

国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

用户案卷号 PT2025005326-FD-P

此框内容由国家知识产权局填写

③ 国际申请号	PCT/IB2024/053443	① 国家申请号		
④ 国际申请日	2024-04-08	② 递交日		
⑤ 优先权日	2023-06-01			
⑥ 国际公布号	W02024/246625			
⑦ 国际公布日	2024-12-05			
⑧ 国际公布语言	西班牙			
⑨ 发明名称	获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法			
⑩ 发明人	发明人 (1)	姓名： 劳尔·弗朗西斯科·莫埃达诺·拉拉	<input type="checkbox"/> 不公布姓名	
		国籍或地区： 墨西哥	身份证件号码：	
	发明人 (2)	姓名：	<input type="checkbox"/> 不公布姓名	
		国籍或地区：	身份证件号码：	
⑪ 申请人	<input type="checkbox"/> 全体申请人请求费用减缴且已完成费用减缴资格备案			
	申请人 (1)	姓名或名称： 劳尔·弗朗西斯科·莫埃达诺·拉拉	申请人类型 个人	
		国籍或注册国家（地区） 墨西哥	电子邮箱	
		身份证件号码或统一社会信用代码		
		经常居所地或营业所所在地 墨西哥	电话	
		详细地址 墨西哥 伊达尔戈州	邮政编码	
	申请人 (2)	姓名或名称：	申请人类型	
		国籍或注册国家（地区）	电子邮箱	
		身份证件号码或统一社会信用代码		
		经常居所地或营业所所在地	电话	
详细地址		邮政编码		
⑫ 联系人	姓 名	电 话		
	邮政编码	电子邮箱		
	详细地址			
⑬ 代表人	为非第一署名申请人时声明 特声明第<u>1</u> 署名申请人为代表人			

国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

⑭ 专 利 代 理 机 构	<input checked="" type="checkbox"/> 声明已经与申请人签订了专利代理委托书且本表中的信息与委托书中相应信息一致				
	名称 北京市万慧达律师事务所		机构代码 11111		
	代 理 师 (1)	姓 名 胡洪慧	代 理 师 (2)	姓 名	
		资格证号 1110811		资格证号	
	电 话 010-68921000		电 话		
<p>⑮ 提前处理</p> <input checked="" type="checkbox"/> 自优先权日起 30 个月的期限尚未届满，请求国家知识产权局根据专利法实施细则第 129 条提前处理和审查本国际申请。 <input type="checkbox"/> 本国际申请尚未国际公布，请求国家知识产权局作为指定局要求国际局传送国际申请文件副本。 *自优先权日起 30 个月的期限尚未届满，申请人不要求提前处理本国际申请，请取消上述默认选项。					
<p>⑯ <input type="checkbox"/> 提前公布 根据专利法第 34 条的规定，请求早日公布该专利申请。</p>					
<p>⑰ 审查基础文本声明</p> <input checked="" type="checkbox"/> 以原始国际申请文件中的译文为审查基础 <input type="checkbox"/> 以下列申请文件为审查基础					
<input type="checkbox"/> 说明书	第 页，按原始国际申请文件的中文译文 第 页，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件的中文译文 第 页，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
<input type="checkbox"/> 权利要求	第 项，按原始国际申请文件的中文译文 第 项，按专利合作条约第 19 条修改的中文译文 第 项，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件的中文译文 第 项，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
<input type="checkbox"/> 附图	第 页，按原始国际申请文件的中文译文 第 页，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件的中文译文 第 页，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
<input type="checkbox"/> 核苷酸和/或氨基酸序列表	第 页，按原始国际申请文件 第 页，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件 第 页，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
⑱ 要 求 优 先 权 声 明	序号	原受理机构名称	在先申请日	在先申请号	
	1	墨西哥	2023-06-01	MX/a/2023/006528	
	2				
	3				
	4				
	5				

国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

⑲ 关于遗传资源的说明

本国际申请涉及的发明创造是依赖于遗传资源完成的

⑳ 关于援引加入的说明

本国际申请在国际阶段含有援引加入项目或部分，提交的中文译文中包含援引加入项目或部分。

序号	文件类型	原始申请文件译文中的位置	在先申请文件译文中的位置	原受理机构名称	在先申请日	在先申请号
----	------	--------------	--------------	---------	-------	-------

