



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120076828 A

(43) 申请公布日 2025.05.30

(21) 申请号 202380073206.4

(22) 申请日 2023.11.16

(66) 本国优先权数据

202211438239.8 2022.11.16 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.04.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/131913 2023.11.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/104409 ZH 2024.05.23

(71) 申请人 苏州盛迪亚生物医药有限公司

地址 215126 江苏省苏州市苏州工业园区  
凤里街350号

申请人 上海恒瑞医药有限公司

江苏恒瑞医药股份有限公司

(72) 发明人 杨震 杨喜琴 葛凌霄 王宏伟

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(54) 发明名称

一种含抗RANKL-NGF双特异性抗体的药物组合物

(57) 摘要

本披露涉及一种含抗RANKL-NGF双特异性抗体的药物组合物。具体而言,本披露涉及的药物组合物包含抗RANKL-NGF双特异性抗体和缓冲剂。

(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  
2024年5月23日 (23.05.2024)



(10) 国际公布号  
**WO 2024/104409 A1**

(51) 国际专利分类号:

*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 19/08* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/131913

(22) 国际申请日: 2023年11月16日 (16.11.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202211438239.8 2022年11月16日 (16.11.2022) CN

(71) 申请人: 苏州盛迪亚生物医药有限公司(SUZHOU SUNCADIA BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区凤里街350号, Jiangsu 215126 (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)。江苏恒瑞医药股份有限公司(JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS 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)。

(72) 发明人: 杨震(YANG, Zhen); 中国江苏省苏州市苏州工业园区凤里街350号, Jiangsu 215126 (CN)。杨喜琴(YANG, Xiqin); 中国江苏省苏州市苏州工业园区凤里街350号, Jiangsu 215126 (CN)。葛凌霄(GE, Lingxiao); 中国江苏省苏州市苏州工业园区凤里街350号, Jiangsu 215126 (CN)。王宏伟(WANG, Hongwei); 中国江苏省苏州市苏州工业园区凤里街350号, Jiangsu 215126 (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10层, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING ANTI-RANKL-NGF BISPECIFIC ANTIBODIES

(54) 发明名称: 一种含抗RANKL-NGF双特异性抗体的药物组合物

(57) Abstract: The present disclosure relates to a pharmaceutical composition comprising an anti-RANKL-NGF bispecific antibodies. Specifically, the pharmaceutical composition of the present disclosure comprises anti-RANKL-NGF bispecific antibodies and a buffer.

(57) 摘要: 本披露涉及一种含抗RANKL-NGF双特异性抗体的药物组合物。具体而言, 本披露涉及的药物组合物包含抗RANKL-NGF双特异性抗体和缓冲剂。

WO 2024/104409 A1

## 一种含抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的药物组合物

本申请要求中国专利申请（申请号 202211438239.8，申请日 2022 年 11 月 16 日）的优先权。

### 技术领域

本披露属于药物制剂领域，具体涉及一种含抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的药物组合物，以及其作为药物的用途。

### 背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

骨转移是很多癌症发展到后期常见的一种伴随症状。骨转移的发病机制为：原发性的肿瘤细胞脱落进入血液循环系统形成循环的肿瘤细胞，循环的肿瘤细胞转移到骨骼部位形成具有传播性的肿瘤细胞，并在骨骼微环境中休眠；这一过程可能持续数年的时间，直到存活下来的肿瘤细胞逐渐适应了骨骼的微环境，肿瘤细胞被激活，从休眠状态进入增殖状态（Mantyh, P.W., *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014. 8(2): p83-90）。肿瘤细胞的增殖会影响骨骼的微环境，并促进破骨细胞的形成，破骨细胞导致骨吸收加快并释放出多种细胞因子，进一步促进肿瘤细胞的增殖，由此形成了一个恶性循环（Quayle, L., *Current Cancer Drug Targets*, 2015. 15(6): p469-480）。肿瘤细胞的不断增殖导致多个转移位点的形成，使患者出现骨损伤和疼痛等各种问题（Gartland, A., *Journal of Bone Oncology*, 2016. 5(3): p100-103）。

据统计，常见的发生骨转移的癌症包括骨髓瘤、肾癌、黑色素瘤、膀胱癌、甲状腺癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌（Cleazardin, P., *Joint Bone Spine*, 2017. 84(6): p677-684. Fidler, M.M. Fidler, *Scandinavian Journal of Public Health*, 2018. 46(1): p27-36）。

在正常骨组织中，成骨和破骨细胞处于一个相对平衡的状态，以维持骨骼正常的生长发育，而癌细胞的存在会破坏这种平衡。在骨微环境中的癌细胞会释放一系列的细胞因子来刺激成骨细胞和骨细胞分泌大量的核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体（Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand, RANKL）。RANKL与RANK受体作用促进破骨细胞的形成，导致骨吸收加剧。骨吸收造成的骨质溶解又会释放出其他的生长因子来促进癌细胞的增殖。这样就形成了一个有利于癌细胞转移的循环（Body, J.J., *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012. 12(3): p307-322）。

NGF（Nerve growth factor）是一种神经生长因子。NGF信号通路介导了神经系统的生长发育和疼痛信号的传导。目前已知在细胞表面有两种NGF受体，其中TrkA是高亲和力的受体，p75NTR是低亲和力的受体。NGF与TrkA作用可以同时

激活Ras和PI3K通路，促进细胞的存活和神经的生长。而NGF与p75NTR作用可以促进细胞的凋亡。另外PI3K通路还可以激活TRPV1的磷酸化，导致离子通道激活产生动作电位并传导痛觉神经元信号（Kumar, V. and Mahal B. A., Journal of Pain Research, 2012. 5: p279-287）。

已有数据表明，靶向 NGF 和 RANKL 的单克隆抗体对骨转移引起的骨损伤和疼痛有一定的治疗效果（Body JJ. Expert Rev Anticancer Ther. 2012. 12(3): p307-322. Sopata M., et al. 2015. 156(9): p1703-1713）。

## 发明内容

本披露提供一种含抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的药物组合物，该组合物具有治疗活性。此外，该组合物还具有稳定性好等优势。

在一些实施方案中，本披露提供一种药物组合物，包含抗 RANKL-NGF 双特异性抗体和缓冲剂，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体包含特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域和特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域，所述缓冲剂为醋酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂或磷酸盐缓冲剂。

在一些实施方案中，所述缓冲剂为醋酸-醋酸钠缓冲剂、组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂或柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲剂。

在一些实施方案中，所述缓冲剂为醋酸-醋酸钠缓冲剂或组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。

在一些具体的实施方案中，所述缓冲剂为醋酸-醋酸钠缓冲剂。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.8。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.0。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 5.4。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 4.6。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 4.8。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.0。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.2。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.4。当本披露中提及点值时，应当理解该点值包含了误差范围。这种误差范围是由于实验室环境、人员操作、仪器、方法学、测量误差等因素所致。以 pH 为例，当测值为约 5.0 时，应当理解其包含了误差范围。作为一个示例，采用工业用 pH 计测量制剂时，“约 5.0”表示  $5.0 \pm 0.2$ （即 pH 为 4.8 至 5.2）。

在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.6-6.6。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.6-5.8。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.8。

在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7 或 7.8，或

者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.6。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.8。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.2。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.4。

通常，通过置换缓冲剂获得的药物组合物的 pH 与缓冲剂 pH 几乎一致。同时，本领域技术人员公知，在药物制剂的过程中，有时可能会存在 pH 飘移，但药物制剂的 pH 的飘移一般很小（例如 $\pm 0.3$  范围内）。在一些实施方案中，药物制剂的 pH 的飘移在 $\pm 0.2$  范围内。在一些实施方案中，药物制剂的 pH 的飘移在 $\pm 0.1$  范围内。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL 至 150mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL 至 100mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 10 mg/mL 至 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 20mg/mL 至 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 20mg/mL 至 77 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 20mg/mL 至 70 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 50mg/mL 至 77 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 56 mg/mL 至 84 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 63 mg/mL 至 77 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为约 77mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为约 70mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为约 50mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为约 20 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、55mg/mL、56 mg/mL、60mg/mL、63 mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、77mg/mL、80mg/mL、84 mg/mL、90mg/mL、100mg/mL、110mg/mL、120mg/mL、130mg/mL、140mg/mL 或 150mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 77mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 70mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 50mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 20mg/mL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂是非离子表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂选自泊洛沙姆（例如泊洛沙姆 188）、聚山梨酯（例如聚山梨酯 20、聚山梨酯 80）、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸

钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80、聚山梨酯 20 或泊洛沙姆 188。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂浓度为 0.01mg/mL 至 1.0mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.01mg/mL 至 0.8mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.01mg/mL 至 0.6mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.01mg/mL 至 0.4mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.01mg/mL 至 0.2mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.1 mg/mL 至 0.4 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.05mg/mL 至 0.15mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.09 mg/mL 至 0.11 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为约 0.4 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为约 0.2 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为约 0.1 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.01 mg/mL、0.05mg/mL、0.08 mg/mL、0.09 mg/mL、0.1mg/mL、0.11 mg/mL、0.12 mg/mL、0.15mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL 或 1.0mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.4 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.2 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.1mg/mL。

在一些实施方案中，所述表面活性剂为约 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80。在一些实施方案中，所述表面活性剂为 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包括稳定剂。在一些实施方案中，稳定剂为糖（包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等）、氨基酸（包括脯氨酸、精氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、组氨酸等等）或盐类（氯化钠、氯化钾、氯化钙等）。在一些实施方案中，所述稳定剂选自脯氨酸、蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠组成的组中的一种或更多种。在一些实施方案中，所述稳定剂为脯氨酸、蔗糖或氯化钠。在一些实施方

案中，所述稳定剂为氨基酸。在一些实施方案中，所述稳定剂为脯氨酸。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，稳定剂浓度为 1mM 至 300mM。在一些实施方案中，稳定剂浓度为 25 mM 至 290 mM。在一些实施方案中，稳定剂浓度为 25mM 至 250mM。在一些实施方案中，稳定剂浓度为 210 mM 至 270 mM。在一些实施方案中，稳定剂浓度为 216 mM 至 264 mM。在一些实施方案中，稳定剂浓度为 228 mM 至 252 mM。在一些实施方案中，所述稳定剂浓度为约 240 mM。在一些实施方案中，所述稳定剂浓度为 1 mM、5 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、110 mM、120 mM、130 mM、140 mM、150 mM、160 mM、170 mM、180 mM、190 mM、200 mM、210 mM、216 mM、220 mM、228 mM、230 mM、235 mM、240 mM、245 mM、250 mM、252 mM、260 mM、264 mM、270 mM、280 mM、290 mM 或 300 mM，或者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述稳定剂浓度为 240 mM。

在一些实施方案中，所述稳定剂为约 240 mM 脯氨酸。在一些实施方案中，所述稳定剂为 240 mM 脯氨酸。

在一些实施方案中，所述稳定剂为糖，所述糖选自：葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，木糖醇，山梨糖醇（也称山梨醇），甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，麦芽糖醇，乳糖醇和异-麦芽酮糖。在一些实施方案中，所述稳定剂选自蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠组成的组中的一种或多种。在一些实施方案中，所述稳定剂为非还原性二糖。在一些实施方案中，所述稳定剂为海藻糖或蔗糖。在一些实施方案中，所述稳定剂为蔗糖。

在一些实施方案中，稳定剂为 10mg/mL 至 100mg/mL 蔗糖。在一些实施方案中，稳定剂为 30mg/mL 至 80mg/mL 蔗糖。在一些实施方案中，稳定剂为 50mg/mL 至 80mg/mL 蔗糖。在一些实施方案中，稳定剂为 70mg/mL 至 80mg/mL 蔗糖。在一些实施方案中，稳定剂为 60 mg/mL 至 90 mg/mL 蔗糖。在一些实施方案中，稳定剂为 67.5 mg/mL 至 82.5 mg/mL 蔗糖。在一些实施方案中，稳定剂为约 75mg/mL 蔗糖。在一些实施方案中，稳定剂浓度非限制性实施包括 10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、65mg/mL、67.5 mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、80mg/mL、82.5 mg/mL、85mg/mL、90mg/mL、95mg/mL、100mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，稳定剂为 75 mg/mL 蔗糖。

在一些实施方案中，所述稳定剂为盐类。在一些实施方案中，所述稳定剂为氯化钠。在一些实施方案中，所述稳定剂为 0.64% (w/v) 至 0.96% (w/v) 氯化钠。在一些实施方案中，所述稳定剂为 0.72% (w/v) 至 0.88% (w/v) 氯化钠。在一些实施方案中，所述稳定剂为约 0.8% (w/v) 氯化钠。在一些实施方案中，所述稳定

剂为 0.8% (w/v) 氯化钠。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,所述缓冲剂的浓度为 5mM 至 100mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 10mM 至 50mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 30 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 10mM 至 20mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 16 mM 至 24 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 18 mM 至 22 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为约 20 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为约 10 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 5mM、10mM、15mM、16 mM、18 mM、20mM、22 mM、24 mM、25mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM 或 100mM, 以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 20 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 10 mM。

在一些实施方案中,所述缓冲剂为约 10mM 醋酸-醋酸钠缓冲剂。在一些实施方案中,所述缓冲剂为约 20mM 醋酸-醋酸钠缓冲剂。在一些实施方案中,所述缓冲剂为 10mM 醋酸-醋酸钠缓冲剂。在一些实施方案中,所述缓冲剂为 20mM 醋酸-醋酸钠缓冲剂。在一些实施方案中,所述缓冲剂为 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。在一些实施方案中,所述缓冲剂为 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲剂。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体包含:至少一个特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域和至少一个特异性结合 NGF 的第二抗原结合域。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体包含:两个特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域和两个特异性结合 NGF 的第二抗原结合域。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体具有如图 1 所示的结构。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述抗RANKL-NGF 双特异性抗体中,特异性结合RANKL的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中:

所述重链可变区包含:HCDR1,其包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列;和 HCDR3,其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列;和

所述轻链可变区包含:LCDR1,其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列;和 LCDR3,其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中,特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链

可变区，其中：所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列；和/或  
所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域包含重链和轻链，所述重链包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列，所述轻链包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，

(i) 特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列；

(ii) 特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗RANKL-NGF双特异性抗体中，

(i) 特异性结合RANKL的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列；

(ii) 特异性结合NGF的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗RANKL-NGF双特异性抗体中，

(i) 特异性结合RANKL的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含：HCDR1，其包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列；HCDR2，其包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列；和HCDR3，其包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列；LCDR2，其包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列；和LCDR3，其包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列；

(ii) 特异性结合NGF的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含：HCDR1，其包含SEQ ID NO: 15的氨基酸序列；HCDR2，其包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列；和HCDR3，其包含SEQ ID NO: 17的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含SEQ ID NO: 18的氨基酸序列；LCDR2，其包含SEQ ID NO: 19的氨基酸序列；和LCDR3，其包含SEQ ID NO: 20的氨基酸序列；且所述抗RANKL-NGF双特异性抗体具有如图1所示的结构。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗RANKL-NGF双特异性抗体中，

(i) 特异性结合RANKL的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列；

(ii) 特异性结合NGF的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列；且所述抗RANKL-NGF双特异性抗体具有如图1所示的结构。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗RANKL-NGF双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中：所述第一多肽链包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列，所述第二多肽链包含SEQ ID NO: 31的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体包含两条序列相同的第一链和两条序列相同的第二链，其中：所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列，所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，
- (b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性剂，
- (c) 1 mM 至 300 mM 的稳定剂，和
- (d) 5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，
- (b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性剂，
- (c) 1 mM 至 300 mM 的脯氨酸，和
- (d) 5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，
- (b) 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80，
- (c) 25 mM 至 290 mM 的脯氨酸，和
- (d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，
- (b) 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 25 mM 至 250 mM 的脯氨酸，和
- (d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 20 mg/mL 至 80 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，
- (b) 0.01 mg/mL 至 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸，和
- (d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，
- (b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸，和
- (d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体,
- (b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80,
- (c) 25 mM 至 250 mM 的脯氨酸, 和
- (d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸钠盐缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体,
- (b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80,
- (c) 240 mM 的脯氨酸, 和
- (d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂; 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体,
- (b) 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL 的聚山梨酯 80,
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸, 和
- (d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体,
- (b) 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的聚山梨酯 80,
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸, 和
- (d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

- (a) 约 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体,
- (b) 约 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80,
- (c) 约 240 mM 的脯氨酸, 和
- (d) 约 20 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

- (a) 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体,
- (b) 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80,
- (c) 240 mM 的脯氨酸, 和
- (d) 20 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上所述的药物组合物, 所述药物组合物是液体制剂。在一些实施方案中, 所述液体制剂的溶剂是水。

本披露还提供一种的冻干制剂, 其特征在于所述冻干制剂复溶后可形成如上任

一项所述的药物组合物。

本披露还提供一种冻干制剂，其为如上任一项所述的药物组合物的冻干形式制剂。

本披露还提供一种制备冻干制剂的方法，其中包括将如上任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。在一些实施方案中，如上任一项所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

本披露还提供一种冻干制剂，所述制剂通过将如上任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

本披露还提供一种复溶溶液，其特征在于所述复溶溶液是通过将如上任一项所述的冻干制剂经复溶制备获得。

本披露还提供一种复溶溶液，其为如上任一项所述的冻干制剂的复溶形式制剂。在一些实施方案中，如上任一项所述的复溶溶液，其组分和含量与前述的药物组合物的组分和含量相同。

