(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 2017/107914 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 45/06 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/111264

(22) 国际申请日: 2016 年 12 月 21 日 (21.12.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510958988.7 2015 年 12 月 21 日 (21.12.2015) CN
201510959364.7 2015 年 12 月 21 日 (21.12.2015) CN

(71) 申请人: 合肥立方制药股份有限公司 (HEFEI LIFEON PHARMACEUTICAL CO.,LTD.) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市长江西路 669 号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。

(72) 发明人: 张美 (ZHANG, Mei); 中国安徽省合肥市望江西路 522 号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。 季俊虬 (JI, Junqiu); 中国安徽省合肥市望江西路 522 号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。 高美华 (GAO, Meihua); 中国安徽省合肥市望江西路 522 号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。 陈军 (CHEN, Jun); 中国安徽省合肥市望江西路 522 号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司 (NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市西城区金融大街 27 号投资广场 A 座 1802, Beijing 100033 (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))。
— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: DRUG DESIGN METHOD, OBTAINED DRUG AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称 : 一种药物设计方法和获得的药物及其应用

(57) Abstract: Provided is a drug system design method, comprising selecting a target portion specifically binding a target of interest, and connecting the target portion to a biologically active portion and/or connecting the target portion to a biologically inert portion. Also provided are a test kit, a drug kit or a pharmaceutical composition including a biologically inert drug comprising the target portion and the biologically inert portion and a biologically active drug comprising the target portion and the biologically active portion, wherein the biologically inert drug and the biologically active drug target a same target. Also provided is a method for using the drugs or the pharmaceutical composition to treat diseases such as those related to ED-B.

(57) 摘要: 本发明提供了药物体系设计方法，包括选择特异性结合感兴趣靶的靶向部分；将靶向部分与生物活性部分连接；和/或将靶向部分与生物惰性部分连接。本发明还提供了试剂盒、药盒或药物组合物，包含包括靶向部分和生物惰性部分的生物惰性药物和包括靶向部分和生物活性部分的生物活性药物，其中所述生物惰性药物与所述生物活性药物能够靶向相同靶。本发明还提供了使用所述药物或药物组合物治疗疾病例如与 ED-B 相关的疾病的方法。

WO 2017/107914 A1

一种药物设计方法和获得的药物及其应用

发明领域

本发明涉及药物设计开发领域和药物制剂领域，特别涉及与 ED-B 相关疾病的药物设计开发领域，还涉及药物以及治疗应用。

发明背景

药物进入人体内能够发挥活性作用的器官、组织、细胞和生物大分子及其特定的药物结合位点，分别称为靶器官、靶组织、靶细胞和靶点。靶点可以为蛋白质、核酸或其他物质，包括基因位点、受体、酶、离子通道、核酸等生物大分子，一般具有重要的生理或病理功能。药物能够特异性的作用于靶点，但是部分药物靶点分布在非预期的药物作用器官或组织上，或者脱落在血液中，会与药物竞争性结合致使部分药物不能与靶器官上的靶点结合，这会影响药效的发挥，一方面消耗药物，另一方面会产生毒副作用。另外，从组织中脱落的靶点蛋白游离在血液或组织液中，会影响药物的代谢动力学。靶点的上述特点会引起一些列的问题，比如：给药量增大、个体差异大、药物毒副作用增大、治疗窗较窄的药物会无效或产生难以耐受的毒性等。

在抗体药物或抗体相关药物开发过程中，药物脱靶现象以及非靶器官靶点带来的副作用更加明显。寄予厚望的抗肿瘤抗体药物虽然给肿瘤患者带来希望，但效果仍不理想。如针对人类表皮生长因子受体 2（HER2）开发的抗体药物，如赫赛汀，在乳腺癌治疗中取得了良好的效果, 但由于 HER-2 蛋白在心肌横小管上有分布，长期使用有可能增加心血管毒性，引起充血性心衰，轻度甚至中至重度的心功能减退（Nemeth, B. T., et al. (2016). Br J Pharmacol.doi: 10.1111/bph.13643），这是药物靶点蛋白分布的器官特异性不高产生的副作用。而靶向 HER2 的抗体偶联化药（ADC）药物，如 T-DM1 （曲妥珠单抗偶联美登木素 DM1），携带高效的细胞毒类药物，能抑制微管蛋白聚合和微管动力学，但同样由于 HER2 在心脏组织的分布会导致心脏毒性，并且 T-DM1 在非病灶部位的代谢也会产生肝脏毒性等（Yan, H., et al. (2016). Mol Cancer Ther 15(3)：480-490）。针对纤维连接蛋白的额外结构域 B（ED-B）

开发的抗体药物，如 L19-IL2，通过静脉给药途径药效不明显（Eigentler, T.K., et al.,(2011)Clin Cancer Res,17(24): 7732-42），而通过肿瘤病灶局部给药则效果显著（Weide, B., et al.，(2014)Cancer immunology research **2**(7): 668-678）。

发明概述

在一个方面，本发明提供了一种试剂盒或药盒，其包含本发明所述的生物惰性药物和生物活性药物，其中

- 所述生物活性药物包括靶向部分和生物活性部分；

- 所述生物惰性药物包括靶向部分和生物惰性部分，其中所述生物惰性药物与所述生物活性药物能够靶向相同靶，其中所述生物惰性药物与所述生物活性药物的靶向部分可以相同或不同。

在一个方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明所述的生物惰性药物和生物活性药物以及任选存在的药学可接受的载体和/或赋形剂。

在一个实施方案中，所述靶向部分选自配体、受体、抗体或抗体片段，例如完整抗体（如单克隆抗体、嵌合抗体等）、CDR 区、可变区、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

在一个实施方案中，所述试剂盒、药盒或药物组合物用于治疗与纤维连接蛋白 ED-B 相关的疾病，例如实体肿瘤。

在一个实施方案中，所述靶向部分为靶向纤维连接蛋白（Fibronectin，FN）额外结构域 B（Extradomain B，ED-B）的抗体或其片段，例如 CGS-1、CGS-2、L19 或 B5 抗体或其抗体片段。

在一个实施方案中，所述生物活性部分选自细胞毒素、细胞因子、放射性同位素、化学药物、具有生物活性的抗体恒定区和具有生物活性的细胞。

在一个实施方案中，所述生物惰性部分选自抗体恒定区、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体。

在一个实施方案中，所述生物活性药物是 SEQ ID NO：6 所示的多肽。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物是 SEQ ID NO：5 所示的多肽或其二聚体。

在一个实施方案中，所述试剂盒或药盒包含的生物惰性药物与所述生物活性药物混合制成单一制剂或组合物，或者所述生物惰性药物与所述生物活性药物分别制成独立制剂或组合物。

在一个方面，本发明提供了一种生物惰性药物，其包括靶向部分和生物惰性部分，任选其中所述靶向部分可选自配体、受体、抗体或其片段。

在一个实施方案中，所述靶向部分为靶向纤维连接蛋白 ED-B 的抗体或其片段，例如 CGS-1、CGS-2、L19 或 B5 抗体或其片段，例如 SEQ ID NO：3 所示的多肽。

在一个实施方案中，所述生物惰性部分选自抗体恒定区、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体，例如 SEQ ID NO：4 所示的多肽。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物是 SEQ ID NO：5 所示的多肽或其二聚体。

在一个方面，本发明提供了一种治疗疾病的方法，包括给予需要治疗的对象施用本发明所述的生物惰性药物和生物活性药物或本发明所述的药物组合物、或使用本发明所述的试剂盒或药盒。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物与生物活性药物同时施用，或者顺序施用，例如间隔 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、40 分钟、50 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时或更长时间。

在一个实施方案中，所述方法包括施用生物惰性药物，然后施用生物活性药物。

在一个实施方案中，所述疾病是与纤维连接蛋白 ED-B 相关的疾病，例如实体肿瘤。

在一个方面，本发明提供了本发明所述的生物惰性药物和/或生物活性药物在制备用于治疗哺乳动物对象例如人的疾病的试剂盒或药盒或药物组合物中的应用。

在一个实施方案中，所述疾病是与纤维连接蛋白 ED-B 相关的疾病，

例如实体肿瘤。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物与所述生物活性药物混合制成单一制剂或组合物，或者所述生物惰性药物与所述生物活性药物分别制成独立制剂或组合物。

在一个方面，本发明提供了一种生物活性药物和/或生物惰性药物用于治疗例如与 ED-B 有关的疾病，其中所述生物活性药物包括特异性结合 ED-B 的靶向部分和生物活性部分，所述生物惰性药物包括靶向部分和生物惰性部分，所述治疗包括给予患有所述疾病的对象施用本发明所述的生物活性药物和生物惰性药物，任选其中所述生物惰性药物同时或先于生物活性药物施用，例如间隔 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、40 分钟、50 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时或更长时间。

在一个实施方案中，所述靶向部分选自配体、受体、抗体或其片段，例如完整抗体（如单克隆抗体、嵌合抗体等）、CDR 区、可变区、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

