



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202434288 A

(43)公開日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：112144352

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 11 月 16 日

(51)Int. Cl. :

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61K47/26 (2006.01)

A61K47/18 (2006.01)

A61K47/12 (2006.01)

A61K9/19 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

A61P19/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/11/16

中國大陸

2022114382398

(71)申請人：大陸商蘇州盛迪亞生物醫藥有限公司(中國大陸) SUZHOU SUNCADIA  
BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD. (CN)

中國大陸

大陸商上海恆瑞醫藥有限公司(中國大陸) SHANGHAI HENGRUI  
PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

中國大陸

大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司(中國大陸) JIANGSU HENGRUI  
PHARMACEUTICALS CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：楊震 YANG, ZHEN (CN)；楊喜琴 YANG, XIQIN (CN)；葛凌霄 GE, LINGXIAO  
(CN)；王宏偉 WANG, HONGWEI (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：4 共 120 頁

(54)名稱

一種含抗RANKL-NGF雙特異性抗體的醫藥組成物

(57)摘要

本揭露涉及一種含抗RANKL-NGF雙特異性抗體的醫藥組成物。具體而言，本揭露涉及的醫藥組成物包含抗RANKL-NGF雙特異性抗體和緩衝劑。

This disclosure relates to a pharmaceutical composition containing anti-RANKL-NGF bispecific antibodies. Specifically, the pharmaceutical composition disclosed in this disclosure includes anti-RANKL-NGF bispecific antibodies and buffering agents.

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 一種含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的醫藥組成物

【英文發明名稱】 A PHARMACEUTICAL COMPOSITION  
CONTAINING ANTI-RANKL-NGF BISPECIFIC  
ANTIBODIES

### 【中文】

本揭露涉及一種含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的醫藥組成物。具體而言，本揭露涉及的醫藥組成物包含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體和緩衝劑。

### 【英文】

This disclosure relates to a pharmaceutical composition containing anti-RANKL-NGF bispecific antibodies. Specifically, the pharmaceutical composition disclosed in this disclosure includes anti- RANKL-NGF bispecific antibodies and buffering agents.

【指定代表圖】 無。

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 一種含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的醫藥組成物

【英文發明名稱】 A PHARMACEUTICAL COMPOSITION  
CONTAINING ANTI-RANKL-NGF BISPECIFIC  
ANTIBODIES

【0001】 本申請要求中國專利申請(申請號 202211438239.8，申請日 2022 年 11 月 16 日)的優先權。

### 【技術領域】

【0002】 本揭露屬於藥物製劑領域，具體涉及一種含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的醫藥組成物，以及其作為藥物的用途。

### 【先前技術】

【0003】 這裡的陳述僅提供與本揭露有關的背景信息，而不必然地構成現有技術。

【0004】 骨轉移是很多癌症發展到後期常見的一種伴隨症狀。骨轉移的發病機制為：原發性的腫瘤細胞脫落進入血液循環系統形成循環的腫瘤細胞，循環的腫瘤細胞轉移到骨骼部位形成具有傳播性的腫瘤細胞，並在骨骼微環境中休眠；這一過程可能持續數年的時間，直到存活下來的腫瘤細胞逐漸適應了骨骼的微環境，腫瘤細胞被激活，從休眠狀態進入增殖狀態(Mantyh, P.W., Curr Opin Support Palliat Care, 2014. 8(2): p83-90)。

腫瘤細胞的增殖會影響骨骼的微環境，並促進破骨細胞的形成，破骨細胞導致骨吸收加快並釋放出多種細胞因子，進一步促進腫瘤細胞的增殖，由此形成了一個惡性循環(Quayle, L., *Current Cancer Drug Targets*, 2015. 15(6): p469-480)。腫瘤細胞的不斷增殖導致多個轉移位點的形成，使患者出現骨損傷和疼痛等各種問題(Gartland, A., *Journal of Bone Oncology*, 2016. 5(3): p100-103)。

【0005】據統計，常見的發生骨轉移的癌症包括骨髓瘤、腎癌、黑色素瘤、膀胱癌、甲狀腺癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌(Clezardin, P., *Joint Bone Spine*, 2017. 84(6): p677-684. Fidler, M.M. Fidler, *Scandinavian Journal of Public Health*, 2018. 46(1): p27-36)。

【0006】在正常骨組織中，成骨和破骨細胞處於一個相對平衡的狀態，以維持骨骼正常的生長發育，而癌細胞的存在會破壞這種平衡。在骨微環境中的癌細胞會釋放一系列的細胞因子來刺激成骨細胞和骨細胞分泌大量的核因子  $\kappa$ B 受體活化因子配體(Receptor Activator of Nuclear Factor-  $\kappa$ B Ligand, RANKL)。RANKL 與 RANK 受體作用促進破骨細胞的形成，導致骨吸收加劇。骨吸收造成的骨質溶解又會釋放出其他的生長因子來促進癌細胞的增殖。這樣就形成了一個有利於癌細胞轉移的循環(Body, J.J., *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012. 12(3): p307-322)。

【0007】NGF(Nerve growth factor)是一種神經生長因子。NGF 信號通路介導了神經系統的生長發育和疼痛信號的傳導。目前已知在細胞表面有兩種 NGF 受體，其中 TrKA 是高親和力的受體，p75NTR 是低親和力的受體。NGF 與 TrkA 作用可以同時激活 Ras 和 PI3K 通路，促進細胞的存



活和神經的生長。而 NGF 與 p75NTR 作用可以促進細胞的凋亡。另外 PI3K 通路還可以激活 TRPV1 的磷酸化，導致離子通道激活產生動作電位並傳導痛覺神經元信號(Kumar, V. and Mahal B. A., Journal of Pain Research, 2012. 5 : p279-287)。

【0008】已有數據表明，靶向 NGF 和 RANKL 的單株抗體對骨轉移引起的骨損傷和疼痛有一定的治療效果(Body JJ. Expert Rev Anticancer Ther. 2012. 12(3):p307-322. Sopata M., et al. 2015. 156(9):p1703-1713)。

#### 【發明內容】

【0009】本揭露提供一種含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的醫藥組成物，該組成物具有治療活性。此外，該組成物還具有穩定性好等優勢。

【0010】在一些實施方案中，本揭露提供一種醫藥組成物，包含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體和緩衝劑，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含特異性結合 RANKL 的第一抗原結合結構域和特異性結合 NGF 的第二抗原結合結構域，該緩衝劑為醋酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑或磷酸鹽緩衝劑。

【0011】在一些實施方案中，該緩衝劑為醋酸-醋酸鈉緩衝劑、組胺酸-鹽酸組胺酸緩衝劑或檸檬酸-磷酸氫二鈉緩衝劑。

【0012】在一些實施方案中，該緩衝劑為醋酸-醋酸鈉緩衝劑或組胺酸-鹽酸組胺酸緩衝劑。

【0013】在一些具體的實施方案中，該緩衝劑為醋酸-醋酸鈉緩衝劑。

【0014】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.8。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.0。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 5.4。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為約 4.6。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為約 4.8。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為約 5.0。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為約 5.2。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為約 5.4。當本揭露中提及點值時，應當理解該點值包含了誤差範圍。這種誤差範圍是由於實驗室環境、人員操作、儀器、方法學、測量誤差等因素所致。以 pH 為例，當測值為約 5.0 時，應當理解其包含了誤差範圍。作為一個示例，採用工業用 pH 計測量製劑時，“約 5.0”表示  $5.0 \pm 0.2$  (即 pH 為 4.8 至 5.2)。

【0015】 在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 4.6-6.6。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 4.6-5.8。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 5.0-5.8。

【0016】 在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 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，或者為這些點值之間的任意範圍。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 4.6。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 4.8。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 5.0。在一些

實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 5.2。在一些實施方案中，該醫藥組成物的 pH 為 5.4。

【0017】通常，藉由置換緩衝劑獲得的醫藥組成物的 pH 與緩衝劑 pH 幾乎一致。同時，所屬技術領域中具有通常知識者公知，在藥物製劑的過程中，有時可能會存在 pH 飄移，但藥物製劑的 pH 的飄移一般很小(例如  $\pm 0.3$  範圍內)。在一些實施方案中，藥物製劑的 pH 的飄移在  $\pm 0.2$  範圍內。在一些實施方案中，藥物製劑的 pH 的飄移在  $\pm 0.1$  範圍內。

【0018】在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 1mg/mL 至 150mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 1mg/mL 至 100mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 10 mg/mL 至 80 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 20mg/mL 至 80 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 20mg/mL 至 77 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 20mg/mL 至 70 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 50mg/mL 至 77 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 56 mg/mL 至 84 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 63 mg/mL 至 77 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為約 77mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為約 70mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為約 50mg/mL。在一些

實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為約 20 mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 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，或者為這些點值之間的任意範圍。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 77mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 70mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 50mg/mL。在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 20mg/mL。

【0019】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該醫藥組成物包含表面活性劑。在一些實施方案中，該表面活性劑是非離子表面活性劑。在一些實施方案中，該表面活性劑選自泊洛沙姆(例如泊洛沙姆 188)、聚山梨酯(例如聚山梨酯 20、聚山梨酯 80)、聚羥亞烴、Triton、十二烷基磺酸鈉、月桂基磺酸鈉、辛基糖甙鈉、月桂基-磺基甜菜鹼、肉豆蔻基-磺基甜菜鹼、亞油基-磺基甜菜鹼、硬脂基-磺基甜菜鹼、月桂基-肌胺酸、肉豆蔻基-肌胺酸、亞油基-肌胺酸、硬脂基-肌胺酸、亞油基-甜菜鹼、肉豆蔻基-甜菜鹼、鯨蠟基-甜菜鹼、月桂醯胺基丙基-甜菜鹼、柯卡醯胺基丙基-甜菜鹼、亞油醯胺基丙基-甜菜鹼、肉豆蔻醯胺基丙基-甜菜鹼、棕櫚醯胺基丙基-甜菜鹼、異硬脂醯胺基丙基-甜菜鹼、肉豆蔻醯胺基丙基-二甲基胺、棕櫚醯胺基丙基-二甲基胺、異硬脂醯胺基丙基-二甲基胺、甲基可可

醯基鈉、甲基油基牛磺酸鈉、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯與丙烯二醇的共聚物等。在一些實施方案中，該表面活性劑為聚山梨酯或泊洛沙姆。在一些實施方案中，該表面活性劑為聚山梨酯 80、聚山梨酯 20 或泊洛沙姆 188。在一些實施方案中，該表面活性劑為聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20。在一些實施方案中，該表面活性劑為聚山梨酯 80。

【0020】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該表面活性劑濃度為 0.01mg/mL 至 1.0mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.01mg/mL 至 0.8mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.01mg/mL 至 0.6mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.01mg/mL 至 0.4mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.01mg/mL 至 0.2mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.1 mg/mL 至 0.4 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.05mg/mL 至 0.15mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.09 mg/mL 至 0.11 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為約 0.4 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為約 0.2 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為約 0.1 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 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，或者為這些點值之間的任意範圍。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度

為 0.4 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.2 mg/mL。在一些實施方案中，該表面活性劑濃度為 0.1mg/mL。

【0021】 在一些實施方案中，該表面活性劑為約 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80。在一些實施方案中，該表面活性劑為 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80。

【0022】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包括穩定劑。在一些實施方案中，穩定劑為糖(包括單糖、二糖、三糖、多糖、糖醇、還原性糖、非還原性糖等等)、胺基酸(包括脯胺酸、精胺酸、甘胺酸、半胱胺酸、組胺酸等等)或鹽類(氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣等)。在一些實施方案中，該穩定劑選自由脯胺酸、蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精胺酸、甘胺酸和氯化鈉組成的組中的一種或更多種。在一些實施方案中，該穩定劑為脯胺酸、蔗糖或氯化鈉。在一些實施方案中，該穩定劑為胺基酸。在一些實施方案中，該穩定劑為脯胺酸。

【0023】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，穩定劑濃度為 1mM 至 300mM。在一些實施方案中，穩定劑濃度為 25 mM 至 290 mM。在一些實施方案中，穩定劑濃度為 25mM 至 250mM。在一些實施方案中，穩定劑濃度為 210 mM 至 270 mM。在一些實施方案中，穩定劑濃度為 216 mM 至 264 mM。在一些實施方案中，穩定劑濃度為 228 mM 至 252 mM。在一些實施方案中，該穩定劑濃度為約 240 mM。在一些實施方案中，該穩定劑濃度為 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，或者為這些點值之間的任意範圍。在一些實施方案中，該穩定劑濃度為 240 mM。

【0024】 在一些實施方案中，該穩定劑為約 240 mM 脯胺酸。在一些實施方案中，該穩定劑為 240 mM 脯胺酸。

【0025】 在一些實施方案中，該穩定劑為糖，該糖選自：葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麥芽糖，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(也稱山梨醇)，甘露醇，密裡二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水蘇糖，麥芽糖，乳果糖，麥芽酮糖，麥芽糖醇，乳糖醇和異-麥芽酮糖。在一些實施方案中，該穩定劑選自由蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精胺酸、甘胺酸和氯化鈉組成的組中的一種或多種。在一些實施方案中，該穩定劑為非還原性二糖。在一些實施方案中，該穩定劑為海藻糖或蔗糖。在一些實施方案中，該穩定劑為蔗糖。

【0026】 在一些實施方案中，穩定劑為 10mg/mL 至 100mg/mL 蔗糖。在一些實施方案中，穩定劑為 30mg/mL 至 80mg/mL 蔗糖。在一些實施方案中，穩定劑為 50mg/mL 至 80mg/mL 蔗糖。在一些實施方案中，穩定劑為 70mg/mL 至 80mg/mL 蔗糖。在一些實施方案中，穩定劑為 60 mg/mL 至 90 mg/mL 蔗糖。在一些實施方案中，穩定劑為 67.5 mg/mL 至 82.5 mg/mL 蔗糖。在一些實施方案中，穩定劑為約 75mg/mL 蔗糖。在一些實施方案中，穩定劑濃度非限制性實施包括 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，以及這些點值之間的任一範圍。在一些實施方案中，穩定劑為 75 mg/mL 蔗糖。

【0027】 在一些實施方案中，該穩定劑為鹽類。在一些實施方案中，該穩定劑為氯化鈉。在一些實施方案中，該穩定劑為 0.64%(w/v)至 0.96%(w/v)氯化鈉。在一些實施方案中，該穩定劑為 0.72%(w/v)至 0.88%(w/v)氯化鈉。在一些實施方案中，該穩定劑為約 0.8%(w/v)氯化鈉。在一些實施方案中，該穩定劑為 0.8%(w/v)氯化鈉。

