

抗 EGFR 单抗、其双特异性抗体、药物组合物和用途

技术领域

本发明属于生物医药领域，涉及一种抗 EGFR 单抗、其双特异性抗体、药物组合物和用途。本发明还涉及一种抗 EGFR-抗 Met 双特异性抗体。

背景技术

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 是表皮生长因子 (EGF) 的受体，属于 ErbB 受体家族。EGFR 是一种分子量为 170KDa 的跨膜糖蛋白，属于受体型酪氨酸激酶，在相关配体如表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF) 和转化生长因子- α (transforming growth factor α , TGF α) 的作用下，EGFR 由单体转化为二聚体而被激活，从而进一步活化下游信号传导通路，例如 Akt、ERK 等激酶的磷酸化，调控细胞的增殖 (Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res* 2003; 284:31-53.)。大量研究表明，在大多数肿瘤如胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌等组织中存在 EGFR 的高表达或者异常表达 (Modjtahedi H, and Dean C. The receptor for EGF and its ligands Expression, prognostic value and target for therapy in cancer. *International Journal of Oncology* 1994; (4): 277-96.)。EGFR 功能的异常与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移以及细胞凋亡的抑制有关 (Castillo L, Etienne Grimaldi MC, Fischel JL, et al. Pharmacological background of EGFR targeting. *Ann Oncol* 2004; 15: 1007-12.)。其功能的异常主要表现为两个方面：一是在肿瘤组织中的过度异常表达，二是 EGFR 突变体在肿瘤细胞中的持续性激活 (不需要配体刺激或形成自循环刺激通路)。

c-间充质-上皮转换因子 (c-mesenchymal-epithelial transition factor, 简称为 c-Met、cMet 或 Met) 是受体酪氨酸激酶家族的成员之一。Met 受体与其配体——肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) 结合，可诱导 Met 二聚体化并造成其进入激活状态，进而激活下游信号通路，例如 Akt、ERK 等激酶的磷酸化。Met 在胚胎发育、器官生长和伤口愈合过程中承担重要的作用，通常仅会在干细胞和祖细胞中表达。在癌症中，因 Met 突变导致的 Met 异常激活会促进血管生成，并且促进癌症转移。

肺癌是发病率及死亡率最高的第一大癌种，其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 占肺癌患者的 90%。EGFR 突变是 NSCLC 的主要驱动因素，在亚洲 NSCLC 患者中达 40% 以上。EGFR 激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 是主要的治疗手段，然而患者用药后耐药比例高，机制复杂，其

中 7-15% 的患者发生 Met 扩增。此外，Met 的 14 号外显子跳跃突变、Met 融合、Met 扩增和过表达也是 NSCLC 原发驱动因素。靶向 EGFR 和 Met 的双抗可同时抑制两条信号通路，有望用于 EGFR-TKI 无效或耐药的患者。

目前，有多款 EGFR×Met 双特异性抗体公开报道。US9328173B2（礼来制药）、WO2018221969A1（钟根堂生物制药株式会社）、WO2022104236A2（Ab therapeutics）公开了“2+2”型 EGFR×Met 双特异性抗体的构造方法，即抗 EGFR 端和抗 Met 端均为双价形式。由于 EGFR 抗体有皮肤毒性，因此“2+2”型 EGFR×Met 双特异性抗体有潜在更高的安全性风险。强生公司的 Amivantamab（US2017275367A1）公开了“1+1”型 EGFR×Met 双特异性抗体的构造方法，即抗 EGFR 端和抗 Met 端均为单价形式。该抗体已获批上市，安全性良好。

“1+1”型 EGFR×Met 双特异性抗体的构造存在巨大的技术挑战，需要解决轻重链正确配对和重链异源二聚化的问题。如 US2017275367A1 报道，Amivantamab 采用了 Fab 臂交换（Fab arm exchange）技术，然而该方法需要分别制备抗 EGFR 抗体和抗 Met 抗体，然后通过体外重组的方法获得双特异性抗体，增加了生产成本。共同轻链技术是构造双特异性抗体的方法之一，由于不存在轻重链错配问题，因此极大方便了双特异性抗体的制备。

目前尚需要开发新的抗 EGFR 抗体以及抗 EGFR-抗 Met 双特异性抗体。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，得到了双特异性抗体，特别是抗 EGFR-抗 Met 双特异性抗体。本发明采用共同轻链技术构造 EGFR×Met 双特异性抗体，能抑制 EGF 和 HGF 诱导的 Akt、ERK 磷酸化；促进 EGFR 和 Met 的内吞；并通过 ADCC 效应杀伤肿瘤细胞。本发明的双特异性抗体具有良好的抗肿瘤活性。由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，所述抗 EGFR 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3，其中：

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 26 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示；并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示，LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示，LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 76 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，其中，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 至 SEQ ID NO: 36 中的任一序列所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗 EGFR 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 10 中的任一序列；并且

所述抗 EGFR 抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 77。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗EGFR或其抗原结合片段，其中，

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示；

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ

ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ

ID NO: 44所示;

或者

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 所示。

在本发明的一些实施方式中, 所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段, 其中,

所述的抗EGFR抗体包括非-CDR区, 且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种, 例如来自人抗体。

在本发明的一些实施方式中, 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中, 抗 EGFR 抗体的恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区。

在本发明的一些实施方式中, 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 EGFR 抗体的重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region 或 Ig gamma-4 chain C region; 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region 或 Ig lambda chain C region。

在本发明的一些实施方式中, 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 EGFR 抗体的重链恒定区序列选自 SEQ ID NO: 79、80 和 81。

在本发明的一些实施方式中, 所述抗 EGFR 抗体的重链选自 SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74 和 75; 并且所述抗 EGFR 抗体的轻链选自 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13。

在本发明的一些实施方式中, 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中:

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示;

或者

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74 或 75 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示。

在本发明的一些实施方式中, 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

在本发明的一些实施方式中, 重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region (例如 NCBI ACCESSION: P01857) 或 Ig gamma-4 chain C region (例如 NCBI ACCESSION: P01861.1); 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region (例如 NCBI ACCESSION: P01834)

本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子, 其编码本发明中任一项所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段。

本发明还涉及一种重组载体, 其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞, 其包含本发明的分离的核酸分子, 或者本发明的重组载体。

本发明的再一方面涉及一种药物组合物, 其包含有效量的本发明中任一项所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 以及一种或多种药学上可接受的辅料。

在本发明的一些实施方式中, 所述的药物组合物, 其还包含有效量的抗 Met 抗体或其抗原结合片段;

优选地, 所述抗 Met 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3, 所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3, 其中:

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示, HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示; 或者 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示, HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示;

并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示, LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合物中，
所述抗 Met 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 55；并且

所述抗 Met 抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示；

优选地，其中所述的抗Met抗体：

重链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16或者SEQ ID NO: 21所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示。

本发明的再一方面涉及一种组合药物产品，包括独立包装的第一药物产品和第二药物产品，其中：

所述第一药物产品包含有效量的本发明中任一项所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的辅料；

所述第二药物产品包含有效量的抗Met抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的辅料；

可选地，所述组合药物产品还包含产品说明书。

在本发明的一些实施方式中，所述的组合药物产品，其中，

所述抗 Met 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3，其中：

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示；或者 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示；

并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示，LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示，LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的组合药物产品，其中，

所述抗 Met 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 55；并且

所述抗 Met 抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示；

优选地，其中所述的抗Met抗体：

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 或者 SEQ ID NO: 21 所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

本发明的再一方面涉及一种双特异性抗体，其包括：

靶向 EGFR 的第一蛋白功能区，和

靶向不同于 EGFR 的靶点（例如 Met）的第二蛋白功能区；

其中，所述第一蛋白功能区包含本发明中任一项所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段的重链可变区，或者包含本发明中任一项所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区。

在本发明的一些实施方式中，所述双特异性抗体为抗 EGFR-抗 Met 双特异性抗体，又称为 EGFR×Met 双特异性抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述双特异性抗体为“1+1”型 EGFR×Met 双特异性抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

第二蛋白功能区包含抗 Met 抗体或其抗原结合片段的重链可变区；或者包含抗 Met 抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区；

其中，

所述抗 Met 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3，其中：

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示；或者 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示；

并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示，LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示，LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

所述抗 Met 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 55；并且

所述抗 Met 抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示；

优选地，其中所述的抗 Met 抗体：

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 或者 SEQ ID NO: 21 所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

其中，所述第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区独立地为单链抗体的融合蛋白或者半分子型单价抗体(IgG half molecule, IgG-HM)。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

所述第一蛋白功能区为半分子型单价抗体, 和

所述第二蛋白功能区为半分子型单价抗体。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

所述第一蛋白功能区为靶向 EGFR 的半分子型单价抗体, 和

所述第二蛋白功能区为靶向 Met 的半分子型单价抗体。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

所述的两种半分子型单价抗体的重链恒定区分别含第一 CH3 区和第二 CH3 区, 第一 CH3 区与第二 CH3 区的序列不同, 并且第一 CH3 区与第二 CH3 区之间的异二聚体相互作用强于所述第一 CH3 区与第二 CH3 区各自的同二聚体相互作用。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

所述的两种半分子型单价抗体的重链恒定区分别含第一 CH3 区和第二 CH3 区, 并且按照 EU Numbering System, 第一 CH3 区的第 405 位突变为 Ala、Asp、Glu、His、Ile、Met、Asn、Gln、Thr、Val、Tyr、Leu、Lys、Ser 或 Trp; 第二 CH3 区的第 409 位突变为氨基酸 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

其所包含的两种半分子型单价抗体的重链恒定区分别含第一 CH3 区和第二 CH3 区, 并且按照 EU Numbering System, 第一 CH3 区的第 405 位突变为 Leu; 第二 CH3 区的 409 位突变为氨基酸 Arg。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区, 并且具有 Knob 突变 (例如 S354C 和 T366W 突变); 和

所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区, 并且具有 Hole 突变 (例如 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V 突变)。

本发明中, Knob 和 hole 的突变位置是根据 EU numbering system 进行编号。在本发明的一些实施方式中, Knob 突变是指 S354C 和 T366W 突变。在本发明的一些实施方式中, Hole 突变是指 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V 突变。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区, 并且按照 EU Numbering System, 其中一个半分子型单价抗体的重链恒定区的第 435 位突变为氨基酸 Arg(R), 第 436 位突变为氨基酸 Phe(F)。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其为 IgG 形式, 优选为 IgG1 形式;

优选地，所述双特异性抗体中的各轻链的序列相同；

优选地，所述双特异性抗体具有两条序列相同的轻链；

优选地，所述双特异性抗体由如下肽链组成：

(1) 选自SEQ ID NO: 17至SEQ ID NO: 19，以及SEQ ID NO: 58至SEQ ID NO: 75中的肽链，

(2) 选自SEQ ID NO: 16和SEQ ID NO: 20的肽链，以及

(3) 选自的肽链SEQ ID NO: 11至SEQ ID NO: 13，以及SEQ ID NO: 57中的肽链，

其中，(3) 中的肽链为相同的两个拷贝；

优选地，(1) 和 (2) 中肽链、(2) 和 (3) 中的肽链以及 (1) 和 (3) 中的肽链通过一个或多个二硫键（例如2个或3个二硫键）连接。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其由如下肽链组成：

SEQ ID NO: 17所示的肽链、SEQ ID NO: 16所示的肽链以及SEQ ID NO: 12所示肽链，其中SEQ ID NO: 12所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 17所示的肽链、SEQ ID NO: 16所示的肽链以及SEQ ID NO: 13所示肽链，其中SEQ ID NO: 13所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 18所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 12所示肽链，其中SEQ ID NO: 12所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 18所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 13所示肽链，其中SEQ ID NO: 13所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 19所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 12所示肽链，其中SEQ ID NO: 12所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 19所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 13所示肽链，其中SEQ ID NO: 13所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75任一所示的肽链，以及SEQ ID NO: 16所示的肽链以及SEQ ID NO: 57所示肽链，其中SEQ ID NO: 57所示肽链为相同的两个拷贝；

或者

SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、或75任一所示的肽链，以及SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 57所示肽链，其中SEQ ID NO: 57所示肽链为相同的两个拷贝。

本发明的再一方面涉及一种分离的核酸分子，其编码本发明中任一项所述的双特异性抗体。

本发明的再一方面涉及一种重组表达载体，其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种重组宿主细胞，其包含本发明的重组表达载体，优选地，所述重组宿主细胞为重组的CHO-K1 细胞。

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的双特异性抗体，以及一种或多种药学上可接受的辅料。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的双特异性抗体在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤为EGFR和/或Met高表达的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为选自胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、胆道癌、支气管癌、淋巴瘤、卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、脑癌、甲状腺癌和头颈癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌。

根据本发明中任一项所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的双特异性抗体，其用于治疗或预防肿瘤；

优选地，所述肿瘤为EGFR和/或Met高表达的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为选自胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、胆道癌、支气管癌、淋巴瘤、卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、脑癌、甲状腺癌和头颈癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌。

本发明的再一方面涉及一种治疗或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的双特异性抗体的步骤；

优选地，所述肿瘤为EGFR和/或Met高表达的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为选自胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、胆道癌、支气管癌、淋巴瘤、卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、脑癌、甲状腺癌和头颈癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌。

在本发明的一些实施方式中，所述的治疗或预防肿瘤的方法，其中，在手术之前或之后给药，和/或在放疗之前或之后给药。

在本发明的一些实施方式中，所述的治疗或预防肿瘤的方法，其中，

所述抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg，优选每千克体重 5-50mg 或 5-15mg；

优选地，每3天、每4天、每5天、每6天、每10天、每1周、每2周或每3周给药一次；

优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。

附图说明

图1：双特异性抗体 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF 的结构示意图。

图2：双特异性抗体 E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 的结构示意图。

图3：双特异性抗体 JNJ-372 的结构示意图。

图4：EGFR ELISA 结合实验结果。

图5：Met ELISA 结合实验结果。

图6：EGFR ELISA 阻断实验结果。

图7：Met ELISA 阻断实验结果。

图8A至图8C：抗体 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 皆与重组人 EGFR 有结合活性。其中：图8A：抗体 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF 与人 EGFR 的结合解离曲线；图8B：抗体 E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF 与人 EGFR 的结合解离曲线；图8C：抗体 JNJ-372 与人 EGFR 的结合解离曲线。

图9A至图9C：抗体 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 皆与重组人 Met 有结合活性。其中：图9A：抗体 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF 与人 Met 的结合解离曲线；图9B：抗体 E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF 与人 Met 的结合解离曲线；图9C：抗体 JNJ-372 与人 Met 的结合解离曲线。

