

(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
2015年10月1日 (01.10.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/143696 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 1/14 (2006.01) C07K 14/755 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/074256
- (22) 国际申请日: 2014年3月28日 (28.03.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 成都蓉生药业有限责任公司 (CHENGDU RONGSHENG PHARMACEUTICALS CO., LTD) [CN/CN]; 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。
- (72) 发明人: 牟蕾 (MU, Lei); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。 鲁涛 (LU, Tao); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。 初毅波 (CHU, Yibo); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。 苗松 (MIAO, Song); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。 邓红 (DENG, Hong); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。 王黔川 (WANG, Qianchuan); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。 李伟 (LI, Wei); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。 余伟 (YU, Wei); 中国四川省成都市高新区科园南路7号, Sichuan 610041 (CN)。
- (74) 代理人: 成都高远知识产权代理事务所 (普通合伙) (GAOYUNG INTELLECTUAL PROPERTY

AGENCY); 中国四川省成都市高新区衣冠庙邮局 A-42 号邮箱 (高朋大道5号博士创业园), Sichuan 610041 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING CRYOPRECIPITATE AND METHOD FOR PREPARING BLOOD COAGULATION FACTOR VIII PREPARATION WITH THE CRYOPRECIPITATE

(54) 发明名称: 一种冷沉淀的制备方法以及用其制备凝血因子VIII制剂的方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for preparing a cryoprecipitate, comprising the steps of: (1) melting: taking fresh frozen plasma, raising the temperature, obtaining the melted plasma with temperature of 0-5°C; (2) filtration: under the condition of melted plasma temperature of 0-5°C, filtering to obtain filtrate and residue; (3) centrifugation: under the condition of filtrate temperature of 0-5°C, centrifuging to obtain precipitate; (4) combining the residue obtained in the step (2) and the precipitate obtained in the step (3), to give the cryoprecipitate.

(57) 摘要: 一种制备冷沉淀的方法, 包括如下步骤: (1) 融化: 取新鲜冰冻血浆, 升温, 得温度为 0~5°C 融化血浆; (2) 过滤: 在融化血浆温度为 0~5°C 的条件下, 过滤, 得滤液和滤渣; (3) 离心: 在滤液温度为 0~5°C 的条件下, 离心, 得沉淀; (4) 合并步骤 (2) 得到的滤渣和步骤 (3) 得到的沉淀, 即为冷沉淀。



WO 2015/143696 A1

一种冷沉淀的制备方法以及用其制备凝血因子VIII制剂的方法

技术领域

本发明涉及血液制品的制备方法，特别涉及一种冷沉淀的制备方法以及用其制备凝血因子VIII的方法。

背景技术

冷沉淀是新鲜冰冻血浆在低温条件下不溶解的白色沉淀物，主要含有第VIII因子、纤维蛋白原、血管性血友病因子(VWF)、第XIII因子以及纤连蛋白等成分，是制备人凝血因子VIII制剂的原料。

目前，血浆的冷沉淀制备方法有两种：快速融化离心法和虹吸法。虹吸法制得的冷沉淀中，人凝血因子VIII含量低，目前通常采用快速融化离心法。

快速融化离心法的具体步骤为：取出待制备冷沉淀的新鲜冰冻血浆，置 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜融化或在 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 水浴装置中融化；当血浆基本融化时，取出血浆，在 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的环境下离心，离心的沉淀即为冷沉淀。但是，该方法制得的冷沉淀的量较少，通常每吨血浆仅得到8.9kg冷沉淀，冷沉淀中人凝血因子VIII的含量为39.95IU/g（见营长永等，“人凝血因子VIII分离纯化工艺研究”，山东大学硕士学位论文），对冷沉淀进一步分离纯化制得的人凝血因子VIII制剂的量也比较少，造成血浆资源的浪费。

