

特异性结合 RANKL 和 NGF 的抗原结合分子及其医药用途

本申请要求 2021 年 05 月 12 日提交的中国专利申请(申请号 202110515444.9) 的优先权。

5

技术领域

本披露属于生物制药领域。更具体地,本披露涉及特异性结合 RANKL 和 NGF 的抗原结合分子及其应用。

10 背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息,而不必然地构成现有技术。

骨转移是很多癌症发展到后期常见的一种伴随症状。骨转移的发病机制为: 原发性的肿瘤细胞脱落进入血液循环系统形成循环的肿瘤细胞,循环的肿瘤细胞 转移到骨骼部位形成具有传播性的肿瘤细胞,并在骨骼微环境中休眠;这一过程 可能持续数年的时间,直到存活下来的肿瘤细胞逐渐适应了骨骼的微环境,肿瘤 细胞被激活从休眠状态进入增殖状态(Mantyh, P.W., Curr Opin Support Palliat Care, 2014. 8 (2): p. 83-90)。肿瘤细胞的增殖会影响骨骼的微环境,并促进破骨细胞 的形成,破骨细胞导致骨吸收加快并释放出多种细胞因子,进一步促进肿瘤细胞 的增殖,由此形成了一个恶性循环(Quayle, L., Curr Cancer Drug Targets, 2015. 15 (6): p. 469-480)。肿瘤细胞的不断增殖导致多个转移位点的形成,使患者出 现骨损伤和疼痛等各种问题(Gartland, A., J Bone Oncol, 2016. 5 (3): p. 100-103)。

据统计,常见的发生骨转移的癌症包括骨髓瘤、肾癌、黑色素瘤、膀胱癌、 甲状腺癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌(Clezardin, P., Joint Bone Spine, 2017. 84 (6): p. 677-684. Fidler, M.M., Scand J Public Health, 2018. 46 (1): p. 27-36)。

在正常骨组织中,成骨和破骨细胞处于一个相对平衡的状态,以维持骨骼正 常的生长发育,而癌细胞的存在会破坏这种平衡。在骨微环境中的癌细胞会释放 一系列的细胞因子来刺激成骨细胞和骨细胞分泌大量的RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, 核因子 κ B受体活化因子配体)。RANKL与 受体RANK作用促进破骨细胞的形成,导致骨吸收加剧。骨吸收造成的骨质溶解又 会释放出其他的生长因子来促进癌细胞的增殖。这样就形成了一个有利于癌细胞 转移的循环(Body, J.J., Expert Rev Anticancer Ther, 2012. 12 (3): p. 307-322)。

NGF是一种神经生长因子。NGF信号通路介导了神经系统的生长发育和疼痛 信号的传导。目前已知在细胞表面有两种NGF的受体,其中TrkA是高亲和力的受 体, p75NTR是低亲和力的受体。NGF与TrkA作用可以同时激活Ras和PI3K通路, 促进细胞的存活和神经的生长。而NGF与p75NTR作用可以促进细胞的凋亡。另外 PI3K通路还可以激活TRPV1的磷酸化,导致离子通道激活产生动作电位并传导痛

觉神经元信号 (Kumar, V. and B.A. J Pain Res, 2012. 5: p. 279-287)。

已有数据表明, 靶向NGF和RANKL的单克隆抗体对骨转移引起的骨损伤和疼痛有一定的治疗效果 (Body JJ. Expert Rev Anticancer Ther. 2012. 12(3): p.307-322. Sopata M, et al. 2015. 156 (9): p. 1703-1713)。

5

发明内容

本披露提供了同时阻断RANKL和NGF的双特异性抗体, 阻断与骨损失和疼痛相关的两条关键信号通路; 并且, 该双特异性抗体在体内表现出很好的止痛和骨保护效果, 同时具备良好的安全性。

10 在一个方面, 本披露提供一种抗原结合分子, 其包含至少一个特异性结合RANKL的第一抗原结合域和至少一个特异性结合NGF的第二抗原结合域。

在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其中所述特异性结合RANKL的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

i) 所述重链可变区包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列;
15 HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列; 和

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

20 ii) 所述重链可变区包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列; 和

所述轻链可变区包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列; 或
25

iii) 所述重链可变区包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列; 和

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

在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其中所述特异性结合RANKL的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

i) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 和
35

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO:

6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

ii)所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

iii)所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

10 在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 36、37 或 38 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列；和/或

15 所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 37 具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列；和/或

20 所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 36、37 或 38 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

25 在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 36、37 或 38 所示；和/或所述轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

30 在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

35 在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的

第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列;和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区的序列如
5 SEQ ID NO: 37 所示;和/或所述轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中:

所述重链可变区包含:HCDR1,其包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列;和 HCDR3,其包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列;和
10

所述轻链可变区包含:LCDR1,其包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列;和 LCDR3,其包含 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列。

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中:
15

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59 和 SEQ ID NO: 60 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;和

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62 和 SEQ ID NO: 63 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中:

所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 64 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列;和/或所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 65 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、
25 96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列;和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列。

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 64 所示;和/或所述轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 65 所示。
30

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述的抗原结合分子包含 Fc 区,所述 Fc 区包含能够缔合(二聚化)的两个亚基。

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述的 Fc 区为 IgG₁、IgG₂、IgG₃或 IgG₄ 的 Fc 区;优选地,所述 Fc 区优选为 IgG₄ Fc 区。
35

在一些实施方案中,前述的抗原结合分子,其中所述的 Fc 区包含 1 个或更多

个氨基酸取代。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其中所述的所述 Fc 区是人 IgG₄ Fc 区，并且在 228 位置的氨基酸残基为 P，编号依据为 EU 索引。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其包含式 (I) 所示结构的第一链
5 和式 (II) 所示结构的第二链，

式 (I): VHa-连接子 1-VHb-CH1-Fc 区的一个亚基；

式 (II): VLa-连接子 2-VLb-CL；

其中: VHa 与 VHb 为重链可变区，VLa 与 VLb 为轻链可变区；且

VHa 与 VLa 可形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域，VHb 和 VLb
10 可形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域；或

VHa 与 VLa 可形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域，VHb 和 VLb
可形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域；和

连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其包含两条式 (I) 所示结构的第一链
15 和两条式 (II) 所示结构的第二链，

式 (I) VHa-连接子 1-VHb-CH1-Fc 区的一个亚基；

式 (II) VLa-连接子 2-VLb-CL；

其中: VHa 与 VHb 为重链可变区，VLa 与 VLb 为轻链可变区；且

VHa 与 VLa 可形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域，VHb 和 VLb
20 可形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域；或

VHa 与 VLa 可形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域，VHb 和 VLb
可形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域；和

连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其包含式 (I) 所示结构的第一链
25 和式 (II) 所示结构的第二链，

式 (I) VHa-连接子 1-VHb-CH1-Fc 区的一个亚基；

式 (II) VLa-连接子 2-VLb-CL；

其中: VHa 与 VHb 为重链可变区，VLa 与 VLb 为轻链可变区；且

VHa 与 VLa 可形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域，VHb 和 VLb
30 可形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域；连接子 1 和连接子 2 为序列相同
或不同的肽连接子；其中，

i) VHa 包含: HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列；HCDR2，其
包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 14 的氨基
酸序列；和

35 VLa 包含: LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；LCDR2，其包含
SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列；

或

ii) VH_a 包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列; 和

5 VL_a 包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列; 或

10 iii) VH_a 包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列; 和

VL_a 包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列; 和

15 VH_b 包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列; 和

VL_b 包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列。

20 在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其包含式 (I) 所示结构的第一链和式 (II) 所示结构的第二链,

式 (I) VH_a-连接子 1-VH_b-CH1-Fc 区的一个亚基;

式 (II) VL_a-连接子 2-VL_b-CL;

其中: VH_a 与 VH_b 为重链可变区, VL_a 与 VL_b 为轻链可变区; 且

25 VH_a 与 VL_a 可形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域, VH_b 和 VL_b 可形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域; 连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子; 其中,

30 VH_a 包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列; 和

VL_a 包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列; 和

35 VH_b 包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列; 和

VLb 包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其包含式 (I) 所示结构的第一链和式 (II) 所示结构的第二链,

式 (I) VH_a-连接子 1-VH_b-CH1-Fc 区的一个亚基;

式 (II) VL_a-连接子 2-VL_b-CL;

其中: 连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子;

VH_a 包含 SEQ ID NO: 36、37 或 38 的氨基酸序列, VL_a 包含 SEQ ID NO: 10 40 的氨基酸序列; 且

VH_b 包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列, VL_b 包含 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其包含式 (I) 所示结构的第一链和式 (II) 所示结构的第二链,

15 式 (I) VH_a-连接子 1-VH_b-CH1-Fc 区的一个亚基;

式 (II) VL_a-连接子 2-VL_b-CL;

其中: 连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子;

VH_a 包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列, VL_a 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列; 且

20 VH_b 包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列, VL_b 包含 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其中所述的连接子 1 或连接子 2 包含 SEQ ID NO: 70-97 中任一所示的氨基酸序列。

25 在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其中所述的连接子 1 包含 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列, 和/或所述连接子 2 包含 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其中所述的 CH1-Fc 区包含 SEQ ID NO: 51 或 66 的序列。

在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其包含:

30 第一链, 其包含与 SEQ ID NO: 98、100 或 101 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列; 和/或

第二链, 其包含与 SEQ ID NO: 99 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列。

35 在一些实施方案中, 前述的抗原结合分子, 其包含至少两条链, 其中:

第一链, 其包含 SEQ ID NO: 98、100 或 101 的氨基酸序列; 和第二链, 其

包含 SEQ ID NO: 99 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其包含至少两条链，其中：

第一链，其包含 SEQ ID NO: 98 的氨基酸序列；和第二链，其包含 SEQ ID NO: 99 的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中，前述的抗原结合分子包含两条序列相同的第一链和两条序列相同的第二链。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子包含两条序列相同的第一链和两条序列相同的第二链，其中：

10 第一链，其包含 SEQ ID NO: 98 的氨基酸序列；和第二链，其包含 SEQ ID NO: 99 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子具有 DVD-IgG 结构，其包含如 SEQ ID NO: 98 的所示的第一链，和如 SEQ ID NO: 99 所示的第二链。

15 在一个方面，本披露还提供一种抗原结合分子，其包特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域和特异性结合 NGF 的第二抗原结合域，所述的抗原结合分子与前面任一项所述的抗原结合分子竞争性结合人 RANKL 和/或人 NGF。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其具有以下特性中的至少一种：

i) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域结合 RANKL 的亲和力高于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域结合 NGF 的亲和力；

20 ii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域结合人 RANKL 的 EC50 值小于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域结合人 NGF 的 EC50 值；和

iii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域阻断 RANKL 与 RANK 的结合的 IC50 值小于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域阻断 NGF 与 TrKA 的结合的 IC50 值。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其具有以下特性中的至少一种：

25 i) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域结合 RANKL 的亲和力高于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域结合 NGF 的亲和力，所述亲和力通过 Biacore 方式检测；

30 ii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域结合人 RANKL 的 EC50 值小于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域结合人 NGF 的 EC50 值，所述 EC50 值通过 ELISA 的方法检测；和

iii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域阻断 RANKL 与 RANK 的结合的 IC50 值小于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域阻断 NGF 与 TrKA 的结合的 IC50 值，所述 IC50 值通过 ELISA 的方式检测。

在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其具有以下特性中的至少一种：

35 i) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域结合 RANKL 的亲和力比特异性结合 NGF 的第二抗原结合域结合 NGF 的亲和力高至少 2 倍、至少 3 倍、至少

4 倍或至少 5 倍，所述亲和力通过 Biacore 方式检测；

ii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域结合人 RANKL 的 EC50 值比特异性结合 NGF 的第二抗原结合域结合人 NGF 的 EC50 值低至少 25 倍、至少 20 倍、至少 15 倍、至少 10 倍、至少 9 倍、至少 8 倍、至少 4 倍或至少 2 倍，所述 EC50 值通过 ELISA 的方法检测；和

iii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域阻断 RANKL 与 RANK 的结合的 IC50 值比特异性结合 NGF 的第二抗原结合域阻断 NGF 与 TrKA 的结合的 IC50 值低至少 20 倍、至少 15 倍、至少 10 倍、至少 8 倍、至少 4 倍或至少 2 倍，所述 IC50 值通过 ELISA 的方式检测。

10 在一些实施方案中，前述的抗原结合分子，其具有以下特性中的至少一种：

i) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域以小于 5nM、低于 4nM、低于 3nM 或低于 2nM 的 KD 值结合 RANKL；且

所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域以大于 10nM 的 KD 值与 NGF 结合；

ii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域以小于 0.13nM 的 EC50 结合人 RANKL，且

所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域以大于 3nM 的 EC50 结合人 NGF；

和

iii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域以小于 0.5nM 的 IC50 阻断 RANKL 与 RANK 的结合；且

20 所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域以大于 4nM 的 IC50 阻断 NGF 与 TrKA 的结合。

在一个方面，本披露提供一种具有较高亲和力的抗 RANKL 抗体。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