在一些实施方案中，如上任一项所述的复溶溶液，其包含如下组分：

(a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，(b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性剂，(c) 1 mM 至 300 mM 的稳定剂，和 (d) 5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的复溶溶液，其包含如下组分：

(a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的如上任一项所述的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，(b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性剂，(c) 1 mM 至 300 mM 的脯氨酸，和 (d) 5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的复溶溶液，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，(b) 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80，(c) 25 mM 至 290 mM 的脯氨酸，和 (d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4。

在一些实施方案中，如上任一项所述的复溶溶液，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，(b) 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 25 mM 至 250 mM 的脯氨酸，和 (d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4。

在一些实施方案中，如上任一项所述的复溶溶液，其包含如下组分：

(a) 20 mg/mL 至 80 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，(b) 0.01 mg/mL 至 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4。

在一些实施方案中，如上任一项所述的复溶溶液，其包含如下组分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸，和 (d) 10 mM

至 30 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体, (b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 25 mM 至 250 mM 的脯氨酸, 和 (d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸钠盐缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体, (b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 240 mM 的脯氨酸, 和 (d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体, (b) 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸, 和 (d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体, (b) 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸, 和 (d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 约 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体, (b) 约 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 约 240 mM 的脯氨酸, 和 (d) 约 20 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体, (b) 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 240 mM 的脯氨酸, 和 (d) 20 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液, 其为皮下注射制剂、静脉注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂。在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液, 其为皮下注射制剂。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液, 其适用于皮下注射、静脉注射、腹腔注射或肌肉注射; 优选地, 其适用于皮下注射。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液或冻干制剂, 其用于制备皮下注射、静脉注射、腹腔注射或肌肉注射的药物; 优选地, 其用于制备皮下注射的药物。

本披露还提供一种药盒, 其包括至少一个容器, 各容器独立地包含如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂或如上任一项所述的复溶溶液。

在一些实施方案中, 本披露还提供诊断、治疗、缓解受试者病症的方法, 包

含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒在制备治疗或预防疾病的药物中的用途。

在一些实施方案中，本披露还提供一种治疗或预防疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒，其用于治疗或预防疾病。

在一个方面，本披露还提供如前任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒在制备用于预防或治疗疾病或病症的药物中的用途。

在一些具体实施方案中，如上任一项所述的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

在一些实施方案中，所述的疼痛选自：骨关节疼痛、类风湿性关节炎疼痛、痛风、骨癌痛、骨折疼痛、手术后疼痛、癌症疼痛、痛性膀胱综合征、肌肉骨骼痛、前列腺炎（例如慢性前列腺炎）、盆腔疼痛（例如慢性盆腔疼痛）、间质性膀胱炎、下背痛、痛经、骨骼疾病相关的疼痛、三叉神经痛、带状疱疹后遗神经痛、带状疱疹感染、坐骨神经痛、偏头痛、糖尿病神经病变和外周神经相关的疼痛。

在一些实施方案中，所述的骨损失与选自下组的至少一种状况相关：骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨质疏松、骨坏死、骨损伤、骨吸收、骨发育不全、炎症、自身免疫疾病、肠炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、克罗恩病、牙周骨吸收、溶骨性转移和癌症。

在一些实施方案中，其中所述的癌症选自乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾癌、肺癌、食道癌、直肠癌、膀胱癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、胃肠道癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、非小细胞肺癌、骨肿瘤和何杰金氏病。

在一些实施方案中，前述的疾病为与 NGF 或 RANKL 相关的疾病。

在一些实施方案中，前述的疾病为表达 NGF 或 RANKL 的疾病。

在一个方面，本披露提供一种治疗或预防与 NGF 或 RANKL 相关的疾病的方法，所述方法包括给予受试者预防有效量或治疗有效量的如前任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

在一些实施方案中，所述与 NGF 或 RANKL 相关的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

在一个方面，本披露的如前任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻

干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒可用作药物。在一些实施方案中，用作用于治疗疼痛、关节僵硬或骨损失的药物。在一些实施方案中，用作用于治疗骨关节疼痛、类风湿性关节炎疼痛、痛风、骨癌痛、骨折疼痛、手术后疼痛、癌症疼痛、痛性膀胱综合征、肌肉骨骼痛、前列腺炎（例如慢性前列腺炎）、盆腔疼痛（例如慢性盆腔疼痛）、间质性膀胱炎、下背痛、痛经、骨骼疾病相关的疼痛、三叉神经痛、带状疱疹后遗神经痛、带状疱疹感染、坐骨神经痛、偏头痛、糖尿病神经病变和外周神经相关的疼痛的药物。在一些实施方案中，用作用于治疗骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨质疏松、骨坏死、骨损伤、骨吸收、骨发育不全、炎症、自身免疫疾病、肠炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、克罗恩病、牙周骨吸收、溶骨性转移和癌症引起的骨损失的药物。

在一个方面，本披露提供如前一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒在制备用于或预防或治疗与 NGF 或 RANKL 相关的疾病的药物中的用途。在一些实施方案中，所述的与 NGF 或 RANKL 相关的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

在一个方面，本披露提供的如前一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂、如上任一项所述的复溶溶液或如上任一项所述的药盒可用作预防或治疗与 NGF 或 RANKL 相关的疾病的药物。在一些实施方案中，所述的与 NGF 或 RANKL 相关的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

## 附图说明

图 1: DVD-IgG 结构示意图。

图 2A 至图 2D: 图 2A 显示联合用药第 14 天，小鼠疼痛行为统计结果；图 2B 显示联合用药第 21 天，小鼠疼痛行为统计结果；图 2C 显示联合用药第 14 天，小鼠骨损伤评分结果；图 2D 显示联合用药第 21 天，小鼠骨损伤评分结果；其中 vs vehicle \*\*\*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.0001$ ; \*\*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.001$ ; \*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.01$ ; \*表示 vs vehicle,  $P < 0.05$ 。空白对照 (Blank); 假手术组 (Sham); 载剂对照 (vehicle)。

图 3A 至图 3B: 图 3A 显示使用双特异性抗体 1 第 14 天，小鼠疼痛行为统计结果；图 3B 显示使用双特异性抗体 1 第 21 天，小鼠疼痛行为统计结果；其中 vs vehicle \*\*\*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.0001$ ; \*\*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.001$ ; \*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.01$ ; \*表示 vs vehicle,  $P < 0.05$ 。载剂对照 (vehicle)。

图 4A 至图 4D: 图 4A 显示使用双特异性抗体 1 第 15 天，小鼠疼痛行为统计结果；图 4B 显示使用双特异性抗体 1 第 21 天，小鼠疼痛行为统计结果；图 4C 显示使用双特异性抗体 1 第 15 天，小鼠骨损伤评分结果；图 4D 显示使用双特异性抗体 1 第 21 天，小鼠骨损伤评分结果；其中 vs vehicle \*\*\*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.0001$ ;

\*\*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.001$ ; \*\*表示 vs vehicle,  $P < 0.01$ ; \*表示 vs vehicle,  $P < 0.05$ 。  
假手术组 (Sham); 载剂对照 (vehicle)。

## 具体实施方式

### 术语

为了更容易理解本披露, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义, 否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本披露所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代, 除非上下文清楚表明并非如此。

除非上下文另外清楚要求, 否则在专利说明书和权利要求书中, 应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为“包括但不限于”的意义, 而不是排他性或穷举性意义。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生, 该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。

本领域技术人员应当理解, 当参考数值范围、截止值或特定值使用时, “约”可以表示在 1 个或多于 1 个标准偏差之内。或者, “约”可以表示相差最高达 20% 的范围 (即  $\pm 20\%$ )。由于本文所用的许多数值是通过实验确定的, 因此本领域的技术人员应当理解, 此类确定可以在不同实验之间有差异并且通常在不同实验之间有差异。由于这种内在差异, 认为本文所用的值不应受到过度限制。因此, 术语“约”用于涵盖与指定值相差  $\pm 20\%$  或更小的变化、 $\pm 10\%$  或更小的变化、 $\pm 5\%$  或更小的变化、 $\pm 1\%$  或更小的变化、 $\pm 0.5\%$  或更小的变化、或者  $\pm 0.1\%$  或更小的变化。

尽管本披露提供了含量范围或含量值, 但本领域一般技术人员理解, 所述含量范围或含量值涵盖了所测定具体值的可接受误差范围。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

“抗-RANKL 抗体”意指能够与 RANKL 或其表位结合, 并抑制 RANKL 的生物活性及/或抑制 RANKL 的下游通路的抗体。

术语“NGF”, 神经生长因子意指神经生长因子及其保留至少一部分 NGF 的生物活性的变体。当在本文中使用时, NGF 包括所有哺乳动物物种的野生型序列 NGF 或其天然存在的变体, 包括人类、鼠、猴、狗、猫、马或牛。

术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸, 以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸, 以及后来修饰的那些氨基酸, 例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学

结构（即与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的  $\alpha$  碳）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的 R 基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

“抗体”以最广义使用，涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。“天然抗体”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N 至 C 端，每条重链具有一个可变区（VH），又称作可变重域、重链可变区，接着是三个恒定域（CH1、CH2 和 CH3）。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区（VL），又称作可变轻域，或轻链可变域，接着是一个恒定轻域（轻链恒定区、CL）。术语“双特异性抗体”指能够对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原表位特异性结合的抗体（包括抗体或其抗原结合片段，如单链抗体）。

术语“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中涉及抗体结合抗原的域。本文中，抗体重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）各包含四个保守的框架区（FR）和三个互补决定区（CDR）。其中，术语“互补决定区”或“CDR”指可变区内主要促成与抗原结合的区域；“框架”或“FR”是指除 CDR 残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。每个 VH 和 VL 由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。单个 VH 或 VL 可能足以赋予抗原结合特异性。

可以通过各种公知方案来确定 CDR 的氨基酸序列边界，例如：“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等（1991），“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则、“ABM”编号规则、“contact”编号规则（参见 Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001）和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则（Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77（2003）；Front Immunol. 2018 Oct 16;9:2278）等；各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的。本披露的编号规则如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101

LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

除非另有说明，本披露实施例中的可变区和 CDR 序列均适用“Kabat”编号规则。尽管在具体的实施方案中，采用了 Kabat 编号规则来限定氨基酸残基，但是其他编号系统所对应的技术方案将视为等同技术方案。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述双特异性抗体，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。本披露中，“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“药学可接受的载体”或“药学可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时，允许该成分保留生物学活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料。例子包括但不限于任何标准药物载体，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。在一些实施例中，用于气雾剂或肠胃外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水（PBS）或生理（0.9%）盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法配制。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸缓冲剂”是包含组氨酸的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸组氨酸，组氨酸-醋酸组氨酸，组氨酸-磷酸组氨酸，组氨酸-硫酸组氨酸等缓冲剂，优选组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂可由组氨酸与盐酸配制而成，或者由组氨酸与盐酸组氨酸配制而成。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠盐、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠盐。示例性的，所述的琥珀酸-琥珀酸钠可由琥珀酸与氢氧化钠配制而成，或由琥珀酸与琥珀酸钠盐配制而成。

“磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括柠檬酸-磷酸氢二钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是柠檬酸-磷酸氢二钠。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、组氨酸-醋酸组氨酸、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

“泊洛沙姆(poloxamer)”是环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物，其是水溶性的并在药物制剂中用作表面活性剂。泊洛沙姆的实例包括泊洛沙姆 188。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

本披露所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物，优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

稳定的制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度(2-8°C)保存至少3个月、优选6个月、更优选1年，且甚至更优选地多达2年。另外，稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括25°C的温度保存包括2周、4周、1个月、3个月或6个月在内的时段后表现出期望的特征。此外，稳定的液体制剂还包括40°C的温度保存包括2周、4周、1个月、3个月或6个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的例子：通过SEC-HPLC测得，通常不超过约10%、优选不超过约5%的抗体发生聚集或降解。通过视觉分析，制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色澄明液体，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10%变化，优选不超过±5%的变化。所述制剂通常形成不超过约10%、优选不超过约5%的聚集。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过UV光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射(DLS)测得，抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法(其确定蛋白三级结构)和通过FTIR光谱法(其确定蛋白二级结构)来评价。

如果抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和CE-SDS等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或MALDI/TOF/MS结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽

谱法等来评价)。

如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。

“施用”、“给予”和“处理”，当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当其应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本披露的任一种的药物组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床有测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

本披露的药物组合物可通过任何合适的手段施用，包括肠胃外、肺内和鼻内，并且如果需要局部治疗，则病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何适当的途径，例如，通过注射，诸如静脉内或皮下注射。本文考虑多种给药时间方案，包括但不限于，单次或在多个时间点多次施用，推注施用和脉冲输注。在一些实施方案中，本披露的药物组合物通过皮下注射施用。

本披露的药物组合物将以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的起因、试剂的递送部位、施用方法、施用时间安排以及医学从业者已知的其他因素。任选地，药物组合物还可以与用于预防或治疗所述病症的一种或更多种其它试剂一起配制。此类其它试剂的有效量取决于药物组合物中存在的抗原结合分子的量、病症或治疗的类型以及其它因素。可以与本文所述相同的剂量和施用路径使用，或以本文所述剂量的约 1 至 99% 使用，或以任何剂量使

用，并通过经验/临床确定为合适的任何途径使用。

本披露中与 NGF 或 RANKL 相关的疾病没有限制，只要它是与 NGF 或 RANKL 相关的疾病即可，例如利用本披露的抗体诱导的治疗反应可通过结合人类 NGF 或 RANKL，然后阻遏 NGF 或 RANKL 与其受体结合，或杀伤过表达 NGF 或 RANKL 的细胞；或抑制过表达 NGF 或 RANKL 的细胞的生长。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围，本披露的范围由权利要求书限定。

### 实施例-抗 RANKL-NGF 双特异性抗体制备与检测

PCT/CN2022/092333（申请日：2022.05.12；优先权专利申请号：CN202110515444.9）通过援引完整收入本披露。

#### 实施例 1：抗 RANKL 抗体的制备

通过设计引物，构建酵母菌文库。利用 RANKL 蛋白（Sino biological，11682-HNCH）对文库进行富集和筛选，获得候选克隆，通过测序确定克隆中抗体的轻重链可变区的氨基酸序列。得到的示例性的抗 RANKL 抗体的序列如下：

表 2. 抗 RANKL 抗体的 CDR 区序列

D75H	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 1	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 2	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGTT <sup>u</sup> SIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6

表 3. RANKL 抗体可变区序列

抗体名称	重链可变区序列	轻链可变区序列
------	---------	---------

D75H	<p>EVQLLES<span style="text-decoration: underline;">GGGLVQP</span>GGSLRLS                  CAASGFTFSSYAMSWVRQAP                  GKGLEWVSGITGSGG<span style="text-decoration: underline;">STYYAD</span>                  SVKGRFTISRDN<span style="text-decoration: underline;">SKNTLYLQM</span>                  NSLRAEDTAVYYCVKDPG<span style="text-decoration: underline;">TTS</span>                  IMSWFD<span style="text-decoration: underline;">PWGQ</span>GLTVVSS                  SEQ ID NO: 7</p>	<p>EIVLTQSPGTL<span style="text-decoration: underline;">SLSP</span>GERATLSC                  RASQSVRGRYLA<span style="text-decoration: underline;">WYQQ</span>KPGQ                  APRLLIYGASSRATGIPDRFSGS                  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYC                  QQYGSSPRTFGQGTKVEIK                  SEQ ID NO: 8</p>
------	---	---

将上述可变区与人轻链恒定区和重链恒定区融合，形成完整的抗体轻、重链。  
 示例性的抗体的恒定区序列如下：

人 IgG4 重链恒定区：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP  
 PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NNYKTTTPVLDSGDFLYSRLTVDKSRWQEGNMFSCSVMEALHNHYTQKSL  
 SLSLGK

SEQ ID NO: 9;

人 κ 轻链恒定区：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
 SQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
 EC

SEQ ID NO: 10.