在一个实施方案中，所述所述生物活性部分选自选自细胞毒素、细胞因子、放射性同位素、化学药物、具有生物活性的抗体恒定区和具有生物活性的细胞。

在一个实施方案中，所述生物惰性部分选自抗体恒定区、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体，例如 SEQ ID NO：4 所示的多肽。

在一个方面，本发明提供了本发明所述的生物惰性药物和/或生物活性药物在制备用于疾病的试剂盒、药盒或药物组合物中的应用。

在一个实施方案中，所述疾病是与纤维连接蛋白 ED-B 相关的疾病，例如实体肿瘤。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物与所述生物活性药物混合制成单一制剂或组合物，或者所述生物惰性药物与所述生物活性药物分别制成独立制剂或组合物。

在一个方面，本发明提供了一种药物设计方法，包括：

- 选择特异性结合感兴趣靶的靶向部分；

- 将靶向部分与生物活性部分连接，直接连接或通过接头连接，获得生物活性药物；和/或

- 将靶向部分与生物惰性部分连接，直接连接或通过接头连接，获得生物惰性药物。

在一个实施方案中，所述方法用于设计治疗与 ED-B 相关的疾病的药物，包括：

- 将特异性结合 ED-B 的靶向部分例如抗体的抗原结合部分与生物活性部分连接；和/或

- 将特异性结合 ED-B 的靶向部分例如抗体的抗原结合部分与生物惰性部分连接。

在一个实施方案中，所述抗原结合部分是 B5 抗体的 scFv，例如 SEQ ID NO：3 所示的多肽。

附图简述

图 1：B5-Fc 融合蛋白二聚体示意图。

图 2：B5-IL2 融合蛋白示意图。

图 3：ED-B 在对象血液中的表达。

发明详述

除非特别指出，本文使用的科学和技术术语应具有本领域技术人员通常已知的含义。另外除非特别需要，则单数术语应包括复数，复数术语应包括单数。前述技术和方法通常根据本领域熟知的及在本说明书引用的参考文献所述的常规方法进行。见例如并入作参考的 Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001))所述。本文引用的所有参考文献，包括专利、专利申请、文章、教科书等及其中引用的参考文献在此均以其全部并入本文作参考。

本发明涉及一种提高药物特异性的药物体系开发方法、相应的药物和药物组合物、试剂盒或药盒以及相关疾病治疗方法。本发明进一步提高药物的特异性，提高药物在病灶器官或组织的分布而降低在正常组织的分布，可以降低对非靶器官或非靶组织的伤害，也可以显著提高药物

疗效，同时减少药物的浪费。

在一个方面，本发明通过封闭或消除非给药目标组织的靶点实现精准给药。本发明的高特异性药物体系、药物和配方开发是设计一种新的基本无生物活性药物代替一部分有生物活性药物，分布在非病灶靶点上，减少生物活性药物的用量或者提高生物活性药物在病灶部位的分布比例，从而降低药物毒副作用或提高药效。在另一方面，本发明的高特异性药物体系、药物和配方也可用于靶主要或仅存在于患病部位，通过先给予生物惰性药物代替生物活性药物分布在已表达的病灶靶点上，再给予生物活性药物分布于新生的病灶靶点。

本发明所述的药物可以是核酸类药物，多肽类药物，蛋白类药物，或者是生物药物与化学药物的偶联物。药物进入人体内能够发挥活性作用的器官、组织、细胞和生物大分子及其特定的药物结合位点，分别称为靶器官、靶组织、靶细胞、靶分子和靶点。靶分子可以为蛋白质、核酸或其他物质，包括基因位点、受体、酶、离子通道、核酸等生物大分子，一般具有重要的生理或病理功能。

本发明所述“封闭或消除”非靶器官上的药物靶点，可以是部分封闭或部分消除，也可能会对靶器官、靶组织、病灶等部位产生一定的封闭或消除作用。由于药物靶点在病灶部位的分布密度或浓度较正常组织高，而正常组织上药物靶点分布较少或很难检测到，或者由于血液中游离的靶点比组织中的靶点更容易与药物结合，因此给予生物惰性药物对正常组织或血液中靶点的作用比对病灶中的靶点更显著。

本发明所述的高特异性药物体系包括生物惰性药物和生物活性药物，其中所述生物惰性药物与所述生物活性药物能够靶向同一个靶点，例如具有相同的靶向部分。本发明所涉及的高特异性药物体系开发方法，也包含药物设计方法，药物伴侣的设计方法，药物及药物伴侣的组合使用方法，这些方法可单独使用，也可组合使用。

本发明所述生物活性是指具有生物代谢或生理调节功能的生物效应或治疗作用，如促进消化吸收，促进免疫调节、激素调节、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、细胞毒性、降血压、降血脂等活性。

本发明所述的“生物活性药物”或“具有生物活性的药物”具有相同的含义，是指在生物体内尤其是指在人体内具有生物活性的物质，能够

与人体内细胞、蛋白等相互作用并能影响机体生理、生化和病理过程的、用于预防、诊断、治疗疾病。

本发明所述生物惰性，指不具有上述生物活性或具有微弱的生物活性。本发明所述的“生物惰性药物”或“具有生物惰性的药物”具有相同含义，是指在生物体内尤其是指在人体内基本无生物活性的物质，虽然能够与人体内细胞、蛋白等产生结合作用，但不能显著影响机体生理、生化和病理过程，或治疗作用很弱，主要用于辅助生物活性药物提高药效或降低毒副作用等目的。所述的生物惰性药物也可以产生一定的生物效应，比如具有较弱的 ADCC 活性或 CDC 活性，但生物惰性药物与生物活性药物具有不同的药物活性，或生物惰性药物的药物活性显著低于生物活性药物。

生物惰性药物是相对生物活性药物而言，基本无生物活性主要指生物惰性药物不具备生物活性药物的药效，或者在同等给药剂量下药效较生物活性药物可忽略不计。但不排除生物惰性药物可以有其他功能或生理活性，例如生物惰性药物可以有荧光，可以阻断靶点与生物活性药物的结合，可以与其他配体或受体结合。特别地，生物惰性药物不具有对应活性药物的生物活性或单独使用不具有治疗作用。在本发明中，生物惰性药物伴随生物活性药物使用，也可称为药物伴侣。本发明所述的“药物伴侣”是指与活性药物识别相同的靶点并伴随活性药物使用的辅助药物或辅助分子，在本发明中是指生物惰性药物。

具有生物活性的药物可识别特定靶点并与之结合，产生药物的治疗作用。生物活性药物的活性部分（例如为生物活性分子）可产生希望的治疗作用，可以是例如细胞毒素，细胞因子，放射性同位素，化学药物，具有生物活性的抗体恒定区，或具有生物活性的细胞如 T 淋巴细胞。

如本文使用，“治疗”是获得有益的或希望的结果包括临床结果的方法。对于本发明而言，有益的或希望的临床结果包括但不限于如下的一或多种：缓解疾病所导致的一或多个症状，减轻疾病程度，稳定疾病(例如预防或延缓疾病恶化)，预防或延缓疾病传播(例如转移)，预防或延缓疾病复发，延缓或减慢疾病进展，改善疾病状态，疾病(部分或全部)减轻，减少治疗疾病需要的一或多种其它药物的剂量，延缓疾病进展，增加或改善生活质量，增加体重，和/或延长存活。“治疗”还涵

盖减少癌症的病理学结果(例如肿瘤体积)。

在一个方面，本发明涉及一种药物设计和开发方法，包括根据靶点选择特异性结合该靶点的靶向部分，基于该靶向部分产生具有生物活性的药物，发挥药物治疗作用，同时基于该靶向部分或靶点产生具有生物惰性的药物，发挥靶点屏蔽作用或者发挥或促进靶点清除，如靶点降解、靶点被细胞内吞、靶点进入消化系统等。

在一个实施方案中，本发明通过封闭或消除非病灶如正常组织或血液中的靶点（例如蛋白）实现对病灶的精准给药。屏蔽和消除靶的方法有多种，例如使用具有生物惰性的药物和具有生物活性的药物的组合物或药方，其中具有生物惰性的药物与具有生物活性的药物能够靶向同一个靶点。具有生物活性的药物可识别特定靶点并与之结合，产生治疗作用，而具有生物惰性的药物可识别特定靶点并与之结合，能屏蔽靶点或引导靶点降解，从而减少可与生物活性药物结合的靶点，例如尤其是减少在正常组织中分布的可与生物活性药物结合的靶点，也包括减少在血液中分布的可与生物活性药物结合的靶点。

或者，使用生物活性药物和生物惰性药物，其中生物活性药物可发挥生物治疗作用，而生物惰性药物发挥封闭或消除非靶器官上的靶点（例如靶蛋白）的作用，所述的消除靶点可以是蛋白水解消除，也可以是加快靶点被细胞内吞的过程。

在本发明中，生物惰性药物与生物活性药物可以具有同一母核，可以具有相同靶向部分例如识别同一抗原表位，可以竞争同一靶点，可以竞争同一靶蛋白或蛋白复合物。

在一个实施方案中，本发明提供了药物设计方法，包括：

- 选择特异性结合感兴趣靶的靶向部分；

- 将靶向部分与生物活性部分连接，例如直接共价连接或通过接头间接连接，获得生物活性药物；和/或

- 将靶向部分与生物惰性部分连接，例如直接共价连接或通过接头间接连接，获得生物惰性药物。

本发明所述靶可以是在特定的患病器官、组织和/或细胞上表达或存在的生物分子，例如受体、离子通道或其它任何适合的表面分子。在一个实施方案中，所述靶可以是疾病的特异性生物标记物。在一个实施

