

(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
2017 年 6 月 29 日 (29.06.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/107817 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 47/42 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/109807
- (22) 国际申请日: 2016 年 12 月 14 日 (14.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510962987.X 2015 年 12 月 21 日 (21.12.2015) CN
- (71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。
- (72) 发明人: 梁金栋 (LIANG, Jindong); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。蒋贵阳 (JIANG, Guiyang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。李昂 (LI, Ang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。许建烟 (XU, Jianyan); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟, Beijing 100738 (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, 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: PREPARATION METHOD FOR ANTIBODY DRUG CONJUGATE

(54) 发明名称: 一种抗体药物偶联物的制备方法

(57) Abstract: The present invention relates to a preparation method for an antibody drug conjugate. Specifically, the present invention relates to synthesis and purification steps for an antibody drug conjugate, the purification step comprising a molecular exclusion step.

(57) 摘要: 一种抗体药物偶联物的制备方法。具体而言, 涉及抗体药物偶联物的合成和纯化步骤, 所述的纯化步骤包括分子排阻步骤。



WO 2017/107817 A1

一种抗体药物偶联物的制备方法

技术领域

本发明涉及一类抗体药物偶联物的制备方法，尤其涉及一类抗体药物偶联物的
5 制备方法的纯化步骤。更具体地说，本发明涉及抗体药物偶联物 T-DM1 及 P-mab-linker-MC-MMAF 的制备方法。

背景技术

化疗依然是包括手术、放疗、以及靶向治疗法在内的最重要的抗癌手段之
10 一。尽管高效细胞毒性药物的种类很多，但是肿瘤细胞和正常细胞之间差别很小，限制了这些抗肿瘤化合物由于毒副作用在临床上的广泛应用。而抗肿瘤单克隆抗体对于肿瘤细胞表面抗原的特异性，抗体药物已成为抗肿瘤治疗的前线药物，但单独使用抗体作为抗肿瘤药物时，疗效经常不尽人意。

抗体药物偶联物(antibody drug conjugate, ADC)把单克隆抗体或者抗体片段
15 通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒性药物相连，充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒性药物的高效性，同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着，与以往的化疗药物相比，抗体药物偶联物能精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响(Mullard A,(2013)Nature Reviews Drug Discovery,12:329-332; DiJoseph
20 JF,Armellino DC, (2004)Blood,103:1807-1814)。

抗体药物偶联物的制备方法主要包括偶联物的制备和纯化两个步骤。纯化步骤可以去除抗体药物偶联物初始制备液中的小分子及多聚体等杂质，提高纯度。

通常纯化步骤会用到离子交换层析(Ion Exchange Chromatography 简称为 IEC)方法或者切向流超滤(TFF, 超滤)。离子交换层析是以离子交换剂为固定相，依
25 据流动相中的组分离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时的结合力大小的差别，而进行分离的一种层析方法。采用离子交换层析时，由于抗体药物偶联物样品中抗体分子偶联药物的数量不同，从而影响不同载药量的抗体药物偶联物的电荷分布。因此在采用离子柱进行层析分离时，药物载量引起的电荷分布会比较大的影响层析结果，比如影响最终层析产物的纯度及平均载药量。

30 切向流超滤是指液体流动方向与过滤方向呈垂直方向的过滤形式，切向流过滤时，待过滤的液体的流动方向和过滤膜平面的方向平行，液体就会垂直于膜表面穿过膜孔。切向流超滤方法可以很方便除去体系中的小分子杂质，但缺点是无法除去分子量比较大的一些杂质。

分子排阻色谱法又称空间排阻色谱法(SEC)或凝胶色谱法，是利用多孔凝胶
35 固定相的独特性，凝胶孔隙的孔径大小，高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系，而对溶质进行分离的方法。其分离机理主要取决于凝胶的孔径大小与被分离

组分分子尺寸之间的关系，与流动相的性质没有直接的关系；样品分子与固定相之间不存在相互作用。色谱固定相是多孔性凝胶，仅允许直径小于孔径的组分进入，这些孔对于溶剂分子来说是相当大的，以致溶剂分子可以自由的扩散出入。样品中的大分子不能进入凝胶孔洞而完全被排阻，只能沿多孔凝胶粒子之间的空隙通过色谱柱，首先从柱中被流动相洗脱出来；中等大小的分子能进入凝胶中一些适当的孔洞中，但不能进入更小的微孔，在柱中受到滞留，较慢地从色谱柱洗脱出来；小分子可进入凝胶中绝大部分孔洞，在柱中受到更强的滞留，会更慢的被洗脱出；溶解样品的溶剂分子，其分子量最小，可进入凝胶的所有孔洞，最后从柱中流出，从而实现具有不同分子大小样品的完全分离。分子排阻法可以通过不同分子量的组分在在凝胶中的保留时间差异不同，从而区分出不同分子量的组分。而且该方法对组分的不同电荷分布没有要求。因此分子排阻色谱法在进行纯化时，不受分子的电荷分布情况的影响。

T-DM1 是一种抗体-药物偶联物（ADC），由赫赛汀（曲妥珠单抗）和小分子微管类药物 DM1 偶联而成。我们发现在用常规方法制备 T-DM1 时，无法得到同时符合载药量和 SEC 纯度要求以及回收率的产物。

CN101267841B 公开了一种制备纯化 T-DM1 的方法，其中两步纯化方法都使用了切向流超滤。然而，由于切向流超滤无法除去一些分子量较大的杂质，使用该方法并不能稳定地得到高纯度的终产品，有时候还需要通过增加其他纯化步骤才可以获得纯度合格的产品，延长后处理过程。

WO2015113476 公开了一种新型的抗体-药物偶联物帕妥珠单抗-丙基-1-硫-MC-MMAF（P-mab-linker-MC-MMAF），其能够有效地抑制肿瘤细胞的生长。在制备 P-mab-linker-MC-MMAF 时，我们同样发现使用常规方法制备纯化无法得到同时符合载药量和 SEC 纯度以及回收率的产物。