㉑ 生物材料样品保藏

本国际申请涉及的生物材料样品的保藏已在专利合作条约实施细则第 13 条之 2.4 规定的期限内以下列形式作出记载：

保藏编号	保藏日期	保藏单位代码	说明书译文第_页_行 或 PCT/RO/134 表	是否存活
------	------	--------	------------------------------	------

国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

<p>⑳ 不丧失新颖性宽限期声明</p> <p><input type="checkbox"/> 已在国家出现紧急状态或者非常情况时，为公共利益目的首次公开。</p> <p><input type="checkbox"/> 已在中国政府主办或承认的国际展览会上首次展出，并在提出国际申请时作出过声明。</p> <p><input type="checkbox"/> 已在规定的学术会议或技术会议上首次发表，并在提出国际申请时作出过声明。</p> <p><input type="checkbox"/> 他人未经申请人同意而泄露其内容。</p>	
<p>㉑ 复查请求</p> <p><input type="checkbox"/> 申请人于年月日收到下列通知</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 受理局拒绝给予国际申请日 <input type="checkbox"/> 国际局按专利合作条约第 12 条（3）作出认定</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 受理局宣布申请被认为撤回</p> <p><input type="checkbox"/> 根据专利合作条约第 25 条特此向国家知识产权局提出复查请求，并且</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 已请求国际局将档案中有关文件传送国家知识产权局；</p> <p style="margin-left: 20px;">已依照专利法实施细则第 120 条的规定办理进入中国国家阶段的手续。</p>	
<p>㉒ 请求实质审查</p>	<p><input type="checkbox"/> 根据专利法第 35 条的规定，请求对该专利申请进行实质审查。</p> <p style="margin-left: 20px;">请求对本申请延迟审查，延迟期限为 <input type="checkbox"/> 1 年 <input type="checkbox"/> 2 年 <input type="checkbox"/> 3 年</p> <p><input type="checkbox"/> 申请人声明，放弃专利法实施细则第 57 条规定的主动修改的权利。</p>
<p>㉓ 摘要附图</p>	<p>指定说明书附图中的图为摘要附图。</p>
<p>㉔ 申请文件清单</p> <p>1. 国际申请进入中国国家阶段声明（发明）共 5 页</p> <p>2. 说明书摘要 共 1 页</p> <p>3. 权利要求书 共 3 页</p> <p>4. 说明书 共 10 页</p> <p>权利要求的项数 25 项</p>	<p>㉕ 附加文件清单</p> <p>1. 专利代理委托书 共 2 页</p> <p>证明文件备案编号__</p> <p>总委托书(编号)</p>

国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

⑳ 代表人或专利代理机构

北京市万慧达律师事务所

权利要求书

1. 一种获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，包括以下步骤：

1. 鉴定母牛的来源。2. 验证母牛的健康卫生要求。3. 选择母牛。4. 使用 Cachetero Cash 技术使母牛脱敏。5. 通过垂直咽喉切割屠宰动物。6. 排出胎牛。7. 垂直取出胎牛。8. 在垂直位置提取胎血，在卫生条件下收集在 25 升聚丙烯袋中。9. 验证血液没有任何外部污染物。10. 静置血液。11. 机械去纤维化血液以破坏任何类型的凝结核。12. 通过离心分离血清。13. 倾析胎牛血清。14. 获得胎牛血清。15. 放置胎牛血清于均化罐中。16. 生产均质胎牛血清。17. 转移胎牛血清至不锈钢容器中。18. 过滤胎牛血清以除去毒素和不需要的化合物。19. 包装胎牛血清以在卫生条件下且完全无菌地分配。20. 灭菌胎牛血清。21. 冷冻胎牛血清。22. 融化纯胎牛血清。23. 制备由胎牛血清、胍丁胺、和水组成的混合物。24. 温育所述混合物。25. 离心所述混合物。26. 离心后从样品中除去可能的固体。27. 向具有胍丁胺的胎牛血清中添加 40%乙醇的 12.80%溶液，这有助于保持胎牛血清的性质而不影响其化学组成并去除多胺残余物。28. 离心分离固形物。29. 干燥混合物以脱水。30. 获得细晶体。31. 包装结晶化合物。32. 用紫外光消毒所述化合物。33. 执行质量控制测试。34. 再生晶体。

2. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，其特征在于，在步骤 3 中，基于胎龄至多 7 个月选择所述母牛。

3. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，其特征在于，在步骤 10 中，所述血液的静置期是在冰上保持 5 小时。

4. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，其特征在于，在步骤 12 中，通过使用 Beckman Coulter 离心机 Model Avanti JxN-26 在 4° C 以 8,000 rpm 离心 30 分钟来分离血清。

5. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，其特征在于，在步骤 15 中，所述罐由不锈钢制成，具有 10 至 20 升的容量，并且为椭圆形，其中通过机械方式进行均质化，即环状、水平、竖直和振动运动。

6. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，其特征在于，在步骤 17 中，将转移所述血清至与氮气压力系统连接的不锈钢筒中，以根据所需剂量来包装。

7. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，其特征在于，在步骤 18 中，使用双构造的 0.10 微米 Pall Acropack 过滤器在氮气压力下三重过滤。

8. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法，其特征在于，在步骤 20 中，

权 利 要 求 书

用紫外光灭菌所述胎牛血清 30 - 45 分钟。

9. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 21 中, 胎牛血清的储存是在 -21°C 。

10. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 22 中, 在 8 和 12 摄氏度之间的环境温度下解冻纯胎牛血清。

11. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 23 中, 所述混合物由 600 ml 胎牛血清、80 ml 的 30%胍丁胺、和 100 ml 的 40%乙醇水溶液在 pH 6 下组成。

12. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 24 中, 所述混合物的孵育在 -5°C 下进行 2 小时。

13. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 25 中, 在 -6°C 下以 8,000 rpm 的速度离心所述混合物以分离固形物。

14. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 27 中, 将乙醇加入到胎牛血清和胍丁胺的化合物中, 其中乙醇的浓度为 40%。

15. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 28 中, 在 8,000 rpm、最高温度 -5°C 下离心分离固形物。

16. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 29 中, 所述化合物脱水的干燥温度逐渐升高至最高温度 180°C , 以防止初始化学性质损失。

17. 根据权利要求 1 的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 30 中, 获得尺寸为 1 微米, 但不限于 1 微米的粉红色细晶体。

18. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 31 中, 包装所述化合物可在由聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG) 或玻璃制成的无菌容器中进行。

19. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 32 中, 用紫外光灭菌所述化合物。

20. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 32 中, 所述化合物的灭菌时间为 30 - 45 分钟。

21. 根据权利要求 1 所述的获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法, 其特征在于, 在步骤 34 中, 用于所述晶体再生和它们的使用的量可为 50 ml 无热原的水溶液与 0.242g 结晶胎牛血清; 100 ml 含 0.485g 结晶胎牛血清; 250 ml 与 1.2125g 结晶胎牛血清; 500 ml 含 2.425g 结

权 利 要 求 书

晶胎牛血清；1000 ml 含 4.85g 结晶胎牛血清。

22. 通过权利要求 1 至 20 的方法获得的含胍丁胺的结晶胎牛血清。
23. 含胍丁胺的结晶胎牛血清在细胞培养物中增加细胞产量和增加每细胞蛋白质表达量的用途。
24. 根据权利要求 1 所述的含胍丁胺的结晶胎牛血清在细胞培养物中的用途，用于储存无需超冷链要求。
25. 根据权利要求 1 所述的含胍丁胺的结晶胎牛血清在细胞培养物中的用途，使用根据权利要求 2 所述的精确剂量用于所述使用量，从而降低污染风险。

获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种用于旨在用于细胞培养基中的补充剂的结晶和重构方法。

技术领域

[0002] 本发明的目的是通过掺入胍丁胺获得结晶胎牛血清的方法，这是在测试了各种多胺并鉴定了最有效增加细胞产量和增加每细胞蛋白质表达量的那一个之后选择的。所述方法与液体胎牛血清相比获得了 98% 的最佳结晶效率，以及重构为液体形式用于特定用途而不损失原始性质的合适方法。这允许储存而不需要超冷链，并且通过根据所需的使用体积实现精确的剂量而降低污染风险。

背景技术

[0003] 对于植物和动物细胞的培养，一直需要使用基于蛋白质的血清，其提供有效的细胞发育和产生所需蛋白质或病毒所需的必需生长营养物。为了实现生物产品如病毒或重组蛋白的有效开发，关键是获得最佳细胞密度和增强细胞内蛋白质表达，从而使目标产物的总产率最大化。