方案中，所述靶不仅在患病器官、组织和/或细胞上表达或存在，也在正常器官、组织和/或细胞上表达或存在或者在体液例如血液中存在。在一个实施方案中，本发明所述靶可包括例如具有促进新生血管生成作用的受体酪氨酸激酶类靶点，如表皮生长因子受体（EGFR）、血管内皮细胞生长因子受体（VEGFR）、血小板衍生生长因子受体（PDGFR）、成纤维细胞生长因子受体（FGFR）等，其在部分正常组织或血管壁中也有表达；以及包括例如在肿瘤或炎症组织细胞膜或细胞外基质中特异性高表达的蛋白或肿瘤标志物，如纤维连接蛋白(fibronectin，Fn)的额外结构域 A（ED-A)、癌胚抗原（CEA）、糖蛋白抗原（如 MUC16/CA125 、MUC1/CA 15-3)、上皮细胞粘附分子（EpCAM）和癌胚抗原相关细胞黏附分子（CEACAM1)等。

在一个实施方案中，本发明所述靶包括但不限于 HER2、ED-B、ED-A、EGFR、VEGFR、PDGFR、FGFR、CEA、糖蛋白抗原（如 MUC16/CA125 、MUC1/CA 15-3)、EpCAM 和 CEACAM1。

本发明所述靶向部分可以是本领域已知的或将来鉴别的能够特异性靶向（例如识别和/或结合）感兴趣靶的分子或部分，例如抗体、配体、受体或其部分。在一个实施方案中，靶向部分是抗体或其可以结合抗原的片段，例如完整抗体（如单克隆抗体、嵌合抗体等）、CDR 区、可变区、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。常见的靶向部分如 Wu, A. M. and P. D. Senter . Nat Biotechnol 23(9): 1137-1146(2005)中所述。

用语“线性抗体”通常是指在 Zapata et al., Protein Eng., 8(10)：1057-1062 (1995)中描述的抗体。这些抗体包含一对串联的 Fd 节段(VH-CH1-VH-CH1)，其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

木瓜蛋白酶消化抗体产生称作“Fab”片段的两个相同的抗原结合片段和剩余的“Fc”片段。Fab 片段由沿着 H 链的可变区结构域(V_H)的整个 L 链及一条重链的第一个恒定结构域(C_H1)组成。每个 Fab 片段关于抗原结合均是单价的，即其具有单一抗原结合位点。对抗体进行胰蛋白酶处理产生单一的大 $F(ab')_2$ 片段，其大致相应于两个二硫键连接的 Fab 片段，具有二价抗原结合活性，仍能交联抗原。Fab’片段与 Fab 片

段不同，在 C_H1 结构域的羧基末端具有另外几个残基，包括来自抗体铰链区的一或多个半胱氨酸。

“Fv”是最小抗体片段，其含有完整的抗原识别和抗原结合位点。这个片段由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的紧密非共价缔合的二聚体组成。这两个结构域的折叠产生 6 个超变环(各来自 H 和 L 链的 3 个环)，贡献抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体的抗原结合特异性。单一的可变结构域(或者包含仅三个特异于抗原的 CDR 的一半 Fv)也具有识别和结合抗原的能力。

“单链 Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”，是包含连接为单一多肽链的 V_H 和 V_L 抗体结构域的抗体片段。优选地，sFv 多肽进一步包含在 V_H 与 V_L 结构域之间的多肽接头，其使得 sFv 形成用于抗原结合所需的结构。关于 sFv 的综述，见 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。

术语“双抗体”是指小抗体片段，通过在 V_H 与 V_L 结构域之间用短接头(大约 5-10 个残基)构建 sFv 片段而制备，由此获得 V 结构域的链间而不是链内配对，产生二价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv 片段的异源二聚体，其中两个抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同的多肽链上。参见例如 EP 404,097、WO 93/11161 及 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)。

本发明所述靶向部分可与生物活性部分和/或生物惰性部分直接共价连接或通过接头间接连接。本领域已知将靶向部分与生物活性部分或生物惰性部分进行连接的方法。本领域技术人员根据本领域技术知识也可以确定将所述靶向部分与生物活性部分或生物惰性部分直接共价连接或通过接头（例如 SEQ ID NO：7 或 8 所示的接头）连接，以实现靶向部分的靶向功能（例如特异性结合感兴趣的靶）和/或生物活性部分的治疗功能，例如杀伤癌细胞，或生物惰性部分的功能，例如屏蔽靶点或降解靶点。所述接头可以有多种设计方式，常见的短肽接头参见 Chen, X., et al. Adv Drug Deliv Rev 65(10): 1357-1369(2013)。在一个实施方案中，本发明所述接头是不超过 50 个氨基酸的短肽。在一个实施方案中，

本发明所述接头是 GS 接头例如$(GGGGS)_n$（其中 n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10），$(Gly)_n$ 接头（其中 n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）例如$(Gly)_6$ 或$(Gly)_8$，$(EAAAK)_n$ 接头（其中 n=1、2 或 3），$[A(EAAAK)_nA]_m$ 接头（其中 n=2、3、4 或 5，m=1 或 2），$(Ala\text{-}Pro)_n$ 接头（其中 n=5-17），或$(XP)_n$ 接头（其中 X 表示任意氨基酸，优选 Ala、Lys 或 Glu；n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）。

在一个实施方案中，生物活性药物是抗体恒定区置换为能够产生生物活性、治疗作用或药物效应的部分的抗体，所述产生生物活性、治疗作用或药物效应的活性部分可以选自细胞毒素、细胞因子（如 IL-2、TNFα、IL-12）、放射性同位素、化疗药物和偶联化学药物。

在一个实施方案中，所述生物惰性部分选自抗体恒定区例如 IgG4 Fc、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体。

在一个实施方案中，所述靶向部分是抗体可变区，生物惰性药物是带有抗体恒定区的完整抗体，而生物活性药物是抗体的恒定区置换为具有药物效应的部分的抗体，所述具有药物效应的部分可以选自细胞因子（如 IL2、TNFα、IL12）、放射性同位素和偶联化学药物。

在一个实施方案中，所述靶向部分是抗体可变区，所述生物惰性部分是 IgG4 抗体的恒定区，而生物活性部分是 IL-2。

在一个实施方案中，所述靶向部分是抗体可变区，所述生物惰性部分是 IgG4 抗体恒定区，而所述生物活性部分包含偶联了强效抗微管药物 DM1 的 IgG4 抗体恒定区。

在一个实施方案中，本发明提供了一种用于治疗与 ED-B 相关的疾病的药物设计方法，包括：

- 将 ED-B 特异性抗体的抗原结合部分与生物活性部分连接，例如直接共价连接或通过接头（例如 SEQ ID NO：7 或 8 所示的接头）间接连接；和/或

- 将 ED-B 特异性抗体的抗原结合部分与生物惰性部分连接，例如直接共价连接或通过接头（例如 SEQ ID NO：7 或 8 所示的接头）间接连接。

纤维连接蛋白（fibronectin, FN）是一种多功能的糖蛋白，由上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、肝细胞、蜕膜细胞及绒毛外滋养细胞等表

达。FN 的基因约有 75kb，约含 50 个外显子，相对分子质量约 250kDa，主要由 I，II，III 型三类同源重复的球形结构域单元构成，各结构域之间由对胰蛋白酶敏感的肽链连接。ED-B（Extradomain B）是包含在 FN 的 III 型重复序列中，由单个外显子编码的包含 91 个氨基酸的完整结构域。几乎所有的人类实体肿瘤，其原发病灶及转移位点都能检测到含有 ED-B 的 FN（FN(B+)）的高表达，因此 FN(B+)被作为肿瘤新生血管的标志物(Carnemolla, Balza et al. (1989). J Cell Biol. 108: 1139-1148.)。

“ED-B”是指含有 ED-B 氨基酸序列的蛋白或其同源物，其中 ED-B 氨基酸序列例如具有 SEQ ID NO：10 所示氨基酸序列或与 SEQ ID NO：10 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列相同性的序列。本发明人在之前的研究中发现血液中含有 ED-B 蛋白并且在组织增生例如肿瘤患者的血液中 ED-B 蛋白水平与正常人或者未患肿瘤的对象相比升高（PCT/CN2015/094727，该专利申请以其全文并入本文参考）。