通过研究，我们发现了一种在保证载药量的同时，即能保持活性，又能提高回收率的方法，使抗体偶联物的制备效率得到有效的提高。这种方法也同样适合于其他抗体偶联物的制备，并取得优良的效果。

发明内容

为了改进 ADC 药物制备效果，本发明提供了一种改进的抗体药物偶联物的制备方法，包括抗体-连接剂与细胞毒性药物进行偶联反应，以制备抗体药物偶联物以及抗体药物偶联物的纯化步骤，所述的纯化步骤包括分子排阻步骤。

其中，抗体连接剂的制备是通过使双功能交联试剂与抗体反应，从而导致连接体分子与抗体共价连接，得到修饰的抗体。所述的“双功能交联试剂”优选 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯（SMCC）、3-乙酰巯基丙醛。

在本发明的一个优选实施例方案中，所述的抗体原液浓度为 5-15mg/mL，优选 10mg/mL。

在本发明的一个优选实施例方案中，所述的抗体连接剂的浓度为 5-15mg/mL，优选 10mg/mL。

在本发明的一个优选实施例方案中，分子排阻步骤包括使用分离分子量范围在 5000~5000000，优选 10000~600000 的凝胶作为纯化柱的填充料。

5 在本发明的一个优选实施例方案中，分离分子量范围 10000~600000 的凝胶填充料包括 G200 凝胶。G200 凝胶能够分离的蛋白分子量范围在 10000-600000 之间，市售产品有 Sephadex G200、Superdex G200、SuperdexTM 200pg 等。本发明中优选 SuperdexTM 200pg。更符合生产目的。

10 在本发明的一个优选实施例方案中，在抗体药物偶联物的制备方法中，所述的抗体为曲妥珠单抗。

在本发明的一个优选实施例方案中，在抗体药物偶联物的制备方法中，所述的抗体药物偶联物为 T-DM1。

在本发明的一个优选实施例方案中，在抗体药物偶联物的制备方法中，所述的抗体为帕妥珠单抗。

15 在本发明的一个优选实施例方案中，在抗体药物偶联物的制备方法中，所述的抗体药物偶联物为 P-mab-linker-MC-MMAF。

在本发明的一个优选实施例方案中，抗体连接剂的纯化方法可使用小分子过滤法，优选切向流超滤。在本发明的一个优选实施例方案中，超滤的滤膜孔径为 10-50KD，优选 30KD。

20 在抗体连-接剂与细胞毒性药物进行偶联反应前，还可以包括抗体-连接剂的制备和纯化步骤。

本发明用分子排阻法纯化抗体-药物偶联物，可以有效除去抗体中的多聚体，并且对样品的药物载量几乎没有影响，在保证活性的同时，提高偶联药物纯度。该方法的优点是可以一步法除去偶联过程中产生的聚体以及体系中未反应的小分子毒素，得到高纯度的偶联物，减少了纯化的步骤，提高了纯化的效率，有利于工业化生产。

30 除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明，但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本发明时，依据以下定义使用下列术语。

当本发明中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

35 术语“细胞毒性药物”是指在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。

在本发明的实施方式中，其非限制性实例包括微管蛋白抑制剂、DNA 烷化剂、酪氨酸激酶抑制剂、拓扑异构酶抑制剂或 DNA 合成抑制剂。

术语“抗体”是指表现出所需生物学活性的任何形式的抗体。因此，它以最广义使用，具体地说，包括但不限于全长抗体，抗体结合片段或衍生物。抗体的来源包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体（例如双特异性抗体）。

术语“抗体原液”是指以合适的，所属领域技术人员常规使用的缓冲液体系，对纯化后得到的抗体进行保存所形成的抗体溶液。所述缓冲液体系如本发明中所用的醋酸-醋酸钠缓冲液体系或磷酸盐缓冲液体系（PBS）。

本发明中所述的连接剂（SMCC）可以是市售的，也可以参考文献 Facile Synthesis of Reagents Containing a Terminal Maleimido Ligand Linked to an Active Ester, Synthesis 1991 (10), 819-821, 进行制备和纯化。

本发明中所述的抗体-连接剂指的是抗体和 SMCC 进行偶联反应后得到的，如实施例 1 步骤 2 中的曲妥珠单抗-连接剂。此处所述的偶联反应的反应底物当量比，即 SMCC：抗体范围为 2-10:1；本发明中优选 8:1。反应时间为 1-5 小时，优选 2 小时。

本发明中所述的抗体-连接剂与细胞毒性药物进行偶联反应指抗体-连接剂与细胞毒性药物进行 C-S 偶联反应。此处所述的偶联反应的反应底物当量比，即 L-DM1：抗体-连接剂的范围为 2-15:1；本发明中优选 6:1。偶联反应所用的反应液为含 EDTA 的磷酸缓冲盐溶液（PBS），pH 为 5.5-7.5，优选 6.5。反应时间为 2-18 小时，优选 4 小时。反应温度 4-37℃，优选 25℃。反应液中还包含一种或多种选自以下的溶剂乙腈、乙醇、DMSO、DMA、DMF，有机溶剂的含量 2-20%，优选 5-10%；本发明中优选 10%乙醇和 2%乙腈。也可参考 US 2005/0169933 A1 的描述。

本发明中所述的 G200 凝胶表示凝胶型号，G 值表示交联度大小，数字表示每克干胶膨胀时吸水量的 10 倍，如 Superdex G200 表示每克干胶膨胀时可以吸水 20 克。Sephadex 为一种葡聚糖凝胶（dextran gel）的商品名；Superdex 为一种琼脂糖及葡聚糖组成的复合凝胶的商品名，其为 Sephadex 的改进形式。SuperdexTM 200pg，为市售制备级的凝胶型号。