【0028】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，該緩衝劑的濃度為 5mM 至 100mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 10mM 至 50mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 10 mM 至 30 mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 10mM 至 20mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 16 mM 至 24 mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 18 mM 至 22 mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為約 20 mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為約 10 mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 5mM、10mM、15mM、16 mM、18 mM、20mM、22 mM、24 mM、25mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM 或 100mM，以及這些點值之間的任一範圍。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 20 mM。在一些實施方案中，該緩衝劑的濃度為 10 mM。

【0029】 在一些實施方案中，該緩衝劑為約 10mM 醋酸-醋酸鈉緩衝劑。在一些實施方案中，該緩衝劑為約 20mM 醋酸-醋酸鈉緩衝劑。在一些實施方案中，該緩衝劑為 10mM 醋酸-醋酸鈉緩衝劑。在一些實施方案中，該緩衝劑為 20mM 醋酸-醋酸鈉緩衝劑。在一些實施方案中，該緩衝劑為



10mM 組胺酸-鹽酸組胺酸緩衝劑。在一些實施方案中，該緩衝劑為 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉緩衝劑。

【0030】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含：至少一個特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域和至少一個特異性結合 NGF 的第二抗原結合域。

【0031】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含：兩個特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域和兩個特異性結合 NGF 的第二抗原結合域。

【0032】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體具有如圖 1 所示的結構。

【0033】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：3 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6 的胺基酸序列。

【0034】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域

包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO：7 的胺基酸序列；和/或該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：8 的胺基酸序列。

【0035】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：15 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：16 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：17 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：18 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：19 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：20 的胺基酸序列。

【0036】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

該重鏈可變區包含 SEQ ID NO：21 的胺基酸序列；和/或

該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：22 的胺基酸序列。

【0037】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 NGF 的第二抗原結合結構域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO：24 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO：25 的胺基酸序列。

【0038】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，

(i) 特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：3 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6 的胺基酸序列；

(ii) 特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：15 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：16 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：17 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：18 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：19 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：20 的胺基酸序列。

【0039】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，

(i) 特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含 SEQ ID NO：7 的胺基酸序列；和/或該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：8 的胺基酸序列；

(ii) 特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含 SEQ ID NO：21 的胺基酸序列；和/或該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：22 的胺基酸序列。

【0040】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，

(i) 特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：3 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6 的胺基酸序列；

(ii) 特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：15 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：16 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：17 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：18 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：19 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：20 的胺基酸序列；且該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體具有如圖 1 所示的結構。

【0041】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，

(i) 特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含 SEQ ID NO：7 的胺基酸序列；和/或該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：8 的胺基酸序列；

(ii) 特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含 SEQ ID NO：21 的胺基酸序列；和/或該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：22 的胺基酸序列；且該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體具有如圖 1 所示的結構。

【0042】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含第一多肽鏈和第二多肽鏈，其中：該第一多肽鏈包含 SEQ ID NO：30 的胺基酸序列，該第二多肽鏈包含 SEQ ID NO：31 的胺基酸序列。

【0043】 在一些實施方案中，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含兩條序列相同的第一鏈和兩條序列相同的第二鏈，其中：該第一多肽鏈包含 SEQ ID NO：30 的胺基酸序列，該第二多肽鏈包含 SEQ ID NO：31 的胺基酸序列。

【0044】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

- (a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性劑，
- (c) 1 mM 至 300 mM 的穩定劑，和
- (d) 5 mM 至 100 mM 的緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.0。

【0045】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

- (a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性劑，

(c) 1 mM 至 300 mM 的脯胺酸，和

(d) 5 mM 至 100 mM 的緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.0。

【0046】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

(a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，

(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 的脯胺酸，和

(d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4。

【0047】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

(a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，

(b) 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 25 mM 至 250 mM 的脯胺酸，和

(d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4。

【0048】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

(a) 20 mg/mL 至 80 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，

(b) 0.01 mg/mL 至 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和

(d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4。

【0049】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，

(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和

(d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0050】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，

(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 25 mM 至 250 mM 的脯胺酸，和

(d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸鈉鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0051】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，

(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 240 mM 的脯胺酸，和

(d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑；該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0052】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (b) 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和
- (d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0053】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (b) 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和
- (d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0054】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

- (a) 約 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (b) 約 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 約 240 mM 的脯胺酸，和



(d) 約 20 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0055】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

(a) 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，

(b) 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 240 mM 的脯胺酸，和

(d) 20 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0056】 在一些實施方案中，如上所述的醫藥組成物，該醫藥組成物是液體製劑。在一些實施方案中，該液體製劑的溶劑是水。

【0057】 本揭露還提供一種的凍乾製劑，其特徵在於該凍乾製劑複溶後可形成如上任一項所述的醫藥組成物。

【0058】 本揭露還提供一種凍乾製劑，其為如上任一項所述的醫藥組成物的凍乾形式製劑。

【0059】 本揭露還提供一種製備凍乾製劑的方法，其中包括將如上任一項所述的醫藥組成物進行冷凍乾燥的步驟。在一些實施方案中，如上任一項所述冷凍乾燥依次包括預凍、一次乾燥和二次乾燥的步驟。

【0060】 本揭露還提供一種凍乾製劑，該製劑藉由將如上任一項所述的醫藥組成物經冷凍乾燥獲得。

【0061】 本揭露還提供一種複溶溶液，其特徵在於該複溶溶液是藉由將如上任一項所述的凍乾製劑經複溶製備獲得。

【0062】 本揭露還提供一種複溶溶液，其為如上任一項所述的凍乾製劑的複溶形式製劑。

【0063】 在一些實施方案中，如上任一項的所述的複溶溶液，其組分和含量與前述的醫藥組成物的組分和含量相同。

【0064】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性劑，(c) 1 mM 至 300 mM 的穩定劑，和(d) 5 mM 至 100 mM 的緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.0。

【0065】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的如上任一項所述的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性劑，(c) 1 mM 至 300 mM 的脯胺酸，和(d) 5 mM 至 100 mM 的緩衝劑，醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.0。

【0066】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(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 的脯胺酸，和(d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4。

【0067】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 25 mM 至 250 mM 的脯胺酸，和(d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4。

【0068】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 20 mg/mL 至 80 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.01 mg/mL 至 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和(d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4。

【0069】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和(d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0070】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 25 mM 至 250 mM 的脯胺酸

酸，和(d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸鈉鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0071】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 240 mM 的脯胺酸，和(d) 10 mM 至 20 mM 的醋酸-醋酸鈉鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0072】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和(d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸鈉鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0073】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和(d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸鈉鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0074】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 約 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 約 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 約 240 mM 的脯胺酸，和(d) 約 20 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0075】 在一些實施方案中，如上任一項所述的複溶溶液，其包含如下組分：

(a) 70 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，(b) 0.1 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 240 mM 的脯胺酸，和(d) 20 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【0076】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物或複溶溶液，其為皮下注射製劑、靜脈注射製劑、腹腔注射製劑或肌肉注射製劑。在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物或複溶溶液，其為皮下注射製劑。

【0077】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物或複溶溶液，其適用於皮下注射、靜脈注射、腹腔注射或肌肉注射；較佳地，其適用於皮下注射。

【0078】 在一些實施方案中，如上任一項所述的醫藥組成物或複溶溶液或凍乾製劑，其用於製備皮下注射、靜脈注射、腹腔注射或肌肉注射的藥物；較佳地，其用於製備皮下注射的藥物。

【0079】 本揭露還提供一種藥盒，其包括至少一個容器，各容器獨立地包含如上任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑或如上任一項所述的複溶溶液。

【0080】 在一些實施方案中，本揭露還提供診斷、治療、緩解受試者病症的方法，包含向該受試者施用有效量的如上任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒。

【0081】 在一些實施方案中，本揭露還提供如上任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒在製備治療或預防疾病的藥物中的用途。

【0082】 在一些實施方案中，本揭露還提供一種治療或預防疾病的方法，該方法包括向受試者施用治療有效量的如上任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒。

【0083】 在一些實施方案中，本揭露還提供如上任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒，其用於治療或預防疾病。

【0084】 在一個方面，本揭露還提供如前任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒在製備用於預防或治療疾病或病症的藥物中的用途。

【0085】 在一些具體實施方案中，如上任一項所述的疾病為疼痛、關節僵硬或骨損失。

【0086】 在一些實施方案中，該疼痛選自：骨關節疼痛、類風濕性關節炎疼痛、痛風、骨癌痛、骨折疼痛、手術後疼痛、癌症疼痛、痛性膀胱綜合症、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)、間質性膀胱炎、下背痛、痛經、骨骼疾病相關的疼痛、三叉神經痛、帶狀皰疹後遺神經痛、帶狀皰疹感染、坐骨神經痛、偏頭痛、糖尿病神經病變和外周神經相關的疼痛。

【0087】 在一些實施方案中，該骨損失與選自下組的至少一種狀況相關：骨質疏鬆症、佩吉特氏病、骨髓炎、高鈣血症、骨質稀少、骨質疏鬆、骨壞死、骨損傷、骨吸收、骨發育不全、炎症、自身免疫疾病、腸炎、類風濕性關節炎、系統性紅斑狼瘡、克羅恩病、牙周骨吸收、溶骨性轉移和癌症。

【0088】 在一些實施方案中，其中該癌症選自乳腺癌、前列腺癌、甲狀腺癌、腎癌、肺癌、食道癌、直腸癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、胃腸道癌、黑色素瘤、多發性骨髓瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、非小細胞肺癌、骨腫瘤和何傑金氏病。

【0089】 在一些實施方案中，前述的疾病為與 NGF 或 RANKL 相關的疾病。

【0090】 在一些實施方案中，前述的疾病為表達 NGF 或 RANKL 的疾病。

【0091】 在一個方面，本揭露提供一種治療或預防與 NGF 或 RANKL 相關的疾病的方法，該方法包括給予受試者預防有效量或治療有效量的如前任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒。

【0092】 在一些實施方案中，該與 NGF 或 RANKL 相關的疾病為疼痛、關節僵硬或骨損失。

【0093】 在一個方面，本揭露的如前任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒可用作藥物。在一些實施方案中，用作用於治療疼痛、關節僵硬或骨損失的藥物。在一些實施方案中，用作用於治療骨關節疼痛、類風濕性關節炎疼痛、痛風、骨癌痛、骨折疼痛、手術後疼痛、癌症疼痛、痛性膀胱綜合症、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)、間質性膀胱炎、下背痛、痛經、骨骼疾病相關的疼痛、三叉神經痛、帶狀皰疹後遺神經痛、帶狀皰疹感染、坐骨神經痛、偏頭痛、糖尿病神經病變和外周神經相關的疼痛的藥物。在一些實施方案中，用作用於治療骨質疏鬆症、佩吉特氏病、骨髓炎、高鈣血症、骨質稀少、骨質疏鬆、骨壞死、骨損傷、骨吸收、骨發育不全、炎症、自身免疫疾病、腸炎、類風濕性關節炎、系統性紅斑狼瘡、克羅恩病、牙周骨吸收、溶骨性轉移和癌症引起的骨損失的藥物。

【0094】 在一個方面，本揭露提供如前任一項所述的藥物醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒在製備用於或預防或治療與 NGF 或 RANKL 相關的疾病的藥物中的用途。在一些實施方案中，該與 NGF 或 RANKL 相關的疾病為疼痛、關節僵硬或骨損失。

【0095】 在一個方面，本揭露提供的如前任一項所述的醫藥組成物、如上任一項所述的凍乾製劑、如上任一項所述的複溶溶液或如上任一項所述的藥盒可用作預防或治療與 NGF 或 RANKL 相關的疾病的藥物。在一



些實施方案中，該與 NGF 或 RANKL 相關的疾病為疼痛、關節僵硬或骨損失。

**【圖式簡單說明】**

**【0096】** 圖 1：DVD-IgG 結構示意圖。

**【0097】** 圖 2A 至圖 2D：圖 2A 顯示聯合用藥第 14 天，小鼠疼痛行為統計結果；圖 2B 顯示聯合用藥第 21 天，小鼠疼痛行為統計結果；圖 2C 顯示聯合用藥第 14 天，小鼠骨損傷評分結果；圖 2D 顯示聯合用藥第 21 天，小鼠骨損傷評分結果；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,  $P < 0.05$ 。空白對照(Blank)；假手術組(Sham)；載劑對照(vehicle)。

**【0098】** 圖 3A 至圖 3B：圖 3A 顯示使用雙特異性抗體 1 第 14 天，小鼠疼痛行為統計結果；圖 3B 顯示使用雙特異性抗體 1 第 21 天，小鼠疼痛行為統計結果；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,  $P < 0.05$ 。載劑對照(vehicle)。

**【0099】** 圖 4A 至圖 4D：圖 4A 顯示使用雙特異性抗體 1 第 15 天，小鼠疼痛行為統計結果；圖 4B 顯示使用雙特異性抗體 1 第 21 天，小鼠疼痛行為統計結果；圖 4C 顯示使用雙特異性抗體 1 第 15 天，小鼠骨損傷評分結果；圖 4D 顯示使用雙特異性抗體 1 第 21 天，小鼠骨損傷評分結果；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。假手術組(Sham)；載劑對照(vehicle)。

## 【實施方式】

### 術語

【0100】為了更容易理解本揭露，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，否則本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本揭露所屬技術領域具有通常知識者通常理解的含義。

【0101】本揭露所用的單數形式“一個”、“一種”和“該”包括複數指代，除非上下文清楚表明並非如此。

【0102】除非上下文另外清楚要求，否則在專利說明書和申請專利範圍中，應將詞語“包含”、“具有”、“包括”等理解為“包括但不僅限於”的意義，而不是排他性或窮舉性意義。

【0103】“視需要”或“視需要地”意味著隨後所描述地事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生地場合。

【0104】所屬技術領域中具有通常知識者應當理解，當參考數值範圍、截止值或特定值使用時，“約”可以表示在 1 個或多於 1 個標準偏差之內。或者，“約”可以表示相差最高達 20%的範圍(即±20%)。由於本文所用的許多數值是藉由實驗確定的，因此所屬技術領域中具有通常知識者應當理解，此類確定可以在不同實驗之間有差異並且通常在不同實驗之間有差異。由於這種內在差異，認為本文所用的值不應受到過度限制。因此，術語“約”用於涵蓋與指定值相差±20%或更小的變化、±10%或更小的變化、±5%或

更小的變化、±1%或更小的變化、±0.5%或更小的變化、或者±0.1%或更小的變化。

【0105】 儘管本揭露提供了含量範圍或含量值，但所屬技術領域中具有通常知識者理解，該含量範圍或含量值涵蓋了所測定具體值的可接受誤差範圍。

【0106】 本揭露所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如 *J. biol. chem.*, 243, p3558(1968)中所述。