图10A至图10G：受试物细胞水平的结合实验。

图11A至图11M：受试物对 AKT 或 ERK 磷酸化检测结果。

图12A：报告基因法检测的 ADCC 实验结果。

图12B：报告基因法检测的 ADCC 实验结果。

图12C：LDH 法检测的 ADCC 实验结果。

图12D：报告基因法检测的 ADCC 实验结果。

图12E：LDH 法检测的 ADCC 实验结果。

图13：受试物对 CB-17 SCID 小鼠移植 NCI-H1975 人肺癌模型的抑制作用。

图14：受试物对 NCI-H1975 人源肺癌皮下肿瘤模型的抑制作用。

图15：受试物对 H1975(L858R/T790M/C797S)人源肺癌皮下肿瘤模型的抑制作用。

图16：受试物对 H292 人源肺癌皮下肿瘤模型的抑制作用。

具体实施方式

科学和技术名词

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语 EC₅₀ 是指半最大效应浓度（concentration for 50% of maximal effect），是指能引起 50% 最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987;196:901-917; Chothia 等人 Nature 1989;342:878-883，或者 IMGT 编号系统定义，见 Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1): D301-D307 的定义。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，

其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *nature*, 1975; 256(5517): 495)，但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白（受体抗体）的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体（供体抗体）的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源（例如，小鼠、大鼠或兔）抗体。此外，受体抗体的构架区（FR）的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., *Nature* 1986; 321:522-525; Reichmann et al., *Nature*, 1988; 332:323-329; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 1992; 2:593-596; 和 Clark, *Immunol. Today* 2000; 21: 397-402。在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体 (Diabodies)，其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如，Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:6444-6448 和 Poljak R. J. et al., *Structure* 1994; 2:1121-1123)。

如本文中所使用的，术语“单链抗体(single chain fragment variable, ScFv)”是指，包含通过连接体连接的抗体重链可变区(V_H)和抗体轻链可变区(V_L)的分子。其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见，例如，Bird et al, *Science* 1988; 242:423-426 和 Huston et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85:5879-5883)。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂- V_L -连接片段- V_H -COOH 或 NH₂- V_H -连接片段- V_L -COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄ 的接头，但也可使用其变体(Holliger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alftan et al, *Protein Eng.* 1995; 8:725-731, Choi et al, *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 94-106, Hu et al, *Cancer Res.* 1996; 56:3055-3061, Kipriyanov et al, *J. Mol. Biol.* 1999; 293:41-56 和 Roovers et al, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2001, 50(1): 51-59.描述。

如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合

成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的，术语“载体 (vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 来源的人工染色体 (PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒 (如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，GS 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体 (或对某抗原具有特异性的抗体) 是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力 (K_D) 结合该抗原。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数 (K_D) 结合抗原 (例如，EGFR 蛋白)。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 K_D ，例如使用 ForteBio 分子相互作用仪测定。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的 (参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或

者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如肿瘤）发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重程度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

如本文中所使用的，当提及 EGFR 蛋白的氨基酸序列时，其包括 EGFR 蛋白的全长，包含 EGFR ECD 的片段；还包括 EGFR 蛋白的全长的融合蛋白或 EGFR ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段（mFc 或 hFc）进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 EGFR 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“添加），蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述 EGFR 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的，当提及 Met 蛋白的氨基酸序列时，其包括 Met 蛋白的全长，包含 Met ECD 的片段；还包括 Met 蛋白的全长的融合蛋白或 Met ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段（mFc 或 hFc）进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 Met 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“添加），蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述 Met 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

本发明中，术语“ADCC”是指抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）。抗体的 Fab 段结合病毒感染的细胞或肿瘤细胞的抗原表位，其 Fc 段与杀伤细胞（NK 细胞、巨噬细胞等）表面的 Fc 受体（Fc Receptor, FcR）结合，介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞。

在本发明中，如果没有特别说明，所述“第一”（例如第一蛋白功能区或第一药物产品）和“第二”（例如第二蛋白功能区或第二药物产品）是为了指代上的区分或表述上的清楚，并不具有典型的次序上的含义。

本发明中，术语“半分子型单价抗体(IgG half molecule, IgG-HM)”由 IgG 抗体（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的 1 条重链和 1 条轻链组成的抗体分子，其是一种单价抗体（例如请参见冯一帆等，HIV-1 特异性单抗 2G12 单价抗体的构建及活性分析，中国病毒杂志，2015 年 5 月第 5 卷第 3 期，p171-175）。

本发明涉及的部分序列如下（下划线部分为 kabat 编号方案的 CDR）：

(1) E2-M1-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSIYKDSGFDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 1)

(2) E2-M2-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSVYKDSGFDYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 2)

(3) E2-M5-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSVYQDSGFDYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

(4) E2-M12-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSVYEDSRFDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 4)

(5) E2-M13-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSVYSDSMFDYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 5)

(6) E2-M16-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSLYKDSRFDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 6)

(7) E2-M17-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSLYKDSRFDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 7)

(8) E2-M25-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSVYKDSRFDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 8)

(9) E2-M34-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSIYEDSGFDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 9)

(10) E2-M38-VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCCARVSLYEDSGFDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 10)

(11) E2-LC

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAT
GIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCLQVGSTPLTFGGGTKAEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11)

其中 3 个轻链 CDR 的序列如下:

LCDR1: RASQSVSSWLA (SEQ ID NO: 38)

LCDR2: GASNRAT (SEQ ID NO: 39)

LCDR3: QVGSTPLT (SEQ ID NO: 40)

轻链可变区 VL 序列如下:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAT
GIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCLQVGSTPLTFGGGTKAEIK (SEQ ID NO:
42)

(12) E2-10-LC-13-91A

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCLQAGSTPLTFGGGTKAEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)

其中 3 个轻链 CDR 的序列如下:

LCDR1: RASQSVSSWLA (SEQ ID NO: 38)

LCDR2: GASNRAT (SEQ ID NO: 39)

LCDR3: LQAGSTPLT (SEQ ID NO: 41)

轻链可变区 VL 序列如下:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCLQAGSTPLTFGGGTKAEIK (SEQ ID NO:
43)

(13) E2-10-LC-69

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNLAK
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCLQAGSTPLTFGGGTKAEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13)

其中 3 个轻链 CDR 的序列如下:

LCDR1: RASQSVSSWLA (SEQ ID NO: 38)

LCDR2: GASNRAT (SEQ ID NO: 39)

LCDR3: LQAGSTPLT (SEQ ID NO: 41)

轻链可变区 VL 序列如下:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNLAK
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCLQAGSTPLTFGGGTKAEIK (SEQ ID NO:
44)

(14) JNJ-372-ML (其中斜体部分为轻链可变区)

*DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLA*WFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR
*FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQ*TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK

SGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 14)

其中 3 个轻链 CDR 的序列如下:

RASQGISNWL (SEQ ID NO: 51)

AASSLLS (SEQ ID NO: 52)

QQANSFPIT (SEQ ID NO: 53)

轻链可变区 VL 序列如下:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 56)

(15) JNJ-372-EL (其中斜体部分为轻链可变区)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS
GSESGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)

(16) M5-HC-K409R (其中斜体部分为重链可变区)

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPPGKGLEWIGVIYPSGNTYYSS
*PSLKS**SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTIYDLFDI**WGQGTMTVSSASTKGPSVF*
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 16)

其中 3 个重链 CDR 的序列如下:

HCDR1: SSVYYWS (SEQ ID NO: 45)

HCDR2: VIYPSGNTYYSPSLKS (SEQ ID NO: 46)

HCDR3: TIYDLFDI (SEQ ID NO: 47)

重链可变区 VH 序列如下:

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPPGKGLEWIGVIYPSGN
*TYSPSLKS**SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTIYDLFDI**WGQGTMTVSS*

(SEQ ID NO: 54)

重链恒定区序列如下:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 78)

(17) E2mut34-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSIYEDSGFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

其中重链恒定区序列如下:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 79)

(18) E2mut34-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSIYEDSGFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY

RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)

其中恒定区序列如下所示:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
SREEMTKNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 80)

(19) E2mut34-HC-holeRF (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSIYEDSGFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

其中恒定区序列如下所示:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
SREEMTKNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

(20) M5-HC-knob (其中斜体部分为重链可变区)

QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSVYYWSWIRQPPGKGLEWIGVIYPSGNTYY
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTIYDLFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVF

PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)

其中恒定区序列如下所示:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

(21) JNJ-372-MH (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)

其中 3 个重链 CDR 的序列如下:

SYGIS (SEQ ID NO: 48)

WISAYNGYTNYAQKLQG (SEQ ID NO: 49)

DLRGTYFDY (SEQ ID NO: 50)

重链可变区 VH 如下:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYN
GYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 55)

(22) JNJ-372-EH (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYK
YYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGT
ITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLT
VDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)

(23) EGFR-his-tag

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTLQLGTFEDHFLSLQRMFN
NCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE VAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYEYNSY
ALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNM
SMDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQ
CAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVK
KCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSIN
ATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENR
TDLHAFENLEIIRGR TKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN
WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREG
VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC
PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSHHHHHH
(SEQ ID NO: 23)

(24) Met-his-tag

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNV
LHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKDN
INMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCV
VSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLKETKDGFMTDQSYIDV
LPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLD AQT FHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECIL
TEKRKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLND DILFGVFAQSKPD SAEPMDRS

AMCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVNRCLQHFYGPNEHCFNRTLRLNSSGCEARRDEYRTE
FTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFL
LD SHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWC
HDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFNPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKT
RVLLGNESCTLTLSSESTMNTLTKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSI
SPKYGPMAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVK
LKIDLANRETSIFS YREDPIVYIEHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRN
FTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFKPK
VMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSE
LNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFTHHHHHH (SEQ ID NO: 24)

(25) E2-10-LC-13-91Q

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCLQQGSTPLTTFGGGTCAEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 57)

其中 3 个轻链 CDR 的序列如下:

LCDR1: RASQSVSSWLA (SEQ ID NO: 38)

LCDR2: GASNRAT (SEQ ID NO: 39)

LCDR3: LQQGSTPLT (SEQ ID NO: 76)

轻链可变区 VL 序列如下:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCLQQGSTPLTTFGGGTCAEIK (SEQ ID NO:
77)

(26) E2mut1-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGLVKPSQTL*SLTCTVSGGSIS*SGDYYSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTDY*
*NPSLKS*RVTM*SVDT*SKNQFSLKVNSVTAADTAVYYC*ARVSIYKDSGFDYWGQ*GLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT

KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 58)

(27) E2mut2-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYKDSGFDYWGGQTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 59)

(28) E2mut5-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYQDSGFDYWGGQTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 60)

(29) E2mut12-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYEDSRFDYWGGQTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 61)

(30) E2mut13-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
*NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTA**VYYCARVSVYSDSMFDYWGQ**GT**LVTVSSAST*
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 62)

(31) E2mut16-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSNGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
*NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTA**VYYCARVSLYKDSRFDYWGQ**GT**LVTVSSASTK*
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 63)

(32) E2mut17-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
*NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTA**VYYCARVSLYKDSRFDYWGQ**GT**LVTVSSASTK*
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)

(33) E2mut25-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYKDSRFDYWGQGLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 65)

(34) E2mut38-HC-F405L (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSLYEDSGFDYWGQGLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)

(35) E2mut1-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSIYKDSGFDYWGQGLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 67)

(36) E2mut2-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYKDSGFDYWGQGLVTVSSAST

KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 68)

(37) E2mut5-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYQDSGFDYWGQGLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 69)

(38) E2mut12-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYEDSRFDYWGQGLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 70)

(39) E2mut13-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYSDSMFDYWGQGLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF

LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 71)

(40) E2mut16-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISNGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSLYKDSRFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 72)

(41) E2mut17-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSLYKDSRFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT
KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)

(42) E2mut25-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

*QVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY*
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSVYKDSRFDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT

KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)

(43) E2mut38-HC-hole (其中斜体部分为重链可变区)

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGDIYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCARVSLYEDSGFDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 75)

发明的有益效果

本发明的双特异性抗体取得了如下技术效果 (1) - (5) 项的一项或者几项:

- (1) 具有与靶点 EGFR 和/或 Met 的良好的亲和力和/或特异性;
- (2) 具有较高的 ADCC 活性;
- (3) 具有较高的内吞率;
- (4) 具有良好的抗肿瘤活性;
- (5) 生产工艺简单, 成本低。

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将会理解, 下列实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者, 按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。

制备例 1: 抗 EGFR 单克隆抗体的序列设计和制备

设计并筛选得到 10 个抗 EGFR 单克隆抗体, 分别命名为 E2-M1、E2-M2、E2-M5、E2-M12、E2-M13、E2-M16、E2-M17、E2-M25、E2-M34 和 E2-M38。这 10 个抗 EGFR 单抗的重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1-10 所示, 重链恒定区选自 SEQ ID NO: 79、80、81 所示的氨基酸序列。轻链的氨基酸序列均如 SEQ ID NO: 11 所示。其中 HCDR 和 LCDR 通过 kabat 编号系统确定, 用下划线标出, 如下面的表 A 所示。

表 A

抗体名称	HCDR1	HCDR2	HCDR3
E2-M1	SGDYYWS (SEQ ID NO: 25)	YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO: 27)	ARVSIYKDSGFDY (SEQ ID NO: 28)
E2-M2	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSVYKDSGFDY (SEQ ID NO: 29)
E2-M5	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSVYQDSGFDY (SEQ ID NO: 30)
E2-M12	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSVYEDSRFDY (SEQ ID NO: 31)
E2-M13	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSVYSDSMFDY (SEQ ID NO: 32)
E2-M16	NGDYYWS (SEQ ID NO: 26)	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSLYKDSRFDY (SEQ ID NO: 33)
E2-M17	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSLYKDSRFDY (SEQ ID NO: 33)
E2-M25	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSVYKDSRFDY (SEQ ID NO: 34)
E2-M34	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSIYEDSGFDY (SEQ ID NO: 35)
E2-M38	SGDYYWS	YIYYSGSTDYNPSLKS	ARVSLYEDSGFDY (SEQ ID NO: 36)

上述抗体中，HCDR3 的结构如下面的 SEQ ID NO: 37 所示：ARVSX1YX2DSX3FDY（SEQ ID NO: 37）；其中，X1 选自氨基酸 I、V 和 L，X2 选自氨基酸 K、Q、E 和 S，X3 选自氨基酸 G、R 和 M。

