重时引起细胞死亡。如向培养液加入保护剂，可使冰点降低。在缓慢的冻结条件下，能使细胞内水分在冻结前透出细胞，贮存在低温下能减少冰晶的形成。

细胞冻存中最重要的部分是细胞冻存液。传统的细胞冻存液含有动物血清，主要为胎牛血清和/或小牛血清。血清是由血浆去除纤维蛋白而形成的一种极其复杂的混合物，其一部分组成成份尚不清楚，且血清组成及含量常随供血动物的性别、年龄、生理条件和营养条件的不同而不同。血清中含有各种血浆蛋白、多肽、脂肪、碳水化合物、激素、无机物等。

细胞复苏

如本发明所用，“细胞复苏”一词是指休眠的细胞重新活化的过程。一般采

用本领域技术人员所熟知的程序即快速复苏法，将冷冻管迅速由液氮转入到温水浴中，较佳地 37℃-40℃，不定时搅拌加速解冻；细胞完全解冻后，对冷冻管进行消毒；将解冻后清洗细胞并重悬，转移到细胞培养瓶，CO₂ 孵箱中培养；检查细胞存活率及活力。

5

细胞冻存方法

在本发明具体实施方式中，Car-T 细胞的冻存与复苏步骤：

1. 取一袋悬浮培养至 14 天的 Car-T 细胞，计算活率和细胞密度，取活细胞量 4×10^8 离心收集；
- 10 2. 离心后去上清，弹开细胞沉淀，缓缓加入 20mL 冻存液；
3. 混匀，分装至 2 个 20mL 冻存袋，放入程序降温仪降温至-80 度；
4. 于液氮中保存，并于 1 周、6 周分别取样进行细胞活度与功能表达能力的检测分析。

在本发明具体实施方式中，间充质干细胞的冻存与复苏步骤：

- 15 1. 取数盘贴壁培养的间充质干细胞，观察融合度为 80%~90%，通过胰酶消化收集细胞，并计算活率和细胞密度，取活细胞量 4×10^7 离心收集；
2. 离心后去上清，弹开细胞沉淀，缓缓加入 3mL 冻存液；
3. 混匀，分装至 2 个 2mL 冻存袋，放入程序降温仪降温至-80 度；
4. 于液氮中保存，并于 1 月、3 月分别取样进行细胞活率与分化能力的检测
- 20 分析。

细胞冻存液

细胞的维持环境需要是一个等渗的溶液。盐缓冲液如生理盐水、复方电解质注射液等可以维持细胞渗透压。细胞在冻存时需要用冷冻保护剂替换出细胞内的水，防止

25 在冻存过程中水形成冰晶损害细胞器，而细胞在冻存复苏后的代谢需要消耗维生素和氨基酸。

本发明人意外发现，在生理盐水中添加了盐缓冲液、人白蛋白、维生素、氨基酸和冷冻保护剂制成细胞冻存液，可以长时间冻存细胞，并且可以维持细胞复苏后较高的活率和较强的功能表达与分化能力。

30 本发明的细胞冻存液，包括以下组分：

- (1) 盐缓冲液；

- (2) 人白蛋白;
- (3) 维生素;
- (4) 氨基酸;
- (5) 冷冻保护剂。

5 所述的盐缓冲液包括(但并不限于): 生理盐水、复方电解质注射液、磷酸盐缓冲液的一种或多种的组合。所述的冷冻保护剂包括(但并不限于): 二甲基亚砷、甘油、乙二醇的一种或多种的组合。

本发明的细胞冻存液, 可以用于:

- (a) 保存细胞;
- 10 (b) 建立细胞库; 或
- (c) 保持细胞的活力。

细胞混合物

本发明的细胞混合物, 包含以下组分:

- 15 (a) 细胞; 以及
- (b) 细胞冻存液, 包括以下组分:
 - (1) 盐缓冲液;
 - (2) 人白蛋白;
 - (3) 维生素;
 - 20 (4) 氨基酸;
 - (5) 冷冻保护剂。

所述的盐缓冲液包括(但并不限于)生理盐水、复方电解质注射液、磷酸盐缓冲液的一种或多种的组合。所述的冷冻保护剂包括(但并不限于)二甲基亚砷、甘油、乙二醇的一种或多种的组合。

25

本发明的细胞冻存液主要优点包括:

- (1) 可以长时间冻存细胞, 复苏后的细胞仍具有较高的活率;
- (2) 冻存后复苏的细胞仍然具有较好的功能表达能力和分化能力。

30 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,

通常按照常规条件,例如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

5 实施例 1

本实施例中采用的冻存液配方如下:

序号	所用试剂	试剂配制方案
1	Na ⁺	140mmol/L
2	K ⁺	6mmol/L
3	Mg ²⁺	2mmol/L
4	Cl ⁻	110mmol/L
5	CH ₃ COO ⁻	40mmol/L
6	人白蛋白	8%(W/V)
7	二甲基亚砷	1.4mol/L
8	维生素 C	50mmol/L
9	甘氨酸	0.1mol/L
10	精氨酸	0.1mol/L

具体冻存和复苏操作步骤如下:

1. 取一袋悬浮培养至 14 天的 Car-T 细胞,计算活率和细胞密度,取活细胞量 4×10^8 离心收集
2. 离心后去上清,弹开细胞沉淀,缓缓加入 20ml 冻存液
3. 混匀,分装至 2 个 20ml 冻存袋,放入程序降温仪降温至-80 度
4. 于液氮中保存,并于 1 周、6 周分别取样进行检测。

经冻存后的 Car-T 细胞活率结果如图 1 所示。据实验统计,冻存 1~6 周后活率下降都在 10%内,且 1~6 周的结果稳定,说明冻存液的效果符合需求。

Car-T 功能表达能力与冻存时间关系的检测结果如图 2 所示,图中,0\N\P 各组分别表示:

0: CarT cells only

N: CarT cells + CD19 negative tumor cells

P: CarT cells + CD19 positive tumor cells

从图中可以看出,0\N 组为对照组和阴性组,几乎无表达,P 组仍具有较强的

表达能力, 所以只能看到 P 组。该结果表明, 经冻存 1~6 周后细胞仍然就有较强的功能表达能力, 与冻存前相比降幅不明显。

实施例 2

5 本实施例中采用的冻存液配方如下:

序号	所用试剂	试剂配制方案
1	Na ⁺	140mmol/L
2	K ⁺	6mmol/L
3	Mg ²⁺	2mmol/L
4	Cl ⁻	110mmol/L
5	CH ₃ COO ⁻	40mmol/L
6	人白蛋白	5% (W/V)
7	二甲基亚砷	0.7 mol/L
8	维生素 C	60mmol/L
9	甘氨酸	0.2mol/L
10	精氨酸	0.2mol/L

具体冻存和复苏操作步骤如下:

1. 取数盘贴壁培养的间充质干细胞, 观察融合度为 80%~90%, 通过胰酶消化收集细胞, 并计算活率和细胞密度, 取活细胞量 4×10^7 离心收集;
2. 离心后去上清, 弹开细胞沉淀, 缓缓加入 3ml 冻存液;
- 10 3. 混匀, 分装至 2 个 2ml 冻存袋, 放入程序降温仪降温至 -80 度;
4. 于液氮中保存, 并于 1 月、3 月分别取样进行检测。

间充质干细胞活率与冻存时间关系如图 3 所示, 结果表明, 细胞在冻存 1~3 月后活率下降在 5% 以内, 达到 95% 以上, 符合临床使用的需求。

- 15 经冻存后的间充质干细胞分化能力效能检测结果如图 4 中所示。结果表明, 冻存 1 月和 3 个月后分别和新鲜冻存前细胞对照做分化实验, 细胞成脂、成骨、成软骨能力未受影响。

实施例 3

本实施例中采用的冻存液配方如下:

序号	所用试剂	试剂配制方案
----	------	--------

1	Na ⁺	140mmol/L
2	K ⁺	6mmol/L
3	Mg ²⁺	2mmol/L
4	Cl ⁻	110mmol/L
5	CH ₃ COO ⁻	40mmol/L
6	重组人白蛋白	5% (W/V)
7	二甲基亚砜	0.7 mol/L
8	维生素 C	60mmol/L
9	甘氨酸	0.2mol/L
10	精氨酸	0.2mol/L

具体冻存和复苏操作步骤如下：

1. 取数盘贴壁培养的间充质干细胞，观察融合度为 80%~90%，通过胰酶消化收集细胞，并计算活率和细胞密度，取活细胞量 4×10^7 离心收集；

- 5 2. 离心后去上清，弹开细胞沉淀，缓缓加入 3ml 冻存液；
3. 混匀，分装至 2 个 2ml 冻存袋，放入程序降温仪降温至 -80 度；
4. 于液氮中保存，并于 1 月、3 月分别取样进行检测。

活率分析如图 5 中所示，结果显示，用细胞在含重组人白蛋白冻存 1~3 月后活率下降在 7%以内，达到 93%以上，符合临床使用的需求。

- 10 分化能力效能检测结果如图 6 所示。从图中可以看出，在分化实验中，用重组人白蛋白冻存液冻存 1 月后，和新鲜冻存前细胞相比，分化能力基本一致。

实施例 4

本实施例中采用的冻存液配方如下：

序号	所用试剂	试剂配制方案
1	Na ⁺	140mmol/L
2	K ⁺	6mmol/L
3	Mg ²⁺	2mmol/L
4	Cl ⁻	110mmol/L
5	CH ₃ COO ⁻	40mmol/L
6	人白蛋白	5% (W/V)