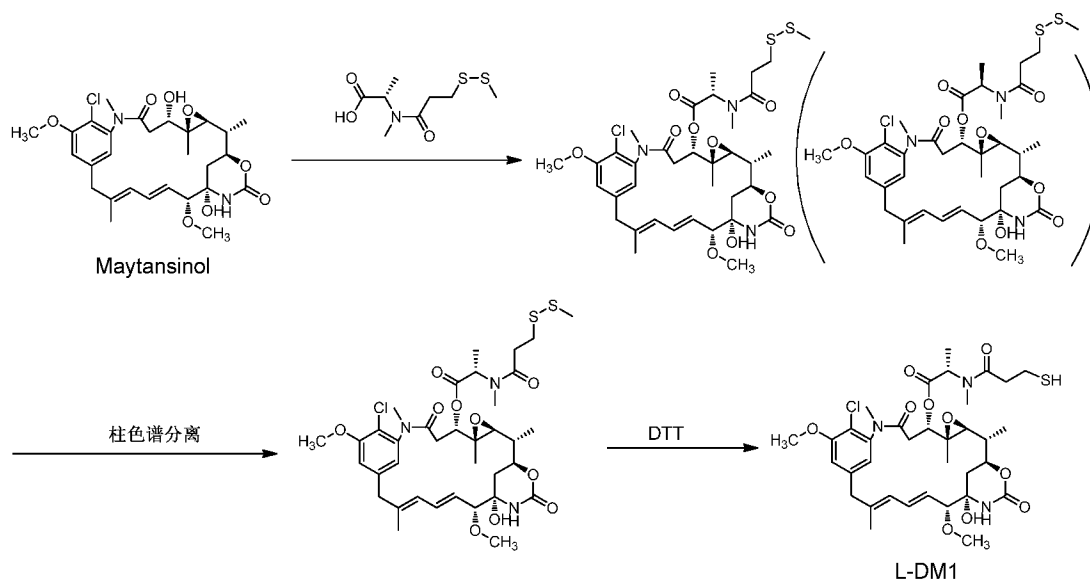
具体实施方式

以下结合实施例进一步描述解释本发明，但这些实施例并非意味着限制本发明的范围。

本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

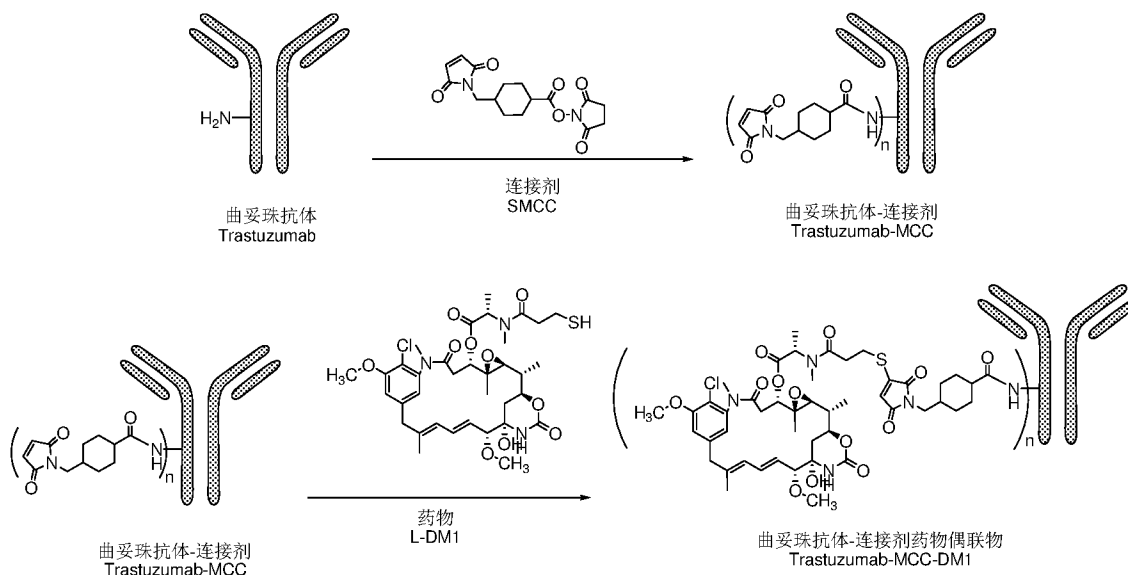
实施例1：抗体药物偶联物T-DM1的合成与纯化

步骤一、L-DM1合成工艺路线



合成方法参考 **Semisynthetic Maytansine Analogues for the Targeted Treatment of Cancer**, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4392-4408。

5 步骤二、T-DM1 合成工艺路线



在 25℃，在含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 5%乙腈的缓冲液(pH 6.5)中，10.0 克单克隆抗体曲妥珠抗体原液（Trastuzumab，抗体公开于 US6165464A）(用 50mM，pH 6.5 的磷酸盐缓冲液稀释 Trastuzumab 至抗体终浓度 10mg/mL) 与 181 毫克的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯（连接剂 SMCC，上海鸿翰生科科技有限公司）在反应摇床上反应进行 2 小时，生成 Trastuzumab-MCC 的反应液；将反应生成得到的 Trastuzumab-MCC 反应液，在 25℃温度下，用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 5%乙腈的缓冲液(pH 6.5)10 倍体积进行等体积超滤（超滤膜包采用 30kd 的

聚纤维素膜包)，以除去反应液中未反应的 SMCC 以及其他小分子杂质，最后用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤得到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲液溶液 (pH 6.5)。