实施例 1：octet Red 96e 测定 E2 突变体对 EGFR 的亲合力

使用 protein A 捕获法测定前面制得的 10 个抗 EGFR 单抗与抗原 EGFR-his-tag 结合的动力学参数。将浓度为 1 µg/ml 的单抗和对照抗体 JNJ-372-E-LF（下面的制备例 2 制得）结合在 Protein A 探针上（Cat No:18-5010; lot: 2001131），将抗原 EGFR-his-tag 用 1X Fortebio

工作液（1X PBS+0.05% 吐温 20）从 50nM 往下 2 倍稀释设 4 个浓度梯度与抗体结合，于 1X Fortebio 工作液中解离。

E2 突变体与 EGFR-his-tag 结合的动力学参数见表 B。

表 B

抗体名称	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)
JNJ-372-E-LF	4.34E-09	2.47E+05	1.07E-03
E2-M1	2.16E-09	4.11E+05	8.88E-04
E2-M2	1.92E-09	4.19E+05	8.05E-04
E2-M5	8.86E-09	6.25E+04	5.54E-04
E2-M12	8.01E-09	4.75E+04	3.80E-04
E2-M13	8.64E-09	5.24E+04	4.53E-04
E2-M16	9.31E-09	4.88E+04	4.54E-04
E2-M17	9.04E-09	5.02E+04	4.54E-04
E2-M25	1.52E-09	2.79E+05	4.24E-04
E2-M34	1.13E-09	4.06E+05	4.59E-04
E2-M38	2.15E-09	4.04E+05	8.66E-04

结果显示，10 个 E2 突变体的亲和力都达到 nM 水平，其中 E2-M1、E2-M2、E2-M25、E2-M34、E2-M38 的亲和力优于对照抗体 JNJ-372-E-LF，其中 E2-M34 的亲和力最高。

制备例 2：第一批 EGFR×Met 双特异性抗体的设计和制备

1. 双特异性抗体分子构建

从制备例 1 制得的 10 个高亲和力的 EGFR 抗体重链可变区中挑选 E2mut34 构建 EGFR×Met 双特异性抗体的 EGFR 端母抗体的重链（见 SEQ ID NO: 17-19）。另外，参考已公开的 Met 抗体（CN105705519A 中的 SEQ ID NO: 410）的重链，根据制备双特异性抗体的需要在恒定区做相应修改后，作为 EGFR×Met 双特异性抗体的 Met 端母抗体的重链（见 SEQ ID NO: 16 和 20）。使用 E2-10-LC-13-91A 或 E2-10-LC-69 作为共同轻链。

委托擎科生物合成编码表 1 中的 4 条轻链 E2-10-LC-13-91A、E2-10-LC-69、JNJ-372-ML 和 JNJ-372-EL 的 DNA 序列，通过 SapI（购自 NEB 公司，货号：R0569L）酶切并连接至 HXT2 载体（君实生物自主改造载体，源自于 pTT5），得到 4 个表达载体，分别命名为 HXT2-E2-10-LC-13-91A、HXT2-E2-10-LC-69、HXT2-JNJ-372-ML 和 HXT2-JNJ-372-EL。

其中，HXT2-JNJ-372-ML 为 Amivantamab 的 Met 端抗体轻链，HXT2-JNJ-372-EL 为

Amivantamab 的 EGFR 端抗体轻链（序列来源 IMGT 官网）。

委托擎科生物合成编码表 1 中的 7 条重链 M5-HC-K409R 、 E2mut34-HC-F405L 、 E2mut34-HC-hole 、 E2mut34-HC-holeRF 、 M5-HC-knob 、 JNJ-372-MH 和 JNJ-372-EH 的 DNA 序列，通过 SapI（购自 NEB 公司，货号：R0569L）酶切并连接至 HXT1S 载体（君实生物自主改造载体，源自于 pTT5），得到 7 个表达载体，分别命名为 HXT1S-E2mut34-HC-F405L 、 HXT1S-M5-HC-K409R 、 HXT1S-E2mut34-HC-hole 、 HXT1S-E2mut34-HC-holeRF 、 HXT1S-M5-HC-knob 、 HXT1S-JNJ-372-MH 和 HXT1S-JNJ-372-EH。

其中，HXT1S-JNJ-372-MH 为 Amivantamab 的 Met 端抗体重链，HXT1S-JNJ-372-EH 为 Amivantamab 的 EGFR 端抗体重链（序列来源 IMGT 官网）。

表 1：重链和轻链名称

重链名称	SEQ ID NO:	轻链名称	SEQ ID NO:
M5-HC-K409R	16	E2-10-LC-13-91A	12
E2mut34-HC-F405L	17	E2-10-LC-69	13
E2mut34-HC-hole	18	JNJ-372-ML	14
E2mut34-HC-holeRF	19	JNJ-372-EL	15
M5-HC-knob	20	/	/
JNJ-372-MH	21	/	/
JNJ-372-EH	22	/	/

2. 瞬转蛋白表达与纯化

所需重链、轻链以及表达载体如表 2 所示。其中：

E2mut34-91A-F405L-LF 和 M5-91A-K409R-LF 用于后续双特异性抗体的制备（体外重组法）；

E2mut34-69-F405L-LF 和 M5-69-K409R-LF 用于后续双特异性抗体的制备（体外重组法）；

JNJ-372-M-LF 和 JNJ-372-E-LF 用于后续双特异性抗体的制备（体外重组法）。

ALK101-2 和 ALK101-4 则采用了共同轻链和“杵-臼”（knob-into-hole）技术（参考 WO1996027011A1）制备双特异性抗体。

表 2：重链和轻链的组合以及对应表达载体的组合

抗体名称	EGFR 抗体重链	Met 抗体重链	抗体轻链	转 染 比例
------	-----------	----------	------	--------

E2mut34-91A-F405L-LF	E2mut34-HC-F405L (SEQ ID NO: 17)	/	E2-10-LC-13-91A(SEQ ID NO: 12)	1:1
M5-91A-K409R-LF	/	M5-HC-K409R(SEQ ID NO: 16)	E2-10-LC-13-91A(SEQ ID NO: 12)	1:1
E2mut34-69-F405L-LF	E2mut34-HC-F405L (SEQ ID NO: 17)	/	E2-10-LC-69 (SEQ ID NO: 13)	1:1
M5-69-K409R-LF	/	M5-HC-K409R(SEQ ID NO: 16)	E2-10-LC-69 (SEQ ID NO: 13)	1:1
JNJ-372-M-LF	/	JNJ-372-MH (SEQ ID NO: 21)	JNJ-372-ML (SEQ ID NO: 14)	1:1
JNJ-372-E-LF	JNJ-372-EH (SEQ ID NO: 22)	/	JNJ-372-EL (SEQ ID NO: 15)	1:1
ALK101-2	E2mut34-HC-hole (SEQ ID NO: 18)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91A(SEQ ID NO: 12)	1:1:1
ALK101-4	E2mut34-HC-holeRF (SEQ ID NO: 19)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-69(SEQ ID NO: 13)	1:1:1

2.1 双特异性抗体分子的表达

将正在培养的 CHO-K1 细胞(苏州君盟自有)进行计数,当细胞密度在 $2-6 \times 10^6/\text{ml}$ 时用 CD CHO (购自 ThermoFisher, 货号: 12490-001) 培养基进行传代扩增, 转染前一天将细胞密度稀释至 $1.8-2.5 \times 10^6/\text{ml}$, 次日当细胞密度达到约 $3.5-5.0 \times 10^6/\text{ml}$ 时进行转染。先加入十分之一转染体积的 CD CHO 培养基, 按照表 2 所示组合表加入 $1-2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的质粒(公司自制), 最后加入 $3-14 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PEI (购自 Polysciences, 货号: 24765-1), 混匀后室温孵育。最后将转染混合物缓慢加入预先处理好的细胞中, 边加边混匀。将转染好的混合物放入摇床培养。转染后第一天加入 6% 的糖型调节剂 (购自奥浦迈, 货号: R170026), 补料 4% 的 Cell Boost 7a (购自 Hyclone, 货号: SH31026.05) 和 0.4% 的 Cell Boost 7b (购自 Hyclone, 货号: SH31027.04CN), 然后每两天补料一次, 转染后 5-9 天收样。

3. 体外重组与纯化

3.1 双特异性抗体分子的亲和捕获

培养结束后, 用落地离心机 (购自 ThermoFisher, R404A) 1000g 离心 5min 弃去沉淀, 然后 8000g 离心 30min 收集细胞上清并用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤杯 (购自 jet, FPE-214-000) 进行无菌过滤。用蛋白纯化仪 (购自 GE, AKTA avant) 进行纯化。用 PBS 平衡缓冲液 (购

自无锡傲锐东源生物科技有限公司，ZLI-9061）平衡 Mabselect sure LX 柱子（Cytiva,17547403）。待上样完成后，先用亲和层析淋洗缓冲液 A（pH5.5，45mM 醋酸-醋酸钠+1M 氯化钠体系）进行淋洗，然后用淋洗液 B（pH5.5，45mM 醋酸-醋酸钠体系）进行淋洗，最后用亲和洗脱液（pH 3.6，10mM 醋酸-醋酸钠缓冲液）洗脱目的蛋白，用 1M Tris（购自 Merck，货号：E300016981946）缓冲液中和样品，调节 pH 至 5.5-6，用于下一步体外重组。

3.2 双特异性抗体分子的体外重组

参考 WO2011131746 公开的技术方案，使用 Fab 臂交换（Fab arm exchange）技术制备双特异性抗体，方法如下：

将亲和后的两种母抗体浓缩换液至 PBS 平衡缓冲液（购自无锡傲锐东源生物科技有限公司，ZLI-9061）中，将蛋白浓度定在 1±0.05mg/ml。

750mM Cysteamine hydrochloride（购自 VETEC，V900342-25G）母液的配置：向 14ml PBS 中加入 2.556g Cysteamine hydrochloride，加 PBS 定量至 30ml，然后用 0.22μm 的滤器（购自 sartorius，16541-K）过滤，最后用铝箔纸包裹，避光放置。

构建孵育体系：取经上述步骤处理后的母抗体，如表 3 所示，按照摩尔比 M：E=1：1.2，在 15ml 离心管（购自 Genemore，G3210015）中加入 2ml M 母抗体、2.4ml E 母抗体和 0.489 ml 750mM Cysteamine hydrochloride。将构建好的孵育体系用铝箔纸密封，避光放置在 31℃水浴锅（上海精宏实验设备有限公司，DK-S28）中孵育时间 3h。孵育结束后，用 PBS 平衡缓冲液进行浓缩换液，在室温环境中避光放置 16h~24h。最终，体外重组法制备的双特异性抗体分子结构如图 1 至图 3 所示。

表 3：双特异性抗体体外重组组合表

双特异性抗体名称	母抗体 M （抗 Met 抗体）	母抗体 E （抗 EGFR 抗体）	摩尔比 M:E
E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF	M5-91A-K409R-LF	E2mut34-91A-F405L-LF	1:1.2
E2mut34-69×M5-69-FAE-LF	M5-69-K409R-LF	E2mut34-69-F405L-LF	1:1.2
JNJ-372（Amivantamab 作为对照）	JNJ-372-M-LF	JNJ-372-E-LF	1:1.2

3.3 双特异性抗体分子的精纯

选择 Capto™ MMC Impres（Cytiva，17371602）填料进行精纯。使用清洗缓冲液（pH7.5，20mM Tris-HCl +1M NaCl 缓冲体系）预平衡，使用平衡液（pH7.5，20mM Tris-HCl 体系）对系统进行平衡。上样结束后用平衡液平衡 3~6 柱体积，最后用洗脱液（pH7.5，20mM Tris-HCl +1M NaCl 缓冲体系）进行线性洗脱，收集目的蛋白。由此制得表 3 中的 3 个双特

异性抗体。

实施例 2: ELISA 结合实验

4.1 EGFR ELISA 结合实验

使用 PBS (购自 Hyclone, 货号: SH30256.01) 稀释 EGFR-his-tag (购自苏州君盟, 批号: 20210803。序列来源: nuiprot 官网) 至 5.0 μ g/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置包被 60 分钟; 洗板; 加入 200 μ l/孔 2% BSA (购自 Sigma, 货号: B2064) 至板内, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内孵育 60 分钟, 洗板; 用 2% BSA 稀释样品至 10 μ g/ml, 3 倍梯度稀释至 0.056 ng/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 60 分钟, 洗板; 将辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗人 IgG(Fc 特异性)抗体 (购自 Sigma, 货号: A0170) 用 2% BSA 稀释 5000 倍, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内孵育 60 分钟, 洗板; 加入显色液 TMB (购自 Sigma, 货号: T2885) 0.1 mg/ml, 100 μ l/孔, 避免气泡, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟; 最后加 2M 的盐酸溶液终止反应, 100 μ l/孔, 避免气泡, 10 分钟内完成酶标仪读数 (检测波长 450 nm; 参比波长 620 nm), 使用四参数对数回归 (4PL) 模型拟合 EC₅₀。如图 4 所示, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF、JNJ-372 结合 EGFR 的 EC₅₀ 值分别为 13.57、11.71 和 33.90ng/ml, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 对 EGFR 的结合力优于 JNJ-372。

4.2 Met ELISA 结合实验

使用 PBS (购自 Hyclone, 货号: SH30256.01) 稀释 Met-his-tag (购自苏州君盟, 批号: 20220404。序列来源: nuiprot 官网) 至 2.0 μ g/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置包被 60 分钟; 洗板; 加入 200 μ l/孔 2% BSA (购自 Sigma, 货号: B2064) 至板内, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内孵育 60 分钟, 洗板; 用 2% BSA 稀释样品至 10 μ g/ml, 3 倍梯度稀释至 0.056 ng/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 60 分钟。洗板; 将辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗人 IgG(Fc 特异性)抗体 (购自 Sigma, 货号: A0170) 用 2% BSA 稀释 5000 倍, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内孵育 60 分钟, 洗板; 加入显色液 TMB (购自 Sigma, 货号: T2885) 0.1 mg/ml, 100 μ l/孔, 避免气泡, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟; 最后加 2M 的盐酸溶液终止反应, 100 μ l/孔, 避免气泡, 10 分钟内完成酶标仪读数 (检测波长 450 nm; 参比波长 620 nm), 使用四参数对数回归 (4PL) 模型拟合 EC₅₀。如图 5 所示, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF、JNJ-372 结合 Met 的 EC₅₀ 值分别为 7.461、6.558 和 8.416ng/ml, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 对 Met 的结合力与 JNJ-372 相当。