25 i) 所述重链可变包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列；和

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

30 ii) 所述重链可变包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列；和

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

iii) 所述重链可变包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列; 和

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

在一些实施方案总, 前述的抗 RANKL 抗体, 其包含轻链可变区和重链可变区, 其中:

i) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 和

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

ii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 和

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

iii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 和

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案总, 前述的抗 RANKL 抗体, 其包含轻链可变区和重链可变区, 其中其中所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 36、37 或 38 具有至少 90%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列; 和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 具有至少 90%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案总, 前述的抗 RANKL 抗体, 其包含轻链可变区和重链可变区, 其中所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 37 具有至少 90%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列; 和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 具有至少 90%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案总, 前述的抗 RANKL 抗体, 其包含轻链可变区和重链可变区, 其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 36、37 或 38 的氨基酸序列; 和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

在一些实施方案总, 前述的抗 RANKL 抗体, 其包含轻链可变区和重链可变区, 其中所述重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 36、37 或 38 所示; 和/或所述轻

链可变区的序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

10 在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 37 的所示；和/或所述轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链恒定区和轻链恒定区。

15 在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区和 λ 链或 κ 链的轻链恒定区。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其中所述的重链恒定区包含 SEQ ID NO: 51 的氨基酸序列，和/或所述的轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 52 的氨基酸序列。

20 在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO: 53、55 或 56 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 54 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

25 在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO: 53 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 54 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO: 55 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 54 具有至少 85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO: 56 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、
5 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 54 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链和轻链，其中：

10 所述重链包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列，和/或所述轻链包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列，和/或所述轻链包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列；或

15 所述重链包含 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列，和/或所述轻链包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链的序列如 SEQ ID NO: 53 所示，和/或所述轻链的序列如 SEQ ID NO: 54 所示；或

20 所述重链的序列如 SEQ ID NO: 55 所示，和/或所述轻链的序列如 SEQ ID NO: 54 所示；或

所述重链的序列如 SEQ ID NO: 56 所示，和/或所述轻链的序列如 SEQ ID NO: 54 所示。

25 在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其中所述的抗 RANKL 抗体是抗体片段；优选地，其中所述的抗体片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv 和 dAb。

在一些实施方案中，前述的抗 RANKL 抗体，其中所述的抗体具备以下特性：

所述的抗体以低于 5nM 的 KD 值与人 RANKL 结合；和/或

所述的抗体阻断 RANKL 与 RANK 结合的 IC₅₀ 值低于 0.5nM。

30 在一个方面，本披露还提供一种双特异性抗体，其包含前述任一项所述的抗 RANKL 抗体。

在一个方面，本披露提供一种分离的核酸，其编码如前一项所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体。

在一个方面，本披露提供一种载体，其包含如前所述的核酸。

在一个方面，本披露提供一种宿主细胞，其包含如前所述的载体。

35 本申请的宿主细胞不能发育成完成动植物个体。

在一个方面，本披露提供一种制备抗原结合分子或抗 RANKL 抗体或双特异

性抗体的方法，其包括在适于表达所述抗原结合分子或抗 RANKL 抗体或双特异性抗体的条件下培养如前所述的宿主细胞。

在一个方面，本披露提供一种药物组合物，其含有：

5 预防有效量或治疗有效量的如前一项所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体，以及一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

在一个方面，本披露提供一种治疗或预防相关疾病的方法，所述方法包括给予受试者预防有效量或治疗有效量如前所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体，或如前所述的药物组合物。

10 在一些实施方案中，所述的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

在一些实施方案中，所述的疼痛选自：骨关节疼痛、类风湿性关节炎疼痛、痛风、骨癌痛、术后疼痛、痛性膀胱综合征、慢性前列腺炎、慢性盆腔疼痛、下背痛、骨骼疾病相关的疼痛和外周神经相关的疼痛。

15 在一些实施方案中，所述的骨损失与选自下组的至少一种状况相关：骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨坏死、炎症、自身免疫疾病、类风湿性关节炎、牙周骨吸收、溶骨性转移和癌症。在一些实施方案中，其中所述的癌症选自乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾癌、肺癌、食道癌、直肠癌、膀胱癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、胃肠道癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、非小细胞肺癌、骨肿瘤和何杰金氏病。

20 在一些实施方案中，前述的疾病为与 NGF 或 RANKL 相关的疾病。

在一些实施方案中，前述的疾病为表达 NGF 或 RANKL 的疾病。

25 在一个方面，本披露提供一种治疗或预防与 NGF 或 RANKL 相关的疾病的方法，所述方法包括给予受试者预防有效量或治疗有效量的如前一项所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体，或如前所述的药物组合物。

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

30 在一个方面，本披露还提供如前一项所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体，或如前所述的药物组合物在制备用于预防或治疗疾病或病症的药物中的用途。在一些实施方案中，所述的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

35 在一些实施方案中，所述的疼痛选自：骨关节疼痛、类风湿性关节炎疼痛、痛风、骨癌痛、术后疼痛、痛性膀胱综合征、慢性前列腺炎、慢性盆腔疼痛、下背痛、骨骼疾病相关的疼痛和外周神经相关的疼痛。在一些实施方案中，所述的骨损失与选自下组的至少一种状况相关：骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨坏死、炎症、自身免疫疾病、类风湿性关节炎、牙周骨吸

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

5 在一个方面，本披露的如前一项所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体，或如前所述的药物组合物可用作药物。在一些实施方案中，用作用于治疗疼痛、关节僵硬或骨损失的药物中的用途。在一些实施方案中，用作用于治疗骨关节疼痛、类风湿性关节炎疼痛、痛风、骨癌痛、术后疼痛、痛性膀胱综合征、慢性前列腺炎、慢性盆腔疼痛、下背痛、骨骼疾病相关的疼痛和外周神经相关的疼痛的药物中的用途。在 10 一些实施方案中，用作用于治疗骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨坏死、炎症、自身免疫疾病、类风湿性关节炎、牙周骨吸收、溶骨性转移和癌症引起的骨损失的药物中的用途。

 在一个方面，本披露提供如前一项所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体，或如前所述的药物组合物在 15 制备用于或预防或治疗与 NGF 或 RANKL 相关的疾病的药物中的用途。在一些实施方案中，所述的与 NGF 或 RANKL 相关的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

 在一个方面，本披露提供的如前一项所述的抗原结合分子，或如前一项所述的抗 RANKL 抗体，或如前所述的双特异性抗体，或如前所述的药物组合物 20 可用作预防或治疗与 NGF 或 RANKL 相关的疾病的药物。在一些实施方案中，所述的与 NGF 或 RANKL 相关的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失。

 在一个方面，本披露提供一种预防或治疗疼痛或抑制骨损失的方法，所述方法包括对该个体施用有效量的 NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂；所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂同时或顺序施用。

25 在一个方面，本披露提供 NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂在制备用于预防或治疗疼痛或抑制骨损失的药物中的用途。

 在一个方面，本披露提供 NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂联用，用于治疗疼痛或抑制骨损失，所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂同时或顺序施用。

 在一些实施方案中，所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂在相同或不同的 30 容器中。

 在一个方面，本披露提供 NGF 拮抗剂用于预防或治疗疼痛或抑制骨损失，其中 NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂联用，NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂不在同一容器中。

 在一个方面，本披露提供 RANKL 拮抗剂用于预防或治疗疼痛或抑制骨损失， 35 其中 RANKL 拮抗剂和 NGF 拮抗剂联用，NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂不在同一容器中。

在一个方面，本披露提供包含 NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂的组合物，其用于预防或治疗疼痛或抑制骨损失。

在一些实施方案中，所述的 NGF 拮抗剂为抗 NGF 抗体。

在一些实施方案中，所述的 RANKL 拮抗剂为抗 RANKL 抗体。

5 在一些实施方案中，所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂被制备成混合物。

在另一些实施方案中，所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂不是混合物的形式，所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂包含在不同的容器中、或包装在不同的药盒中。

应当理解，在实际临床应用中，所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂允许
10 单独制备，而在临床中联合施用。在所述 NGF 拮抗剂/RANKL 拮抗剂的使用说明中，如果指出所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂的联合施用，则落入“NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂在制备用于预防或治疗疾病的药物中的用途”。

在一些实施方案中，所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂同时或顺序施用。应当理解，“同时”不可解读为同一个时间点，NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂
15 在施用间隔不超过 30min（含）的，可以认为是“同时施用”。二者的施用间隔超过 30min 时，可以认为是“顺序施用”，施用间隔的上限以仍能发生协同效应为限。

在一些实施方案中，其中所述的抗 NGF 抗体为 Tanezumab，和/或所述的抗 RANKL 抗体为 AMR2。

在一些实施方案中，其中所述的抗 NGF 抗体为他尼珠单抗（Tanezumab），和
20 /或所述的抗 RANKL 抗体为迪诺苏单抗（Denosumab）。

本披露提供的抗原结合分子，具有治疗活性、安全性、药物代谢动力学特性和成药性（如稳定性）好的特点。

附图说明

25 图 1: DVD-IgG 结构示意图。

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

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

35 图 4A 至图 4D: 图 4A 显示使用双特异性抗体 1 第 15 天，小鼠疼痛行为统计结果；图 4B 显示使用双特异性抗体 1 第 21 天，小鼠疼痛行为统计结果；图 4C 显

示使用双特异性抗体 1 第 15 天，小鼠骨损伤评分结果；图 4D 显示使用双特异性抗体 1 第 21 天，小鼠骨损伤评分结果；其中 vs vehicle **** 表示 vs vehicle, $P<0.0001$; ***表示 vs vehicle, $P<0.001$; *表示 vs vehicle, $P<0.05$ 。假手术组(Sham), 载剂对照 (vehicle)。

5

具体实施方式

术语

本文所用的术语只是为了描述实施方案的目的，并非旨在进行限制。除非另外定义，本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本披露所属领域的普通技术人员通常所理解相同意义。

10

说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代，除非上下文清楚表明并非如此。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。除非另有说明，“包含”包括了“由……组成”。

15

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

术语“和/或”，例如“X 和/或 Y”应当理解为意指“X 和 Y”或“X 或 Y”并且应当被用来提供对两种含义或任一含义的明确支持。

20

术语“抗原结合分子”以最广义使用，涵盖各种特异性结合抗原或其表位的分子，包括但不限于抗体、其他具有抗原结合活性的多肽以及两者融合而成的抗体融合蛋白。示例性的，本文中的抗原结合分子是双特异性抗原结合分子（例如：双特异性抗体），其可包含两条相同（或不同）的第一链和两条相同（或不同）的第二链；或互不相同的第一链、第二链、第三链和第四链。示例性的，所述链是多肽链。示例性的，所述第一多肽链或第三多肽链可以是抗体的重链或包含 Fc 区的多肽，所述第二多肽链或第四多肽链可以是抗体的轻链或经改造的抗体轻链。术语“双特异性抗原结合分子”指能够对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原表位特异性结合的抗原结合分子。

25

术语“RANK 拮抗剂”是一种试剂，其是 RANKL 结合剂，其统计学上显著中和 RANKL 和/或降低或抑制 RANKL 与其受体 RANK 的结合，从而拮抗 RANK-RANKL 的相互作用及其下游信号传导通路。

30

RANK 拮抗剂的拮抗功能的特征特别在于减少、抑制或预防由激动剂(RANKL)激活的受体 (RANK) 的反应。拮抗剂特别地是竞争性拮抗剂，其可以在相同结合位点可逆地结合 RANKL 或作为内源性受体干扰结合位点（活性位点），而不必激活所述受体。

35

所述试剂可以是任何合适的结合剂或配体，例如选自由下列组成的组：有机

或无机小分子、碳水化合物、生物大分子、肽、蛋白质（这里也称为多肽）、肽类似物、肽模拟物、抗体（包括抗体的抗原结合片段）、核酸、核酸类似物，以及任何前述的组合。在一些实施方案中，所述 RANKL 拮抗剂是免疫治疗剂。所述试剂的具体实例选自由下列组成的组：抗体、受体或骨保护素（其为无活性的或呈现无活性的，以避免激动剂 RANKL 与其受体 RANK 结合）、受体-融合蛋白，例如 RANK-Fc 融合蛋白、肽、适体或小分子。示例性的，RANKL 的拮抗剂包括 Denosumab、重组 RANK-Fc（Schmiedel et al.2013, Cancer Res.73（2）：683-94）、RANKL-纳米抗体（WO2008142164A2）或 RANKL 结合肽（WO2012163887A1）。

通过“统计学上显著降低或抑制”RANK-RANKL 的相互作用及其下游信号传导通路，意味着拮抗剂显示出选自以下的任一项或其组合：

(i) 拮抗剂抑制 RANKL 与 RANK 的结合超过 50%，优选超过 60%、70%、80%、90%或 95%，或完全抑制这种结合；

(ii) 拮抗剂功能性地抑制 RANKL 诱导的通路，特别是 RANK 刺激后的信号传导，例如 MAPK（丝裂原活化蛋白激酶）或 SRC 激酶的活性或参与转移形成的 NF- κ B 信号；或者