发明内容

为了解决上述问题，本发明提供了一种新的冷沉淀制备方法。

本发明制备冷沉淀的方法，它包括如下步骤：

- (1) 融化：取新鲜冰冻血浆，升温，得温度为 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 融化血浆；
- (2) 过滤：在融化血浆温度为 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 的条件下，过滤，得滤液和滤渣；
- (3) 离心：在滤液温度为 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 的条件下，离心，得沉淀；
- (4) 合并步骤(2)得到的滤渣和步骤(3)得到的沉淀，即为冷沉淀。

步骤(1)所述融化包括如下两个步骤：

a、预融化：将新鲜冰冻血浆静置于 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$ 环境中，使血浆升温至 $-10^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ ；

b、融化：再升温，得 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 融化血浆。

步骤a中，所述环境温度为 0°C 。

步骤b中，所述升温的方法是 $25\sim 37^{\circ}\text{C}$ 水浴。

步骤(2)中，所述过滤采用堰式滤器过滤。

步骤(3)中，所述离心的离心力为 $14000\sim 15900\text{g}$ 。优选地，所述离心

采用型号为 GQ142 的高速管式离心机离心。

本发明制备凝血因子VIII的方法，它包括如下步骤：

- a、按照前述方法制备冷沉淀；
- b、溶解冷沉淀；
- c、用聚乙二醇沉淀法沉淀，离心，得上清；
- d、SD 法病毒灭活；
- e、采用离子交换层析法或者用氯化钠/甘氨酸盐析法纯化；
- f、除菌、分装、冻干、干热灭活，即可。

步骤 b 中，溶解冷沉淀采用的缓冲液为 0.02M Tris 缓冲液。

步骤 c 中，所述聚乙二醇沉淀法采用 30% 聚乙二醇沉淀。

步骤 e 中，所述离子交换层析采用的凝胶为 Toyopearl DEAE 650M，缓冲液为 0.001 M~0.05M 的枸橼酸钠缓冲液。

步骤 e 中，所述盐析法采用氯化钠/甘氨酸沉淀。

采用本发明方法制备冷沉淀，每吨血浆可以制备得到 11.14kg 冷沉淀，其人凝血因子VIII的含量为 39.43IU/g，有效提高了单位血浆制得的冷沉淀的量，也提高了单位血浆制得的人凝血因子VIII制剂的量，经济效益好，充分利用了血浆资源，具有良好的市场应用前景。

显然，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，在不脱离本发明上述基本技术思想前提下，还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

以下通过实施例形式的具体实施方式，对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

具体实施方式

实施例 1 用本发明方法制备冷沉淀

1、实验仪器

堰式滤器：型号是 FL-2023 堰式罐形过滤器；

连续离心机：GQ142 的高速管式离心机离心。

2、实验方法

(1) 新鲜健康人血浆采集后，-20℃保存，不超过 3 年；

(2) 预融化：将新鲜冰冻血浆 2500L（即 2575Kg，人凝血因子VIII的含量为 2500, 000IU），放置在环境温度为 0℃的条件下，升温至-10℃~0℃；

(3) 融化：在 25℃水浴中融化，将血浆升温至 0~5℃，得融化血浆；

(4) 过滤：在维持融化血浆温度为 0~5℃条件下，采用堰式滤器过滤过滤，得滤液和滤渣；

(5) 离心：在维持滤液温度为 0~5℃ 条件下，采用连续离心机对滤液进行离心，离心力为 15900 g，得沉淀；

(6) 合并步骤 (4) 得到的滤渣和步骤 (5) 得到的沉淀，即为冷沉淀。称量冷沉淀的重量，检测冷沉淀中人凝血因子Ⅷ的含量。

2、检测结果

经过检测，步骤 (4) 的滤渣重量为 6.18kg，其人凝血因子Ⅷ的含量为 41IU/g，步骤 (5) 的沉淀中，滤渣重量为 22.5kg，其人凝血因子Ⅷ的含量为 39IU/g，将二者合并后得到的本发明冷沉淀，总重量为 28.68Kg，冷沉淀中人凝血因子Ⅷ的含量为 39.43IU/g。