实施例 3: ELISA 阻断实验

5.1 EGFR ELISA 阻断实验

使用 PBS (购自 Hyclone, 货号: SH30256.01) 稀释 EGFR-his-tag (购自苏州君盟, 批号: 20210803) 至 2.0 μ g/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置包被 60 分钟; 洗板; 加入 200 μ l/孔 2% BSA (购自 Sigma, 货号: B2064) 至板内, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内孵育 60 分钟; 洗板; 用 2% BSA 稀释 EGF mFc (购自 Acro, 货号: EGF-H525b) 至 3.0 μ g/ml, 再用 3.0 μ g/ml 的 EGF mFc 稀释样品至 400 μ g/ml, 3 倍梯度稀释至 0.0023 μ g/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 60 分钟, 洗板; 将辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的抗鼠 Fc 抗体 (购自 Sigma, 货号: A2554) 用 2% BSA 稀释 5000 倍, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内孵育 60 分钟, 洗板; 加入显色液 TMB (购自 Sigma, 货号: T2885) 0.1 mg/ml, 100 μ l/孔, 避免气泡, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟; 最后加 2M 的盐酸溶液终止反应, 100 μ l/孔, 避免气泡, 10 分钟内完成酶标仪读数 (检测波长 450 nm; 参比波长 620 nm), 使用四参数对数回归 (4PL) 模型拟合 IC₅₀。如图 6 所示, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF、JNJ-372 阻断 EGFR 的 IC₅₀ 值分别为 1749、1668 和 3356ng/ml, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 对 EGFR 的阻断能力略优于 JNJ-372。

5.2 Met ELISA 阻断实验

使用 PBS (购自 Hyclone, 货号: SH30256.01) 稀释 HGF-his-tag (购自 Acro, 批号: HGF-H52H3) 至 4.0 μ g/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜包被; 洗板; 加入 200 μ l/孔 2% BSA (购自 Sigma, 货号: B2064) 至板内, 室温孵育 90 分钟, 洗板; 用 2% BSA 稀释 Met biotinylated (购自苏州君盟, 批号: 20220526) 至 0.1 μ g/ml, 再用 0.1 μ g/ml 的 Met biotinylated 稀释样品至 20 μ g/ml, 2.5 倍梯度稀释至 0.84 ng/ml, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 室温孵育 60 分钟, 洗板; 将辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的 Streptavidin (购自 Jackson ImmunoResearch, 货号: 016-030-084) 用 2% BSA 稀释 5000 倍, 以 100 μ l/孔加入酶标板, 室温孵育 60 分钟, 洗板; 加入显色液 TMB (购自 Sigma, 货号: T2885) 0.1 mg/ml, 100 μ l/孔, 避免气泡, 室温避光显色 10 分钟; 最后加 2M 的盐酸溶液终止反应, 100 μ l/孔, 避免气泡, 10 分钟内完成酶标仪读数 (检测波长 450 nm; 参比波长 620 nm), 使用四参数对数回归 (4PL) 模型拟合 IC₅₀。如图 7 所示, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF、JNJ-372 阻断 Met 的 IC₅₀ 值分别为 216.7、185.2 和 165ng/ml, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 对 Met 的阻断能力与 JNJ-372 相当。

实施例 4: Biacore 测定亲和力

使用分子相互作用分析仪 Biacore T200（GE 医疗生命科学）检测抗体 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 分别与重组人 EGFR、Met 的结合亲和力。

抗体与 EGFR 结合亲和力的测定方法如下：将 40 μg/ml 羊抗人 IgG-Fc 片段抗体偶联在 CM5 芯片（Cytiva，货号 BR-1005-30）表面，用于捕获抗体。在 CM5 芯片表面捕获 1 μg/ml E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 抗体。进样 20 nM、5 nM 的 EGFR 与 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF 结合，进样 80 nM、20 nM 的 EGFR 与 JNJ-372 结合。使用 Biacore T200 系统（GE Healthcare）检测结合与解离动力学信号。使用软件 Biacore T200 Evaluation Software 3.0 拟合结合解离曲线计算亲和力 K_D 值。

抗体与 Met 结合亲和力的测定方法如下：将 40 μg/ml 羊抗人 IgG-Fc 片段抗体（Jackson ImmunoResearch）偶联在 CM5 芯片（Cytiva，货号 BR-1005-30）表面，用于捕获抗体。在 CM5 芯片表面捕获 1 μg/ml 的 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 抗体。进样 50 nM、12.5 nM 的 Met 与三种抗体结合。使用 Biacore T200 系统（GE Healthcare）检测结合与解离动力学信号。使用软件 Biacore T200 Evaluation Software 3.0 拟合结合解离曲线计算亲和力 K_D 值。

Biacore 数据如表 4、图 8A 至图 8C、图 9A 至图 9C 所示。

表 4: Biacore 测定抗体亲和力统计表

抗原名称	双特异性抗体名称	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
重组人 EGFR	E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF	7.08E+05	8.49E-04	1.20E-09
	E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF	6.98E+05	7.59E-04	1.09E-09
	JNJ-372	1.41E+05	7.19E-04	5.10E-09
重组人 Met	E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF	1.32E+05	5.66E-05	4.30E-10
	E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF	1.52E+05	5.43E-05	3.57E-10
	JNJ-372	2.46E+05	5.18E-05	2.10E-10

结果显示，抗体 E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 皆与人 EGFR、Met 有结合活性。E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF 的 EGFR 亲和力相近，且比 JNJ-372 的 EGFR 亲和力强约 5 倍。E2-mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2-mut34-69×M5-69-FAE-LF 的 Met 亲和力相近，且比 JNJ-372 的 Met 亲和力弱约 2 倍。

实施例 5: 细胞结合实验

将分别过表达人 EGFR 和人 cMet 的 293F-EGFR、293-cMet 细胞(293F 细胞购自 ATCC 细胞库, 货号: CRL-1573。在此细胞基础上自主构建了分别过表达人 EGFR 和人 cMet 的稳转细胞株, 分别用这 2 株细胞检测双特异性抗体中 EGFR 和 cMet 端各自的结合亲和力, 其中人 EGFR 的氨基酸序列来自 NCBI 登录号 NP_005219.2, 人 cMet 的氨基酸序列来自 NCBI 登录号 NP_000236.2), 分别与不同浓度的 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 和 anti-KLH IgG1 抗体(起始浓度为 25μg/ml, 4 倍稀释, 共 10 个浓度梯度)在 4°C 条件下孵育 30 min, 然后用染色缓冲液(PBS+1v/v%FBS)洗去未结合的抗体, 并与染色缓冲液配制的含 5% (v/v) 的荧光二抗 goat anti-human IgG PE (SouthernBiotech, Cat#2040-09) 在 4°C 条件下避光孵育 30 分钟。最后用流式细胞仪(BD 公司, C6 PLUS 型号)收集细胞, 检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值, 并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线并计算 EC₅₀。

将 NCI-H1975 细胞(购自上海诺百生物科技有限公司, 编号: C01-HE, 内源同时表达人 EGFR 和人 cMet, 用来检测双特异性抗体的协同结合亲和力)与不同浓度的 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 和 anti-KLH IgG1 抗体(起始浓度为 100μg/ml, 4 倍稀释, 前 7 个浓度梯度; 10 倍稀释, 后 5 个浓度梯度)在 4°C 条件下孵育 30 min, 然后用染色缓冲液(PBS+1v/v%FBS)洗去未结合的抗体, 并与染色缓冲液配制的含 5% (v/v) 的荧光二抗 goat anti-human IgG PE (SouthernBiotech, Cat#2040-09) 在 4°C 条件下避光孵育 30 分钟。最后用流式细胞仪(BD 公司, C6 PLUS 型号)收集细胞, 检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值, 并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线并计算 EC₅₀。

如图 10A 至图 10C 所示, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 和 JNJ-372 与 293F-EGFR 细胞的结合 EC₅₀ 分别为 100.7ng/ml、85.02ng/ml、57.40ng/ml; 与 293F-cMet 细胞的结合 EC₅₀ 分别为 127.7ng/ml、87.39ng/ml、46.65ng/ml; 与 H1975 细胞的结合 EC₅₀ 分别为 19.33ng/ml、25.19ng/ml、180.3ng/ml。结果显示 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 与单抗原 EGFR 或 cMet 的结合亲和力稍弱于阳性对照 JNJ-372, 但与双抗原 EGFR & cMet 的结合亲和力显著优于阳性对照 JNJ-372。

实施例 6: 磷酸化抑制实验

将 NCI-H1975 细胞消化、离心后用完全培养基(RPMI-1640 培养基+10v/v%FBS)重悬, 按照 2×10^4 个细胞每孔接种在 96 孔平底板(Corning 公司, 货号: 3599)中, CO₂ 培养箱中孵育过夜。第二天将 96 孔板中的培养基换成无血清的 RPMI-1640 培养基, CO₂ 培养箱中

继续孵育过夜。第三天用无血清的 RPMI-1640 培养基配制 2×分析浓度的抗体 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 和 JNJ-372 (EGF(R&D 公司, 货号: 236-EG-200)激活条件的起始浓度 6μM, 3 倍稀释, 共 11 个浓度梯度; HGF(R&D 公司, 货号: 294-HG-100/CF)激活条件的起始浓度 660nM, 3 倍稀释, 共 12 个浓度梯度)。弃掉 96 孔板中的培养基后, 加入 50μl 上述稀释好的抗体, 37°C 预孵育 30min。使用无血清的 RPMI-1640 培养基配制 2×分析浓度激动剂 EGF(浓度 8ng/ml)或 HGF(浓度 140ng/ml), 配好后放于培养箱中备用。预孵育完成后, 从培养箱中取出 96 孔平底板, 加入稀释好的 EGF 或 HGF 激动剂溶液, 每孔 50μl, 37°C 继续孵育 30min。孵育完成后, 取出 96 孔平底板, 弃去上清, 按照 KITs 说明 (phospho-AKT(Ser473) kit (Cisbio 公司, 货号: 64AKSPEH) & Advanced phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204) (Cisbio 公司, 货号: 64AERPEH)) 加入 50μl 的 1×裂解液, 室温振摇 350rpm×30min 后, 向 HTRF 96 well low volume plates (Cisbio 公司, 货号: 66PL96025) 中加入 16μl 的细胞裂解液和 4μl KITs 中的 mix antibody, 用枪头轻轻混匀后, 将板子封好膜后在离心机中 1000rpm 离心 30s。最后将板子于 20°C-25°C 室温条件下避光孵育, 4-24h 内用酶标仪 (BioTek 公司, Synergy H1 型号) 读板, 测定波长 655 nm 和 620 nm 处的吸光值 (A) 计算其比值 (Ratio 665/620), 计算公式为 $\text{Ratio } 665/620 = A_{655}/A_{620} \times 10000$, 并用 GraphPad Prism 软件对 Ratio 665/620 进行数据分析处理。

如图 11A 至图 11E 所示, EGF 激活条件下, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 和 JNJ-372 抑制 AKT 磷酸化的 IC₅₀ 值分别为 4.370nM、2.837nM、22.41nM; 抑制 ERK 磷酸化的 IC₅₀ 值分别为 15.51nM、10.49nM、53.58nM。从结果可以看出, EGF 激活条件下, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 抑制 AKT 和 ERK 磷酸化的活性优于阳性对照 JNJ-372。HGF 激活条件下, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 和 JNJ-372 抑制 AKT 磷酸化的 IC₅₀ 值分别为 0.5869nM、0.3944nM、0.8861nM; 抑制 ERK 磷酸化的 IC₅₀ 值分别为 0.9124nM、0.9498nM、1.617nM。从结果可以看出, HGF 激活条件下, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 抑制 AKT 和 ERK 磷酸化的活性与阳性对照 JNJ-372 相当。

实施例 7: ADCC 活性实验

报告基因法: 将 NCI-H1975 细胞按照 5×10^4 个细胞每孔接种在 96 孔白板 (Costar 公司, 货号: 3917), CO₂ 培养箱中孵育过夜。第二天从 CO₂ 培养箱中取出 96 孔白板, 去除培养上清, 每孔加入 40μl 用分析缓冲液 (RPMI-1640 培养基+2v/v%FBS) 稀释的抗体 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 和 JNJ-372(起始浓度为

50 μ g/ml, 3 倍稀释, 前 3 个浓度梯度; 5 倍稀释, 后 7 个浓度梯度), 与靶细胞预孵育 30min。预孵育完成后, 每孔加入 40 μ l 用分析缓冲液(RPMI-1640 培养基+2v/v%FBS)重悬的表达 NFAT-Luc 和 Fc γ RIIIa 的效应细胞 Jurkat ADCC (每孔 1 $\times$ 10⁵ 个细胞), 在 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 6h。最后加入底物 One-Lite(Vazyme 公司, 货号:DD1203-03)并用酶标仪(TECAN 公司, M1000 pro 型号)检测荧光素酶信号, 荧光读值越高, ADCC 效应越强。通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的 ADCC 效应曲线。

LDH 法: 首先复苏 PBMC 效应细胞备用, 并于 CO₂ 培养箱中恢复过夜。靶细胞 NCI-H1975 消化、离心后, 弃掉上清, 用无酚红 RPMI Medium 1640 + 1v/v%FBS 培养基将细胞密度调整为 4 $\times$ 10⁵ cells/ml。每孔加 50 μ l 靶细胞至 96 孔低吸附板中 (Costar 公司, 货号: 7007)。接着用无酚红 RPMI Medium 1640 + 1%FBS 培养基稀释抗体 E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF、JNJ-372 和 anti-KLH IgG1, 配成 4 $\times$ 分析浓度 (抗体起始浓度 66.67 μ g/ml, 3 倍稀释前 2 个浓度梯度; 5 倍稀释后 7 个浓度梯度)。每孔 50 μ l 加入稀释好的抗体溶液, 轻轻吹打混匀几次后, 于培养箱中孵育 30min。取出复苏过夜的 PBMC, 将 PBMC 的密度调整为 5 $\times$ 10⁶ cells/ml (效靶比为 25:1)。每孔加 100 μ l PBMC 至 96 孔低吸附板中, 在 CO₂ 培养箱中共培养 4h。在共培养时间结束前半小时, T_{max} 组按照每孔 20 μ l 加入 LDH-cytotoxicity kit (BioVision 公司, 货号:K311-400) 中的 cell lysis buffer, 然后将 96 孔低吸附板放回培养箱中继续孵育。取出 96 孔低吸附板离心 (1500rpm $\times$ 5min), 每孔吸取 50 μ l 培养上清到新的 96 孔平底板(Corning 公司, 货号: 3599) 中, 再加入 50 μ l 稀释好的 LDH-cytotoxicity kit 中的 Dye Solution, 置于摇床上避光孵育 10~30min, 最后用多功能酶标仪(TECAN 公司, M1000 pro 型号)读板和 GraphPad Prism 软件进行数据分析处理。杀伤计算公式为: ADCC %=[(Sample-Buffer)/(T_{max}-T_s)] $\times$ 100。