示例性的抗 RANKL 抗体的序列如下：

D75H 重链：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGT  
TSIMSWFDPWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDK  
 RVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV  
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL  
 PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSGDFLYSRLTVDKSRWQEGNMFSCSVMEALHNHYTQKSLSL  
 SLGK

SEQ ID NO: 11;

D75H 轻链：

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYG  
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

*QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO: 12。

对照抗 RANKL 抗体的序列如下：

Denosumab 重链序列：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGT  
TVIMSWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP  
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV  
PSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLN  
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13;

Denosumab 轻链序列：

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA  
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFCQQYGGSPRTFGQGTKVEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14。

**实施例 2：抗 RANKL/NGF 双特异性抗体的制备**

本披露中双特异性抗体的结合 NGF 的第二抗原结合结构域可以来源于任意适宜的抗体的抗原结合部分。特别适宜的抗体描述于例如国际申请 WO2004058184A2（通过援引完整收入本文）。

示例性双特异性抗体的结合 NGF 结合域的 CDR 和可变区序列如下所示：

表 4. NGF 结合域的 CDR

HCDR1	GYDLN (SEQ ID NO: 15)	LCDR1	RASQISISNNLN (SEQ ID NO: 18)
HCDR2	IIWGDGTTDYN SAVKS (SEQ ID NO: 16)	LCDR2	YTSRFHS (SEQ ID NO: 19)
HCDR3	GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 17)	LCDR3	QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 20)

NGF 结合域重链可变区：

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW  
GDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATS  
YYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 21;

NGF 结合域轻链可变区:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNNLNWYQKPGKAPKLLIYYTS  
RFHSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 22。

将 NGF 结合域的可变区分别与 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 23 的重链恒定区和 SEQ ID NO: 10 的轻链恒定区融合, 获得抗 NGF 抗体。其序列如下:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVEC  
 PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
 TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS  
 LSPGK

SEQ ID NO: 23;

抗 NGF 抗体 (N-mAb) 重链:

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWRQPPGKGLEWIGIIW  
GDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATS  
YYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
 NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES  
 KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW  
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

SEQ ID NO: 24;

抗 NGF 抗体 (N-mAb) 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNNLNWYQKPGKAPKLLIYYTS  
RFHSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 25;

对照抗 NGF 抗体的序列:

Tanezumab 重链:

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWRQPPGKGLEWIGIIW  
GDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATS  
YYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
 NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV  
 RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW  
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK

*TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*  
SEQ ID NO: 26;

Tanezumab 轻链:

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS  
RFHSGVPSRFRSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO: 27.

针对骨转移适应症，目前靶向 NGF 和 RANKL 单克隆抗体的临床给药剂量相差悬殊。因此，在制备针对 NGF 和 RANKL 的双特异性抗体时，需要平衡双特异性抗体的 NGF 臂和 RANKL 臂的活性，以便确定合适的双特异性抗体的给药剂量，避免因给药剂量过高引起的副作用，或因给药剂量太低，不能发挥双特异性抗体的功能。

本披露制备的双特异性抗体具有 DVD-IgG 结构（如图 1 所示）。将抗 RANKL 抗体和抗 NGF 抗体的轻链可变结构域（VL）直接地，或通过重组 DNA 技术经由短连接子串联连接，随后为轻链恒定结构域。类似地，重链包含串联连接的 2 个重链可变结构域（VH），随后为恒定结构域 CH1 和 Fc 区。其中连接子包括但不限于如下肽连接子：ASTKGP（SEQ ID NO: 28）、TVAAP（SEQ ID NO: 29）。

示例性的双特异性抗体的序列如下：

双特异性抗体 1 的第一链

*EVOLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG  
ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCVKDPGTTSI  
MSWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPQVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGFSLIG  
YDLNWRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVT  
AADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST  
SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
SSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK  
DTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSRL  
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK*

SEQ ID NO: 30;

双特异性抗体 1 的第二链

*EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA  
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYGSSPRTFGQGTKVEIKT  
VAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT  
SRFHSGVPSRFRSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIK  
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE*

SVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 31。

注：序列中单下划线为 RANKL 抗体可变区，双下划线为 NGF 抗体可变区，粗体为连接子，其余序列为恒定区。

## 测试例

### 测试例 1. 抗 RANKL 抗体亲和力测试

用生物传感芯片 Protein A (GE, 29127556) 亲和捕获一定量的待测抗体，然后于芯片表面流经一系列浓度梯度的抗原：人 RANKL 蛋白 (Sino Biological, 11682-HNCH)，人 NGF 蛋白 (Sino biological, 11050-HNAC)，利用 Biacore 实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后，用 pH 1.5 的甘氨酸-盐酸再生溶液 (GE, BR-1003-54) 将生物芯片洗净再生。实验数据用 BIAevaluation version 4.1 软件以 1: 1 模型进行拟合，从而得出亲和力数值。结果如下表 5 所示。

表 5. 抗 RANKL 抗体的亲和力 KD 值

抗体	对人 RANKL 的亲和力			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	亲和力比值 (相对于 Denosumab 亲和力 提高的倍数)
D75H	5.24E+04	7.73E-05	1.48E-09	6.24
Denosumab	1.90E+04	1.75E-04	9.24E-09	1.00

结果显示，改造后的抗体 D75H 的亲和力比 Denosumab 抗体提高了 6 倍以上。

### 测试例 2: 抗 RANKL 抗体阻断 RANKL 与 RANK 结合的能力检测

通过 ELISA 的方法检测抗体阻断配体和受体结合的活性。用 pH7.4 的 PBS (源培生物, B320) 缓冲液将人 RANK 蛋白稀释至 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 100  $\mu\text{L}$ /孔的体积加入 96 孔酶标板 (Corning, 3590) 中，4 $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。弃去液体后，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  1% Casein 封闭液 (Thermo, 37528) 进行封闭，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液 (pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20) 洗板 3 次后备用。将固定浓度的生物素 (Biotin) 标记的人 RANKL 蛋白 (Sino Biological, 11682-HNCH) 与梯度稀释的抗体混合后 37 $^{\circ}\text{C}$  预孵育 30 分钟后加入封闭好的酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  链霉亲和素-HRP (Invitrogen, 434323, 1: 4000 稀释)，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小时。去上清，用 PBST 洗板 3 次后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色底物 (KPL, 5120-0077)，室温孵育 10 至 15 分钟。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，用软件拟合出抑制配体和受体结合的曲线，计算出  $\text{IC}_{50}$  值。结果见下表 6。

表 6. 抗 RANKL 抗体阻断 RANKL 与 RANK 结合的能力

抗体名称	阻断 RANKL 与 RANK 结合 IC <sub>50</sub> (nM)
D75H	0.2964
Denosumab	0.5324

结果显示, 抗 RANKL 抗体 D75H 可阻断 RANKL 与 RANK 结合, 其阻断活性优于 Denosumab 抗体。

### 测试例 3: ELISA 检测双特异性抗体与不同种属抗原的结合活性

用 ELISA 方法检测本披露的双特异性抗体与人 RANKL (Sino biological, 11682-HNCH)、猴 RANKL (Sino Biological, 90301-C01H)、鼠 RANKL (R&D Systems, 462-TR/CF) 和人 NGF (猴 NGF 序列与人 NGF 完全相同) (Sino biological, 11050-HNAC)、鼠 NGF (Sino Biological, 50385-MNAC) 的结合活性, 方法如下:

用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 (源培生物, B320) 将抗原稀释至 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 以 100  $\mu\text{L}$ /孔的体积加入 96 孔酶标板 (Corning, 9018) 中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。弃去液体后, 加入用 PBS 稀释的 5% 脱脂牛奶 (BD, 232100) 封闭液 300  $\mu\text{L}$ /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液 (pH 7.4 PBS 含 0.1% tween-20) 洗板 3 次后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  用样品稀释液 (pH 7.4 PBS 含 1% BSA) 稀释的不同浓度的双特异性抗体, 放于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  用样品稀释液稀释的 HRP 标记的抗人 Fc 二抗 (Abcam, ab97225), 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色底物 (KPL, 5120-0077), 于室温孵育 10 至 15 min, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 用酶标仪在 450 nm 处读取吸收值, 计算双特异性抗体结合抗原的 EC<sub>50</sub> 值, 结果如下表 7 所示。

表 7. 双特异性抗体与不同种属抗原的结合 EC<sub>50</sub>

抗体	ELISA EC <sub>50</sub> (nM)				
	人 RANKL	猴 RANKL	鼠 RANKL	人 (猴) NGF	鼠 NGF
双特异性抗体 1	0.06245	0.4666	不结合	12.27	4.344
Denosumab	0.1277	2.129	不结合	不结合	不结合
Tanezumab	不结合	不结合	不结合	2.270	1.151

结果显示, 双特异性抗体 1 对人 RANKL 和猴 RANKL 的结合活性都优于对照 Denosumab 抗体。但双特异性抗体 1 和 Denosumab 都不与鼠 RANKL 交叉结合。双特异性抗体 1 对人 NGF 和鼠 NGF 的结合活性均明显的弱于 Tanezumab, 表明本披露的双特异性抗体 1 成功的降低了 Tanezumab 端 (特异性结合 NGF 的第二抗原结合域) 的结合活性。

#### 测试例 4: 双特异性抗体亲和力测试

用生物传感芯片 Protein A (GE, 29127556) 亲和捕获一定量的待测抗体, 然后于芯片表面流经一系列浓度梯度的抗原: 人 RANKL 蛋白 (Sino Biological, 11682-HNCH), 人 NGF 蛋白 (Sino biological, 11050-HNAC), 利用 Biacore 实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后, 用 pH 1.5 的甘氨酸-盐酸再生溶液 (GE, BR-1003-54) 将生物芯片洗净再生。实验数据用 BIAevaluation version 4.1 软件以 1: 1 模型进行拟合, 从而得出亲和力数值。结果如下表 8 所示。

表 8. 双特异性抗体与不同抗原的亲和力

抗体	对人 RANKL 的亲和力			对人 NGF 的亲和力		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
双特异性抗体 1	2.25E+04	8.77E-05	3.89E-09	1.13E+03	6.33E-05	5.61E-08
Denosumab	1.04E+04	1.53E-04	1.47E-08	/	/	/
Tanezumab	/	/	/	1.29E+06	1.84E-04	1.42E-10

结果显示, 双特异性抗体 1 对人 RANKL 的亲和力是 Denosumab 的 3.8 倍, 双特异性抗体 1 对人 NGF 的亲和力显著低于 Tanezumab。

#### 测试例 5: 配体和受体的阻断实验

通过 ELISA 的方法检测抗体对配体和受体的阻断活性。用 pH7.4 的 PBS (源培生物, B320) 缓冲液将受体蛋白 (RANK 或 TrkA) 稀释至 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 以 100  $\mu\text{L}$ /孔的体积加入 96 孔酶标板 (Corning, 3590) 中, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。弃去液体后, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  1% Casein 封闭液 (Thermo, 37528) 进行封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液 (pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20) 洗板 3 次后备用。将固定浓度的生物素 (Biotin) 标记的配体蛋白 (RANKL 或 NGF) 与梯度稀释的抗体或融合蛋白混合后 37 $^{\circ}\text{C}$  预孵育 30 分钟后加入封闭好的酶标板中, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP (Invitrogen, 434323, 1: 4000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小时。去上清, 用 PBST 洗板 3 次后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色底物 (KPL, 5120-0077), 室温孵育 10 至 15 分钟, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值, 用软件拟合出抑制配体和受体结合的曲线, 计算出  $\text{IC}_{50}$  值。

实验中所用配体和受体蛋白信息如下: 人 RANKL 蛋白 (Sino Biological, 11682-HNCH), 人 RANK 蛋白 (Sino Biological, 16078-H02H), 人 TrkA 蛋白 (Sino Biological, 11073-H03H), 人 NGF 蛋白 (Sino biological, 11050-HNAC)。

实验结果如下表 9 所示。

表 9. 双特异性抗体的阻断活性

抗体	阻断 RANKL 和 RANK 结合	阻断 NGF 和 TrkA 结合
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)
双特异性抗体 1	0.3225	102.1
Denosumab	0.5585	/
Tanezumab	/	3.663

结果显示，双特异性抗体 1 对 RANKL 的阻断活性优于 Denosumab，对 NGF 的阻断活性显著地弱于 Tanezumab。这表明通过降低双特异性抗体 1 NGF 端的结合活性，也显著降低了其对 NGF 的阻断活性。

### 测试例 6：破骨细胞分化实验

RANKL 的主要功能是促进破骨细胞的分化和成熟，因此通过破骨细胞分化实验可以测试抗体对 RANKL 的抑制活性。实验方法如下：

将 Raw264.7 细胞 (ECACC, 91062702) 铺在 96 孔细胞培养板 (Corning, 3599) 中，37°C 培养箱中过夜培养。第二天，在 96 孔细胞板中加入固定浓度的人 RANKL 蛋白 (Sino Biological, 11682-HNCH) 和梯度稀释的待测双特异性抗体，37°C 培养 4 天。将 96 孔板取出，除去上清液，每孔加入 100  $\mu$ L 细胞裂解液 (碧云天, P0013J)，吹打混匀后将细胞裂解液转移至离心管中，冰上放置 10 分钟，离心取上清液。参考抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒 (碧云天, P0332) 中的方法，取 40  $\mu$ L 待测样本加 40  $\mu$ L 显色底物和 5  $\mu$ L 酒石酸，混合均匀，置于 37°C 培养箱中孵育 10 min，加入 160  $\mu$ L 终止液，用酶标仪检测 OD 405nm 的数值，用软件对数据进行拟合获得 IC<sub>50</sub> 值。实验结果如下表 10 所示。

表 10. 双特异性抗体抑制破骨细胞分化的活性

抗体	IC <sub>50</sub> (nM)
双特异性抗体 1	1.193
Denosumab	3.917

结果显示，双特异性抗体 1 抑制破骨细胞分化的活性是 Denosumab 的 3.3 倍以上。

### 测试例 7：TF-1 细胞增殖实验

NGF 在体外可以促进 TF-1 细胞的增殖，因此通过 TF-1 细胞增殖实验评价抗体对 NGF 的抑制活性。实验方法如下：

用无 GM-CSF 的 1640 培养基 (Gibco, 22400-105) 重悬 TF-1 细胞 (ATCC, CRL-2003) 并铺在 96 孔细胞培养板 (Corning, 3903) 中，37°C 培养箱中过夜培养。第二天在 96 孔细胞板中加入固定浓度的人 NGF 蛋白 (Sino biological, 11050-HNAC) 和梯度稀释的待测抗体，37°C 培养箱中培养 72 小时。取出细胞培

养板，每孔加入 50 $\mu$ L Cell-titer Glo (Promega, G755B) 溶液，轻轻晃动混匀 10 分钟，室温静置 10 分钟，用 PE Victor 3 检测生物发光信号。用软件对数据进行拟合获得 IC<sub>50</sub> 值。实验结果如下表 11 所示。

表 11. 双特异性抗体抑制 TF-1 细胞增殖的活性

抗体	IC <sub>50</sub> (nM)
双特异性抗体 1	3.159
Tanezumab	0.7589

结果显示，双特异性抗体 1 依然可以抑制 TF-1 细胞增殖，其中 Tanezumab 抑制活性是双特异性抗体 1 的约 4.2 倍，说明双特异性抗体 1 显著降低了 NGF 端的活性。

因此，在体外活性与给药剂量具有相关性的前提下，我们预期双特异性抗体 1 的 RANKL 端的给药剂量可以降低到 40 mg 左右，依然可以保持 RANKL 端的体内药效；而 NGF 端的给药剂量可以提升到 80 mg 左右，依然可以保持较好的安全性。此外，目前临床中针对 NGF 的抗体 Tanezumab 的给药周期是抗 RANKL 抗体 Denosumab 的 2 倍，因此本披露中示例性的双特异性抗体 1 可以使两个靶点的给药剂量达到平衡。

#### 测试例 8：骨转移动物模型体内药效

用骨转移动物模型来评价抗体的止痛和骨保护效果。

模型的构建方法为：雄性 C57 BL/6 小鼠，SPF 级，购自常州卡文斯实验动物有限责任公司。于实验室环境适应性饲养，给予 12/12 小时光/暗周期调节，温度 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C，湿度 40 至 50%，动物均给予标准灭菌鼠饲料，自由进食饮水。小鼠体重达到 25 g 左右开始造模。

用 1% 巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠后备皮，把小鼠放在加热垫上，用眼科剪在左后肢膝盖外侧皮肤上平行于股骨方向切开 1 厘米，暴露出肌肉，钝性分离皮肤和肌层。用眼科剪刀以结缔组织线为导向，在股直肌和股内侧肌之间切开，用弯镊将股直肌和髌骨移至膝关节内侧，暴露股骨髌且不要切断髌骨韧带。用直径 0.45 mm 的针头在踝窝处股骨顶部至中部开孔，进入髓内间隙 1 至 1.5 cm 打开注射通道。用 Hamilton 微量注射器 (50  $\mu$ L, 型号 Model 1705 RN SYR, 26 号针头, 型号 ga26/51 mm/pst3, 货号 7768-02) 从开孔处插入骨髓腔并缓慢注射 10 $\mu$ L ( $5 \times 10^4$ ) LLC1 细胞 (ATCC, CRL-1642)。推注完成后拔出注射器针头，将腿拉直并用弯镊将髌骨与韧带复位，将肌肉恢复原状，洒上抗生素粉末，再用自动伤口夹 (Roboz, Reflex 7 Clip 7 mm) 缝合外皮。术后动物尽量不多于三只一笼饲养，七天后取下伤口夹。假手术组 (Sham) 操作同上，于骨髓腔注射相同体积的 PBS；空白组正常饲养不进行任何处理。造模 7 天后开始给药，每 5 天给药一次，总共给药 3 次，分别在第 14 天 (或第 15 天) 和第 21 天对小鼠的疼痛行为进行统计和腿骨损伤进

行评分。

疼痛行为统计方法：动物被放置在四周为有机玻璃，下面是铁丝网格的地板上，先适应 30 分钟（直到动物在盒子里的探索和主要梳理活动停止），然后观察它们的运动情况，并评估 5 分钟内出现的躲避患肢疼痛的行为，用秒表测定时长。