因此，采用本发明方法制备冷沉淀，每吨血浆可以制备得到 11.14kg 冷沉淀，其人凝血因子Ⅷ的含量为 39.43IU/g，其中，过滤获得冷沉淀为 2.4Kg，占比 21.55%，其人凝血因子Ⅷ的含量为 41IU/g，离心获得冷沉淀为 8.74Kg，占比 78.45%，其人凝血因子Ⅷ的含量为 39IU/g。

实施例 2 用本发明方法制备冷沉淀

1、实验仪器

堰式滤器：型号是 FL-2023 堰式罐形过滤器；

连续离心机：GQ142 的高速管式离心机离心。

2、实验方法

(1) 新鲜健康人血浆采集后，-20℃ 保存，不超过 3 年；

(2) 预融化：将新鲜冰冻血浆 2500L（即 2575Kg，人凝血因子Ⅷ的含量为 2500，000IU），放置在环境温度为 2℃ 的条件下，升温至 -10℃~0℃；

(3) 融化：在 37℃ 水浴中融化，将血浆升温至 0~5℃，得融化血浆；

(4) 过滤：在维持融化血浆温度为 0~5℃ 条件下，采用堰式滤器过滤过滤，得滤液和滤渣；

(5) 离心：在维持滤液温度为 0~5℃ 条件下，采用连续离心机对滤液进行离心，离心力为 14000 g，得沉淀；

(6) 合并步骤 (4) 得到的滤渣和步骤 (5) 得到的沉淀，即为冷沉淀。

实施例 3 采用本发明冷沉淀制备人凝血因子Ⅷ制剂

1、实验方法

实施例 1 步骤 (4) 过滤获得的冷沉淀（滤渣）300g（重复三次）以及实施例 1 步骤 (5) 离心获得的冷沉淀（沉淀）（重量分别为 3.8kg、3.525kg、

2kg) 分别按照如下方法纯化制备人凝血因子VIII:

(1) 将冷沉淀用 0.02M 氨丁三醇 (Tris) 缓冲液溶解, 30% 聚乙二醇沉淀, 离心, 得上清;

(2) 上清合并澄清后, 加入 Tween-80 和磷酸三丁酯使其最终浓度分别为 1% 和 0.3%, 25°C ± 1°C 处理 6 小时, 完成第一次病毒灭活 (即 SD 病毒灭活);

(3) 氯化钠/氨基酸盐析: SD 病毒灭活结束后, 加入液体体积 15% (w/v) 的氯化钠和 7.5% (w/v) 的甘氨酸进行沉淀, 4000rpm 离心, 收集沉淀;

(4) 超滤配制: 用含 0.01M 枸橼酸钠、0.001M 氯化钙、0.19M 盐酸精氨酸的缓冲液对步骤 I 获得的洗脱液进行超滤透析, 制得的溶液成分为人凝血因子VIII、枸橼酸钠、氯化钙和盐酸精氨酸, 超滤完成后, 加入 20% 人血白蛋白, 使得人血白蛋白的浓度为 8g/L 的比例, 得超滤液;

(5) 再进行除菌、分装、冻干, 冻干结束后, 作 80°C 72 小时的干热处理, 即得终产品: 人凝血因子 VIII 制剂。

检测各步骤产物以及终产品的效价, 计算效价回收率。

2、实验结果

实施例 1 步骤 (4) 过滤获得的冷沉淀的检测结果如下表 1:

表 1 人凝血因子 VIII 的效价回收

	1 st			2 nd			3 rd		
	FVIII 效价 (IU/ml)	体积 ml	收率 (%)	FVIII 效价 (IU/ml)	体积 ml	收率 (%)	FVIII 效价 (IU/ml)	体积 ml	收率 (%)
Tris 溶解液	8.8	1240	100	8.3	1240	100	8.3	1220	100
PEG 上清	4.0	1320	48	4.8	1280	60	3.7	1260	46
SD 后	3.1	1380	39	4.0	1320	51	3.5	1280	44
盐析沉淀	36	100	33	63	100	61		100	
超滤液	31.2	110	31	23.1	110	25	36.4	110	40
终产品	20	150	27	21	120	24	21	170	35