如图 12A 至图 12B 所示, 在报告基因法实验中, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 均具有 ADCC 活性, 其 EC₅₀ 分别为 22.21ng/ml、14.12ng/ml, 且 E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 的 ADCC 活性强于阳性对照 JNJ-372。

如图 12C 所示, 以 PBMC 为效应细胞, NCI-H1975 为靶细胞时, E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 和 JNJ-372 可引发显著的 ADCC 效应, 其 EC₅₀ 值分别为 1.408ng/ml、4.556ng/ml、42.60ng/ml, 而阴性对照 anti-KLH IgG1 不能引起 ADCC 效应。E2mut34-91A $\times$ M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69 $\times$ M5-69-FAE-LF 的 ADCC 活性强于阳性对照 JNJ-372。

实施例 8: 内吞实验

将 MKN45 细胞（购自上海诺百生物科技有限公司，编号：C01-1C，内源表达人 EGFR 和人 cMet）消化、离心后，用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）重悬，按照每孔加入 2×10^5 个细胞接种在 96 孔圆底板（Corning 公司，货号：3799）中，加入用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）稀释好的抗体 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF、JNJ-372 和 anti-KLH IgG1(起始浓度 100μg/ml，4 倍稀释，11 个浓度梯度)在 4℃ 条件下孵育 30 min。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 200μl 完全培养基（RPMI-1640 培养基+10v/v%FBS）重悬细胞后，一分为二，一份继续放在 4℃ 条件下孵育 24h，另一份放在 37℃ 条件下孵育 24h。孵育时间结束后，离心弃掉上清，加入染色缓冲液配制的含 5‰（v/v）的荧光二抗 goat anti-human IgG PE（SouthernBiotech，Cat#2040-09）在 4℃ 条件下避光孵育 30 分钟。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 PFA（Absin 公司，货号：abs9179）固定后在流式细胞仪（BD 公司，C6 PLUS 型号）上收集细胞，检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值，并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线得到 Top 值。内吞率的计算公式为：内吞率（%）= $(1 - \text{Top}_{37^\circ\text{C}} / \text{Top}_{4^\circ\text{C}}) \times 100$ 。

结果如表 5 所示。

表 5：MKN45 细胞的内吞活性检测结果

组别	Top_4℃	Top_37℃	内吞率，%
JNJ-372	26097	13295	49
E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF	33839	9374	72
E2mut34-69A×M5-91A-FAE-LF	32544	8943	72
Anti-KLH hIgG1	1572	1613	NA

结果显示，E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 和 JNJ-372 均可以被 MKN45 细胞内吞，而阴性对照 anti-KLH IgG1 几乎没有内吞作用。结果显示，E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、E2mut34-69×M5-69-FAE-LF 的内吞活性相当，24h 的内吞率为 72%，优于 JNJ-372（24h 内吞率为 49%）。

实施例 9：H1975 移植瘤模型

本实施例评价本发明 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF 对 CB-17 SCID 小鼠移植人肺腺癌细胞 NCI-H1975 模型的抑制作用。

1、测试过程

6-8 周龄雌性 CB-17 SCID 小鼠（购自上海吉辉实验动物饲养有限公司，动物合格证编号：20170012022482），于右侧皮下接种 5×10^6 NCI-H1975 细胞。待平均肿瘤体积约为 164

mm³ 时，选取合适的动物，根据肿瘤体积随机分为 5 组，每组 6 只动物。分别为：

- G1 生理盐水对照组（溶剂对照组）；
- G2 JNJ-372（5 mg/kg）组（阳性对照组）；
- G3 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (5 mg/kg)组（治疗组）。

腹腔注射，每周给药 2 次，连续给药 3 周，末次给药 3 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，将小鼠安乐死，计算相对肿瘤增殖率， $TGI(\%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)] \times 100\%$ 。（Ti：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，T0：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V0：溶剂对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值）。

结果如表 6 和图 13 所示。

表 6：在 NCI-H1975 人源肺癌皮下肿瘤模型中各组药效分析表

实验组	开始给药后第 20 天		
	肿瘤体积 $\bar{x} \pm S$	TGI (%)	P Value (相较于对照组)
G1, 生理盐水	3374±178	-	-
G2, JNJ-372, 5mg/kg	708±135	83.0	<0.001
G3 , E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF, 5mg/kg	711±73	83.0	<0.001

- 注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；
2. $TGI\% = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)] \times 100\%$ ；
3. P 值由 T 检验方法比较各组肿瘤体积得到。

结果显示，在给药后第 20 天，生理盐水对照组平均肿瘤体积为 3374 mm³。JNJ-372(5 mg/kg)组的平均肿瘤体积为 708 mm³，与生理盐水对照组相比，肿瘤抑制率为 83.0%，显著抑制了肿瘤生长；E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (5 mg/kg)组平均肿瘤体积为 711 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 83.0%，显著抑制肿瘤生长。结果表明，在 CB-17 SCID 小鼠移植 NCI-H1975 模型中，在 5 mg/kg 的剂量水平，E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF 具有显著的肿瘤抑制作用。

制备例 3：第二批 EGFR×Met 双特异性抗体突变体的设计和制备

1. 双特异性抗体分子构建

使用前面的制备例 1 制得的 10 个高亲和力的 EGFR 抗体重链作为 EGFR×Met 双特异性抗体的 EGFR 端母抗体的重链。另外，参考已公开的 Met 抗体 (CN105705519A 中的 SEQ

ID NO: 410)的重链,根据制备双特异性抗体的需要在恒定区做相应修改后,作为 EGFR×Met 双特异性抗体的 Met 端母抗体的重链(见 SEQ ID NO: 20)。使用 E2-10-LC-13-91Q 作为共同轻链。

委托擎科生物合成编码表 7 中的重链和轻链,方法参照制备例 2。

表 7: 突变体重链和轻链名称及组合

抗体名称	EGFR 抗体重链	Met 抗体重链	抗体轻链	转染比例
E2mut1-91Q-F405L-LF	E2mut1-HC-F405L (SEQ ID NO: 58)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1
E2mut2-91Q-F405L-LF	E2mut2-HC-F405L (SEQ ID NO: 59)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1
E2mut5-91Q-F405L-LF	E2mut5-HC-F405L (SEQ ID NO: 60)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1
E2mut12-91Q-F405L-LF	E2mut12-HC-F405L (SEQ ID NO: 61)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1
E2mut13-91Q-F405L-LF	E2mut13-HC-F405L (SEQ ID NO: 62)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1
E2mut16-91Q-F405L-LF	E2mut16-HC-F405L (SEQ ID NO: 63)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut17-91Q-F405L-LF	E2mut-HC-F405L (SEQ ID NO: 64)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut25-91Q-F405L-LF	E2mut25-HC-F405L (SEQ ID NO: 65)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut34-91Q-F405L-LF	E2mut34-HC-F405L (SEQ ID NO: 17)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut38-91Q-F405L-LF	E2mut38-HC-F405L (SEQ ID NO: 66)	/	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
M5-91Q-K409R-LF	/	M5-HC-K409R(S) EQ ID NO: 16)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1
E2mut1-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut1-HC-hole (SEQ ID NO: 67)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1:1
E2mut2-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut2-HC-hole	M5-HC-knob	E2-10-LC-13-91Q(S)	1:1:1

	(SEQ ID NO: 68)	(SEQ ID NO: 20)	EQ ID NO: 57)	
E2mut5-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut5-HC-hole (SEQ ID NO: 69)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1:1
E2mut12-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut12-HC-hole (SEQ ID NO: 70)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	1:1:1
E2mut13-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut13-HC-hole (SEQ ID NO: 71)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut16-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut16-HC-hole (SEQ ID NO: 72)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut17-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut17-HC-hole (SEQ ID NO: 73)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut25-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut25-HC-hole (SEQ ID NO: 74)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut34-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut34-HC-hole (SEQ ID NO: 18)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	
E2mut38-91Q×M5-91Q-KIH-LF	E2mut38-HC-hole (SEQ ID NO: 75)	M5-HC-knob (SEQ ID NO: 20)	E2-10-LC-13-91Q(S) EQ ID NO: 57)	

2. 瞬转蛋白表达与纯化

所需重链、轻链如表 7 所示。其中：

E2mut1-91Q-F405L-LF 、 E2mut2-91Q-F405L-LF 、 E2mut5-91Q-F405L-LF 、 E2mut12-91Q-F405L-LF 、 E2mut13-91Q-F405L-LF 、 E2mut16-91Q-F405L-LF 、 E2mut17-91Q-F405L-LF 、 E2mut25-91Q-F405L-LF 、 E2mut34-91Q-F405L-LF 、 E2mut38-91Q-F405L-LF、和 M5-91Q-K409R-LF 用于后续双特异性抗体的制备（体外重组法）；

E2mut1-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut2-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut5-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut12-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut13-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut16-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut17-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut25-91Q×M5-91Q-KIH-LF 、 E2mut34-91Q×M5-91Q-KIH-LF、E2mut38-91Q×M5-91Q-KIH-LF 则采用了共同轻链和“杵-臼”（knob-into-hole）技术（参考 WO1996027011A1）制备双特异性抗体。

2.1 双特异性抗体分子的表达

将正在培养的 CHO-K1 细胞(苏州君盟自有)进行计数,当细胞密度在 $2-6 \times 10^6/\text{ml}$ 时用 CD CHO (购自 ThermoFisher, 货号: 12490-001) 培养基进行传代扩增,转染前一天将细胞密度稀释至 $1.8-2.5 \times 10^6/\text{ml}$,次日当细胞密度达到约 $3.5-5.0 \times 10^6/\text{ml}$ 时进行转染。先加入十分之一转染体积的 CD CHO 培养基,按照表 2 所示组合表加入 $1-2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的质粒(公司自制),最后加入 $3-14 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PEI (购自 Polysciences, 货号: 24765-1),混匀后室温孵育。最后将转染混合物缓慢加入预先处理好的细胞中,边加边混匀。将转染好的混合物放入摇床培养。转染后第一天加入 6% 的糖型调节剂(购自奥浦迈,货号: R170026),补料 4% 的 Cell Boost 7a (购自 Hyclone, 货号: SH31026.05)和 0.4% 的 Cell Boost 7b (购自 Hyclone, 货号: SH31027.04CN),然后每两天补料一次,转染后 5-9 天收样。

3. 体外重组与纯化

3.1 双特异性抗体分子的亲和捕获

培养结束后,用落地离心机(购自 ThermoFisher, R404A) $1000g$ 离心 5min 弃去沉淀,然后 $8000g$ 离心 30min 收集细胞上清并用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤杯(购自 jet, FPE-214-000)进行无菌过滤。用蛋白纯化仪(购自 GE, AKTA avant)进行纯化。用 PBS 平衡缓冲液(购自无锡傲锐东源生物科技有限公司, ZLI-9061)平衡 Mabselect sure LX 柱子(Cytiva, 17547403)。待上样完成后,先用亲和层析淋洗缓冲液 A ($\text{pH} 5.5$, 45mM 醋酸-醋酸钠+ 1M 氯化钠体系)进行淋洗,然后用淋洗液 B ($\text{pH} 5.5$, 45mM 醋酸-醋酸钠体系)进行淋洗,最后用亲和洗脱液 ($\text{pH} 3.6$, 10mM 醋酸-醋酸钠缓冲液)洗脱目的蛋白,用 1M Tris (购自 Merck, 货号: E300016981946) 缓冲液中和样品,调节 pH 至 $5.5-6$,用于下一步体外重组。

3.2 双特异性抗体分子的体外重组

参考 WO2011131746 公开的技术方案,使用 Fab 臂交换 (Fab arm exchange) 技术制备双特异性抗体,方法如下:

将亲和后的两种母抗体浓缩换液至 PBS 平衡缓冲液(购自无锡傲锐东源生物科技有限公司, ZLI-9061)中,将蛋白浓度定在 $1 \pm 0.05\text{mg}/\text{ml}$ 。

750mM Cysteamine hydrochloride (购自 VETEC, V900342-25G) 母液的配置:向 14ml PBS 中加入 2.556g Cysteamine hydrochloride,加 PBS 定量至 30ml ,然后用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤器(购自 sartorius, 16541-K)过滤,最后用铝箔纸包裹,避光放置。

构建孵育体系:取经上述步骤处理后的母抗体,如表 3 所示,按照摩尔比 M: E=1: 1.2,在 15ml 离心管(购自 Genemore, G3210015)中加入 2ml M 母抗体、 2.4ml E 母抗体和 0.489ml 750mM Cysteamine hydrochloride。将构建好的孵育体系用铝箔纸密封,避光放

置于 31℃水浴锅（上海精宏实验设备有限公司，DK-S28）中孵育时间 3h。孵育结束后，用 PBS 平衡缓冲液进行浓缩换液，在室温环境中避光放置 16h~24h。

表 8：双特异性抗体突变体体外重组组合表

双特异性抗体名称	母抗体 M (抗 Met 抗体)	母抗体 E (抗 EGFR 抗体)	摩尔比 M:E
E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut1-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut2-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut2-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut5-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut5-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut12-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut13-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut16-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut16-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut17-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut17-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut25-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut25-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut34-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut34-91Q-F405L-LF	1:1.2
E2mut38-91Q×M5-91Q-FAE-LF	M5-91Q-K409R-LF	E2mut38-91Q-F405L-LF	1:1.2