L19-IL2 药物 I 期临床药物代谢实验数据表明：1）在同一个治疗周期内连续给药时，在相同给药剂量下血液中的 L19-IL2 浓度（单位剂量的浓度-时间曲线下面积，AUC/D）会逐次降低；2）在相同给药次数时，其血液中的 L19-IL2 浓度（单位剂量的浓度-时间曲线下面积，AUC/D）会随给药剂量的增加而降低 (Johannsen, Spitaleri et al. (2010).Eur J Cancer. 46: 2926-2935)。不受任何理论约束，推测：1）当首次给药时，血液中大量存在 ED-B 抗原，L19-IL2 会与血液 ED-B 结合，L19 抗体的亲和力较高而长期存在于血浆中，并且与 L19-IL2 结合的 ED-B 会与 L19-IL2 一起代谢而从血液中被清除；当同一治疗周期内再次给药时，由于血液 ED-B 含量降低，从而使与之结合的 L19-IL2 减少，游离的 L19-IL2 则可以快速进入实体肿瘤组织，因此检测到的血药浓度（AUC/D）较前一次给药时低。当给药剂量较低时，L19-IL2 与血液中 ED-B 充分结合而游离 L19-IL2 较少，但随着 L19-IL2 剂量的加大，使之与 ED-B 的结合接近饱和或过饱和，则血液中游离的 L19-IL2 增加，游离的 L19-IL2 更容易进入实体肿瘤组织中，因此检测到的血液 L19-IL2 浓度（AUC/D）随剂量增加而降低。因此可通过给予较大剂量的生物惰性的 L19 抗体先与血液中的 ED-B 过饱和结合，然后给予含有 L19 抗体

识别结构的生物活性药物。

本发明所述与 ED-B 相关的疾病是指在患病的器官、组织和/或细胞存在和/或表达 ED-B 的疾病。

在一个实施方案中，本发明所述与 ED-B 相关的疾病是组织增生，包括例如乳腺增生，赘生物，良性肿瘤，恶性肿瘤或癌症例如选自各类鳞癌、腺癌或肉瘤。在一个实施方案中，本发明所述肿瘤是实体肿瘤，选自例如畸胎瘤，上消化道癌症例如食管癌、贲门癌、喉癌、胃癌，头颈癌，肝癌，胆道癌，胆囊癌，结肠癌，十二指肠癌，肺癌，膀胱癌，子宫颈癌，卵巢癌，子宫内膜癌，乳腺癌，黑色素瘤，胰腺癌，肾癌和前列腺癌。在一个实施方案中，所述肿瘤是畸胎瘤、鼻咽癌、食管癌、胃癌、肺癌或胰腺癌。在一个实施方案中，所述肿瘤是淋巴瘤。

在一个实施方案中，所述 ED-B 特异性抗体包括例如 CGS-1、CGS-2（PCT/GB97/01412；Nissim, Hoogenboom et al. (1994).EMBO J. 13: 692-698）、L19（Pini, Viti et al. (1998).J Biol Chem. 273: 21769-21776）、B5（CN201480001324.5；WO2014/194784）。在一个实施方案中，所述 ED-B 特异性抗体是 L19 或 B5 抗体。在一个实施方案中，所述 ED-B 特异性抗体的抗原结合部分是完整抗体、CDR 区、可变区、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

在一个实施方案中，所述生物活性部分选自细胞毒素、细胞因子、放射性同位素、化学药物、具有生物活性的抗体恒定区和具有生物活性的细胞。在一个实施方案中，所述生物活性部分是细胞因子，例如 IL-2，如 SEQ ID NO：9 所示的多肽。

在一个实施方案中，所述生物惰性部分选自抗体恒定区、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体。在一个实施方案中，所述生物惰性部分是抗体恒定区，例如 IgG4 抗体恒定区（IgG4 Fc），如 SEQ ID NO：4 所示的多肽。

本发明还提供了一种生物惰性药物的开发方法以及相应的生物惰性药物。本发明所述生物惰性药物不具有活性药物的治疗作用，或者具有治疗作用但与所述活性药物针对不同的适应症，更特别地，惰性药物不具有对应活性药物的生物活性。

生物惰性药物可以是在活性药物上修改，使其仅具备识别并结合靶点的作用，包括但不限于去除生物活性作用的结构、使生物活性作用部位突变失活、置换活性药物的生物活性部位、增加抑制生物活性作用的结构如通过化学修饰屏蔽药物的活性部位、或者融合基本无生物活性的蛋白形成空间位阻。

本发明所述的惰性药物（药物伴侣）需要与活性药物联合使用。靶向同一靶点的活性药物和药物伴侣可以制成单一制剂或组合物、或分别制成独立制剂或组合物，通过给予药物伴侣与特定靶点结合以封闭靶点或部分封闭靶点，通过给予活性药物靶向未被封闭的靶点或新产生的靶点，从而活性药物以更精准和/或更高比例到达病灶靶点。药物伴侣用于提高既有活性药物的安全性、有效性和/或靶向性。例如，生物惰性药物可与生物活性药物制成制剂，同时给药；生物惰性药物也可以成为药物配方中的一种辅料，其作用是与生物活性药物竞争结合血液中的游离的靶点或者其他正常组织中的靶点，同时也具有保护生物活性药物稳定的作用。

生物惰性药物可以在仅保留药物靶向结合部位的基础上如上所述被修改、修饰或置换药物活性结构，使既有活性药物变成惰性药物，例如使活性药物的原有活性下降 50%以上、90%以上、99%以上、99.9%以上。惰性药物与活性药物可以有相同的分子结构，例如相同结构占所述活性药物分子结构的比例大于 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、甚至大于 90%。特别地，二者主要是与靶点结合部位的分子结构高度相似，例如结合部位的相似比例达到 50%、60%、70%、80%、90%、95%、甚至 100%相同性。二者不仅能够结合到同一靶点分子，而且结合在靶点上的部位接近，甚至高度重叠，当惰性药物与相应靶点结合后形成空间位阻，使活性药物不能与惰性药物结合同一靶点。

具有生物惰性的药物可识别特定靶点并与之结合，能屏蔽靶点和/或促进靶点降解和/或维持生物活性药物稳定。生物惰性药物的惰性部分（也可称为生物惰性分子）可屏蔽靶点和/或引导靶点降解，可以是例如抗体恒定区，白蛋白，聚乙二醇，或核酸适配体。

具有生物惰性的药物可以为生物药物包括但不限于核酸类药物、多肽类药物、蛋白类药物，化学药物以及生物药物与化学药物的偶联化合

物。具有生物惰性的药物，包括但不限于抗体，抗体重组蛋白，具有生物活性的药物的类似物或修饰物，仅与具有生物活性的药物的靶点识别部分相同的生物惰性药物。

具有生物惰性的药物与具有生物活性的药物也可以不具有同一化学结构，也可以不具有同一母核。在一个实施方案中，生物惰性药物是核酸适配体，而生物活性药物是蛋白质。在一个实施方案中，生物惰性药物可基于具有靶向特异性的母核融合抗体的恒定区片段，或融合人白蛋白、聚乙二醇修饰、融合多肽片段或天然蛋白的结构域。

在一个实施方案中，本发明提供了 ED-B 蛋白相关药物的药物伴侣，例如 ED-B 蛋白的抗体在制备用于治疗哺乳动物例如人中肿瘤的试剂盒、药盒或药物组合物中的应用。在一个实施方案中，本发明涉及的药物伴侣是靶向纤维连接蛋白 ED-B 的抗体药物伴侣，基于以 L19 或 B5 抗体为母核的生物药物，在保留 L19 或 B5 抗体可变区的基础上，融合抗体恒定区结晶片段(FC)蛋白，形成药物伴侣 L19-或 B5-IgG4 Fc，并与 L19 或 B5 相关药物配伍给药。

本发明所涉及的高特异性药物体系、药物和药方的开发方法，不仅适合抗癌药物的开发，也适合自身免疫疾病的药物开发，也适合其他疾病的药物开发。

本发明还提供了通过上述方法产生的包含相应生物活性药物和/或生物惰性药物的试剂盒、药盒和药物组合物。

在一个方面，本发明还提供了一种包含生物惰性药物和生物活性药物的组合物，其中生物惰性药物与生物活性药物二者均具有相同的靶向部分，其中生物惰性药物由靶向部分和生物惰性部分经共价键结合组成，生物活性药物由靶向部分和生物活性部分经共价键结合组成。在一个实施方案中，所述生物惰性药物与生物活性药物的靶向部分为抗体或抗体片段。

在本发明中，试剂盒和药盒可互换使用，指包括本发明所述的生物惰性药物和生物活性药物的组合或本发明所述的药物组合物、或根据本发明所述方法获得的生物活性药物和生物惰性药物的组合或药物组合物、以及任选存在的施用药物的工具和/或其它所需试剂例如缓冲液、复性溶剂等的生产物品。

在一个方面，本发明提供了一种药物体系、试剂盒、药盒或药物组合物，其包含本发明所述的生物惰性药物和生物活性药物或通过本发明的方法获得的生物活性药物和生物惰性药物以及任选存在的施用工具、给药说明、药学可接受的载体和/或赋形剂，其中所述生物惰性药物与所述生物活性药物能够靶向相同靶点。在一个实施方案中，所述生物惰性药物与所述生物活性药物具有相同的靶向部分。

本发明所述的生物活性药物可识别并结合特定靶点以及产生治疗作用。在一个实施方案中，所述生物活性药物包括靶向部分和生物活性部分，其中靶向部分可识别并结合靶点，所述生物活性部分产生生物活性或治疗作用，例如已知有特定的作用靶点、治疗效果、适应症等的物质。