5 得到的 Trastuzumab-MCC 在 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲液溶液(pH 6.5)置换到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾以及 10%乙醇和 2%乙腈的缓冲液溶液(pH 6.5)中，调整浓度为 10mg/mL，再加入 300mgL-DM1 的乙醇溶液与上述反应体系。在反应摇床上反应进行 4 小时，生成 Trastuzumab-MCC-DM1 的反应液，取样品进行药物载量测试以及 SEC-HPLC
10 纯度测试，SEC-HPLC 结果是 94.59%；将反应生成得到的 Trastuzumab-MCC-DM1 反应液用填料为 Superdex™ 200pg 的分子排阻柱进行纯化样品，以除去样品中的聚合体和其他小分子杂质，回收单体，取样品进行药物载量测试以及 SEC-HPLC 纯度测试，SEC-HPLC 结果是 99.11%。根据纯化过程取样的药物载量计算（UV 法），结果见表 1。

15

表 1.根据纯化过程取样的药物载量计算（UV 法）

样品	纯化前	纯化后
载量	3.40	3.34

附：Trastuzumab-MCC-DM1 药物载量的测定方法：

20 Trastuzumab-MCC-DM1 药物载量的测定方法包括紫外-可见分光光度法和 LC/MS 法。

紫外-可见分光光度法的原理是基于在 280nm 下药物和单克隆抗体共同对总吸光值产生作用（The absorbance at 280nm of the drug and the antibody contribute to the total absorbance （ A_{280nm} ）），计算过程如下：

$$A_{280nm} = \varepsilon_1 bc_1 + \varepsilon_2 bc_2 \quad (1)$$

25 其中：

ε_1 ：药物在 280nm 下的消光系数；

ε_2 ：单克隆抗体在 280nm 下的消光系数；

c_1 ：药物的浓度；

c_2 ：单克隆抗体的浓度；

30 b：光程长度（detector path length）；

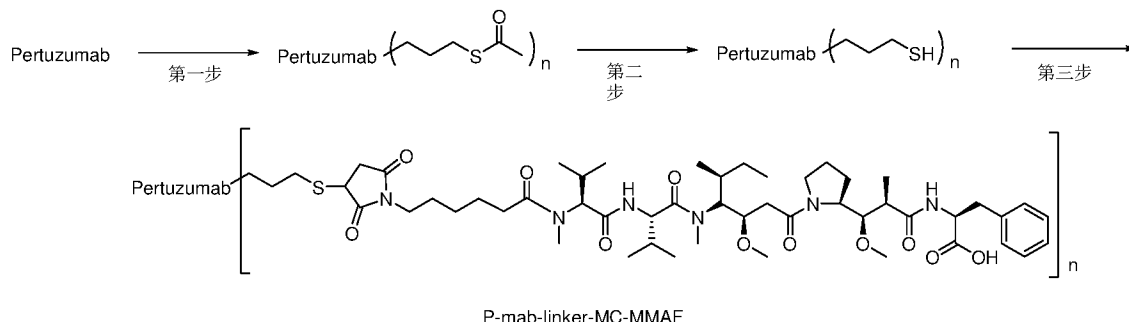
同理可以得到样品在 252nm 下的总吸光值方程：

$$A_{252nm} = \varepsilon_3 bc_3 + \varepsilon_4 bc_4 \quad (2)$$

由(1)和(2)两种方程结合单克隆抗体和药物在两个检测波长下的消光系数和浓

度数据可以计算出药物的载量。在该工艺中采用紫外-可见分光光度法来测量计算原液最后的载量。

实施例2：抗体药物偶联物P-mab-linker-MC-MMAF的合成



5

取帕妥珠单抗(P-mab, 抗体公开于 US7041292B1)原液(pH=4.3-4.5 的 100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液中, 并浓缩至浓度为 10.0mg/mL 左右), 得 P-mAb 的醋酸-醋酸钠缓冲液 200mL (13.5mmol), 将 3-乙酰巯基丙醛(14.3mg, 0.108mmol), 溶解于 20mL 乙腈后滴加入上述缓冲液中, 将氰基硼氢化钠(173mg, 2.7mmol)溶于 10mL 水中滴加入上述反应液中, 25±2℃下搅拌反应 2-3 小时。反应结束后用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙腈的缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤, 以除去反应液中未反应的其他小分子杂质, 最后用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤后得 200mL 帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯溶液, 浓度约为 10mg/mL。

15 向帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯溶液(第一步制得)加入2M 盐酸羟胺4.0mL, 25℃下搅拌反应1 小时后将反应液用50mM NaCl、2mM EDTA 和50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤后得200mL 帕妥珠单抗-丙硫醇溶液, 浓度10mg/mL。

取化合物 MC-MMAF (化合物公开于 WO2005081711, 125mg, 13.5mmol)溶于 20mL 乙腈中, 加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液(第二步制得)中, 25℃下搅拌反应 4 小时后, 得到 P-mab-linker-MC-MMAF 的 ADC 样品, 取样品进行完整分子量测试以及 SEC-HPLC 纯度测试, SEC-HPLC 结果详是 94.70%以及药物载量是 2.1。将得到的 P-mab-linker-MC-MMAF 的 ADC 样品反应液用填料为 Superdex™ 200pg 的分子排阻柱进行纯化样品, 以除去样品中的聚体以及其他的小分子残余, 可以得到纯化的样品, 取样品进行完整分子量测试以及 SEC-HPLC 纯度测试, SEC-HPLC 结果是 99.39%以及药物载量是 2.08。

附：测试单抗类样品 P-mab-linker-MC-MMAF 的完整分子量实验条件：

色谱条件:

30 色谱柱: Poroshell 300SB-C8 5um 2.1*75mm

流动相: A: 0.1% $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ B: 0.1% HCOOH/ACN

梯度:

RT(min)	0	5	8	12	12.1	15
B%	5	5	95	95	5	5

流速: 0.4mL/min

柱温: 75℃

5 质谱条件:

质谱: Agilent 6530 Q-TOF LC-MS

模式: 1 GHz

毛细管电压: 3500V

去溶剂气体温度: 325℃

10 气体流速: 10L/min

Fragmentor 电压: 200V

MS 采集范围: 500m/z-5000m/z

实施例3: 抗体药物偶联物T-DM1的合成与纯化

15 在 25℃, 在含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 5%乙腈的缓冲液(pH 6.5)中, 50.0 克单克隆抗体曲妥珠(Trastuzumab 终浓度 10mg/mL) 与 905 毫克的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯在反应摇床上反应进行 2 小时, 生成 Trastuzumab-MCC 的反应液; 将反应生成得到的 Trastuzumab-MCC 反应液, 在 25℃温度下, 用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 5%乙腈的缓冲液(pH 6.5)10 倍体积进行等体积超滤, 以除
20 去反应液中未反应的 SMCC 以及其他小分子杂质, 最后用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤得到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲液溶液(pH 6.5)。

得到的 Trastuzumab-MCC 在 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲
25 液溶液(pH 6.5)置换到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾以及 10%乙醇和 2%乙腈的缓冲液溶液(pH 6.5)中, 调整浓度为 10mg/mL, 再加入 1500mgL-DM1 的乙醇溶液与上述反应体系。在反应摇床上反应进行 4 小时, 反应得到 Trastuzumab-MCC-DM1 反应液, 测试其纯度以及药物载量。SEC-HPLC 纯度是 95.25%, 药物载量是 3.43。

30 将得到的 Trastuzumab-MCC-DM1 反应液用填料为 Superdex™ 200pg 的分子排阻柱进行纯化样品, 以除去样品中的聚合体和残余其他小分子物质。最后在进行纯度测试以及药物载量测试, 其 SEC-HPLC 纯度为 99.26%, 药物载量是 3.40。样品回收率是 95%。

35 表 2.根据纯化过程取样的药物载量计算 (UV 法)

样品	纯化前	纯化后
载量	3.43	3.40

比较实施例 1:

在 25℃, 在含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 5%乙腈的缓冲液(pH 6.5)中, 10.0 克单克隆抗体曲妥珠 (Trastuzumab 终浓度 10mg/ml) 与 180 毫克的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯在反应摇床上反应进行 2 小时, 生成 Trastuzumab-MCC 的反应液; 反应结束后, 将反应生成得到的 Trastuzumab-MCC 反应液, 用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾的缓冲液), 以除去反应液中未反应的 SMCC 以及其他小分子杂质, 最后得到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲液溶液(pH 6.5)。

将得到的 Trastuzumab-MCC 在 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲液溶液(pH 6.5)置换到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾以及 10%乙醇和 2%乙腈的缓冲液溶液(pH 6.5)中, 调整浓度为 10mg/ml, 再加入 300mg L-DM1 的乙醇溶液与上述反应体系。在反应摇床上反应进行 4 小时, 生成 Trastuzumab-MCC-DM1 的反应液; 反应结束后, 将反应生成得到的 Trastuzumab-MCC-DM1 反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾的缓冲液), 以除去反应液中未反应的 L-DM1 以及其他小分子杂质, 最后得到 Trastuzumab-MCC-DM1 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲液溶液(pH 6.5)。最后在进行纯度测试以及药物载量测试, 其 SEC-HPLC 纯度为 94.45%, 药物载量是 3.45。

比较实施例 2:

在 25℃, 在含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 5%乙腈的缓冲液(pH 6.5)中, 10.0 克单克隆抗体曲妥珠 (Trastuzumab 终浓度 10mg/ml) 与 181 毫克的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯在反应摇床上反应进行 2 小时, 生成 Trastuzumab-MCC 的反应液; 将反应生成得到的 Trastuzumab-MCC 反应液, 在 25℃温度下, 用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 5%乙腈的缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤(超滤膜包采用 30kd 的聚纤维素膜包), 以除去反应液中未反应的 SMCC 以及其他小分子杂质, 最后用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤得到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾缓冲液溶液(pH 6.5)。

得到的 Trastuzumab-MCC 在 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲

液溶液(pH 6.5)置换到 Trastuzumab-MCC 的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾以及 10%乙醇和 2%乙腈的缓冲液溶液(pH 6.5)中,调整浓度为 10mg/ml,再加入 300mgL-DM1 的乙醇溶液与上述反应体系。在反应摇床上反应进行 4 小时,生成 Trastuzumab-MCC-DM1 的反应液,在 25℃温度下,用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 以及 10%乙醇和 2%乙腈的缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤(超滤膜包采用 30kd 的聚纤维素膜包),以除去反应液中未反应的 L-DM1 以及其他小分子杂质,最后用 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)5 倍体积进行等体积超滤得到 Trastuzumab-MCC-DM1(T-DM1)的 50mM NaCl、2mM EDTA 和 50mM 磷酸钾 缓冲液溶液(pH 6.5)。最后在进行纯度测试以及药物载量测试,其 SEC-HPLC 纯度为 94.61%,药物载量是 3.51。

权利要求书:

1. 一种抗体药物偶联物的制备方法，包括抗体-连接剂与细胞毒性药物进行偶联反应，以制备抗体药物偶联物，还包括抗体药物偶联物的纯化步骤，所述的纯化步骤包括分子排阻步骤。
2. 如权利要求 1 所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，分子排阻步骤包括使用分离分子量范围在 5000~5000000，优选 10000~600000 的凝胶作为纯化柱的填充料。
3. 如权利要求 2 所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，分子排阻步骤包括使用 G200 凝胶作为纯化柱的填充料，优选 SuperdexTM 200pg 凝胶作为纯化柱的填充料。
4. 如权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述的抗体连接剂的纯化的方法为超滤。
5. 如权利要求 4 所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述超滤的滤膜孔径为 10-50KD，优选 30KD。
6. 如权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述的抗体原液浓度为 5-15mg/mL，优选 10mg/mL。
7. 如权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述的抗体连接剂的浓度为 5-15mg/mL，优选 10mg/mL。
8. 如权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述的抗体为曲妥珠单抗。
9. 如权利要求 8 所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述的抗体药物偶联物为 T-DM1。
10. 如权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述的抗体为帕妥珠单抗。
11. 如权利要求 10 所述的抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，所述的抗体药物偶联物为 P-mab-linker-MC-MMAF。

12. 如权利要求 1 至 11 任意一项所述的制备方法，其特征在于，在抗体-连接剂与细胞毒性药物进行偶联反应前，还包括抗体-连接剂的制备和纯化步骤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/109807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/42 (2017.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; C07K 16/30 (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, A61P, C07K

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)

DWPI, VEN, CNKI, CNABS, ISI Web of Knowledge, Google, PubMed: JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; binder-drug conjugate, molecular exclusion, steric exclusion, gel chromatography, molecular sieve, SEC, size exclusion chromatography, G200, superdex, sephadex, antibody drug conjugate, ADC, purify, ultra-filtration, UF; LIANG, Jindong; JIANG, Guiyang; LI, Ang; YE, Xin; XU, Jianyan

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1993146 A (GENENTECH, INC.), 04 July 2007 (04.07.2007) embodiments 3-4	1-12
X	CN 103068406 A (GENENTECH, INC.), 24 April 2013 (24.04.2013) embodiment 8	1-12
X	CN 104936621 A (PFIZER INC.), 23 September 2015 (23.09.2015) embodiment 14	1-12
X	CN 101784550 A (SANOFI-AVENTIS), 21 July 2010 (21.07.2010), description, paragraphs 238 and 244-245	1-12
X	WO 9205200 A1 (CHEMEX PHARMACEUTICALS, INC.), 02 April 1992 (02.04.1992) embodiment 1	1-12
A	WO 2015113476 A1 (SHANGHAI HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.), 06 August 2015 (06.08.2015), the whole document	1-12

☒ 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 08 February 2017 (08.02.2017)	Date of mailing of the international search report 06 March 2017 (06.03.2017)
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 WU, Xuemei Telephone No.: (86-10) 62414290

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/109807

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 102971012 A (IMMUNOGEN, INC.), 13 March 2013 (13.03.2013), the whole document	1-12
A	CN 103858003 A (SEATTLE GENETICS INC.), 11 June 2014 (11.06.2014), the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/109807

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1993146 A	04 July 2007	ZA 200610159 B	28 October 2009
		ZA 200610159 A	28 October 2009
CN 103068406 A	24 April 2013	EP 2579897 A1	17 April 2013
		JP 2013534520 A	05 September 2013
		CA 2799540 A1	15 December 2011
		MX 2012013868 A	24 January 2013
		AU 2011265054 A1	15 November 2012
		RU 2012156248 A	20 July 2014
		US 9000130 B2	07 April 2015
		KR 20130087382 A	06 August 2013
		SG 10201600791T A	30 March 2016
		MX 336540 B	22 January 2016
		AU 2011265054 B2	15 September 2016
		SG 185428 A1	28 December 2012
		US 2011301334 A1	08 December 2011
		AU 2016256788 A1	01 December 2016
		WO 2011156328 A1	15 December 2011
		US 2014288280 A1	25 September 2014
CN 104936621 A	23 September 2015	CA 2890256 A1	15 May 2014
		MX 2015005582 A	14 August 2015
		AU 2013343111 A1	14 May 2015
		WO 2014072888 A1	15 May 2014
		EP 2916875 A1	16 September 2015
		US 2015266962 A1	24 September 2015
		HK 1214161 A1	22 July 2016
		PE 08912015 A1	11 June 2015
		IL 238566 A	30 June 2015
		PH 12015500977 A1	13 July 2015
		SG 11201503431T A	28 May 2015
		JP 2016503295 A	04 February 2016
		KR 20150060980 A	03 June 2015
		IL 238566 D0	30 June 2015
CN 101784550 A	21 July 2010	EA 201070163 A1	30 August 2010
		HK 1144289 A1	17 April 2015
		TW I500618 B	21 September 2015
		BR PI0814267 A2	31 March 2015
		NZ 582679 A	27 April 2012
		AT 530553 T	15 November 2011
		PA 8790201 A1	09 February 2009
		JP 5551070 B2	16 July 2014
		US 8404678 B2	26 March 2013
		GT 201000008 A	26 March 2012
		DK 2170890 T3	27 February 2012
		AR 067575 A1	14 October 2009
		CA 2693551 C	20 September 2016
		US 2010316656 A1	16 December 2010
		SI 2170890 T1	29 February 2012
		CN 101784550 B	11 June 2014
		ES 2435779 T3	23 December 2013
		PT 2170890 E	03 February 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/109807

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1993146 A	04 July 2007	ZA 200610159 B	28 October 2009
		ZA 200610159 A	28 October 2009
CN 103068406 A	24 April 2013	EP 2579897 A1	17 April 2013
		JP 2013534520 A	05 September 2013
		CA 2799540 A1	15 December 2011
		MX 2012013868 A	24 January 2013
		AU 2011265054 A1	15 November 2012
		RU 2012156248 A	20 July 2014
		US 9000130 B2	07 April 2015
		KR 20130087382 A	06 August 2013
		SG 10201600791T A	30 March 2016
		MX 336540 B	22 January 2016
		AU 2011265054 B2	15 September 2016
		SG 185428 A1	28 December 2012
		US 2011301334 A1	08 December 2011
		AU 2016256788 A1	01 December 2016
		WO 2011156328 A1	15 December 2011
		US 2014288280 A1	25 September 2014
CN 104936621 A	23 September 2015	CA 2890256 A1	15 May 2014
		MX 2015005582 A	14 August 2015
		AU 2013343111 A1	14 May 2015
		WO 2014072888 A1	15 May 2014
		EP 2916875 A1	16 September 2015
		US 2015266962 A1	24 September 2015
		HK 1214161 A1	22 July 2016
		PE 08912015 A1	11 June 2015
		IL 238566 A	30 June 2015
		PH 12015500977 A1	13 July 2015
		SG 11201503431T A	28 May 2015
		JP 2016503295 A	04 February 2016
		KR 20150060980 A	03 June 2015
		IL 238566 D0	30 June 2015
CN 101784550 A	21 July 2010	EA 201070163 A1	30 August 2010
		HK 1144289 A1	17 April 2015
		TW I500618 B	21 September 2015
		BR PI0814267 A2	31 March 2015
		NZ 582679 A	27 April 2012
		AT 530553 T	15 November 2011
		PA 8790201 A1	09 February 2009
		JP 5551070 B2	16 July 2014
		US 8404678 B2	26 March 2013
		GT 201000008 A	26 March 2012
		DK 2170890 T3	27 February 2012
		AR 067575 A1	14 October 2009
		CA 2693551 C	20 September 2016
		US 2010316656 A1	16 December 2010
		SI 2170890 T1	29 February 2012
		CN 101784550 B	11 June 2014
		ES 2435779 T3	23 December 2013
		PT 2170890 E	03 February 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/109807

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103858003 A	11 June 2014	AU 2011226672 B2	23 July 2015
		US 2013295104 A1	07 November 2013
		US 9346887 B2	24 May 2016
		EP 2544719 A1	16 January 2013
		MX 2012010514 A	20 March 2013
		KR 20150021112 A	27 February 2015
		SG 10201501803Y A	28 May 2015
		EP 2544719 A4	09 October 2013
		CN 102971012 B	04 May 2016
		KR 20130016272 A	14 February 2013
		AR 080513 A1	11 April 2012
		AU 2011226672 A1	27 September 2012
		NZ 602176 A	30 January 2015
		CN 106046159 A	26 October 2016
		JP 2015091267 A	14 May 2015
		TW 201607558 A	01 March 2016
		WO 2011112978 A1	15 September 2011
		NZ 703481 A	26 February 2016
		JP 2016127867 A	14 July 2016
		KR 101644674 B1	02 August 2016
		EP 2764351 A4	27 May 2015
		US 2014242624 A1	28 August 2014
		AU 2012315956 A1	27 March 2014
		JP 2014531596 A	27 November 2014
		CA 2848520 A1	04 April 2013
		WO 2013049410 A1	04 April 2013
		AU 2012315956 B2	21 January 2016
		HK 1201153 A1	28 August 2015
		EP 2764351 A1	13 August 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/109807

A. 主题的分类

A61K 47/42(2017.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/30(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, A61P, C07K

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))

DWPI, VEN, CNKI, CNABS, ISI Web of Knowledge, Google, PubMed; 江苏恒瑞医药股份有限公司, 抗体药物偶联物, 抗体-药物偶联物, 结合剂-药物缀合物, 纯化, 分子排阻, 空间排阻, 凝胶色谱, 尺寸排阻色谱, 分子筛, 超滤, SEC, size exclusion chromatography, G200, superdex, sephadex, antibody drug conjugate, ADC, purify, ultra-filtration, UF, 梁金栋, 蒋贵阳, 李昂, 叶鑫, 许建烟

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 1993146 A (健泰科生物技术公司) 2007年 7月 4日 (2007 - 07 - 04) 实施例3-4	1-12
X	CN 103068406 A (基因泰克公司) 2013年 4月 24日 (2013 - 04 - 24) 实施例8	1-12
X	CN 104936621 A (辉瑞公司) 2015年 9月 23日 (2015 - 09 - 23) 实施例14	1-12
X	CN 101784550 A (赛诺菲-安万特) 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21) 说明书第238段, 第244-245段	1-12
X	WO 9205200 A1 (CHEMEX PHARMACEUTICALS, INC.) 1992年 4月 2日 (1992 - 04 - 02) 实施例1	1-12
A	WO 2015113476 A1 (上海恒瑞医药有限公司等) 2015年 8月 6日 (2015 - 08 - 06) 全文	1-12

☒ 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

2017年 2月 8日

国际检索报告邮寄日期

2017年 3月 6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

武雪梅

电话号码 (86-10)62414290

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 102971012 A (伊缪诺金公司) 2013年 3月 13日 (2013 - 03 - 13) 全文	1-12
A	CN 103858003 A (西雅图基因公司) 2014年 6月 11日 (2014 - 06 - 11) 全文	1-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/109807