3.3 双特异性抗体分子的精纯

选择 Capto™ MMC Impres（Cytiva，17371602）填料进行精纯。使用清洗缓冲液（pH7.5，20mM Tris-HCl +1M NaCl 缓冲体系）预平衡，使用平衡液（pH7.5，20mM Tris-HCl 体系）对系统进行平衡。上样结束后用平衡液平衡 3~6 柱体积，最后用洗脱液（pH7.5，20mM Tris-HCl +1M NaCl 缓冲体系）进行线性洗脱，收集目的蛋白。

实施例 10：Biacore 检测双抗突变体结合解离动力学

使用分子相互作用分析仪 Biacore T200（GE 医疗生命科学）检测抗体分别与重组人 EGFR、人 c-Met 的结合亲和力。

抗体与人 EGFR 结合亲和力的测定方法如下：将 40 μg/mL 羊抗人 IgG-Fc 片段抗体（Jackson ImmunoResearch）偶联在 CM5 芯片（Cytiva，货号 BR-1005-30）表面，用于捕获抗体。在 CM5 芯片表面捕获 1 μg/mL 的 ALK101 抗体，进样 40 nM、10 nM 的人 EGFR 与抗体结合。使用 Biacore T200 系统（GE Healthcare）检测结合与解离动力学信号。使用软件 Biacore T200 Evaluation Software 3.0 拟合结合解离曲线计算亲和力 K_D 值。

抗体与人 c-Met 结合亲和力的测定方法如下：将 40 μg/mL 羊抗人 IgG-Fc 片段抗体

（Jackson ImmunoResearch）偶联在 CM5 芯片（Cytiva，货号 BR-1005-30）表面，用于捕获抗体。在 CM5 芯片表面捕获 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 ALK101 抗体，进样 40 nM、10 nM 的人 c-Met 与抗体结合。使用 Biacore T200 系统（GE Healthcare）检测结合与解离动力学信号。使用软件 Biacore T200 Evaluation Software 3.0 拟合结合解离曲线计算亲和力 K_D 值。

结果如表 9 所示，E2mut1-91Q-F405L-LF、E2mut2-91Q-F405L-LF、E2mut5-91Q-F405L-LF、E2mut12-91Q-F405L-LF、E2mut13-91Q-F405L-LF、E2mut16-91Q-F405L-LF、E2mut17-91Q-F405L-LF、E2mut25-91Q-F405L-LF、E2mut34-91Q-F405L-LF、E2mut38-91Q-F405L-LF 皆与人 EGFR 有结合活性，亲和力相当或略弱于 JNJ-372。M5-91Q-K409R-LF 与人 c-Met 有结合活性，亲和力与 JNJ-372 相当。同时测试了 4 个双抗分子 E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut25-91Q×M5-91Q-FAE-LF 的亲和力，结果显示单价的亲和力与双价的单克隆抗体一致。

表 9：Biacore 测定抗体突变体亲和力统计表

抗原名称	抗体名称	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
EGFR	JNJ-372	1.72E+05	8.36E-04	4.84E-09
	E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF	2.91E+05	5.51E-03	1.89E-08
	E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF	2.97E+05	1.68E-03	5.67E-09
	E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF	3.16E+05	2.86E-03	9.05E-09
	E2mut25-91Q×M5-91Q-FAE-LF	1.42E+04	1.30E-03	9.18E-08
	E2mut1-91Q-F405L-LF	3.39E+05	5.22E-03	1.54E-08
	E2mut2-91Q-F405L-LF	3.11E+05	6.05E-03	1.95E-08
	E2mut5-91Q-F405L-LF	4.70E+05	9.46E-03	2.01E-08
	E2mut12-91Q-F405L-LF	3.27E+05	1.64E-03	5.03E-09
	E2mut13-91Q-F405L-LF	3.50E+05	2.78E-03	7.94E-09
	E2mut16-91Q-F405L-LF	7.22E+04	2.78E-03	3.85E-08
	E2mut17-91Q-F405L-LF	8.76E+04	2.28E-03	2.60E-08
	E2mut25-91Q-F405L-LF	5.99E+04	1.19E-03	1.99E-08
	E2mut34-91Q-F405L-LF	5.18E+05	3.62E-03	6.99E-09
	E2mut38-91Q-F405L-LF	5.92E+05	1.47E-02	2.48E-08
抗原名称	抗体名称	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
c-Met	JNJ-372	2.20E+05	9.15E-05	4.17E-10
	E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF	1.96E+05	1.28E-04	6.51E-10

	E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF	1.89E+05	1.34E-04	7.06E-10
	E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF	1.95E+05	1.29E-04	6.62E-10
	E2mut25-91Q×M5-91Q-FAE-LF	1.88E+05	1.28E-04	6.84E-10
	M5-91Q-K409R-LF	2.60E+05	1.09E-04	4.18E-10

实施例 11：双抗突变体细胞结合实验

将 293F-EGFR、293-cMet 细胞分别与不同浓度的 JNJ372、E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF、E2mut25-91Q×M5-91Q-LF 和 anti-KLH IgG1 抗体(起始浓度为 100μg/ml，5 倍稀释，共 12 个浓度梯度) 在 4℃ 条件下孵育 30 min，然后用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，并与染色缓冲液配制的含 5%（v/v）的荧光二抗 goat anti-human IgG PE（SouthernBiotech，Cat#2040-09）在 4℃条件下避光孵育 30 分钟。最后用流式细胞仪（BD 公司，C6 PLUS 型号）收集细胞，检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值，并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线并计算 EC50。

将 MKN45 细胞（内源同时表达人 EGFR 和人 cMet，用来检测双特异性抗体的协同结合亲和力）与不同浓度的 JNJ372、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 和 anti-KLH IgG1 抗体(起始浓度为 100μg/ml，4 倍稀释，共 11 个浓度梯度) 在 4℃ 条件下孵育 30 min，然后用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，并与染色缓冲液配制的含 5%（v/v）的荧光二抗 goat anti-human IgG PE（SouthernBiotech，Cat#2040-09）在 4℃条件下避光孵育 30 分钟。最后用流式细胞仪（BD 公司，C6 PLUS 型号）收集细胞，检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值，并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线并计算 EC50。

将 PC-9 细胞（内源同时表达人 EGFR 和人 cMet，用来检测双特异性抗体的协同结合亲和力）与不同浓度的 JNJ372、E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 和 anti-KLH IgG1 抗体(起始浓度为 25μg/ml，4 倍稀释，共 8 个浓度梯度) 在 4℃ 条件下孵育 30 min，然后用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，并与染色缓冲液配制的含 5%（v/v）的荧光二抗 goat anti-human IgG PE（SouthernBiotech，Cat#2040-09）在 4℃条件下避光孵育 30 分钟。最后用流式细胞仪（BD 公司，C6 PLUS 型号）收集细胞，检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值，并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线并计算 EC50。

如图 10D 至图 10G 所示，JNJ372、E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF、E2mut25-91Q×M5-91Q-LF 与 293F-EGFR 细胞的结合 EC50 分

别为 203.6ng/ml、70.01ng/ml、67.48ng/ml、55.53ng/ml、337.4ng/ml；TOP 值分别为 35956、17708、23177、19445、23508；JNJ372、E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF、E2mut25-91Q×M5-91Q-LF 与 293F-CMet 细胞的结合 EC50 分别为 24.13 ng/ml、25.80ng/ml、26.95ng/ml、25.99ng/ml、28.22ng/ml；JNJ372、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 与 MKN45 细胞的结合 EC50 分别为 65.77 ng/ml、78.99ng/ml、79.78ng/ml；E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF、JNJ372 与 PC-9 细胞的结合 EC50 分别为 324.4 ng/ml、142.0ng/ml、149.2ng/ml、194.0ng/ml；结果显示 E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF、E2mut25-91Q×M5-91Q-LF 与单抗原 EGFR 的结合亲和力弱于阳性对照 JNJ-372；与单抗原 cMet 的结合亲和力与阳性对照 JNJ-372 相当；与双抗原 EGFR & cMet 的结合亲和力与阳性对照 JNJ-372 相当。

实施例 12：双抗突变体磷酸化抑制实验

将 NCI-H1975 细胞消化、离心后用完全培养基（RPMI-1640 培养基+10v/v%FBS）重悬，按照 2×10^4 个细胞每孔接种在 96 孔平底板中，CO₂ 培养箱中孵育过夜。第二天将 96 孔板中的培养基换成无血清的 RPMI-1640 培养基，CO₂ 培养箱中继续孵育过夜。第三天用无血清的 RPMI-1640 培养基配制 2×分析浓度的抗体 JNJ372、E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 和 E2mut25-91Q×M5-91Q-LF（起始浓度 500 μg/ml，3 倍稀释，共 12 个浓度梯度）。弃掉 96 孔板中的培养基后，加入 50μl 上述稀释好的抗体，37°C 预孵育 30min。使用无血清的 RPMI-1640 培养基配制 2×分析浓度激动剂 EGF（浓度 8ng/ml），配好后放于培养箱中备用。预孵育完成后，从培养箱中取出 96 孔平底板，加入稀释好的 EGF 激动剂溶液，每孔 50μl，37°C 继续孵育 30min。孵育完成后，取出 96 孔平底板，弃去上清，按照 KITS 说明（phospho-AKT(Ser473) kit（Cisbio 公司，货号：64AKSPEH）& Advanced phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204)（Cisbio 公司，货号：64AERPEH））加入 50μl 的 1×裂解液，室温振摇 350rpm×30min 后，向 HTRF 96 well low volume plates（Cisbio 公司，货号：66PL96025）中加入 16μl 的细胞裂解液和 4μl KITS 中的 mix antibody，用枪头轻轻混匀后，将板子封好膜后在离心机中 1000rpm 离心 30s。最后将板子于 20°C-25°C 室温条件下避光孵育，4-24h 内用酶标仪（BioTek 公司，Synergy H1 型号）读板，测定波长 655 nm 和 620 nm 处的吸光值（A）计算其比值（Ratio 665/620），计算公式为 $\text{Ratio 665/620} = A_{655}/A_{620} \times 10000$ ，并用 GraphPad Prism 软件对 Ratio 665/620 进行分析处理。

将 BxPC-3 细胞消化、离心后用完全培养基（RPMI-1640 培养基+10v/v%FBS）重悬，

按照 2×10^4 个细胞每孔接种在 96 孔平底板中, CO_2 培养箱中孵育过夜。第二天将 96 孔板中的培养基换成无血清的 RPMI-1640 培养基, CO_2 培养箱中继续孵育过夜。第三天用无血清的 RPMI-1640 培养基配制 $2 \times$ 分析浓度的抗体 JNJ372、E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut25-91Q $\times$ M5-91Q-LF 和 anti-KLH IgG1 (起始浓度 $20 \mu\text{g/ml}$, 3 倍稀释, 共 10 个浓度梯度)。弃掉 96 孔板中的培养基后, 加入 $50 \mu\text{l}$ 上述稀释好的抗体, 37°C 预孵育 30min。使用无血清的 RPMI-1640 培养基配制 $2 \times$ 分析浓度激动剂 HGF (浓度 300ng/ml), 配好后放于培养箱中备用。预孵育完成后, 从培养箱中取出 96 孔平底板, 加入稀释好的 HGF 激动剂溶液, 每孔 $50 \mu\text{l}$, 37°C 继续孵育 30min。孵育完成后, 取出 96 孔平底板, 弃去上清, 按照 KITS 说明 (phospho-AKT(Ser473) kit (Cisbio 公司, 货号: 64AKSPEH) & Advanced phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204) (Cisbio 公司, 货号: 64AERPEH)) 加入 $50 \mu\text{l}$ 的 $1 \times$ 裂解液, 室温振摇 $350 \text{rpm} \times 30 \text{min}$ 后, 向 HTRF 96 well low volume plates (Cisbio 公司, 货号: 66PL96025) 中加入 $16 \mu\text{l}$ 的细胞裂解液和 $4 \mu\text{l}$ KITS 中的 mix antibody, 用枪头轻轻混匀后, 将板子封好膜后在离心机中 1000rpm 离心 30s。最后将板子于 20°C - 25°C 室温条件下避光孵育, 4-24h 内用酶标仪 (BioTek 公司, Synergy H1 型号) 读板, 测定波长 655nm 和 620nm 处的吸光值 (A) 计算其比值 (Ratio 665/620), 计算公式为 $\text{Ratio } 665/620 = A_{655}/A_{620} \times 10000$, 并用 GraphPad Prism 软件对 Ratio 665/620 进行数据分析处理。

如图 11F 至图 11M 所示, EGF 激活条件下, JNJ372、E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q-LF 和 E2mut25-91Q $\times$ M5-91Q-LF 抑制 AKT 磷酸化的 IC_{50} 值分别为 1377ng/ml 、 464713ng/ml 、 2988ng/ml 、 8899ng/ml 、 111137ng/ml ; 抑制 ERK 磷酸化的 IC_{50} 值分别为 3383ng/ml 、 4711189ng/ml 、 8496ng/ml 、 42459ng/ml 、 575652ng/ml 。从结果可以看出, EGF 激活条件下, E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF 抑制 AKT 和 ERK 磷酸化的活性稍弱于阳性对照 JNJ-372, E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut25-91Q $\times$ M5-91Q-LF 抑制 AKT 和 ERK 磷酸化的活性显著弱于阳性对照 JNJ-372。HGF 激活条件下, JNJ372、E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q-LF 和 E2mut25-91Q $\times$ M5-91Q-LF 抑制 AKT 磷酸化的 IC_{50} 值分别为 296.9ng/ml 、 410.4ng/ml 、 268.3ng/ml 、 404.5ng/ml 、 766.3ng/ml ; 抑制 ERK 磷酸化的 IC_{50} 值分别为 457.8ng/ml 、 547.6ng/ml 、 517.9ng/ml 、 535.0ng/ml 、 1312ng/ml 。从结果可以看出, HGF 激活条件下, E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q 抑制 AKT 和 ERK 磷酸化的活性与阳性对照 JNJ-372 相当, E2mut25-91Q $\times$ M5-91Q-LF 抑制 AKT 和 ERK 磷酸化的活性稍弱于阳性对照 JNJ-372。