在一个实施方案中，所述靶向部分是可以特异性靶向感兴趣靶的分子例如抗体、配体、受体等或其部分。在一个实施方案中，所述靶向部分是完整抗体或其一部分或片段，例如 CDR 区、可变区、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

在一个实施方案中，所述生物活性部分选自细胞毒素、细胞因子（如 IL-2、TNFα、IL-12）、放射性同位素、化疗药物、化学药物、具有生物活性的抗体恒定区和具有生物活性的细胞。在一个特定的实施方案中，所述生物活性部分是细胞因子，例如 SEQ ID NO：9 所示的多肽。

本发明所述的生物惰性药物可识别并结合特定靶点以及能屏蔽靶点或促进靶点降解或促进靶点被细胞内吞、促进靶点进入消化系统等，从而减少可与生物活性药物结合的靶点，包括减少在正常组织中分布的可与生物活性药物结合的靶点，和减少在血液中分布的可与生物活性药物结合的靶点。特别地，生物惰性药物将血液中游离的蛋白靶点和正常组织中分布的蛋白靶点封闭或部分封闭，减少生物活性药物在非靶器官和非靶组织的结合，使生物活性药物可以更多的分布到靶器官和靶组织中，从而提高生物活性药物在病灶部位的效应或治疗效果，减少所述生物活性药物的用量，以减少药物的毒副作用，提高药物安全性；同时也具有保护生物活性药物稳定的作用。本发明的生物惰性药物本身不具有治疗作用，需要伴随生物活性药物组合使用。所述生物惰性药物改善生

物活性药物的代谢与分布，是生物活性药物的伴侣，也可称为药物伴侣。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物包括靶向部分和生物惰性部分。所述靶向部分可识别并结合靶点，生物惰性部分能屏蔽靶点或引导靶点降解。在一个实施方案中，所述生物惰性部分选自抗体恒定区、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体。在一个实施方案中，所述生物惰性部分是 IgG4 抗体恒定区，例如 SEQ ID NO：4 所示的多肽。

在一个实施方案中，本发明提供了一种用于治疗与 ED-B 相关的疾病例如肿瘤的药物体系、试剂盒、药盒或药物组合物，其包含：

- 生物活性药物，其包含与靶向 ED-B 的靶向部分连接的生物活性部分，例如直接共价连接或通过接头（例如 SEQ ID NO：7 或 8 所示的接头）间接连接，和

- 生物惰性药物，其包含与靶向 ED-B 的靶向部分连接的生物惰性部分，例如直接共价连接或通过接头（例如 SEQ ID NO：7 或 8 所示的接头）间接连接。

在一个实施方案中，所述靶向 ED-B 的靶向部分是 EB-D 抗体如 CGS-1、CGS-2、L19 抗体或 B5 抗体或其结合抗原的片段或部分，例如 CDR 区、可变区、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

在一个实施方案中，所述靶向 ED-B 的靶向部分是 B5 抗体的单链 Fv（scFv），其中所述 B5 抗体轻链（VL）和重链（HL）通过适当接头例如$(G_4S)_3$、SEQ ID NO：7 或 8 所示的接头连接。

在一个实施方案中，所述生物活性部分是 IL-2 或其活性片段，如 SEQ ID NO：9 所示的多肽。

在一个实施方案中，所述生物惰性部分是 IgG4 Fc 区，如 SEQ ID NO：4 所示的多肽。

在一个实施方案中，所述生物活性药物是包含 SEQ ID NO：6 所示氨基酸序列的多肽。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物是包含 SEQ ID NO：5 所示氨基酸序列的多肽或其二聚体。

在一个实施方案中，所述生物活性药物和生物惰性药物可分别配制为独立制剂或组合物，或者混合配制为单一制剂或组合物。在单一制剂

或组合物的情况中，所述生物活性药物和生物惰性药物在制剂或组合物中的含量以及比例可以由本领域技术人员根据实际需要确定，例如生物活性药物和生物惰性药物的摩尔比例可以为 10:1 至 1:10，例如 10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 或 1:10。

本发明所述的“制剂”是指为适应治疗或预防疾病的需要，按照一定的剂型要求所制成的可提供给用药对象使用的药品。所述的制剂中可以含有本发明所述生物活性药物、生物惰性伴侣，同时也可以含有其他药用辅料和工具。

本发明所述的“辅料”即药用辅料，是指生产药品和调配处方时使用的除活性成分以外，在安全性方面已进行了合理的评估，且包含在药物制剂中的物质，其目的除赋形、充当载体或提高稳定性外，还可以具有增溶、助溶、缓控释等重要功能。

本发明的药物或药物组合物可以配制为适合任何合适给予途径例如静脉内、皮下、胃肠外、口服、腹膜内等的剂型，例如片剂、粉剂、溶液等。在一个实施方案中，本发明所述药物或药物组合物可以配制为适合用于静脉内施用的形式。

在一个实施方案中，本发明提供了用于治疗哺乳动物例如人中肿瘤的试剂盒、药盒或药物组合物，所述试剂盒、药盒或药物组合物包括有效量的能降低 ED-B 蛋白水平的药物伴侣例如 ED-B 蛋白抗体，和靶向 ED-B 蛋白的活性药物例如 ED-B 蛋白的抗体药物。

本文所述“降低水平”是指与参照值例如在未接受治疗的对象或者在接受惰性药物治疗前观察到的中间值或者平均值相比降低，例如降低至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或 100%。

本发明所述试剂盒或药盒也可包含容器、标签和/或者说明书。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。通常，容器含有有效治疗病症的组合物及可具有无菌入口(例如容器可以是静脉内注射溶液袋)。组合物中至少一种活性剂是本发明所述的生物活性药物和/或生物惰性药物、或本发明所述的药物组合物、或通过本发明所述方法获得的生物活性药物和/或生物惰性药物、或药物组合物。所述标签或说明书指示所

述药物或组合物用于治疗特定病症，含有关于使用这种治疗产品的适应症、用法、剂量、给药、禁忌症和/或注意事项的信息。在一个实施方案中，所述说明书指出所述药物或组合物用于治疗与 ED-B 相关的疾病，例如与 ED-B 相关的实体肿瘤。

此外，本发明所述试剂盒或药盒可进一步包含其它容器，其包含药物可接受的缓冲液，如抑制细菌的注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer's 溶液和葡萄糖溶液。其可进一步包含满足商业和用户需要的其它材料，包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

在一个方面，本发明提供了一种疾病治疗方法，包括给予需要治疗的对象施用本发明所述的生物活性药物和生物惰性药物或药物组合物、或根据本发明所述方法获得的生物活性药物和生物惰性药物或药物组合物。

例如，可以先给予一种药物与特定靶点结合封闭靶点或部分封闭靶点，然后再给予另一种药物，使后给予的药物能靶向新产生的靶点或未被封闭的靶点。先给予的药物可以仅具备靶点封闭作用，使后给予的药物不能作用与同一个靶点；先给予的药物也可以具有其他生物活性，但与后给予的药物具有不同的药效或具有不同强度的药物活性。

所述生物活性药物和生物惰性药物可以同时给予，例如以单一制剂形式给予；或者间隔一定时间例如 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、40 分钟、50 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时或更长时间先后给予，例如先给予生物活性药物、再给予生物惰性药物，或者先给予生物惰性药物、再给予生物活性药物。

在先后给药的情况中，间隔时间可以根据本领域已知的技术知识或经验确定，例如根据给予的药物的药物动力学、半衰期、清除速率等确定合适的间隔时间，这都在本领域技术人员的技术知识和能力范围内。

所述药物或药物组合物可以通过任何合适的途径给予，例如静脉内、皮下、胃肠外、口服、腹膜内等。给予的剂量和方案可以根据医师的经验或者相关手册确定。在一个实施方案中，本发明所述药物或药物组合物可以通过静脉内施用。

给予的生物活性药物和生物惰性药物的剂量和/或比例可以可以根

据医师的经验或者相关手册确定。在一个实施方案中，生物活性药物和生物惰性药物的摩尔比例可以为 10:1 至 1:10，例如 10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 或 1:10。

在一个方面，本发明提供了治疗患有与 ED-B 相关的疾病例如实体肿瘤的哺乳动物例如人的方法，包括给所述动物施用本发明所述的生物活性药物和生物惰性药物或药物组合物、或根据本发明所述方法获得的生物活性药物和生物惰性药物或药物组合物，其中所述生物活性药物包含与靶向 ED-B 的靶向部分连接（例如直接共价连接或通过接头间接连接）的生物活性部分，生物惰性药物包含与靶向 ED-B 的靶向部分连接（例如直接共价连接或通过接头间接连接）的生物惰性部分。

在一个实施方案中，所述靶向 ED-B 的靶向部分是 EB-D 抗体如 CGS-1、CGS-2、L19 抗体或 B5 抗体或其结合抗原的片段，例如 CDR 区、可变区、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

在一个实施方案中，所述靶向 ED-B 的靶向部分是 B5 抗体的单链 Fv（scFv），其中所述 B5 抗体轻链（VL）和重链（HL）通过适当接头例如$(G_4S)_3$或 SEQ ID NO：7 或 8 所示。

