

(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 11 月 29 日 (29.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/214943 A1

(51) 国际专利分类号:
A01N 1/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/088246

(22) 国际申请日: 2018 年 5 月 24 日 (24.05.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710375424.X 2017 年 5 月 24 日 (24.05.2017) 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 6 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: 张丽(ZHANG, Li); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。王飞(WANG, Fei); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 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 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。林南静(LIN, Nanjing); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。刘丽萍(LIU, Liping); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。刘欣(LIU, Xin); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。李超(LI, Chao); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。余舒倩(YU, Shuqian); 中国上海

市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。胡永来(HU, Yonglai); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。赵佳维(ZHAO, Jiawei); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。孙哲(SUN, Zhe); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 楼, Shanghai 200233 (CN)。刘晓雨(LIU, Xiaoyu); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 6 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)。

(54) Title: CELL CRYOPRESERVATION FORMULATION AND CELL RECOVERY METHOD

(54) 发明名称: 一种冻存细胞制剂及细胞复苏方式

(57) Abstract: The present invention relates to the preparation and use of a cell cryopreservation formulation convenient for clinical use. In particular, provided is a cell cryopreservation (freezing) formulation, comprising: (1) a cell; (2) a cryopreservation diluent, the cryopreservation diluent comprising: an aqueous solution of sodium chloride, protective proteins, and dimethyl sulfoxide. The present invention also involves a corresponding cell recovery method. The present invention uses a cryopreservation media requiring no washing to prepare a cell cryopreservation formulation, and cell recovery and dilution for clinical use can be performed by means of a simple preparation operation.

(57) 摘要: 本发明涉及一种便于临床使用的冻存细胞制剂的制备与使用。具体地, 本发明提供了一种冻存(冰冻)细胞制剂, 所述制剂包括: (1) 细胞; (2) 冻存稀释液, 所述的冻存稀释液包括: 氯化钠水溶液、保护性蛋白, 和二甲亚砜。本发明还涉及相应的细胞复苏方式。本发明采用免洗的冻存液进行细胞冰冻制剂的制备, 采用简单配药式的操作进行细胞复苏和稀释既可以临床使用。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种冻存细胞制剂及细胞复苏方式

技术领域

本发明属于细胞治疗领域，具体地，本发明提供了一种免洗的可静脉滴注的冰冻细胞制剂，以及使该冰冻细胞制剂使用简单化。

背景技术

细胞治疗应用时，通常采用新鲜的细胞进行静脉或局部输注，或者采用冻存的细胞经过洗涤后进行使用。新鲜的细胞在临床使用之前，一般只有不到 8 小时的有效期，不利于远程的运输，也不能适应临床病人病情的变化。因此，若需要在治疗领域应用到细胞，势必涉及到对细胞进行冻存和复苏的过程。

在实验室冻存复苏过程中，对冻存的细胞进行复苏洗涤的操作通常需要在洁净的环境中(如无菌室中)进行，且需要专业的生物技术人员进行操作。然而，在实际治疗的过程中，冻存复苏的过程是在普通医院中进行的，无法提供无菌室的环境，也缺乏具有相应实验技巧的人员，这限制了细胞治疗的推广使用。

综上所述，本领域迫切需要一种操作简单的细胞冻存复苏方法及相应的试剂。

发明内容

本发明采用免洗的冻存液进行细胞冰冻制剂的制备，采用简单配药式的操作进行细胞复苏和稀释既可以临床使用。有效的解决了细胞治疗领域的上述问题。

本发明的第一方面，提供了一种冻存(冰冻)细胞制剂，所述制剂包括：

- (1) 细胞；
- (2) 冻存液，所述的冻存液包括：氯化钠水溶液、保护性蛋白，和二甲基亚砜。

在另一优选例中，所述的细胞为选自下组的细胞：原代 T 细胞、扩增培养后的 T 细胞、基因转导后的 T 细胞、干细胞，或其组合。

在另一优选例中，所述的细胞为选自下组的细胞：悬浮培养的细胞和贴壁培养

在另一优选例中，所述的贴壁培养的细胞在制备所述的冻存制剂之前预先进行消化悬浮。

在另一优选例中，所述的制剂中，细胞密度范围是 1×10^5 - 5×10^8 /ml。

在另一优选例中，所述的制剂中，氯化钠浓度为 0.85%-0.95% (w/v)。

5 在另一优选例中，所述的制剂中，保护性蛋白浓度为 10%-90% (w/v)。

在另一优选例中，所述的制剂中，保护性蛋白浓度为 10-30%(w/v)。

在另一优选例中，所述的制剂中，保护性蛋白浓度为 15-25%(w/v)。

在另一优选例中，所述的制剂中，二甲基亚砷浓度为 5%-40% (v/v)。

在另一优选例中，所述的制剂中，二甲基亚砷浓度为 5%-20% (v/v)。

10 在另一优选例中，所述的制剂中，二甲基亚砷浓度为 8%-12% (v/v)。

在另一优选例中，所述方法包括步骤：

(a) 提供待冻存的细胞和冻存稀释液，用所述的冻存稀释液重悬所述细胞，得到第一冻存混合物；其中，所述的冻存稀释液包括以下组分：氯化钠水溶液，和保护性蛋白；

15 (b) 在所述的第一冻存混合物中加入冻存稀释液，混匀，得到第二冻存混合物；

(c) 转移所述的第二冻存混合物至容器中，进行程序降温至-80℃以下，得到所述的冻存细胞制剂。

20 在另一优选例中，步骤(b)中所述的冻存液的体积 Vb 和步骤(a)中所述的冻存稀释液的体积 Va 之比 Vb: Va=1:0.8-1.2。

在另一优选例中，所述的容器为冻存袋或冻存管。

在另一优选例中，所述的冻存稀释液包括：氯化钠水溶液，和保护性蛋白。

在另一优选例中，所述的冻存稀释液中，氯化钠浓度为 0.85%-0.95% (w/v)。

在另一优选例中，所述的冻存稀释液中，保护性蛋白浓度为 10%-90% (w/v)。

25 在另一优选例中，所述的制剂中，保护性蛋白浓度为 10-30%(w/v)。

在另一优选例中，所述的制剂中，保护性蛋白浓度为 15-25%(w/v)。

本发明的第二方面，提供了一种冻存细胞复苏方法，包括步骤：

(i) 提供如本发明第一方面中所述的冻存细胞制剂；

(ii) 将所述的冻存细胞制剂置于 35-40℃的恒温设备中进行复苏，得到复苏后

的细胞-冻存液复合物；

(iii) 用注射器或一次性使用连接器将所述制剂中的细胞转移至注射载体中。

在另一优选例中，所述的复苏还包括步骤：对细胞进行活率检测，若活率符合使用要求，则用于临床使用。

5 在另一优选例中，所述的恒温设备为恒温水浴锅。

在另一优选例中，所述的细胞解冻时间为 30 秒到 3 分钟。

在另一优选例中，所述的注射载体为可静脉注射的溶液，优选地选自下组：氯化钠注射液、复方电解质注射液、氨基酸注射液。

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 中冻存前和复苏后细胞活率的变化对比图；
图 2 为实施例 1 中冻存复苏后的细胞增殖能力曲线图；
图 3 为实施例 1 中冻存前和冻存后 CAR-T 细胞的肿瘤抗原应答能力对比图；
图 4 为不同冻存方式(程序)的比较。

20 具体实施方式

本发明人经过长期而深入的研究，设计了一种操作简便的细胞冻存-复苏方法，及所使用的相应冻存液。所述的方法可以在普通实验室环境下，由医疗人员方便地进行，因此可以用作细胞治疗过程中的冻存-复苏方法。基于上述发现，发明人完成了本发明。

25

冻存细胞制剂

如本文所用，术语“冻存细胞制剂”和“冰冻细胞制剂”可互换使用，均指在低温(如-80℃下，或液氮环境中)状态下保存的含有治疗活性细胞的制剂。

本发明的冻存(冰冻)细胞制剂包括以下组分：

30 (1) 细胞；

(2) 冻存液，所述的冻存液包括：氯化钠水溶液、保护性蛋白，和二甲基亚砷。

所述的细胞是可以用于细胞治疗的活性细胞，其种类没有特别的限制，本发明的优选实施例中，所述的细胞为选自下组的细胞：原代 T 细胞、扩增培养后的 T 细胞、基因转导后的 T 细胞、干细胞，或其组合。

本发明的细胞类型没有特别的限制，在另一优选例中，所述的细胞为选自下组的细胞：悬浮培养的细胞和贴壁培养的细胞。较佳地，所述的贴壁培养的细胞在制备所述的冻存制剂之前，预先进行消化悬浮。

所述的制剂中，所述的细胞密度范围没有特别的限制，例如可以是 1×10^5 - 5×10^8 /ml。

优选地，所述的制剂中，氯化钠浓度为 0.85%-0.95% (w/v)。

在另一优选实施例中，所述的制剂中，保护性蛋白浓度为 10%-90% (w/v)。

在另一优选实施例中，所述的制剂中，二甲基亚砷浓度为 5%-40% (v/v)。

15 细胞冻存复苏方法

本发明还提供了一种细胞冻存-复苏的方法，所述的方法包括步骤：

(a) 提供待冻存的细胞和冻存稀释液，用所述的冻存稀释液重悬所述细胞，得到第一冻存混合物；其中，所述的冻存稀释液包括以下组分：氯化钠水溶液，和保护性蛋白；

(b) 在所述的第一冻存混合物中加入所述的冻存液，混匀，得到第二冻存混合物；

(c) 转移所述的第二冻存混合物至容器中，进行程序降温至 -80°C 以下，得到冻存细胞制剂。

其中，步骤(b)中所述的冻存液的体积 V_b 和步骤(a)中所述的冻存稀释液的体积 V_a 之比 $V_b: V_a=1:0.8-1.2$ 。当然，根据待冻存的细胞种类，冻存温度等条件的不同，上述二者的比例可以略有差异。

所述的容器没有特别的限制，优选为可以用注射器刺穿容器表面进行吸液的容器。在本发明的优选实施例中，所述的容器为冻存袋或冻存管。采用上述装置，可以最大程度地避免普通实验室环境所带来的污染。

所述的冻存的细胞可以在常规非无菌环境下进行复苏，在本发明的优选实施例中，所述的复苏过程包括步骤：

(i) 提供所述的冻存细胞制剂；

(ii) 将所述的冻存细胞制剂置于 35-40℃ 的恒温设备中进行复苏，得到复苏后的细胞-冻存液复合物；

(iii) 用注射器或一次性使用连接器将所述制剂中的细胞转移至注射载体中。

在另一优选例中，所述的复苏还包括步骤：对细胞进行活率检测，若活率符合使用要求，则用于临床使用。

所述的恒温设备没有特别的限制，可以为实验室中常用的恒温设备(如恒温水浴锅)。

在另一优选例中，所述的细胞解冻时间为 30 秒到 3 分钟。

所述的注射载体没有特别的限制，优选可以是可静脉注射的溶液，更优选地选自下组：氯化钠注射液、复方电解质注射液、氨基酸注射液。

本发明的优选实施例中，在进行冻存前，先采用生理盐水对收集的细胞进行洗涤，确保各项残留符合产品临床使用要求。冻存稀释液除不含二甲基亚砷外，其他成分与冻存液的成分相同。根据冻存规格，用冻存稀释液重悬细胞，使细胞浓度为终浓度的 2 倍，再缓缓添加等体积的冻存液，充分混匀。将细胞悬液转移至冻存袋(或冻存管)中，采用 1-2℃/min 的降温速度进行程序降温。降温至零下 80℃ 以下时，转移至液氮冰箱中存储。

使用时从液氮冰箱中取出冰冻制剂，在 37℃ 条件下快速解冻。解冻后用注射剂或一次性使用连接器转移至生理盐水中。对稀释的细胞制剂进行活率检测。活率符合使用要求后进行临床使用。

与现有技术相比，本发明的主要优点包括：

(1) 利用本发明制备的细胞制剂可以长期存储后依然保持高的细胞活率，便于从制备单位到使用医院的远程运输。

(2) 本发明涉及的细胞冻存制剂全部采用了辅料级或药品级的试剂，可以安全的在临床进行应用。

(3) 利用本发明的使用方式对冻存细胞制剂进行复苏操作，可以免去细胞制

剂操作对无菌环境的严苛要求，可以让一名未经过培训的护士轻松掌握冻存细胞的复苏并保持高的细胞活率。

(4) 利用本发明的使用方式对冻存细胞制剂进行复苏操作，可以保持细胞的生物学活性。

5

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不适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，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

10

实施例 1

冰冻细胞制剂的冻存容器为冻存袋。细胞类型为 CAR-T 细胞。冻存规格 $2 \times 10^7/10 \text{ ml}$ 。冰冻细胞制剂的组分如下表所示。将所述的 CAR-T 细胞与 100ml 冻存 3 个月后，在 37°C 水浴中解冻 2 分钟，用注射器将解冻的细胞稀释至 100 ml 生理盐水中。取稀释的细胞进行活率检测、肿瘤抗原应答检测和细胞增殖能力检测。

15

序号	组分	含量
1	细胞	$2 \times 10^7/\text{ml}$
2	氯化钠	0.9% (w/v)
3	人血清白蛋白	20%(w/v)
4	二甲基亚砜	10%(v/v)

细胞活率变化：稀释的细胞悬液用台盼蓝染色的方法进行活率检测，结果如图 1 中所示。结果显示，复苏后细胞保持了较高的存活率。

冻存后细胞的增殖能力：将冻存复苏的细胞置于完全培养基中继续培养，每天记录细胞的密度。每隔 2-3 天补充培养基，绘制生长曲线(如图 2 中所示)。从图中可见，在冻存复苏过程后，细胞仍然具有较好的增殖能力。

20

冻存前后 CAR-T 细胞的肿瘤抗原应答能力：冻存复苏的细胞和携带肿瘤抗原的肿瘤细胞 1:1 共培养过夜，收集培养上清液检测 CAR-T 细胞释放的 IFN γ 量；收集细胞检测 CD3 阳性细胞表达 CD137 的比例来评估肿瘤抗原应答能力。冻存前的数据和冻存后继续培养 7 天的数据作为对比，对比图如图 3 中所示。结果显示，在经历了冻存-复苏过程后，细胞的肿瘤抗原应答能力没有明显下降。

25

结论:冻存3个月复苏的冰冻细胞制剂活率达到90%以上。复苏的冰冻CAR-T细胞制剂依然具有增值能力。复苏的冰冻CAR-T细胞制剂,发生肿瘤抗原应答能力的可逆下降,继续培养后得到恢复。总之该冰冻细胞制剂保持了新鲜细胞原有的效能,可以再临床应用。

5

实施例2 不同冻存程序下细胞复苏率对比

细胞在不同冻存程序冻存后,迅速在37℃水域中解冻并转移至37℃预热的DMEM中,取约0.3 ml进行活率检测。结果显示,采用本申请方法进行细胞冻存复苏后,复苏率高于采用对照组冻存复苏方法进行冻存复苏后的复苏率。

10

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、一种冻存(冰冻)细胞制剂，其特征在于，所述制剂包括：

(1) 细胞；

5 (2) 冻存液，所述的冻存液包括：氯化钠水溶液、保护性蛋白，和二甲基亚砷。

2、如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，所述的细胞为选自下组的细胞：原代 T 细胞、扩增培养后的 T 细胞、基因转导后的 T 细胞、干细胞，或其组合。

3、如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，所述的细胞为选自下组的细胞：
10 悬浮培养的细胞和贴壁培养的细胞。

4、如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，所述的制剂中，细胞密度范围是 1×10^5 - 5×10^8 /ml。

5、如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，所述的制剂中，氯化钠浓度为 0.85%-0.95% (w/v)。

15 6、如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，所述的制剂中，保护性蛋白浓度为 10%-90% (w/v)。

7、如权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，所述的制剂中，二甲基亚砷浓度为 5%-40% (v/v)。

8、如权利要求 1 所述的制剂的制备方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

20 (a) 提供待冻存的细胞和冻存稀释液，用所述的冻存稀释液重悬所述细胞，得到第一冻存混合物；其中，所述的冻存稀释液包括以下组分：氯化钠水溶液，和保护性蛋白；

(b) 在所述的第一冻存混合物中加入冻存稀释液，混匀，得到第二冻存混合物；

25 (c) 转移所述的第二冻存混合物至容器中，进行程序降温至 -80°C 以下，得到所述的冻存细胞制剂。

9、一种冻存细胞复苏方法，其特征在于，包括步骤：

(i) 提供如权利要求 1 中所述的冻存细胞制剂；

30 (ii) 将所述的冻存细胞制剂置于 35 - 40°C 的恒温设备中进行复苏，得到复苏后的细胞-冻存液复合物；

(iii) 用注射器或一次性使用连接器将所述制剂中的细胞转移至注射载体中。

10、如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述的注射载体为可静脉注射的溶液，优选地选自下组：氯化钠注射液、复方电解质注射液、氨基酸注射液。

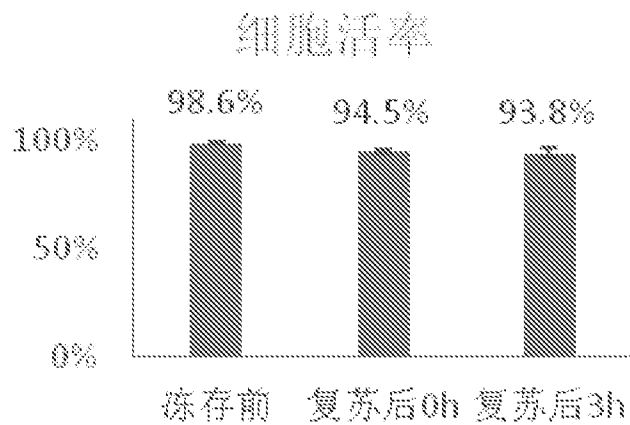


图 1

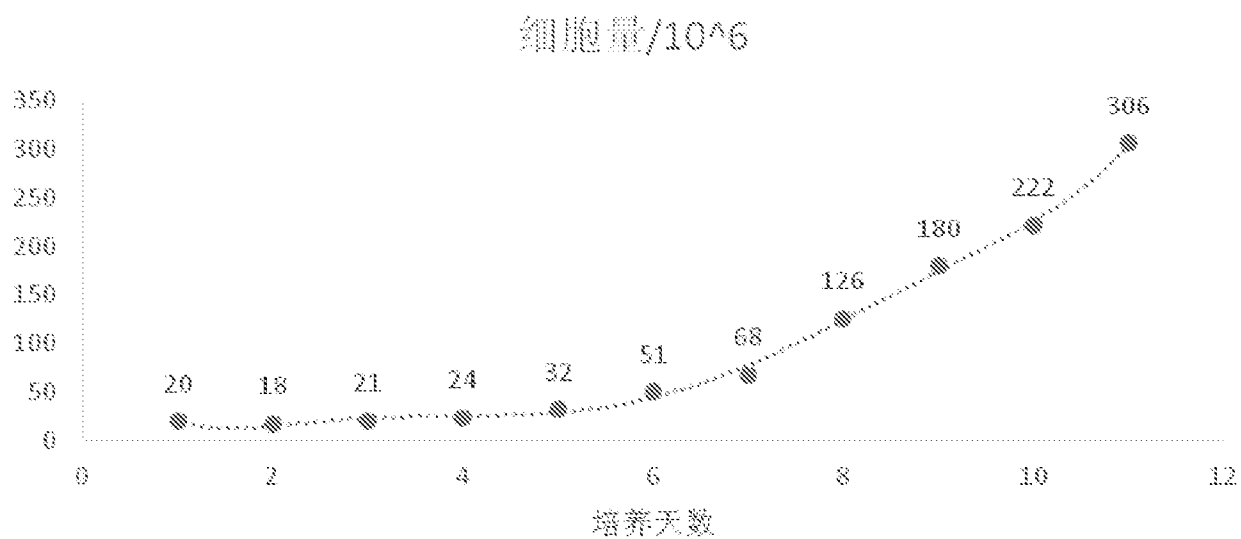


图 2

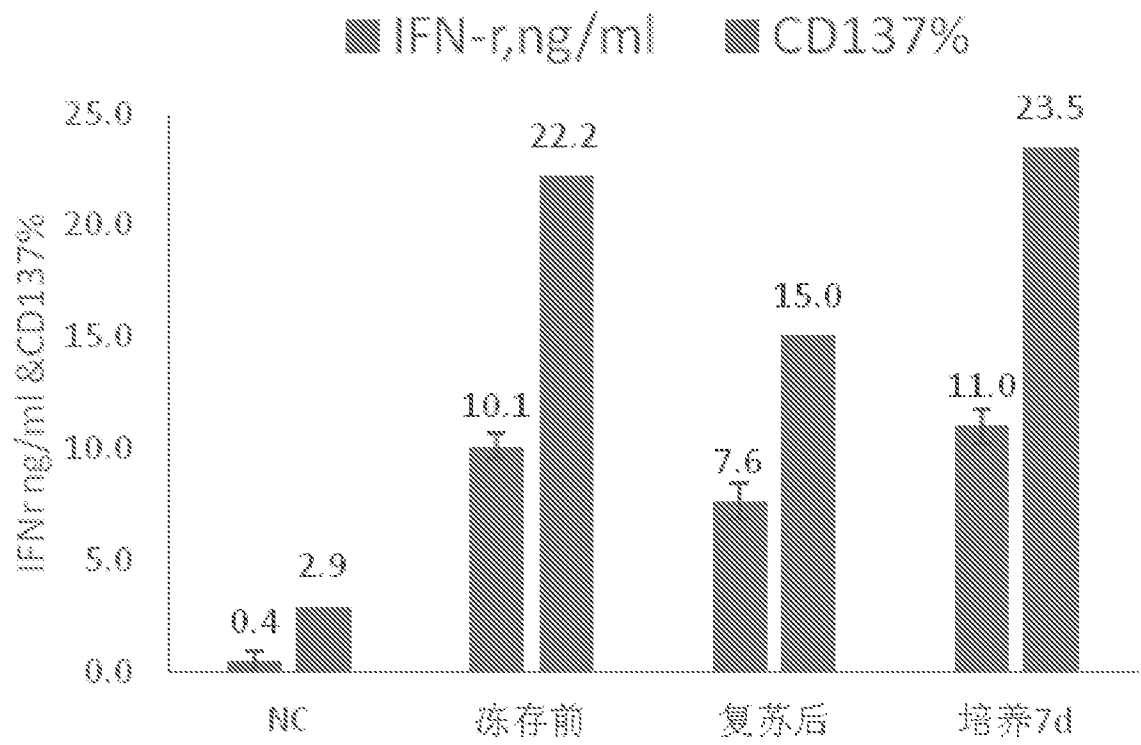


图 3

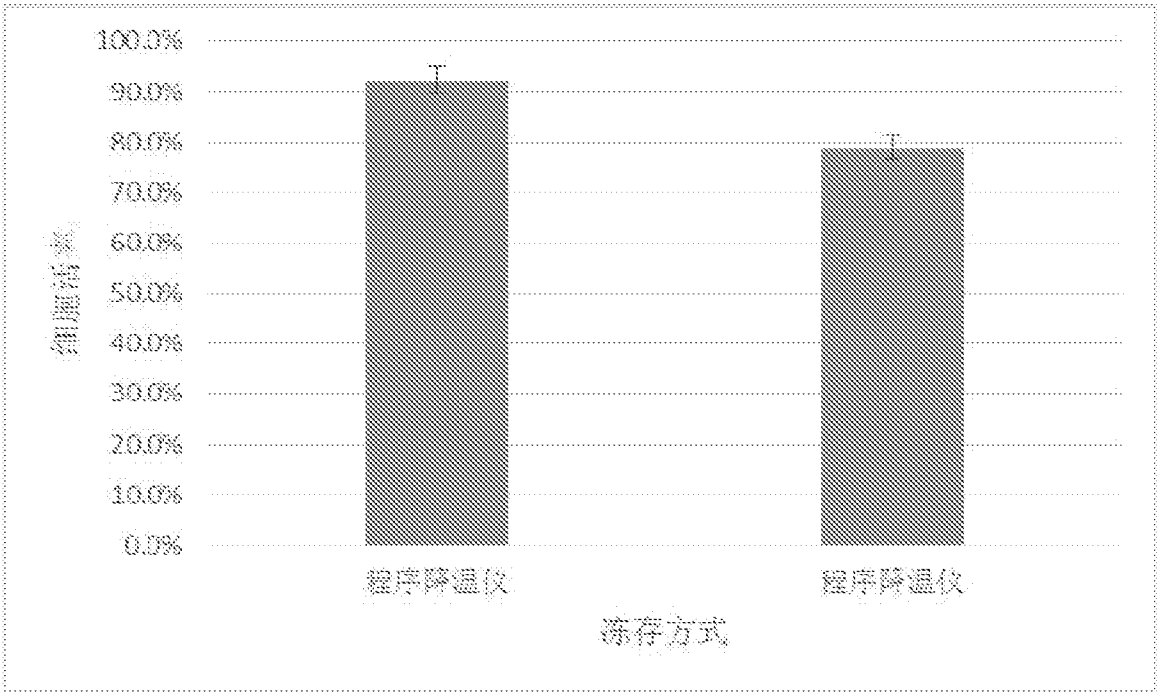


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/088246

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

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: 氯化钠, 生理盐水, NaCl, 保护性蛋白, 保护蛋白, 人血清白蛋白, 人血白蛋白, 蛋白, 二甲基亚砜, DMSO, Sodium chloride, common salt, normal saline, physiological saline, protective protein, human serum albumin, HAS, albumin, protein, dimethyl sulfoxide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105477017 A (SHENZHEN ISTEM REGENERATIVE MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.), 13 April 2016 (13.04.2016), claims 1, 3 and 6	1-10
X	CN 105325402 A (HUANG, Linhai), 17 February 2016 (17.02.2016), claims 1-4, and embodiments 1-11	1-10
X	CN 105660606 A (GUANGZHOU SALIAI STEM CELL SCIENCE AND TECHNOLOGY CO., LTD.), 15 June 2016 (15.06.2016), claims 1 and 9, and embodiment 1	1-10
A	CN 102907416 A (ZHENJING BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.; ZHENJING BIOTECHNOLOGY (WUXI) CO., LTD.), 06 February 2013 (06.02.2013), entire document	1-10
A	CN 103583511 A (SICHUAN NEO-LIFE STEM CELL BIOTECH INC.), 19 February 2014 (19.02.2014), entire document	1-10
A	CN 104430301 A (CHENGDU KANGHUA BIOLOGICAL PRODUCTS CO., LTD.), 25 March 2015 (25.03.2015), 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	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 24 July 2018	Date of mailing of the international search report 07 August 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. 010-62084379

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/088246

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 103461322 A (ZHENJING BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.; ZHENJING BIOTECHNOLOGY (WUXI) CO., LTD.), 25 December 2013 (25.12.2013), entire document	1-10
A	US 2004067480 A1 (ORGAN RECOVERY SYSTEMS INC.), 08 April 2004 (08.04.2004), entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/088246

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105477017 A	13 April 2016	None	
CN 105325402 A	17 February 2016	None	
CN 105660606 A	15 June 2016	CN 105660606 B	03 April 2018
CN 102907416 A	06 February 2013	CN 102907416 B	03 August 2016
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 104430301 A	25 March 2015	None	
CN 103461322 A	25 December 2013	CN 103461322 B	03 August 2016
US 2004067480 A1	08 April 2004	US 2008070302 A1	20 March 2008
		US 7270946 B2	18 September 2007
		US 8017311 B2	13 September 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/088246

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

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: 氯化钠, 生理盐水, NaCl, 保护性蛋白, 保护蛋白, 人血清白蛋白, 人血白蛋白, 蛋白, 二甲基亚砜, DMSO, Sodium chloride, common salt, normal saline, physiological saline, protective protein, human serum albumin, HAS, albumin, protein, dimethyl sulfoxide

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 105477017 A (深圳爱生再生医学科技有限公司) 2016年 4月 13日 (2016 - 04 - 13) 权利要求1、3、6	1-10
X	CN 105325402 A (黄林海) 2016年 2月 17日 (2016 - 02 - 17) 权利要求1-4, 实施例1-11	1-10
X	CN 105660606 A (广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司) 2016年 6月 15日 (2016 - 06 - 15) 权利要求1、9, 实施例1	1-10
A	CN 102907416 A (臻景生物技术上海有限公司 臻景生物技术无锡有限公司) 2013年 2月 6日 (2013 - 02 - 06) 全文	1-10
A	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) 全文	1-10
A	CN 104430301 A (成都康华生物制品有限公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 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 7月 24日

国际检索报告邮寄日期

2018年 8月 7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

受权官员

田瑞增

电话号码 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 103461322 A (臻景生物技术上海有限公司 臻景生物技术无锡有限公司) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 全文	1-10
A	US 2004067480 A1 (ORGAN RECOVERY SYSTEMS INC) 2004年 4月 8日 (2004 - 04 - 08) 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/CN2018/088246

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	105477017	A	2016年 4月 13日	无			
CN	105325402	A	2016年 2月 17日	无			
CN	105660606	A	2016年 6月 15日	CN	105660606	B	2018年 4月 3日
CN	102907416	A	2013年 2月 6日	CN	102907416	B	2016年 8月 3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	104430301	A	2015年 3月 25日	无			
CN	103461322	A	2013年 12月 25日	CN	103461322	B	2016年 8月 3日
US	2004067480	A1	2004年 4月 8日	US	2008070302	A1	2008年 3月 20日
				US	7270946	B2	2007年 9月 18日
				US	8017311	B2	2011年 9月 13日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)