躲避疼痛的行为被定义为：

- (1) 完整的保护（行走时抬起患肢，不落地负重）；
- (2) 患肢五指蜷缩，会戳穿网格（正常鼠的四肢应为五指伸展，平摊在网格上，用前脚掌发力支撑。肿瘤骨转移小鼠的患肢会五指蜷缩，如此时能用后脚跟着地支撑，则认为疼痛较轻，不计入测定时间，如全脚掌均不与网格接触或戳穿网格，则计入测定时间）；
- (3) 舔舐患侧肢体；
- (4) 零星的单脚跳跃；
- (5) 单侧后肢的站立（两前肢抬起的情况下）。

骨损伤评分方法：

小心剥取俯卧位左侧股骨，采用 MX-20 digital cabinet X-ray system (Faxitron/Bioptics) 检测骨破坏情况，由一位固定的专业人士对骨损伤进行评分。

评分标准如下：

0-相对正常，1-轻微-局部损伤，2-中度-局部损伤，3-中度-多处损伤，4-重度-弥漫性损伤。对股骨远端和股骨近端分别评分后相加，骨破坏最严重时计为 4+4=8 分。

1. RANKL 拮抗剂和 NGF 拮抗剂对止痛和骨保护的效果测试

由于 Denosumab 对鼠 RANKL 没有交叉结合活性，因此我们利用鼠 RANKL 抗体 AMR2 与 Tanezumab 联用，评估两种抗体联用的体内药效是否优于一种抗体。

AMR2 抗体的可变区序列来源于 WO2013176469A1，将可变区重轻链序列分别与人 IgG4 和人 λ 恒定区融合构建成全长抗体 AMR2。AMR2 的相关序列如下：

表 12. AMR2 抗体的 CDR

HCDR1	DYDMS (SEQ ID NO: 32)	LCDR1	TGSSSNIGNNAVS (SEQ ID NO: 35)
HCDR2	WIYPSGGSIYYADSVKGG (SEQ ID NO: 33)	LCDR2	SDRHRPS (SEQ ID NO: 36)
HCDR3	SGLTRTRWPIYYADGMDV (SEQ ID NO: 34)	LCDR3	GSWDASLSGYV (SEQ ID NO: 37)

AMR2 重链可变区：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVS  
WIYPSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGLTRT  
RWPIYYADGMDVWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 38;

AMR2 轻链可变区:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSD  
RHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGTK  
 LTVL

SEQ ID NO: 39;

AMR2 重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVS  
WIYPSGGSIIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGLTRT  
RWPIYYADGMDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD  
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD  
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD  
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
 NVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLGK

SEQ ID NO: 40;

AMR2 轻链

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSD  
RHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGTK  
LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA  
GVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC  
 S

SEQ ID NO: 41。

分组及给药量如下表 13 所示:

表 13. 分组及给药量

分组	小鼠 (只)	抗体	剂量 (mpk)	给药频率	给药方法
1	12	Vehicle	/	Q5d*3	i.p.
2	12	Tanezumab	10	Q5d*3	i.p.
3	12	AMR2	20	Q5d*3	i.p.
4	12	Tanezumab + AMR2	10 + 20	Q5d*3	i.p.
假手术组 (Sham)	10	/	/	/	/
空白对照组 (Blank)	10	/	/	/	/

注: Q5d\*3 表示每 5 天给药一次, 总共 3 次; i.p.表示腹腔注射给药。

实验结果如下图 2A 至图 2D 所示。

小鼠的疼痛行为统计结果表明, 在第 14 天, 与阴性组相比, 三个给药组都显示出了显著的止痛效果, 其中联合给药组的止痛效果要强于单抗组。在第 21 天,

只有联合给药组显示出了显著的止痛效果，两个单抗组虽然也表现出了一定的止痛效果，但跟阴性组相比没有显示出统计学差异 (vs vehicle: \*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.0001)。

骨损伤的评分结果表明,在第 14 天,联合给药组表现出了一定的骨保护效果。在第 21 天,联合给药组显示出了显著的骨保护效果。综合以上实验结果表明,联合给药组在止痛和骨保护两个方面都显示出了药效。因此,发明人之后进一步验证了本披露的双特异性抗体分子在体内的药效。

## 2. 双特异性抗体 NGF 端体内药效的评价

由于双特异性抗体 1 的 NGF 端的体外活性与 NGF 单抗 Tanezumab 相比,降低了 4 倍左右,因此,通过该药效实验确定双特异性抗体 1 的 NGF 端在小鼠体内是否依然具有药效。实验分组如下表所示:

表 14. 给药剂量和分组

分组	小鼠 (只)	药物	剂量 (mpk)	给药频率	给药方式
1	12	Vehicle	/	Q5d	i.p.
2	12	双特异性抗体 1	13.5	Q5d	i.p.

注: Q5d 表示每 5 天给药一次; i.p.表示腹腔注射给药。

实验结果见图 3A 至图 3B 所示。

结果显示,给药后第 14 天和 21 天,与阴性组相比,双特异性抗体 1 都显示出了显著的止痛效果,说明双特异性抗体 1 的 NGF 端依然具有显著的药效。

## 3. 双特异性抗体的体内药效评价

用人 RANKL 转基因鼠 (购自百奥赛图) 构建骨转移动物模型,以评价双特异性抗体的体内药效。实验分组如下表 15 所示:

表 15. 给药剂量和分组

分组	小鼠 (只)	药物	剂量 (mpk)	给药频率	给药方式
1	10	Sham	-	Q5d	i.p.
2	10	Vehicle	-	Q5d	i.p.
3	14	双特异性抗体 1	5.4	Q5d	i.p.
4	14		21.6	Q5d	i.p.

注: Q5d 表示每 5 天给药一次; i.p.表示腹腔注射给药。

实验结果见图 4A 至图 4D 所示。

结果显示,双特异性抗体 1 显示出了明显的止痛和骨保护效果。第 15 天和第 21 天,双特异性抗体 1 的高剂量组都显示出了显著的止痛效果,并且高低剂量组都显示出对骨损伤具有明显的保护效果。

## 测试例 9: 大鼠 PK 测试

用 SD 大鼠进行体内药代动力学测试。雄性 SD 大鼠 (浙江维通利华实验动物技术有限公司) 分组,每组 4 只,静脉注射给药,双特异性抗体 1 的剂量为 4 mg/kg,

给药组于给药前及给药后 5 分钟、8 小时、24 小时、48 小时、84 小时、9 天、10 天、14 天、21 天、28 天采集全血 0.2 mL，不加抗凝。取血后在 4℃放置 30 分钟，1000 g 离心 15 分钟，取上层血清置于 EP 管中，于-80℃保存。

用 ELISA 法检测血清中的血药浓度，用 Winnolin 软件计算待测抗体的药代动力学参数，检测结果如下所示：

表 16. 双特异性抗体 1 的 PK 结果

检测项	RANKL 臂	NGF 臂
t <sub>1/2</sub> (天)	15.09	14.30

结果显示，双特异性抗体 1 在大鼠中的 PK 表现很好，RANKL 和 NGF 两端的半衰期比较接近，分别为 15.09 天和 14.3 天。

### 制备实施例-抗 RANKL-NGF 双特异性抗体制剂

#### 示例性抗体药物组合物（制剂）制备工艺

第一步：RANKL-NGF 双特异性抗体与稳定剂配制成含该抗体的制剂原液，经 0.22μm 滤芯除菌过滤，收集滤液。

第二步：调节装量（目标装量为 1.0mL/瓶），选用西林瓶进行灌装，分别于灌装开始、灌装中间、灌装结束时取样检测装量差异。

第三步：开启轧盖机，加铝盖，进行轧盖。

第四步：目检，确认产品无装量不准、外观不良等缺陷。打印纸盒标签，折叠纸盒，装盒，贴纸盒标签。

#### 外观：

采用目视法，将样品瓶擦拭干净，在 1000~1500lx 的光照强度下，分别于澄明度检测仪白背景和黑背景下观察样品颜色、澄清度和可见异物。

外观检测仪器：精拓仪器 YB-2A 澄明度检测仪。

#### 溶解温度（T<sub>m</sub>）和聚集温度（T<sub>agg</sub>）：

T<sub>m</sub> 为蛋白质在升温过程中，50%组分变性时所对应的温度；T<sub>agg</sub> 为蛋白在升温过程中发生聚集时对应的温度。将样品加载到 Uni 管中，以 25-95℃的热升温运行测定。

T<sub>m</sub> 和 T<sub>agg</sub> 测定仪器：Uncle，仪器厂家为 Unchained。

#### SEC 分子排阻色谱法：

根据凝胶孔隙的孔径大小与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分析方法。

SEC%（SEC 单体含量百分比）=A 单体/A 总×100%（A 单体为样品中主峰单体的峰面积，A 总为所有峰面积之和）。ΔSEC%=稳定性实验后制剂的 SEC%-稳定性实验前制剂的 SEC%。

SEC 测定用仪器：安捷伦 HPLC 1260。

柱子：Tosoh, TSKgel G3000SWXL (7.8 mm ×30 cm, 5μm)。

**NR-CE 毛细管凝胶电泳：**

将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳，并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。

NR-CE%（非还原 CE 纯度百分比）=A 主峰/A 总×100%（A 主峰为样品中主峰的峰面积，A 总为所有峰面积之和。）ΔNR-CE%=稳定性实验后制剂的 NR-CE%-稳定性实验前制剂的 NR-CE%。

CE 测定用仪器：Beckman 毛细管电泳仪，型号 PA800 plus。

**icIEF 成像毛细管等电聚焦电泳：**

以毛细管为分离通道，在毛细管两端加上直流电压，毛细管内两性电解质溶液形成一定范围的 pH 梯度，各组分依据所带电荷差异迁移至各自等电点，聚焦成很窄的区段，以此实现组分的分离。

icIEF%（主峰含量百分比）=A 主峰峰面积/A 总面积×100%（A 总面积为酸性峰、主峰和碱性峰面积之和）。Δ icIEF %=稳定性实验后制剂的 icIEF%-稳定性实验前制剂的 icIEF %。

icIEF 测定用仪器：Protein Simple，型号 Maurice。

以下制剂的制备实施例中所采用的 RANKL-NGF 双特异性抗体为如上所述的双特异性抗体 1，有时简称“抗体”。

### 制备实施例 1. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂 pH 筛选

选择 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲体系，设计 4.2、4.6、5.0、5.4、5.8、6.2、6.6、7.0、7.4、7.8 共 10 个不同 pH，制备 RANKL-NGF 双特异性抗体浓度为 20mg/mL 的共 10 组处方抗体制剂，测定样品的熔解温度（T<sub>m</sub>），考察抗体在不同 pH 条件的构象稳定性，测定样品的聚集温度（T<sub>agg</sub>），考察抗体在不同 pH 条件的胶体稳定性。同时通过测定样品在 40℃ 条件下外观、SEC、NRCE 等，考察抗体在不同 pH 条件下的热稳定性。

- 1) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH4.2;
- 2) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH4.6;
- 3) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH5.0;
- 4) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH5.4;
- 5) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH5.8;
- 6) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH6.2;
- 7) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH6.6;
- 8) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH7.0;
- 9) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠，pH7.4;

10) 10mM 柠檬酸-磷酸氢二钠, pH7.8。

表 17. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂 pH 筛选结果 1

序号	pH	Tm (°C)	Tagg(°C)
1	4.2	66.06	63.58
2	4.6	69.10	64.81
3	5.0	69.60	64.97
4	5.4	68.81	64.96
5	5.8	68.34	64.12
6	6.2	67.26	63.39
7	6.6	66.06	62.78
8	7.0	65.06	62.45
9	7.4	63.39	62.58
10	7.8	60.21	62.09

表 18. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂 pH 筛选结果 2

序号	外观			
	颜色	澄清度	可见异物	
	T0/40°C	T0/40°C	T0	40°C-7 天
1	无色	微乳光	无可见微粒或异物	少量蛋白颗粒
2	无色	微乳光	无可见微粒或异物	少量蛋白颗粒
3	无色	微乳光	无可见微粒或异物	少量蛋白颗粒
4	无色	微乳光	无可见微粒或异物	少量蛋白颗粒
5	无色	微乳光	无可见微粒或异物	大量蛋白颗粒
6	无色	微乳光	无可见微粒或异物	大量蛋白颗粒
7	无色	微乳光	无可见微粒或异物	大量蛋白颗粒
8	无色	微乳光	无可见微粒或异物	大量蛋白颗粒
9	无色	微乳光	无可见微粒或异物	大量蛋白颗粒
10	无色	微乳光	无可见微粒或异物	大量蛋白颗粒

表 19. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂 pH 筛选结果 3

序号	SEC-HPLC				NRCE			
	聚体%		单体%		主峰%		碎片%	
	T0	40°C-7 天	T0	40°C-7 天	T0	40°C-7 天	T0	40°C-7 天
1	1.8	3.7	97.8	95.7	96.8	95.9	3.2	4.1

序号	SEC-HPLC				NRCE			
	聚体%		单体%		主峰%		碎片%	
	T0	40°C-7天	T0	40°C-7天	T0	40°C-7天	T0	40°C-7天
2	1.7	1.8	97.9	97.6	97.6	95.8	2.4	4.2
3	1.6	1.8	97.9	97.7	97.5	96.2	2.5	3.8
4	1.6	1.6	98.0	98.0	97.5	96.6	2.5	3.4
5	1.6	1.7	98.0	97.9	97.5	96.6	2.5	3.4
6	1.6	1.8	98.0	97.8	96.8	96.3	3.2	3.7
7	1.5	1.8	98.1	97.8	97.1	96.0	2.9	4.0
8	1.6	2.2	98.0	97.4	96.4	96.3	3.6	3.7
9	1.7	3.1	97.9	96.5	96.4	95.5	3.6	4.5
10	1.9	4.1	97.7	95.5	95.7	95.8	4.3	4.2

结果显示：RANKL-NGF 双特异性抗体在 pH4.6~5.4 条件下 Tm 值和 Tagg 值较高，表明该抗体在该 pH 范围体系中构象稳定性和胶体稳定性较好；在高温（40°C）条件考察 1 周后，pH4.2~5.4 范围处方的外观出现少量可见蛋白颗粒，而在其它 pH 条件下则出现大量蛋白颗粒。纯度方面：除 pH 4.2、7.4 和 7.8 体系中的蛋白经 40°C 孵育 7 天后出现明显聚集，pH7.0 出现少量聚集外，其余 pH 体系中的蛋白均无明显聚集且组间无显著差异。NRCE 结果显示，pH 4.6-5.8 体系中的蛋白在 T0 时碎片含量相对较低，其中 pH5.0~5.8 在经 40°C 孵育 7 天后碎片比例低于 4%，综合上述样品的分子特性、外观和 SEC 结果可得，抗体在 pH 4.6-5.4 体系中表现最好，故选择中间值 pH 5.0 作为优选 pH 条件以进行后续研究。

### 制备实施例 2. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂缓冲体系筛选

选择 pH4.8 和 pH5.2 的 10mM 醋酸-醋酸钠、pH5.2 的 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸三组缓冲体系，以 75mg/mL 蔗糖作为稳定剂，RANKL-NGF 双特异性抗体浓度为 20mg/mL，制备共 3 组处方样品。通过检测样品外观、SEC-HPLC、NRCE 和 iCIEF 纯度等，考察 3 组处方在高温（40°C）放置 2 周、25°C 放置 2 周和 4 周、2~8°C 放置 2 周和 4 周、反复冻融（-35°C 和室温）循环 3 次和 5 次等条件下的稳定性，以筛选最适缓冲体系。

- 1) 10mM 醋酸-醋酸钠，pH4.8，75mg/mL 蔗糖，20mg/mL 抗体；
- 2) 10mM 醋酸-醋酸钠，pH5.2，75mg/mL 蔗糖，20mg/mL 抗体；
- 3) 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸，pH5.2，75mg/mL 蔗糖，20mg/mL 抗体。

表 20. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂缓冲体系筛选结果 1

序	外观
---	----

号	颜色	澄清度								可见异物									
		T0	2~8℃		25℃		40℃		冻融		T0	2~8℃		25℃		40℃		冻融	
			2周	4周	2周	4周	2周	3次	5次	2周		4周	2周	4周	2周	3次	5次		
			2周	4周	2周	4周	2周	3次	5次	2周		4周	2周	4周	2周	3次	5次		
1	无色	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	无可见微粒或异物	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	
2	无色	微乳光	微乳光	微乳光	乳光	乳光	乳光	微乳光	微乳光	无可见微粒或异物	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	
3	无色	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	无可见微粒或异物	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	大量蛋白颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	少量细小颗粒	

表 21. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂缓冲体系筛选结果 2

序号	SEC-HPLC																	
	T0	聚体%								单体%								
		2~8℃		25℃		40℃		冻融		T0	2~8℃		25℃		40℃		冻融	
		2周	4周	2周	4周	2周	3次	5次	2周		4周	2周	4周	2周	3次	5次		
1	1.9	1.7	1.7	1.4	1.4	1.6	1.8	1.8	97.6	97.8	97.8	98.0	98.1	97.8	97.6	97.7		
2	1.8	1.6	1.6	1.3	1.3	1.4	1.8	1.8	97.6	97.8	98.0	98.1	98.2	97.9	97.7	97.6		
3	1.9	1.6	1.5	1.3	1.3	1.5	1.8	1.7	97.7	97.9	98.0	98.2	98.2	97.9	97.7	97.8		