在一个实施方案中，所述生物活性部分是 IL-2 或其片段，如 SEQ ID NO：9 所示。

在一个实施方案中，所述生物惰性部分是 IgG4 Fc 区，如 SEQ ID NO：4 所示。

在一个实施方案中，所述生物活性药物是包含 SEQ ID NO：6 所示氨基酸序列的多肽。

在一个实施方案中，所述生物惰性药物是包含 SEQ ID NO：5 所示氨基酸序列的多肽或其二聚体。

在一个实施方案中，给所述哺乳动物静脉内施用本发明的药物或药物组合物。在一个实施方案中，同时给予所述生物惰性药物和生物活性药物，例如以包含所述生物惰性药物和生物活性药物的药物组合物的形式。

在一个实施方案中，先给哺乳动物施用生物惰性药物，再施用生物

活性药物，例如间隔 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、40 分钟、50 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时或更长时间。

实施例

本发明给出发明药物体系设计方法、药物设计方法和药物组方方法。此外，本发明涉及药物的生产方式。本发明通过下述实施例进一步阐明，但任何实施例或其组合不应当理解为对本发明的范围或实施方式的限制。

实施例 1：检测血液中的 ED-B 蛋白

（A）ED-B 蛋白抗体表达和纯化

分别合成 B5、L19 的单链抗体(scFv)结构的 DNA 序列（参见专利申请号 CN201480001324.5，Pini, Viti et al. (1998).J Biol Chem. 273: 21769-21776 和 Borsi, Balza et al. (2002).Int J Cancer. 102: 75-85）。在抗体的 DNA 序列 5’端添加一个编码信号肽的 DNA 序列和在 3’端添加一个编码 IgG1 Fc 标签的 DNA 序列(Cao, Cao et al. (2009).Appl Biochem Biotechnol. 157: 562-574)。该序列 N 端和 C 端分别通过 Nhe I 和 Not I 限制性内切酶酶切并克隆至 pCI-neo 载体中，形成 pCI-neo-B5-Fc 载体、pCI-neo-L19-Fc 载体。抗体蛋白的载体构建和表达方式可参见(Borsi, Balza et al. (2002).Int J Cancer. 102: 75-85.)。

将获得的含抗体融合蛋白的载体利用 Invitrogen 的 Lipofectamine® 2000 转染至 CHO-K1 细胞，借助 pCI-neo 质粒载体的 neo 基因在含 G418 的选择性培养基(Davies and Jimenez (1980).Am J Trop Med Hyg. 29: 1089-1092.)中进行连续 4 周的选择培养后，经有限稀释法进行克隆化培养，将获得的单克隆细胞继续克隆化培养以获得稳定株。

获得的细胞株用 Hyclone CD4CHO 悬浮表达。带 Fc 标签的抗体蛋白用 Protein A 纯化。纯化获得的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳检测纯化获得样本纯度，通过紫外分光光度计检测样本浓度。

（B）ELISA 检测血液中的 ED-B

取健康人血液和患者（鼻咽癌、食管癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、乳腺增生、良性肿瘤）血液经枸橼酸钠抗凝剂处理后于 4℃、3000g 离心 2

分钟后，弃沉淀，重复一次。

采用 L19-IL2(参见 Carnemolla, Borsi et al. (2002).Blood. 99: 1659-1665.)和 B5-Fc 抗体通过夹心 ELISA 方法检测血液样本中的 ED-B 蛋白。

简而言之，将抗体 L19-IL2 用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲液（Na_2CO_3 1.59 g/L，$NaHCO_3$ 2.93 g/L）稀释至浓度为 2ng/μl，按 100μl/孔在 37℃包被酶标板 2 小时。用 PBST（NaCl 8g/L，KCl 0.2g/L，Na_2HPO_4 1.42g/L，KH_2PO_4 0.27g/L，pH=7.4，0.5‰ Tween-20）洗涤包被后的酶标板 3 次，以含 4%BSA 的 PBS 溶液（NaCl 8g/L，KCl 0.2g/L，Na_2HPO_4 1.42g/L，KH_2PO_4 0.27g/L，pH=7.4）在 37℃封闭酶标板 1 小时。用 PBST 洗涤酶标板 3 次。

PBS（NaCl 8g/L，KCl 0.2g/L，Na_2HPO_4 1.42g/L，KH_2PO_4 0.27g/L，pH=7.4）稀释 50 倍的血清样品按 100μl/孔加入到酶标板样品孔中。同时以 BSA 为阴性对照。将酶标板置于 37℃孵育 1 h。以 PBST 洗涤酶标板 3 次，以 PBST 将 B5-Fc 抗体稀释至 2 ng/μl，按 100 μl/孔加入到酶标板样品孔中，37℃孵育 1 h。以 PBST 洗涤酶标板 3 次，加入用 PBST 稀释 5000 的 HRP 标记小鼠抗人 IgG 抗体（Boster BA1070），37℃孵育 1 h。PBST 洗涤酶标板 5 次，向样品孔中加入 100μl/孔的 TMB 显色液，室温孵育 5 分钟。用 100 μl/孔的 2 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应。用酶标仪选择 OD450 nm 和 OD630 nm 双波长检测。扣除空白对照孔的本底值，即为样品检测吸光值。

结果示于图 3，显示实体肿瘤患者血液中 ED-B 水平显著升高，与健康人相比差异具有显著统计学意义(Mann-Whitney test)。

实施例 2：生物惰性药物与生物活性药物的设计与表达

1）生物惰性药物 B5-Fc 融合蛋白(SEQ ID NO：5)的设计与表达

B5 抗体重链(VH)(SEQ ID NO：1)与轻链(VL)(SEQ ID NO：2)之间用长连接片段(SEQ ID NO：7)连接，形成单链抗体 B5-ScFv(SEQ ID NO：3)，后端融合抗体 IgG4 的 Fc 片段(SEQ ID NO：4)，并保留 Fc 片段的铰链区，即保留半胱氨酸以形成二聚体，并提高蛋白的柔性(B5 抗体见专利公开 WO2014/194784)。B5 抗体的羧基端以三个丙氨酸残基与 Fc

的氨基端铰链区序列连接。融合后形成蛋白 B5-Fc(SEQ ID NO：5)。

2）生物活性药物 B5-IL2 融合蛋白(SEQ ID NO：6)的设计与表达

B5 抗体重链(VH)(SEQ ID NO：1)与轻链(VL)(SEQ ID NO：2)之间用长连接片段(SEQ ID NO：7)连接，形成单链抗体 B5-ScFv(SEQ ID NO：3)，后端融合人白介素 2(IL2)(SEQ ID NO：9)，B5 抗体的羧基端以长连接片段(SEQ ID NO：8)与 IL2 连接。融合后形成的蛋白为 B5-IL2(SEQ ID NO：6)。

3）B5-Fc 与 B5-IL2 融合蛋白表达

将编码 B5-Fc(SEQ ID NO：5)与 B5-IL2(SEQ ID NO：6)融合蛋白的 DNA 片段分别连接至 pCI-neo 载体中，将获得的含所述抗体融合蛋白编码序列的质粒大量提取后，利用 Lipofectamine® 2000（Invitrogen）将质粒 DNA 转染至 CHO-K1 细胞（购自中国典型培养物保藏中心），借助 pCI-neo 质粒载体的 neo 基因在含 G418 的选择性 DMEM/F12 培养基（Thermo Scientific HyClone）中进行连续 4-8 周的选择培养后，经有限稀释法进行克隆化培养，将获得的单克隆细胞继续克隆化培养以获得稳定株。

获得的细胞株经 Hyclone SFM4CHO-Utility（Thermo Scientific HyClone）驯化后悬浮表达，经 ELISA 和 SDS-PAGE 实验验证，获得了目标抗体蛋白，抗体蛋白产量约为 100 mg/L。

实施例 3：动物造模、分组和给药方法

溶液配制：在 PBS（NaCl 8g/L，KCl 0.2g/L，Na_2HPO_4 1.42g/L，KH_2PO_4 0.27g/L，pH=7.4）溶液中将实施例 1 中制备的 B5-Fc 与 B5-IL2 融合蛋白分别配制成 0.4mg/ml 的溶液。

小鼠移植瘤模型建立：健康 Balb/c nu 裸鼠在 SPF 级屏障系统中饲养至 8 周龄，在小鼠背部皮下接种小鼠畸胎瘤细胞（F9）（上海复祥生物科技有限公司），每个注射点 2.5×10^6 个细胞。接种第 6 天选择肿瘤体积约 60 mm^3 的小鼠进行分组实验。按 8 只每组分组，设 A、B、C、D、E 组，在接种后第 6 天、7 天、8 天分别通过尾静脉注射给药，其中：