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	1993146	A	2007年 7月 4日	ZA	200610159	B	2009年 10月 28日
				ZA	200610159	A	2009年 10月 28日
CN	103068406	A	2013年 4月 24日	EP	2579897	A1	2013年 4月 17日
				JP	2013534520	A	2013年 9月 5日
				CA	2799540	A1	2011年 12月 15日
				MX	2012013868	A	2013年 1月 24日
				AU	2011265054	A1	2012年 11月 15日
				RU	2012156248	A	2014年 7月 20日
				US	9000130	B2	2015年 4月 7日
				KR	20130087382	A	2013年 8月 6日
				SG	10201600791T	A	2016年 3月 30日
				MX	336540	B	2016年 1月 22日
				AU	2011265054	B2	2016年 9月 15日
				SG	185428	A1	2012年 12月 28日
				US	2011301334	A1	2011年 12月 8日
				AU	2016256788	A1	2016年 12月 1日
				WO	2011156328	A1	2011年 12月 15日
				US	2014288280	A1	2014年 9月 25日
CN	104936621	A	2015年 9月 23日	CA	2890256	A1	2014年 5月 15日
				MX	2015005582	A	2015年 8月 14日
				AU	2013343111	A1	2015年 5月 14日
				WO	2014072888	A1	2014年 5月 15日
				EP	2916875	A1	2015年 9月 16日
				US	2015266962	A1	2015年 9月 24日
				HK	1214161	A1	2016年 7月 22日
				PE	08912015	A1	2015年 6月 11日
				IL	238566	A	2015年 6月 30日
				PH	12015500977	A1	2015年 7月 13日
				SG	11201503431T	A	2015年 5月 28日
				JP	2016503295	A	2016年 2月 4日
				KR	20150060980	A	2015年 6月 3日
				IL	238566	D0	2015年 6月 30日
CN	101784550	A	2010年 7月 21日	EA	201070163	A1	2010年 8月 30日
				HK	1144289	A1	2015年 4月 17日
				TW	I500618	B	2015年 9月 21日
				BR	PI0814267	A2	2015年 3月 31日
				NZ	582679	A	2012年 4月 27日
				AT	530553	T	2011年 11月 15日
				PA	8790201	A1	2009年 2月 9日
				JP	5551070	B2	2014年 7月 16日
				US	8404678	B2	2013年 3月 26日
				GT	201000008	A	2012年 3月 26日
				DK	2170890	T3	2012年 2月 27日
				AR	067575	A1	2009年 10月 14日
				CA	2693551	C	2016年 9月 20日
				US	2010316656	A1	2010年 12月 16日
				SI	2170890	T1	2012年 2月 29日
				CN	101784550	B	2014年 6月 11日
				ES	2435779	T3	2013年 12月 23日
				PT	2170890	E	2012年 2月 3日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/109807

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)
		EC SP109875 A	2010年 2月 26日
		HR P20120067 T1	2012年 2月 29日
		CY 1112278 T1	2015年 12月 9日
		IL 203318 A	2016年 8月 31日
		EP 2019104 B1	2013年 9月 4日
		DK 2019104 T3	2013年 12月 16日
		PE 08892009 A1	2009年 8月 6日
		RS 52245 B	2012年 10月 31日
		CA 2693551 A1	2009年 2月 5日
		UA 98153 C2	2012年 4月 25日
		EA 019938 B1	2014年 7月 30日
		EP 2170890 A2	2010年 4月 7日
		JP 2010533703 A	2010年 10月 28日
		WO 2009016516 A8	2009年 4月 16日
		AU 2008281439 B2	2013年 2月 7日
		PT 2019104 E	2013年 12月 3日
		KR 20100063021 A	2010年 6月 10日
		KR 101627871 B1	2016年 6月 7日
		CR 11225 A	2010年 6月 23日
		ES 2376026 T3	2012年 3月 8日
		TW 200922598 A	2009年 6月 1日
		EP 2019104 A1	2009年 1月 28日
		JO 2744 B	2014年 3月 15日
		DO P2010000014 A	2010年 2月 15日
		PE 05902013 A1	2013年 5月 22日
		TN 2010000002 A1	2011年 9月 26日
		AU 2008281439 A1	2009年 2月 5日
		CO 6290692 A2	2011年 6月 20日
		WO 2009016516 A3	2009年 6月 11日
		SI 2019104 T1	2013年 12月 31日
		MY 151245 A	2014年 4月 30日
WO	9205200 A1	1992年 4月 2日	无
WO	2015113476 A1	2015年 8月 6日	CA 2937561 A1 2015年 8月 6日
			CN 105636591 A 2016年 6月 1日
			AU 2015210578 A1 2016年 8月 25日
			TW 201609133 A 2016年 3月 16日
			EP 3100731 A1 2016年 12月 7日
			US 2017002090 A1 2017年 1月 5日
			KR 20160111964 A 2016年 9月 27日
CN	102971012 A	2013年 3月 13日	JP 5932672 B2 2016年 6月 8日
			US 2011256153 A1 2011年 10月 20日
			JP 2013524777 A 2013年 6月 20日
			CA 2792618 A1 2011年 9月 15日
			AU 2015246118 A1 2015年 11月 12日
			SG 183542 A1 2012年 10月 30日
			US 2016326258 A1 2016年 11月 10日
			RU 2012139045 A 2014年 4月 20日
			MX 338932 B 2016年 5月 6日
			TW 201206481 A 2012年 2月 16日
			US 8765917 B2 2014年 7月 1日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/109807

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 2011226672 B2	2015年 7月 23日
		US 2013295104 A1	2013年 11月 7日
		US 9346887 B2	2016年 5月 24日
		EP 2544719 A1	2013年 1月 16日
		MX 2012010514 A	2013年 3月 20日
		KR 20150021112 A	2015年 2月 27日
		SG 10201501803Y A	2015年 5月 28日
		EP 2544719 A4	2013年 10月 9日
		CN 102971012 B	2016年 5月 4日
		KR 20130016272 A	2013年 2月 14日
		AR 080513 A1	2012年 4月 11日
		AU 2011226672 A1	2012年 9月 27日
		NZ 602176 A	2015年 1月 30日
		CN 106046159 A	2016年 10月 26日
		JP 2015091267 A	2015年 5月 14日
		TW 201607558 A	2016年 3月 1日
		WO 2011112978 A1	2011年 9月 15日
		NZ 703481 A	2016年 2月 26日
		JP 2016127867 A	2016年 7月 14日
		KR 101644674 B1	2016年 8月 2日
CN 103858003 A	2014年 6月 11日	EP 2764351 A4	2015年 5月 27日
		US 2014242624 A1	2014年 8月 28日
		AU 2012315956 A1	2014年 3月 27日
		JP 2014531596 A	2014年 11月 27日
		CA 2848520 A1	2013年 4月 4日
		WO 2013049410 A1	2013年 4月 4日
		AU 2012315956 B2	2016年 1月 21日
		HK 1201153 A1	2015年 8月 28日
		EP 2764351 A1	2014年 8月 13日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)