[0004] 通常，常规的胎牛血清制剂需要用于运输和储存的冷链。本发明所述的结晶胎牛血清构成以细晶体形式存在的创新产品。可方便地调节此制剂以减少白蛋白、转铁蛋白、支原体和牛海绵状脑病的不期望的比例，从而产生更安全的产品——特别适用于制备旨在用于人应用的药物或疫苗。

[0005] 目前，已经探索了几种替代方案来提供有效的培养条件，其显著地将与解冻和提取等分试样以供实验室使用相关的污染风险最小化。本发明源于需要提供一种克服目前市场上可获得的胎牛血清中固有的这些和其它技术限制的方法。

[0006] 与血清组分浓度及其生物活性的波动相关的批次间变异性可最终导致原代细胞的培养、扩增、和分化——代表细胞培养过程中的重要成本因素。由于依赖于胎牛血清的模型的再现性存在问题，因此其用于调节目的用途仍在讨论中。为此，只要可能，应避免使用补充血清的培养基，优选化学成分确定的培养基（van der Valk 等人，2018）。

[0007] 理想来说，在整个研究期间应当有足够量的血清可用。当切换到新的批次时，研究人员必须确保没有其它试剂被改变，并且为了验证目的保留足够量的先前血清，以便确定任何

说明书

意外结果是否可归因于批次改变。例如，当实际上新的血清批次已经影响细胞分裂速率时，很容易错误地得出 DNA 转染方案中存在问题的结论。研究人员还应记录血清供应商提供的信息，包括批号（Baker, M., 2016）。

[0008] 为了使血清污染最小化，一些研究者选择 γ 辐射。几种常见的污染物，包括支原体，甚至对低水平的辐射也是敏感的。然而，该方法需要精密的平衡，因为辐射也可能损害细胞生存所必需的生长蛋白和生物活性分子。来自位于科罗拉多州 Longmont 的 RMC Pharmaceutical Solutions 的细胞培养顾问 Raymond Nims 建议计划用 γ 辐射的血清工作的任何人应该首先证实细胞如预期的那样工作，并且记住甚至无污染物的血清也不能防止源自其它来源的感染（Baker, M., 2016）。

[0009] 无血清培养基的使用减少了动物的痛苦，并可产生更具重现性的体外方法，其中的一些方法正被开发以替代或最小化动物试验，从而有助于动物实验的替代、减少、和改进的原则。因此，安全、科学、和伦理考虑成为开发和实施无血清培养基的主要动机（van der Valk 等人，2018）。

[0010] 在本发明中，我们已经成功地消除了最终产品的处理过程中对冷链的需要，允许操作和剂量而没有污染的风险，并通过能够在环境温度下储存而显著地降低了使用者的成本。我们开发了通过对各种胎牛血源进行分类、混合、和处理而获得的结晶胎牛血清，获得在结晶和随后的溶解时恢复到其液体形式的一种血清。当重结晶时，以其固态回收，一旦掺入培养基中，则提供期望水平的细胞效率和生产力。

[0011] 鉴于市场上唯一主要的形式是常规的液体胎牛血清，本发明的创新在于产品的转化过程。然而，通过专有的结晶方法，我们已经获得了这种新颖的表现，其构成了该领域中的真正的技术进步和与众不同的创新。

[0012] 本发明公开的结晶胎牛血清是一种以固体形式存在的产品，由保持与常规液体血清相同的物理化学和生物学性质的细晶体组成，不需要冷冻，并且在处理过程中具有更高的效率和产率。此产品所赋予的优点是：冷链的免除、保存期限的延长、在不超过 30° C 的环境温度下储存的能力、冷藏要求的免除、以及在不损害产品完整性的情况下无污染定量给料的可能性。总之，这些特性使得产品在整个分销和商业化过程中更有效。

[0013] 本发明的结晶胎牛血清的表征通过根据溶解参考表制备所需量的方法来定义，从而能够制备合适的培养基。通过无热原的水溶液中简单重建晶体，可再生具有与常规液体形式相同的性质的胎牛血清。