A 组为阴性对照组，每天给予生理盐水两次，间隔 6 小时，每次 50μl/只。

B 组为阳性对照组，每天给予 B5-IL2 溶液和生理盐水各一次，先给予生理盐水，间隔 6 小时再给予 B5-IL2 溶液，分别为 50μl/只。

C 组每天先给予 B5-Fc 溶液，6 小时后给药予 B5-IL2 溶液，分别为 50μl/只。

D 组每天给予 B5-IL2 溶液与 B5-Fc 溶液制成的等体积混合溶液一次，100μl/只。

E 组为对照组，每天给予 B5-Fc 溶液和生理盐水各一次，先给予 B5-Fc 溶液，间隔 6 小时再给予生理盐水，分别为 50μl/只。

最后一次给药后第 6 天，即小鼠皮下接种造模后第 14 天测量体积。结果示于下表 1：A 组、E 组为阴性对照组，肿瘤体积显著大于 B 组、C 组、D 组的肿瘤体积，差异有统计学意义。C 组或 D 组的肿瘤体积显著小于 B 组肿瘤体积，差异有统计学意义，因此 C 组和 D 组的治疗效果优于 B 组；C 组和 D 组之间无显著差异。A 组和 E 组之间无显著差异。

表 1

分组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
肿瘤体积（mm^3）	1202.0±223.1	481.6±72.69	206.6±89.76	207.9±43.4	1076±183.3

权利要求

1、一种试剂盒，其包含生物惰性药物和生物活性药物，其中

- 所述生物活性药物包括靶向部分和生物活性部分，
- 所述生物惰性药物包括靶向部分和生物惰性部分，

所述生物惰性药物与所述生物活性药物能够靶向相同靶，任选所述生物惰性药物与所述生物活性药物具有相同的靶向部分。

2、一种药物组合物，其包含生物惰性药物和生物活性药物以及任选存在的药学可接受的载体和/或赋形剂，其中

- 所述生物活性药物包括靶向部分和生物活性部分，
- 所述生物惰性药物包括靶向部分和生物惰性部分，

所述生物惰性药物与所述生物活性药物能够靶向相同靶，任选所述生物惰性药物与所述生物活性药物具有相同的靶向部分。

3、根据权利要求 1 所述的试剂盒或权利要求 2 所述的药物组合物，其中所述靶向部分选自配体、受体、抗体或其结合靶的片段，例如完整抗体、抗体 CDR 区、抗体可变区、Fab 片段、Fab'片段、$F(ab)'_2$ 片段、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的试剂盒或药物组合物，其中所述生物惰性部分选自抗体恒定区、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体，例如 IgG4 Fc 区。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的试剂盒或药物组合物，其中所述生物活性部分选自细胞毒素、细胞因子如 TNF-alpha、IL-2 或 IL-12、放射性同位素、化学药物、具有生物活性的抗体恒定区和具有生物活性的细胞。

6、根据权利要求 1-5 任一项所述的试剂盒或药物组合物，其中所述靶向部分靶向纤维连接蛋白额外结构域 B（ED-B），例如选自 CGS-1、

CGS-2、L19 或 B5 抗体或其结合 ED-B 的片段，例如完整抗体、抗体 CDR 区、抗体可变区、Fab 片段、Fab'片段、$F(ab)'_2$ 片段、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

7、根据权利要求 1-6 任一项所述的试剂盒或药物组合物，其中所述生物惰性部分是抗体恒定区，例如 SEQ ID NO：4 所示的肽。

8、根据权利要求 1-7 任一项所述的试剂盒或药物组合物，其中所述生物活性部分是细胞因子 IL-2，例如 SEQ ID NO：9 所示的肽。

9、根据权利要求 1-8 任一项所述的试剂盒或药物组合物，其中所述生物惰性部分是 SEQ ID NO：4 所示的多肽，或者所述生物活性部分是 SEQ ID NO：9 所示的多肽。

10、根据权利要求 1-9 任一项所述的试剂盒或药物组合物，其中所述生物惰性药物是 SEQ ID NO：5 所示的多肽或其二聚体，或者所述生物活性药物是 SEQ ID NO：6 所示的多肽。

11、根据权利要求 1-10 任一项所述的试剂盒，其中所述生物惰性药物与所述生物活性药物混合制成单一制剂或组合物，或者所述生物惰性药物与所述生物活性药物分别制成独立制剂或组合物。

12、一种生物惰性药物，其包括靶向感兴趣靶的靶向部分和生物惰性部分。

13、根据权利要求 12 所述的生物惰性药物，其中所述靶向部分选自配体、受体、抗体或抗体片段，例如完整抗体、抗体 CDR 区、抗体可变区、Fab 片段、Fab'片段、$F(ab)'_2$ 片段、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体。

14、根据权利要求 12 或 13 所述的生物惰性药物，其中所述靶向部分靶向纤维连接蛋白额外结构域 B，例如选自 CGS-1、CGS-2、L19 或 B5 抗体或其结合 ED-B 的片段，例如抗体 CDR 区、抗体可变区、Fab 片段、Fab'片段、$F(ab)'_2$ 片段、单链 Fv（scFv）、Fv 片段、抗体轻链、抗体重链、单域抗体、双抗体及线性抗体，如 SEQ ID NO：3 所示的肽。

15、根据权利要求 12-14 任一项所述的生物惰性药物，其中所述生物惰性部分选自抗体恒定区、白蛋白、聚乙二醇和核酸适配体，例如 IgG4 Fc 区，如 SEQ ID NO：4 所示的肽。

16、根据权利要求 12-15 任一项所述的生物惰性药物，其中所述生物惰性药物是 SEQ ID NO：5 所示的多肽或其二聚体。

17、一种治疗疾病的方法，包括给予需要治疗的对象例如哺乳动物施用权利要求 1-11 任一项中所限定的生物惰性药物和生物活性药物、或权利要求 2-10 任一项所述的药物组合物，或使用权利要求 1-11 任一项的试剂盒。

18、根据权利要求 17 所述的方法，其中所述生物惰性药物与生物活性药物同时施用，或者顺序施用，例如间隔 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、40 分钟、50 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时或更长时间，例如先施用生物惰性药物，然后施用生物活性药物。

19、根据权利要求 17 或 18 所述的方法，其中所述疾病是与纤维连接蛋白 ED-B 相关的疾病，例如实体肿瘤。

20、权利要求 17-19 任一项的方法，其中所述对象是人。

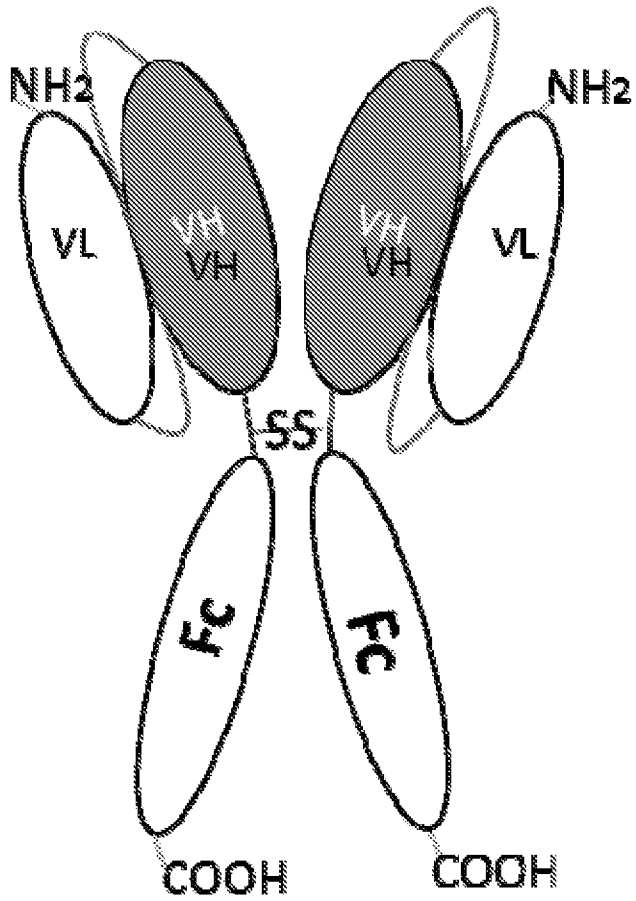


图 1

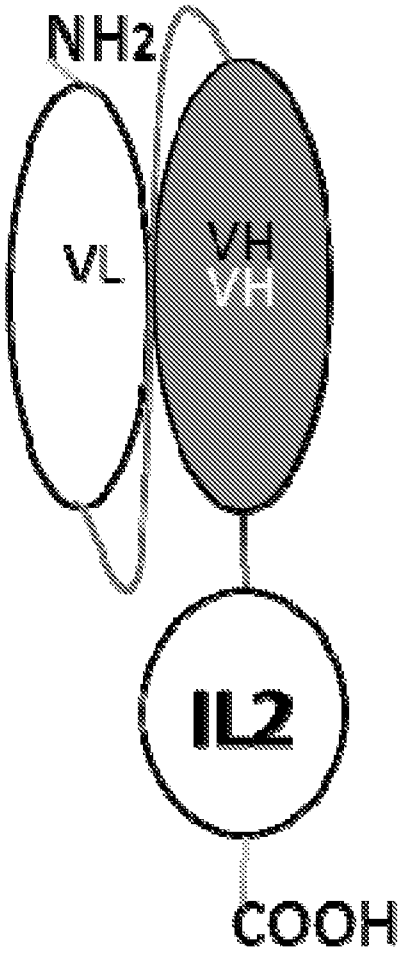


图 2

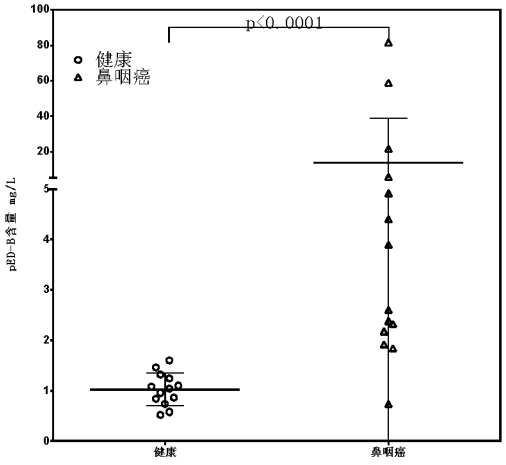


图 3A

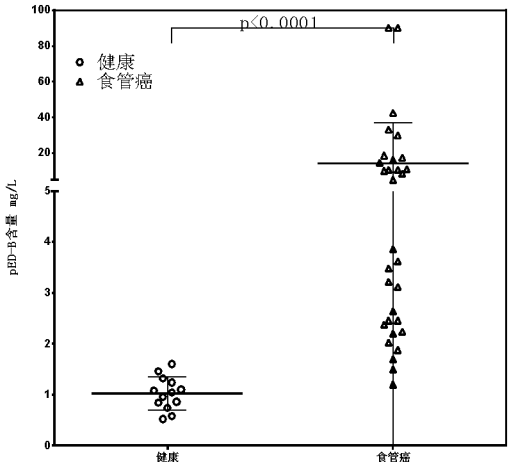


图 3B

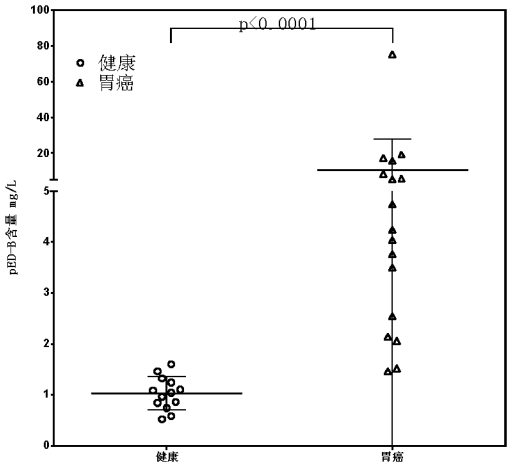


图 3C

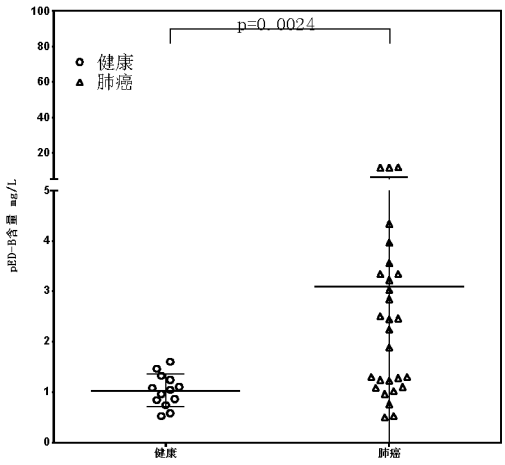


图 3D

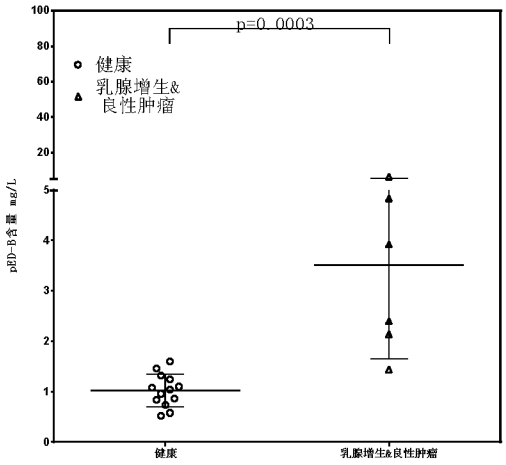


图 3E

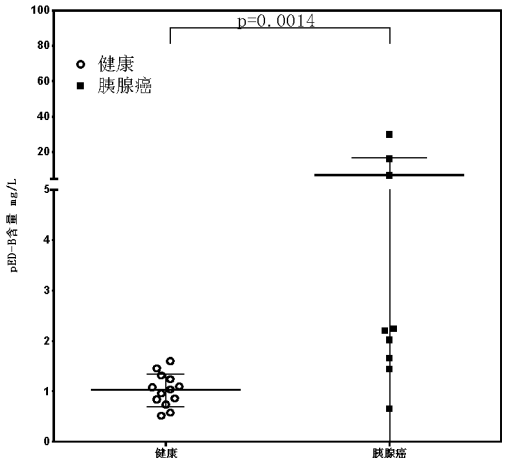


图 3F

图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/111264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/06 (2006.01) i; A61K 38/20 (2006.01) i; C07K 19/00 (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; 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, CNABS, SIPOABS, CNKI, Medline: Fc, scFv, polyethyleneglycol, targeting, active, therapeutic, inactive, drug, composition, antibody, kit, albumin, PEG, interleukin, IL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103124788 A (MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.), 29 May 2013 (29.05.2013), description, paragraphs [0010]-[0018] and [0024]-[0029]	1-20
A	EP 2256134 B1 (HANMI SCIENCE CO., LTD.), 08 January 2014 (08.01.2014), the whole document	1-20

☐ 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	Date of mailing of the international search report
30 March 2017 (30.03.2017)	**10 April 2017 (10.04.2017)**
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 **LI, Yang** Telephone No.: (86-10) **62411031**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/111264

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/111264

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] the subject matter of claims 17-20 is method for treating diseases, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). The subject matter of claims 17-20 can be rationally expected to modified as: biologically inactive drugs and biologically active drugs as defined in any one of claims 1-11, drug combination as claimed in any one of claims 1-20, or the use of lit for preparing drugs for treating diseases as claimed in any one of claims 1-11. The international search is made based on this rational expectation.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/111264

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103124788 A	29 May 2013	US 2014178380 A1	26 June 2014
		US 2011286976 A1	24 November 2011
		AU 2011255238 A1	06 December 2012
		EP 2571992 A1	27 March 2013
		JP 2013530146 A	25 July 2013
		JP 2017000143 A	05 January 2017
		US 2016168269 A1	16 June 2016
		US 2011293579 A1	01 December 2011
		CA 2800173 A1	24 November 2011
		US 9238080 B2	19 January 2016
		CN 103124788 B	13 January 2016
		AU 2011255238 B2	04 June 2015
		WO 2011146902 A1	24 November 2011
		US 8691771 B2	08 April 2014
		WO 2011146902 A9	15 November 2012

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/111264

A. 主题的分类

A61K 45/06(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; C07K 19/00(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; 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, CNABS, SIPOABS, CNKI, Medline: 靶向，活性，惰性，药物，试剂盒，抗体，Fc，scFv，白蛋白，聚乙二醇，白介素，targeting, active, therapeutic, inactive, drug, composition, antibody, kit, albumin, PEG, interleukin, IL

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 103124788 A (梅里麦克制药股份有限公司) 2013年 5月 29日 (2013-05-29) 说明书第[0010]-[0018]、[0024]-[0029]段	1-20
A	EP 2256134 B1 (HANMI SCIENCE CO LTD) 2014年 1月 8日 (2014-01-08) 全文	1-20

☐ 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	国际检索报告邮寄日期
2017年 3月 30日	2017年 4月 10日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
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	李洋
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62411031

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/111264

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☑ 电子形式

b. (提交时间)

☑ 含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/111264

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 17-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求17-20的主题为治疗疾病的方法，属于细则39.1(iv)定义的不要求检索的主题。权利要求17-20的主题可经合理预期修改为权利要求1-11任一项中所限定的生物惰性药物和生物活性药物、或权利要求2-10任一项所述的药物组合物，或权利要求1-11任一项的试剂盒用于制备治疗疾病的药剂的用途。国际检索基于这一合理预期作出。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/111264

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	103124788	A	2013年 5月 29日	US	2014178380	A1	2014年 6月 26日
				US	2011286976	A1	2011年 11月 24日
				AU	2011255238	A1	2012年 12月 6日
				EP	2571992	A1	2013年 3月 27日
				JP	2013530146	A	2013年 7月 25日
				JP	2017000143	A	2017年 1月 5日
				US	2016168269	A1	2016年 6月 16日
				US	2011293579	A1	2011年 12月 1日
				CA	2800173	A1	2011年 11月 24日
				US	9238080	B2	2016年 1月 19日
				CN	103124788	B	2016年 1月 13日
				AU	2011255238	B2	2015年 6月 4日
				WO	2011146902	A1	2011年 11月 24日
				US	8691771	B2	2014年 4月 8日
				WO	2011146902	A9	2012年 11月 15日