7	二甲基亚砷	0.7 mol/L
8	维生素 E	60mmol/L
9	亮氨酸	0.1mol/L
10	苯丙氨酸	0.2mol/L

具体冻存和复苏操作步骤如下：

1. 取数盘贴壁培养的间充质干细胞，观察融合度为 80%~90%，通过胰酶消化收集细胞，并计算活率和细胞密度，取活细胞量 4×10^7 离心收集；
2. 离心后去上清，弹开细胞沉淀，缓缓加入 3ml 冻存液；
3. 混匀，分装至 2 个 2ml 冻存袋，放入程序降温仪降温至 -80 度；
4. 于液氮中保存，并于 1 月、3 月分别取样进行检测。

经冻存后的间充质干细胞活率与冻存时间关系如图 7 所示。结果表明，用细胞在含重组人白蛋白冻存 1~3 月后活率下降在 5%以内，达到 95%以上，符合临床使用的需求。

- 10 分化能力效能检测结果如图 8 所示。从图中可以看出，在分化实验中，用含其他维生素和氨基酸冻存液冻存 1 月后，和新鲜冻存前细胞相比，分化能力基本一致。

对比例 1

- 15 本对比例中采用的冻存液配方如下：

序号	所用试剂	试剂配制方案
1	Na ⁺	140mmol/L
2	K ⁺	6mmol/L
3	Mg ²⁺	2mmol/L
4	Cl ⁻	110mmol/L
5	CH ₃ COO ⁻	40mmol/L
6	人白蛋白	40% (W/V)
7	二甲基亚砷	5 mol/L

具体的冻存和复苏操作步骤如下：

1. 取数盘贴壁培养的间充质干细胞，观察融合度为 80%~90%，通过胰酶消化收集细胞，并计算活率和细胞密度，取活细胞量 4×10^7 离心收集
2. 离心后去上清，弹开细胞沉淀，缓缓加入 3ml 冻存液

3. 混匀，分装至 2 个 2ml 冻存袋，放入程序降温仪降温至-80 度

4. 于液氮中保存，并于 1 月、3 月分别取样进行检测

经本对比例所述的冻存液冻存后，间充质干细胞活率分析结果如图 9 所示。

从图中可以看出，在人白蛋白和二甲基亚砷浓度过高时，细胞在冻存 1~3 月内出

5 现大幅度下降，尤其在一个月內，说明冻存过程中此冻存液未能保护细胞活率。

分化能力效能检测结果如图 10 所示。从图中可以看出，在分化实验中，用高
二甲基亚砷冻存液冻存 1 月后，和新鲜冻存前细胞相比，成软骨能力明显下降。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被
10 单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本
领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所
附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种可临床使用的细胞冻存液，其特征在于，所述的细胞冻存液包括以下组分：

5 (1) 人白蛋白；

(2) 冷冻保护剂，所述的冷冻保护剂包括二甲基亚砜、甘油、乙二醇的一种或多种的组合；

(3) 盐缓冲液，所述的盐缓冲液为包含 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 和 CH_3COO^- 离子的溶液；

(4) 维生素；和

10 (5) 氨基酸；

其中，所述人白蛋白浓度为 1%~20% (w/v)。

2. 如权利要求 1 所述的细胞冻存液，其特征在于，所述的冷冻保护剂浓度为 0.4mol/L~2.2mol/L。

3. 如权利要求 1 所述的细胞冻存液，其特征在于，所述的细胞冻存液包括选自
15 下组的一个或多个特征：

Na^+ 离子的浓度为 0.1~0.2mol/L；

K^+ 离子的浓度为 5~10mmol/L；

Mg^{2+} 离子的浓度为 1.5~5mmol/L；

Cl^- 离子的浓度为 0.1~0.3mol/L；

20 CH_3COO^- 离子的浓度为 40~60mmol/L。

4. 如权利要求 1 所述的细胞冻存液，其特征在于，所述的维生素浓度为 50mmol/L~150mmol/L；和/或所述氨基酸浓度为 0.1mol/L~0.5mol/L。

5. 如权利要求 1 所述的细胞冻存液，其特征在于，所述的人白蛋白选自下组：血浆提取人白蛋白、基因重组人白蛋白、或其组合。

25 6. 如权利要求 1 所述的细胞冻存液，其特征在于，所述的维生素选自下组：维生素 A、维生素 B、维生素 C、维生素 D、维生素 E、维生素 K、或其组合。