(iii) 在特定的显著水平处（例如但不限于，p 设置为 0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.0001、0.0005、0.0001、或甚至更低），存在拮抗剂的组和不存在拮抗剂的组之间，RANK-RANKL 相互作用水平（或其下游信号传导通路中的成员活性水平）存在显著差异。

这种功能抑制是例如对转移形成的抑制程度超过约 50%、60%、70%、80%、90%或 95%，或完全抑制。

术语“迪诺苏单抗”或“Denosumab”包括迪诺苏单抗的生物类似物。如本文中所使用，（经批准的参考产品/生物药物，诸如蛋白质治疗剂、抗体等的）“生物类似物”是指基于来源于以下研究的数据与参考产品类似的生物产品：（a）显示生物产品高度类似于参考产品，但在临床无活性组分方面存在微小差异的分析研究；（b）动物研究（包括毒性的评定）；和/或（c）一项或多项临床研究（包括免疫原性和药代动力学或药效学的评定），足以证明在一个或多个适当使用条件下的安全性、纯度和效力，参考产品已获得许可并打算使用，并且正在寻求生物产品的许可。

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

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

“NGF 受体”意指与 NGF 结合或被 NGF 激活的多肽。NGF 受体包括任何哺乳动物物种的 TrkA 受体和 p75 受体，包括但不限于人类、狗、猫、马、灵长类或牛。

“NGF 拮抗剂”是指任何一种可以中和 NGF 信号和生物活性的化合物。例如，

NGF 拮抗剂可以抑制 NGF 与其配体结合, 比如, 与细胞膜结合的 TrkA 或 p75 受体。

在一些实施方案中, NGF 拮抗剂, 包括抗 NGF 抗体、抗 NGF 抗体的片段、或 NGF 结合蛋白、或 NGF 结合多肽。在某些实施方案中, NGF 拮抗剂被设计用于被治疗的特定物种。例如, 该物种是人时, 使用人或人源化 NGF 拮抗剂, 比如 RN624 (tanezumab)、JNJ-42160443、REGN475、PG110、alpha-D11、AMG-403 (参见例如 Mantyh et al., *Anaesthesiology* 115: 189-204 (2011)), 描述在 Hongo et al., *Hybhdoma*: 19: 215-27 (2000) 中的 911 抗体, 或描述在 Ruberti et al., *Cell. Molec. Neurobiol.* 13: 559-68 (1993) 中的 aD11 抗体, 或描述在 WO 2012153121、WO 2012153122、WO 2012153123、WO 2012153126 中的任何抗体。

在一些实施方案中, NGF 拮抗剂是 NGF 结合蛋白或多肽, 例如一种包含 TrkA 或 p75 的多肽, 或可以结合 NGF 的 TrkA 或 p75 的片段。在一个具体的实施方案中, 所述的 NGF 拮抗剂是一种 NGF 结合多肽, 其包含 TrkA 或 p75 (或其结合 NGF 的片段) 和一种免疫球蛋白的 Fc。在一些实施方案中, 所述的 NGF 拮抗剂是一种可以结合 NGF 的 TrkA-IgG 融合蛋白, 例如在 Shelton et al., *J. Neurosci.* 15: 477-91 (1995) 中描述的。在一些实施方案中, 所述的 NGF 拮抗剂是一种结合 NGF 的 p75 融合蛋白, 比如由 Levicept (Kent, England) 开发的用于治疗慢性疼痛的 p75-Fc。在一些实施方案中, 所述的 NGF 拮抗剂是一种小分子化合物, 该化合物可以干扰 NGF 与 TrkA 的结合, 比如 ALE0540 和 PD90780, 参见 Hefti et al., *TRENDS in Pharmacol. Sci.* 27: 85-91 (2006); 或 MNAC13, 参见 Mantyh et al., *Anaesthesiology* 115: 189-204 (2011)。在一些实施方案中, 所述的 NGF 拮抗剂是抑制 TrkA 的小分子化合物。

NGF 的“生物活性”通常意指与 NGF 受体结合及/或激活 NGF 受体发送信号通路的能力。生物活性包括, 但不限于下列之一或多项: 与 NGF 受体 (如 p75 及/或 trkA) 结合的能力; 提高 TrkA 受体二聚化作用及/或自我磷酸化作用的能力; 激活 NGF 受体发送信号通路的能力; 在细胞生理学上促进细胞分化、增殖、存活、生长及其他变化的能力, 包括神经元 (包括周围和中枢神经元) 形态学上的变化、突触生成 (synaptogenesis)、突触功能、在创伤之后的神经递质及/或神经肽释放和再生; 促进三叉神经元存活的能力; 以及调节疼痛, 包括手术后疼痛的能力。

“抗 NGF 抗体”意指能够与 NGF 结合, 并抑制 NGF 的生物活性及/或借由 NGF 发送信号调节的下游通路的抗体。抗 NGF 抗体包括阻断、拮抗、压抑或降低 NGF 生物活性的抗体, 包括借由 NGF 发送信号调节的下游通路, 如受体结合及/或诱发对 NGF 的反应。在一些具体实施方案中, 抗 NGF 抗体与 NGF 结合并预防 NGF 二聚化作用及/或与 NGF 受体 (如 p75 及/或 TrkA) 结合。在其他的具体实施方案中, 抗-NGF 抗体与 NGF 结合, 并预防 TrkA 受体二聚作用及/或 trkA 自我磷酸化作用。

术语“他尼珠单抗”或“Tanezumab”包括他尼珠单抗的生物类似物。

术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物或氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构（即与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的 α 碳）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的 R 基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

术语“氨基酸突变”包括氨基酸取代，缺失，插入和修饰。可以进行取代、缺失、插入和修饰的任意组合来实现最终构建体，只要最终构建体拥有期望的特性，例如降低或对 Fc 受体的结合。氨基酸序列缺失和插入包括在多肽链的氨基端和/或羧基端的缺失和插入。具体的氨基酸突变可以是氨基酸取代。在一个实施方案中，氨基酸突变是非保守性的氨基酸取代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种天然氨基酸的衍生物（例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸）替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变、PCR，基因合成等。预计基因工程以外的改变氨基酸侧链基团的方法，如化学修饰也可能是可用的。本文中可使用各种名称来指示同一氨基酸突变。本文中，可采用位置+氨基酸残基的方式表示特定位置的氨基酸残基，例如 366W，则表示在 366 位点上的氨基酸残基为 W。T366W 则表示第 366 位点上的氨基酸残基由原来的 T 突变为 W。

术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。“天然抗体”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条轻链和两条重链构成。从 N 至 C 端，每条重链具有一个可变区（VH，又称作可变重域、重链可变区），接着是三个恒定域（CH1、CH2 和 CH3）。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区（VL，又称作可变轻域，或轻链可变域），接着是一个恒定轻域（轻链恒定区、CL）。术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用，指具有与天然抗体结构基本类似的结构或具有含有如本文所限定的 Fc 区的重链的抗体。

术语“双特异性抗体”指能够对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原表位特异性结合的抗体（包括抗体或其抗原结合片段，如单链抗体）。现有技术已公开了各种结构的双特异性抗体，根据 IgG 分子的完整性可分为 IgG 样双特异

性抗体和抗体片段型双特异性抗体；根据抗原结合区域的数量，可分为二价、三价、四价或更多价的双特异性抗体，根据结构左右是否对称，可分为对称结构双特异性抗体和不对称结构双特异性抗体。其中，基于抗体片段的双特异性抗体，例如缺乏 Fc 片段的 Fab 片段，其通过将 2 个或多个 Fab 片段结合在一个分子中形成双特异性抗体，其具有较低的免疫原性，且分子量小，具有较高的肿瘤组织渗透性，该类型的典型的抗体结构如 F(ab)2、scFv-Fab、(scFv)2-Fab 等双特异性抗体；IgG 样双特异性抗体（例如具有 Fc 片段），这类抗体相对分子量较大，Fc 片段有助于抗体后期的纯化，并提高其溶解性、稳定性，Fc 部分还可能会与受体 FcRn 结合，增加抗体血清半衰期，典型的双特异性抗体结构模型如 KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、FcΔAdp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAb、2：1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、DART-Fc、LP- DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F(ab)2- CrossMAb、IgG-(scFv)2、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent- DART-Fc、(scFv)4-Fc、CODV-Ig、mAb2、F(ab)4- CrossMAb 等双特异性抗体（参见 Aran F. Labrijn 等，Nature Reviews Drug Discovery volume 18, pages585–608 (2019)；Chen S1 等，J Immunol Res. 2019 Feb 11; 2019: 4516041）。

术语“可变区”或“可变域”指重链或轻链中参与抗体-抗原相互作用的域。重链可变区可用 VH 表示，轻链可变区可用 VL 表示。VH 和 VL 各包含四个保守的框架区（FR）和三个互补决定区（CDR）。其中，术语“互补决定区”或“CDR”指可变结构域内主要促成与抗原结合的区域；“框架”或“FR”是指除 CDR 残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

每个 VH 和 VL 由从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。单个 VH 或 VL 可能足以赋予抗原结合特异性。

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

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35

HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

除非另有说明，本披露实施方案中的可变区和 CDR 序列均适用“Kabat”编号规则。

术语“抗体片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分与完整抗体所结合的抗原相结合。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)₂、单域抗体、单链 Fab(scFab)、双抗体、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv）；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然 Fc 区和改造的 Fc 区。在一些实施方案中，Fc 区包含了相同或不同的两个亚基。在一些实施方案中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。用于本文所述抗体的合适天然序列 Fc 区包括人 IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3 和 IgG4。除非另有说明，Fc 区的编号规则为 EU 索引。

术语“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本文所用，“结合亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成员之间 1:1 相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常可以由解离常数 (KD) 表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法（包括本文所述的那些）测量。术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合 (association) 速率，而如本文所使用的术语“kdis”或“kd”意在是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所使用的，术语“KD”指解离常数，其获得自 kd 与 ka 的比率（即 kd/ka）并且表示为摩尔浓度 (M)。可以使用本领域已知的方法测定抗体的 KD 值，例如：用于测定抗体 KD 的方法包括使用生物传感系统例如系统测量表面等离子体共振，或通过溶液平衡滴定法 (SET) 测量溶液中的亲和力。

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体的群，即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的，除了可能少量存在的天然突变以外。相比之下，多克隆抗体制剂通常包含在其可变结构域具有不同氨基酸序列的多种不同抗体，其通常特异性针对不同表位。“单克隆”表示从基本上均质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。在一些实施方案中，本披露提供的抗体是单克隆抗体。

术语“抗原”是指能够被抗原结合蛋白（例如抗体）选择性结合的分子。抗原可具有一个或多个能够与不同的抗原结合蛋白（例如抗体）相互作用的表位。

术语“表位”指能够与抗体或其抗原结合片段特异性结合的抗原上的区域（area 或 region）。表位可以由连续氨基酸串（线性表位）形成或包含非连续氨基酸（构象表位），例如因抗原的折叠（即通过蛋白质性质的抗原的三级折叠）而变成空间接近。构象表位和线性表位的差别在于：在变性溶剂的存在下，抗体对构象表位的结合丧失。表位包含处于独特空间构象的至少 3，至少 4，至少 5，至少 6，至少 7，或 8-10 个氨基酸。筛选结合特定表位的抗体（即那些结合相同表位的）可以使用本领域例行方法来进行，例如但不限于丙氨酸扫描，肽印迹（见 Meth. Mol. Biol. 248（2004）443-463），肽切割分析，表位切除，表位提取，抗原的化学修饰（见 Prot. Sci. 9（2000）487-496），和交叉阻断（见“Antibodies”，Harlow and Lane（Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY））。

与参照抗体“竞争结合的抗体”指在竞争测定法中，将参照抗体对抗原的结合阻断 50%或更多的抗体，或其对抗原的结合被参照抗体阻断 50%或更多的抗体。

术语“能够特异性结合”、“特异性结合”或“结合”是指相比其他抗原或表位，抗原结合分子能够以更高的亲和力结合至某个抗原或其表位。通常，抗体以约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小（例如约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小）的平衡解离常数（KD）结合抗原或其表位。在一些实施方案中，抗体与抗原结合的 KD 为该抗体结合至非特异性抗原（例如 BSA、酪蛋白）的 KD 的 10%或更低（例如 1%）。可使用已知的方法来测量 KD，例如通过 BIACORE[®]表面等离子体共振测定法所测量的。然而，特异性结合至抗原或其表位的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性，例如，对来自其它物种（同源）（诸如人或猴，例如食蟹猕猴（*Macaca fascicularis*）（cynomolgus, cyno）、黑猩猩（*Pan troglodytes*）（chimpanzee, chimp）或狨猴（*Callithrix jacchus*）（commonmarmoset, marmoset）的相应抗原具有交叉反应性。

术语“抗 RANKL 抗体”或“特异性结合 RANKL 的抗原结合域”是指能够以足够的亲和力结合 RANKL 或其表位的抗体或结构域，使得抗 RANKL 抗体或含有该结构域的抗体可用作靶向 RANKL 的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中，与 RANKL 结合的抗体或结构域具有以下解离常数（KD）< 约 $1 \mu\text{M}$ 、< 约 100 nM 、< 约 10 nM ，其是通过 FACS 方法测量的。在某些实施方案中，抗 RANKL 抗体或特异性结合 RANKL 的抗原结合域结合来自不同物种的 RANKL 中保守的 RANKL 表位。

术语“抗 NGF 抗体”或“特异性结合 NGF 的抗原结合域”是指能够以足够的亲和力结合 NGF 的抗体，使得含有该结构域抗体可用作靶向 NGF 的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗 NGF 抗体结合来自不同物种的 NGF 中保守的 NGF 表位。

术语“连接子”指连接两个多肽片段的连接单元。在本文中，同一分子中出现的连接子可以是相同或不同的。连接子可以是肽连接子，其包含一个或多个氨基酸，典型的包含约 1-30 个、2-24 个或 3-15 个氨基酸。当“-”出现在结构式中，其表示

两侧的单元直接通过共价键连接。当术语“键”出现在结构单元，其表示该单元没有氨基酸，单元两侧的单元直接连接。

术语“抗体依赖性细胞的细胞毒性”、“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是诱导细胞死亡的机制，该机制依赖于抗体包被的靶细胞与具有裂解活性的效应细胞（诸如自然杀伤细胞（NK）、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞）经由效应细胞上表达的 Fc γ 受体(Fc γ R)发生的相互作用。例如，NK 细胞表达 Fc γ RIIIa，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIIIa。本文提供的抗原结合分子的 ADCC 活性可使用体外测定，使用表达抗原的细胞作为靶细胞和 NK 细胞作为效应细胞进行评定。根据从裂解的细胞中释放的标记物（例如放射性底物、荧光染料或天然胞内蛋白）来检测细胞裂解。

术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用，并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸，所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有与参考核酸相似的结合特性，并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸（PNA）。

“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。编码抗 RANKL 抗体或所述抗原结合分子的分离的核酸指编码抗体重链和轻链（或其片段）的一个或更多个核酸分子，包括在单一载体或分开的载体中的这样的一个或更多个核酸分子，和存在于宿主细胞中一个或更多个位置的这样的一个或更多个核酸分子。除非另有说明，否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体（例如，简并密码子取代）和互补序列以及明确指明的序列。具体地，如下详述，简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得，在这些序列中，一个或多个所选的（或全部）密码子的第三位被简并碱基和/或脱氧肌苷残基取代。

术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明，否则特定的多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体。

术语序列“同一性”指，当对两条序列进行最佳比对时，两条序列的氨基酸/核酸在等价位置相同的程度（百分比）；其中，在最佳比对过程中，必要时引入间隙，以获取最大序列同一性百分比，且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分。为测定序列同一性百分比，比对可以通过本领域技术已知的技术来实现，例如使用公开可得到的计算机软件，诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，

包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

术语“融合”或“连接”是指部件（例如抗原结合结构域和 Fc 结构域）直接地或经由一个或多个连接子而通过共价键连接。当连接子是肽连接子时，所述共价键是肽键或酰胺键。

5 术语“载体”意指能够递送与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指环状双链 DNA 环，其中可以连接附加的 DNA 区段。另一种类型的载体是病毒载体，例如腺相关病毒载体（AAV 或 AAV2），其中另外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体
10 载体（例如，非附加型哺乳动物载体）可以在引入宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。

术语“表达载体”或“表达构建体”是指适用于对宿主细胞进行转化且含有指导及/或控制与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译，且在存在内含子时影响与
15 其可操作地连接的编码区的 RNA 剪接的序列。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且指已经导入外源核酸的细胞，包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代，而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同，可以含有突变。本文中包括具有
20 与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞，其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。示例性的宿主细胞如下：中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝细胞癌细胞（例如，HepG2）、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞、巴氏毕赤酵母（*Pichia pastoris*）、芬兰毕赤酵母（*Pichia finlandica*）、白色念珠菌（*Candida albicans*）、黑曲霉（*Aspergillus niger*）、米曲霉（*Aspergillus oryzae*）、里氏木霉（*Trichoderma reesei*）。如在本申请中所使用的，表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用，并且所有这样的名称均包括子代。因而，词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和来源于其的培养物，而与传代的次数无关。还应
30 理解的是，由于有意或无意的突变，使得并非所有子代均具有完全相同的 DNA 内容物。包括与原始转化细胞具有相同功能或生物活性的突变子代。

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

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述的抗体或抗原结合分子与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。
35

术语“药学上可接受的载体”指药学配制剂中与活性成分不同的，且对受试者

无毒的成分。药学可接受载剂包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

术语“受试者”或“个体”包括人类和非人类动物。非人动物包括所有脊椎动物（例如哺乳动物和非哺乳动物）例如非人灵长类（例如，食蟹猴）、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非指出时，否则所述术语“患者”或“受试者”在本文5 文中可互换地使用。如本文所使用的，术语“食蟹猴(cyno)”或“食蟹猴(cynomolgus)”是指食蟹猴（*Macaca fascicularis*）。在某些实施方案中，个体或受试者是人。

“施用”或“给予”，当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。

10 术语“样本”是指从受试者分离的类似流体、细胞、或组织的采集物，以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。示例性样本为生物流体，诸如血液、血清和浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、唾液、囊液、泪液、排泄物、痰、分泌组织和器官的粘膜分泌物、阴道分泌物、腹水、体腔（如胸膜、心包、腹膜、腹腔）的流体、由支气管灌洗液收集的流体、滑液、与受试者或生物来源接触的液体溶液，15 例如细胞和器官培养基（包括细胞或器官条件培养基）、灌洗液等，组织活检样本、细针穿刺、手术切除的组织、器官培养物或细胞培养物。

“治疗（treatment 或 treat）”和“处理”（及其语法变型）指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预，并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生，减轻症状，减轻/减少疾病20 的任何直接或间接病理后果，预防转移，降低疾病进展速率，改善或减轻疾病状态，和消退或改善的预后。在一些实施方案中，使用本披露的抗原结合分子来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

“有效量”一般是足以降低症状的严重程度及/或频率、消除这些症状及/或潜在病因、预防症状及/或其潜在病因出现及/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的25 损伤的量。在一些实施方案中，有效量是治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状，或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应，例如预防或延迟该疾病状态的发作（或复发），或者降低该疾病状态或相关症状30 的发作（或复发）可能性的量。治疗或预防效果未必在给予一个剂量之后便发生，可能在给予一系列剂量之后发生。因而，治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于多种因素变化：诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如患者改善的健康状况。

35 当在本文中使用时，“疼痛”意指任何病因学的疼痛，包括急性和慢性疼痛，以及任何有炎症组份的疼痛。疼痛的实例包括但不限于手术后疼痛、操作后疼痛（包

括牙齿痛)、偏头痛、头痛和三叉神经痛、与烧伤、创伤或肾结石有关的疼痛、与外伤(包括头部外伤)有关的疼痛、神经病变的疼痛、与肌肉-骨骼病症有关的疼痛(如风湿性关节炎、骨关节炎、脊椎僵直性脊椎炎、血清-阴性(非风湿性)关节病、非关节性风湿病和关节周围病症),以及与癌症有关的疼痛(包括“突破疼痛”和与癌症末期有关的疼痛)、周围神经病变和带状疱疹后神经痛。有炎症组份的疼痛的实例(除了上述的那些),包括风湿性疼痛、与粘膜炎症有关的疼痛。

“手术后疼痛”(可互换地称为“介入后”或“受伤后疼痛”)意指起因于外伤的疼痛,如个体组织的割伤、穿刺伤、介入、撕裂或受伤(包括起因于所有手术程序的那些,无论是侵入性或非侵入性的)。当在本文中使用时,手术后疼痛不包括没有外在物理创伤而发生(出现或发作)的疼痛。在一些具体实施方案中,手术后疼痛是内在或外在(包括周围)的疼痛,并可能偶尔(有外伤)或故意(有手术切开)发生受伤、割伤、外伤、撕裂或切口。当在本文中使用时,“疼痛”包括感受伤害和感觉疼痛,可使用疼痛计分和现有技术中已知的方法,主观和客观地评估疼痛。手术后疼痛,当在本文中使用时,包括异常性疼痛(即增加对正常无害刺激的反应)和痛觉过敏(即增加对正常有害或讨厌刺激的反应),其实际上可依次为热或机械(触觉)的。在一些具体实施方案中,通过热敏感性、机械敏感性及/或静止疼痛来表征疼痛的特征。在一些具体实施方案中,手术后疼痛包括以机械方式引起的疼痛或静止疼痛。在其他的实施方案中,手术后疼痛包括静止疼痛。该疼痛为主要或次要疼痛,如同现有技术中已熟知的。

20 本披露的抗原结合分子

本披露提供了抗原结合分子,其具有诸多有利的特性,例如亲和力、对细胞表面 RANKL 的特异性、治疗活性、安全性、药物代谢动力学特性和成药性(如产率、纯度和稳定性等)。

示例性的抗原结合分子

25 在一个方面,本披露提供了一种抗原结合分子,其包含至少一个特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域和至少一个特异性结合 NGF 的第二抗原结合域。特别的,本披露的抗原结合分子具有:

- i) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域以小于 5nM、低于 4nM、低于 3nM 或低于 2nM 的 KD 值结合 RANKL; 且
- 30 所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域以大于 10nM 的 KD 值与 NGF 结合;
- ii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域以小于 0.13nM 的 EC50 结合人 RANKL, 且
- 所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域以大于 3nM 的 EC50 结合人 NGF;
- 或
- 35 iii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域以小于 0.5nM 的 IC50 阻断 RANKL 与 RANK 的结合; 且

所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域以大于 4nM 的 IC₅₀ 阻断 NGF 与 TrKA 的结合。

本披露提供一种双价的特异性结合 RANKL 和双价的特异性结合 NGF 的抗原结合分子，其具有 DVD-IgG 结构。

- 5 在一些实施方案中，所述抗原结合包含式 (I) 所示结构的第一链和式 (II) 所示结构的第二链，

(I) [RANKL-VH]-连接子 1-[NGF-VH]-CH1-Fc 的一个亚基；

(II) [RANKL-VL]-连接子 2-[NGF-VL]-CL；其中，连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子。

- 10 在一些实施方案中，所述抗原结合包含式 (I) 所示结构的第一链和式 (II) 所示结构的第二链，

(I) [NGF-VH]-连接子 1-[RANKL-VH]-CH1-Fc 的一个亚基；

(II) [NGF-VL]-连接子 2-[RANKL-VL]-CL，其中，连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子。

- 15 在一些实施方案中，所述抗原结合分子包含式 (I) 所示结构的第一链和式 (II) 所示结构的第二链，

(I) VHa-连接子 1-VHb-CH1-Fc 的一个亚基；

(II) VLb-连接子 2-VLb-CL；

其中，连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子，且

- 20 VHa 包含 SEQ ID NO: 36、37 或 38 的序列，VLb 包含的序列 SEQ ID NO: 40 的序列；且

VHb 包含 SEQ ID NO: 64 的序列，VLb 包含 SEQ ID NO: 65 的序列。

在一些实施方案中，所述抗原结合分子包含：

第一链，其包含 SEQ ID NO: 98、100 或 101 的序列；和

- 25 第二链，其包含 SEQ ID NO: 99 的序列。

在一些实施方案中，所述抗原结合分子包含两条序列相同的第一链和两条序列相同的第二链。

抗原结合分子或抗 RANKL 抗体的变体

- 30 在某些实施方案中，涵盖本文中提供的抗原结合分子的氨基酸序列变体。例如，可以期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将合适的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中，或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗原结合分子的氨基酸序列内的残基的删除、和/或插入、和/或取代。可以进行删除、插入、和取代的任何组合以得到最终的构建体，只要最终的构建体拥有期望的特征，例如抗原结合特性

- 35 包含取代、插入、和删除的变体

在某些实施方案中，提供了具有一处或多处氨基酸取代的抗原结合分子的变

体。感兴趣的位点包括 CDR 和 FR。保守取代在表 2 中在“优选的取代”的标题下显示。更实质的变化在表 2 中在“示例性取代”的标题下提供，并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸取代引入感兴趣的抗体中，并且对产物筛选期望的活性，例如保留/改善的抗原结合，降低的免疫原性，或改善的 ADCC 或 CDC。

表 2. 氨基酸的取代

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

依照常见的侧链特性，氨基酸可以如下分组：

- 10
- (1) 疏水性的：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile;

(2) 中性，亲水性的：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln;

(3) 酸性的：Asp，Glu;

(4) 碱性的：His，Lys，Arg;

(5) 影响链取向的残基：Gly，Pro;

(6) 芳香族的：Trp，Tyr，Phe。

15

非保守取代需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的成员。

一类取代变体涉及取代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个 CDR 残基。一般地，经选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性（例如升高的亲和力，降低的免疫原性）的改变（例如改善），和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。一种例示性的取代变体是亲和力成熟的

抗体,可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(如本文所述的那些技术),便利地产生所述抗体。简言之,将一个或多个 CDR 残基突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并对其筛选特定的生物学活性(例如结合亲和力)。可以对 CDR 做出改变(例如取代),例如以改善抗体亲和力。可以对 CDR“热点”,即在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基,和/或接触抗原的残基做出此类改变,同时对所得的变体 VH 或 VL 测试结合亲和力。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错 PCR、链改组、或寡核苷酸指导的诱变)的任一种,将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。然后,创建次级文库。然后,筛选文库以鉴定具有期望的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及 CDR 定向的方法,其中将几个 CDR 残基(例如一次 4-6 个残基)随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来鉴定涉及抗原结合的 CDR 残基。特别地,经常靶向 HCDR3 和 LCDR3。

在某些实施方案中,取代、插入或缺失可以在一个或多个 CDR 内发生,只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以对 CDR 做出保守变化(例如保守取代,如本文中提供的),其不实质性降低结合亲和力。此类变化可以例如在 CDR 中的抗原接触残基外部。在上文提供的变体 VH 和 VL 序列的某些实施方案中,每个 CDR 是未改变的,或者含有不超过 1、2 或 3 处氨基酸取代。

一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”。在这种方法中,鉴定一个残基或靶残基组(例如带电荷的残基,诸如 Arg、Asp、His、Lys 和 Glu),并且用中性或带负电荷的氨基酸(例如,Ala 或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的取代。此外,可通过研究抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原间的接触点。这些接触残基及邻近残基可以作为取代候选物被打靶或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性氨基酸序列插入包括长度范围为 1 个残基至含有 100 或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基端融合,和单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的 N 或 C 端与酶或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

Fc 区的改造

在一个方面,本披露的抗原结合分子的 Fc 区包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代减少其与 Fc 受体的结合,例如其与 Fc γ 受体的结合,并且降低或消除效应子功能。天然 IgG Fc 区,具体地是 IgG₁ Fc 区或 IgG₄ Fc 区,可能导致本披露的抗原结合分子靶向表达 Fc 受体的细胞,而不是表达抗原的细胞。本披露改造的 Fc 区表现出降低的对 Fc 受体的结合亲和力和/或降低的效应子功能。在一些实施方案中,改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比,对 Fc 受体的结合亲和力下降 50%、80%、90%或 95%以上。在一些实施方案中,所述的 Fc 受体是 Fc γ 受体。

在一些实施方案中，所述 Fc 受体是人 Fcγ 受体，例如 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIB、FcγRIIIa。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对补体，如 C1q 的结合亲和力也降低。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对新生儿 Fc 受体（FcRn）的结合亲和力不降低。在一些实施方案中，改造的 Fc 区具有降低的效应子功能，所述降低的效应子功能可以包括但不限于以下中的一个或多个：降低的补体依赖性细胞毒性（CDC）、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、降低的抗体依赖性细胞吞噬（ADCP）、减少的细胞因子分泌、减少的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、减少的与 NK 细胞的结合、减少的与巨噬细胞的结合、减少的与单核细胞的结合、减少的与多形核细胞的结合、减少的直接信号传导诱导性细胞凋亡、降低的树突细胞成熟或减少的 T 细胞引发。对于 IgG₁ Fc 区，在 238、265、269、270、297、327 和 329 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。在一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG₁ Fc 区，并且在 234 和 235 位置的氨基酸残基为 A，编号依据为 EU 索引。对于 IgG₄ Fc 区，在 228 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。

抗原结合分子可包含与 Fc 区的两个亚基融合的不同抗原结合域，因此可能导致不期望的同源二聚化。为了提高产率和纯度，因此在本发明的抗原结合分子的 Fc 区中引入促进异源二聚化的修饰将是有利的。在一些实施方案中，本披露的 Fc 区包含根据杵臼（knob-into-hole, KIH）技术的改造，该方法涉及在第一亚基的界面处引入凸起结构（knob）以及在第二亚基的界面处引入孔结构（hole）。使得所述凸起结构可以定位在孔结构中，促进异源二聚体的形成并抑制同源二聚体的产生。凸起结构是通过用较大侧链（例如酪氨酸或色氨酸）取代来自第一亚基的界面的小氨基酸侧链而构建的。而孔结构是通过用较小的氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）取代大氨基酸侧链而在第二亚基的界面中创建的。凸起结构和孔结构通过改变编码多肽的核酸来制备，可选的氨基酸取代如下表所示：

表 3. KIH 突变组合

第一亚基	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A
第二亚基	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L358A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S

除了杵臼技术外，用于修饰多特异性抗体的重链的 CH3 结构域以实现异源二聚化的其他技术也是本领域中已知的，例如 WO96/27011、WO98/050431、EP1870459、WO2007/110205、WO 007/147901、WO2009/089004、WO2010/129304、WO2011/90754、WO2011/143545、WO2012/058768、WO2013/157954 和 WO 013/096291。

Fc 区的 C 末端可以是以氨基酸残基 PGK 结束的完整 C 末端；也可以是缩短的 C 末端，例如在所述缩短的 C 末端中已经去除了一个或两个 C 末端氨基酸残基。

在一个优选的方面中，重链的 C 末端是以 PG 结束的缩短的 C 末端。因此，在一些实施方案中，完整抗体的组合物可以包括去除了所有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方案中，完整抗体的组合物可以包括没有去除 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方案中，完整抗体的组合物具有带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物的抗体群体。

重组方法

抗体可以使用重组方法来产生。对于这些方法，提供编码抗体的一个或更多个分离的核酸。

在天然抗体、天然抗体片段或具有同源二聚体重链的双特异性抗体的情况下，需要两个核酸，一个用于轻链或其片段，一个用于重链或其片段。此类核酸编码包含抗体 VL 的氨基酸序列和/或包含抗体 VH 的氨基酸序列（例如抗体的轻链和/或重链）。这些核酸可以在相同的表达载体上或在不同的表达载体上。

在具有异二聚体重链的双特异性抗体的情况下，需要四个核酸，一个用于第一轻链，一个用于包含第一异源单体 Fc 区多肽的第一重链，一个用于第二轻链，并且一个用于包含第二异源单体 Fc 区多肽的第二重链。这四个核酸可包含在一个或更多个核酸分子或表达载体中，通常这些核酸位于两个或三个表达载体上，即一个载体可包含这些核酸中的多于一个。

在一个实施方案中，本披露提供了编码如前所述的抗体的分离的核酸。此类核酸可以给自独立的编码前述的任一多肽链。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的一种或多种载体（例如表达载体）。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个实施方案中，提供制备抗原结合分子，抗 RANKL 抗体的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收所述抗体。

为了重组产生抗原结合分子或抗 RANKL 抗体，将编码蛋白的核酸分离并插入一个或更多个载体中，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序（例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针），或者通过重组方法产生或通过化学合成获得。

用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别是当抗体不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。在表达后，抗体可以在可溶级分中从细菌细胞糊状物分离，并且可进一步纯化。

除了原核生物以外，真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是用于编码抗体的载体的合适的克隆或表达宿主，包括真菌和酵母菌株，其糖基化通路已经“人源化”，导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。适于表达（糖基化）抗体的合适的宿主细胞也可源自多细胞生物体（无脊椎动物和脊椎动物）；无脊椎动物细胞

的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株，其可与昆虫细胞联合使用，特别是用于草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞的转染；还可利用植物细胞培养物作为宿主，例如 US5959177、US 6040498、US6420548、US 7125978 和 US6417429；也可将脊椎动物细胞用作宿主，例如适应于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系。适宜的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是经 SV40 转化的猴肾 CVI 系（COS-7）；人胚肾系（293 或 293T 细胞）；幼仓鼠肾细胞（BHK）；小鼠塞托利（sertoli）细胞（TM4 细胞）；猴肾细胞（CV1）；非洲绿猴肾细胞（VERO-76）；人宫颈癌细胞（HELA）；犬肾细胞（MDCK）；水牛鼠（buffalo rat）肝细胞（BRL3A）；人肺细胞（W138）；人肝细胞（Hep G2）；小鼠乳房肿瘤（MMT 060562）；TRI 细胞；MRC 5 细胞；和 FS4 细胞。其它适宜的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，包括 DHFR-CHO 细胞；以及骨髓瘤细胞系，如 Y0、NS0 和 Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如 Yazaki, P. 和 Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol.248, Lo, B.K.C.（编），Humana Press, Totowa, NJ（2004），第 255-268 页。

15 测定

本文提供的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体可以通过本领域已知的多种测定法对其物理/化学特征和/或生物学活性进行鉴定、筛选或表征。

在一个方面中，例如通过已知方法如 ELISA、蛋白印迹法等，测试本披露的抗体的抗原结合活性。

20 在另一个方面，竞争测定法可用于鉴定与 RANKL 竞争结合的抗体。在某些实施方案中，所述竞争性抗体与抗原结合分子或抗 RANKL 抗体结合相同的表位（例如线性或构象表位）在示例性的竞争测定中，在溶液中温育固定化的 RANKL，该溶液包含结合 RANKL 的第一标记抗体和第二未标记抗体，该第二未标记抗体被检测其与第一标记抗体竞争结合 RANKL 的能力。第二未标记抗体可以存在于杂交瘤上清中。作为对照，将固定的 RANKL 在包含第一标记抗体而不包含第二未标记的抗体的溶液中温育，去除过量的未结合的抗体，并且测量与固定的 RANKL 结合的标记量。如果相对于对照样品，在测试样品中，与固定的 RANKL 结合的标记量实质性减少，则指示第二抗体与第一抗体竞争对 RANKL 的结合。

25 在一个方面中，提供了用于鉴定具有生物学活性的抗 RANKL 抗体的测定法。详见本披露的测试例。

30 免疫缀合物

本披露还提供免疫缀合物，其包含与一种或多种细胞毒性剂缀合的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体，所述一种或多种细胞毒性剂为诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物来源的蛋白质毒素、酶活性毒素，或它们的片段）、或放射性同位素。

35 诊断与治疗组合物

在某些实施方案中，本披露提供的抗原结合分子可用于检测生物学样品中 RANKL 或 NGF 的存在，以及本披露提供的抗 RANKL 抗体可用于检测生物学样品中 RANKL 的存在。在用于本文时，术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中，生物学样品包含细胞或组织，诸如肿瘤组织。

5 在一个实施方案中，提供了在诊断或检测方法中使用的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体。在又一方面，提供了检测生物学样品中 RANKL 或 NGF 的存在的方法。在某些实施方案中，该方法包括在适宜条件下使生物学样品与抗原结合分子或抗 RANKL 抗体接触，并检测是否在检测试剂与抗原之间形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，使用抗原结合分子或抗 RANKL
10 抗体来选择适合治疗的受试者，例如 RANKL 或 NGF 是用于选择患者的生物标志物。

可使用本披露的抗体来诊断的示例性病症，例如与 RANKL 表达有关的 B 细胞障碍、浆细胞障碍、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、巨球蛋白血症、淀粉样变性、华氏巨球蛋白血症、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、骨硬化性
15 骨髓瘤、重链病、意义不明的单克隆丙种球蛋白病以及郁积型多发性骨髓瘤；自身免疫性疾病、全身性红斑狼疮。

在某些实施方案中，提供了经标记的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体。标记物包括但不限于直接检测的标记物或模块（诸如荧光、发色、电子致密、化学发光、和放射性标记物），和间接检测的模块（例如，经由酶反应或分子相互作用
20 间接检测的模块，诸如酶或配体）。

在另外的方面，提供包含所述抗原结合分子或抗 RANKL 抗体的药物组合物，例如，用于以下任何治疗方法。在一个方面，药物组合物包含本文提供的任何抗体和药学上可接受的载体。在另一个方面，药物组合物包含本文提供的任何抗体和至少一种另外的治疗剂。

25 本披露所述的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体的药物组合物通过以下制备：将抗体与一种或更多种任选的药学上可接受的载体混合，所述药物组合物为冻干组合物或水溶液的形式。用于体内施用的配制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现，例如通过穿过无菌滤膜过滤。

治疗方法与施用途径

30 本文提供的任何抗原结合分子或抗 RANKL 抗体可用于治疗方法。

在一个此类实施方案中，所述用治疗方法进一步包括向受试者施用有效量的至少一种另外的治疗剂（例如一种、两种、三种、四种、五种或六种另外的治疗剂）。根据任意以上实施方案的“受试者”可以是人。

在又一个方面，本披露提供抗原结合分子或抗 RANKL 抗体在药物的制造或
35 制备中的用途。在一个实施方案中，所述药物用于治疗 RANKL 相关疾病，例如例如与 RANKL 表达有关的关节僵硬或骨损失。并且所述药物是对上述疾病的

有效量的形式存在的。在一些实施方案中，所述有效量是单位日剂量或单位周剂量。

在又一个的方面，提供包含所述抗原结合分子或抗 RANKL 抗体的药物组合物，例如，其用于以上任何制药用途或治疗方法。在一个实施方案中，药物组合物包含本文提供的任何抗 RANKL 抗体和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中，药物组合物还包含至少一种另外的治疗剂。

本披露的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体可单独使用或与其他试剂联合用于治疗。例如，本披露的抗体可与至少一种另外的治疗剂共同施用。

本披露的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体（和任何另外的治疗剂）可通过任何合适的手段施用，包括肠胃外、肺内和鼻内，并且如果需要局部治疗，则病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何适当的途径，例如，通过注射，诸如静脉内或皮下注射，这部分取决于施用是短期的还是长期的。本文考虑多种给药时间方案，包括但不限于，单次或在多个时间点多次施用，推注施用和脉冲输注。

本披露的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体将以符合法规或行业标准的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体的临床状况、病症的起因、试剂的递送部位、施用方法、施用时间安排以及医学从业者已知的其他因素。抗原结合分子或抗 RANKL 抗体无需（但任选地）与目前用于预防或治疗所述病症的一种或更多种试剂一起配制。此类其它试剂的有效量取决于药物组合物中存在的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体的量、病症或治疗的类型以及上文讨论的其它因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用路径使用，或以本文所述剂量的约 1 至 99% 使用，或以任何剂量使用，并通过经验/临床确定为合适的任何途径使用。

为了预防或治疗疾病，本披露的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体（当单独使用或与一种或更多种其他另外的治疗剂组合使用时）的适当的剂量将取决于待治疗的疾病的类型，治疗分子的类型，疾病的严重性和病程，是为预防还是治疗目的施用，之前的治疗，患者的临床病史和对治疗分子的响应，和主治医师的判断。治疗分子恰当地以一次或经过一系列治疗施用于患者。取决于疾病的类型和严重性，约 1 μ g/kg 至 15mg/kg 的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体可以是用于施用至患者的初始候选剂量，不管例如是通过一次或更多次分开的施用还是通过连续输注。一种典型的每日剂量可能在约 1 μ g/kg 至 100mg/kg 或更多的范围内，这取决于上文提及的因素。相应的，以 50kg 体重为例，示例性的单位日剂量为 50 μ g -5g。

制品

在本披露的另一方面中，提供一种制品，所述制品包含可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料。该制品包含容器和在容器上或与容器联合的标签或包装插页（package insert）。合适的容器包括，例如，瓶子、管形瓶、注射器、IV 溶

液袋等。容器可以自各种材料（诸如玻璃或塑料）形成。

容器装有单独的组合物，或与另一种组合物组合，以有效治疗，预防和/或诊断疾患；并且容器可具有无菌的存取口（例如，容器可以是静脉内溶液袋或管形瓶，其具有由皮下注射针可刺穿的塞子）。组合物中的至少一种活性试剂是本披露的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体。标签或包装插页指示使用该组合物是来治疗选择的病况。

此外，制品可以包含：

- (a) 装有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本披露的抗原结合分子或抗 RANKL 抗体；和
- (b) 装有组合物的第二容器，其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他方面的治疗剂。

备选地，或另外地，制品可进一步包含第二（或第三）容器，所述第二（或第三）容器，其包含药学上可接受的缓冲液。从商业和用户立场，它可进一步包括所需的其他材料，包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

作为一个示例，制品是包含本披露抗原结合分子或抗 RANKL 抗体的药盒或试剂盒。

实施例与测试例

以下结合实施例和测试例进一步描述本披露，但这些实施例和测试例并非限制着本披露的范围。本披露实施例和测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1：抗 RANKL 抗体的制备

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

表 4. 抗体的 CDR 区序列

1-22H	HCDR1	DYAMS SEQ ID NO: 1	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GISASGSSTYYADSVKG SEQ ID NO: 2	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
5-16H	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5

	HCDR3	DPASIVIMSWFDP SEQ ID NO: 9	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
5-51H	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPCFSYIMSWFDP SEQ ID NO: 10	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
5-53H	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPCFTYIMSWFDP SEQ ID NO: 11	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
5-58H	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGFTYIMSWFDP SEQ ID NO: 12	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
D35H	HCDR1	AYPMS SEQ ID NO: 13	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
D75H	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGTTSIMSWFDP SEQ ID NO: 14	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
D80H	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGSTIIMSWFDP SEQ ID NO: 15	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
2-52L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	QGSSRAT SEQ ID NO: 16
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6

2-72L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSLGARGLA SEQ ID NO: 17
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GTSSRAT SEQ ID NO: 18
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
2-76L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQAIPYNQLA SEQ ID NO: 19
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GVSSRAT SEQ ID NO: 20
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
2-79L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GSSSRAT SEQ ID NO: 21
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
2-87L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQYLPFHRLA SEQ ID NO: 22
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	DTSSRAT SEQ ID NO: 23
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
3-20L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQAIRGPNLA SEQ ID NO: 24
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	DTSSRAT SEQ ID NO: 25
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
3-37L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQAIRGRKLA SEQ ID NO: 26
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	DTSSRAT SEQ ID NO: 27
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
3-83L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQALGVRGLA SEQ ID NO: 28
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
3-85L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSIPGPRLA SEQ ID NO: 29

	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRT SEQ ID NO: 6
4-64L	HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASQSVRGRYLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	GITGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 8	LCDR2	GASSRAT SEQ ID NO: 5
	HCDR3	DPGTTVIMSWFDP SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYGSSPRI SEQ ID NO: 30

表 5. RANKL 抗体可变区序列

抗体名称	重链可变区序列	轻链可变区序列
1-22H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFADYAMSWVRQAPGKGLEWVS <u>GISASGSSTYYADSVKGRFTISRDN</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD <u>PGTTVIMSWFDPWGQGTLVTVSS</u> SEQ ID NO: 31	EIVLTQSPGTLSPGERATL <u>SCRASQSVRGRYLA</u> WYQQ KPGQAPRLLIY <u>GASSRATGI</u> PDRFSGSGSGTDFTLISRLE PEDFAVFYC <u>QQYGSSPRTFG</u> QGTKVEIK SEQ ID NO: 40
5-16H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS <u>GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD <u>PASIVIMSWFDPWGQGTLVTVSS</u> SEQ ID NO: 32	
5-51H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS <u>GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD <u>PCFSYIMSWFDPWGQGTLVTVSS</u> SEQ ID NO: 33	
5-53H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS <u>GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQD <u>PCFTYIMSWFDPWGQGTLVTVSS</u> SEQ ID NO: 34	
5-58H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS <u>GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVQD <u>PGFTYIMSWFDPWGQGTLVTVSS</u> SEQ ID NO: 35	

D35H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFS <u>A</u> YPM <u>S</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>G</u> ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>D</u> <u>P</u> GTTVIMSWFDPWGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 36	
D75H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAM <u>S</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>G</u> ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVK <u>D</u> <u>P</u> GTT <u>S</u> IMSWFDPWGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 37	
D80H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAM <u>S</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>G</u> ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVK <u>D</u> <u>P</u> GSTIIMSWFDPWGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 38	
2-52L		EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQSVRGRYLAWYQQ KPGQAPRLLIY <u>Q</u> GSSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVFYC <u>Q</u> QYGSSPRTF GQGTKVEIK SEQ ID NO: 41
2-72L	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAM <u>S</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>G</u> ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>D</u> <u>P</u> GTTVIMSWFDPWGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 39	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQSLGARGLAWYQQ KPGQAPRLLIY <u>G</u> TSSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVFYC <u>Q</u> QYGSSPRTF GQGTKVEIK SEQ ID NO: 42
2-76L		EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQAIPYNQLAWYQQK PGQAPRLLIY <u>G</u> VSSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVFYC <u>Q</u> QYGSSPRTFG QGTKVEIK SEQ ID NO: 43

2-79L	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCR <u>ASQSVRGRYLA</u> WYQQ KPGQAPRLLIYGSSSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVFYCCQQYGSSPRTF GQGTKVEIK SEQ ID NO: 44
2-87L	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCR <u>ASQYLPFHRLA</u> WYQQK PGQAPRLLIYDTSSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVFYCCQQYGSSPRTFG QGTKVEIK SEQ ID NO: 45
3-20L	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCR <u>ASQAIRGPNLA</u> WYQQK PGQAPRLLIYDTSSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVFYCCQQYGSSPRTFG QGTKVEIK SEQ ID NO: 46
3-37L	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCR <u>ASQAIRGRKLA</u> WYQQK PGQAPRLLIYDTSSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVFYCCQQYGSSPRTFG QGTKVEIK SEQ ID NO: 47
3-83L	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCR <u>ASQALGVRGLA</u> WYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVFYCCQQYGSSPRTF GQGTKVEIK SEQ ID NO: 48
3-85L	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQSIPGPRLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVFYCCQQYGSSPRTFG QGTKVEIK SEQ ID NO: 49

4-64L	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQSVRGRYLAWYQQ KPGQAPRLLIY <u>GASSRATGI</u> PDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVFYCC <u>QY</u> GSSPRIFG QGTVKVEIK SEQ ID NO: 50
-------	---

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

人 IgG4 重链恒定区:

5 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSLGTITYTCNVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPCCF
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
10 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGRNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 51;

人 κ 轻链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
15 EC SEO ID NO: 52.

示例性的抗 RANKL 抗体的序列如下:

D35H 重链:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAPMSWVRQAPGKGLEWVS
GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGT
20 TVIMSWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDPKPSNTK
DKRVESEKYGGPPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
25 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK

SEQ ID NO: 53;

D35H 轻链:

30 EIVLTQSPGTL^{SL}SPGERATL^{SCR}ASQSV^RGRYLAWYQKPGQAPRL^{LI}YGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFY^CQOY^{GSS}PRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV^VCLLN^{NF}YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSK^DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 54.

D75H 重链:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGT
 TSIMSWFDPWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
 5 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV
 DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQ
 10 KSLSLSLGK SEQ ID NO: 55;

D75H 轻链:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
 SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYGSSPRTFGQGTKVEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 15 QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO: 54。

D80H 重链:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGS
 20 TIIMSWFDPWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD
 KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
 LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 25 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSL
 SLSLKG SEQ ID NO: 56;

D80H 轻链:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
 SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYGSSPRTFGQGTKVEIKR
 30 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO: 54。

对照抗 RANKL 抗体的序列如下:

Denosumab 重链序列:

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGT
 TVIMSWFDPWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP

EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHK
PSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
5 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 57;

Denosumab轻链序列:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYGSSPRTFGQGTKVEIKR
10 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 54。

实施例 2: 抗 RANKL/NGF 双特异性抗体的制备

15 本披露中双特异性抗体的结合 NGF 的第二抗原结合结构域可以来源于任意
适宜的抗体的抗原结合部分。特别适宜的抗体描述于例如国际申请
WO2004058184 (通过援引完整收入本文)。

示例性双特异性抗体的结合 NGF 结合域 CDR 和可变区序列如下所示:

表 6. NGF 结合域的 CDR

HCDR1	GYDLN (SEQ ID NO: 58)	LCDR1	RASQISNNLN (SEQ ID NO: 61)
HCDR2	IIWGDGTTDYNSAVKS (SEQ ID NO: 59)	LCDR2	YTSRFHS (SEQ ID NO: 62)
HCDR3	GGYWYATSYFYDY (SEQ ID NO: 60)	LCDR3	QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 63)

20

NGF 结合域重链可变区:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW
GDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATS
YYFDYWGQGTLVTVSS
25 SEQ ID NO: 64;

NGF 结合域轻链可变区:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS
RFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIK
30 SEQ ID NO: 65。

将 NGF 结合域的可变区分别与 SEQ ID NO: 51 或 SEQ ID NO: 66 的重链恒
定区和 SEQ ID NO: 52 的轻链恒定区融合, 获得的抗 NGF 抗体。其序列如下:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC

PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS

5 LSPGK SEQ ID NO: 66;

抗 NGF 抗体 (N-mAb) 重链:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW
GDGTTDYN~~SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATS~~
YYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
10 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLGKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVES~~
KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

15 SEQ ID NO: 67;

抗 NGF 抗体 (N-mAb) 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ~~SISNNLN~~WYQQKPGKAPKLLIYYTS
RFHSGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLQPED~~IATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR~~
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
20 QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 68;

对照抗 NGF 抗体的序列:

Tanezumab 重链:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW
25 GDGTTDYN~~SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATS~~
YYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV~~DHKPSNTKVDKTV~~
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
30 TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 69;

>Tanezumab 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ~~SISNNLN~~WYQQKPGKAPKLLIYYTS
35 RFHSGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLQPED~~IATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR~~
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 68。

针对骨转移适应症, 目前靶向 NGF 和 RANKL 单克隆抗体的临床给药剂量相

差悬殊。因此，在制备针对 NGF 和 RANKL 的双特异性抗体时，需要平衡双特异性抗体的 NGF 臂和 RANKL 臂的活性，以便确定合适的双特异性抗体的给药剂量，避免因给药剂量过高引起的副作用，或因给药剂量太低，不能发挥双特异性抗体的功能。

- 5 本披露制备了多种结构不同的双特异性抗体，示例性的构建了具有 DVD-IgG 结构的双特异性抗体。将抗 RANKL 抗体和抗 NGF 抗体的 2 个不同轻链可变结构域 (VL) 直接地，或通过重组 DNA 技术经由短连接子串联连接，随后为轻链恒定结构域。类似地，重链包含串联连接的 2 个不同重链可变结构域 (VH)，随后为恒定结构域 CH1 和 Fc 区。其中连接子包括但不限于如下肽连接子：ASTKGP
 10 (SEQ ID NO: 70)、TVAAPS (SEQ ID NO: 71)、ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 72)、TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 73)、AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 74)、AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 75)、AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 76)、SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 77)、SAKTTP (SEQ ID NO: 78)、RADAAP (SEQ ID NO: 79)、RADAAPTVS (SEQ ID NO: 80)、RADAAAAGGPGS (SEQ
 15 ID NO: 81)、SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 82)、ADAAP (SEQ ID NO: 83)、ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 84)、TVAAP (SEQ ID NO: 85)、TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 86)、QPKAAP (SEQ ID NO: 87)、QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 88)、AKTTPP (SEQ ID NO: 89)、AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 90)、AKTTAP (SEQ ID NO: 91)、AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 92)、ASTKGPSVFPLAP
 20 (SEQ ID NO: 93)、GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 94)、GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 95)、GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 96) 和 GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 97)。

示例性的双特异性抗体的序列如下：

>双特异性抗体 1 的第一链

- 25 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG
ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGTTSI
MSWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPOVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIG
YDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLSSVT
AADTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
 30 SESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
 DTL MISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
 35 TVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 98;

>双特异性抗体 1 的第二链

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
 SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCOQYGGSPRTFGQGTKVEIKT
 VAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT
 SRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLOPEDIAITYYCQOEHTLPYTFGQGTKLEIK
 5 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO: 99。

双特异性抗体 2 的第一链:

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYPMSWVRQAPGKGLEWVS
 GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGT
 TVIMSWFDPWGQGT LTVSSASTKGPPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFS
 LIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLS
 SVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCS
 15 RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTP E VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 20 YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 100;

双特异性抗体 2 的第二链:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
 SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCOQYGGSPRTFGQGTKVEIKT
 25 VAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT
 SRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLOPEDIAITYYCQOEHTLPYTFGQGTKLEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO: 99。

双特异性抗体 3 的第一链

30 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 GITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGS
 TIIMSWFDPWGQGT LTVSSASTKGPPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSL
 IGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLS
 35 VTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSR
 STSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 PSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTP E VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 40 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY

SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 101;

双特异性抗体 2 的第二链:

5 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSSVRGRYLAWYQOKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIKT
VAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISNNLNWYQOKPGKAPKLLIYYT
SRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 99;

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

测试例

15 测试例 1. 抗 RANKL 抗体亲和力测试

用生物传感芯片 Protein A（GE，29127556）亲和捕获一定量的待测抗体，然后于芯片表面流经一系列浓度梯度的抗原：人 RANKL 蛋白（Sino Biological，11682-HNCH），人 NGF 蛋白（Sino biological，11050-HNAC），利用 Biacore 实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后，用 pH 1.5 的甘氨酸-盐酸再生溶液（GE，BR-1003-54）将生物芯片洗净再生。实验数据用 BIAevaluation version 4.1 软件以 1: 1 模型进行拟合，从而得出亲和力数值。结果如下表 7 所示。

表 7. 抗 RANKL 抗体的亲和力 KD 值

抗体	对人 RANKL 的亲和力			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	亲和力比值 (相对于 Denosumab 亲和力和 提高的倍数)
1-22H	2.58E+04	2.53E-04	9.81E-09	0.94
5-16H	2.92E+04	2.60E-04	8.91E-09	1.04
5-51H	2.92E+04	6.90E-04	2.36E-08	0.39
5-53H	1.72E+04	5.83E-04	3.40E-08	0.27
5-58H	1.22E+04	5.01E-04	4.10E-08	0.23
D35H	2.71E+04	7.61E-05	2.81E-09	3.29
D75H	5.24E+04	7.73E-05	1.48E-09	6.24
D80H	1.97E+04	7.40E-05	3.76E-09	2.46
2-52L	1.57E+04	2.22E-04	1.42E-08	0.65
2-72L	1.62E+04	3.08E-04	1.90E-08	0.49
2-76L	1.68E+04	3.41E-04	2.03E-08	0.46
2-79L	1.42E+04	2.32E-04	1.63E-08	0.57
2-87L	1.07E+04	2.73E-04	2.56E-08	0.36

3-20L	2.01E+04	2.72E-04	1.35E-08	0.68
3-37L	1.55E+04	3.05E-04	1.97E-08	0.47
3-83L	1.56E+04	3.22E-04	2.07E-08	0.45
3-85L	1.50E+04	3.35E-04	2.23E-08	0.41
4-64L	1.48E+04	2.53E-04	1.71E-08	0.54
Denosumab	1.90E+04	1.75E-04	9.24E-09	1.00

结果显示,改造后的抗体 D75H 的亲合力比 Denosumab 抗体提高了 6 倍以上, D35H、D80H 抗体的亲合力也明显优于 Denosumab 抗体。其余抗体与 RANKL 的亲合力并没有明显提高,甚至比 Denosumab 抗体还弱。

5

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

通过 ELISA 的方法检测抗体阻断配体和受体结合的活性。用 pH7.4 的 PBS (源培生物, B320) 缓冲液将人 RANK 蛋白稀释至 2 μg/mL, 以 100 μL/孔的体
积加入 96 孔酶标板 (Corning, 3590) 中, 4℃过夜孵育。弃去液体后, 每孔加入
10 200 μL 1% Casein 封闭液 (Thermo, 37528) 进行封闭, 37℃孵育 2 小时。封闭结
束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液 (pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20) 洗板 3 次
后备用。将固定浓度的生物素 (Biotin) 标记的人 RANKL 蛋白 (Sino Biological,
11682-HNCH) 与梯度稀释的抗体混合后 37℃预孵育 30 分钟后加入封闭好的酶标
板中, 37℃孵育 1.5 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 μL 链霉
15 亲和素-HRP (Invitrogen, 434323, 1: 4000 稀释), 37℃孵育 1 小时。去上清,
用 PBST 洗板 3 次后每孔加入 100 μL TMB 显色底物 (KPL, 5120-0077), 室温孵
育 10 至 15 分钟。每孔加入 50 μL 1M H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪读取在 450 nm
处的吸收值, 用软件拟合出抑制配体和受体结合的曲线, 计算出 IC₅₀ 值。结果见
下表 8。

20

表 8. 抗 RANKL 抗体阻断 RANKL 与 RANK 结合的能力

抗体名称	阻断 RANKL 与 RANK 结合 IC ₅₀ (nM)
5-53H	1.366
5-58H	0.9992
D35H	0.2891
D75H	0.2964
D80H	0.3659
Denosumab	0.5324

结果显示, 抗 RANKL 抗体 D35H、D75H 和 D80H 均可阻断 RANKL 与 RANK 结合, 其阻断活性优于 Denosumab 抗体。

25

测试例 3: ELISA 检测双特异性抗体与不同种属抗原的结合活性

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

5 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 (源培生物, B320) 将抗原稀释至 1 µg/mL, 以 100 µL/孔的体积加入 96 孔酶标板 (Corning, 9018) 中, 于 4℃过夜。弃去液体后, 加入用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶 (BD, 232100) 封闭液 300 µL/孔, 37℃孵育 2 小时进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液 (pH 7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次后, 每孔加入 100 µL 用样品稀释液 (pH 7.4 PBS 含 1% BSA) 稀释的不同浓度的双特异性抗体, 放于 37℃恒温箱孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 µL 用样品稀释液稀释的 HRP 标记的抗人 Fc 二抗 (Abcam, ab97225), 37℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100 µL TMB 显色底物 (KPL, 5120-0077), 于室温孵育 10 至 15 min, 每孔加入 50 µL 1M H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪在 450 nm 处读取吸收值, 计算双特异性抗体结合抗原的 EC₅₀ 值, 结果如下表 9 所示。

10

15

表 9. 双特异性抗体与不同种属抗原的结合 EC₅₀

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

结果显示, 双特异性抗体 1 对人 RANKL 和猴 RANKL 的结合活性都优于对照 Denosumab 抗体。但双特异性抗体 1 和 Denosumab 都不与鼠 RANKL 交叉结合。

20 双特异性抗体 1 对人 NGF 和鼠 NGF 的结合活性均明显的弱于 Tanezumab, 表明本披露的双特异性抗体 1 成功的降低了 Tanezumab 端 (特异性结合 NGF 的第二抗原结合域) 的结合活性。

测试例 4: 双特异性抗体亲和力测试

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

30 BIAevaluation version 4.1 软件以 1: 1 模型进行拟合, 从而得出亲和力数值。结果

如下表 10 所示。

表 10. 双特异性抗体与不同抗原的亲和力

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

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

5

测试例 5：配体和受体的阻断实验

通过 ELISA 的方法检测抗体对配体和受体的阻断活性。用 pH7.4 的 PBS（源
培生物，B320）缓冲液将受体蛋白（RANK 或 TrkA）稀释至 2 μg/mL，以 100 μL/
孔的体积加入 96 孔酶标板（Corning，3590）中，4℃过夜孵育。弃去液体后，每
10 孔加入 200 μL 1% Casein 封闭液（Thermo，37528）进行封闭，37℃孵育 2 小时。
封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20）洗
板 3 次后备用。将固定浓度的生物素（Biotin）标记的配体蛋白（RANKL 或 NGF）
与梯度稀释的抗体或融合蛋白混合后 37℃预孵育 30 分钟后加入封闭好的酶标板
中，37℃孵育 1.5 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μL
15 streptavidin-HRP（Invitrogen，434323，1：4000 稀释），37℃孵育 1 小时。去上
清，用 PBST 洗板 3 次后每孔加入 100 μL TMB 显色底物（KPL，5120-0077），室
温孵育 10 至 15 分钟，每孔加入 50 μL 1 M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪读取在 450
nm 处的吸收值，用软件拟合出抑制配体和受体结合的曲线，计算出 IC₅₀ 值。

实验中所用配体和受体蛋白信息如下：人 RANKL 蛋白（Sino Biological，
20 11682-HNCH），人 RANK 蛋白（Sino Biological，16078-H02H），人 TrkA 蛋白（Sino
Biological，11073-H03H），人 NGF 蛋白（Sino biological，11050-HNAC）。

实验结果如下表 11 所示。

表 11. 双特异性抗体的阻断活性

抗体	阻断 RANKL 和 RANK 结合	阻断 NGF 和 TrkA 结合
	IC50 (nM)	IC50 (nM)
双特异性抗体 1	0.3225	102.1
Denosumab	0.5585	/
Tanezumab	/	3.663

25 结果显示，双特异性抗体 1 对 RANKL 的阻断活性优于 Denosumab，对 NGF

的阻断活性显著的弱于 Tanezumab。这表明通过降低双特异性抗体 1 NGF 端的结合活性，也显著降低了其对 NGF 的阻断活性。

测试例 6：破骨细胞分化实验

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

 将 Raw264.7 细胞（ECACC，91062702）铺在 96 孔细胞培养板（Corning，3599）中，37℃培养箱中过夜培养。第二天，在 96 孔细胞板中加入固定浓度的人 RANKL 蛋白（Sino Biological，11682-HNCH）和梯度稀释的待测双特异性抗体，

10 37℃培养 4 天。将 96 孔板取出，除去上清液，每孔加入 100 μL 细胞裂解液（碧云天，P0013J），吹打混匀后将细胞裂解液转移至离心管中，冰上放置 10 分钟，离心取上清液。参考抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒（碧云天，P0332）中的方法，取 40μL 待测样本加 40μL 显色底物和 5μL 酒石酸，混合均匀，置于 37℃培养箱中孵育 10 min，加入 160μL 终止液，用酶标仪检测 OD 405nm 的数值，用软件

15 对数据进行拟合获得 IC50 值。实验结果如下表 12 所示。

表 12. 双特异性抗体抑制破骨细胞分化的活性

抗体	IC50（nM）
双特异性抗体 1	1.193
Denosumab	3.917

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

测试例 7：TF-1 细胞增殖实验

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

 用无 GM-CSF 的 1640 培养基（Gibco，22400-105）重悬 TF-1 细胞（ATCC，CRL-2003）并铺在 96 孔细胞培养板（Corning，3903）中，37℃培养箱中过夜培养。第二天在 96 孔细胞板中加入固定浓度的人 NGF 蛋白（Sino biological，11050-HNAC）和梯度稀释的待测抗体，37℃培养箱中培养 72 小时。取出细胞培养板，每孔加入 50μL Cell-titer Glo（Promega，G755B）溶液，轻轻晃动混匀 10 分钟，室温静置 10 分钟，用 PE Victor 3 检测生物发光信号。用软件对数据进行拟合获得 IC50 值。实验结果如下表 13 所示。

表 13. 双特异性抗体抑制 TF-1 细胞增殖的活性

抗体	IC50（nM）
双特异性抗体 1	3.159
Tanezumab	0.7589

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

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

10

测试例 8：骨转移动物模型体内药效

用骨转移动物模型来评价抗体的止痛和骨保护效果。

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

用 1%巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠后备皮，把小鼠放在加热垫上，用眼科剪在左后肢膝盖外侧皮肤上平行于股骨方向切开 1 厘米，暴露出肌肉，钝性分离皮肤和肌层。用眼科剪刀以结缔组织线为导向，在股直肌和股内侧肌之间切开，用弯镊将股直肌和髌骨移至膝关节内侧，暴露股骨髌且不要切断髌骨韧带。用直径 0.45 mm 的针头在踝窝处股骨顶部至中部开孔，进入髓内间隙 1 至 1.5 cm 打开注射通道。用 Hamilton 微量注射器（50 μ L，型号 Model 1705 RN SYR，26 号针头，型号 ga26/51 mm/pst3，货号 7768-02）从开孔处插入骨髓腔并缓慢注射 10 μ L（5×10⁴）LLC1 细胞（ATCC，CRL-1642）。推注完成后拔出注射器针头，将腿拉直并用弯镊将髌骨与韧带复位，将肌肉恢复原状，洒上抗生素粉末，再用自动伤口夹（Roboz，Reflex 7 Clip 7 mm）缝合外皮。术后动物尽量不多于三只一笼饲养，七天后取下伤口夹。假手术组（Sham）操作同上，于骨髓腔注射相同体积的 PBS；空白组正常饲养不进行任何处理。造模 7 天后开始给药，每 5 天给药一次，总共给药 3 次，分别在第 14 天（或第 15 天）和第 21 天对小鼠的疼痛行为进行统计和腿骨损伤进行评分。

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

躲避疼痛的行为被定义为：

- （1）完整的保护（行走时抬起患肢，不落地负重）；
- （2）患肢五指蜷缩，会戳穿网格（正常鼠的四肢应为五指伸展，平摊在网格

上，用前脚掌发力支撑。肿瘤骨转移小鼠的患肢会五指蜷缩，如此时能用后脚跟着地支撑，则认为疼痛较轻，不计入测定时间，如全脚掌均不与网格接触或戳穿网格，则计入测定时间）；

(3) 舔舐患侧肢体;

5 (4) 零星的单脚跳跃;

(5) 单侧后肢的站立（两前肢抬起的情况下）。

骨损伤评分方法:

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

10 评分标准如下:

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

1. RANKL 拮抗剂和 NGF 拮抗剂对止痛和骨保护的效果测试

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

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

表 14. AMR2 抗体的 CDR

HCDR1	DYDMS (SEQ ID NO: 102)	LCDR1	TGSSSNIGNNAVS (SEQ ID NO: 105)
HCDR2	WIYPSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 103)	LCDR2	SDRHRPS (SEQ ID NO: 106)
HCDR3	SGLTRTRWPIYYADGMDV (SEQ ID NO: 104)	LCDR3	GSWDASLSGYV (SEQ ID NO: 107)

20 AMR2 重链可变区:

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVS
WIYPSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGLTR
TRWPIYYADGMDVWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 108;

AMR2 轻链可变区:

25 QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSD
RHRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGT
KLTVL SEO ID NO: 109;

AMR2 重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVS
30 WIYPSGGSIIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGLTR
TRWP IYYADGMDVWGOGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV

5

KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC
NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 110;
AMR2 轻链

10

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSD
RHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGT
KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSNKYYASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

SEQ ID NO: 111。

分组及给药量如下表 15 所示：

表 15. 分组及给药量

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

15

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

实验结果如下图 2A 至图 2D 所示。

小鼠的疼痛行为统计结果表明，在第 14 天，与阴性组相比，三个给药组都显示出了显著的止痛效果，其中联合给药组的止痛效果要强于单抗组。在第 21 天，只有联合给药组显示出了显著的止痛效果，两个单抗组虽然也表现出了一定的止痛效果，但跟阴性组相比没有显示出统计学差异 (vs vehicle: *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.0001)。

20

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

25

2. 双特异性抗体 NGF 端体内药效的评价

由于双特异性抗体 1 的 NGF 端的体外活性与 NGF 单抗 Tanezumab 相比，降低了 4 倍左右，因此，通过该药效实验确定双特异性抗体 1 的 NGF 端在小鼠体内

是否依然具有药效。实验分组如下表所示：

表 16. 给药剂量和分组

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

注：Q5d 表示每 5 天给药一次；i.p. 表示腹腔注射给药。

实验结果见图 3A 至图 3B 所示。

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

3. 双特异性抗体的体内药效评价

用人 RANKL 转基因鼠（购自百奥赛图）构建骨转移动物模型，以评价双特异性抗体的体内药效。实验分组如下表 17 所示：

表 17. 给药剂量和分组

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

注：Q5d 表示每 5 天给药一次；i.p. 表示腹腔注射给药。

实验结果见图 4A 至图 4D 所示。

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

测试例 9：大鼠 PK 测试

用 SD 大鼠进行体内药代动力学测试。雄性 SD 大鼠（浙江维通利华实验动物技术有限公司）分组，每组 4 只，静脉注射给药，双特异性抗体 1 的剂量为 4 mg/kg，
20 给药组于给药前及给药后 5 分钟、8 小时、24 小时、48 小时、84 小时、9 天、10 天、14 天、21 天、28 天采集全血 0.2 mL，不加抗凝。取血后在 4℃ 放置 30 分钟，1000 g 离心 15 分钟，取上层血清置于 EP 管中，于 -80℃ 保存。

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

表 18. 双特异性抗体 1 的 PK 结果

检测项	RANKL 臂	NGF 臂
t1/2 (天)	15.09	14.30

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

权利要求书

1. 一种抗原结合分子，其包含：
至少一个特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域，和
5 至少一个特异性结合 NGF 的第二抗原结合域；
所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，
其中：
i) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列；
HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO:
10 14 的氨基酸序列；和
所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；LCDR2，
其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列；或
ii) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列；
15 HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO:
15 的氨基酸序列；和
所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；LCDR2，
其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列；或
20 iii) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列；
HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO:
3 的氨基酸序列；和
所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；LCDR2，
其包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列。
25 酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：
所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 37、36 或 38 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；和
30 所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；
优选地，
所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 37、36 或 38 的氨基酸序列；和/或
35 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列；
更优选地，

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列；和/或
所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 3 所述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 NGF 的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 64 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 65 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；

优选地，

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列；和/或
所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗原结合分子，其包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够缔合的两个亚基；

所述 Fc 区优选为 IgG₄ Fc 区；

更优选地，所述 Fc 区是人 IgG₄ Fc 区，并且在 228 位置的氨基酸残基为 P，编号依据为 EU 索引。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗原结合分子，其包含式 (I) 所示结构的第一链和式 (II) 所示结构的第二链，

VHa-连接子 1-VHb-CH1-Fc 区的一个亚基

式 (I)；

VLa-连接子 2-VLb-CL

式 (II)；

其中：

VHa 与 VHb 为重链可变区，VLa 与 VLb 为轻链可变区；

VHa 与 VLa 形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域, VHb 与 VLb 形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域; 或

VHa 与 VLa 形成特异性结合 NGF 的第二抗原结合结构域, VHb 与 VLb 形成特异性结合 RANKL 的第一抗原结合结构域; 和

5 连接子 1 和连接子 2 为序列相同或不同的肽连接子;

优选地,

所述 VHa 包含 SEQ ID NO: 37、36 或 38 的氨基酸序列, 和所述 VLa 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列; 和/或

10 所述 VHb 包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列, 和所述 VLb 包含 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 6 所述的抗原结合分子, 其中所述连接子 1 或连接 2 包含选自 SEQ ID NO: 70-97 中任一所示的氨基酸序列;

优选地, 所述连接子 1 包含 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列, 和/或

15 所述连接子 2 包含 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的抗原结合分子, 其中所述 CH1-Fc 区包含 SEQ ID NO: 51 或 66 的氨基酸序列。

20 9. 根据权利要求 6 至 8 中任一项所述的抗原结合分子, 其包含:

第一链, 其包含与 SEQ ID NO: 98、100 或 101 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列; 和/或

第二链, 其包含与 SEQ ID NO: 99 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列; 优选地, 所述抗原结合分子包含:

25 第一链, 其包含 SEQ ID NO: 98、100 或 101 的氨基酸序列; 和

第二链, 其包含 SEQ ID NO: 99 的氨基酸序列; 更优选地, 所述抗原结合分子包含两条序列相同的第一链和两条序列相同的第二链。

30 10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗原结合分子, 其具有以下特性中的至少一种:

i) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域与 RANKL 的亲合力高于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域与 NGF 的亲合力;

ii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域结合人 RANKL 的 EC₅₀ 值小于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域结合人 NGF 的 EC₅₀ 值; 和

35 iii) 所述特异性结合 RANKL 的第一抗原结合域阻断 RANKL 与 RANK 的结合的 IC₅₀ 值小于特异性结合 NGF 的第二抗原结合域阻断 NGF 与 TrKA 结合的

IC50 值。

11. 一种抗 RANKL 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

i) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列；
5 HCDR2，其包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列；和

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

10 ii) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列；或
15

iii) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列。
20

12. 根据权利要求 11 所述的抗 RANKL 抗体，其中：

所述重链可变区包含与 SEQ ID NO：36、37 或 38 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；和/或
25

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO：40 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；

优选地，所述重链可变区包含 SEQ ID NO：36、37 或 38 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO：40 的氨基酸序列；

30 更优选地，所述重链可变区包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO：40 的氨基酸序列。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的抗 RANKL 抗体，其包含重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO：51 或 66 的氨基酸序列，
35 和/或所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO：52 的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 11 至 13 中任一项所述的抗 RANKL 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO: 53、55 或 56 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 54 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列；

优选地，

所述重链包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列，和/或所述轻链包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列，和/或所述轻链包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列，和/或所述轻链包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 11 至 13 中任一项所述的抗 RANKL 抗体，其中所述抗 RANKL 抗体是抗体片段；优选地，所述抗体片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv 和 dAb。

16. 根据权利要求 11 至 15 中任一项所述的抗 RANKL 抗体，其中：
所述抗体以低于 5nM 的 KD 值与人 RANKL 结合；和/或
所述抗体阻断 RANKL 与 RANK 结合的 IC₅₀ 值低于 0.5nM。

17. 一种双特异性抗体，其包含权利要求 11 至 16 中任一项所述的抗 RANKL 抗体。

18. 分离的核酸，其编码权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗原结合分子，或权利要求 11 至 16 中任一项所述的抗 RANKL 抗体，或权利要求 17 所述的双特异性抗体。

19. 载体，其包含权利要求 18 所述的分离的核酸。

20. 一种宿主细胞，其包含权利要求 19 所述的载体。

21. 一种制备抗原结合分子、抗 RANKL 抗体或双特异性抗体的方法，其包括在适于表达所述抗原结合分子或抗体的条件下培养权利要求 20 所述的宿主细胞。

22. 一种药物组合物，其含有：

治疗有效量的权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗原结合分子，或权利要求 11

至 16 中任一项所述的抗 RANKL 抗体，或权利要求 17 所述的双特异性抗体；以及

一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

- 5 23. 一种治疗或预防疾病的方法，所述方法包括给予受试者治疗有效量的权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗原结合分子，或权利要求 11 至 16 中任一项所述的抗 RANKL 抗体，或权利要求 17 所述的双特异性抗体，或权利要求 22 所述的药物组合物；

 优选地，所述的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失；

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

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

- 20 24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾癌、肺癌、食道癌、直肠癌、膀胱癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、胃肠道癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、非小细胞肺癌、骨肿瘤和何杰金氏病。

- 25 25. 一种治疗或预防与 NGF 或 RANKL 相关的疾病的方法，所述方法包括给予受试者预防有效量或治疗有效量的权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗原结合分子，或权利要求 11 至 16 中任一项所述的抗 RANKL 抗体，或权利要求 17 所述的双特异性抗体，或权利要求 22 所述的药物组合物；

 优选地，所述与 NGF 或 RANKL 相关的疾病为疼痛、关节僵硬或骨损失；

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

- 35 其中，所述骨损失与选自下组的至少一种状况相关：骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨质疏松、骨坏死、骨损伤、骨吸收、骨发

育不全、炎症、自身免疫疾病、肠炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、克罗恩病、牙周骨吸收、溶骨性转移和癌症。

26. 一种治疗疼痛或抑制骨损失的方法，所述方法包括对有需要的个体施用有效量的 NGF 拮抗剂和 RANKL 拮抗剂；所述 NGF 拮抗剂和所述 RANKL 拮抗剂同时或顺序施用；

优选地，所述的 NGF 拮抗剂为抗 NGF 抗体和/或所述 RANKL 拮抗剂为抗 RANKL 抗体。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中：
所述抗 NGF 抗体为他尼珠单抗（Tanezumab），和/或
所述抗 RANKL 抗体为迪诺苏单抗（Denosumab）。