表 22. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂缓冲体系筛选结果 3

序号	NRCE (Caliper)																	
	T0	主峰%								碎片%								
		2~8℃		25℃		40℃		冻融		T0	2~8℃		25℃		40℃		冻融	
		2周	4周	2周	4周	2周	3次	5次	2周		4周	2周	4周	2周	3次	5次		
1	96.8	96.8	96.6	96.5	96.5	95.8	96.2	96.5	3.2	3.2	3.4	3.5	3.5	4.2	3.8	3.5		
2	95.8	96.9	96.9	96.5	96.7	95.8	95.9	96.6	4.2	3.1	3.1	3.5	3.3	4.2	4.1	3.4		
3	96.5	96.7	96.9	96.7	96.4	94.7	96.3	96.8	3.5	3.3	3.1	3.3	3.6	5.3	3.7	3.2		

表 23. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂缓冲体系筛选结果 4

序号	iCIEF																							
	T0	酸峰%								主峰%				碱峰%										
		2~8℃		25℃		40℃		冻融		T0	2~8℃		25℃		40℃		冻融							
		2周	4周	2周	4周	2周	3次	5次	2周		4周	2周	4周	2周	3次	5次								
1	34.4	29.6	30.0	30.3	31.0	35.2	29.7	30.0	52.2	57.3	57.2	58.0	58.8	51.0	56.9	56.7	13.4	13.1	12.9	11.7	10.2	13.8	13.3	13.3
2	34.0	29.7	29.1	30.5	31.2	35.9	30.2	29.9	52.8	56.8	57.5	58.1	58.7	51.5	56.6	56.5	13.1	13.5	13.3	11.4	10.1	12.6	13.3	13.7
3	33.8	29.9	30.0	30.5	31.9	35.9	29.8	29.6	53.2	56.7	56.9	57.7	57.6	50.3	56.7	56.9	13.0	13.4	13.2	11.8	10.5	13.9	13.5	13.5

结果显示: 25°C和 40°C孵育 2 周, 10mM 醋酸-醋酸钠 pH5.2 体系中的蛋白呈乳光, 10mM 醋酸-醋酸钠 pH4.8 体系中的蛋白呈微乳光, 两个处方均出现少量蛋白颗粒; 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH5.2 体系中的蛋白经 40°C孵育 2 周后出现大量蛋白颗粒, 从外观结果来看, 蛋白在 10mM 醋酸-醋酸钠缓冲体系中的稳定性更好。纯度方面: 各组处方在不同稳定性条件下的聚体、单体、碎片比例与 T0 相比无显著变化且组间无差异, 表明 SEC-HPLC 纯度稳定性均较好; 在高温条件下, 与醋酸盐缓冲体系相比, 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸体系 NRCE 碎片增加更明显; iCIEF 检测结果显示各处方无明显差异。综上, 选择 10mM 醋酸-醋酸钠缓冲体系进行后续处方开发。

### 制备实施例 3. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂浓度和稳定剂筛选

为保证缓冲体系更好的 pH 缓冲效果, 将缓冲体系浓度提高至 20mM。选择选择 20mM 醋酸-醋酸钠, pH5.0 作为缓冲体系, 选择 0.2mg/mL 聚山梨酯 80 作为表面活性剂, 选择 75mg/mL 蔗糖或 240mM 脯氨酸或 0.8% (w/v) 氯化钠作为稳定剂, 抗体浓度分别为 20 mg/mL、50mg/ mL、70 mg/mL, 共制备 5 组处方样品, 考察样品在振荡 (300rpm/25°C)、反复冻融 (-35°C/室温)、高温 (40°C)、25°C 和光照条件下的稳定性。

1) 20mM 醋酸-醋酸钠, pH5.0, 75mg/mL 蔗糖, 0.2mg/mL 聚山梨酯 80, 50mg/mL 抗体;

2) 20mM 醋酸-醋酸钠, pH5.0, 240mM 脯氨酸, 0.2mg/mL 聚山梨酯 80, 50mg/mL 抗体;

3) 20mM 醋酸-醋酸钠, pH5.0, 0.8% (w/v) 氯化钠, 0.2mg/mL 聚山梨酯 80, 50mg/mL 抗体;

4) 20mM 醋酸-醋酸钠, pH5.0, 75mg/mL 蔗糖, 0.2mg/mL 聚山梨酯 80, 20mg/mL 抗体;

5) 20mM 醋酸-醋酸钠, pH5.0, 75mg/mL 蔗糖, 0.2mg/mL 聚山梨酯 80, 70mg/mL 抗体。

表 24. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂浓度和稳定剂筛选-结果 1

序号	外观							
	T0	振荡 3 天	光照 5 天	冻融 3 次	冻融 5 次	25°C- 4 周	40°C- 2 周	40°C- 4 周
1	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒							
2	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒							
3	无色, 乳光, 无可见蛋白颗粒							
4	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒							

序号	外观							
	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 3次	冻融 5次	25℃- 4周	40℃- 2周	40℃- 4周
5	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒							

表 25. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂浓度和稳定剂筛选-结果 2

序号	SEC-HPLC															
	聚体%								单体%							
	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 3次	冻融 5次	25℃ 4周	40℃ 2周	40℃ 4周	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 3次	冻融 5次	25℃ 4周	40℃ 2周	40℃ 4周
1	1.5	1.4	1.6	1.5	1.5	1.3	1.7	2.2	98.1	98.2	98.0	98.1	98.1	98.2	97.8	96.3
2	1.5	1.3	1.5	1.5	1.4	1.3	1.7	2.1	98.1	98.2	98.0	98.1	98.1	98.2	97.7	96.4
3	1.5	1.5	1.8	1.5	1.7	1.6	3.9	4.5	98.1	98.0	97.8	98.0	98.0	97.9	94.6	91.7
4	1.5	1.3	1.4	1.4	1.5	1.2	1.5	1.9	98.1	98.2	98.1	98.1	98.0	98.2	98.0	96.6
5	1.4	1.4	1.9	1.5	1.4	1.4	1.9	2.6	98.1	98.2	97.7	98.1	98.1	98.0	97.6	95.8

表 26. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂浓度和稳定剂筛选-结果 3

序号	NRCE													
	主峰%							碎片%						
	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 5次	25℃ 4周	40℃ 2周	40℃ 4周	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 5次	25℃ 4周	40℃ 2周	40℃ 4周
1	96.8	96.3	96.4	96.3	95.5	94.8	85.0	3.2	3.7	3.6	3.7	4.5	5.2	15.0
2	96.3	95.8	96.2	96.4	96.0	95.2	93.8	3.7	4.2	3.8	3.6	4.0	4.8	6.2
3	96.1	96.2	95.7	96.0	95.9	96.1	89.8	3.9	3.8	4.3	4.0	4.1	3.9	10.2
4	96.4	95.4	95.6	96.6	95.8	94.2	70.6	3.6	4.6	4.4	3.4	4.2	5.8	29.4
5	96.5	96.3	96.3	95.5	96.2	94.7	87.5	3.5	3.7	3.7	4.5	3.8	5.3	12.5

表 27. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂浓度和稳定剂筛选-结果 4

序号	icIEF 纯度																				
	酸峰%						主峰%						碱峰%								
	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 5次	25℃ 4周	40℃ 2周	40℃ 4周	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 5次	25℃ 4周	40℃ 2周	40℃ 4周	T0	振荡 3天	光照 5天	冻融 5次	25℃ 4周	40℃ 2周	40℃ 4周
1	36.5	36.8	38.5	36.2	37.4	41.8	52.0	49.7	49.7	48.0	50.1	49.5	43.5	34.7	13.8	13.6	13.5	13.8	13.1	14.7	13.3
2	36.2	36.3	38.9	36.5	36.8	40.2	44.9	50.4	50.2	47.3	49.8	50.1	45.0	39.4	13.3	13.5	13.9	13.8	13.1	14.8	15.7
3	36.8	36.5	37.8	36.8	37.9	40.3	44.0	50.0	50.0	48.8	49.7	48.3	43.1	39.0	13.2	13.5	13.4	13.5	13.8	16.6	17.0
4	37.0	37.0	37.6	37.4	37.6	40.2	57.6	49.1	49.5	48.4	48.8	48.7	45.1	30.5	13.9	13.6	13.9	13.9	13.7	14.8	11.9
5	37.3	37.6	40.5	37.4	37.7	40.9	50.2	49.0	48.8	46.0	48.8	49.8	44.3	35.6	13.7	13.6	13.6	13.8	12.5	14.7	14.2

结果显示：与其他处方相比，处方 3 乳光略重，外观略差；纯度方面：各组处方在振荡、光照、反复冻融和 25℃ 考察条件下，SEC-HPLC 聚体、NRCE 碎片含量均无明显变化。在高温 40℃ 条件下，处方 3 SEC-HPLC 聚体含量有明显增加，表明该处方稳定性较差，处方 2 NRCE 碎片含量增长较少，表明脯氨酸可作为稳定剂，明显改善抗体稳定性，且抗体浓度越高，NRCE 纯度越高（50mg/mL 和 70mg/mL 处方差异相对较小）。各组处方在振荡、反复冻融和 25℃ 考察条件下，iCIEF 酸性峰、中性峰和碱性峰均无显著变化，但在高温 40℃ 4 周条件下，酸性峰均有所增加，处方 2 主峰含量相对最高，且 50mg/mL 和 70mg/mL 处方差异相对较小。综合以上结果，选择脯氨酸作为稳定剂，抗体浓度为 70 mg/mL，pH 5.0。

#### 制备实施例 4. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂表面活性剂浓度筛选

选择 20mM 醋酸-醋酸钠，pH5.0 缓冲体系，以 240mM 脯氨酸为稳定剂，RANKL-NGF 双特异性抗体浓度为 70 mg/mL，制备聚山梨酯 80 浓度分别为 0.1mg/mL、0.2mg/mL 和 0.4mg/mL 的 3 组处方样品，考察样品在振荡（300rpm/25℃）、反复冻融（-35℃/室温）、高温（40℃）条件下的稳定性。

1) 20mM 醋酸-醋酸钠，pH5.0，240mM 脯氨酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，70mg/mL 抗体；

2) 20mM 醋酸-醋酸钠，pH5.0，240mM 脯氨酸，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，70mg/mL 抗体；

3) 20mM 醋酸-醋酸钠，pH5.0，240mM 脯氨酸，0.4mg/mL 聚山梨酯 80，70mg/mL 抗体。

表 28. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂表面活性剂浓度筛选-结果 1

序号	外观					
	颜色	澄明度				可见异物
	所有条件	T0	振荡 3 天/ 冻融 3 次/ 冻融 5 次	高温 2 周	高温 4 周	所有条件
1	无色	澄明	澄明	轻微乳光	轻微乳光	无可见蛋白颗粒
2		澄明	澄明	轻微乳光	轻微乳光	
3		澄明	澄明	乳光略重	乳光略重	

表 29. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂表面活性剂浓度筛选-结果 2

序号	SEC-HPLC											
	聚体%						单体%					
	T0	振荡 3 天	冻融		高温		T0	振荡 3 天	冻融		高温	
			3 次	5 次	2 周	4 周			3 次	5 次	2 周	4 周

1	2.2	1.2	1.8	1.7	1.7	2.2	97.6	98.7	98.1	98.2	97.9	97.1
2	2.2	1.2	1.8	1.7	1.7	2.3	97.6	98.7	98.1	98.3	97.9	97.0
3	2.2	1.3	1.8	1.7	1.8	2.5	97.6	98.6	98.1	98.3	97.8	96.9

表 30. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂表面活性剂浓度筛选-结果 3

组	NRCE					
	单体%			碎片%		
	T0	高温 2周	高温 4周	T0	高温 2周	高温 4周
1	98.1	96.9	95.8	1.9	3.1	4.2
2	98.1	96.8	90.7	1.9	3.2	9.3
3	97.8	94.3	86.3	2.2	5.7	13.7

表 31. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂表面活性剂浓度筛选-结果 4

组	iCIEF								
	酸峰%			主峰%			碱峰%		
	T0	高温 2周	高温 4周	T0	高温 2周	高温 4周	T0	高温 2周	高温 4周
1	32.2	36.1	42.1	56.0	51.0	43.9	11.8	12.9	14.0
2	31.6	37.9	44.7	57.3	49.3	42.1	11.2	12.8	13.1
3	31.2	38.0	46.4	57.5	48.9	41.3	11.2	13.1	12.3

结果显示: 随着聚山梨酯 80 浓度升高, 聚体、碎片和酸碱峰含量均呈增加趋势, 聚山梨酯 80 浓度为 0.4mg/mL 时, 抗体稳定性相对较差。因此, 聚山梨酯 80 浓度优选为 0.1mg/mL。

#### 制备实施例 5. RANKL-NGF 双特异性抗体优选处方稳定性研究

选择 20mM 醋酸-醋酸钠, pH5.0 的缓冲体系, 以 240mM 脯氨酸为稳定剂, RANKL-NGF 双特异性抗体浓度为 70 mg/mL, 制备聚山梨酯 80 浓度为 0.1mg/mL 的制剂, 考察制剂在加速条件 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}/60\%RH \pm 5RH$ ) 和长期条件下 ( $2 \sim 8^\circ\text{C}$ ) 的稳定性。

表 32. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂加速稳定性结果

检测项目		时间				
		0时	1月	2月	3月	6月
不溶性微粒(每瓶)	$\geq 10 \mu\text{M}$	59	NT	NT	57	4
	$\geq 25 \mu\text{M}$	4			18	1
可见异物		无	NT	NT	NT	无
SEC-HPLC-单体		99.2%	99.1%	99.1%	99.0%	98.9%

SEC-HPLC-聚体	0.3%	0.4%	0.4%	0.5%	0.6%
RCE	99.2%	99.4%	99.0%	98.8%	97.0%
iCIEF-主峰	60.5%	58.1%	58.0%	51.3%	47.8%
iCIEF-酸峰	34.0%	35.6%	35.0%	40.4%	43.9%
iCIEF-碱峰	5.5%	6.3%	6.9%	8.3%	8.4%
RANKL 结合活性	101%	NT	NT	88%	103%
NGF 结合活性	93%			79%	88%

注：NT 表示未检测。

表 33. RANKL-NGF 双特异性抗体制剂长期稳定性结果

检测项目		时间					
		0 时	1 月	3 月	6 月	9 月	12 月
不溶性微粒(每瓶)	≥10μm	59	NT	NT	NT	NT	2
	≥25μm	4					0
可见异物		无	NT	NT	NT	NT	无
SEC-HPLC-单体		99.2%	99.3%	99.2%	99.2%	99.2%	99.1%
SEC-HPLC-聚体		0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.4%	0.4%
RCE		99.2%	99.3%	99.3%	99.4%	99.3%	99.2%
iCIEF-主峰		60.5%	58.0%	59.3%	61.1%	59.8%	59.3%
iCIEF-酸峰		34.0%	36.3%	34.7%	33.3%	34.7%	35.2%
iCIEF-碱峰		5.5%	5.7%	6.0%	5.6%	5.5%	5.5%
RANKL 结合活性		101%	NT	NT	92%	NT	107.0%
NGF 结合活性		93%	NT	NT	90%	NT	88.0%

注：NT 表示未检测。

结果显示，在加速条件（25±2℃/60%RH±5RH）储存 6 个月，iCIEF 主峰下降约 12.7%，其它检测项目无明显变化；而长期条件下（2~8℃）储存 12 个月，所有检测项目与 0 时相比均无明显变化，表明 RANKL-NGF 双特异性抗体制剂长期稳定性良好。

制备实施例 6. 可选择制剂配方

本披露提供“50~77mg/mL RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠, pH4.6~5.4”制剂配方的 RANKL-NGF 双特异性抗体药物制剂, 包括但不限于:

(1) 70mg/mL RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6;

(2) 70mg/mL RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0;

(3) 70mg/mL RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH5.4;

(4) 50mg/ml RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6;

(5) 50mg/ml RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0;

(6) 50mg/ml RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH5.4;

(7) 77mg/ml RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6;

(8) 77mg/ml RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0;

(9) 77mg/ml RANKL-NGF 双特异性抗体, 240mM 脯氨酸, 0.1mg/mL 聚山梨酯 80, 20mM 醋酸-醋酸钠 pH5.4。

实验结果表明, 上述制剂配方的 RANKL-NGF 双特异性抗体制剂均具有良好的稳定性, 可应用于 RANKL-NGF 双特异性抗体药物的配制。

## 权利要求书：

1. 一种药物组合物，包含抗 RANKL-NGF 双特异性抗体和缓冲剂，其中：  
所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体包含特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域和特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域；  
5 所述缓冲剂为醋酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂或磷酸盐缓冲剂；  
优选地，所述缓冲剂为醋酸-醋酸钠缓冲剂、组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂或柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲剂；  
更优选地，所述缓冲剂为醋酸-醋酸钠缓冲剂或组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；  
最优选地，所述缓冲剂为醋酸-醋酸钠缓冲剂。
- 10 2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.0；  
优选地，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4；  
更优选地，所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。
- 15 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 1 mg/mL 至 150 mg/mL；  
优选地，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 10 mg/mL 至 80 mg/mL；  
更优选地，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体的浓度为 63 mg/mL 至 77 mg/mL。
- 20 4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂；  
优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆；  
更优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80；  
25 最优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。
5. 根据权利要求 4 所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL；  
优选地，所述表面活性剂的浓度为 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL；  
30 更优选地，所述表面活性剂的浓度为 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL；  
最优选地，所述表面活性剂的浓度为 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含稳定剂；  
35 优选地，所述稳定剂选自脯氨酸、蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠组成的组中的一种或更多种；  
更优选地，所述稳定剂为脯氨酸、蔗糖或氯化钠；