实施例 13 双抗突变体 ADCC 活性实验

报告基因法：将 NCI-H1975 细胞按照 5×10^4 个细胞每孔接种在 96 孔白板 (Costar 公司, 货号: 3917), CO_2 培养箱中孵育过夜。第二天从 CO_2 培养箱中取出 96 孔白板, 去除培养上清, 每孔加入 40 μl 用分析缓冲液 (RPMI-1640 培养基+2v/v%FBS) 稀释的抗体。E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q-LF、JNJ-372 和 anti-KLH IgG1 (起始浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 倍稀释, 10 个浓度梯度), 与靶细胞预孵育 30min。预孵育完成后, 每孔加入 40 μl 用分析缓冲液 (RPMI-1640 培养基+2v/v%FBS) 重悬的表达 NFAT-Luc 和 Fc γ RIIIa 的效应细胞 Jurkat ADCC (每孔 1×10^5 个细胞), 在 37°C 继续孵育 6h。最后加入底物 One-Lite (Vazyme 公司, 货号: DD1203-03) 并用酶标仪 (TECAN 公司, M1000 pro 型号) 检测荧光素酶信号, 荧光读值越高, ADCC 效应越强。通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的 ADCC 效应曲线。

LDH 法：首先复苏 PBMC 效应细胞备用, 并于 CO_2 培养箱中恢复过夜。靶细胞 NCI-H1975 消化、离心后, 弃掉上清, 用无酚红 RPMI Medium 1640 + 1v/v%FBS 培养基将细胞密度调整为 4×10^5 cells/ml。每孔加 50 μl 靶细胞至 96 孔低吸附板中 (Costar 公司, 货号: 7007)。接着用无酚红 RPMI Medium 1640 + 1%FBS 培养基稀释抗体。E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q-LF、JNJ-372 和 anti-KLH IgG1, 配成 4 $\times$ 分析浓度 (抗体起始浓度 66.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 倍稀释前 2 个浓度梯度; 5 倍稀释后 7 个浓度梯度) 每孔 50 μl 加入稀释好的抗体溶液, 轻轻吹打混匀几次后, 于培养箱中孵育 30min。取出复苏过夜的 PBMC, 将 PBMC 的密度调整为 5×10^6 cells/ml (效靶比为 25:1)。每孔加 100 μl PBMC 至 96 孔低吸附板中, 在 CO_2 培养箱中共培养 4h。在共培养时间结束前半小时, T_{max} 组按照每孔 20 μl 加入 LDH-cytotoxicity kit (BioVision 公司, 货号: K311-400) 中的 cell lysis buffer, 然后将 96 孔低吸附板放回培养箱中继续孵育。取出 96 孔低吸附板离心 (1500rpm $\times$ 5min), 每孔吸取 50 μl 培养上清到新的 96 孔平底板 (Corning 公司, 货号: 3599) 中, 再加入 50 μl 稀释好的 LDH-cytotoxicity kit 中的 Dye Solution, 置于摇床上避光孵育 10~30min, 最后用多功能酶标仪 (TECAN 公司, M1000 pro 型号) 读板和 GraphPad Prism 软件进行数据分析处理。杀伤计算公式为: $\text{ADCC \%} = [(\text{Sample} - \text{Buffer}) / (\text{T}_{\text{max}} - \text{T}_{\text{s}})] \times 100$ 。

如图 12D 所示, 在报告基因法实验中, E2mut1-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut12-91Q $\times$ M5-91Q-LF、E2mut13-91Q $\times$ M5-91Q-LF 均具有 ADCC 活性, EC_{50} 分别为 50.92ng/ml、53.05ng/ml、42.70ng/ml, 其 ADCC 活性稍弱于阳性对照 JNJ-372。

如图 12E 所示, 以 PBMC 为效应细胞, NCI-H1975 为靶细胞时,

E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 均具有 ADCC 活性，其 EC₅₀ 分别为 33.66ng/ml、11.95ng/ml、28.39ng/ml，其 ADCC 活性与阳性对照 JNJ-372 相当。而阴性对照 anti-KLH IgG1 不能引起 ADCC 效应。

实施例 14：双抗突变体内吞实验

将 MKN45 细胞消化、离心后，用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）重悬，按照每孔加入 2×10⁵ 个细胞接种在 96 孔圆底板（Corning 公司，货号：3799）中，加入用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）稀释好的抗体 E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 和 JNJ-372 (25μg/ml)在 4℃ 条件下孵育 30 min。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 200μl 完全培养基（RPMI-1640 培养基+10v/v%FBS）重悬细胞后，一分为二，一份继续放在 4℃ 条件下孵育 24h，另一份放在 37℃ 条件下孵育 24h。孵育时间结束后，离心弃掉上清，加入染色缓冲液配制的含 5%（v/v）的荧光二抗 goat anti-human IgG PE（SouthernBiotech，Cat#2040-09）在 4℃条件下避光孵育 30 分钟。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 PFA（Absin 公司，货号：abs9179）固定后在流式细胞仪（BD 公司，C6 PLUS 型号）上收集细胞，检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值，并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线得到 Top 值。内吞率的计算公式为：内化率（%）=(1-Top_{37℃}/Top_{4℃})×100。

结果如表 10 所示。

表 10：MKN45 细胞的内吞活性检测结果 2

组别	Top _{4℃}	Top _{37℃}	内化率，%
JNJ-372	1273	324	75
E2mut12-91Q×M5-91Q-LF	1228	200	84
E2mut13-91Q×M5-91Q-LF	1171	235	80

结果显示，E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 和 JNJ-372 均可被 MKN45 细胞内吞，三者的内吞活性相当，24h 的内吞率分别为 75%、84%和 80%。

将 PC-9 细胞消化、离心后，用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）重悬，按照每孔加入 2×10⁵ 个细胞接种在 96 孔圆底板（Corning 公司，货号：3799）中，加入用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）稀释好的抗体 E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF 和 JNJ-372 (25μg/ml)在 4℃ 条件下孵育 30 min。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 200μl 完全培养基（RPMI-1640 培养基+10v/v%FBS）重悬细胞后，一分为二，一份继续放在 4℃ 条件下孵育 24h，另一份放在 37℃

条件下孵育 24h。孵育时间结束后，离心弃掉上清，加入染色缓冲液配制的含 5‰（v/v）的荧光二抗 goat anti-human IgG PE（SouthernBiotech, Cat#2040-09）在 4℃条件下避光孵育 30 分钟。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 PFA（Absin 公司，货号：abs9179）固定后在流式细胞仪（BD 公司，C6 PLUS 型号）上收集细胞，检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值，并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线得到 Top 值。内吞率的计算公式为：内化率（%） $= (1 - \text{Top}_{37^{\circ}\text{C}} / \text{Top}_{4^{\circ}\text{C}}) \times 100$ 。

结果如表 11 所示。

表 11：PC-9 细胞的内吞活性检测结果

组别	Top_4℃	Top_37℃	内化率，%
JNJ-372	2284	425	81
E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF	2749	335	88
E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF	2992	403	87
E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF	3159	459	85

结果显示，E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF 和 JNJ-372 均可被 MKN45 细胞内吞，且内吞活性相当，24h 的内吞率分别为 88%、87%、85%和 81%。

将 NUGC4 细胞（内源表达人 EGFR 和人 cMet）和 BaF3-EGFR-cMet（过表达人 EGFR 和人 cMet）消化、离心后，用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）重悬，按照每孔加入 2×10^5 个细胞接种在 96 孔圆底板（Corning 公司，货号：3799）中，加入用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）稀释好的抗体 E2mut1-91Q×M5-91Q-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-LF、E2mut25-91Q×M5-91Q-LF 和 JNJ-372 (100μg/ml)在 4℃条件下孵育 30 min。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 200μl 完全培养基（RPMI-1640 培养基+10v/v%FBS）重悬细胞后，一分为二，一份继续放在 4℃条件下孵育 24h，另一份放在 37℃条件下孵育 24h。孵育时间结束后，离心弃掉上清，加入染色缓冲液配制的含 5‰（v/v）的荧光二抗 goat anti-human IgG PE（SouthernBiotech, Cat#2040-09）在 4℃条件下避光孵育 30 分钟。接着用染色缓冲液（PBS+1v/v%FBS）洗去未结合的抗体，用 PFA（Absin 公司，货号：abs9179）固定后在流式细胞仪（BD 公司，C6 PLUS 型号）上收集细胞，检测细胞表面结合的荧光抗体。用 FlowJo 分析原始数据得到 MFI 值，并用通过 GraphPad 拟合抗体剂量依赖性的结合曲线得到 Top 值。内吞率的计算公式为：内化率（%） $= (1 - \text{Top}_{37^{\circ}\text{C}} / \text{Top}_{4^{\circ}\text{C}}) \times 100$ 。

结果如表 12、13 所示。

表 12: NUGC4 细胞的内吞活性检测结果

组别	Top_4℃	Top_37℃	内化率, %
JNJ-372	7348	2949	60
E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF	5059	2356	53
E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF	5940	1958	67
E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF	5485	2377	57
E2mut25-91Q×M5-91Q-FAE-LF	6440	2050	68

表 13: BaF3-EGFR-cMet 细胞的内吞活性检测结果

组别	Top_4℃	Top_37℃	内化率, %
JNJ-372	13553	2608	81
E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF	24752	3907	84
E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF	18826	4428	76
E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF	18101	4804	73
E2mut25-91Q×M5-91Q-FAE-LF	14777	3578	76

结果显示，E2mut1-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut12-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut13-91Q×M5-91Q-FAE-LF、E2mut25-91Q×M5-91Q-FAE-LF 和 JNJ-372 均可被 NUGC4 细胞和 BaF3-EGFR-cMet 细胞内吞。

实施例 15: 双抗突变体 H1975 移植瘤模型

本实施例评价本发明 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF，ALK101-15Q-LF，ALK101-17Q-LF 和 ALK101-31Q-LF 对 NDG 小鼠移植人肺腺癌细胞 NCI-H1975 模型的抑制作用。ALK101-15Q-LF，ALK101-17Q-LF 和 ALK101-31Q-LF 选自表 8 中双特异性抗体。

1、测试过程

6-8 周龄雌性 NDG 小鼠（购自上海吉辉实验动物饲养有限公司，动物合格证编号：20170012022482），于右侧皮下接种 5×10^6 NCI-H1975 细胞。待平均肿瘤体积约为 125 mm^3 时，选取合适的动物，根据肿瘤体积随机分为 6 组，每组 6 只动物。分别为：

- G1 生理盐水对照组（溶剂对照组）；
- G2 JNJ-372（3 mg/kg）组（阳性对照组）；
- G3 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (3 mg/kg)组（治疗组）；

G4 ALK101-15Q-LF(3 mg/kg)组（治疗组）；
G5 ALK101-31Q-LF(3 mg/kg)组（治疗组）；
G6 ALK101-17Q-LF(3 mg/kg)组（治疗组）。

腹腔注射，每周给药 2 次，连续给药 2 周，初始给药 28 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，将小鼠安乐死，计算相对肿瘤增殖率， $TGI(\%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)] \times 100\%$ 。(Ti：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，T0：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V0：溶剂对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值)。

结果如表 14 和图 14 所示。

表 14：在 NCI-H1975 人源肺癌皮下肿瘤模型中各组药效分析表

实验组	开始给药后第 28 天		
	肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	P Value (相较于对照组)
G1, 生理盐水	2070±504	-	-
G2, JNJ-372, 3mg/kg	272±275	92.5	<0.001
G3, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF, 3mg/kg	223±158	95	<0.001
G4, ALK101-15Q-LF, 3mg/kg	600±652	75.6	0.001
G5, ALK101-31Q-LF, 3mg/kg	348±243	88.5	<0.001
G6, ALK101-17Q-LF, 3mg/kg	394±268	86.1	<0.001

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. $TGI\% = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)] \times 100\%$ ；

3. P 值由 T 检验方法比较各组肿瘤体积得到。

结果显示，在给药后第 28 天，生理盐水对照组平均肿瘤体积为 2070 mm³。JNJ-372(3 mg/kg)组的平均肿瘤体积为 272 mm³，与生理盐水对照组相比，肿瘤抑制率为 92.5%，显著抑制了肿瘤生长；E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (3 mg/kg)组平均肿瘤体积为 223 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 95.0%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-15Q-LF(3 mg/kg)组平均肿瘤体积为 600 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 75.6%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-31Q-LF(3 mg/kg)组平均肿瘤体积为 348 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 88.5%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-17Q-LF(3 mg/kg)组平均肿瘤体积为 394 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 86.1%，显著抑制肿瘤生长。结果表明，在 NDG 小鼠移植 NCI-H1975 模型中，在 3 mg/kg 的剂量水平，

E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF, ALK101-15Q-LF, ALK101-17Q-L 和 ALK101-31Q-LF 具有显著的肿瘤抑制作用。

实施例 16：双抗突变体 H1975(L858R/T790M/C797S)移植瘤模型

本实施例评价本发明 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF，ALK101-15Q-LF，ALK101-17Q-LF 和 ALK101-31Q-LF 对 NDG 小鼠移植人肺腺癌细胞 NCI-H1975(L858R/T790M/C797S)模型的抑制作用。

1、测试过程

6-8 周龄雌性 NDG 小鼠（购自上海吉辉实验动物饲养有限公司，动物合格证编号：20170012022482），于右侧皮下接种 5×10^6 NCI-H1975 细胞。待平均肿瘤体积约为 186 mm^3 时，选取合适的动物，根据肿瘤体积随机分为 6 组，每组 5 只动物。分别为：

- G1 生理盐水对照组（溶剂对照组）；
- G2 JNJ-372（2 mg/kg）组（阳性对照组）；
- G3 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (2 mg/kg)组（治疗组）；
- G4 ALK101-15Q-LF(2 mg/kg)组（治疗组）；
- G5 ALK101-31Q-LF(2 mg/kg)组（治疗组）；
- G6 ALK101-17Q-LF(2 mg/kg)组（治疗组）。

腹腔注射，每周给药 2 次，一共给药 5 次，初始给药 28 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，将小鼠安乐死，计算相对肿瘤增殖率， $TGI(\%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]\times100\%$ 。(Ti：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，T0：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V0：溶剂对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值)。

结果如表 15 和图 15 示。

表 15：在 H1975(L858R/T790M/C797S)人源肺癌皮下肿瘤模型中各组药效分析表

实验组	开始给药后第 28 天		
	肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$)	TGI (%)	P Value (相较于对照组)
G1, 生理盐水	1678±342	-	-
G2, JNJ-372, 2mg/kg	4±8	112.2	<0.001
G3, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF, 2mg/kg	7±10	112	<0.001
G4, ALK101-15Q-LF, 2mg/kg	9±14	111.9	<0.001

G5, ALK101-31Q-LF, 2mg/kg	6±13	112.1	<0.001
G6, ALK101-17Q-LF, 2mg/kg	0±0	112.5	<0.001

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. $TGI\% = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100\%$ ；