【0107】 “抗-RANKL 抗體”意指能夠與 RANKL 或其表位結合，並抑制 RANKL 的生物活性及/或抑制 RANKL 的下游通路的抗體。

【0108】 術語“NGF”，神經生長因子意指神經生長因子及其保留至少一部分 NGF 的生物活性的變體。當在本文中使用时，NGF 包括所有哺乳動物物種的野生型序列 NGF 或其天然存在的變體，包括人類、鼠、猴、狗、貓、馬或牛。

【0109】 術語“胺基酸”是指天然存在的和合成的胺基酸，以及以與天然存在的胺基酸類似的方式起作用的胺基酸類似物和胺基酸模擬物。天然存在的胺基酸是由遺傳密碼編碼的那些胺基酸，以及後來修飾的那些胺基酸，例如羧脯胺酸、 $\gamma$ -羧基谷胺酸和 O-磷酸絲胺酸。胺基酸類似物是指與天然存在的胺基酸具有相同基本化學結構(即與氫、羧基、胺基和 R 基團結合的  $\alpha$  碳)的化合物，例如高絲胺酸、正亮胺酸、甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸甲基銻。此類類似物具有修飾的 R 基團(例如，正亮胺酸)或修飾的肽骨架，但保留與天然存在的胺基酸相同的基本化學結構。胺基酸模擬物是指具有

與胺基酸的一般化學結構不同的結構，但是以與天然存在的胺基酸類似的方式起作用的化學化合物。

【0110】“抗體”以最廣義使用，涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體，多株抗體；單特異性抗體，多特異性抗體(例如雙特異性抗體)，全長抗體和抗體片段(或抗原結合片段，或抗原結合部分)，只要它們展現出期望的抗原結合活性。“天然抗體”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗體是約 150,000 道爾頓的異四聚糖蛋白，由二硫鍵結合的兩條相同輕鏈和兩條相同重鏈構成。從 N 至 C 端，每條重鏈具有一個可變區(VH)，又稱作可變重域、重鏈可變區，接著是三個恆定域(CH1、CH2 和 CH3)。類似地，從 N 至 C 端，每條輕鏈具有一個可變區(VL)，又稱作可變輕域，或輕鏈可變域，接著是一個恆定輕域(輕鏈恆定區、CL)。術語“雙特異性抗體”指能夠對兩個不同抗原或同一抗原的至少兩個不同抗原表位特異性結合的抗體(包括抗體或其抗原結合片段，如單鏈抗體)。

【0111】術語“可變區”或“可變域”指抗體重鏈或輕鏈中涉及抗體結合抗原的域。本文中，抗體重鏈可變區(VH)和輕鏈可變區(VL)各包含四個保守的框架區(FR)和三個互補決定區(CDR)。其中，術語“互補決定區”或“CDR”指可變區內主要促成與抗原結合的區域；“框架”或“FR”是指除 CDR 殘基之外的可變結構域殘基。VH 包含 3 個 CDR 區：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 個 CDR 區：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。每個 VH 和 VL 由從胺基末端排到羧基末端按以下順序排列的三個 CDR 和四個 FR 構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。單個 VH 或 VL 可能足以賦予抗原結合特異性。

【0112】可以藉由各種公知方案來確定 CDR 的胺基酸序列邊界，例如：“Kabat”編號規則(參見 Kabat 等(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD)、 “Chothia”編號規則、“ABM”編號規則、“contact”編號規則(參見 Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001)和 ImMunoGenTics(IMGt)編號規則(Lefranc，M.P.等，Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)；Front Immunol. 2018 Oct 16; 9:2278)等；各種編號系統之間的對應關係是所屬技術領域中具有通常知識者熟知的。本揭露的編號規則如下表 1 中所示。

表 1. CDR 編號系統之間的關係

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

【0113】除非另有說明，本揭露實施例中的可變區和 CDR 序列均適用“Kabat”編號規則。儘管在具體的實施方案中，採用了 Kabat 編號規則來限定胺基酸殘基，但是其他編號系統所對應技術方案將視為等同技術方案。

【0114】“醫藥組成物”表示含有一種或多種本文所述雙特異性抗體，以及其他組分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。醫藥組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。本揭露中，“醫藥組成物”和“製劑”並不互相排斥。

【0115】“有效量”包含足以改善或預防醫學病症的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定受試者或獸醫學受試者的有效量可依據以下因素而變化：如待治療的病症、受試者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

【0116】“藥學可接受的載體”或“藥學可接受的賦形劑”包括當與活性成分組合時，允許該成分保留生物學活性並且不與受試者的免疫系統反應的任何材料。例子包括但不限於任何標準藥物載體，例如磷酸鹽緩衝鹽水溶液、水、乳劑如油/水乳劑、和各種類型的潤濕劑。在一些實施例中，用於氣霧劑或腸胃外施用的稀釋劑是磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)或生理(0.9%)鹽水。包含此類載體的組成物藉由眾所周知的常規方法配製。

【0117】“緩衝劑”指藉由其酸-鹼共軛組分的作用而耐受 pH 變化的緩衝劑。將 pH 控制在適當範圍中的緩衝劑的例子包括醋酸鹽、琥珀酸鹽、葡萄糖酸鹽、組胺酸、草酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、枸橼酸鹽、酒石酸鹽、延胡索酸鹽、甘胺鹽甘胺酸和其它有機酸緩衝劑。

【0118】“組胺酸緩衝劑”是包含組胺酸的緩衝劑。組胺酸緩衝劑的實例包括組胺酸-鹽酸組胺酸，組胺酸-醋酸組胺酸，組胺酸-磷酸組胺酸，組胺酸-硫酸組胺酸等緩衝劑，較佳組胺酸-鹽酸組胺酸緩衝劑。組胺酸-鹽酸

組胺酸緩衝劑可由組胺酸與鹽酸配製而成，或者由組胺酸與鹽酸組胺酸配製而成。

【0119】“枸橼酸鹽緩衝劑”是包括枸橼酸根離子的緩衝劑。枸橼酸鹽緩衝劑的實例包括枸橼酸-枸橼酸鈉、枸橼酸-枸橼酸鉀、枸橼酸-枸橼酸鈣、枸橼酸-枸橼酸鎂等。較佳的枸橼酸鹽緩衝劑是枸橼酸-枸橼酸鈉。

【0120】“琥珀酸鹽緩衝劑”是包括琥珀酸根離子的緩衝劑。琥珀酸鹽緩衝劑的實例包括琥珀酸-琥珀酸鈉鹽、琥珀酸-琥珀酸鉀、琥珀酸-琥珀酸鈣鹽等。較佳的琥珀酸鹽緩衝劑是琥珀酸-琥珀酸鈉鹽。示例性的，該琥珀酸-琥珀酸鈉可由琥珀酸與氫氧化鈉配製而成，或由琥珀酸與琥珀酸鈉鹽配製而成。

【0121】“磷酸鹽緩衝劑”是包括磷酸根離子的緩衝劑。磷酸鹽緩衝劑的實例包括檸檬酸-磷酸氫二鈉、磷酸氫二鈉-磷酸二氫鈉、磷酸氫二鈉-磷酸二氫鉀、磷酸氫二鈉-枸橼酸等。較佳的磷酸鹽緩衝劑是檸檬酸-磷酸氫二鈉。

【0122】“醋酸鹽緩衝劑”是包括醋酸根離子的緩衝劑。醋酸鹽緩衝劑的實例包括醋酸-醋酸鈉、組胺酸-醋酸組胺酸、醋酸-醋酸鉀、醋酸-醋酸鈣、醋酸-醋酸鎂等。較佳的醋酸鹽緩衝劑是醋酸-醋酸鈉。

【0123】“泊洛沙姆(poloxamer)”是環氧乙烷和環氧丙烷的嵌段共聚物，其是水溶性的並在藥物製劑中用作表面活性劑。泊洛沙姆的實例包括泊洛沙姆 188。

【0124】“凍乾製劑”表示液體或溶液形式的醫藥組成物或液體或溶液製劑經真空冷凍乾燥步驟之後獲得的製劑或醫藥組成物。

【0125】本揭露所述的醫藥組成物能夠達到一種穩定的效果：其中的抗體在貯藏後基本上保留其物理穩定性和/或化學穩定性和/或生物學活性的醫藥組成物，較佳地，醫藥組成物在貯藏後基本上保留其物理和化學穩定性以及其生物學活性。貯藏期一般基於醫藥組成物的預定保存期來選擇。目前有多種測量蛋白質穩定性的分析技術，可測量在選定溫度貯藏選定時間段後的穩定性。

【0126】穩定的製劑是在下述情況下沒有觀察到顯著變化的製劑：在冷藏溫度(2-8°C)保存至少 3 個月、較佳 6 個月、更佳 1 年，且甚至更佳地多達 2 年。另外，穩定的液體製劑包括這樣的液體製劑：其在包括 25°C 的溫度保存包括 2 週、4 週、1 個月、3 個月或 6 個月在內的時段後表現出期望的特徵。此外，穩定的液體製劑還包括 40 °C 的溫度保存包括 2 週、4 週、1 個月、3 個月或 6 個月在內的時段後表現出期望的特徵。穩定性的典型的例子：藉由 SEC-HPLC 測得，通常不超過約 10%、較佳不超過約 5% 的抗體發生聚集或降解。藉由視覺分析，製劑是淡黃色近無色澄明液體或者無色澄明液體，或澄清至稍微乳白色。該製劑的濃度、pH 和重量克分子滲透壓濃度具有不超過±10%變化，較佳不超過±5%的變化。該製劑通常形成不超過約 10%、較佳不超過約 5%的聚集。

【0127】如果在目檢顏色和/或澄清度後，或者藉由 UV 光散射、尺寸排阻色譜法(SEC)和動態光散射(DLS)測得，抗體沒有顯示出顯著的聚集增加、沉澱和/或變性，那麼該抗體在藥物製劑中“保留它的物理穩定性”。蛋白構象的變化可以藉由熒光光譜法(其確定蛋白三級結構)和藉由 FTIR 光譜法(其確定蛋白二級結構)來評價。



【0128】 如果抗體沒有顯示出顯著的化學改變，那麼該抗體在藥物製劑中“保留它的化學穩定性”。藉由檢測和定量化學上改變的形式的蛋白，可以評估化學穩定性。經常改變蛋白化學結構的降解過程包括水解或截短(藉由諸如尺寸排阻色譜法和 CE-SDS 等方法來評價)、氧化(藉由諸如與質譜法或 MALDI/TOF/MS 結合的肽譜法等方法來評價)、脫醯胺作用(藉由諸如離子交換色譜法、毛細管等電聚焦、肽譜法、異天冬胺酸測量等方法來評價)和異構化(藉由測量異天冬胺酸含量、肽譜法等來評價)。

【0129】 如果抗體在給定時間的生物活性是在製備藥物製劑時表現出的生物活性的預定範圍內，那麼該抗體在藥物製劑中“保留它的生物活性”。

【0130】 “施用”、“給予”和“處理”，當其應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組成物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“施用”、“給予”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中該流體與細胞接觸。“施用”、“給予”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合組成物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當其應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

【0131】 “治療”意指給予患者內用或外用治療劑，例如包含本揭露的任一種的醫藥組成物，該患者具有一種或多種疾病症狀，而巳知該治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，以誘導這類症狀退化或抑制這類症狀發

展到任何臨床有測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量(也稱作“治療有效量”)可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。藉由醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本揭露的實施方案(例如治療方法或製品)在緩解每個目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如 Student t 檢驗、卡方檢驗、依據 Mann 和 Whitney 的 U 檢驗、Kruskal-Wallis 檢驗(H 檢驗)、Jonckheere-Terpstra 檢驗和 Wilcoxon 檢驗確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

【0132】本揭露的醫藥組成物可藉由任何合適的手段施用，包括腸胃外、肺內和鼻內，並且如果需要局部治療，則病灶內施用。腸胃外輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下施用。給藥可以藉由任何適當的途徑，例如，藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射。本文考慮多種給藥時間方案，包括但不限於，單次或在多個時間點多次施用，推注施用和脈衝輸注。在一些實施方案中，本揭露的醫藥組成物藉由皮下注射施用。

【0133】本揭露的醫藥組成物將以符合良好醫療實踐的方式配製、給藥和施用。在此背景下考慮的因素包括所治療的具體病症、所治療的具體哺乳動物、個體患者的臨床狀況、病症的起因、試劑的遞送部位、施用方法、施用時間安排以及醫學從業者已知的其他因素。視需要地，醫藥組成物還可以與用於預防或治療該病症的一種或更多種其它試劑一起配製。此類其它試劑的有效量取決於醫藥組成物中存在的抗原結合分子的量、病症或治療的類型以及其它因素。可以與本文所述相同的劑量和施用路徑使用，

或以本文該劑量的約 1 至 99% 使用，或以任何劑量使用，並藉由經驗/臨床確定為合適的任何途徑使用。

【0134】本揭露中與 NGF 或 RANKL 相關的疾病沒有限制，只要它是與 NGF 或 RANKL 相關的疾病即可，例如利用本揭露的抗體誘導的治療反應可藉由結合人類 NGF 或 RANKL，然後阻遏 NGF 或 RANKL 與其受體結合，或殺傷過表達 NGF 或 RANKL 的細胞；或抑制過表達 NGF 或 RANKL 的細胞的生長。

【0135】在以上說明書中提出了本揭露一種或多種實施方式的細節。雖然可使用與本文所述類似或相同的任何方法和材料來實施或測試本揭露，但是以下描述較佳的方法和材料。藉由說明書和申請專利範圍，本揭露的其他特點、目的和優點將是顯而易見的。在說明書和申請專利範圍中，除非上下文中有清楚的另外指明，單數形式包括複數指代物的情況。除非另有定義，本文使用的所有技術和科學術語都具有本揭露所屬領域具有通常知識者所理解的一般含義。說明書中引用的所有專利和出版物都藉由引用納入。提出以下實施例是為了更全面地說明本揭露的較佳實施方式。這些實施例不應以任何方式理解為限制本揭露的範圍，本揭露的範圍由申請專利範圍限定。

#### 實施例-抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體製備與檢測

【0136】PCT/CN2022/092333(申請日：2022.05.12；優先權專利申請號：CN202110515444.9)藉由援引完整收入本揭露。

#### 實施例 1：抗 RANKL 抗體的製備

【0137】藉由設計引子，構建酵母菌文庫。利用 RANKL 蛋白(Sino biological, 11682-HNCH)對文庫進行富集和篩選，獲得候選株，藉由測序確定株中抗體的輕重鏈可變區的胺基酸序列。得到的示例性的抗 RANKL 抗體的序列如下：

表 2. 抗 RANKL 抗體的 CDR 區序列

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

表 3. RANKL 抗體可變區序列

抗體名稱	重鏈可變區序列	輕鏈可變區序列
D75H	EVQLLES <span style="text-decoration: underline">GGGLVQPGGSLRLS</span> CAASGFTFSS <span style="text-decoration: underline">SYAMS</span> WVRQAPG KGLEWVSGITGSGGSTYYAD <u>S</u> <u>V</u> KGRFTISRDN <span style="text-decoration: underline">SKNTLYLQMN</span> SLRAEDTAVYYCVKDPGTT <u>S</u> <u>M</u> SWFDPWGQGT <u>L</u> VTVSS SEQ ID NO : 7	EIVLTQSPGTL <span style="text-decoration: underline">SLSPGERATLSC</span> <u>RASQSVRGRYLA</u> WYQQKPGQ APRLLIY <span style="text-decoration: underline">GASSRAT</span> GIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYC <u>QQYGSSPRT</u> FGQGTKVEIK SEQ ID NO : 8

【0138】將上述可變區與人輕鏈恆定區和重鏈恆定區融合，形成完整的抗體輕、重鏈。示例性的抗體的恆定區序列如下：

【0139】人 IgG4 重鏈恆定區：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV<sup>D</sup>HKPSNTK  
 VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG  
 SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL<sup>S</sup>LGK

SEQ ID NO : 9 ;

【0140】 人 κ 輕鏈恆定區 :

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD  
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH  
 QGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 10 .

【0141】 示例性的抗 RANKL 抗體的序列如下 :

【0142】 D75H 重鏈 :

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG  
 LEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT  
 AVYYCVKDPGTTSIMSWFDPWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR  
 TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<sup>G</sup>VHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTVPSSSLGKTYTCNV<sup>D</sup>HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP  
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

*PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH  
YTQKSLSLSLGK*

SEQ ID NO : 11 ;

【0143】 D75H 輕鏈 :

*EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SCR~~ASQSVRGRYLA~~WY~~QQKPGQAP  
RLLIY~~GASSRAT~~GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV~~FYCQQYGSS~~  
PRTFGQGTKVEIK~~RTVAAPS~~VFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCLL~~NNFYPREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~STY~~SLSS~~TL~~LSKADY~~EK~~HKVYAC  
EVTHQGLSSP~~VTK~~SFNRGEC*

SEQ ID NO : 12 。

【0144】 對照抗 RANKL 抗體的序列如下 :

【0145】 Denosumab 重鏈序列 :

*EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG  
LEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN~~SK~~NTLYLQMNSLRAEDT  
AVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR  
STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FPAVLQSSGLYS  
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKT~~VER~~KCCVECPCPA  
PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS~~VL~~TVVHQDWLNGKEYKCKVSN  
KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN~~QV~~SLTCLVKG~~FY~~  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSK~~LT~~VDKSRWQQG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO : 13 ;

【0146】 Denosumab 輕鏈序列：

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAP  
RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYGSS  
PRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH  
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 14。

### 實施例 2：抗 RANKL/NGF 雙特異性抗體的製備

【0147】 本揭露中雙特異性抗體的結合 NGF 的第二抗原結合結構域可以來源於任意適宜的抗體的抗原結合部分。特別適宜的抗體描述於例如國際申請 WO2004058184A2(藉由援引完整收入本文)。

【0148】 示例性雙特異性抗體的結合 NGF 結合域的 CDR 和可變區序列如下所示：

表 4. NGF 結合域的 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)

【0149】 NGF 結合域重鏈可變區：

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL  
 EWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY  
 YCARGGYWYATSYYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 21 ;

【0150】 NGF 結合域輕鏈可變區：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAP  
 KLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQEHT  
LPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO : 22 。

【0151】 將 NGF 結合域的可變區分別與 SEQ ID NO : 9 或 SEQ ID NO : 23 的重鏈恆定區和 SEQ ID NO : 10 的輕鏈恆定區融合，獲得抗 NGF 抗體。其序列如下：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK  
 VDKTVERKCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV  
 VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDG  
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 23 ;

【0152】 抗 NGF 抗體(N-mAb)重鏈：

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL  
 EWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY



YCARGGYWYATSYYFDYWGQGT~~LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE~~  
 STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV~~  
 PSSSLGTKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF~~  
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV~~VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK~~  
 PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK~~  
 GQPREPQVYTLPPS~~QEEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN~~  
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT~~VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ~~  
 KSLSLSLGK

SEQ ID NO : 24 ;

【0153】 抗 NGF 抗體(N-mAb)輕鏈：

DIQMTQSPSSLSASV~~GDRVITTCRASQ~~SISNNLN~~WYQQKPGKAP~~  
 KLLIYYT~~SRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS~~SLQPEDIATYYC~~QQEHT~~  
 LPYTFGQGT~~KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE~~  
 AKVQWKVDNALQSGNSQ~~ESVTEQDSK~~DSTYLS~~SSTLTL~~SKADY~~EKHKVYA~~  
 CEVTHQGLSSP~~VTKSFNRGEC~~

SEQ ID NO : 25 ;

【0154】 對照抗 NGF 抗體的序列：

【0155】 Tanezumab 重鏈：

QVQLQESGPG~~LVKPS~~ETLSLTCTVSGFSLIGYDLN~~WIRQPPGKGL~~  
 EWIGIIWGDGTTDYN~~SAVKSRVTISKDT~~SKNQFSLKLSSVTAADTAVY  
 YCARGGYWYATSYYFDYWGQGT~~LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE~~  
 STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV~~  
 PSSNFGTQTYTCNV~~DHKPSNTKVDKTVERKCCVEC~~PPCPAPPVAGPSVF

*LFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTK  
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGK*

SEQ ID NO : 26 ;

【0156】 Tanezumab 輕鏈：

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISISNNLNWYQQKPGKAP  
 KLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHT  
 LPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA  
 CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO : 27 。

【0157】 針對骨轉移適應症，目前靶向 NGF 和 RANKL 單株抗體的臨床給藥劑量相差懸殊。因此，在製備針對 NGF 和 RANKL 的雙特異性抗體時，需要平衡雙特異性抗體的 NGF 臂和 RANKL 臂的活性，以便確定合適的雙特異性抗體的給藥劑量，避免因給藥劑量過高引起的副作用，或因給藥劑量太低，不能發揮雙特異性抗體的功能。

【0158】 本揭露製備的雙特異性抗體具有 DVD-IgG 結構(如圖 1 所示)。將抗 RANKL 抗體和抗 NGF 抗體的輕鏈可變結構域(VL)直接地，或藉由重組 DNA 技術經由短連接子串聯連接，隨後為輕鏈恆定結構域。類似地，重鏈包含串聯連接的 2 個重鏈可變結構域(VH)，隨後為恆定結構域

CH1 和 Fc 區。其中連接子包括但不限於如下肽連接子：ASTKGP (SEQ ID NO : 28)、TVAAP (SEQ ID NO : 29)。

【0159】 示例性的雙特異性抗體的序列如下：

【0160】 雙特異性抗體 1 的第一鏈

EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG  
LEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT  
AVYYCVKDPGTT SIMSWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPQVQLOESGP  
GLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTT  
DYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYAT  
SYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T

K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F L F P P K

P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R

E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A

K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q

P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H

N H Y T Q K S L S L S L G K

SEQ ID NO : 30 ;

【0161】 雙特異性抗體 1 的第二鏈

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVRGRYLA WYQOKPGQAP  
RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSS  
PRTFGQGTKVEIKTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISN  
NLNWYQOKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLO

PEDIATYYCQOEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 31。

【0162】註釋：序列中單下劃線為 RANKL 抗體可變區，雙下劃線為 NGF 抗體可變區，粗體為連接子，其餘序列為恆定區。

### 測試例

#### 測試例 1. 抗 RANKL 抗體親和力測試

【0163】用生物傳感芯片 Protein A(GE, 29127556)親和捕獲一定量的待測抗體，然後於芯片表面流經一系列濃度梯度的抗原：人 RANKL 蛋白(Sino Biological, 11682-HNCH)，人 NGF 蛋白(Sino biological, 11050-HNAC)，利用 Biacore 實時檢測反應信號從而獲得結合和解離曲線。在每個循環解離完成後，用 pH 1.5 的甘胺酸-鹽酸再生溶液(GE, BR-1003-54)將生物芯片洗淨再生。實驗數據用 BIAevaluation version 4.1 軟體以 1 : 1 模型進行擬合，從而得出親和力數值。結果如下表 5 所示。

表 5. 抗 RANKL 抗體的親和力 KD 值

抗體	對人 RANKL 的親和力			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	親和力比值 (相對於 Denosumab 親和力提高的倍數)
D75H	5.24E+04	7.73E-05	1.48E-09	6.24
Denosumab	1.90E+04	1.75E-04	9.24E-09	1.00

【0164】 結果顯示，改造後的抗體 D75H 的親和力比 Denosumab 抗體提高了 6 倍以上。

#### 測試例 2：抗 RANKL 抗體阻斷 RANKL 與 RANK 結合的能力檢測

【0165】 藉由 ELISA 的方法檢測抗體阻斷配體和受體結合的活性。用 pH7.4 的 PBS(源培生物，B320)緩衝液將人 RANK 蛋白稀釋至 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 100  $\mu\text{L}$ /孔的體積加入 96 孔酶標板(Corning，3590)中，4°C 過夜孵育。棄去液體後，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  1% Casein 封閉液(Thermo，37528)進行封閉，37°C 孵育 2 小時。封閉結束後，棄去封閉液，並用 PBST 緩衝液(pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次後備用。將固定濃度的生物素(Biotin)標記的人 RANKL 蛋白(Sino Biological，11682-HNCH)與梯度稀釋的抗體混合後 37°C 預孵育 30 分鐘後加入封閉好的酶標板中，37°C 孵育 1.5 小時。孵育結束後用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  鏈黴親和素-HRP (Invitrogen，434323，1:4000 稀釋)，37°C 孵育 1 小時。去上清，用 PBST 洗板 3 次後每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 顯色受質(KPL，5120-0077)，室溫孵育 10 至 15 分鐘。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  終止反應，用酶標儀讀取在 450 nm 處的吸收值，用軟體擬合出抑制配體和受體結合的曲線，計算出  $\text{IC}_{50}$  值。結果見下表 6。

表 6. 抗 RANKL 抗體阻斷 RANKL 與 RANK 結合的能力

抗體名稱	阻斷 RANKL 與 RANK 結合
	$\text{IC}_{50}(\text{nM})$
D75H	0.2964
Denosumab	0.5324

【0166】結果顯示，抗 RANKL 抗體 D75H 可阻斷 RANKL 與 RANK 結合，其阻斷活性優於 Denosumab 抗體。

### 測試例 3：ELISA 檢測雙特異性抗體與不同種屬抗原的結合活性

【0167】用 ELISA 方法檢測本揭露的雙特異性抗體與人 RANKL (Sino biological, 11682-HNCH)、猴 RANKL(Sino Biological, 90301-C01H)、鼠 RANKL(R&D Systems, 462-TR/CF)和人 NGF(猴 NGF 序列與人 NGF 完全相同)(Sino biological, 11050-HNAC)、鼠 NGF(Sino Biological, 50385-MNAC)的結合活性，方法如下：

【0168】用 pH 7.4 的 PBS 緩衝液(源培生物, B320)將抗原稀釋至 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 100  $\mu\text{L}$ /孔的體積加入 96 孔酶標板(Corning, 9018)中，於 4 $^{\circ}\text{C}$  過夜。棄去液體後，加入用 PBS 稀釋的 5%脫脂牛奶(BD, 232100)封閉液 300  $\mu\text{L}$ /孔，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小時進行封閉。封閉結束後，棄去封閉液，並用 PBST 緩衝液(pH 7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次後，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  用樣品稀釋液(pH 7.4 PBS 含 1% BSA)稀釋的不同濃度的雙特異性抗體，放於 37 $^{\circ}\text{C}$  恆溫箱孵育 1 小時。孵育結束後用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  用樣品稀釋液稀釋的 HRP 標記的抗人 Fc 二抗(Abcam, ab97225)，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小時。用 PBST 洗板 3 次後，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 顯色受質(KPL, 5120-0077)，於室溫孵育 10 至 15 min，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  終止反應，用酶標儀在 450 nm 處讀取吸收值，計算雙特異性抗體結合抗原的  $\text{EC}_{50}$  值，結果如下表 7 所示。

表 7. 雙特異性抗體與不同種屬抗原的結合 EC<sub>50</sub>

抗體	ELISA EC <sub>50</sub> (nM)				
	人 RANKL	猴 RANKL	鼠 RANKL	人(猴) NGF	鼠 NGF
雙特異性抗體 1	0.06245	0.4666	不結合	12.27	4.344
Denosumab	0.1277	2.129	不結合	不結合	不結合
Tanezumab	不結合	不結合	不結合	2.270	1.151

【0169】結果顯示，雙特異性抗體 1 對人 RANKL 和猴 RANKL 的結合活性都優於對照 Denosumab 抗體。但雙特異性抗體 1 和 Denosumab 都不與鼠 RANKL 交叉結合。雙特異性抗體 1 對人 NGF 和鼠 NGF 的結合活性均明顯的弱於 Tanezumab，表明本揭露的雙特異性抗體 1 成功的降低了 Tanezumab 端(特異性結合 NGF 的第二抗原結合域)的結合活性。

#### 測試例 4：雙特異性抗體親和力測試

【0170】用生物傳感芯片 Protein A(GE, 29127556)親和捕獲一定量的待測抗體，然後於芯片表面流經一系列濃度梯度的抗原：人 RANKL 蛋白(Sino Biological, 11682-HNCH)，人 NGF 蛋白(Sino biological, 11050-HNAC)，利用 Biacore 實時檢測反應信號從而獲得結合和解離曲線。在每個循環解離完成後，用 pH 1.5 的甘胺酸-鹽酸再生溶液(GE, BR-1003-54)將生物芯片洗淨再生。實驗數據用 BIAevaluation version 4.1 軟體以 1:1 模型進行擬合，從而得出親和力數值。結果如下表 8 所示。

表 8. 雙特異性抗體與不同抗原的親和力

抗體	對人 RANKL 的親和力			對人 NGF 的親和力		
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
雙特異性抗體 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

【0171】結果顯示，雙特異性抗體 1 對人 RANKL 的親和力是 Denosumab 的 3.8 倍，雙特異性抗體 1 對人 NGF 的親和力顯著低於 Tanezumab。

#### 測試例 5：配體和受體的阻斷實驗

【0172】藉由 ELISA 的方法檢測抗體對配體和受體的阻斷活性。用 pH7.4 的 PBS(源培生物, B320)緩衝液將受體蛋白(RANK 或 TrkA)稀釋至 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 100  $\mu\text{L}$ /孔的體積加入 96 孔酶標板(Corning, 3590)中，4 $^{\circ}\text{C}$  過夜孵育。棄去液體後，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  1% Casein 封閉液(Thermo, 37528)進行封閉，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小時。封閉結束後，棄去封閉液，並用 PBST 緩衝液(pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次後備用。將固定濃度的生物素(Biotin)標記的配體蛋白(RANKL 或 NGF)與梯度稀釋的抗體或融合蛋白混合後 37 $^{\circ}\text{C}$  預孵育 30 分鐘後加入封閉好的酶標板中，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 小時。孵育結束後用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP (Invitrogen, 434323, 1:4000 稀釋)，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小時。去上清，用 PBST 洗板 3 次後每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 顯色受質(KPL, 5120-0077)，室溫孵育 10 至 15 分鐘，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  終止反應，用酶標儀讀取在 450



nm 處的吸收值，用軟體擬合出抑制配體和受體結合的曲線，計算出  $IC_{50}$  值。

【0173】實驗中所用配體和受體蛋白信息如下：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)。

【0174】實驗結果如下表 9 所示。

表 9. 雙特異性抗體的阻斷活性

抗體	阻斷 RANKL 和 RANK 結合	阻斷 NGF 和 TrkA 結合
	$IC_{50}$ (nM)	$IC_{50}$ (nM)
雙特異性抗體 1	0.3225	102.1
Denosumab	0.5585	/
Tanezumab	/	3.663

【0175】結果顯示，雙特異性抗體 1 對 RANKL 的阻斷活性優於 Denosumab，對 NGF 的阻斷活性顯著地弱於 Tanezumab。這表明藉由降低雙特異性抗體 1 NGF 端的結合活性，也顯著降低了其對 NGF 的阻斷活性。

#### 測試例 6：破骨細胞分化實驗

【0176】RANKL 的主要功能是促進破骨細胞的分化和成熟，因此藉由破骨細胞分化實驗可以測試抗體對 RANKL 的抑制活性。實驗方法如下：

【0177】將 Raw264.7 細胞(ECACC, 91062702)鋪在 96 孔細胞培養板(Corning, 3599)中，37°C 培養箱中過夜培養。第二天，在 96 孔細胞板

中加入固定濃度的人 RANKL 蛋白(Sino Biological, 11682-HNCH)和梯度稀釋的待測雙特異性抗體，37°C培養 4 天。將 96 孔板取出，除去上清液，每孔加入 100  $\mu$ L 細胞裂解液(碧雲天, P0013J)，吹打混勻後將細胞裂解液轉移至離心管中，冰上放置 10 分鐘，離心取上清液。參考抗酒石酸酸性磷酸酶檢測試劑盒(碧雲天, P0332)中的方法，取 40 $\mu$ L 待測樣本加 40 $\mu$ L 顯色受質和 5 $\mu$ L 酒石酸，混合均勻，置於 37°C培養箱中孵育 10 min，加入 160 $\mu$ L 終止液，用酶標儀檢測 OD 405nm 的數值，用軟體對數據進行擬合獲得 IC<sub>50</sub> 值。實驗結果如下表 10 所示。

表 10. 雙特異性抗體抑制破骨細胞分化的活性

抗體	IC <sub>50</sub> (nM)
雙特異性抗體 1	1.193
Denosumab	3.917

【0178】結果顯示，雙特異性抗體 1 抑制破骨細胞分化的活性是 Denosumab 的 3.3 倍以上。

#### 測試例 7：TF-1 細胞增殖實驗

【0179】NGF 在體外可以促進 TF-1 細胞的增殖，因此藉由 TF-1 細胞增殖實驗評價抗體對 NGF 的抑制活性。實驗方法如下：

【0180】用無 GM-CSF 的 1640 培養基(Gibco, 22400-105)重新懸浮 TF-1 細胞(ATCC, CRL-2003)並鋪在 96 孔細胞培養板(Corning, 3903)中，37°C培養箱中過夜培養。第二天在 96 孔細胞板中加入固定濃度的人 NGF 蛋白(Sino biological, 11050-HNAC)和梯度稀釋的待測抗體，37°C培養箱

中培養 72 小時。取出細胞培養板，每孔加入 50 $\mu$ L Cell-titer Glo(Promega, G755B)溶液，輕輕晃動混勻 10 分鐘，室溫靜置 10 分鐘，用 PE Victor 3 檢測生物發光信號。用軟體對數據進行擬合獲得 IC<sub>50</sub> 值。實驗結果如下表 11 所示。

表 11. 雙特異性抗體抑制 TF-1 細胞增殖的活性

抗體	IC <sub>50</sub> (nM)
雙特異性抗體 1	3.159
Tanezumab	0.7589

【0181】結果顯示，雙特異性抗體 1 依然可以抑制 TF-1 細胞增殖，其中 Tanezumab 抑制活性是雙特異性抗體 1 的約 4.2 倍，說明雙特異性抗體 1 顯著降低了 NGF 端的活性。

【0182】因此，在體外活性與給藥劑量具有相關性的前提下，我們預期雙特異性抗體 1 的 RANKL 端的給藥劑量可以降低到 40 mg 左右，依然可以保持 RANKL 端的體內藥效；而 NGF 端的給藥劑量可以提升到 80 mg 左右，依然可以保持較好的安全性。此外，目前臨床中針對 NGF 的抗體 Tanezumab 的給藥週期是抗 RANKL 抗體 Denosumab 的 2 倍，因此本揭露中示例性的雙特異性抗體 1 可以使兩個靶點的給藥劑量達到平衡。

#### 測試例 8：骨轉移動物模型體內藥效

【0183】用骨轉移動物模型來評價抗體的止痛和骨保護效果。

【0184】模型的構建方法為：雄性 C57 BL/6 小鼠，SPF 級，購自常州卡文斯實驗動物有限責任公司。於實驗室環境適應性飼養，給予 12/12 小

時光/暗週期調節，溫度  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，濕度 40 至 50%，動物均給予標準滅菌鼠飼料，自由進食飲水。小鼠體重達到 25 g 左右開始造模。

【0185】用 1%巴比妥鈉腹腔注射麻醉小鼠後備皮，把小鼠放在加熱墊上，用眼科剪在左後肢膝蓋外側皮膚上平行於股骨方向切開 1 釐米，暴露出肌肉，鈍性分離皮膚和肌層。用眼科剪刀以結締組織線為導向，在股直肌和股內側肌之間切開，用彎鑷將股直肌和髌骨移至膝關節內側，暴露股骨髌且不要切斷髌骨韌帶。用直徑 0.45 mm 的針頭在踝間窩處股骨頂部至中部開孔，進入髓內間隙 1 至 1.5 cm 打開注射通道。用 Hamilton 微量注射器(50  $\mu\text{L}$ ，型號 Model 1705 RN SYR，26 號針頭，型號 ga26/51 mm/pst3，貨號 7768-02)從開孔處插入骨髓腔並緩慢注射 10 $\mu\text{L}$ ( $5\times 10^4$ )LLC1 細胞(ATCC，CRL-1642)。推注完成後拔出注射器針頭，將腿拉直並用彎鑷將髌骨與韌帶復位，將肌肉恢復原狀，灑上抗生素粉末，再用自動傷口夾(Roboz，Reflex 7 Clip 7 mm)縫合外皮。術後動物儘量不多於三隻一籠飼養，七天後取下傷口夾。假手術組(Sham)操作同上，於骨髓腔注射相同體積的 PBS；空白組正常飼養不進行任何處理。造模 7 天後開始給藥，每 5 天給藥一次，總共給藥 3 次，分別在第 14 天(或第 15 天)和第 21 天對小鼠的疼痛行為進行統計和腿骨損傷進行評分。

【0186】疼痛行為統計方法：動物被放置在四週為有機玻璃，下面是鐵絲網格的地板上，先適應 30 分鐘(直到動物在盒子裡的探索和主要梳理活動停止)，然後觀察它們的運動情況，並評估 5 分鐘內出現的躲避患肢疼痛的行為，用秒表測定時長。

【0187】躲避疼痛的行為被定義為：

(1) 完整的保護(行走時抬起患肢，不落地負重)；

(2) 患肢五指蜷縮，會戳穿網格(正常鼠的四肢應為五指伸展，平攤在網格上，用前腳掌發力支撐。腫瘤骨轉移小鼠的患肢會五指蜷縮，如此時能用後腳跟著地支撐，則認為疼痛較輕，不計入測定時間，如全腳掌均不與網格接觸或戳穿網格，則計入測定時間)；

(3) 舔舐患側肢體；

(4) 零星的單腳跳躍；

(5) 單側後肢的站立(兩前肢抬起的情況下)。

【0188】骨損傷評分方法：

小心剝取俯臥位左側股骨，採用 MX-20 digital cabinet X-ray system (Faxitron/Bioptics) 檢測骨破壞情況，由一位固定的專業人士對骨損傷進行評分。

【0189】評分標準如下：

0-相對正常，1-輕微-局部損傷，2-中度-局部損傷，3-中度-多處損傷，4-重度-迷漫性損傷。對股骨遠端和股骨近端分別評分後相加，骨破壞最嚴重時計為 4+4=8 分。

1. RANLK 拮抗劑和 NGF 拮抗劑對止痛和骨保護的效果測試

【0190】由於 Denosumab 對鼠 RANKL 沒有交叉結合活性，因此我們利用鼠 RANKL 抗體 AMR2 與 Tanezumab 聯用，評估兩種抗體聯用的體內藥效是否優於一種抗體。

【0191】 AMR2 抗體的可變區序列來源於 WO2013176469A1，將可變區重輕鏈序列分別與人 IgG4 和人  $\lambda$  恆定區融合構建成全長抗體 AMR2。AMR2 的相關序列如下：

表 12. AMR2 抗體的 CDR

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

【0192】 AMR2 重鏈可變區：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGK  
GLEWVSWIYPSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED  
TAVYYCARSGLTRTRWPIYYADGMDVWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO : 38 ;

【0193】 AMR2 輕鏈可變區：

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAP  
KLLIYSDRHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWD  
ASLSGYVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO : 39 ;

【0194】 AMR2 重鏈

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGK  
GLEWVSWIYPSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED

TAVYYCARSGLTRTRWPIYYADGMDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP  
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC  
PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR  
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO : 40 ;

【0195】 AMR2 輕鏈

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAP  
KLLIYSDRHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWD  
ASLSGYVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS  
DFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ  
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO : 41 。

【0196】 分組及給藥量如下表 13 所示：

表 13. 分組及給藥量

分組	小鼠 (隻)	抗體	劑量(mpK)	給藥頻率	給藥方法
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.
假手術組(Sham)	10	/	/	/	/
空白對照組(Blank)	10	/	/	/	/

註釋：Q5d\*3 表示每 5 天給藥一次，總共 3 次；i.p.表示腹腔注射給藥。

【0197】 實驗結果如下圖 2A 至圖 2D 所示。

【0198】 小鼠的疼痛行為統計結果表明，在第 14 天，與陰性組相比，三個給藥組都顯示出了顯著的止痛效果，其中聯合給藥組的止痛效果要強於單抗組。在第 21 天，只有聯合給藥組顯示出了顯著的止痛效果，兩個單抗組雖然也表現出了一定的止痛效果，但跟陰性組相比沒有顯示出統計學差異(vs vehicle：\*P<0.05，\*\* P<0.01，\*\*\* P<0.0001)。

【0199】 骨損傷的評分結果表明，在第 14 天，聯合給藥組表現出了一定的骨保護效果。在第 21 天，聯合給藥組顯示出了顯著的骨保護效果。綜合以上實驗結果表明，聯合給藥組在止痛和骨保護兩個方面都顯示出了藥效。因此，發明人之後進一步驗證了本揭露的雙特異性抗體分子在體內的藥效。

## 2. 雙特異性抗體 NGF 端體內藥效的評價



【0200】由於雙特異性抗體 1 的 NGF 端的體外活性與 NGF 單抗 Tanezumab 相比，降低了 4 倍左右，因此，藉由該藥效實驗確定雙特異性抗體 1 的 NGF 端在小鼠體內是否依然具有藥效。實驗分組如下表所示：

表 14. 給藥劑量和分組

分組	小鼠(隻)	藥物	劑量(mpk)	給藥頻率	給藥方式
1	12	Vehicle	/	Q5d	i.p.
2	12	雙特異性抗體 1	13.5	Q5d	i.p.

註釋：Q5d 表示每 5 天給藥一次；i.p.表示腹腔注射給藥。

【0201】實驗結果見圖 3A 至圖 3B 所示。

【0202】結果顯示，給藥後第 14 天和 21 天，與陰性組相比，雙特異性抗體 1 都顯示出了顯著的止痛效果，說明雙特異性抗體 1 的 NGF 端依然具有顯著的藥效。

### 3. 雙特異性抗體的體內藥效評價

【0203】用人 RANKL 轉基因鼠(購自百奧賽圖)構建骨轉移動物模型，以評價雙特異性抗體的體內藥效。實驗分組如下表 15 所示：

表 15. 給藥劑量和分組

分組	小鼠(隻)	藥物	劑量(mpk)	給藥頻率	給藥方式
1	10	Sham	-	Q5d	i.p.
2	10	Vehicle	-	Q5d	i.p.
3	14	雙特異性抗體 1	5.4	Q5d	i.p.
4	14		21.6	Q5d	i.p.

註釋：Q5d 表示每 5 天給藥一次；i.p.表示腹腔注射給藥。

【0204】 實驗結果見圖 4A 至圖 4D 所示。

【0205】 結果顯示，雙特異性抗體 1 顯示出了明顯的止痛和骨保護效果。第 15 天和第 21 天，雙特異性抗體 1 的高劑量組都顯示出了顯著的止痛效果，並且高低劑量組都顯示出對骨損傷具有明顯的保護效果。

#### 測試例 9：大鼠 PK 測試

【0206】 用 SD 大鼠進行體內藥物代謝動力學測試。雄性 SD 大鼠(浙江維通利華實驗動物技術有限公司)分組，每組 4 隻，靜脈注射給藥，雙特異性抗體 1 的劑量為 4 mg/kg，給藥組於給藥前及給藥後 5 分鐘、8 小時、24 小時、48 小時、84 小時、9 天、10 天、14 天、21 天、28 天採集全血 0.2 mL，不加抗凝。取血後在 4°C 放置 30 分鐘，1000 g 離心 15 分鐘，取上層血清置於 EP 管中，於 -80°C 保存。

【0207】 用 ELISA 法檢測血清中的血藥濃度，用 Winnolin 軟體計算待測抗體的藥物代謝動力學參數，檢測結果如下所示：

表 16. 雙特異性抗體 1 的 PK 結果

檢測項	RANKL 臂	NGF 臂
t <sub>1/2</sub> (天)	15.09	14.30

【0208】 結果顯示，雙特異性抗體 1 在大鼠中的 PK 表現很好，RANKL 和 NGF 兩端的半衰期比較接近，分別為 15.09 天和 14.3 天。

#### 製備實施例-抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑

#### 示例性抗體醫藥組成物(製劑)製備工藝

【0209】 第一步：RANKL-NGF 雙特異性抗體與穩定劑配製成含該抗體的製劑原液，經 0.22 $\mu$ m 濾芯除菌過濾，收集濾液。

【0210】 第二步：調節裝量(目標裝量為 1.0mL/瓶)，選用西林瓶進行灌裝，分別於灌裝開始、灌裝中間、灌裝結束時取樣檢測裝量差異。

【0211】 第三步：開啟軋蓋機，加鋁蓋，進行軋蓋。

【0212】 第四步：目檢，確認產品無裝量不準、外觀不良等缺陷。打印紙盒標籤，折疊紙盒，裝盒，貼紙盒標籤。

外觀：

【0213】 採用目視法，將樣品瓶擦拭乾淨，在 1000~1500lx 的光照強度下，分別於澄明度檢測儀白背景和黑背景下觀察樣品顏色、澄清度和可見異物。

【0214】 外觀檢測儀器：精拓儀器 YB-2A 澄明度檢測儀。

溶解溫度(T<sub>m</sub>)和聚集溫度(T<sub>agg</sub>)：

【0215】 T<sub>m</sub> 為蛋白質在升溫過程中，50%組分變性時所對應的溫度；T<sub>agg</sub> 為蛋白在升溫過程中發生聚集時對應的溫度。將樣品加載到 Uni 管中，以 25-95°C的熱升溫運行測定。

【0216】 T<sub>m</sub> 和 T<sub>agg</sub> 測定儀器：Uncle，儀器廠家為 Unchained。

SEC 分子排阻色譜法：

【0217】 根據凝膠孔隙的孔徑大小與高分子樣品分子的線團尺寸間的相對關係而對溶質進行分離的分析方法。

【0218】  $SEC\%(SEC \text{ 單體含量百分比}) = A \text{ 單體} / A \text{ 總} \times 100\%$  (A 單體為樣品中主峰單體的峰面積，A 總為所有峰面積之和)。 $\Delta SEC\% = \text{穩定性實驗後製劑的 } SEC\% - \text{穩定性實驗前製劑的 } SEC\%$ 。

【0219】 SEC 測定用儀器：安捷倫 HPLC 1260。

【0220】 柱子：Tosoh，TSKgel G3000SWXL (7.8 mm × 30 cm, 5 μm)。

**NR-CE 毛細管凝膠電泳：**

【0221】 將凝膠移到毛細管中作為支持介質進行的一種電泳，並在一定的電壓下根據樣品分子量的大小進行分離的方法。

【0222】  $NR-CE\%(非還原 CE \text{ 純度百分比}) = A \text{ 主峰} / A \text{ 總} \times 100\%$  (A 主峰為樣品中主峰的峰面積，A 總為所有峰面積之和)。 $\Delta NR-CE\% = \text{穩定性實驗後製劑的 } NR-CE\% - \text{穩定性實驗前製劑的 } NR-CE\%$ 。

【0223】 CE 測定用儀器：Beckman 毛細管電泳儀，型號 PA800 plus。

**icIEF 成像毛細管等電聚焦電泳：**

【0224】 以毛細管為分離通道，在毛細管兩端加上直流電壓，毛細管內兩性電解質溶液形成一定範圍的 pH 梯度，各組分依據所帶電荷差異遷移至各自等電點，聚焦成很窄的區段，以此實現組分的分離。

【0225】  $icIEF\%(主峰含量百分比) = A \text{ 主峰峰面積} / A \text{ 總面積} \times 100\%$  (A 總面積為酸性峰、主峰和鹼性峰面積之和)。 $\Delta icIEF\% = \text{穩定性實驗後製劑的 } icIEF\% - \text{穩定性實驗前製劑的 } icIEF\%$ 。

【0226】 icIEF 測定用儀器：Protein Simple，型號 Maurice。

【0227】 以下製劑的製備實施例中所採用的 RANKL-NGF 雙特異性抗體為如上所述的雙特異性抗體 1，有時簡稱“抗體”。

### 製備實施例 1. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑 pH 篩選

【0228】選擇 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉緩衝體系，設計 4.2、4.6、5.0、5.4、5.8、6.2、6.6、7.0、7.4、7.8 共 10 個不同 pH，製備 RANKL-NGF 雙特異性抗體濃度為 20mg/mL 的共 10 組處方抗體製劑，測定樣品的熔解溫度( $T_m$ )，考察抗體在不同 pH 條件的構象穩定性，測定樣品的聚集溫度( $T_{agg}$ )，考察抗體在不同 pH 條件的膠體穩定性。同時藉由測定樣品在 40°C 條件下外觀、SEC、NRCE 等，考察抗體在不同 pH 條件下的熱穩定性。

- 1) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH4.2；
- 2) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH4.6；
- 3) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH5.0；
- 4) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH5.4；
- 5) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH5.8；
- 6) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH6.2；
- 7) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH6.6；
- 8) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH7.0；
- 9) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH7.4；
- 10) 10mM 檸檬酸-磷酸氫二鈉，pH7.8。

表 17. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑 pH 篩選結果 1

序號	pH	T <sub>m</sub> (°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 雙特異性抗體製劑 pH 篩選結果 2

序號	外觀			
	顏色	澄清度	可見異物	
	T0/40°C	T0/40°C	T0	40°C-7 天
1	無色	微乳光	無可見微粒或異物	少量蛋白顆粒
2	無色	微乳光	無可見微粒或異物	少量蛋白顆粒
3	無色	微乳光	無可見微粒或異物	少量蛋白顆粒
4	無色	微乳光	無可見微粒或異物	少量蛋白顆粒
5	無色	微乳光	無可見微粒或異物	大量蛋白顆粒
6	無色	微乳光	無可見微粒或異物	大量蛋白顆粒

序號	外觀			
	顏色	澄清度	可見異物	
	T0/40°C	T0/40°C	T0	40°C-7天
7	無色	微乳光	無可見微粒或異物	大量蛋白顆粒
8	無色	微乳光	無可見微粒或異物	大量蛋白顆粒
9	無色	微乳光	無可見微粒或異物	大量蛋白顆粒
10	無色	微乳光	無可見微粒或異物	大量蛋白顆粒

表 19. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑 pH 篩選結果 3

序號	SEC-HPLC				NRCE			
	聚體%		單體%		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
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

【0229】結果顯示：RANKL-NGF 雙特異性抗體在 pH4.6~5.4 條件下 Tm 值和 Tagg 值較高，表明該抗體在該 pH 範圍體系中構象穩定性和膠體穩定性較好；在高溫(40°C)條件考察 1 週後，pH4.2~5.4 範圍處方的外觀出現少量可見蛋白顆粒，而在其它 pH 條件下則出現大量蛋白顆粒。純度方面：除 pH 4.2、7.4 和 7.8 體系中的蛋白經 40°C 孵育 7 天後出現明顯聚集，pH7.0 出現少量聚集外，其餘 pH 體系中的蛋白均無明顯聚集且組間無顯著差異。NRCE 結果顯示，pH 4.6-5.8 體系中的蛋白在 T0 時碎片含量相對較低，其中 pH5.0~5.8 在經 40°C 孵育 7 天後碎片比例低於 4%，綜合上述樣品的分子特性、外觀和 SEC 結果可得，抗體在 pH 4.6-5.4 體系中表現最好，故選擇中間值 pH 5.0 作為較佳 pH 條件以進行後續研究。

#### 製備實施例 2. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑緩衝體系篩選

【0230】選擇 pH4.8 和 pH5.2 的 10mM 醋酸-醋酸鈉、pH5.2 的 10mM 組胺酸-鹽酸組胺酸三組緩衝體系，以 75mg/mL 蔗糖作為穩定劑，RANKL-NGF 雙特異性抗體濃度為 20mg/mL，製備共 3 組處方樣品。藉由檢測樣品外觀、SEC-HPLC、NRCE 和 iCIEF 純度等，考察 3 組處方在高溫(40°C)放置 2 週、25°C 放置 2 週和 4 週、2~8°C 放置 2 週和 4 週、重複凍融(-35°C 和室溫)循環 3 次和 5 次等條件下的穩定性，以篩選最適緩衝體系。

- 1) 10mM 醋酸-醋酸鈉，pH4.8，75mg/mL 蔗糖，20mg/mL 抗體；
- 2) 10mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.2，75mg/mL 蔗糖，20mg/mL 抗體；
- 3) 10mM 組胺酸-鹽酸組胺酸，pH5.2，75mg/mL 蔗糖，20mg/mL 抗體。



表 20. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑緩衝體系篩選結果 1

序號	外觀																
	顏色	澄清度								可見異物							
		T0	2~8°C		25°C		40°C	凍融		T0	2~8°C		25°C		40°C	凍融	
			2週	4週	2週	4週	2週	3次	5次		2週	4週	2週	4週	2週	3次	5次
1	無色	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	無可見微粒或異物	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	
2	無色	微乳光	微乳光	乳光	乳光	乳光	微乳光	微乳光	無可見微粒或異物	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	
3	無色	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	微乳光	無可見微粒或異物	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	大量蛋 白顆粒	少量細小顆粒	少量細小顆粒	

表 21. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑緩衝體系篩選結果 2

序號	SEC-HPLC															
	T0	聚體%							單體%							
		2~8°C		25°C		40°C	凍融		T0	2~8°C		25°C		40°C	凍融	
		2週	4週	2週	4週	2週	3次	5次		2週	4週	2週	4週	2週	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 雙特異性抗體製劑緩衝體系篩選結果 3

序號	NRCE(Caliper)															
	主峰%								碎片%							
	T0	2~8°C		25°C		40°C	凍融		T0	2~8°C		25°C		40°C	凍融	
		2週	4週	2週	4週	2週	3次	5次		2週	4週	2週	4週	2週	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 雙特異性抗體製劑緩衝體系篩選結果 4

序號	iCIEF																										
	酸峰%								主峰%								鹼峰%										
	T0	2~8°C		25°C		40°C		凍融		T0	2~8°C		25°C		40°C		凍融		T0	2~8°C		25°C		40°C		凍融	
		2週	4週	2週	4週	2週	3次	5次	2週		4週	2週	4週	2週	3次	5次	2週	4週		2週	3次	5次	2週	4週	2週	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			

【0231】結果顯示：25°C和 40°C 孵育 2 週，10mM 醋酸-醋酸鈉 pH5.2 體系中的蛋白呈乳光，10mM 醋酸-醋酸鈉 pH4.8 體系中的蛋白呈微乳光，兩個處方均出現少量蛋白顆粒；10mM 組胺酸-鹽酸組胺酸 pH5.2 體系中的蛋白經 40°C 孵育 2 週後出現大量蛋白顆粒，從外觀結果來看，蛋白在 10mM 醋酸-醋酸鈉緩衝體系中的穩定性更好。純度方面：各組處方在不同穩定性條件下的聚體、單體、碎片比例與 T0 相比無顯著變化且組間無差異，表明 SEC-HPLC 純度穩定性均較好；在高溫條件下，與醋酸鹽緩衝體系相比，10mM 組胺酸-鹽酸組胺酸體系 NRCE 碎片增加更明顯；iCIEF 檢測結果顯

示各處方無明顯差異。綜上，選擇 10mM 醋酸-醋酸鈉緩衝體系進行後續處方開發。

### 製備實施例 3. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑濃度和穩定劑篩選

【0232】為保證緩衝體系更好的 pH 緩衝效果，將緩衝體系濃度提高至 20mM。選擇選擇 20mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.0 作為緩衝體系，選擇 0.2mg/mL 聚山梨酯 80 作為表面活性劑，選擇 75mg/mL 蔗糖或 240mM 脯胺酸或 0.8%(w/v)氯化鈉作為穩定劑，抗體濃度分別為 20 mg/mL、50mg/mL、70 mg/mL，共製備 5 組處方樣品，考察樣品在振盪(300rpm/25°C)、重複凍融(-35°C/室溫)、高溫(40°C)、25°C和光照條件下的穩定性。

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

2) 20mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.0，240mM 脯胺酸，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，50mg/mL 抗體；

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

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

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

表 24. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑濃度和穩定劑篩選-結果 1

序號	外觀							
	T0	振盪 3 天	光照 5 天	凍融 3 次	凍融 5 次	25°C- 4 週	40°C- 2 週	40°C- 4 週
1	無色，輕微乳光，無可見蛋白顆粒							
2	無色，輕微乳光，無可見蛋白顆粒							
3	無色，乳光，無可見蛋白顆粒							
4	無色，輕微乳光，無可見蛋白顆粒							
5	無色，輕微乳光，無可見蛋白顆粒							

表 25. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑濃度和穩定劑篩選-結果 2

序 號	SEC-HPLC																	
	T0	聚體%							單體%									
		振盪		光照	凍融		25°C	40°C		T0	振盪		光照	凍融		25°C	40°C	
		3 天	5 天	3 次	5 次	4 週	2 週	4 週	3 天		5 天	3 次	5 次	4 週	2 週	4 週		
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 雙特異性抗體製劑濃度和穩定劑篩選-結果 3

序號	NRCE													
	主峰%							碎片%						
	T0	振盪	光照	凍融	25°C	40°C		T0	振盪	光照	凍融	25°C	40°C	
		3天	5天	5次	4週	2週	4週		3天	5天	5次	4週	2週	4週
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 雙特異性抗體製劑濃度和穩定劑篩選-結果 4

序號	icIEF 純度																				
	酸峰%						主峰%						鹼峰%								
	T0	振盪	光照	凍融	25°C	40°C		T0	振盪	光照	凍融	25°C	40°C		T0	振盪	光照	凍融	25°C	40°C	
		3天	5天	5次	4週	2週	4週		3天	5天	5次	4週	2週	4週		3天	5天	5次	4週	2週	4週
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

【0233】結果顯示：與其他處方相比，處方 3 乳光略重，外觀略差；純度方面：各組處方在振盪、光照、重複凍融和 25°C 考察條件下，SEC-HPLC 聚體、NRCE 碎片含量均無明顯變化。在高溫 40°C 條件下，處方 3 SEC-HPLC 聚體含量有明顯增加，表明該處方穩定性較差，處方 2 NRCE 碎片含量增長較少，表明脯胺酸可作為穩定劑，明顯改善抗體穩定性，且抗體濃度越高，NRCE 純度越高(50mg/mL 和 70mg/mL 處方差異相對較

小)。各組處方在振盪、重複凍融和 25°C 考察條件下，iCIEF 酸性峰、中性峰和鹼性峰均無顯著變化，但在高溫 40°C 4 週條件下，酸性峰均有所增加，處方 2 主峰含量相對最高，且 50mg/mL 和 70mg/mL 處方差異相對較小。綜合以上結果，選擇脯胺酸作為穩定劑，抗體濃度為 70 mg/mL，pH 5.0。

#### 製備實施例 4. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑表面活性劑濃度篩選

【0234】選擇 20mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.0 緩衝體系，以 240mM 脯胺酸為穩定劑，RANKL-NGF 雙特異性抗體濃度為 70 mg/mL，製備聚山梨酯 80 濃度分別為 0.1mg/mL、0.2mg/mL 和 0.4mg/mL 的 3 組處方樣品，考察樣品在振盪(300rpm/25°C)、重複凍融(-35°C/室溫)、高溫(40°C)條件下的穩定性。

1) 20mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.0，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，70mg/mL 抗體；

2) 20mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.0，240mM 脯胺酸，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，70mg/mL 抗體；

3) 20mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.0，240mM 脯胺酸，0.4mg/mL 聚山梨酯 80，70mg/mL 抗體。

表 28. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑表面活性劑濃度篩選-結果 1

序號	外觀					
	顏色	澄明度				可見異物
	所有條件	T0	振盪 3 天/ 凍融 3 次/ 凍融 5 次	高溫 2 週	高溫 4 週	所有條件
1	無色	澄明	澄明	輕微乳光	輕微乳光	無可見蛋白 顆粒
2		澄明	澄明	輕微乳光	輕微乳光	
3		澄明	澄明	乳光略重	乳光略重	

表 29. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑表面活性劑濃度篩選-結果 2

序號	SEC-HPLC											
	聚體%						單體%					
	T0	振盪 3 天	凍融		高溫		T0	振盪 3 天	凍融		高溫	
			3 次	5 次	2 週	4 週			3 次	5 次	2 週	4 週
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 雙特異性抗體製劑表面活性劑濃度篩選-結果 3

組	NRCE					
	單體%			碎片%		
	T0	高溫 2 週	高溫 4 週	T0	高溫 2 週	高溫 4 週
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 雙特異性抗體製劑表面活性劑濃度篩選-結果 4

組	iCIEF								
	酸峰%			主峰%			鹼峰%		
	T0	高溫 2 週	高溫 4 週	T0	高溫 2 週	高溫 4 週	T0	高溫 2 週	高溫 4 週
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

【0235】結果顯示：隨著聚山梨酯 80 濃度升高，聚體、碎片和酸鹼峰含量均呈增加趨勢，聚山梨酯 80 濃度為 0.4mg/mL 時，抗體穩定性相對較差。因此，聚山梨酯 80 濃度較佳為 0.1mg/mL。

#### 製備實施例 5. RANKL-NGF 雙特異性抗體較佳處方穩定性研究

【0236】選擇 20mM 醋酸-醋酸鈉，pH5.0 的緩衝體系，以 240mM 脯胺酸為穩定劑，RANKL-NGF 雙特異性抗體濃度為 70 mg/mL，製備聚山



梨酯 80 濃度為 0.1mg/mL 的製劑，考察製劑在加速條件(25±2°C/60% RH±5RH)和長期條件下(2~8°C)的穩定性。

表 32. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑加速穩定性結果

檢測項目		時間				
		0 時	1 月	2 月	3 月	6 月
不溶性微粒 (每瓶)	≥10μM	59	NT	NT	57	4
	≥25μM	4			18	1
可見異物		無	NT	NT	NT	無
SEC-HPLC-單體		99.2%	99.1%	99.1%	99.0%	98.9%
SEC-HPLC-聚體		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-鹼峰		5.5%	6.3%	6.9%	8.3%	8.4%
RANKL 結合活性		101%	NT	NT	88%	103%
NGF 結合活性		93%			79%	88%

註釋：NT 表示未檢測。

表 33. RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑長期穩定性結果

檢測項目		時間					
		0 時	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
可見異物		無	NT	NT	NT	NT	無
SEC-HPLC-單體		99.2%	99.3%	99.2%	99.2%	99.2%	99.1%
SEC-HPLC-聚體		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-鹼峰		5.5%	5.7%	6.0%	5.6%	5.5%	5.5%
RANKL 結合活性		101%	NT	NT	92%	NT	107.0%
NGF 結合活性		93%	NT	NT	90%	NT	88.0%

註釋：NT 表示未檢測。

【0237】結果顯示，在加速條件(25±2°C/60%RH±5RH)儲存 6 個月，iCIEF 主峰下降約 12.7%，其它檢測項目無明顯變化；而長期條件下(2~8°C)儲存 12 個月，所有檢測項目與 0 時相比均無明顯變化，表明 RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑長期穩定性良好。

#### 製備實施例 6. 可選擇製劑配方

【0238】本揭露提供“50~77mg/mL RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉，pH4.6~5.4”製劑配方的 RANKL-NGF 雙特異性抗體藥物製劑，包含但不限於：

(1) 70mg/mL RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH4.6；

(2) 70mg/mL RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH5.0；

(3) 70mg/mL RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH5.4；

(4) 50mg/ml RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH4.6；

(5) 50mg/ml RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH5.0；

(6) 50mg/ml RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH5.4；

(7) 77mg/ml RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH4.6；

(8) 77mg/ml RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH5.0；

(9) 77mg/ml RANKL-NGF 雙特異性抗體，240mM 脯胺酸，0.1mg/mL 聚山梨酯 80，20mM 醋酸-醋酸鈉 pH5.4。

【0239】 實驗結果表明，上述製劑配方的 RANKL-NGF 雙特異性抗體製劑均具有良好的穩定性，可應用於 RANKL-NGF 雙特異性抗體藥物的配製。

【符號說明】

無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="910128中文序列表.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-12-11">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112144352</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-11-16</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>SHR-2007</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>CN</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>202211438239.8</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-11-16</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO.,
LTD.</ApplicantNameLatin>
  <InventorName languageCode="zh">楊, 震</InventorName>
  <InventorNameLatin>YANG, ZHEN</InventorNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">一種含抗RANKL-NGF雙特異性抗體的醫藥組成物
</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="en">A PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING ANTI-
RANKL-NGF BISPECIFIC ANTIBODIES</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>41</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q2">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SYAMS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GITGSGGSTYYADSVKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q6">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DPGTTSIMSWFDP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RASQSVRGRYLA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 5" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q12">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GASSRAT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```



```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q14">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQYGSSPRT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q16">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGTTSIMSWFDPWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q18">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>327</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..327</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q20">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSVVVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVKRVEESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV
VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ
PREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV
FSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q22">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>449</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..449</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q24">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGTTSIMSWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDRVES
KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</INSDSeq_seq
uence>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>215</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..215</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q26">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
  FSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVFYCCQYGGSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
  REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDS
  eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q28">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVR
KCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequ
ence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>215</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..215</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>

```

```

    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVFCYQYGGSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDS
eq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q32">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GYDLN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>

```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q34">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IIWGDGTTDYNSAVKS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```



```

    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGYWYATSYYFDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q38">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RASQSISNNLN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>

```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q40">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YTSRFHS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQEHTLPYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 21" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWI RQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYNSA
VKS RVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 22" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q46">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRF
SGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>326</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..326</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q48">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPCVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q50">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWI RQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SA
VKSRTVTSKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK
YGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</INSDSeq_sequ
ence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<SequenceData sequenceIDNumber=" 25" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q52">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRF
    SGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
    EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
    q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 26" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>447</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..447</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q54">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWI RQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYNSA
VKSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERK
CCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q56">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SNNLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRHFHSGVPSRF
SGSGSGTDFFTISSLQPEDVATYYCQEQEHTLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q60">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ASTKGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```



```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q62">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>TVAAP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>576</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..576</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q64">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGTTSIMSWFDPWGQGLVTVSSASTKGPQVQLQESGPGLVKP
SETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CARGGYWYATSYFYDWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMI
SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>327</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..327</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q66">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGSSPRTFGQGTKVEIKTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSI
SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 32" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q68">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DYDMS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 33" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q70">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>WIYPSGGSIYYADSVKG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q72">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SGLTRTRWPIYYADGMDV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q74">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TGSSSNIGNNAVS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q76">

```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SDRHRPS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 37" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q78">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSWDASLSGYV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 38" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>127</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..127</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q87">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIYPSGGSIYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGLTRTRWPIYYADGMDVWGQGLVTVSS</INSDSeq_seque
nce>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>110</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..110</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q88">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSDRHRPSGVPDR
FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGTKLTVL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>454</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..454</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q89">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIYPSGGSIIYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARSGLTRTRWPIYYADGMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCS
RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK</INSDSe
q_sequence>

```



```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>216</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..216</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q90">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構建體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSDRHRPSGVPDR
  FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD
  FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSD
  Seq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種醫藥組成物，包含抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體和緩衝劑，其中，

該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含特異性結合 RANKL 的第一抗原結合結構域和特異性結合 NGF 的第二抗原結合結構域；

該緩衝劑為醋酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑或磷酸鹽緩衝劑；

較佳地，該緩衝劑為醋酸-醋酸鈉緩衝劑、組胺酸-鹽酸組胺酸緩衝劑或檸檬酸-磷酸氫二鈉緩衝劑；

更佳地，該緩衝劑為醋酸-醋酸鈉緩衝劑或組胺酸-鹽酸組胺酸緩衝劑；

最佳地，該緩衝劑為醋酸-醋酸鈉緩衝劑。

【請求項2】 如請求項 1 所述的醫藥組成物，其中該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.0；

較佳地，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4；

更佳地，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 1 mg/mL 至 150 mg/mL；

較佳地，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 10 mg/mL 至 80 mg/mL；

更佳地，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體的濃度為 63 mg/mL 至 77 mg/mL。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的醫藥組成物，其中該醫藥組成物包含表面活性劑；

較佳地，該表面活性劑為聚山梨酯或泊洛沙姆；

更佳地，該表面活性劑為聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80；

最佳地，該表面活性劑為聚山梨酯 80。

**【請求項5】** 如請求項 4 所述的醫藥組成物，其中該表面活性劑的濃度為 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL；

較佳地，該表面活性劑的濃度為 0.01 mg/mL 至 0.6 mg/mL；

更佳地，該表面活性劑的濃度為 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL；

最佳地，該表面活性劑的濃度為 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL。

**【請求項6】** 如請求項 1 至 5 中任一項所述的醫藥組成物，其中該醫藥組成物包含穩定劑；

較佳地，該穩定劑選自由脯胺酸、蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精胺酸、甘胺酸和氯化鈉組成的組中的一種或更多種；

更佳地，該穩定劑為脯胺酸、蔗糖或氯化鈉；

最佳地，該穩定劑為脯胺酸。

**【請求項7】** 如請求項 6 所述的醫藥組成物，其中該穩定劑的濃度為 1mM 至 300 mM；

較佳地，該穩定劑的濃度為 25 mM 至 290 mM；

更佳地，該穩定劑的濃度為 210 mM 至 270 mM。

**【請求項8】** 如請求項 1 至 7 中任一項所述的醫藥組成物，其中該緩衝劑的濃度為 5 mM 至 100 mM；

較佳地，該緩衝劑的濃度為 10 mM 至 50 mM；

更佳地，該緩衝劑的濃度為 10 mM 至 30 mM；

最佳地，該緩衝劑的濃度為 16 mM 至 24 mM。

**【請求項9】** 如請求項 1 至 8 任一項所述的醫藥組成物，其中，

該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含：

至少一個特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域，和

至少一個特異性結合 NGF 的第二抗原結合域；

較佳地，

該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體包含：

兩個特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域，和

兩個特異性結合 NGF 的第二抗原結合域；

更佳地，該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體具有如圖 1 所示的結構。

**【請求項10】** 如請求項 9 所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：3 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6 的胺基酸序列；

較佳地，

該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 RANKL 的第一抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，該重鏈可變區包含 SEQ ID

NO：7 的胺基酸序列；和/或該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：8 的胺基酸序列。

【請求項11】如請求項 9 或 10 所述的醫藥組成物，其中該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

該重鏈可變區包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：15 的胺基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：16 的胺基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：17 的胺基酸序列；和

該輕鏈可變區包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：18 的胺基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：19 的胺基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：20 的胺基酸序列；

較佳地，

該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 NGF 的第二抗原結合域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

該重鏈可變區包含 SEQ ID NO：21 的胺基酸序列；和/或

該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO：22 的胺基酸序列；

更佳地，

該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體中，特異性結合 NGF 的第二抗原結合結構域包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO：24 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO：25 的胺基酸序列。

【請求項12】如請求項 1 至 11 中任一項所述的醫藥組成物，其包含如下組分：

- (a) 1 mg/mL 至 150 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
  - (b) 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的表面活性劑，
  - (c) 1 mM 至 300 mM 的穩定劑，和
  - (d) 5 mM 至 100 mM 的緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.2 至 7.0；
- 較佳地，該醫藥組成物包含如下組分：

- (a) 10 mg/mL 至 80 mg/mL 的該抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (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 的脯胺酸，和
- (d) 10 mM 至 50 mM 的醋酸鹽緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.6 至 5.4；

更佳地，該醫藥組成物包含如下組分：

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (b) 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和
- (d) 10 mM 至 30 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2；

最佳地，該醫藥組成物包含如下組分：

- (a) 63 mg/mL 至 77 mg/mL 的抗 RANKL-NGF 雙特異性抗體，
- (b) 0.05 mg/mL 至 0.15 mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 210 mM 至 270 mM 的脯胺酸，和
- (d) 16 mM 至 24 mM 的醋酸-醋酸鈉緩衝劑，該醫藥組成物的 pH 為 4.8 至 5.2。

【請求項13】 一種凍乾製劑，該凍乾製劑複溶後可形成如請求項 1 至 12 中任一項所述的醫藥組成物。

【請求項14】 一種製備凍乾製劑的方法，其中包括將如請求項 1 至 12 中任一項所述的醫藥組成物進行冷凍乾燥的步驟。

【請求項15】 一種凍乾製劑，該製劑藉由如請求項 14 所述的方法獲得的。

【請求項16】 如請求項 1 至 12 中任一項所述的醫藥組成物，其為皮下注射製劑、靜脈注射製劑、腹腔注射製劑或肌肉注射製劑；較佳為皮下注射製劑。

【請求項17】 一種治療或預防疾病的方法，該方法包括給予受試者治療有效量的如請求項 1 至 12 中任一項所述的醫藥組成物，或如請求項 13 或 15 所述的凍乾製劑；

較佳地，該疾病為疼痛、關節僵硬或骨損失；

更佳地，該疼痛選自：骨關節疼痛、類風濕性關節炎疼痛、痛風、骨癌痛、骨折疼痛、手術後疼痛、癌症疼痛、痛性膀胱綜合症、肌肉骨骼痛、前列腺炎、盆腔疼痛、間質性膀胱炎、下背痛、痛經、骨骼疾病相關的疼痛、三叉神經痛、帶狀疱疹後遺神經痛、帶狀疱疹感染、坐骨神經痛、偏頭痛、糖尿病神經病變和外周神經相關的疼痛；

其中，該骨損失與選自下組的至少一種狀況相關：骨質疏鬆症、佩吉特氏病、骨髓炎、高鈣血症、骨質稀少、骨質疏鬆、骨壞死、骨損傷、骨吸收、骨發育不全、炎症、自身免疫疾病、腸炎、類風濕性關節炎、系統性紅斑狼瘡、克羅恩病、牙周骨吸收、溶骨性轉移和癌症。

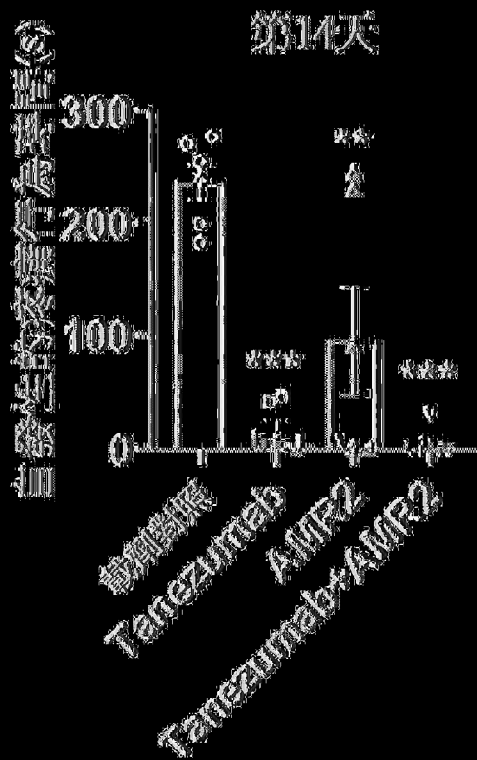
【請求項18】 如請求項 17 所述的方法，其中該癌症選自乳腺癌、前列腺癌、甲狀腺癌、腎癌、肺癌、食道癌、直腸癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、胃腸道癌、黑色素瘤、多發性骨髓瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、非小細胞肺癌、骨腫瘤和何傑金氏病。



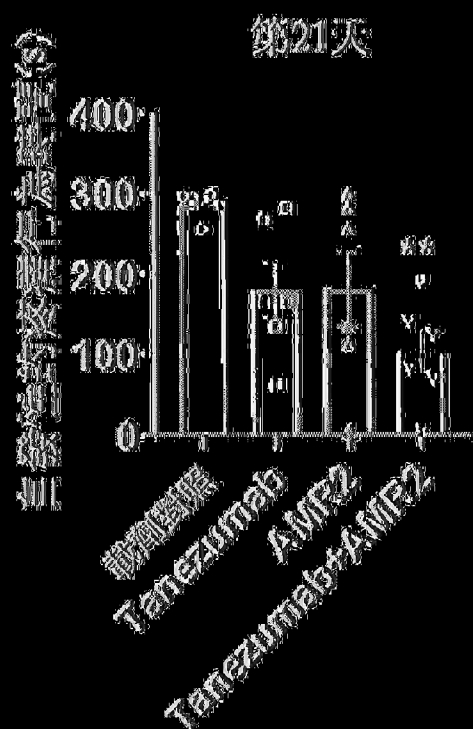
【發明圖式】



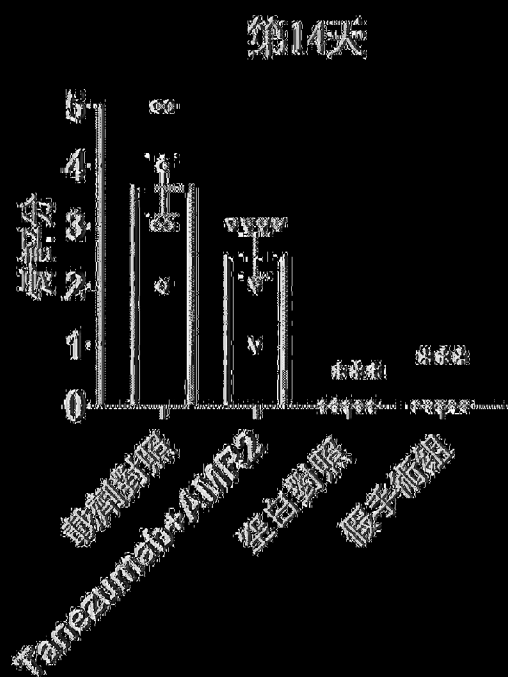
【圖1】



【圖2A】

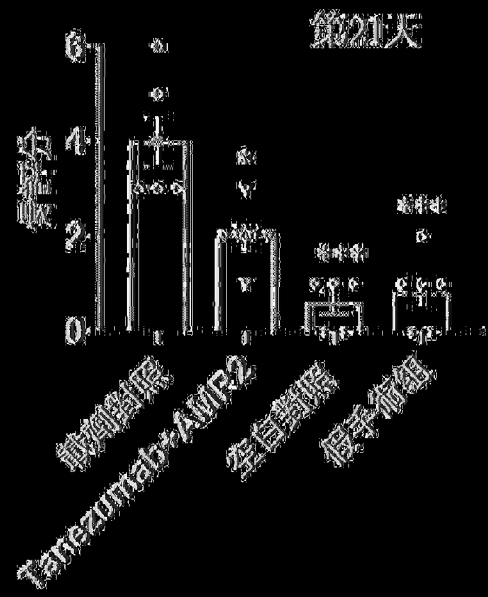


【圖2B】

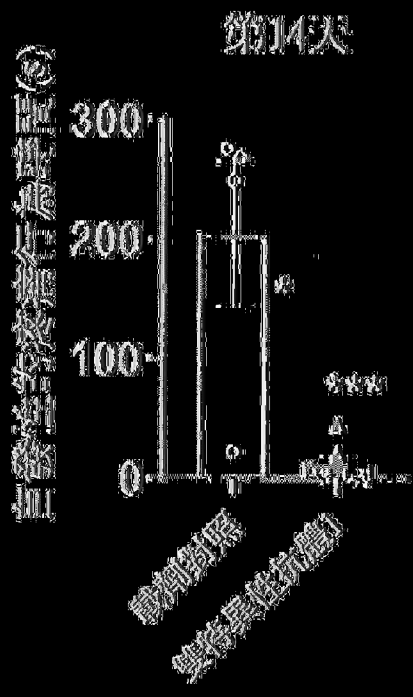


【圖2C】

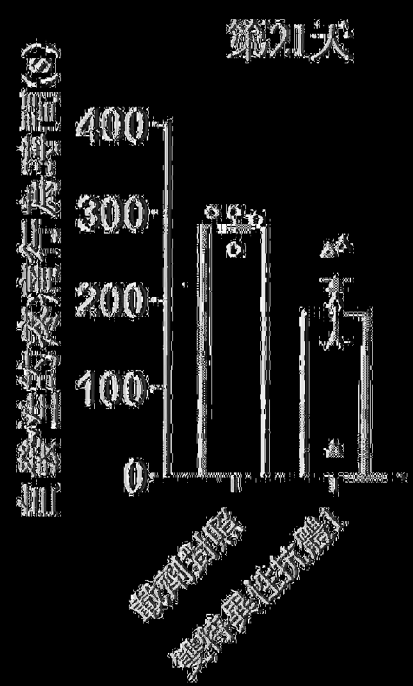
第 1 頁  
共 1 頁



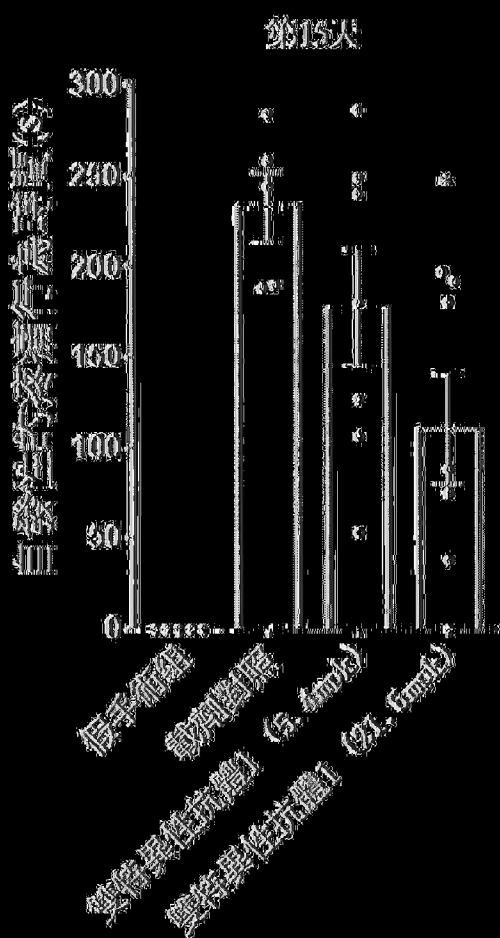
【圖(2D)】



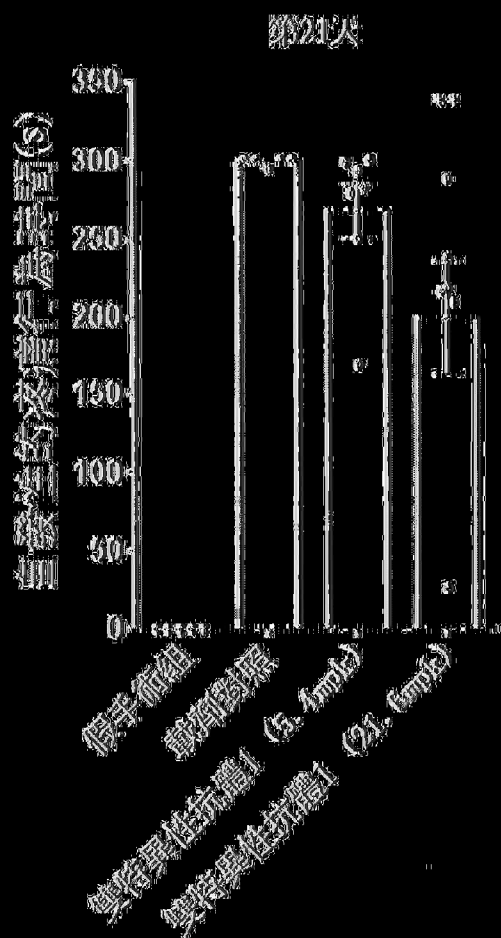
【圖(3A)】



【圖(3B)】

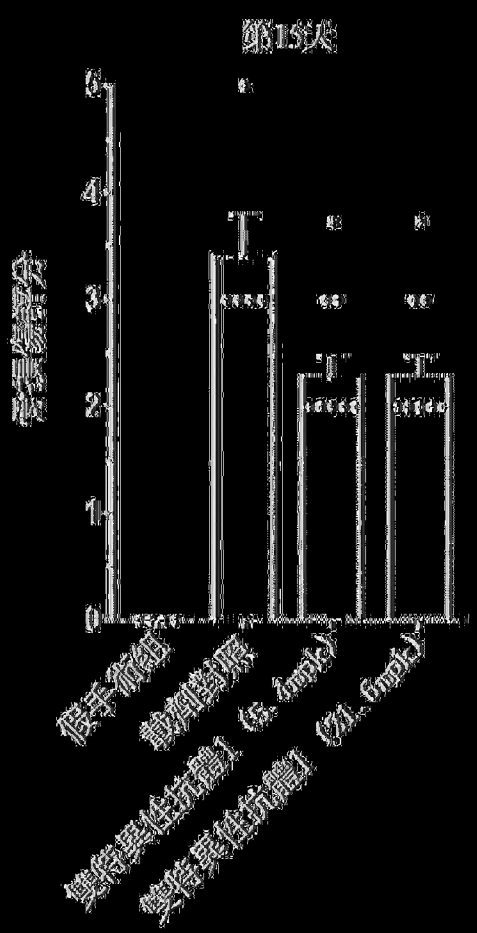


【圖4A】

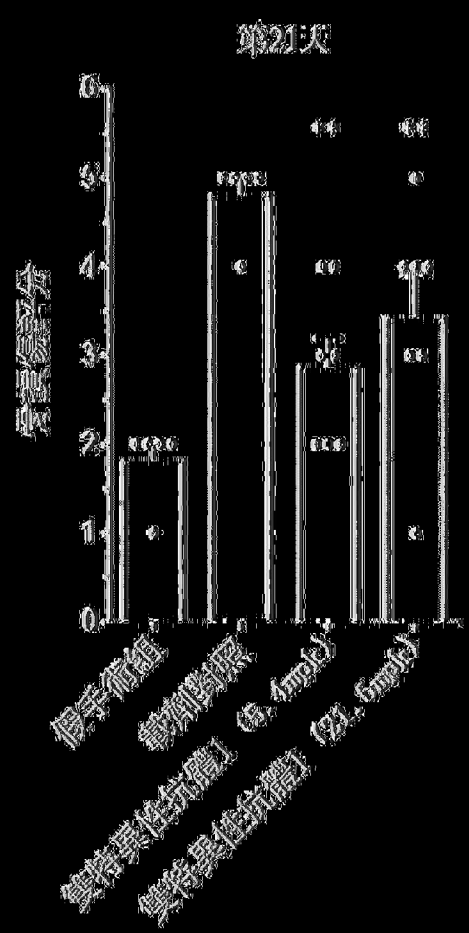


【圖4B】

5  
1  
0



【图4C】



【图4D】