最优选地，所述稳定剂为脯氨酸。

7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其中所述稳定剂的浓度为 1mM 至 300 mM；

- 5 优选地，所述稳定剂的浓度为 25 mM 至 290 mM；  
更优选地，所述稳定剂的浓度为 210 mM 至 270 mM。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 100 mM；

- 10 优选地，所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 50 mM；  
更优选地，所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 30 mM；  
最优选地，所述缓冲剂的浓度为 16 mM 至 24 mM。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的药物组合物，其中：

- 15 所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体包含：  
至少一个特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域，和  
至少一个特异性结合 NGF 的第二抗原结合域；  
优选地，  
所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体包含：  
20 两个特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域，和  
两个特异性结合 NGF 的第二抗原结合域；  
更优选地，所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体具有如图 1 所示的结构。

10. 根据权利要求 9 所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性  
25 抗体中，特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，  
其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列；HCDR2，  
其包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基  
酸序列；和

- 30 所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；LCDR2，  
其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基  
酸序列；

优选地，

- 所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，特异性结合 RANKL 的第一抗原结合  
35 域包含重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 的氨基  
酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的药物组合物，其中所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

5 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列；

10 优选地，

所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列；和/或

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；

15 更优选地，

所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体中，特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域包含重链和轻链，所述重链包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列，所述轻链包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列。

20 12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，

(b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性剂，

(c) 1 mM 至 300 mM 的稳定剂，和

(d) 5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.2 至 7.0；

25 优选地，所述药物组合物包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的所述抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，

(b) 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80，

(c) 25 mM 至 290 mM 的脯氨酸，和

(d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.4；

30 更优选地，所述药物组合物包含如下组分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，

(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸，和

(d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.8

35 至 5.2；

最优选地，所述药物组合物包含如下组分：

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 双特异性抗体，  
(b) 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL 的聚山梨酯 80，  
(c) 210 mM 至 270 mM 的脯氨酸，和  
(d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.8  
5 至 5.2。

13. 一种冻干制剂，所述冻干制剂复溶后可形成权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物组合物。

- 10 14. 一种制备冻干制剂的方法，其中包括将权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

15. 一种冻干制剂，所述制剂通过权利要求 14 所述的方法获得的。

- 15 16. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物组合物，其为皮下注射制剂、静脉注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂；优选为皮下注射制剂。

17. 一种治疗或预防疾病的方法，所述方法包括给予受试者治疗有效量的权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 13 或 15 所述的冻干制剂；  
20 优选地，所述的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失；

更优选地，所述疼痛选自：骨关节疼痛、类风湿性关节炎疼痛、痛风、骨癌疼痛、骨折疼痛、手术后疼痛、癌症疼痛、痛性膀胱综合征、肌肉骨骼痛、前列腺炎、盆腔疼痛、间质性膀胱炎、下背痛、痛经、骨骼疾病相关的疼痛、三叉神经痛、带状疱疹后遗神经痛、带状疱疹感染、坐骨神经痛、偏头痛、糖尿病神经病变和外周神经相关的疼痛；  
25

其中，所述骨损失与选自下组的至少一种状况相关：骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨质疏松、骨坏死、骨损伤、骨吸收、骨发育不全、炎症、自身免疫疾病、肠炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、克罗恩病、牙周骨吸收、溶骨性转移和癌症。

30

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾癌、肺癌、食道癌、直肠癌、膀胱癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、胃肠道癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、非小细胞肺癌、骨肿瘤和何杰金氏病。