3. P 值由 T 检验方法比较各组肿瘤体积得到。

结果显示，在给药后第 28 天，生理盐水对照组平均肿瘤体积为 1678 mm³。JNJ-372(2 mg/kg)组的平均肿瘤体积为 4 mm³，与生理盐水对照组相比，肿瘤抑制率为 112.2%，显著抑制了肿瘤生长；E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (2 mg/kg)组平均肿瘤体积为 7 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 112.0%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-15Q-LF(2 mg/kg)组平均肿瘤体积为 9 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 111.9%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-31Q-LF(2 mg/kg)组平均肿瘤体积为 6 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 112.1%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-17Q-LF(2 mg/kg)组平均肿瘤体积为 0 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 112.5%，显著抑制肿瘤生长。结果表明，在 NDG 小鼠移植 NCI-H1975 (L858R/T790M/C797S) 模型中，在 2 mg/kg 的剂量水平，E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF，ALK101-15Q-LF，ALK101-17Q-L 和 ALK101-31Q-LF 具有显著的肿瘤抑制作用。

实施例 17：双抗突变体 H292 移植瘤模型

本实施例评价本发明 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF，ALK101-15Q-LF，ALK101-17Q-LF 和 ALK101-31Q-LF 对 NDG 小鼠移植人肺腺癌细胞 H292 模型的抑制作用。

1、测试过程

6-8 周龄雌性 NDG 小鼠（购自上海吉辉实验动物饲养有限公司，动物合格证编号：20170012022482），于右侧皮下接种 5×10⁶ H292 细胞。待平均肿瘤体积约为 223 mm³ 时，选取合适的动物，根据肿瘤体积随机分为 6 组，每组 5 只动物。分别为：

- G1 生理盐水对照组（溶剂对照组）；
- G2 JNJ-372（1 mg/kg）组（阳性对照组）；
- G3 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (1 mg/kg)组（治疗组）；
- G4 ALK101-15Q-LF(1 mg/kg)组（治疗组）；
- G5 ALK101-31Q-LF(1 mg/kg)组（治疗组）；
- G6 ALK101-17Q-LF(1 mg/kg)组（治疗组）。

腹腔注射，第 1 周给药 1 次，从第二周开始，每周给药 2 次，一共给药 6 次，初始给

药 28 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，将小鼠安乐死，计算相对肿瘤增殖率， $TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100\%$ 。(Ti：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，T0：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V0：溶剂对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值)。

结果如表 16 和图 16 示。

表 16：在 H292 人源肺癌皮下肿瘤模型中各组药效分析表

实验组	开始给药后第 28 天		
	肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	P Value (相较于对照组)
G1, 生理盐水	1713±960	-	-
G2, JNJ-372, 1mg/kg	625±854	73	0.095
G3, E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF, 1mg/kg	659±974	70.8	0.123
G4, ALK101-15Q-LF, 1mg/kg	1049±1832	44.6	0.493
G5, ALK101-31Q-LF, 1mg/kg	106±83	107.9	0.006
G6, ALK101-17Q-LF, 1mg/kg	152±119	104.7	0.007

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. $TGI\% = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100\%$ ；

3. P 值由 T 检验方法比较各组肿瘤体积得到。

结果显示，在给药后第 28 天，生理盐水对照组平均肿瘤体积为 1713 mm³。JNJ-372(1 mg/kg)组的平均肿瘤体积为 625 mm³，与生理盐水对照组相比，肿瘤抑制率为 73%，显著抑制了肿瘤生长；E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF (1 mg/kg)组平均肿瘤体积为 659 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 70.8%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-15Q-LF(1 mg/kg)组平均肿瘤体积为 1049 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 44.6%。ALK101-31Q-LF(1 mg/kg)组平均肿瘤体积为 106 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 107.9%，显著抑制肿瘤生长。ALK101-17Q-LF(1 mg/kg)组平均肿瘤体积为 152 mm³，与生理盐水组对照组相比，肿瘤抑制率为 104.7%，显著抑制肿瘤生长。结果表明，在 NDG 小鼠移植 H292 模型中，在 1 mg/kg 的剂量水平，E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF，ALK101-17Q-L 和 ALK101-31Q-LF 具有显著的肿瘤抑制作用。

实施例 18：双特异性抗体的热稳定性

DSF（差示扫描荧光技术）技术是基于蛋白内源荧光变化检测其蛋白变性的方法。当

蛋白质处于折叠状态时，其内部的疏水氨基酸如色氨酸在 330nm 处的发射光是要大于在其 350nm 处的发射光。当我们对蛋白进行加热或者化学变性剂处理时，蛋白质会发生去折叠并且色氨酸会暴露于液相环境中，此时最大发射光会发生位移，最终在 350nm 处的发射光会大于在 330nm 处的发射光，因此我们可以利用荧光值的变化来检测温度或者化学变性剂所引起的蛋白质去折叠的过程，从而计算出半数解链温度，即 T_m 值。设置 20℃作为起始温度和 95℃作为终止温度，升温速率为 1℃/min，考察双特异性抗体在缓冲体系（20mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲液，150mM 盐酸精氨酸，pH6.0)中的稳定性。

将双特异性抗体样品置换到上述缓冲体系中，控制样品浓度在 130mg/mL 左右，利用 nanoDSF 进行检测。结果见表 17，本申请提供的双特异性抗体 E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF、ALK101-15Q、ALK101-17Q 和 ALK101-31Q 的热转化温度(T_m)均在 62℃以上，表现了良好的热稳定性。

表 17：双特异性抗体的热稳定性

样品	T _m 1（℃）	T _m 2（℃）	T _m 3（℃）
E2mut34-91A×M5-91A-FAE-LF	67.2	78.6	/
ALK101-15Q	62.5	70.6	76.7
ALK101-17Q	62.4	67.8	75.6
ALK101-31Q	65.8	74.3	/

注：“/”代表不存在

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求 书

1. 抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 所述抗 EGFR 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3, 所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3, 其中:

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 26 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示, HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示; 并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示, LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 76 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中,

HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 至 SEQ ID NO: 36 中的任一序列所示。

3. 根据权利要求 1 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中,

所述抗 EGFR 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 10 中的任一序列; 并且

所述抗 EGFR 抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 77。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的抗 EGFR 或其抗原结合片段, 其中,

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 42所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 43所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 44所示;

或者

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9或10所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 77所示。

5. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述的抗EGFR抗体包括非-CDR区, 且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种, 例如来自人抗体。

6. 根据权利要求1至5中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段, 其中, 抗EGFR抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

7. 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗EGFR抗体的重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region或Ig gamma-4 chain C region; 轻链恒定区为Ig kappa chain C region或Ig lambda chain C region。

8. 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗EGFR抗体的重链恒定区序列选自SEQ ID NO: 79、80和81。

9. 根据权利要求1至8中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗EGFR抗体的重链选自SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74和75; 并且

所述抗EGFR抗体的轻链选自SEQ ID NO: 11、12、13和57。

10. 根据权利要求1至9中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段, 其中: 重链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示, 并且轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示;

或者

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74 或 75 所示, 并且轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

12. 分离的核酸分子, 其编码权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段。

13. 一种重组载体, 其包含权利要求 12 所述的分离的核酸分子。

14. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 12 所述的分离的核酸分子, 或者权利要求 12 所述的重组载体。

15. 一种药物组合物, 其包含有效量的权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 以及一种或多种药学上可接受的辅料。

16. 根据权利要求 15 所述的药物组合物, 其还包含有效量的抗 Met 抗体或其抗原结合片段;

优选地，所述抗 Met 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3，其中：

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示；或者 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示；

并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示，LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示，LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

17. 根据权利要求 15 至 16 中任一权利要求所述的药物组合物，其中，

所述抗 Met 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 55；并且

所述抗 Met 抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示；

优选地，其中所述的抗 Met 抗体：

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 或者 SEQ ID NO: 21 所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

18. 一种组合药物产品，包括独立包装的第一药物产品和第二药物产品，其中：

所述第一药物产品包含有效量的权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的辅料；

所述第二药物产品包含有效量的抗 Met 抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的辅料；

可选地，所述组合药物产品还包含产品说明书。

19. 根据权利要求 18 所述的组合药物产品，其中，

所述抗 Met 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3，其中：

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示；或者 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示；

并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示，LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示，LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

20. 根据权利要求 18 至 19 中任一权利要求所述的组合药物产品，其中，
所述抗 Met 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 55；并
且

所述抗 Met 抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示；

优选地，其中所述的抗 Met 抗体：

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 或者 SEQ ID NO: 21 所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

21. 双特异性抗体，其包括：

靶向 EGFR 的第一蛋白功能区，和

靶向不同于 EGFR 的靶点的第二蛋白功能区；

其中，所述第一蛋白功能区包含权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段的重链可变区；优选地，包含权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区。

22. 根据权利要求 21 所述的双特异性抗体，其中，

所述第二蛋白功能区包含抗 Met 抗体或其抗原结合片段的重链可变区；优选地包含抗 Met 抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区；

其中，所述抗 Met 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1 至 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1 至 LCDR3，其中：

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示；或者 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示；

并且

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示，LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示，LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

23. 根据权利要求 21 至 22 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，

所述抗 Met 抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 55；并
且

所述抗 Met 抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示；

优选地，其中所述的抗 Met 抗体：

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 或者 SEQ ID NO: 21 所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

24. 根据权利要求 21 至 23 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，
其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为单链抗体的融合蛋白或者半分子型单价抗体(IgG half molecule, IgG-HM)。

25. 根据权利要求 21 至 24 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，
所述第一蛋白功能区为半分子型单价抗体，和
所述第二蛋白功能区为半分子型单价抗体。

26. 根据权利要求 21 至 25 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，
所述第一蛋白功能区为靶向 EGFR 的半分子型单价抗体，和
所述第二蛋白功能区为靶向 Met 的半分子型单价抗体。

27. 根据权利要求 24 至 26 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，
所述的两种半分子型单价抗体的重链恒定区分别含第一 CH3 区和第二 CH3 区，第一 CH3 区与第二 CH3 区的序列不同，并且所述第一 CH3 区与第二 CH3 区之间的异二聚体相互作用强于所述第一 CH3 区与第二 CH3 区各自的同二聚体相互作用。

28. 根据权利要求 24 至 27 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，
所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人IgG1的重链恒定区，并且具有Knob突变（例如S354C和T366W突变）；和

所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人IgG1的重链恒定区，并且具有Hole突变（例如Y349C、T366S、L368A和Y407V突变）。

29. 根据权利要求 24 至 28 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，
所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区，并且按照 EU Numbering System，其中一个半分子型单价抗体重链恒定区的第 435 位突变为氨基酸 R，第 436 位突变为氨基酸 F。

30. 根据权利要求 24 至 29 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，
所述半分子型单价抗体的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区，并且按照 EU Numbering System，其中一个半分子型单价抗体重链恒定区的第 405 位突变为氨基酸 L，另外一个半分子型单价抗体重链恒定区的第 409 位突变为氨基酸 R。

31. 根据权利要求21至30中任一权利要求所述的双特异性抗体，其为IgG形式，优选为IgG1形式；

优选地，所述双特异性抗体中的各轻链的序列相同；

优选地，所述双特异性抗体具有两条序列相同的轻链；

优选地，所述双特异性抗体由如下肽链组成：

(1) 选自SEQ ID NO: 17至SEQ ID NO: 19，以及SEQ ID NO: 58至SEQ ID NO: 75中

的肽链，

(2) 选自SEQ ID NO: 16和SEQ ID NO: 20的肽链，以及

(3) 选自的肽链SEQ ID NO: 11至SEQ ID NO: 13，以及SEQ ID NO: 57中的肽链，

其中，(3) 中的肽链为相同的两个拷贝；

优选地，(1) 和 (2) 中肽链、(2) 和 (3) 中的肽链以及 (1) 和 (3) 中的肽链通过一个或多个二硫键（例如2个或3个二硫键）连接。

32. 根据权利要求21至31中任一权利要求所述的双特异性抗体，其由如下肽链组成：

SEQ ID NO: 17所示的肽链、SEQ ID NO: 16所示的肽链以及SEQ ID NO: 12所示肽链，其中SEQ ID NO: 12所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 17所示的肽链、SEQ ID NO: 16所示的肽链以及SEQ ID NO: 13所示肽链，其中SEQ ID NO: 13所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 18所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 12所示肽链，其中SEQ ID NO: 12所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 18所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 13所示肽链，其中SEQ ID NO: 13所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 19所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 12所示肽链，其中SEQ ID NO: 12所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 19所示的肽链、SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 13所示肽链，其中SEQ ID NO: 13所示肽链为相同的两个拷贝；

SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75任一所示的肽链，以及SEQ ID NO: 16所示的肽链以及SEQ ID NO: 57所示肽链，其中SEQ ID NO: 57所示肽链为相同的两个拷贝；

或者

SEQ ID NO: 17、18、19、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、或75任一所示的肽链，以及SEQ ID NO: 20所示的肽链以及SEQ ID NO: 57所示肽链，其中SEQ ID NO: 57所示肽链为相同的两个拷贝。

33. 分离的核酸分子，其编码权利要求21至32中任一权利要求所述的双特异性抗体。

34. 重组表达载体，其包含权利要求33所述的分离的核酸分子。

35. 重组宿主细胞，其包含权利要求34所述的重组表达载体，优选地，所述重组宿主细胞为重组的CHO-K1 细胞。

36. 一种药物组合物，其包含权利要求21至32中任一权利要求所述的双特异性抗体，以及一种或多种药学上可接受的辅料。

37. 权利要求1至11中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段或者权利要求22至33中任一权利要求所述的双特异性抗体在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤为EGFR和/或Met高表达的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为选自胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、胆道癌、支气管癌、淋巴瘤、卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、脑癌、甲状腺癌和头颈癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌。

38. 根据权利要求1至11中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段或者权利要求21至32中任一权利要求所述的双特异性抗体，其用于治疗或预防肿瘤；

优选地，所述肿瘤为EGFR和/或Met高表达的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为选自胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、胆道癌、支气管癌、淋巴瘤、卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、脑癌、甲状腺癌和头颈癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌。

39. 一种治疗或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求1至11中任一权利要求所述的抗EGFR抗体或其抗原结合片段或者权利要求21至32中任一权利要求所述的双特异性抗体的步骤；

优选地，所述肿瘤为EGFR和/或Met高表达的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为选自胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、胆道癌、支气管癌、淋巴瘤、卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、脑癌、甲状腺癌和头颈癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌。