

(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 1 日 (01.11.2018)



WIPO | PCT



(10) 国际公布号

WO 2018/196819 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/64 (2017.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) *A61K 31/496* (2006.01)

(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, 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。

(21) 国际申请号:

PCT/CN2018/084654

(22) 国际申请日: 2018 年 4 月 26 日 (26.04.2018)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201710290102.5 2017年4月28日 (28.04.2017) CN

(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)。

(71) 申请人: 中国 人 民 解 放 军 军 事 科 学 院 军 事 医 学 研 究 院 (ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。

(72) 发明人: 李志平 (LI, Zhiping); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 杨臻博 (YANG, Zhenbo); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 杨阳 (YANG, Yang); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 喻芳邻 (YU, Fanglin); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 龚伟 (GONG, Wei); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 杨美燕 (YANG, Meiyang); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 王玉丽 (WANG, Yuli); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 高春生 (GAO, Chunsheng); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。 梅兴国 (MEI, Xingguo); 中国 北京市 海 淀 区 太 平 路 27 号, Beijing 100850 (CN)。

(74) 代理人: 中国 国 际 贸 易 促 进 委 员 会 专 利 商 标 事 务 所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国 北京市 西 城 区 阜 成 门 外 大 街 2 号 万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。

本国国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

(54) Title: PROTEIN PARTICLE WRAPPED WITH MEDICINE INSOLUBLE IN WATER AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒及其制备方法

(57) Abstract: A protein particle wrapped with a medicine insoluble in water and a preparation method therefor. The preparation method comprises the following steps: i) dissolving a medicine insoluble in water and a liquid solubilizer in a good solvent of the medicine insoluble in water; ii) removing part or all of the good solvent of the medicine insoluble in water from products obtained in step i); iii) mixing products obtained in step ii) with proteins; and iv) dispersing products obtained in step iii) in a poor solvent of the medicine insoluble in water. The preparation method is simple and is suitable for industrial production.

(57) 摘要: 一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒及其制备方法, 包括以下步骤: i) 将难溶于水药物与液态增溶剂溶解于难溶于水药物的良溶剂; ii) 从步骤i)的产物中去除部分或全部所述难溶于水药物的良溶剂; iii) 将步骤ii)的产物与蛋白质混合; iv) 将步骤iii)的产物在难溶于水药物的不良溶剂中分散。该方法制备简单、适合工业化生产。

一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒及其制备方法

技术领域

本公开属于制药领域，具体涉及一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒及其制备方法。

背景技术

药物的纳米递送系统是指利用材料包裹药物形成纳米粒子。研究发现药物经纳米递送系统包裹可以改变药物在体内的释放、分布和代谢行为，经过表面修饰改造甚至可以实现药物的靶组织及靶细胞的特异性摄取、特异性结合以及蓄积，增加药物的治疗效果，同时减少因全身性用药而带来的毒副作用，提高病人的顺应性。因此，纳米递送载体为药物更好的发挥疗效提供了新的途径。

白蛋白纳米粒是目前最受关注的纳米递送系统之一，由于白蛋白为内源性物质，具有无毒、无免疫源性、生物可降解和生物相容性高的特点，同时，很多药物都能与体内血浆蛋白结合，因此白蛋白为天然的理想药物载体。

发明内容

本公开的一个目的是提供一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒及其制备方法。

本公开第一方面提供一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的制备方法，包括以下步骤：

- i) 将难溶于水药物与液态增溶剂溶解于良溶剂；
- ii) 从步骤 i) 的产物中去除部分或全部所述良溶剂；
- iii) 将步骤 ii) 的产物与蛋白质混合；
- iv) 将步骤 iii) 的产物在不良溶剂中分散。

在一些实施方案中，本公开任一项的方法包括以下步骤：

- i) 将难溶于水药物与液态增溶剂溶解于难溶于水药物的良溶剂；
- ii) 从步骤 i) 的产物中去除部分或全部所述难溶于水药物的良溶剂；
- iii) 将步骤 ii) 的产物与蛋白质混合；
- iv) 将步骤 iii) 的产物在难溶于水药物的不良溶剂中分散，获得包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒。

在一些实施方案中，本公开任一项的方法在 45°C 以下的温度进行，优选在 40°C 以下的温度进行，优选在 35°C 以下的温度进行，再优选在 30°C 以下的温度进行。

在一些实施方案中，步骤 i) 的产物为液体（例如澄清溶液）。

在一些实施方案中，步骤 ii) 的产物为液体（例如澄清溶液）。

5 在一些实施方案中，难溶于水药物在步骤 ii) 的产物中以溶液状态存在。

在一些实施方案中，所述液态增溶剂包括：丙醇（例如异丙醇）、液态聚乙二醇（例如聚乙二醇 200、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600 或聚乙二醇 800 中的一种或多种）、吐温（例如吐温 20 或吐温 80）、司盘和甘油中的一种或多种。

10 在一些实施方案中，所述液态增溶剂包括：液态聚乙二醇（例如聚乙二醇 200、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600 或聚乙二醇 800 中的一种或多种）或吐温（例如吐温 20 或吐温 80）。

在一些实施方案中，所述难溶于水药物的良溶剂包括乙醇、甲醇、乙醚、二氯甲烷和氯仿中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述难溶于水药物的良溶剂包括乙醇。

15 在一些实施方案中，所述难溶于水药物的不良溶剂包括水。

在一些实施方案中，所述难溶于水药物的不良溶剂包括生理可接受的水溶液。

在一些实施方案中，所述难溶于水药物的不良溶剂包括缓冲溶液。

在一些实施方案中，所述难溶于水药物的不良溶剂包括盐和/或糖的水溶液。

20 在一些实施方案中，步骤 ii) 包括：采用选自旋转蒸发、加热、抽真空中的一项或多项从步骤 i) 的产物中去除全部或部分难溶于水药物的良溶剂。

在一些实施方案中，难溶于水药物的良溶剂在步骤 ii) 的产物中含量为 1wt% 以下。

在一些实施方案中，步骤 iii) 中，所述蛋白质是粉末状。

在一些实施方案中，所述蛋白质为白蛋白。

25 在一些实施方案中，所述白蛋白包括选自重组白蛋白、天然白蛋白和修饰白蛋白中的一种或多种。

在一些实施方案中，步骤 iv) 包括：采用选自搅拌、剪切、超声、均质、研磨中的一项或多项操作，将步骤 iii) 的产物在不良溶剂中分散。

30 在一些实施方案中，本公开任一项的方法，还包括以下步骤：从步骤 iv) 的产物中去除液态增溶剂。

在一些实施方案中，采用选自透析、凝胶过滤、微柱洗脱中的一项或多项，从步骤 iv) 的产物中去除液态增溶剂。

在一些实施方案中，本公开任一项的方法，还包括以下步骤：从步骤 iv) 的产物中分离白蛋白颗粒。

5 在一些实施方案中，采用离心、过滤和干燥（例如冷冻干燥）中的一项或多项，从步骤 iv) 的产物中分离白蛋白颗粒。

在一些实施方案中，所述难溶于水药物包括紫杉醇、多烯紫杉醇、喜树碱、羟基喜树碱、雷帕霉素、多柔比星、伊曲康唑、尼莫地平中的一种或多种。

10 在一些实施方案中，蛋白质颗粒（蛋白纳米颗粒）的平均粒径为 100~1000nm，例如 200~2000nm，再例如 150~250nm。

在一些实施方案中，蛋白质颗粒（蛋白纳米颗粒）的平均粒径为 50~100nm，100~150nm，150~200nm，200~250nm，250~30nm，300~350nm，350~400nm，400~450nm，450~500nm，500~600nm，600~700nm，700~800nm，800~900nm，900~1000nm。

15 本公开第二方面提供一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒，其由本公开任一项的方法制得。

在一些实施方案中，1g (ml) 难溶于水药物能够在少于 30 ml 难溶于水药物的良溶剂中溶解。

在一些实施方案中，1g (ml) 难溶于水药物在少于 30 ml 难溶于水药物的不良溶剂中不能完全溶解。

20 在一些实施方案中，液态增溶剂是指能够增加难溶于水药物的溶解度的液体物质。

在一些实施方案中，液态增溶剂是水溶性的。

在一些实施方案中，难溶于水药物的良溶剂是指能够有效溶解难溶于水药物的溶剂。

在一些实施方案中，难溶于水药物的不良溶剂是指水性介质。

25 在一些实施方案中，所述难溶于水药物具有羟基、其他活性基团或疏水基团，使白蛋白与药物具有共价或非共价相互作用，并附着与药物颗粒表面。

在一些实施方案中，所述难溶于水药物具有羟基、其他活性基团或疏水基团，使白蛋白与药物具有共价或非共价相互作用。

在一些实施方案中，所述白蛋白为人源性白蛋白。

30 在一些实施方案中，所述白蛋白为经改造或修饰后不会引起机体免疫的其他来源的白蛋白。

在一些实施方案中，难溶于水药物的不良溶剂为有助于提高给药系统机体耐受性、稳定性等的溶液系统。

在一些实施方案中，难溶于水药物的不良溶剂可以包括水、缓冲液、盐溶液、糖溶液以及生理可接受的溶液，

5 在一些实施方案中，缓冲溶液可以为磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液、醋酸盐缓冲液等。

在一些实施方案中，盐溶液可以为氯化钠溶液。

在一些实施方案中，糖溶液可以为葡萄糖溶液、乳糖溶液、甘露醇溶液等。

在一些实施方案中，生理上可接受的溶液是指口服、注射、吸入以及外用给药时机体可耐受的溶液。

10 在一些实施方案中，难溶于水药物的不良溶剂可以包含渗透压调节剂、pH 调节剂、冻干保护剂、助悬剂、稳定剂等。

在一些实施方案中，步骤 i)、ii) 或 iii) 的产物中不包括难溶于水药物的不良溶剂，例如不包括水。

15 在一些实施方案中，本公开任一项的方法，包括修饰包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的步骤。

在一些实施方案中，包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒可以经高分子聚乙二醇（例如聚乙二醇 2000 或聚乙二醇 4000）、靶向修饰高分子聚乙二醇等材料修饰，以获得长循环或者长循环靶向递送功能。

20 在一些实施方案中，包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的尺寸为 100~1000nm，例如 150~250nm，再例如 170~210nm，再例如 140~160nm，再例如 186nm、173nm、192nm、204nm 或 193nm。

25 在一些实施方案中，本公开任一项的制备方法是首先将难溶性药物与液态增溶剂在良溶剂（例如乙醇）存在条件下溶解，然后除去良溶剂，形成难溶性药物与液态增溶剂的液态复合物，该复合物中难溶性药物是以溶液状态存在的；然后该液态复合物与蛋白粉末混合后，加入不良溶剂中分散，难溶性药物析出并被蛋白包裹，形成纳米粒。该方法制备过程中可以不使用高温，有利于增加药物的稳定性。

在一些实施方案中，步骤 i) 中，难溶于水药物与步骤 iii) 中的蛋白质的质量比为 1:0.1~15，例如 1:0.1~0.5，例如 1:0.5~1，例如 1:1~2，例如 1:2~3，例如 1:3~4，例如 1:4~5，例如 1:5~6，例如 1:6~8，例如 1:8~10，例如 1: 10~15。

30 在一些实施方案中，步骤 i) 中，难溶于水药物与液态增溶剂的质量/体积比为

0.1g:0.01~10ml，例如 0.1g:0.01~0.1ml，例如 0.1g:0.1~0.4ml，例如 0.1g:0.4~1ml，例如 0.1g:1~2ml，例如 0.1g:2~3ml，例如 0.1g:3~5ml，例如 0.1g:5~10ml。

在一些实施方案中，步骤 iii) 中，难溶于水药物与不良溶剂的质量体积比为 0.1g:1~100ml，例如 0.1g:1~2ml，0.1g:2~4ml，0.1g:4~6ml，0.1g:6~8ml，0.1g:8~10ml，
5 0.1g:10~15ml、0.1g:15~20ml、0.1g:20~50ml 或 0.1g:50~100ml。

在一些实施方案中，难溶于水药物的不良溶剂是缓冲溶液。

在一些实施方案中，缓冲溶液是柠檬酸缓冲溶液或 PBS 缓冲溶液。

在一些实施方案中，难溶于水药物的不良溶剂的 PH 值为 5~8，例如 PH 值为 5~6，
6~7 或 7~8，例如 PH 值为 7.4。

10 在一些实施方案中，本公开任一项的制备方法是首先将难溶性药物与液态增溶剂在良溶剂（例如乙醇）存在条件下溶解，然后除去良溶剂，形成难溶性药物与液态增溶剂的液态复合物，该复合物中难溶性药物是以溶液状态存在的；然后该液态复合物与蛋白粉末混合后，将混合的产物加入到不良溶剂中分散，在不良溶剂中，难溶性药物析出并被蛋白包裹，形成纳米粒。该方法制备过程中可以不使用高温，有利于增加药物的稳定性。

15 在一些实施方案中，不良溶剂是指难溶于水药物的不良溶剂。

在一些实施方案中，良溶剂是指难溶于水药物的良溶剂。

在一些实施方案中，1g 难溶于水药物在 X ml 难溶于水药物的不良溶剂中不能完全溶解，X≥30，例如 X≥100，例如 X≥200，例如 X≥400，例如 X≥600，例如 X≥800，例如 X≥1000，
例如 X≥2000，例如 X≥3000，例如 X≥5000，例如 X≥10000。

20 在一些实施方案中，1g 难溶于水药物在 Y ml 难溶于水药物的良溶剂中能够完全溶解，Y≤100，例如 Y≤80，例如 Y≤60，例如 Y≤40，例如 Y≤30，例如 Y≤15。

在一些实施方案中，难溶于水药物的良溶剂为介电常数小于或等于 80 的溶剂，例如介电常数小于 60 的溶剂，例如介电常数小于 40 的溶剂，例如介电常数小于 20 的溶剂，
例如介电常数小于 10 的溶剂。

25 在一些实施方案中，难溶于水药物的不良溶剂为介电常数大于 80 的溶剂，例如介电常数≥90 的溶剂，例如介电常数≥100 的溶剂。

在一些实施方案中，PBS 溶液是指磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline）。可选，PBS 溶液的 PH 为 7.4。

在一些实施方案中，混悬液是指难溶于水药物以微粒状态分散于液体介质中形成的非
30 均相的液体。

在一些实施方案中，难溶于水药物是指难溶于水固体药物。

在一些实施方案中，本公开方法不使用交联剂，例如不使用戊二醛等交联剂。

在一些实施方案中，蛋白质颗粒的平均粒径通过激光粒径（例如通过激光衍射法）测定仪获得。

5 在一些实施方案中，液态聚乙二醇的分子量为 200~800。

在一些实施方案中，包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的包封率为 90%以上，例如 92%以上。

在一些实施方案中，包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的载药量为 5~95%，例如 10~45%，例如 15~35%。

10 在一些实施方案中，包裹是指难溶于水药物的部分或全部地被蛋白质包裹。例如，在一个包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒中，可以存在一些难溶于水药物全部地被蛋白质包裹，可以存在一些难溶于水药物部分地被蛋白质包裹。可选地，包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的表面全部地被蛋白质覆盖。可选地，包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的表面部分地被蛋白质覆盖，此时，该颗粒表面存在裸露的难溶于水药物。

15 本公开还提供一种药物组合物，其包括本公开任一项的包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒和药学上可接受的辅料。

本公开的有益效果

一个或多个实施例具有以下一项或多项有益效果：

- 20 i) 制备工艺相对简单；
ii) 关键工艺易于控制；
iii) 无需固化白蛋白即可获得稳定的蛋白质颗粒；
iv) 包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的制备方法的载药量和/或包封率较高；
v) 包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒粒径易于控制；
25 vi) 溶解活性物质的方法是将活性物质与增溶剂共溶于有机溶剂中后，再去除有机溶剂，形成活性物质与增溶剂的复合物，该复合物可显著提高活性物质的溶解度，甚至明显优于有机溶剂的增溶效果；
vii) 在制备包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒过程中，通过搅拌、剪切、超声、均质、研磨等处理一步获得蛋白颗粒，无需产生水包油或油包水的乳剂，去除有机溶
30 剂简单完全。

viii) 制备过程中不会使用高温，有利于增加药物的稳定性。

附图说明

此处所说明的附图用来提供对本公开的进一步理解，构成本申请的一部分，本公

5 开的示意性实施例及其说明用于解释本公开，并不构成对本公开的限定。在附图中：

图 1 为 PBS 稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变化曲线；

图 2 为 PBS 稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线；

图 3 为 PBS 稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变化曲线；

图 4 为 PBS 稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线；

10 图 5 为完全培养基稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变化曲线；

图 6 为完全培养基稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线；

图 7 为完全培养基稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变化曲线；

图 8 为完全培养基稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线。

15 具体实施方式

下面通过附图和实施例，对本公开的技术方案做进一步的详细描述。

以下实施例中使用的仪器如下表所示：

设备名称	厂家牌号
旋转蒸发器	RE-2000, 上海亚荣生化仪器厂
循环水式真空泵	SHD-D(III), 巩义市英峪予华仪器厂
高效液相色谱仪	degasser G1379B; Bin Pump SL G1312B, Hip-ALSSL G1367C, TCCSL G1316B, UV G1314C, 美国安捷伦公司；色谱柱（Agilent Eclipse plus-C ₈ 4.6×250mm 5μm, 美国安捷伦公司）
超声波细胞粉碎机	SCIENTZ(IID), ningbo Scientz Biotechnology Co.,LTD
高压均质机	AVESTIN, Cnanda, EmulsiFlex-C3
稳定性仪	Formulation TURBISCAN TOWER
粒径测定仪	FLUOSTAR, 德国 Symptec
离心设备	Micromax, 美国
人血清白蛋白	批号：VNA1Q087, Baxter AG (美国百特公司)

实施例 1

称取紫杉醇约 50mg, 加入 PEG600 400 μ L, 加入无水乙醇 10mL, 超声至澄清 (水温 30~45℃), 减压旋蒸除去乙醇, 形成紫杉醇-聚乙二醇复合物 (乙醇残留量为 0.5wt% 以下);

称取人血清白蛋白粉末 100mg, 加至紫杉醇-聚乙二醇复合物中, 混匀, 得混合物;

将上述混合物加入到 2 mL pH7.4 的 PBS 溶液中, 于超声破碎仪中以 45% 功率的条件超声 200s (超声 2s-暂停 2s, 循环), 得混悬液。

取上述混悬液, 置于透析袋中, 以 pH7.4 的 PBS 为透析液, 反复透析, 除去 PEG600 及游离白蛋白。取上述混悬液, 3000rpm 条件下离心 10min, 去除未包封的药物沉淀, 然后冷冻干燥, 获得包裹有紫杉醇的蛋白质颗粒。

实施例 2

称取 10-羟基喜树碱约 100mg, 加入 PEG400 1 mL, 加入无水乙醇适量, 超声分散, 至澄清, 减压旋蒸除去乙醇, 形成 10-羟基喜树碱-聚乙二醇复合物 (乙醇残留量为 0.5wt% 以下);

称取人血清白蛋白粉末 300mg, 加至复合物中, 混匀, 得混合物;

将上述混合物加入到 10mL pH5.0 的柠檬酸缓冲溶液中, 用高压均质机均质过膜, 得混悬液。

取上述混悬液, 置于透析袋中, 反复透析, 除去 PEG400 及游离白蛋白。

取上述混悬液, 3000rpm 条件下离心 10min, 去除未包封的药物沉淀, 然后冷冻干燥, 获得包裹有 10-羟基喜树碱的蛋白质颗粒。

实施例 3

称取多烯紫杉醇约 100mg, 加入 PEG400 500 μ L, 加入无水甲醇适量, 超声分散, 至澄清, 减压旋蒸除去甲醇, 形成多烯紫杉醇-聚乙二醇复合物 (乙醇残留量为 0.5wt% 以下);

称取人血清白蛋白粉末 300mg, 加至复合物中, 混匀, 得混合物;

将上述混合物加入到 10mL pH5.0 的柠檬酸缓冲溶液中, 用高压均质机均质过膜, 得混悬液。

取上述混悬液, 置于透析袋中, 反复透析, 除去 PEG400 及游离白蛋白。取上述混

悬液，3000rpm 条件下离心 10min，去除未包封的药物沉淀，然后冷冻干燥，获得包裹有多烯紫杉醇的蛋白质颗粒。

实施例 3b

5 称取多烯紫杉醇约 100mg，加入 PEG400 500μL，加入无水甲醇适量，超声分散，至澄清，减压旋蒸除去甲醇，形成多烯紫杉醇-聚乙二醇复合物(乙醇残留量为 0.5wt%以下)；称取人血清白蛋白粉末 300mg，加至复合物中，混匀，得混合物；将上述混合物加入到 10mL pH7.4 的 PBS 溶液中，用高压均质机均质过膜，得混悬液。

10 取上述混悬液，置于透析袋中，反复透析，除去 PEG400 及游离白蛋白。取上述混悬液，3000rpm 条件下离心 10min，去除未包封的药物沉淀，然后冷冻干燥，获得包裹有多烯紫杉醇的蛋白质颗粒。

实施例 4

15 称取雷帕霉素约 100mg，加入 PEG400 1mL，加入无水乙醇适量，超声分散，至澄清，减压旋蒸除去乙醇，形成雷帕霉素-聚乙二醇复合物（乙醇残留量为 0.5wt%以下）；称取人血清白蛋白粉末 300mg，加至复合物中，混匀，得混合物；将上述混合物加入到 10mL pH5.0 的柠檬酸缓冲溶液中，用高压均质机均质过膜，得混悬液。取上述混悬液，置于透析袋中，反复透析，除去 PEG400 及游离白蛋白。
20 取上述混悬液，3000rpm 条件下离心 10min，去除未包封的药物沉淀，然后冷冻干燥，获得包裹有雷帕霉素的蛋白质颗粒。

实施例 5

25 称取伊曲康唑约 100mg，加入 PEG400 1mL，加入无水乙醇适量，超声分散，至澄清，减压旋蒸除去乙醇，形成伊曲康唑-聚乙二醇复合物（乙醇残留量为 0.5wt%以下）；称取人血清白蛋白粉末 300mg，加至复合物中，混匀，得混合物；将上述混合物加入到 10mL pH5.0 的柠檬酸缓冲溶液中，用高压均质机均质过膜，得混悬液。
30 取上述混悬液，置于透析袋中，反复透析，除去 PEG400 及游离白蛋白。取上述混悬液，3000rpm 条件下离心 10min，去除未包封的药物沉淀，然后冷冻干燥，获得包裹有

伊曲康唑的蛋白质颗粒。

实施例 5b

称取伊曲康唑约 100mg，加入 PEG400 1mL，加入无水乙醇适量，超声分散，至澄清，减压旋蒸除去乙醇，形成伊曲康唑-聚乙二醇复合物（乙醇残留量为 0.5wt%以下）；称取人血清白蛋白粉末 300mg，加至复合物中，混匀，得混合物；将上述混合物加入到 10mL pH7.4 的 PBS 溶液中，用高压均质机均质过膜，得混悬液。

取上述混悬液，置于透析袋中，反复透析，除去 PEG400 及游离白蛋白。取上述混悬液，3000rpm 条件下离心 10min，去除未包封的药物沉淀，然后冷冻干燥，获得包裹有伊曲康唑的蛋白质颗粒。

实施例 6

称取羟基喜树碱约 100mg，加入吐温 80 1mL，加入无水乙醇适量，超声分散，至澄清，减压旋蒸除去乙醇，形成羟基喜树碱-吐温 80 复合物（乙醇残留量为 0.5wt%以下）；称取人血清白蛋白粉末 300mg，加至复合物中，混匀，得混合物；将上述混合物加入到 10mL pH5.0 的柠檬酸缓冲溶液中，用高压均质机均质过膜，得混悬液。

取上述混悬液，置于透析袋中，反复透析，除去吐温 80 及游离白蛋白。取上述混悬液，3000rpm 条件下离心 10min，去除未包封的药物沉淀，然后冷冻干燥，获得包裹有羟基喜树碱的蛋白质颗粒。

实施例 1~6 的制备方法产率接近 100%。

分析检测 1 包封率和载药量的测定

(1) 取白蛋白颗粒约 10 mg，加入乙醇适量，使其完全溶解，然后用流动相定容，HPLC 法测定药物浓度，并计算颗粒中的总药物量 A。
(2) 另取白蛋白颗粒约 10 mg，加水适量，混匀，3000rpm 离心 10min。离心后，若有沉淀，收集沉淀，用乙醇适量溶解，流动相定容，HPLC 法测定药物浓度，并计算沉淀中的药物量 B；
30 还取离心后的上层悬液，置于 16,000rpm 超高速条件下离心 20min，收集上清液，

流动相定容，HPLC 法测定上层悬液中的药物浓度，并计算上层悬液中的药物量 C。

低速离心后沉淀中的药物以及超高速离心后上清液中的药物即为未包封药物，计算包封率及载药量。

$$\text{包封率} = (A - B - C) / A \times 100\%$$

5
载药量 = EE × W_药 / (W_药 + W_{白蛋白})

其中，EE 为包封率，W_药 为颗粒制备过程中投入的总药物量，W_{白蛋白} 为颗粒制备过程中投入的总白蛋白量。

表 1 白蛋白颗粒中药物的载药量及包封率

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 3b	实施例 5b
包封率 (%)	99.2%	98.6%	94.5%	96.8%	94.4%	92.3%	98.7	99.2%
载药量 (%)	33.1%	24.6%	23.6%	24.2%	23.6%	21.4%	24.7%	24.8%

10 分析检测 2 白蛋白颗粒粒径的测定

取实施例 1~6 的白蛋白颗粒，加水混悬，置于激光颗粒径测定仪中检测其粒径大小，具体结果如下：

表 2 白蛋白颗粒的粒径

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 3b	实施例 5b
粒径 (nm)	186	173	192	204	193	153	195	202

由表 2 可知，采用实施例 1~6 的方法可以获得包裹有难溶于水药物的蛋白质纳米

15 颗粒，例如粒径为 153nm 至粒径为 204nm 的包裹有难溶于水药物的蛋白质纳米颗粒。

分析检测 3 紫杉醇白蛋白颗粒的稳定性测定

取实施例 1 中的紫杉醇白蛋白颗粒，分别用磷酸盐缓冲液 (PBS) 及含胎牛血清的 MEM 培养基稀释 50 倍及 100 倍，于稳定性仪上测定原液以及各稀释液的稳定性。

结果如图 1~8。图 1 为 PBS 稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变化曲线；图 2

20 为 PBS 稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线；图 3 为 PBS 稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变化曲线；图 4 为 PBS 稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线；图 5 为完全培养基稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变

化曲线；图 6 为完全培养基稀释 50 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线；图 7 为完全培养基稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的透射光变化曲线；图 8 为完全培养基稀释 100 倍后紫杉醇蛋白质颗粒的背散射光变化曲线。由结果可知，该紫杉醇白蛋白颗粒经不同介质稀释后在 37℃ 条件下透射光和散射光的变化值均不超过 3%，说明其 5 稳定性良好。

最后应当说明的是：以上实施例仅用以说明本公开的技术方案而非对其限制；尽管参照较佳实施例对本公开进行了详细的说明，所属领域的普通技术人员应当理解：依然可以对本公开的具体实施方式进行修改或者对部分技术特征进行等同替换；而不脱离本公开技术方案的精神，其均应涵盖在本公开请求保护的技术方案范围当中。

权 利 要 求

1. 一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的制备方法，包括以下步骤：
 - i) 将难溶于水药物与液态增溶剂溶解于良溶剂；
 - ii) 从步骤 i) 的产物中去除部分或全部所述良溶剂；
 - iii) 将步骤 ii) 的产物与蛋白质混合；
 - iv) 将步骤 iii) 的产物在不良溶剂中分散。
2. 权利要求 1 的制备方法，所述液态增溶剂包括：丙醇（例如异丙醇）、液态聚乙二醇（例如聚乙二醇 200、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600 或聚乙二醇 800 中的一种或多种）、吐温（例如吐温 20 或吐温 80）、司盘和甘油中的一种或多种。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，所述良溶剂包括乙醇、甲醇、乙醚、二氯甲烷和氯仿中的一种或多种。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，所述不良溶剂包括水；
优选地，所述不良溶剂包括生理可接受的水溶液；
优选地，所述不良溶剂包括缓冲溶液；
优选地，所述不良溶剂包括盐和/或糖的水溶液。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，步骤 ii) 包括：采用选自旋转蒸发、加热、抽真空中的一项或多项从步骤 i) 的产物中去除全部或部分良溶剂。
6. 根据权利要求 1 所述的方法，步骤 iii) 中，所述蛋白质是粉末状。
7. 根据权利要求 1 所述的方法，所述蛋白质为白蛋白；
优选地，所述白蛋白包括选自重组白蛋白、天然白蛋白和修饰白蛋白中的一种或多种。
8. 根据权利要求 1 所述的方法，步骤 iv) 包括：采用选自搅拌、剪切、超声、均质、研磨中的一项或多项操作，将步骤 iii) 的产物在不良溶剂中分散。
9. 根据权利要求 1 所述的方法，还包括以下步骤：从步骤 iv) 的产物中去除液态增溶剂；
优选地，采用选自透析、凝胶过滤、微柱洗脱中的一项或多项，从步骤 iv) 的产物中去除液态增溶剂。
10. 根据权利要求 1 所述的方法，还包括以下步骤：从步骤 iv) 的产物中分离白蛋白颗粒；

优选地，采用离心、过滤和干燥（例如冷冻干燥）中的一项或多项，从步骤 iv) 的产物中分离白蛋白颗粒。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，所述难溶于水药物包括紫杉醇、多烯紫杉醇、喜树碱、羟基喜树碱、雷帕霉素、多柔比星、伊曲康唑、尼莫地平中的一种或多种。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，所述液态增溶剂为选自以下一种或多种：液态聚乙二醇、吐温。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，所述不良溶剂是 PBS 缓冲溶液或柠檬酸缓冲溶液。

14. 根据权利要求 1 所述的方法，所述不良溶剂的 PH 值为 5~8。

15. 根据权利要求 1 所述的方法，所述包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒的平均粒径为 100~1000nm。

16. 根据权利要求 1 所述的方法，步骤 i) 中，难溶于水药物与步骤 iii) 中的蛋白质的质量比为 1:0.1~15。

17. 根据权利要求 1 所述的方法，步骤 i) 中，难溶于水药物与液态增溶剂的质量/体积比为 0.1g:0.01~10ml。

18. 根据权利要求 1 所述的方法，步骤 iii) 中，难溶于水药物与不良溶剂的质量/体积比为 0.1g:1~100 ml。

19. 根据权利要求 1 所述的方法，包括以下步骤：

i) 将难溶于水药物与液态增溶剂溶解于良溶剂；

ii) 从步骤 i) 的产物中去除部分或全部所述良溶剂；

iii) 将步骤 ii) 的产物与蛋白质混合；

iv) 将步骤 iii) 的产物在不良溶剂中分散，获得包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒。

20. 一种包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒，由权利要求 1~19 任一项的方法制备获得。

21. 根据权利要求 20 所述的包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒，其包封率为 90%以上，例如 92%以上。

22. 根据权利要求 20 所述的包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒，其载药量为 5~95%，例如 10~45%。

23. 一种药物组合物，包括权利要求 20~22 任一项的包裹有难溶于水药物的蛋白质颗粒和药学上可接受的辅料。

透射光參比譜圖·50倍蛋白納米粒PBS

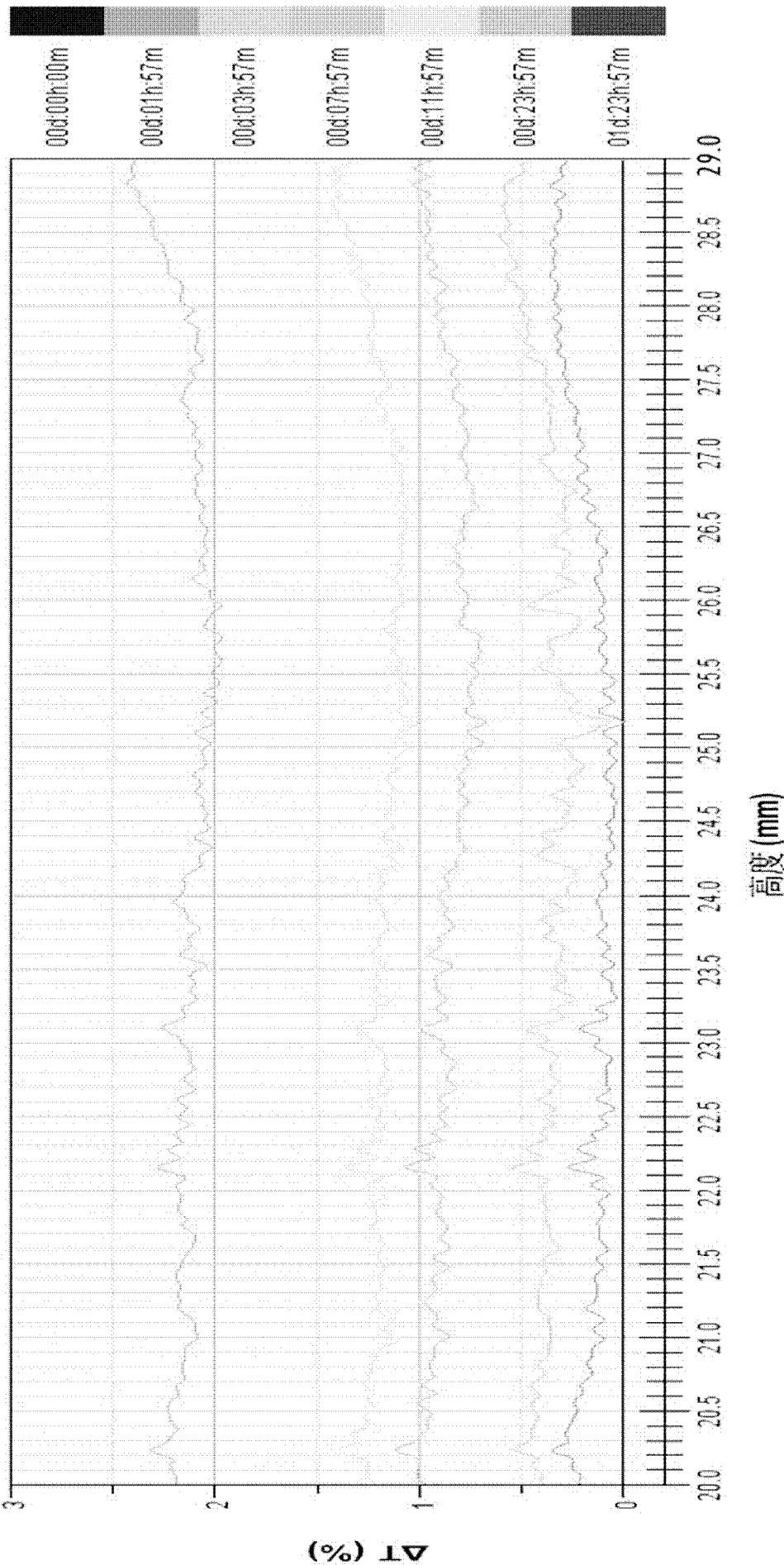


图 1

背散射光参考图·50倍蛋白纳米粒PBS

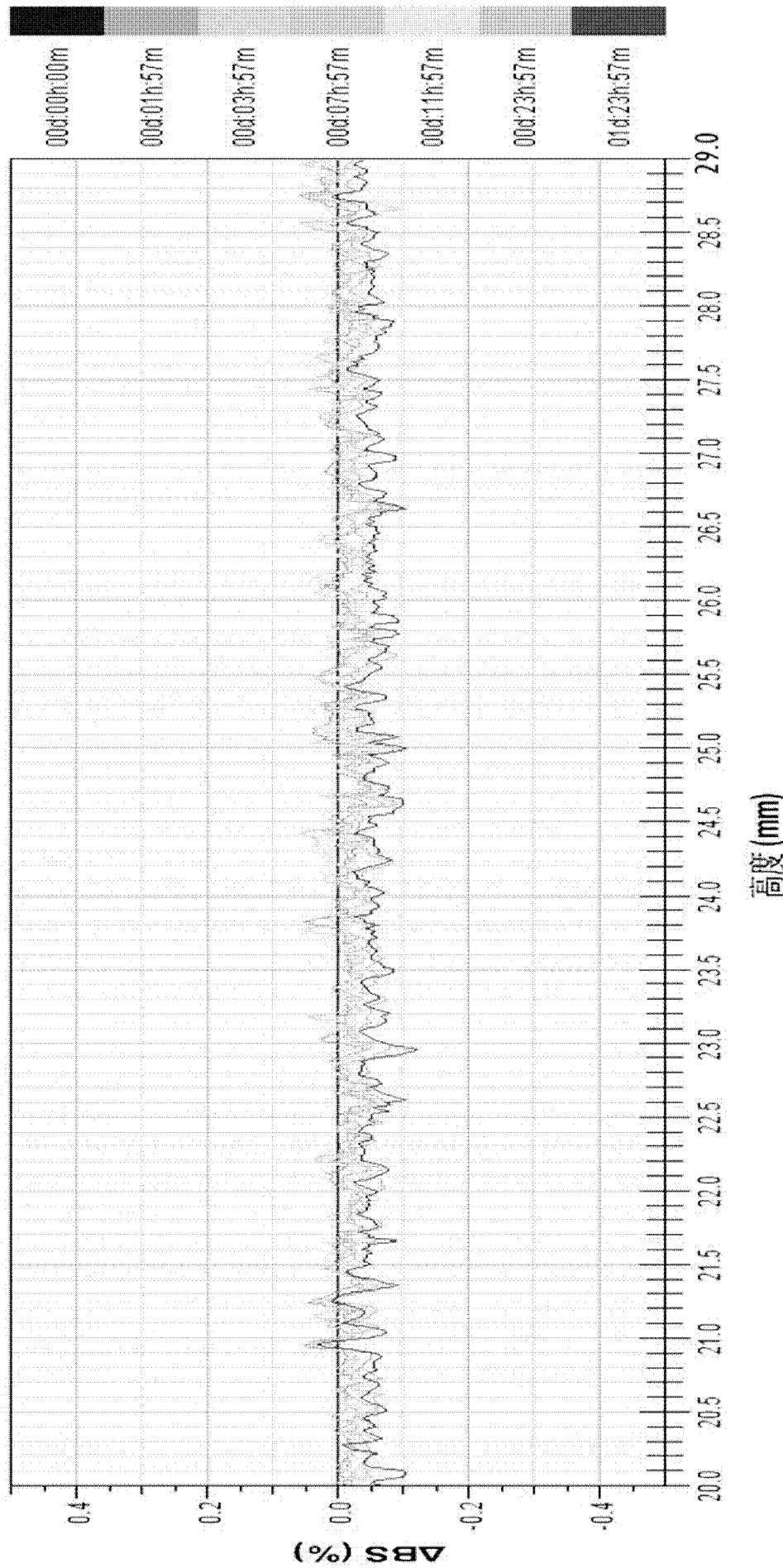


图 2

透射光參比譜圖·100倍蛋白納米粒PBS

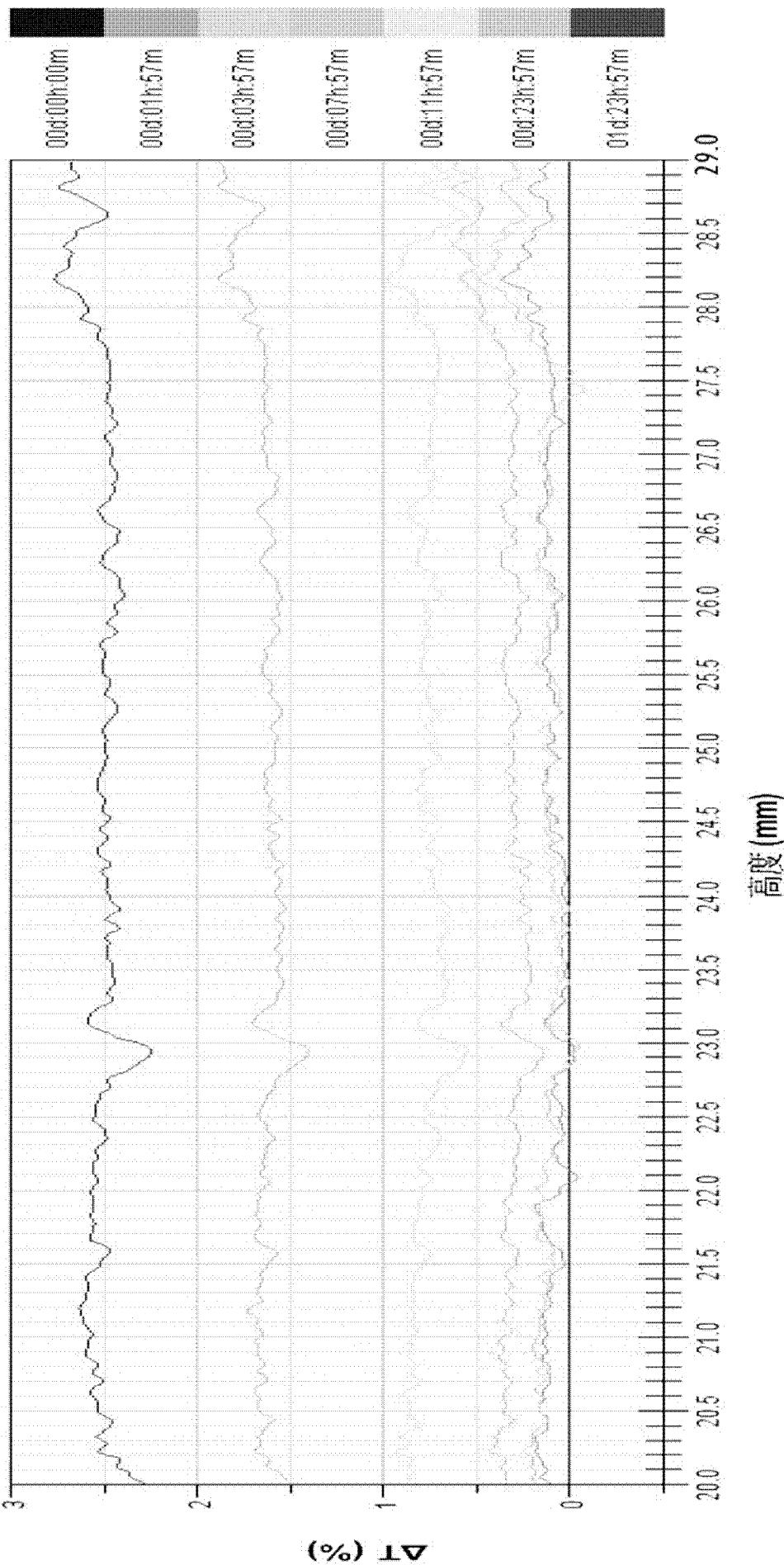


图 3

背散射光参考图·100倍蛋白纳米粒PBS S

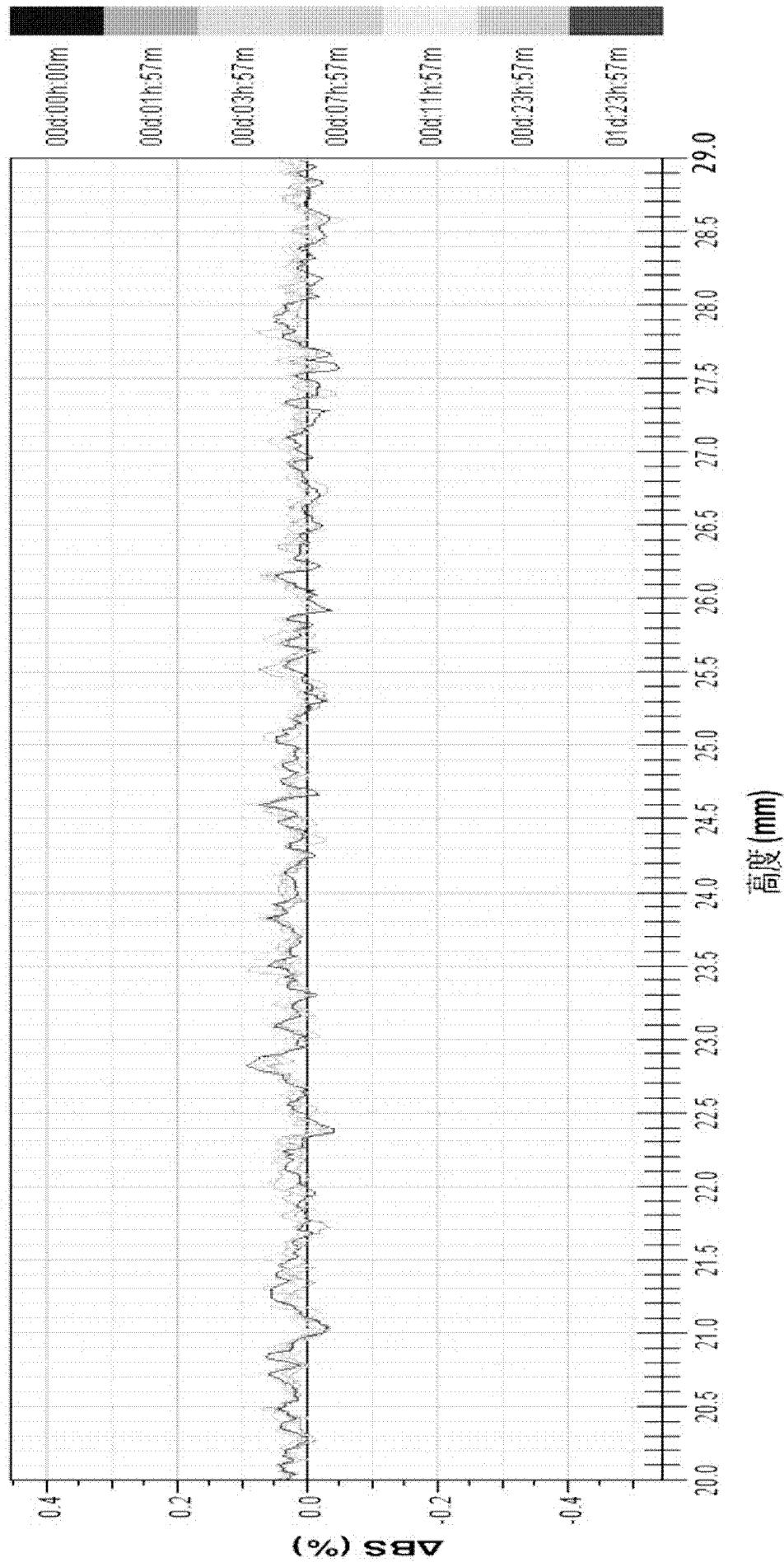


图 4

透射光參比譜圖·50倍蛋白納米粒完全培養液

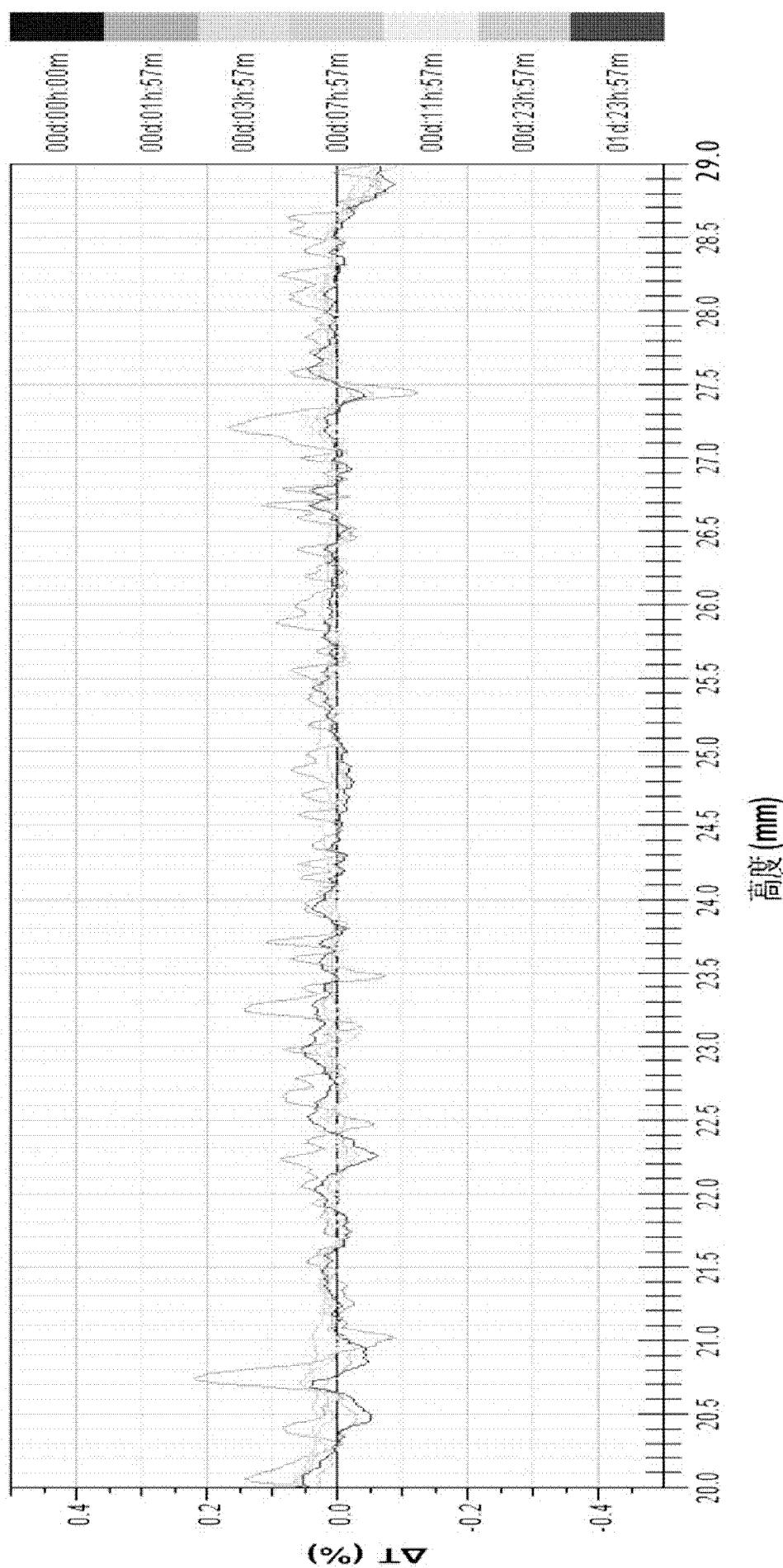


图 5

背散射光參比譜圖·50倍蛋白納米粒完全培养液

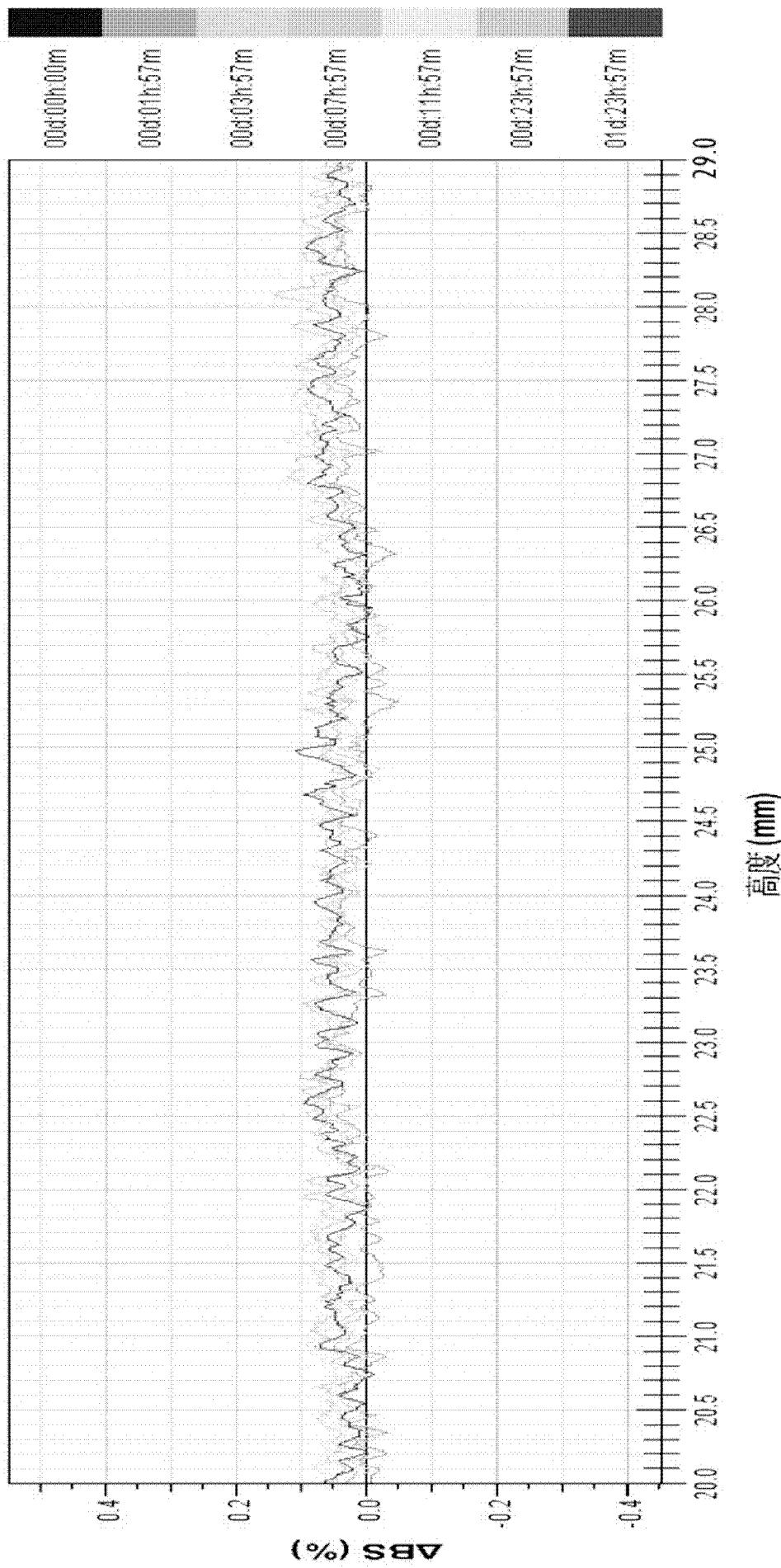


图 6

透射光參比譜圖·100倍蛋白納米粒完全培养液

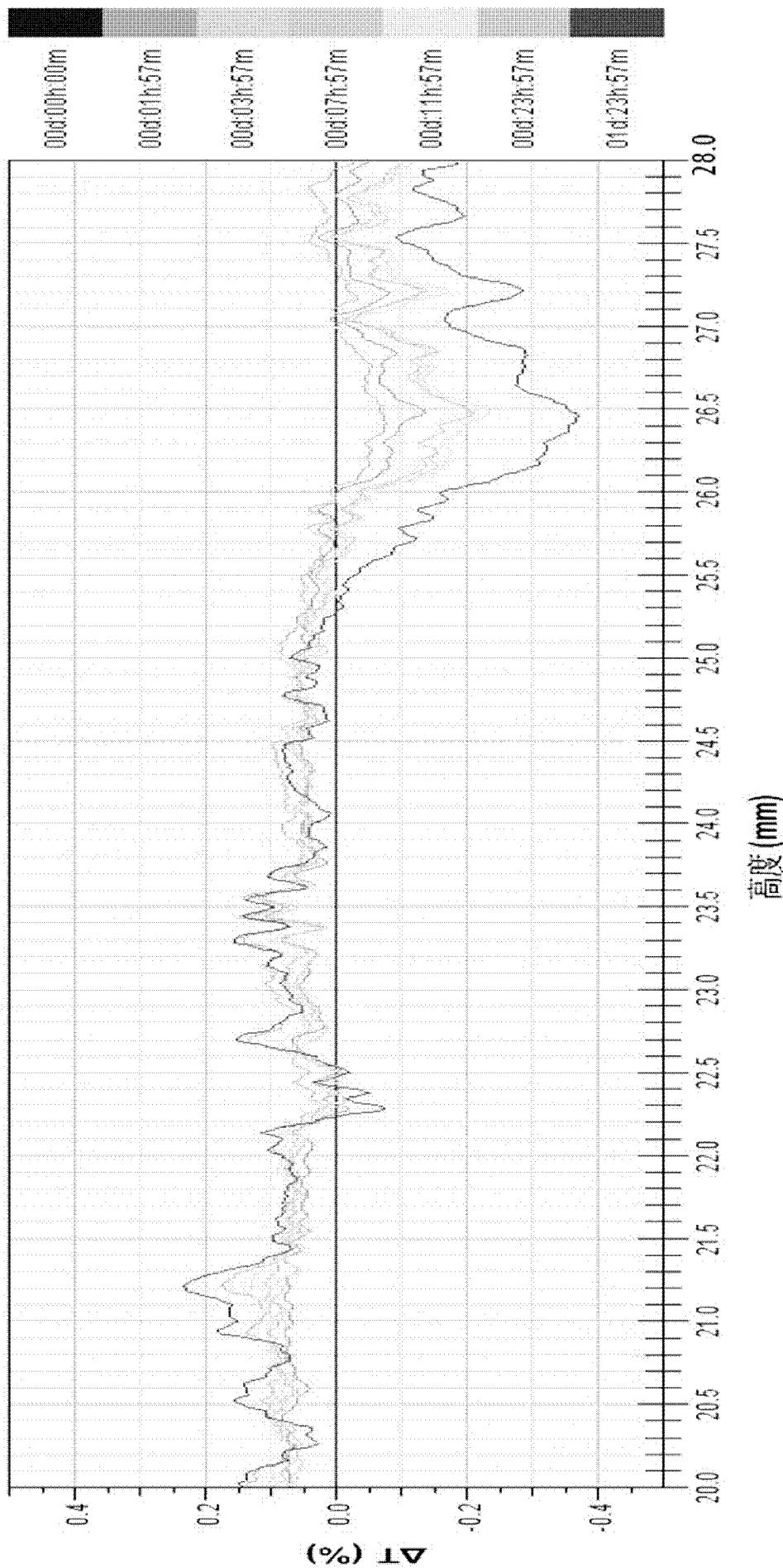


图 7

背散射光参考图·100倍蛋白纳米粒完全培养液

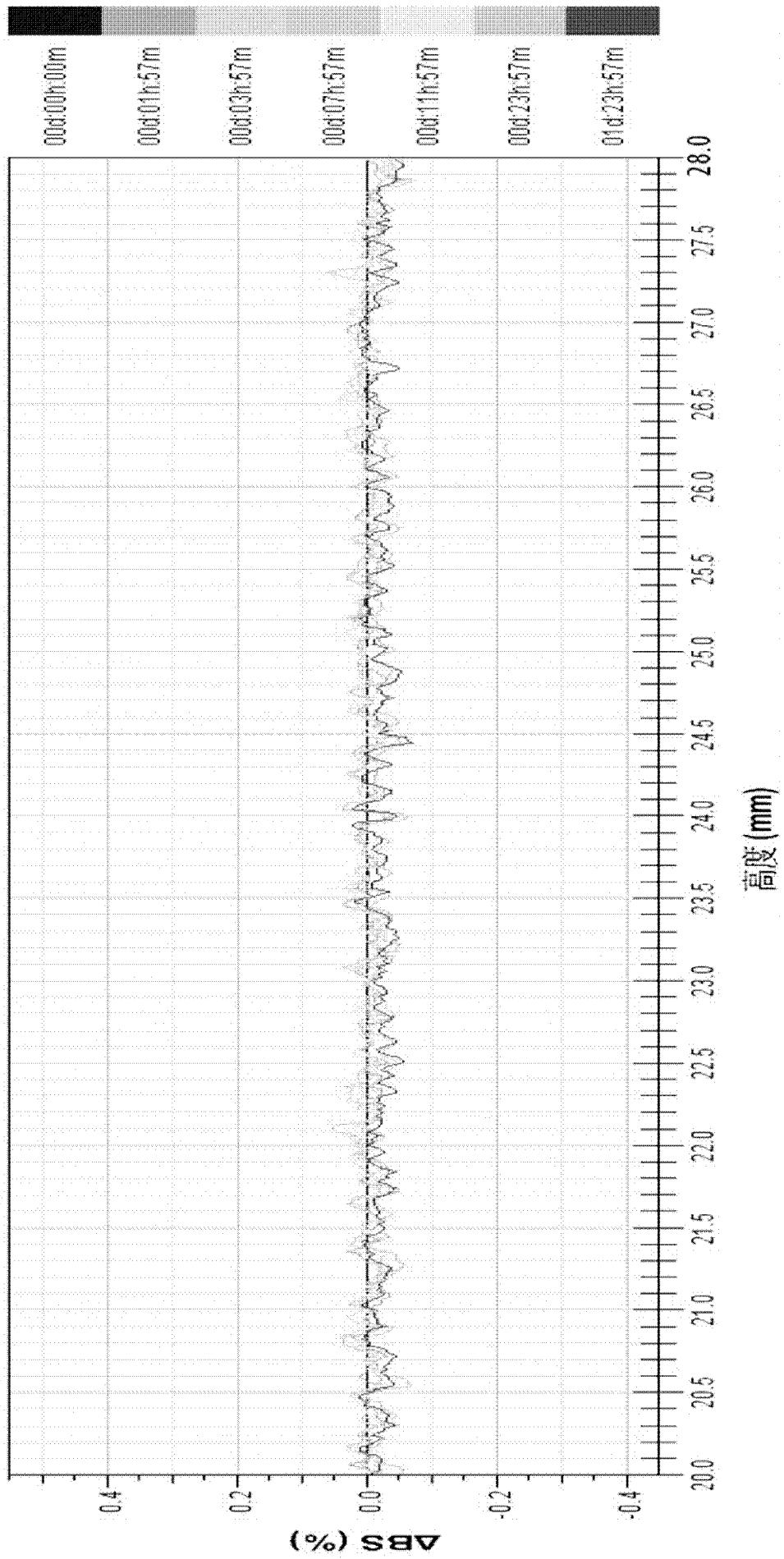


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/084654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/64 (2017.01) i; A61K 9/14 (2006.01) i; A61K 31/337 (2006.01) i; A61K 31/4745 (2006.01) i; A61K 31/436 (2006.01) i; A61K 31/496 (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)

A61K

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, CNTXT, DWPI, USTXT, CNKI, 中国人民解放军军事科学院, 中国人民解放军军事医学科学院, 梅兴国, 李志平, 紫衫烷, 紫杉醇, 多烯紫杉醇, 多西紫杉醇, 纤维素树碱, 伊曲康唑, 难溶, 蛋白质, 白蛋白, 颗粒, 包裹, 包埋, 聚乙二醇, 吐温, 司盘, 复合物, taxol, paclitaxel, taxotere, protein, serum albumin, HAS, hydroxyl camptothecin, itraconazole, insoluble, poorly soluble, particle, nanoparticle, particulate, nanoparticulate, encapsulation, PEG, polyethylene glycol, tween, span, complex, complexation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107412783 A (INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES PLA CHINA) 01 December 2017 (01.12.2017), claims 1-11, description, embodiment 1, and table 1	1-23
A	CN 102357076 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 22 February 2012 (22.02.2012), description, embodiments 1-3	1-23
A	CN 1237901 A (VIVORX PHARMACEUTICALS INC.) 08 December 1999 (08.12.1999), description, embodiments 1-12, and claims 1-72	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- “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
- “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)
- “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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 13 June 2018	Date of mailing of the international search report 27 June 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 YU, Li Telephone No. (86-10) 53961883