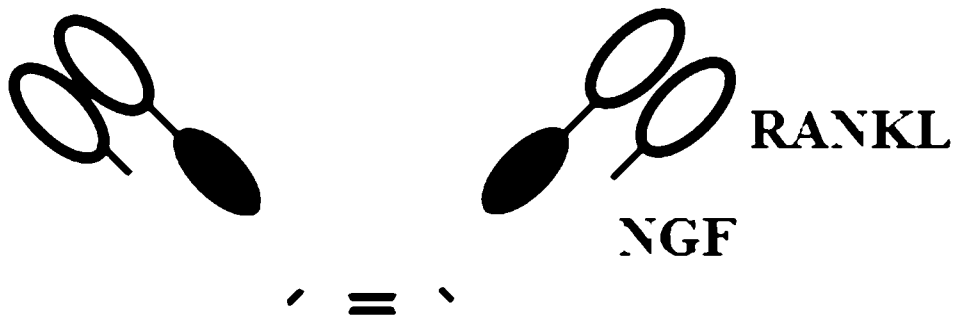


图 1

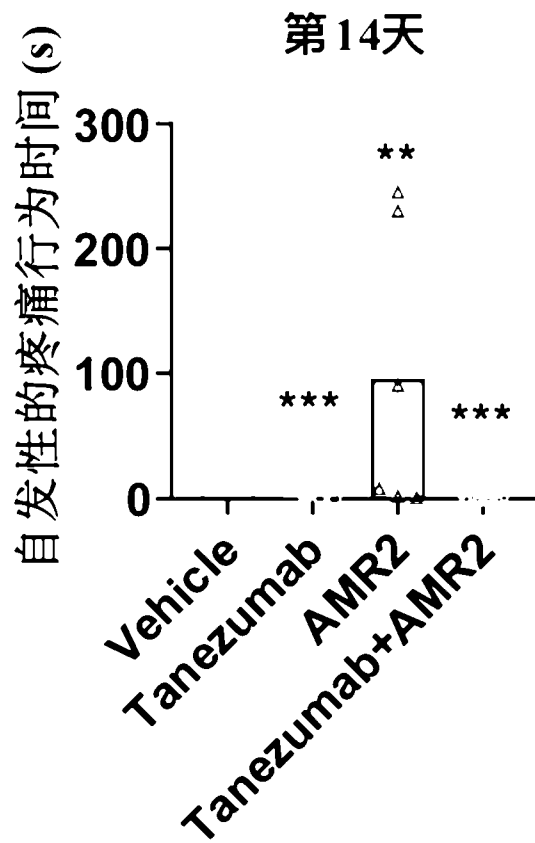


图 2A

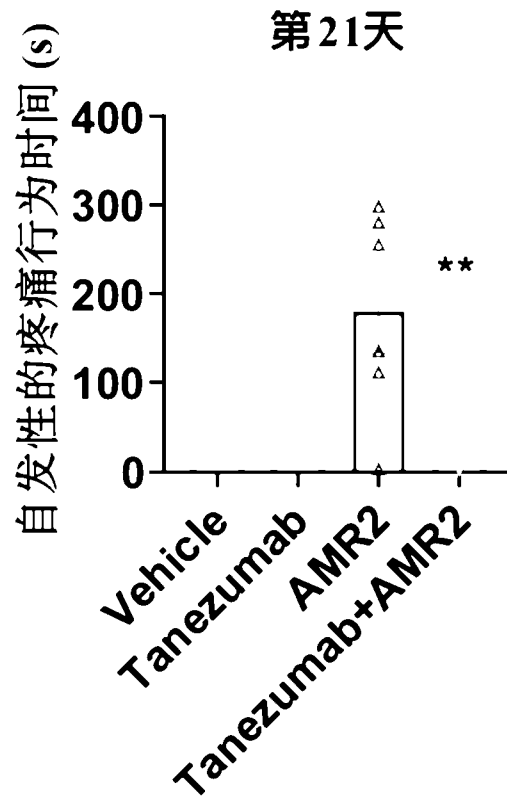


图 2B

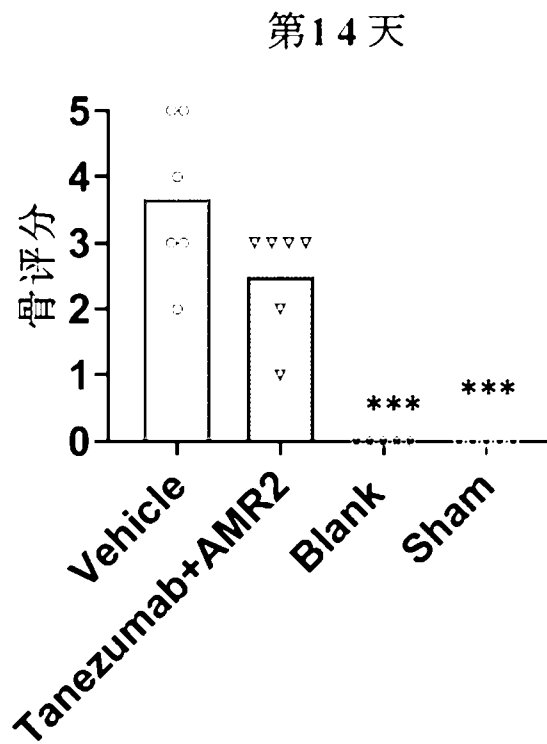


图 2C

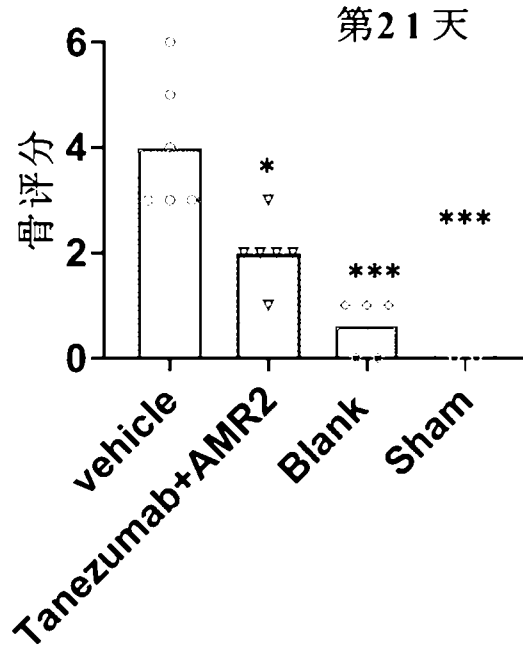


图 2D

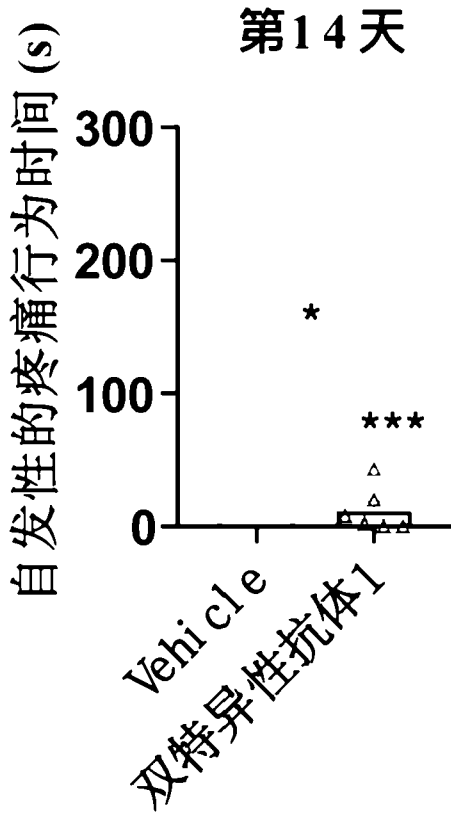


图 3A

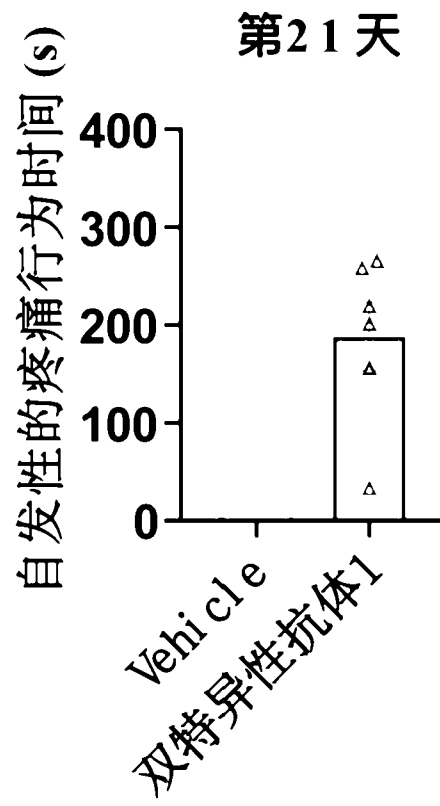


图 3B

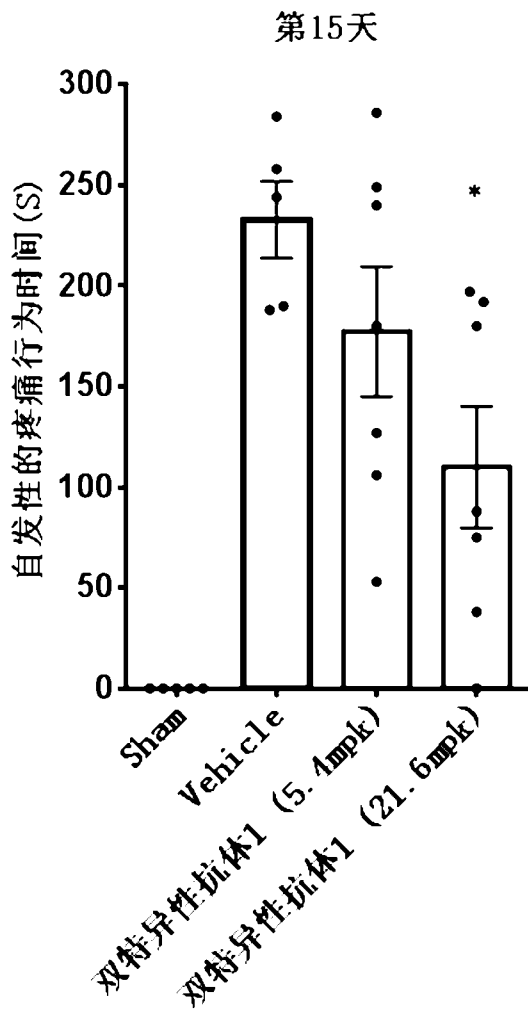


图 4A

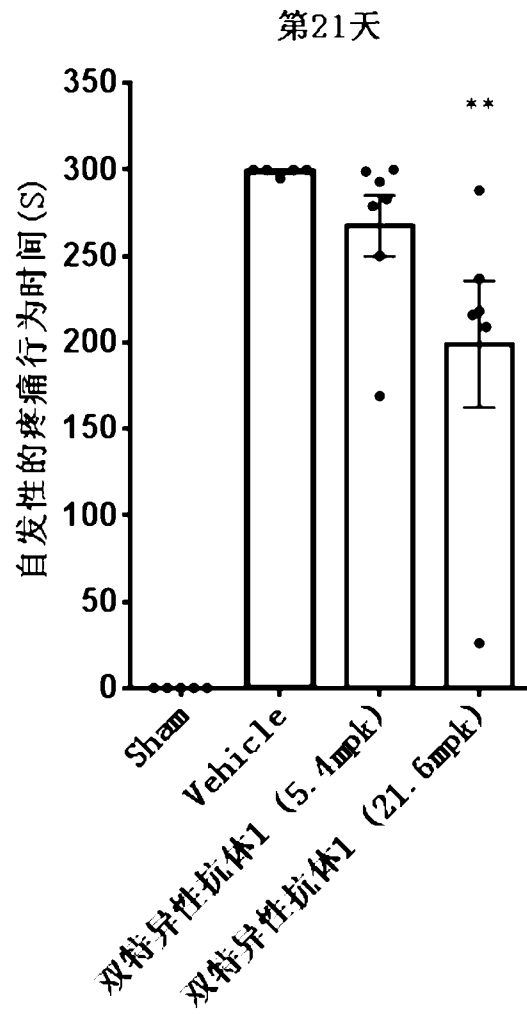


图 4B

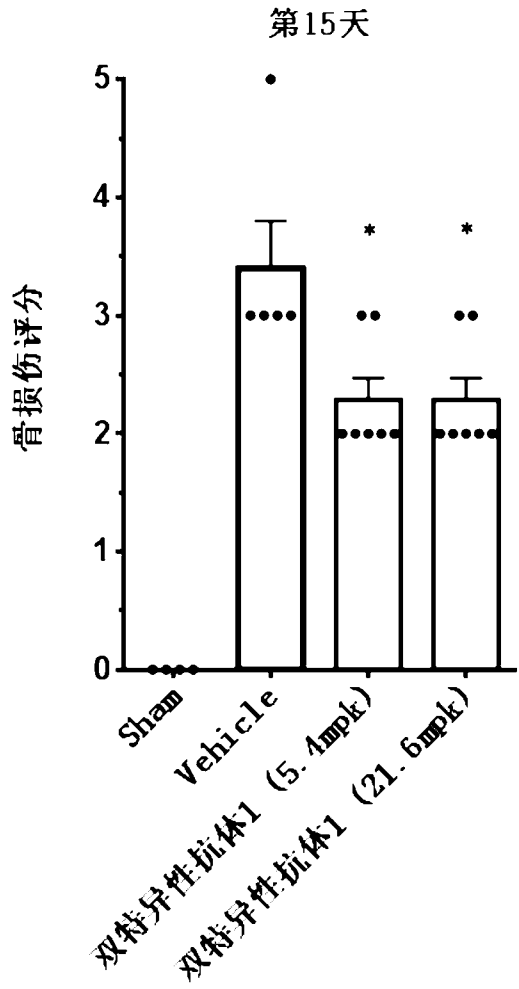


图 4C

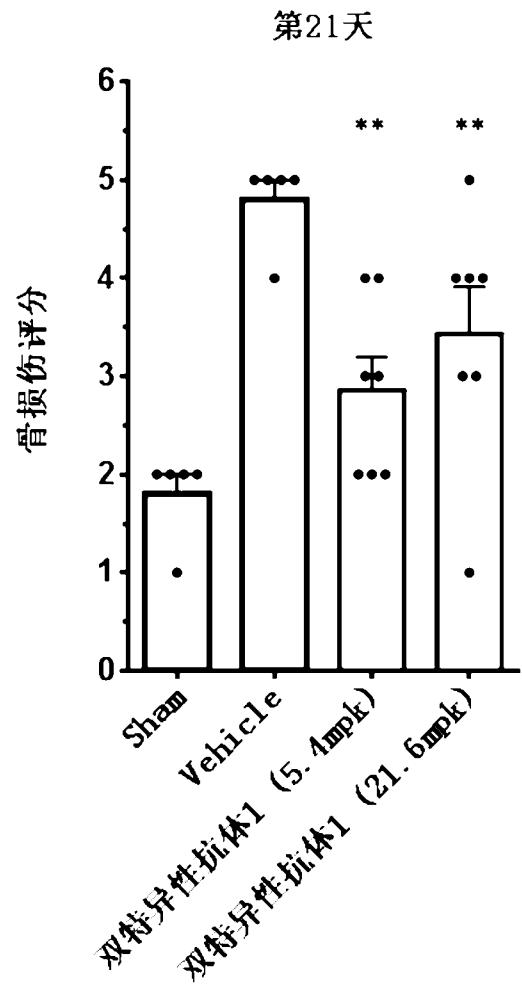


图 4D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/131913

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K39/395(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; A61P19/08(2006.01)i; A61P29/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:A61K,C07K,A61P		
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) VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, ISI of Web Science, 百度学术, Baidu Scholar, Patents, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System, NCBI Genbank, EBI, STNext: 申请人, applicant, 发明人, inventor, NGF, OPGL, RANKL, 抗体, antibody, tumor, CANCER, SEQ ID NO.1-41, 表面活性剂, 泊洛沙姆, 醋酸, 醋酸-醋酸钠, 醋酸盐, 脯氨酸, 缓冲, 聚山梨酯, 聚山梨酯80, 双特异, 双特异抗体, 吐温, 蔗糖, 制剂.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2022237856 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 17 November 2022 (2022-11-17) claims 1-26	1-18
Y	CN 101217979 A (AMGEN INC.) 09 July 2008 (2008-07-09) description, pages 3-10	1-18
Y	张潇文等 (ZHANG, Xiaowen et al.). "骨癌痛病理机制的研究进展 (Non-official translation: Research Progress on Pathological Mechanism of Bone Cancer Pain)" 安徽医科大学学报 (Acta Universitatis Medicinalis Anhui), Vol. 50, No. (12), 18 November 2015 (2015-11-18), page 1835, left-hand column, paragraph 1, page 1838, left-hand column, paragraph 2, and page 1837, left-hand column, paragraph 1	1-18
Y	CN 103232539 A (AMGEN FREMONT INC. et al.) 07 August 2013 (2013-08-07) claim 1	10-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 <b>04 December 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>07 December 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2023/131913**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102746399 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP.) 24 October 2012 (2012-10-24) claims 22-23	11-18
A	CN 110621342 A (AMGEN INC.) 27 December 2019 (2019-12-27) entire document	1-18
A	CN 114246944 A (SHENGHE (CHINA) BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 29 March 2022 (2022-03-29) entire document	1-18
A	CN 111032085 A (THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 17 April 2020 (2020-04-17) entire document	1-18

**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.: **17-18**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claims 17-18 relate to a method for treating and preventing diseases, which belongs to subject matter for which a search is not performed (PCT Rule 39.1(iv)). However, a search is still carried out on the basis of a corresponding pharmaceutical use thereof.
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/CN2023/131913**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022237856	A1	17 November 2022	TW	202306990	A	16 February 2023
CN	101217979	A	09 July 2008	EP	3673919	A1	01 July 2020
				CA	2610839	A1	28 December 2006
				CA	2610839	C	25 June 2019
				ZA	200800338	B	30 June 2010
				US	2012028877	A1	02 February 2012
				US	2013273066	A1	17 October 2013
				US	11607451	B2	21 March 2023
				IL	188102	A0	20 March 2008
				US	2017368170	A1	28 December 2017
				ES	2776657	T3	31 July 2020
				EP	1909831	A2	16 April 2008
				EP	1909831	A4	20 February 2013
				JP	2008543839	A	04 December 2008
				EP	3351269	A1	25 July 2018
				EP	3351269	B1	29 January 2020
				KR	20080031684	A	10 April 2008
				JP	2022185048	A	13 December 2022
				JP	2013047261	A	07 March 2013
				JP	5856555	B2	10 February 2016
				AU	2006259664	A1	28 December 2006
				JP	2020183421	A	12 November 2020
				US	2016362485	A1	15 December 2016
				US	2013273067	A1	17 October 2013
				US	2016362486	A1	15 December 2016
				US	2016362484	A1	15 December 2016
				US	2016319011	A1	03 November 2016
				US	2016367665	A1	22 December 2016
				US	2016339102	A1	24 November 2016
				US	2016367666	A1	22 December 2016
				BRPI	0611901	A2	28 August 2012
				HK	1256288	A1	20 September 2019
				US	2008311078	A1	18 December 2008
				MX	2007015476	A	25 February 2008
				JP	2016053061	A	14 April 2016
				JP	6293103	B2	14 March 2018
				SG	162788	A1	29 July 2010
				EA	200800050	A1	28 April 2008
				EA	012801	B1	30 December 2009
				JP	2018048196	A	29 March 2018
				WO	2006138181	A2	28 December 2006
				WO	2006138181	A3	06 December 2007
CN	103232539	A	07 August 2013	CY	1121151	T1	29 May 2020
				DK	2087908	T3	23 July 2018
				JP	2012140430	A	26 July 2012
				JP	5065529	B2	07 November 2012
				JP	2009022280	A	05 February 2009
				JP	4358282	B2	04 November 2009
				JP	2012153701	A	16 August 2012
				MXPA	04000134	A	06 June 2005

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/131913**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		RS 20120347 A2	30 April 2013
		RS 20120347 A3	31 October 2013
		RS 54274 B1	29 February 2016
		ME 00232 B	10 February 2011
		PT 1409016 E	11 June 2010
		JP 2012229236 A	22 November 2012
		JP 5576903 B2	20 August 2014
		NO 2019048 I1	20 December 2019
		US 2004033535 A1	19 February 2004
		US 7364736 B2	29 April 2008
		MY 143582 A	31 May 2011
		TR 201900581 T4	21 February 2019
		NZ 581637 A	25 May 2012
		JP 2019214563 A	19 December 2019
		LU 91757 I2	24 January 2011
		LU 91757 I9	03 January 2019
		CY 1120658 T1	11 December 2019
		US 2020131271 A1	30 April 2020
		US 2015266952 A1	24 September 2015
		JP 2005506963 A	10 March 2005
		JP 4212470 B2	21 January 2009
		HK 1187932 A1	17 April 2014
		TW 200630107 A	01 September 2006
		TWI 326285 B	21 June 2010
		NO 20200535 A1	10 March 2004
		NO 345566 B1	19 April 2021
		ATE 464068 T1	15 April 2010
		DK 2295081 T3	18 February 2019
		SG 10201603108 QA	30 May 2016
		NZ 530765 A	30 November 2006
		BR 0210579 A	10 May 2005
		BRPI 0210579 B1	14 May 2019
		BRPI 0210579 B8	25 May 2021
		YU 103003 A	25 May 2006
		TR 201809678 T4	23 July 2018
		WO 03002713 A2	09 January 2003
		WO 03002713 A3	14 August 2003
		US 2020354464 A1	12 November 2020
		ES 2674888 T3	04 July 2018
		IL 159512 A0	01 June 2004
		NO 2019039 I1	05 November 2019
		NZ 547695 A	26 September 2008
		TR 201809008 T4	23 July 2018
		AU 2008261137 A1	15 January 2009
		AU 2008261137 B2	04 October 2012
		AU 2008261137 C1	31 August 2023
		KR 20100041797 A	22 April 2010
		KR 101038585 B1	03 June 2011
		CY 1120656 T1	11 December 2019
		NO 20041018 L	10 March 2004

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/131913**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		NO 343687 B1	06 May 2019
		SG 173211 A1	29 August 2011
		EP 2270052 A2	05 January 2011
		EP 2270052 A3	02 March 2011
		EP 2270052 B1	28 March 2018
		EP 2270052 B8	02 May 2018
		US 2012087923 A1	12 April 2012
		US 8409578 B2	02 April 2013
		PL 371915 A1	11 July 2005
		PL 222211 B1	29 July 2016
		AU 2002320157 B2	16 October 2008
		AU 2002320157 C1	21 September 2023
		JP 2022000424 A	04 January 2022
		FR 100050I1	14 January 2011
		FR 100050I2	30 December 2011
		DK 1409016 T3	21 June 2010
		DK 1409016 T4	14 September 2020
		DE 122010000047 I1	05 May 2011
		DK 2270052 T3	02 July 2018
		PT 2087908 T	16 July 2018
		US 2009274688 A1	05 November 2009
		US 8058418 B2	15 November 2011
		TWI 276443 B	21 March 2007
		ES 2706902 T3	01 April 2019
		AR 034637 A1	03 March 2004
		IL 235116 A0	30 November 2014
		KR 20040023630 A	18 March 2004
		EP 2295081 A1	16 March 2011
		EP 2295081 B1	31 October 2018
		EP 1409016 A2	21 April 2004
		EP 1409016 A4	09 November 2005
		EP 1409016 B1	14 April 2010
		EP 1409016 B2	15 July 2020
		EP 1409016 B9	28 October 2020
		US 2014134157 A1	15 May 2014
		JP 2020073518 A	14 May 2020
		NZ 616594 A	26 June 2015
		ES 2342820 T3	15 July 2010
		ES 2342820 T5	14 April 2021
		PT 2295081 T	01 February 2019
		JP 2018154614 A	04 October 2018
		ES 2675735 T3	12 July 2018
		EA 200400063 A1	24 February 2005
		EA 021242 B1	29 May 2015
		EA 021242 B9	30 November 2015
		EP 3492100 A1	05 June 2019
		EP 3492100 B1	08 December 2021
		JP 2015078205 A	23 April 2015
		NO 20190456 A1	10 March 2004
		NO 344842 B1	25 May 2020

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/131913**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		ES 2907826 T3	26 April 2022
		DE 60235989 D1	27 May 2010
		EP 2087908 A1	12 August 2009
		EP 2087908 B1	30 May 2018
		JP 2016216464 A	22 December 2016
		US 2017183417 A1	29 June 2017
		JP 2009273466 A	26 November 2009
		JP 4927910 B2	09 May 2012
		IL 159512 A	31 December 2014
		ZA 200400521 B	27 July 2005
		CA 2451955 A1	09 January 2003
		CA 2451955 C	29 September 2015
		JP 2015057408 A	26 March 2015
		PT 2270052 T	04 July 2018
		MEP 32608 A	10 February 2011
		SG 2011076551 A	28 August 2015
CN 102746399 A	24 October 2012	DK 1575517 T3	14 May 2012
		IL 169221 A	29 March 2012
		EP 3539569 A1	18 September 2019
		CA 2921578 A1	15 July 2004
		CA 2921578 C	14 February 2017
		PT 2263692 T	28 November 2018
		PL 380679 A1	05 March 2007
		PL 215171 B1	31 October 2013
		CA 2936742 A1	15 July 2004
		CA 2936742 C	26 May 2020
		IL 218087 A0	29 March 2012
		IL 218087 B	26 September 2019
		IL 263573 A	31 January 2019
		US 2007212357 A1	13 September 2007
		US 7655232 B2	02 February 2010
		US 2010111970 A1	06 May 2010
		US 8088384 B2	03 January 2012
		JP 2009159977 A	23 July 2009
		SI 2270048 T1	29 January 2016
		NO 20150469 L	23 September 2005
		NO 339595 B1	09 January 2017
		ES 2697876 T3	29 January 2019
		JP 2006525955 A	16 November 2006
		JP 4134170 B2	13 August 2008
		BR 0317738 A	22 November 2005
		BRPI 0317738 B1	16 January 2018
		BRPI 0317738 B8	25 May 2021
		KR 20050096101 A	05 October 2005
		KR 101250818 B1	15 April 2013
		EP 2263692 A1	22 December 2010
		EP 2263692 B1	19 September 2018
		DK 2270048 T3	18 January 2016
		MXPA 05006854 A	12 December 2005
		US 2016152698 A1	02 June 2016

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/131913**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 9708398 B2	18 July 2017
		ATE 553128 T1	15 April 2012
		HUE 026089 T2	30 May 2016
		NZ 587852 A	24 February 2012
		HK 1177754 A1	30 August 2013
		PT 2270048 E	10 February 2016
		HK 1110513 A1	18 July 2008
		CA 2511598 A1	15 July 2004
		CA 2511598 C	13 September 2016
		PT 1575517 E	28 May 2012
		ES 2564752 T3	28 March 2016
		US 2015050286 A1	19 February 2015
		US 9212222 B2	15 December 2015
		WO 2004058184 A2	15 July 2004
		WO 2004058184 A3	27 July 2006
		EP 2270048 A2	05 January 2011
		EP 2270048 A3	02 March 2011
		EP 2270048 B1	11 November 2015
		DK 2263692 T3	26 November 2018
		AU 2003299898 A1	22 July 2004
		AU 2003299898 B2	16 December 2010
		ES 2382918 T3	14 June 2012
		ZA 200504866 B	29 November 2006
		NO 20053583 D0	22 July 2005
		NO 20053583 L	23 September 2005
		NO 336655 B1	12 October 2015
		EP 1575517 A2	21 September 2005
		EP 1575517 A4	24 October 2007
		EP 1575517 B1	11 April 2012
		SI 1575517 T1	29 June 2012
		NZ 540730 A	30 September 2010
		SI 2263692 T1	30 October 2020
		KR 20120128699 A	27 November 2012
		KR 101410692 B1	24 June 2014
		HK 1076251 A1	13 January 2006
		US 2004237124 A1	25 November 2004
		US 7449616 B2	11 November 2008
		JP 2008148710 A	03 July 2008
		JP 4336728 B2	30 September 2009
		EA 200501043 A1	30 June 2006
		EA 011479 B1	28 April 2009
		US 2017342143 A1	30 November 2017
		US 11008386 B2	18 May 2021
<hr/>			
CN	110621342	A	27 December 2019
		CO 2019011463 A2	31 October 2019
		UY 37707 A	31 October 2018
		AU 2018260750 A1	29 August 2019
		MA 48462 A	04 March 2020
		KR 20190140464 A	19 December 2019
		US 2022143181 A1	12 May 2022
		WO 2018200918 A1	01 November 2018

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/131913**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2018200918 A8	14 November 2019
		CR 20190538 A	26 February 2020
		CA 3054165 A1	01 November 2018
		US 2020354463 A1	12 November 2020
		US 11192952 B2	07 December 2021
		TW 201841654 A	01 December 2018
		JP 2018188430 A	29 November 2018
		JP 7190822 B2	16 December 2022
		JP 2022062059 A	19 April 2022
		JP 7356525 B2	04 October 2023
		BR 112019022188 A2	12 May 2020
		IL 268704 A	31 October 2019
		IL 268704 B	01 June 2022
		IL 293127 A	01 July 2022
		EA 201992570 A1	20 March 2020
		JOP 20190255 A1	27 October 2019
		EP 3615066 A1	04 March 2020
		EP 4190355 A1	07 June 2023
		CL 2020002012 A1	16 October 2020
		CL 2019003032 A1	21 February 2020
		PE 20200343 A1	14 February 2020
		AR 111497 A1	17 July 2019
		TN 2019000297 A1	07 May 2021
		PH 12019502444 A1	20 July 2020
		SG 11201909998 TA	28 November 2019
-----			
CN	114246944	A	29 March 2022
-----			
CN	111032085	A	17 April 2020
		WO 2018223182 A1	13 December 2018
		AU 2018280340 A1	19 December 2019
		US 2023042913 A1	09 February 2023
		EP 3634484 A1	15 April 2020
		EP 3634484 A4	12 January 2022
		CA 3065836 A1	13 December 2018
		JP 2020522529 A	30 July 2020
-----			

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K39/395(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; A61P19/08(2006.01)i; A61P29/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:A61K,C07K,A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>VEN,CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, ISI of Web Science, 百度学术, Patents, 中国生物序列检索系统, NCBI Genbank, EBI, STNnext: 申请人,发明人,NGF,OPGL,RANKL,抗体, antibody, tumor, CANCER, SEQ ID NO.1-41,表面活性剂,泊洛沙姆,醋酸,醋酸-醋酸钠,醋酸盐,脯氨酸,缓冲,聚山梨酯,聚山梨酯80,双特异,双特异抗体,吐温,蔗糖,制剂.</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2022237856 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2022年11月17日 (2022 - 11 - 17) 权利要求1-26</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101217979 A (安姆根有限公司) 2008年7月9日 (2008 - 07 - 09) 说明书第3-10页</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>张潇文等. "骨癌痛病理机制的研究进展" 安徽医科大学学报, 第50卷, 第12期, 2015年11月18日 (2015 - 11 - 18), 第1835页左栏第1段, 第1838页左栏第2段, 第1837页左栏第1段</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103232539 A (安姆根弗里蒙特公司等) 2013年8月7日 (2013 - 08 - 07) 权利要求1</td> <td>10-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102746399 A (里纳特神经系统学公司) 2012年10月24日 (2012 - 10 - 24) 权利要求22-23</td> <td>11-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110621342 A (美国安进公司) 2019年12月27日 (2019 - 12 - 27) 全文</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	WO 2022237856 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2022年11月17日 (2022 - 11 - 17) 权利要求1-26	1-18	Y	CN 101217979 A (安姆根有限公司) 2008年7月9日 (2008 - 07 - 09) 说明书第3-10页	1-18	Y	张潇文等. "骨癌痛病理机制的研究进展" 安徽医科大学学报, 第50卷, 第12期, 2015年11月18日 (2015 - 11 - 18), 第1835页左栏第1段, 第1838页左栏第2段, 第1837页左栏第1段	1-18	Y	CN 103232539 A (安姆根弗里蒙特公司等) 2013年8月7日 (2013 - 08 - 07) 权利要求1	10-18	Y	CN 102746399 A (里纳特神经系统学公司) 2012年10月24日 (2012 - 10 - 24) 权利要求22-23	11-18	A	CN 110621342 A (美国安进公司) 2019年12月27日 (2019 - 12 - 27) 全文	1-18
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	WO 2022237856 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2022年11月17日 (2022 - 11 - 17) 权利要求1-26	1-18																					
Y	CN 101217979 A (安姆根有限公司) 2008年7月9日 (2008 - 07 - 09) 说明书第3-10页	1-18																					
Y	张潇文等. "骨癌痛病理机制的研究进展" 安徽医科大学学报, 第50卷, 第12期, 2015年11月18日 (2015 - 11 - 18), 第1835页左栏第1段, 第1838页左栏第2段, 第1837页左栏第1段	1-18																					
Y	CN 103232539 A (安姆根弗里蒙特公司等) 2013年8月7日 (2013 - 08 - 07) 权利要求1	10-18																					
Y	CN 102746399 A (里纳特神经系统学公司) 2012年10月24日 (2012 - 10 - 24) 权利要求22-23	11-18																					
A	CN 110621342 A (美国安进公司) 2019年12月27日 (2019 - 12 - 27) 全文	1-18																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。      <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年12月4日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年12月7日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>李煦颖</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961960</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 114246944 A (盛禾(中国)生物制药有限公司) 2022年3月29日 (2022 - 03 - 29) 全文	1-18
A	CN 111032085 A (昆士兰医学研究所理事会) 2020年4月17日 (2020 - 04 - 17) 全文	1-18

## 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：17-18  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
权利要求17-18涉及治疗和预防疾病的方法，属于PCT实施细则39.1(iv)规定的不进行检索的主题。但仍然基于其相应的制药用途进行检索。
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/CN2023/131913

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)
WO	2022237856	A1	2022年11月17日	TW	202306990	A	2023年2月16日
CN	101217979	A	2008年7月9日	EP	3673919	A1	2020年7月1日
				CA	2610839	A1	2006年12月28日
				CA	2610839	C	2019年6月25日
				ZA	200800338	B	2010年6月30日
				US	2012028877	A1	2012年2月2日
				US	2013273066	A1	2013年10月17日
				US	11607451	B2	2023年3月21日
				IL	188102	A0	2008年3月20日
				US	2017368170	A1	2017年12月28日
				ES	2776657	T3	2020年7月31日
				EP	1909831	A2	2008年4月16日
				EP	1909831	A4	2013年2月20日
				JP	2008543839	A	2008年12月4日
				EP	3351269	A1	2018年7月25日
				EP	3351269	B1	2020年1月29日
				KR	20080031684	A	2008年4月10日
				JP	2022185048	A	2022年12月13日
				JP	2013047261	A	2013年3月7日
				JP	5856555	B2	2016年2月10日
				AU	2006259664	A1	2006年12月28日
				JP	2020183421	A	2020年11月12日
				US	2016362485	A1	2016年12月15日
				US	2013273067	A1	2013年10月17日
				US	2016362486	A1	2016年12月15日
				US	2016362484	A1	2016年12月15日
				US	2016319011	A1	2016年11月3日
				US	2016367665	A1	2016年12月22日
				US	2016339102	A1	2016年11月24日
				US	2016367666	A1	2016年12月22日
				BR-	0611901	A2	2012年8月28日
				PI			
				HK	1256288	A1	2019年9月20日
				US	2008311078	A1	2008年12月18日
				MX	2007015476	A	2008年2月25日
				JP	2016053061	A	2016年4月14日
				JP	6293103	B2	2018年3月14日
				SG	162788	A1	2010年7月29日
				EA	200800050	A1	2008年4月28日
				EA	012801	B1	2009年12月30日
				JP	2018048196	A	2018年3月29日
				WO	2006138181	A2	2006年12月28日
				WO	2006138181	A3	2007年12月6日
CN	103232539	A	2013年8月7日	CY	1121151	T1	2020年5月29日
				DK	2087908	T3	2018年7月23日
				JP	2012140430	A	2012年7月26日
				JP	5065529	B2	2012年11月7日
				JP	2009022280	A	2009年2月5日
				JP	4358282	B2	2009年11月4日
				JP	2012153701	A	2012年8月16日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/131913

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)
		MXPA 04000134 A	2005年6月6日
		RS 20120347 A2	2013年4月30日
		RS 20120347 A3	2013年10月31日
		RS 54274 B1	2016年2月29日
		ME 00232 B	2011年2月10日
		PT 1409016 E	2010年6月11日
		JP 2012229236 A	2012年11月22日
		JP 5576903 B2	2014年8月20日
		NO 2019048 I1	2019年12月20日
		US 2004033535 A1	2004年2月19日
		US 7364736 B2	2008年4月29日
		MY 143582 A	2011年5月31日
		TR 201900581 T4	2019年2月21日
		NZ 581637 A	2012年5月25日
		JP 2019214563 A	2019年12月19日
		LU 91757 I2	2011年1月24日
		LU 91757 I9	2019年1月3日
		CY 1120658 T1	2019年12月11日
		US 2020131271 A1	2020年4月30日
		US 2015266952 A1	2015年9月24日
		JP 2005506963 A	2005年3月10日
		JP 4212470 B2	2009年1月21日
		HK 1187932 A1	2014年4月17日
		TW 200630107 A	2006年9月1日
		TWI 326285 B	2010年6月21日
		NO 20200535 A1	2004年3月10日
		NO 345566 B1	2021年4月19日
		ATE 464068 T1	2010年4月15日
		DK 2295081 T3	2019年2月18日
		SG 10201603108 QA	2016年5月30日
		NZ 530765 A	2006年11月30日
		BR 0210579 A	2005年5月10日
		BR-PI 0210579 B1	2019年5月14日
		BR-PI 0210579 B8	2021年5月25日
		YU 103003 A	2006年5月25日
		TR 201809678 T4	2018年7月23日
		WO 03002713 A2	2003年1月9日
		WO 03002713 A3	2003年8月14日
		US 2020354464 A1	2020年11月12日
		ES 2674888 T3	2018年7月4日
		IL 159512 A0	2004年6月1日
		NO 2019039 I1	2019年11月5日
		NZ 547695 A	2008年9月26日
		TR 201809008 T4	2018年7月23日
		AU 2008261137 A1	2009年1月15日
		AU 2008261137 B2	2012年10月4日
		AU 2008261137 C1	2023年8月31日
		KR 20100041797 A	2010年4月22日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/131913

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)
		KR 101038585 B1	2011年6月3日
		CY 1120656 T1	2019年12月11日
		NO 20041018 L	2004年3月10日
		NO 343687 B1	2019年5月6日
		SG 173211 A1	2011年8月29日
		EP 2270052 A2	2011年1月5日
		EP 2270052 A3	2011年3月2日
		EP 2270052 B1	2018年3月28日
		EP 2270052 B8	2018年5月2日
		US 2012087923 A1	2012年4月12日
		US 8409578 B2	2013年4月2日
		PL 371915 A1	2005年7月11日
		PL 222211 B1	2016年7月29日
		AU 2002320157 B2	2008年10月16日
		AU 2002320157 C1	2023年9月21日
		JP 2022000424 A	2022年1月4日
		FR 10 C005 0I1	2011年1月14日
		FR 10 C005 0I2	2011年12月30日
		DK 1409016 T3	2010年6月21日
		DK 1409016 T4	2020年9月14日
		DE 122010000047 I1	2011年5月5日
		DK 2270052 T3	2018年7月2日
		PT 2087908 T	2018年7月16日
		US 2009274688 A1	2009年11月5日
		US 8058418 B2	2011年11月15日
		TWI 276443 B	2007年3月21日
		ES 2706902 T3	2019年4月1日
		AR 034637 A1	2004年3月3日
		IL 235116 A0	2014年11月30日
		KR 20040023630 A	2004年3月18日
		EP 2295081 A1	2011年3月16日
		EP 2295081 B1	2018年10月31日
		EP 1409016 A2	2004年4月21日
		EP 1409016 A4	2005年11月9日
		EP 1409016 B1	2010年4月14日
		EP 1409016 B2	2020年7月15日
		EP 1409016 B9	2020年10月28日
		US 2014134157 A1	2014年5月15日
		JP 2020073518 A	2020年5月14日
		NZ 616594 A	2015年6月26日
		ES 2342820 T3	2010年7月15日
		ES 2342820 T5	2021年4月14日
		PT 2295081 T	2019年2月1日
		JP 2018154614 A	2018年10月4日
		ES 2675735 T3	2018年7月12日
		EA 200400063 A1	2005年2月24日
		EA 021242 B1	2015年5月29日
		EA 021242 B9	2015年11月30日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/131913

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)
		EP 3492100 A1	2019年6月5日
		EP 3492100 B1	2021年12月8日
		JP 2015078205 A	2015年4月23日
		NO 20190456 A1	2004年3月10日
		NO 344842 B1	2020年5月25日
		ES 2907826 T3	2022年4月26日
		DE 60235989 D1	2010年5月27日
		EP 2087908 A1	2009年8月12日
		EP 2087908 B1	2018年5月30日
		JP 2016216464 A	2016年12月22日
		US 2017183417 A1	2017年6月29日
		JP 2009273466 A	2009年11月26日
		JP 4927910 B2	2012年5月9日
		IL 159512 A	2014年12月31日
		ZA 200400521 B	2005年7月27日
		CA 2451955 A1	2003年1月9日
		CA 2451955 C	2015年9月29日
		JP 2015057408 A	2015年3月26日
		PT 2270052 T	2018年7月4日
		MEP 32608 A	2011年2月10日
		SG 2011076551 A	2015年8月28日
CN 102746399 A	2012年10月24日	DK 1575517 T3	2012年5月14日
		IL 169221 A	2012年3月29日
		EP 3539569 A1	2019年9月18日
		CA 2921578 A1	2004年7月15日
		CA 2921578 C	2017年2月14日
		PT 2263692 T	2018年11月28日
		PL 380679 A1	2007年3月5日
		PL 215171 B1	2013年10月31日
		CA 2936742 A1	2004年7月15日
		CA 2936742 C	2020年5月26日
		IL 218087 A0	2012年3月29日
		IL 218087 B	2019年9月26日
		IL 263573 A	2019年1月31日
		US 2007212357 A1	2007年9月13日
		US 7655232 B2	2010年2月2日
		US 2010111970 A1	2010年5月6日
		US 8088384 B2	2012年1月3日
		JP 2009159977 A	2009年7月23日
		SI 2270048 T1	2016年1月29日
		NO 20150469 L	2005年9月23日
		NO 339595 B1	2017年1月9日
		ES 2697876 T3	2019年1月29日
		JP 2006525955 A	2006年11月16日
		JP 4134170 B2	2008年8月13日
		BR 0317738 A	2005年11月22日
		BR-PI 0317738 B1	2018年1月16日
		BR-PI 0317738 B8	2021年5月25日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/131913

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)
		KR 20050096101 A	2005年10月5日
		KR 101250818 B1	2013年4月15日
		EP 2263692 A1	2010年12月22日
		EP 2263692 B1	2018年9月19日
		DK 2270048 T3	2016年1月18日
		MXPA 05006854 A	2005年12月12日
		US 2016152698 A1	2016年6月2日
		US 9708398 B2	2017年7月18日
		ATE 553128 T1	2012年4月15日
		HUE 026089 T2	2016年5月30日
		NZ 587852 A	2012年2月24日
		HK 1177754 A1	2013年8月30日
		PT 2270048 E	2016年2月10日
		HK 1110513 A1	2008年7月18日
		CA 2511598 A1	2004年7月15日
		CA 2511598 C	2016年9月13日
		PT 1575517 E	2012年5月28日
		ES 2564752 T3	2016年3月28日
		US 2015050286 A1	2015年2月19日
		US 9212222 B2	2015年12月15日
		WO 2004058184 A2	2004年7月15日
		WO 2004058184 A3	2006年7月27日
		EP 2270048 A2	2011年1月5日
		EP 2270048 A3	2011年3月2日
		EP 2270048 B1	2015年11月11日
		DK 2263692 T3	2018年11月26日
		AU 2003299898 A1	2004年7月22日
		AU 2003299898 B2	2010年12月16日
		ES 2382918 T3	2012年6月14日
		ZA 200504866 B	2006年11月29日
		NO 20053583 D0	2005年7月22日
		NO 20053583 L	2005年9月23日
		NO 336655 B1	2015年10月12日
		EP 1575517 A2	2005年9月21日
		EP 1575517 A4	2007年10月24日
		EP 1575517 B1	2012年4月11日
		SI 1575517 T1	2012年6月29日
		NZ 540730 A	2010年9月30日
		SI 2263692 T1	2020年10月30日
		KR 20120128699 A	2012年11月27日
		KR 101410692 B1	2014年6月24日
		HK 1076251 A1	2006年1月13日
		US 2004237124 A1	2004年11月25日
		US 7449616 B2	2008年11月11日
		JP 2008148710 A	2008年7月3日
		JP 4336728 B2	2009年9月30日
		EA 200501043 A1	2006年6月30日
		EA 011479 B1	2009年4月28日
		US 2017342143 A1	2017年11月30日
		US 11008386 B2	2021年5月18日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/131913

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	110621342	A	2019年12月27日	CO	2019011463	A2	2019年10月31日
				UY	37707	A	2018年10月31日
				AU	2018260750	A1	2019年8月29日
				MA	48462	A	2020年3月4日
				KR	20190140464	A	2019年12月19日
				US	2022143181	A1	2022年5月12日
				WO	2018200918	A1	2018年11月1日
				WO	2018200918	A8	2019年11月14日
				CR	20190538	A	2020年2月26日
				CA	3054165	A1	2018年11月1日
				US	2020354463	A1	2020年11月12日
				US	11192952	B2	2021年12月7日
				TW	201841654	A	2018年12月1日
				JP	2018188430	A	2018年11月29日
				JP	7190822	B2	2022年12月16日
				JP	2022062059	A	2022年4月19日
				JP	7356525	B2	2023年10月4日
				BR	112019022188	A2	2020年5月12日
				IL	268704	A	2019年10月31日
				IL	268704	B	2022年6月1日
				IL	293127	A	2022年7月1日
				EA	201992570	A1	2020年3月20日
				JOP	20190255	A1	2019年10月27日
				EP	3615066	A1	2020年3月4日
				EP	4190355	A1	2023年6月7日
				CL	2020002012	A1	2020年10月16日
				CL	2019003032	A1	2020年2月21日
				PE	20200343	A1	2020年2月14日
				AR	111497	A1	2019年7月17日
				TN	2019000297	A1	2021年5月7日
				PH	12019502444	A1	2020年7月20日
				SG	11201909998	TA	2019年11月28日
-----				-----			
CN	114246944	A	2022年3月29日	无			
-----				-----			
CN	111032085	A	2020年4月17日	WO	2018223182	A1	2018年12月13日
				AU	2018280340	A1	2019年12月19日
				US	2023042913	A1	2023年2月9日
				EP	3634484	A1	2020年4月15日
				EP	3634484	A4	2022年1月12日
				CA	3065836	A1	2018年12月13日
				JP	2020522529	A	2020年7月30日
-----				-----			