由上表可以看出, 采用实施例 1 步骤 (4) 过滤获得的冷沉淀为原料, 制备的人凝血因子 VIII 制剂, 平均收率为 28.67%。换句话说, 以实施例 1 步骤 (4) 过滤获得的冷沉淀为原料, 每 1g 冷沉淀可以制备得到 11.75IU (41IU/g × 1g × 28.67%) 人凝血因子 VIII 超滤液。

实施例 1 步骤 (5) 离心获得的冷沉淀的检测结果如下表 2:

表2 人凝血因子 VIII 的效价回收

	1 st			2 nd			3 rd		
	FVII I 效 价 (IU /ml)	体 积 ml	收 率 (%)	FVII I 效 价 (IU /ml)	体 积 ml	收 率 (%)	FVIII 效 价 (IU/ml)	体 积 ml	收率 (%)
Tris 溶解液	11.5	1520 0	100	12.4	1410 0	100	9.23	8000	100
PEG 上清	7.5	1550 0	67	7.7	1420 0	62	5.38	8100	59
SD 后	7.21	1600 0	66	7.5	1480 0	63	5.00	8400	57
盐析沉淀	94.6	970	52	84.5	980	47	62.3	620	52
超滤液	85.6	940	46	54.8	1240	39	55.4	670	50
终产品	21	3600	43	20	3000	34	20	1500	40

由上表可以看出，采用实施例 1 步骤（4）过滤获得的冷沉淀为原料，制备人凝血因子 VIII 超滤液，收率平均为 39%。换句话说，以实施例 1 步骤（4）过滤获得的冷沉淀为原料，每 1g 冷沉淀可以制备得到 15.21IU（ $39\text{IU/g} \times 1\text{g} \times 39\%$ ）人凝血因子 VIII 超滤液。

综上，本发明实施例 1 制备得到的冷沉淀，每 1g 可以制备得到 14.46IU（ $11.75\text{IU} \times 21.55\% + 15.21 \times 78.45\%$ ）人凝血因子 VIII 制剂，回收率为 36.68%。

实施例 4 采用本发明冷沉淀制备人凝血因子 VIII 制剂

1、实验方法

（1）实施例 1 制备得到的本发明冷沉淀 300g，0.02M Tris 缓冲液溶解冷沉淀，30% 聚乙二醇沉淀，离心，得上清；

（2）上清合并澄清后，加入 Tween-80 和磷酸三丁酯使其最终浓度分别为 1% 和 0.3%， $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 处理 6 小时，完成第一次病毒灭活（即 SD 病毒灭活）；

（3）采用以 Toyopearl DEAE 650M 为凝胶为填料的离子交换层析作进一步纯化，缓冲液为 0.001M 的枸橼酸钠缓冲液，通过改变层析缓冲液的氯化钠离子强度，采用 0.11M 氯化钠流穿，0.15M 氯化钠洗涤，收集 0.3M 氯化钠洗脱峰，收集得到含人凝血因子 VIII 的洗脱液；

(4) 用含 0.01M 枸橼酸钠、0.001M 氯化钙、0.19M 盐酸精氨酸的缓冲液对步骤 I 获得的洗脱液进行超滤透析，制得的溶液成分为人凝血因子 VIII、枸橼酸钠、氯化钙和盐酸精氨酸，超滤完成后，加入 20% 人血白蛋白，使得人血白蛋白的浓度为 8g/L 的比例；

(5) 再进行除菌、分装、冻干，冻干结束后，作 80℃72 小时的干热处理，即得人凝血因子 VIII 制剂。

采用现有方法制备冷沉淀，每吨血浆仅得到 8.9kg 冷沉淀，冷沉淀中人凝血因子 VIII 的含量为 39.95IU/g，后续分离纯化后，得到的人凝血因子 VIII 制剂的活性回收率为 32.02%（详见营长永等，“人凝血因子 VIII 分离纯化工工艺研究”，山东大学硕士学位论文，第 23 页倒数 1-3 行以及第 42 页图 10），因此，采用现有的方法制备人凝血因子 VIII 制剂，每 1 吨血浆能制备得到 112366IU 人凝血因子 VIII 制剂。

将现有方法与本发明对比如下表：

	冷沉淀		人凝血因子 VIII 制剂的活性回收率	每 1 吨血浆制得人凝血因子 VIII 制剂的量 (IU)
	量 (kg/吨血浆)	人凝血因子 VIII 的含量 (IU/g)		
现有技术	8.9	39.95	32.02%	113848
本发明	11.14	39.43	36.68%	161116
本发明比现有技术高出的量	2.24			47268

由上表可以看出，采用本发明方法制备冷沉淀，得到的冷沉淀的量比现有方法高了 2.24kg/吨血浆，提高比例为 25.17%；以本发明冷沉淀为原料，制备人凝血因子 VIII 制剂时，活性回收率与现有方法相当，采用本发明方法，每 1 吨血浆可以多制备得到 47268IU 人凝血因子 VIII 制剂，提高比例为 41.51%。

在血液制品领域，由于血浆资源非常有限，具有稀缺和不可替代性，人凝血因子 VIII 的分离纯化又较为复杂，因而人凝血因子 VIII 制剂的价格昂贵，目前，国内的人凝血因子 VIII 制剂，每 200IU/瓶的价格最低为 200 元。

采用本发明方法，每 1 吨血浆可以多获得 47268IU 人凝血因子 VIII 制剂，也就是说，每 1 吨血浆的可以多获得 47268 元，经济效益的提高幅度可想而知。换句话说，因为血液制品的特殊性，有效成分非常敏感，活性容易丧失，因此，通过技术改进得到的收率提高，都意味着技术人员付出了极大的努力，

同时也意味着巨大的经济利益的产生。

工业应用性

采用本发明方法制备得到的冷沉淀的量较大，每一吨冷沉淀可制备得到 11.14kg 冷沉淀，冷沉淀中人凝血因子Ⅷ的含量高，为 39.43IU/g，用其进一步分离纯化制备得到人凝血因子Ⅷ制品的量也较大，充分地利用了血浆，具有良好的市场应用前景，适合产业化生产。

权利要求书

- 1、一种制备冷沉淀的方法，其特征在于：它包括如下步骤：
 - (1) 融化：取新鲜冰冻血浆，升温，得温度为 0~5℃融化血浆；
 - (2) 过滤：在融化血浆温度为 0~5℃的条件下，过滤，得滤液和滤渣；
 - (3) 离心：在滤液温度为 0~5℃的条件下，离心，得沉淀；
 - (4) 合并步骤 (2) 得到的滤渣和步骤 (3) 得到的沉淀，即为冷沉淀。
- 2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤 (1) 所述融化包括如下两个步骤：
 - a、预融化：将新鲜冰冻血浆静置于 0~2℃环境中，使血浆升温至 -10℃~0℃；
 - b、融化：再升温，得 0~5℃融化血浆。
- 3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：步骤 a 中，所述环境温度 为 0℃。
- 4、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：步骤 b 中，所述升温的方法 是 25~37℃水浴。
- 5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤 (2) 中，所述过滤 采用堰式滤器过滤。
- 6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤 (3) 中，所述离心 的离心力为 14000~15900g。
- 7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述离心采用型号为 GQ142 的高速管式离心机离心。
- 8、一种制备凝血因子Ⅷ制剂的方法，其特征在于：它包括如下步骤：
 - a、按照权利要求 1~7 任意一项所述方法制备冷沉淀；
 - b、溶解冷沉淀；
 - c、用聚乙二醇沉淀法沉淀，离心，得上清；
 - d、SD 法病毒灭活；
 - e、采用离子交换层析法或者用氯化钠/甘氨酸盐析法纯化；
 - f、除菌、分装、冻干、干热灭活，即可。
- 9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：步骤 b 中，溶解冷沉淀采 用的缓冲液为 0.02M Tris 缓冲液。
- 10、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：步骤 c 中，所述聚乙二 醇沉淀法采用 30%聚乙二醇进行沉淀。
- 11、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：步骤 e 中，所述离子交 换层析采用的凝胶为 Toyopearl DEAE 650M，缓冲液为 0.001 M~0.05M 的

枸橼酸钠缓冲液。

12、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：步骤 e 中，所述氯化钠/甘氨酸盐析法中，溶液中氯化钠的终浓度为 15% (w/v)，甘氨酸的终浓度为 7.5% (w/v)。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/074256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/14 (2006.01) i; C07K 14/755 (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)

C07K 1/-, C07K 14/-

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)

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, PubMed, ISI Web of Knowledge, Google: MOU, Lei; LU, Tao; CHU, Yibo; MIAO, Song; DENG, Hong; WANG, Qianchuan; LI, Wei; YU, Wei; coagulation factor VIII, premelting, weir filter, polyethylene glycol, Cryoprecipitate, CP, Clotting factor, coagulation Factor, antihemophilic factor, melt+, thaw+, filter+, screen+, Centrifug+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.), 03 August 1976 (03.08.1976), abstract, description, column 1, lines 9-14 and 35-41, and column 2, lines 22-36	1-7
Y	US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.), 03 August 1976 (03.08.1976), abstract, description, column 1, lines 9-14 and 35-41, and column 2, lines 22-36	8-12
Y	CN 102924562 A (CHENGDU RONSEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 13 February 2013 (13.02.2013), claims 6-8, and description, paragraph 0043	8-12
A	LI, He et al., "Large-scale Preparation of High-Purity F VIII Concentrate Processed by Organic Solvents/Surfactants", INTERNATIONAL JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION AND HEMATOLOGY, vol. 15, no. 5, 31 December 1991 (31.12.1991), page 330	8, 12
A	YUAN, Qinghui et al., "Large-scale Preparation of High-Purity Solvent - Factor VIII Concentrate Processed by Detergents", INTERNATIONAL JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION AND HEMATOLOGY, vol. 14, no. 6, 31 December 1991 (31.12.1991), page 391	8, 12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
15 November 2014 (15.11.2014)

Date of mailing of the international search report
31 December 2014 (31.12.2014)

Name and mailing address of the ISA/CN:
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
LIAO, Wenyong
Telephone No.: (86-10) **62413867**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/074256**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3986506 (BAXTER TRAVENOL LAB., INC.), 19 October 1976 (19.10.1976), the whole document	1
A	ZHANG, Xiang et al., "IMPROVEMENT ON THE PREPARATION METHOD OF CRYOPRECIPITATE COAGULATION FACTOR", CHINA PRACTICAL MEDICINE, vol. 7, no. 22, 31 August 2012 (31.08.2012), pages 261-262	1-12
E	CN 103848886 A (CHENGDU RONSEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 11 June 2014 (11.06.2014), claims 1-10	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/074256

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 3973002	03 August 1976	None	
CN 102924562 A	13 February 2013	WO 2014075435 A1	22 May 2014
		CN 102924562 B	23 July 2014
US 3986506	19 October 1976	BE 832979 A1	31 December 1975
		ZA 7505396 A	28 July 1976
CN 103848886 A	11 June 2014	None	

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 1/14(2006.01)i; C07K 14/755(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K 1/-, C07K 14/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, PubMed, ISI Web of Knowledge, Google: 牟蕾, 鲁涛, 初毅波, 苗松, 邓红, 王黔川, 李伟, 余伟, 冷沉淀, 凝血因子VIII, 凝血因子, 过滤, 离心, 融化, 预融化, 堰式过滤器, 聚乙二醇, Cryoprecipitate, CP, Clotting factor, coagulation Factor, antihemophilic factor, melt+, thaw+, filter+, screen+, Centrifug+</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.) 1976年 8月 03日 (1976 - 08 - 03) 摘要, 说明书第1栏第9-14行, 第35-41行, 第2栏第22-36行</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.) 1976年 8月 03日 (1976 - 08 - 03) 摘要, 说明书第1栏第9-14行, 第35-41行, 第2栏第22-36行</td> <td>8-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102924562 A (成都蓉生药业有限责任公司) 2013年 2月 13日 (2013 - 02 - 13) 权利要求6-8, 说明书第0043段</td> <td>8-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>李和等. "大规模制备经有机溶剂/表面活性剂处理的高纯F VIII浓缩物." 国外医学输血及血液学分册., 第15卷卷, 第5期期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第330页</td> <td>8, 12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>袁庆辉等. "大量制备高纯的溶剂——去污剂处理的因子VIII浓制剂." 国外医学输血及血液学分册., 第14卷卷, 第6期期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第391页</td> <td>8, 12</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.) 1976年 8月 03日 (1976 - 08 - 03) 摘要, 说明书第1栏第9-14行, 第35-41行, 第2栏第22-36行	1-7	Y	US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.) 1976年 8月 03日 (1976 - 08 - 03) 摘要, 说明书第1栏第9-14行, 第35-41行, 第2栏第22-36行	8-12	Y	CN 102924562 A (成都蓉生药业有限责任公司) 2013年 2月 13日 (2013 - 02 - 13) 权利要求6-8, 说明书第0043段	8-12	A	李和等. "大规模制备经有机溶剂/表面活性剂处理的高纯F VIII浓缩物." 国外医学输血及血液学分册., 第15卷卷, 第5期期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第330页	8, 12	A	袁庆辉等. "大量制备高纯的溶剂——去污剂处理的因子VIII浓制剂." 国外医学输血及血液学分册., 第14卷卷, 第6期期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第391页	8, 12
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.) 1976年 8月 03日 (1976 - 08 - 03) 摘要, 说明书第1栏第9-14行, 第35-41行, 第2栏第22-36行	1-7																		
Y	US 3973002 (SQUIBB & SONS, INC.) 1976年 8月 03日 (1976 - 08 - 03) 摘要, 说明书第1栏第9-14行, 第35-41行, 第2栏第22-36行	8-12																		
Y	CN 102924562 A (成都蓉生药业有限责任公司) 2013年 2月 13日 (2013 - 02 - 13) 权利要求6-8, 说明书第0043段	8-12																		
A	李和等. "大规模制备经有机溶剂/表面活性剂处理的高纯F VIII浓缩物." 国外医学输血及血液学分册., 第15卷卷, 第5期期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第330页	8, 12																		
A	袁庆辉等. "大量制备高纯的溶剂——去污剂处理的因子VIII浓制剂." 国外医学输血及血液学分册., 第14卷卷, 第6期期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第391页	8, 12																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2014年 11月 15日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2014年 12月 31日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>廖文勇</p> <p>电话号码 (86-10)62413867</p>																		

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	US 3986506 (BAXTER TRAVENOL LAB., INC.) 1976年 10月 19日 (1976 - 10 - 19) 全文	1
A	张湘等. "冷沉淀凝血因子制备方法的改进." 中国实用医药., 第7卷卷, 第22期期, 2012年 8月 31日 (2012 - 08 - 31), 第261-262页	1-12
E	CN 103848886 A (成都蓉生药业有限责任公司) 2014年 6月 11日 (2014 - 06 - 11) 权利要求1-10	1-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/074256

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)
US	3973002		1976年 8月 03日	无			
CN	102924562	A	2013年 2月 13日	WO	2014075435	A1	2014年 5月 22日
				CN	102924562	B	2014年 7月 23日
US	3986506		1976年 10月 19日	BE	832979	A1	1975年 12月 31日
				ZA	7505396	A	1976年 7月 28日
CN	103848886	A	2014年 6月 11日	无			