说明书

[0014] 自然地，胎牛血清通常以液体形式提供；然而，它是需要小心处理的高度敏感和精细的产品，因为它必须在-20° C 的最低温度下储存，并且由于在解冻过程中其功能性质的损失，在解冻后只能使用一次。此外，目前市场上可获得的胎牛血清的商业制剂需要用于运输和储存的连续冷链。通过我们的结晶方法获得的胎牛血清构成了呈现为细晶体的创新产品，其被设计成减少不需要的成分例如白蛋白、转铁蛋白、支原体和牛海绵状脑病病毒，产生更安全的产品，特别适用于制备用于人类应用的药物或疫苗。本发明能够实现均匀的细胞生长以及所需产物——特别是蛋白质——的增加的产量。本发明的区别特征是在牛血清的结晶过程中掺入胍丁胺，一种短链多胺，协同作用以增强细胞生长、特定细胞生产率和最终细胞密度。

[0015] 从国际分类 A61——人类必需品下的专利数据库中检索的选定专利参考 A61K35/16 亚类内的现有技术。特别是，标题为“血清生产系统”的专利 US2009124011A1 公开了具有受控血清特征的牛血清组合物以及从母牛类哺乳动物的后代的全血生产这种组合物的方法。此专利通过特定的生产条件控制了胎牛血清的性质；然而，其没有公开或建议任何结晶方法。

[0016] 在 A61D1/00、A61D1/08、A61K35/16、B01D17/00、B01D35/00 和 B01D57/00 部分中，标题为“一种胎牛血清生产工艺”的专利 CN101112334A，涉及一种胎牛血清，更具体地，涉及生产这种血清的生产工艺。所述发明包括采集、分离、过滤和随后冷冻保存。然而，此专利没有公开任何结晶方法，例如本发明中描述的方法。所引用的文献都没有提及用胍丁胺使胎牛血清结晶的方法，特别是在本申请中详述的特定参数和条件下的。

[0017] 有趣的是，我们发现，与通常被认为是关于其生产方法的标准化产品的常规天然胎牛血清相比，通过我们的专有方法结晶胎牛血清更有利于蛋白质表达和细胞生长速率。

具体实施方式

[0018] 参考包括本发明的阶段和附图，详细描述本发明的特征、功能和操作原理。同样，本发明和现有技术之间的区别也被清楚地识别。

[0019] 实施例

实施例 1:

进行了若干分析以确定参考胎牛血清必须满足的各种参数，例如总蛋白和白蛋白含量，以便匹配或改善不同呈现中的这些特性——即，结晶形式。

说明书

参数	参考值
[0020] 总蛋白	3.4–4.5克/分升
血清白蛋白	1.2–2.5克/分升
球蛋白	2.1–3.6克/分升
白蛋白–球蛋白比	1.1–1.4

获得以下结果：

血液样品	蛋白质	白蛋白	球蛋白
1C	3.30克/分升	1.20克/分升	1.10克/分升
3C+1A	3.50克/分升	1.00克/分升	1.50克/分升
B+½R	3.60克/分升	1.90克/分升	1.70克/分升
B+1R	3.20克/分升	1.60克/分升	1.60克/分升
B+½R	3.00克/分升	1.10克/分升	1.40克/分升
BFS (参考)	3.0–4.5克/分升	1.60–3.40克/分升	1.70克

一旦鉴定了这些批次的胎牛血液，就将其混合以匹配胎牛血清的物理化学特性。将混合物去纤维蛋白并用 Beckman Coulter Avanti JxN-26 离心机在 4° C 以 8,000 rpm 离心 30 分钟。随后，在氮气压力下使用 Pall Acropack 0.10 μm 双滤器超滤，并将所得滤液转移至无菌 PETG 容器中。


[0021] 基于所进行的试验，产生最满意结果的最重要的批次列出如下：

批次	混合物
批次 DQ-98/20-02-18	胎龄3个月胎牛血清400 ml 胎龄7个月胎牛血清400 ml 胎龄11个月胎牛血清400 ml 总溶液900 ml


获得了表现出与参考胎牛血清相当特性的混合物。这些分析通过由认证实验室 LABORATORIOS LEI 进行的测试来验证，其中验证了参数如总蛋白、白蛋白、免疫球蛋白、内毒素、摩尔渗透压浓度、血红蛋白和氢电势 (pH)。相应的实验室结果作为附录“A”附加。

[0022] 从用有效混合物制备的第二批次，获得以下结果：

说明书

批次	混合物	参考图
批次 DQ-145/18-04-19	BFS混合物800 ml 聚胺100 ml 40%乙醇溶液100 ml 总溶液：1000 mL	

将此批次送至墨西哥社会安全研究所（IMSI）—21 世纪，特别是免疫学部门，进行相同的分析，这次包括使用 HUVEC、RAJI、和 HTP-1 细胞的细胞生长测定。相应的实验室结果作为附录“B”附加。


批次	混合物	参考图
批次 DQ-201-A/12-07-2019 分析：2019年8月	BFS 500 ml 聚胺100 ml 40%乙醇溶液80 ml 总溶液760 ml	N/A
[0023] 批次 DQ-201-B/16-10-2019 分析：2019年11月	BFS 600 ml 聚胺100 ml 40%乙醇溶液80 mL 总溶液780 ml	

对于随后的批次，制备以下混合物：

再次将样品送至墨西哥社会安全研究所（IMSI）—21 世纪，特别是免疫学部门，继续进行物理化学和细胞生长试验。同样，将样品送至国立理工学院生技系，进行使用 HeLa 细胞的细胞培养测定。相应的实验室结果作为附录“A”附加。

[0024] 对于以下批次，如下制备混合物：

说明书


批次	混合物	参考图
批次 DQ-297/20-01-2020	BFS 600 ml 聚胺80 ml 40%乙醇溶液100 ml 总溶液780 ml	

BFS: 胎牛血清。

[0025] ES: 指 40%乙醇溶液。

[0026] 实施例 2: 工作开始于改进产品的物理性能, 例如稠度和颜色。为此, 在伊达尔戈州自治大学 (UAEH) 考虑并实施冻干。然而, 由于其未获得与常规胎牛血清相同的特性, 因此在外观或物理化学性质方面, 结果不令人满意。


[0027] 实施例 3: 产生显着结果的另一批次描述如下:

批次	混合物	参考图
批次 DQ-326/14-11-2020	混合: BFS批次297 + 聚胺 + ES + Δ (控制) 效率: 100 mL = 6.85 g	

随后使用几种化合物除去水并获得所得固体, 同时测试各种多胺和聚酰胺直到获得所需结果。

进行一系列的试错实验以确定产生最佳结果的特定有机试剂。

[0028] 实施例 4: 对于随后的批次, 制备以下混合物:

批次	混合物	参考图
批次 DQ-401/23-08-2021	混合: BFS批次297 + 聚胺 + ES + Δ 效率: 100 mL = 9.03 g	

说明书

在与批次 DQ-297/14-12-2020 相同的条件下，但以更大的体积再次进行操作。再现了与先前获得的相同结果；然而，这次产物被纯化，通过加入乙醇，使用水浴除去过量的乙醇，随后在 30° C 干燥并紫外光照射 30 - 45 分钟以实现消毒。

[0029] 实施例 5：对于产品应用，根据用于制备必需培养基的稀释参考表确定所需量。通过无热原的水溶液中简单重建晶体，可再生具有与常规液体形式相同的性质的胎牛血清。

稀释表			
结晶BFS克数	毫升稀释剂	%最终使用溶液	液体BFS毫升当量
0.242 g	50 ml	10%	5.0 ml
0.485 g	100 ml	10%	10 ml
1.2125 g	250 ml	10%	25 ml
2.425 g	500 ml	10%	50 ml
4.85 g	1000 ml	10%	100 ml
命名			
mL	毫升		
g	克		
BFS	胎牛血清		
%	百分比		

上表是基于每升 48.50 克的结晶胎牛血清制备的，从其得到相应的稀释液。我们的方法的效率确保了获得的结晶胎牛血清批次含有一致的蛋白质浓度。

[0031] 一旦胎牛血清已经结晶，就必须在稀释溶液提供如上稀释表中所示的特定量，以便在相应的培养基中达到目标浓度，通常得到 10% 的溶液。同一表还提供了对应于最终重构产品的液体胎牛血清的等体积。

[0032] 为了获得结晶胎牛血清，选择了本发明的下列优选实施方案：

所述方法从探索各种聚酰胺开始，其中某些脂族类型在文献中被鉴定为易于聚合，特别是在 pH 变化下。因此，焦点转向聚胺的研究，因为文献表明这些化合物与蛋白质——尤其是低分子量和低熔点的那些——更相容。这导致制备了掺入脂族化合物的混合物，其中通过改变参数，例如稠度、外观、颜色、数量、处理特性、聚胺浓度、醇浓度、温度、脱水条件、和负或正化学—生物效应，进行了多个实验试验，最终优化结晶过程。

[0033] 当使用多胺开始工作时，选择化合物胍丁胺、精胺、和亚精胺作为可用的候选物。对每一种实施与先前聚胺测试中所用相同的实验变量，包括评估稠度、外观、颜色、数量、处理特性、聚胺浓度、乙醇浓度、温度、脱水条件、和化学和生物（负—正）效应，以及结晶行为。其中，本文提供的结果对应于证明最有利的结果的制剂，显示积极的化学和生物学特征。

说明书

[0034] 以清楚和充分详细的方式，以下部分描述了本发明的优选实施例的步骤——用于获得结晶胎牛血清的过程——以使其能够实际实施。

[0035] 1. 鉴定动物（母牛）的来源。

[0036] 2. 已经证实动物符合所有的健康和卫生要求，包括疾病、接种疫苗、和饲养史的完整记录。

[0037] 3. 选择符合以下标准的一种或多种母牛：

a) 胎龄至多 7 个月。

[0038] b) 无病。

[0039] c) 完全接种。

[0040] d) 营养健康，以基于牧草的饮食维持。

[0041] 4. 使用 CACHTERO CASH 装置使动物人道脱敏以确保屠宰不残忍。

[0042] 5. 屠宰通过垂直放血（颈部切口）进行。

[0043] 6. 进行胎引流过程以确保完全去除流体。

[0044] 7. 然后从母体腔垂直地取出胎牛。

[0045] 8. 在严格卫生的条件下将胎血垂直收集到聚丙烯袋中，以防止污染并保持完整性以用于后续处理。

[0046] 9. 检查收集的血液以确保没有任何外部污染物。进行视觉和人工检查以验证提取过程是在适当的卫生条件下进行的。另外，评估样品以确定是否已经开始凝固，以及评估关键血液特征，包括颜色和密度。

[0047] 10. 允许血液静置五小时以使其凝结，同时保持在冰上以防止微生物生长。

[0048] 11. 对血液进行机械去纤维化以分解任何存在的凝块。

[0049] 12. 然后用 Beckman Coulter Avanti JxN-26 离心机在 4° C 以 8,000 rpm 离心分离去纤维蛋白血液 30 分钟。

[0050] 13. 进行倾析。

[0051] 14. 由此获得胎牛血清。

[0052] 15. 将血清转移到容量为 10 至 20 升的椭圆形均化罐中，通过环状、水平、竖直、和振动运动机械均化。

[0053] 16. 得到均质血清。

[0054] 17. 然后将血清转移到不锈钢圆柱形容器中，所述容器具有内部梯度、测量氮气压力的

说明书

外部压力计、气密密封盖和将所述圆筒连接到 10 - 20 升接收容器的挠性导管。此系统在氮气压力下操作以根据所需剂量包装血清。

[0055] 18. 使用 Pall Acropack 双 0.1 微米过滤器对血清进行三重过滤以除去毒素和不需要的化合物。

[0056] 19. 所述产品在卫生条件下包装并完全无菌地分配。

[0057] 20. 一旦包装，就用紫外光照射血清 30 至 45 分钟以确保产品的灭菌。

[0058] 21. 然后将血清在 - 21° C 冷冻保存。

[0059] 22. 在 8° C 至 12° C 的环境温度下解冻纯的胎牛血清。

[0060] 23. 随后，加入 80 mL 的 30% 胍丁胺水溶液，获得 pH 6。混合物包括 600 mL 胎牛血清、80 mL 的 30% 胍丁胺溶液、和 100 mL 调节至 pH 6 的 40% 乙基水溶液。

[0061] 24. 将混合物在 - 5° C 下孵育 2 小时。

[0062] 25. 在 - 6° C 以 8,000 rpm 的速度离心化合物以实现固形物的分离。

[0063] 26. 如果离心后有固体残留，则从样品中弃去固体残留物。

[0064] 27. 将浓度为 40% 的乙醇的 12.80% 溶液加入到胎牛血清 - 胍丁胺化合物中，以保持胎牛血清的性质而不改变其化学组成。

[0065] 28. 将混合物在 8,000 rpm、最高温度 - 5° C 下离心，分离固体部分。

[0066] 29. 最后，将产品逐步暴露于最高 180° C 的温度下，持续时间需确保产品完全脱水并消除水分，同时保持其原始化学特性。

[0067] 30. 样品形成粉红色细晶体，获得大约 1 微米的玫瑰色细晶体。

[0068] 31. 一旦得到结晶化合物，就将其包装在由聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG) 或玻璃制成的无菌容器中。

[0069] 32. 用紫外光照射 30 - 45 分钟以确保产品的适当卫生处理。

[0070] 33. 对主要参数进行了研究，以验证产品的质量和无菌要求。

[0071] 34. 对于产品的使用，基于溶解表获得所需量以制备必要的介质；通过无热原的水溶液中简单地再生晶体，可获得具有与已知液体形式相同的性质的胎牛血清。

[0072] 晶体再生的量及其最佳用途如下：在 50 mL 无热原水溶液中，0.242 g 结晶胎牛血清；在 100 mL 中，0.485 g 结晶胎牛血清；在 250 mL 中，1.2125 g 结晶胎牛血清；在 500 mL 中，2.425 g 结晶胎牛血清；和在 1000 mL 中，4.85 g 结晶胎牛血清，根据所进行的测试批次。

说明书摘要

本发明涉及一种通过添加特定浓度的胍丁胺获得结晶胎牛血清的方法，起到增加细胞产量和增加每细胞蛋白质表达量的作用。所述方法还涉及为了使用所述液体而重构为液体的特定形式，而不损失其原始性质，允许在没有超低温链的情况下储存并降低污染的风险，从而允许精确地定量供给待使用的量。

专利代理委托书

声明填写的专利代理委托信息与专利代理委托书扫描文件是一致的。
根据专利法第 18 条的规定

委 托 北京市万慧达律师事务所 机构代码（11111）

1. 代为办理名称为 获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法 的发明创造
申请或专利（申请号或专利号为 ）以及在专利权有效期内的全部专利事务。

2. 代为办理名称为
专利号为 的专利权评价报告或实用新型专利检索报告。

3. 代为办理名称为
申请号或专利号为 的中止程序请求。

4. 其他
专利代理机构接受上述委托并指定专利代理师

【专利代理师】 胡洪慧

【专利代理师】

办理此项委托。

委托人（单位或个人） 劳尔·弗朗西斯科·莫埃达诺·拉拉

被委托人（专利代理机构） 北京市万慧达律师事务所

2025 年 11 月 06 日

专利代理委托书

【图片描述】

专利代理委托书（中英文）

POWER OF ATTORNEY

我/我们是墨西哥的公民/法人，根据中华人民共和国专利法，兹委托北京市万慧达律师事务所（北京市海淀区中关村南大街1号友谊宾馆颐园写字楼 邮编：100873）

（代码11111），并由该机构指定其代理人胡洪慧代为办理发明创造名称为获得含胍丁胺的结晶胎牛血清的方法

国家申请号为_____的发明创造，在中华人民共和国申请专利以及在专利权有效期内的全部专利事宜。

国际申请号为 PCT/IB2024/053443 的专利申请，在指定局或选定局程序中的全部专利事宜。

Pursuant to the relevant provisions of the Patent Law of the People's Republic of China, I/we, citizen/legal entity of Mexico hereby authorize BEIJING WAN HUI DA LAW FIRM (Yiyuan Office Building, Friendship Hotel, No. 1, Zhongguancun Street South, Haidian District, Beijing 100873, P.R. China) (Code: 11111) to appoint its patent attorney(s) HU Honghui to act for me/us with the invention entitled METHOD FOR OBTAINING A CRYSTALLIZED FETAL BOVINE SERUM WITH AGMATINE and

whose national application number is _____ and handle all related matters concerning about the patent right.

whose international application number is PCT/IB2024/053443 and handle all related matters concerning about the patent right in the progress of designated office or selected office.

委托人姓名或名称

劳尔·弗朗西斯科·莫埃达诺·拉拉

Authorized by (Name)

Raúl Francisco MOEDANO LARA

委托人盖章或签字

Seal or Signature

（委托单位无印章的由法人代表签字）

委托日期

2025-11-06

Date of Authorization

被委托专利代理机构印章

Seal of the Authorized Agent