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2018/084654

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 102327230 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 25 January 2012 (25.01.2012), embodiments 1-3	1-23
A	CN 105816885 A (PEKING UNIVERSITY) 03 August 2016 (03.08.2016), claims 1-11, and description, paragraphs [0064]-[0079]	1-23
A	US 6749868 B1 (AMERICAN BIOSCIENCE INC.) 15 June 2004 (15.06.2004), the description	1-23
A	US 4842856 A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 27 June 1989 (27.06.1989), the description	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/084654

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 107412783 A	01 December 2017	None	
CN 102357076 A	22 February 2012	CN 102357076 B	11 June 2014
CN 1237901 A	08 December 1999	JP 2009185042 A ES 2323559 T3 LU 9161312 A1 WO 9814174 A1 EP 0961612 A1 CA 2267498 A1 NO 991620 A NL 3004171 I1 US 5916596 A JP 2001501931 A JP 4837809 B2 EP 2286798 A1 CA 2512487 A1 EP 1944019 B1 EP 0961612 B2 DK 0961612 T4 NO 991620 D0 DE 122009000065 I1 HK 1024866 A1 EP 0961612 B1 DK 0961612 T3 ES 2609853 T3 CN 1515244 A CN 1157185 C JP 5117439 B2 BR 9711856 A	20 August 2009 20 July 2009 07 December 2009 09 April 1998 08 December 1999 09 April 1998 01 June 1999 01 December 2009 29 June 1999 13 February 2001 14 December 2011 23 February 2011 09 April 1998 07 September 2016 01 August 2012 08 October 2012 06 April 1999 07 January 2010 13 November 2009 08 April 2009 15 June 2009 24 April 2017 28 July 2004 14 July 2004 16 January 2013 06 November 2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/084654

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CA 2512487 C	29 May 2012
		PT 961612 E	17 June 2009
		NO 328689 B1	26 April 2010
		AT 427739 T	15 April 2009
		CN 1515244 B	07 August 2013
		NZ 335133 A	22 December 2000
		BR PI9715297 B1	12 July 2016
		AU 4592997 A	24 April 1998
		EP 0961612 A4	21 December 2005
		CA 2267498 C	08 May 2007
		DE 69739348 D1	20 May 2009
		EP 1944019 A2	16 July 2008
		ES 2323559 T5	03 December 2012
		BR PI9711856 B1	12 July 2016
		EP 1944019 A3	30 July 2008
		AU 718753 B2	20 April 2000
CN 102327230 A	25 January 2012	CN 102327230 B	21 May 2014
CN 105816885 A	03 August 2016	None	
US 6749868 B1	15 June 2004	AU 5035900 A	12 December 2000
		AU 2006202836 A1	27 July 2006
		AU 784416 B2	30 March 2006
		AU 2009217409 A1	08 October 2009
		AU 2006202836 B2	08 October 2009
		EP 1178786 A1	13 February 2002
		EP 1178786 A4	01 March 2006
		WO 0071079 A3	27 March 2008
		WO 0071079 A2	30 November 2000
		CA 2371912 C	16 February 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/084654

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CA 2684454 A1	18 November 2000
US 4842856 A	27 June 1989	IL 85164 D0	31 July 1988
		EP 0276674 A1	03 August 1988
		AU 1032388 A	28 July 1988
		NZ 223253 A	28 August 1990
		DE 3702105 A1	04 August 1988
		ZA 8800442 A	22 July 1988
		HU T47838 A	28 April 1989
		JP S63192714 A	10 August 1988

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/084654

A. 主题的分类

A61K 47/64(2017.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/337(2006.01)i; A61K 31/4745(2006.01)i; A61K 31/436(2006.01)i; A61K 31/496(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)

A61K

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, CNTXT, DWPI, USTXT, CNKI, 中国人民解放军军事科学院, 中国人民解放军军事医学科学院, 梅兴国, 李志平, 紫衫烷, 紫杉醇, 多烯紫杉醇, 多西紫杉醇, 羟基喜树碱, 伊曲康唑, 难溶, 蛋白质, 白蛋白, 颗粒, 包裹, 包埋, 聚乙二醇, 吐温, 司盘, 复合物, taxol, paclitaxel, taxotere, protein, serum albumin, HAS, hydroxyl camptothecin, itraconazole, insoluble, poorly soluble, particle, nanoparticle, particulate, nanoparticulate, encapsulation, PEG, polyethylene glycol, tween, span, complex, complexation

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
PX	CN 107412783 A (中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所) 2017年 12月 1日 (2017 - 12 - 01) 权利要求1-11, 实施例1, 表1	1-23
A	CN 102357076 A (中国药科大学) 2012年 2月 22日 (2012 - 02 - 22) 实施例1-3	1-23
A	CN 1237901 A (维沃RX药物公司) 1999年 12月 8日 (1999 - 12 - 08) 实施例1-12, 权利要求1-72	1-23
A	CN 102327230 A (中国药科大学) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 实施例1-3	1-23
A	CN 105816885 A (北京大学) 2016年 8月 3日 (2016 - 08 - 03) 权利要求1-11, 说明书第[0064]-[0079]段	1-23
A	US 6749868 B1 (AMERICAN BIOSCIENCE INC.) 2004年 6月 15日 (2004 - 06 - 15) 说明书全文	1-23

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:	"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
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	"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
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	"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
"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)	"&" 同族专利的文件
"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	

国际检索实际完成的日期 2018年 6月 13日	国际检索报告邮寄日期 2018年 6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	受权官员 于莉 电话号码 86-(10)-53961883

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/084654

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 4842856 A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 1989年 6月 27日 (1989 - 06 - 27) 说明书全文	1-23

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/084654

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	107412783	A	2017年 12月 1日	无			
CN	102357076	A	2012年 2月 22日	CN	102357076	B	2014年 6月 11日
CN	1237901	A	1999年 12月 8日	JP	2009185042	A	2009年 8月 20日
				ES	2323559	T3	2009年 7月 20日
				LU	91613	I2	2009年 12月 7日
				WO	9814174	A1	1998年 4月 9日
				EP	0961612	A1	1999年 12月 8日
				CA	2267498	A1	1998年 4月 9日
				NO	991620	A	1999年 6月 1日
				NL	300417	I1	2009年 12月 1日
				US	5916596	A	1999年 6月 29日
				JP	2001501931	A	2001年 2月 13日
				JP	4837809	B2	2011年 12月 14日
				EP	2286798	A1	2011年 2月 23日
				CA	2512487	A1	1998年 4月 9日
				EP	1944019	B1	2016年 9月 7日
				EP	0961612	B2	2012年 8月 1日
				DK	0961612	T4	2012年 10月 8日
				NO	991620	D0	1999年 4月 6日
				DE	122009000065	I1	2010年 1月 7日
				HK	1024866	A1	2009年 11月 13日
				EP	0961612	B1	2009年 4月 8日
				DK	0961612	T3	2009年 6月 15日
				ES	2609853	T3	2017年 4月 24日
				CN	1515244	A	2004年 7月 28日
				CN	1157185	C	2004年 7月 14日
				JP	5117439	B2	2013年 1月 16日
				BR	9711856	A	2001年 11月 6日
				CA	2512487	C	2012年 5月 29日
				PT	961612	E	2009年 6月 17日
				NO	328689	B1	2010年 4月 26日
				AT	427739	T	2009年 4月 15日
				CN	1515244	B	2013年 8月 7日
				NZ	335133	A	2000年 12月 22日
				BR	PI9715297	B1	2016年 7月 12日
				AU	4592997	A	1998年 4月 24日
				EP	0961612	A4	2005年 12月 21日
				CA	2267498	C	2007年 5月 8日
				DE	69739348	D1	2009年 5月 20日
				EP	1944019	A2	2008年 7月 16日
				ES	2323559	T5	2012年 12月 3日
				BR	PI9711856	B1	2016年 7月 12日
				EP	1944019	A3	2008年 7月 30日
				AU	718753	B2	2000年 4月 20日
CN	102327230	A	2012年 1月 25日	CN	102327230	B	2014年 5月 21日
CN	105816885	A	2016年 8月 3日	无			
US	6749868	B1	2004年 6月 15日	AU	5035900	A	2000年 12月 12日
				AU	2006202836	A1	2006年 7月 27日
				AU	784416	B2	2006年 3月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/084654

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)
		AU	2009217409	A1 2009年 10月 8日
		AU	2006202836	B2 2009年 10月 8日
		EP	1178786	A1 2002年 2月 13日
		EP	1178786	A4 2006年 3月 1日
		WO	0071079	A3 2008年 3月 27日
		WO	0071079	A2 2000年 11月 30日
		CA	2371912	C 2010年 2月 16日
		CA	2684454	A1 2000年 11月 18日
US 4842856 A 1989年 6月 27日		IL	85164	D0 1988年 7月 31日
		EP	0276674	A1 1988年 8月 3日
		AU	1032388	A 1988年 7月 28日
		NZ	223253	A 1990年 8月 28日
		DE	3702105	A1 1988年 8月 4日
		ZA	8800442	A 1988年 7月 22日
		HU	T47838	A 1989年 4月 28日
		JP	S63192714	A 1988年 8月 10日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)