7. 如权利要求 1 所述的细胞冻存液，其特征在于，所述的氨基酸选自下组：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸，或其组合；优选为赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、或其组合。

30

8. 一种细胞混合物，其特征在于，所述混合物包括以下组分：

细胞，和

如权利要求 1~7 任一项所述的细胞冻存液；

优选地，所述的细胞是 Car-T 细胞、间充质干细胞、或其组合。

5 9. 一种细胞的冻存方法，其特征在于，包括步骤：

(i) 将待冻存细胞与如权利要求 1~7 任一项所述的细胞冻存液进行混合，得到细胞混合物；

(ii) 将步骤(i)得到的细胞混合物降温后，于液氮中保存。

10 10. 一种试剂盒，所述的试剂盒用于细胞冻存，其特征在于，所述的试剂盒中包括如权利要求 1~7 任一所述的细胞冻存液。

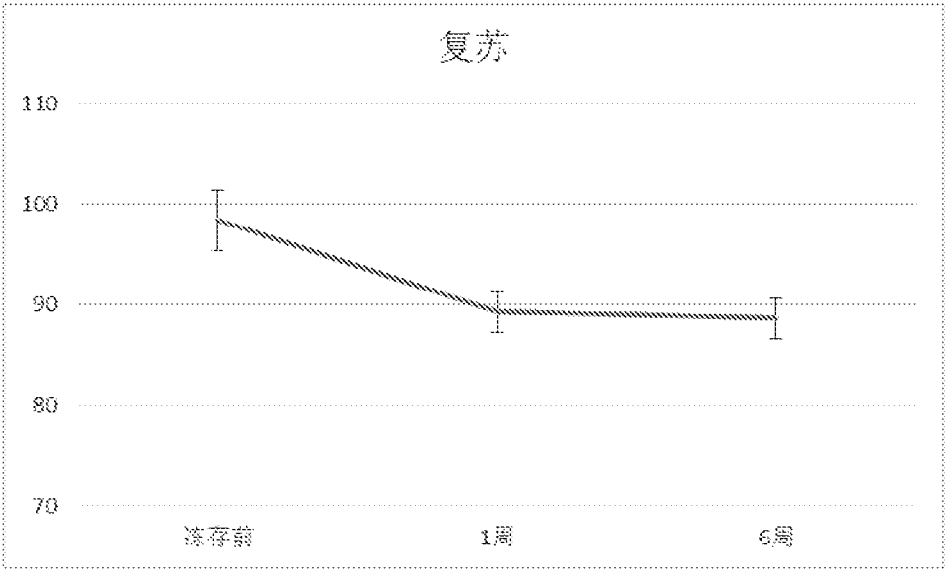


图 1

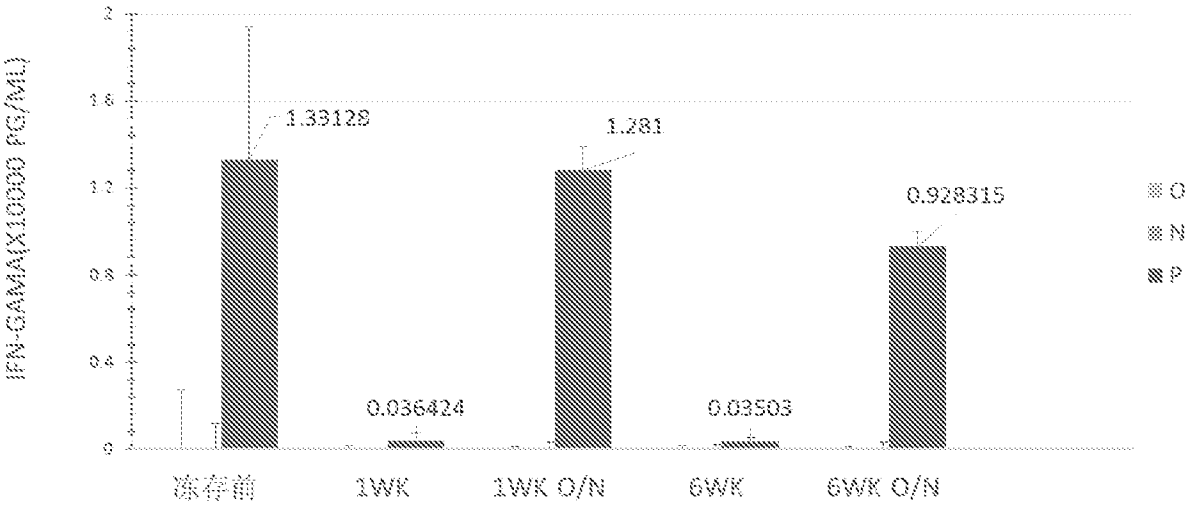


图 2

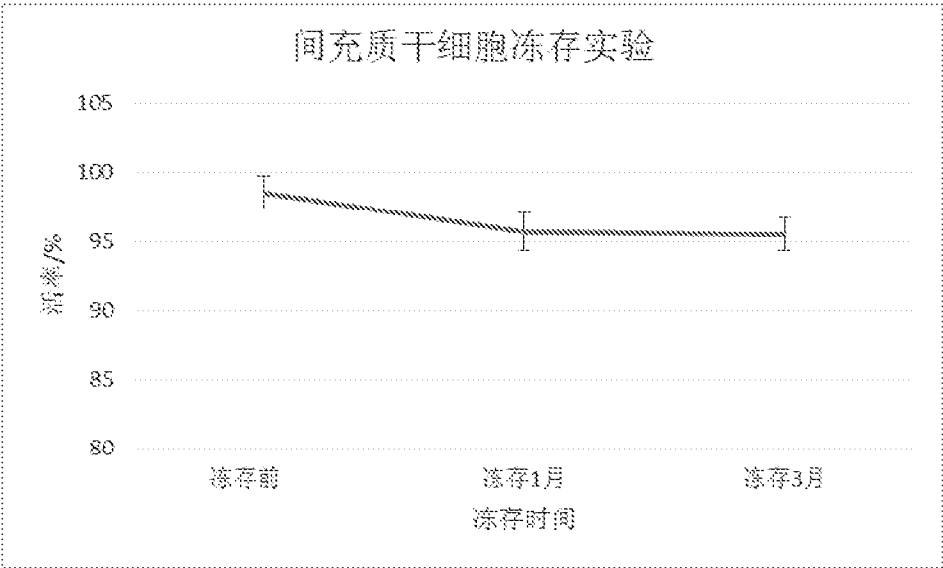


图 3

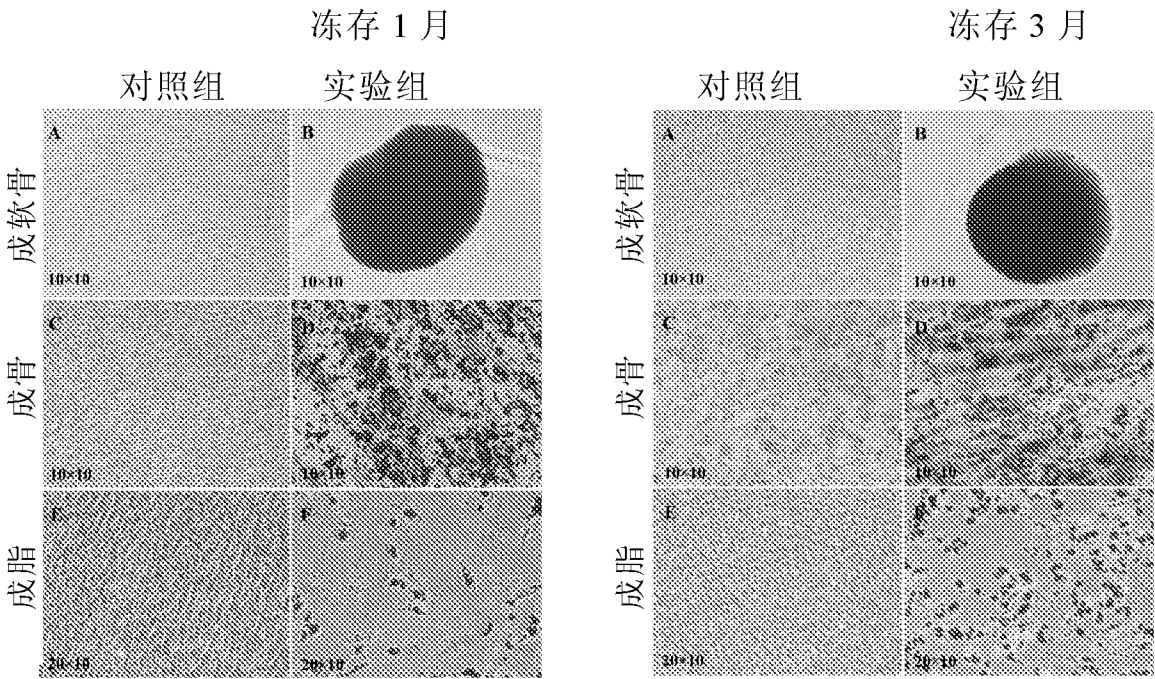


图 4

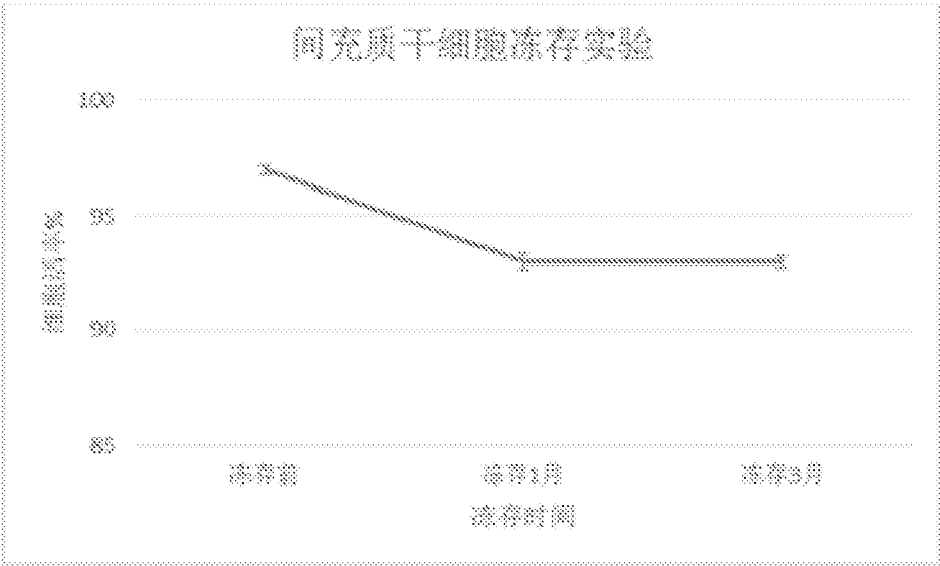


图 5

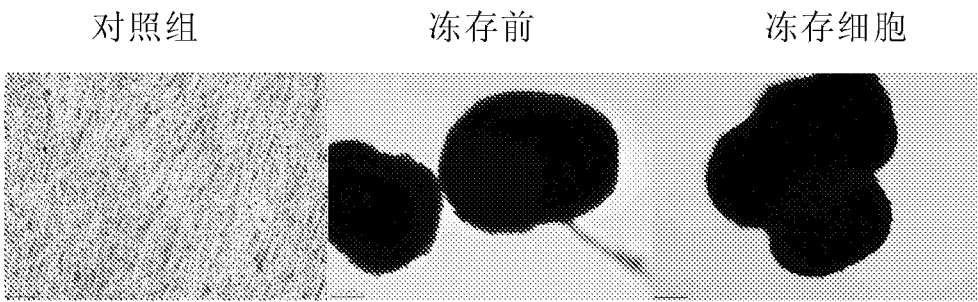


图 6

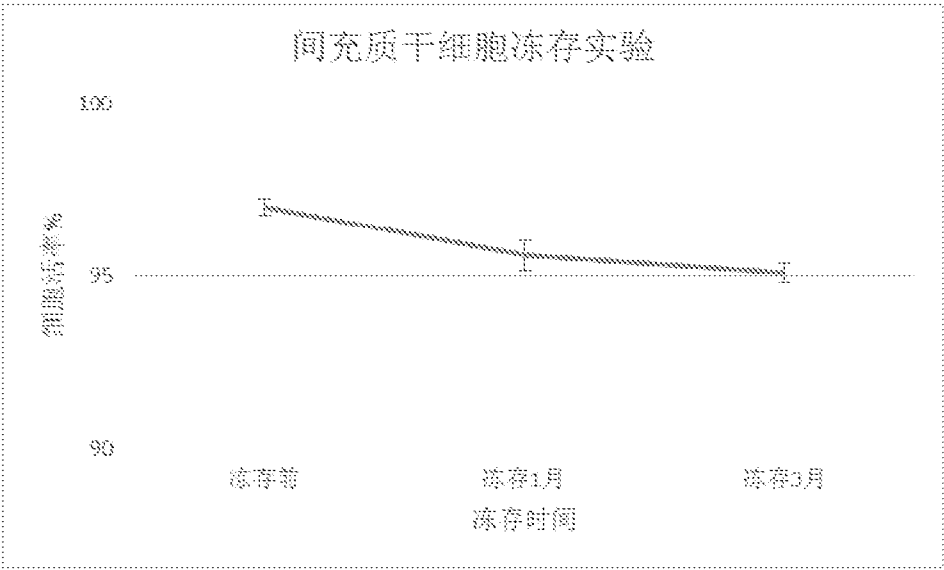


图 7

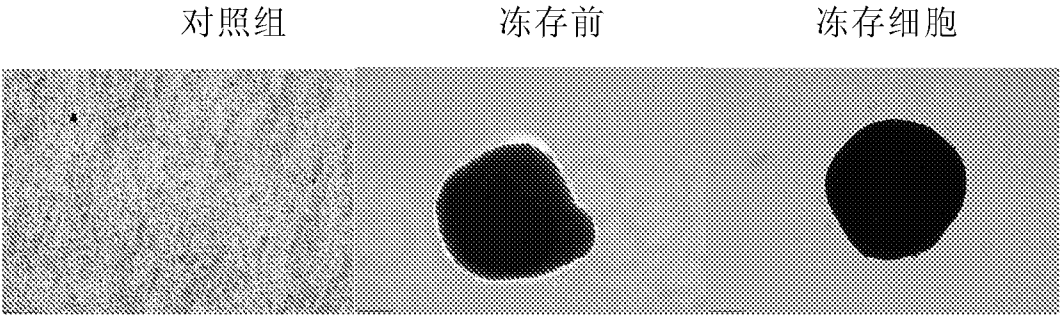


图 8

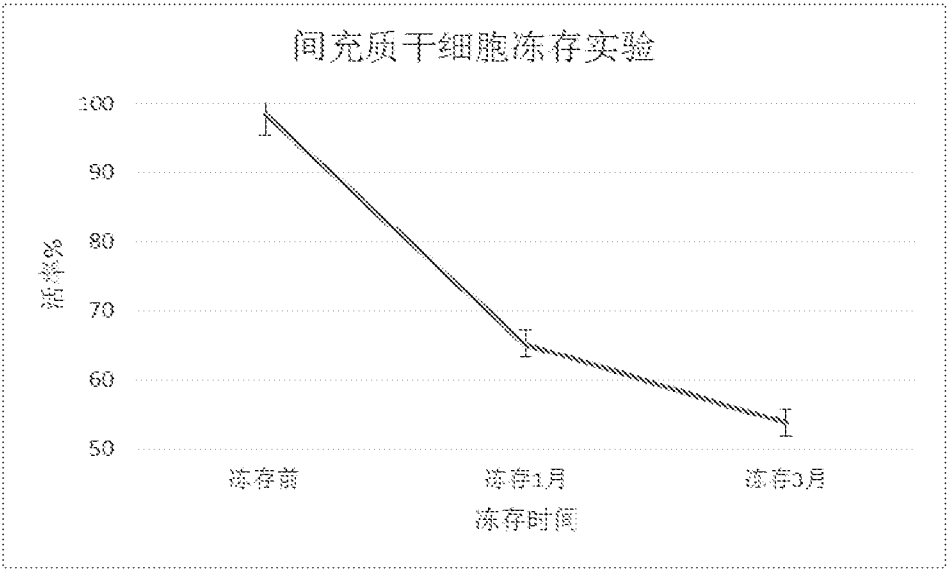


图 9

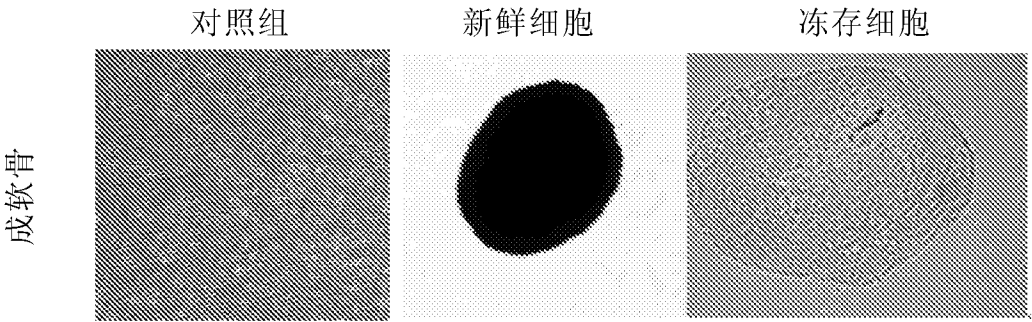


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/118381

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 1/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, VEN, Registry, Caplus, web of knowledge: 细胞, 冻存, 冷冻保存, 白蛋白, 冷冻保护剂, 二甲基亚砷, 甘油, 乙二醇, 缓冲液, 维生素, 维他命, 氨基酸, cell, freezing, cryopreservation, albumin, buffer, vitamin, amino acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105123671 A (GUANGZHOU SALIAI STEM CELL SCIENCE AND TECHNOLOGY CO., LTD.), 09 December 2015 (09.12.2015), claims 1-5, and description, pages 5-6	1-10
X	CN 103583511 A (SICHUAN NEO-LIFE STEM CELL BIOTECH INC.), 19 February 2014 (19.02.2014), claims 1-4, and description, pages 2-3	1-10
A	CN 102948413 A (BEIJING QMLC STEM CELL TECHNOLOGY CO., LTD.), 06 March 2013 (06.03.2013), entire document	1-10
A	CN 104082277 A (CHENGDU QINGKE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 08 October 2014 (08.10.2014), entire document	1-10
A	CN 106234354 A (SHANGHAI FENGXIAN DISTRICT CENTRAL HOSPITAL), 21 December 2016 (21.12.2016), entire document	1-10
A	CN 103404509 A (PENG, Le), 27 November 2013 (27.11.2013), entire document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 21 March 2018	Date of mailing of the international search report 27 March 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Ruizeng Telephone No. (86-10) 010-62084379

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/118381

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103783031 A (SICHUAN NEO-LIFE STEM CELL BIOTECH INC.), 14 May 2014 (14.05.2014), entire document	1-10
A	CN 104542578 A (GUANGZHOU SALIAI STEM CELL SCIENCE AND TECHNOLOGY CO., LTD.), 29 April 2015 (29.04.2015), entire document	1-10
A	CN 1935989 A (SHANGHAI BLOOD CENTER), 28 March 2007 (28.03.2007), entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/118381

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105123671 A	09 December 2015	CN 105123671 B	13 October 2017
CN 103583511 A	19 February 2014	CN 103583511 B	29 July 2015
		CN 102792947 B	26 March 2014
		CN 102792947 A	28 November 2012
CN 102948413 A	06 March 2013	CN 102948413 B	03 September 2014
CN 104082277 A	08 October 2014	CN 104082277 B	13 April 2016
CN 106234354 A	21 December 2016	None	
CN 103404509 A	27 November 2013	CN 103404509 B	08 April 2015
CN 103783031 A	14 May 2014	CN 103783031 B	18 November 2015
CN 104542578 A	29 April 2015	CN 104542578 B	18 January 2017
CN 1935989 A	28 March 2007	CN 1935989 B	12 May 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/118381

A. 主题的分类 A01N 1/02 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) A01N 1/02 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNABS、CNKI、DWPI、SIPOABS、VEN、Registry、Caplus、web of knowledge: 细胞, 冻存, 冷冻保存, 白蛋白, 冷冻保护剂, 二甲基亚砜, 甘油, 乙二醇, 缓冲液, 维生素, 维他命, 氨基酸, cell, freezing, cryopreservation, albumin, buffer, vitamin, amino acid		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 105123671 A (广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司) 2015年 12月 9日 (2015 - 12 - 09) 权利要求1-5, 说明书第5-6页	1-10
X	CN 103583511 A (四川新生命干细胞科技股份有限公司) 2014年 2月 19日 (2014 - 02 - 19) 权利要求1-4, 说明书第2-3页	1-10
A	CN 102948413 A (北京清美联创干细胞科技有限公司) 2013年 3月 6日 (2013 - 03 - 06) 全文	1-10
A	CN 104082277 A (成都清科生物科技有限公司) 2014年 10月 8日 (2014 - 10 - 08) 全文	1-10
A	CN 106234354 A (上海市奉贤区中心医院) 2016年 12月 21日 (2016 - 12 - 21) 全文	1-10
A	CN 103404509 A (彭乐) 2013年 11月 27日 (2013 - 11 - 27) 全文	1-10
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2018年 3月 21日		国际检索报告邮寄日期 2018年 3月 27日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10) 62019451		授权官员 田瑞增 电话号码 (86-10) 010-62084379

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103783031 A (四川新生命干细胞科技股份有限公司) 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14) 全文	1-10
A	CN 104542578 A (广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 全文	1-10
A	CN 1935989 A (上海市血液中心) 2007年 3月 28日 (2007 - 03 - 28) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/118381

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105123671	A	2015年 12月 9日	CN 105123671 B	2017年 10月 13日
CN	103583511	A	2014年 2月 19日	CN 103583511 B	2015年 7月 29日
				CN 102792947 B	2014年 3月 26日
				CN 102792947 A	2012年 11月 28日
CN	102948413	A	2013年 3月 6日	CN 102948413 B	2014年 9月 3日
CN	104082277	A	2014年 10月 8日	CN 104082277 B	2016年 4月 13日
CN	106234354	A	2016年 12月 21日	无	
CN	103404509	A	2013年 11月 27日	CN 103404509 B	2015年 4月 8日
CN	103783031	A	2014年 5月 14日	CN 103783031 B	2015年 11月 18日
CN	104542578	A	2015年 4月 29日	CN 104542578 B	2017年 1月 18日
CN	1935989	A	2007年 3月 28日	CN 1935989 B	2010年 5月 12日