抗 EGFR 和 HER3 双特异性抗体-药物偶联物及其用途

技术领域

本发明涉及抗 EGFR 和 HER3 双特异性抗体-药物偶联物 (Antibody-drug conjugate，ADC)，包含其的药物组合物，其用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症，特别是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤的用途，以及其用于制备治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症，特别是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤的药物中的用途。

背景技术

人表皮生长因子受体 (EGFR，也称为 ErbB1、HER1) 家族具有四个成员 EGFR、HER2、HER3 和 HER4。通过突变、扩增和过表达使每个成员解除调节(deregulation)在肿瘤发生和肿瘤转移中起重要作用。过表达与多种肿瘤的发展有关。通过阻断受体胞外结构域上的 EGFR 结合位点或通过抑制细胞内酪氨酸激酶活性来阻断 EGFR 信号传导可预防表达 EGFR 的肿瘤的生长并改善患者的病症。

HER3 (由 ErbB3 编码) 是 HER 蛋白受体家族成员，最初认为 HER3 没有激酶活性，但最近研究结果表明，HER3 是能够结合 ATP 并能促进胞内结构域磷酸化，但激酶活性相对较弱。研究发现 HER3 在 HER2/HER3 异二聚化和随后 PI3K/AKT 级联信号激活中发挥着重要作用，因此 HER3 近几年得到广泛的关注和研究。HER3 在多种癌症中过度表达，如胃癌、乳腺癌、结直肠癌和肺癌，HER3 表达情况与患者术后较差生存率存在相关关系。研究表明 MET 扩增可能是通过维持 HER3 介导 PI3K/AKT 信号传导而激活诱导 EGFR 靶向治疗耐药性；此外，HER3 不仅在多种癌症中会增强表达，而且还因其具有介导靶向治疗而引起的耐药性方面存在潜在功能，因此 HER3 是一个有潜力和吸引力的治疗性靶点。

现有技术中已经出现了同时靶向 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体-药物偶联物 ADC (BL-B01D1)，针对晚期实体肿瘤中显示出令人鼓舞的临床疗效。然而，该双特异性抗体-药物偶联物在 anti-EGFR 和 anti-HER3 两臂的活性差距较大，预计会造成其活性在 EGFR 高表达的肿瘤上内吞-杀伤活性较强，而在 EGFR 低表达但 HER3 高表达的肿瘤上内吞-杀伤活性很弱。这一缺陷限制了其在 EGFR 低表达 HER3 高表达肿瘤病人上的药效，减少了潜在的覆盖人群，也没有充分发挥双抗 ADC 的优势。此外，该双特异性抗体-药物偶联物还具有脱靶毒性，尤其是严重的血液相关毒性。严重的血液毒性会给受试病人带来痛苦，同时也限制了该双特异性抗体-药物偶联物在临床上的给药剂量进一步提升，导致药效无法进一步增强，同时靶向 EGFR、HER3 双抗原的优势无法充分体现出来。

因此，还需要开发更多的靶向 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体及双特异性抗体-药物偶联物，能够克服上述缺点，从而更好地治疗治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症，特别是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤或癌症。

现有技术中用于 ADC 偶联的方法大多数仍为随机偶联，包括半胱氨酸偶联与赖氨酸偶联等，这种偶联方式会造成 ADC 产物的不均一分布，如半胱氨酸偶联的平均 DAR 值为 4 的 ADC 会包含有 DAR0-DAR8 多种组分，即使是同一种 DAR 值的组分中仍然存在偶联在不同位点上的差异。而这些组分往往具有不同的性质，比如 DAR0 的组分会竞

争性与靶点结合，DAR8 组分由于偶联的疏水性药物较多，容易出现聚集从而在体内更容易被清除掉。这些组分分别对应的不同的药效与药代动力学特征使对不均一 ADC 这种混合物的 PK/PD 分析难度加大，并且需要较高的生产工艺才会生产出批次相对稳定的 ADC 产品。

因此，还需要新颖的抗体改造技术，基于该技术获得的抗体在构建 ADC 时能够实现 ADC 具有更强的稳定性和更强的药效。

发明内容

本发明基于发明人开发出的靶向 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体以及双特异性抗体-药物偶联物，具有相对于现有技术更强的稳定性和更强的抗肿瘤活性。

在一些实施方案中，本发明特别的针对靶向 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体的恒定区进行了半胱氨酸改造，以使得所述抗体或其抗原结合片段在其重链或轻链上将某个或某几个氨基酸突变为半胱氨酸。本发明的双特异性抗体在恒定区较为隐蔽的位点具有半胱氨酸突变，从而为包含其的抗体-药物偶联物带来更好的稳定性和/或亲水性。

因此，本发明的靶向 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体-药物偶联物特别适用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症，特别是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤。

在一方面，本发明提供了一种抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其包括

重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；以及

重链恒定区和轻链恒定区，其中

所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括突变为半胱氨酸的一个或多个突变，例如选自以下突变中的一个或多个突变：重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸、重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸。

在另一方面，本发明提供了一种具有式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_n \quad (\text{Ⅰ})$$

其中，

Ab 是本发明所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，

L 是连接子，

D 是细胞毒性化合物，

n 表示连接数，且 n 是选自 1-15 的自然数。

在再一方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，和药学上可接受的载体或辅料。

在再一方面，本发明提供了本发明所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物在制备用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症的药物中的用途。

在再一方面，本发明提供了本发明所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其用于疗法，例如用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症。

在再一方面，本发明提供了本发明所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症的用途。

在再一方面，本发明提供了一种治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症的方法，该方法包括向受试者施用有效量的本发明所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物。

与现有技术相比，本发明提供的靶向 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体-药物偶联物具有以下优点：

(1) 对 EGFR 和 HER3 都具有很强的亲和力，并展现出分别与 anti-EGFR 和 anti-HER3 单抗相当的内吞活性，使得双抗 ADC 分子在各种不同 EGFR 和 HER3 表达量的肿瘤都可以有很强的内吞和杀伤活性，克服传统 ADC 普遍存在的高度异质性肿瘤中的局限性，可以扩大 EGFR/HER3 双抗 ADC 分子在临床上的适用范围，在 EGFR 低表达 HER3 中/高表达的肿瘤病人上可获得更强的药效；

(2) 采用定点偶联的 linker-payload 偶联方法，可以显著增加 ADC 分子的均一性及 linker-payload 的稳定性，同时因为同一个分子上 linker-payload 数量的减少，整个 ADC 分子的疏水性可以明显降低，其体内 PK 将获得明显改善，最终带来更强的药效；定点偶联带来的 linker-payload 稳定性的提高，将显著减少小分子毒素在肿瘤外的非特异性脱落，预计将明显改善双抗 ADC 分子在临床上的安全性，尤其是减少与游离小分子相关的毒性，如血液毒性等；

(3) 抗体分子的 Fc 部分采用 IgG1LALA 设计，破坏了其与 FcYR 的结合能力，减少了 ADC 分子的非肿瘤特异性结合，预计将明显改善双抗 ADC 分子在临床上的安全性，尤其是减少血液毒性。

附图说明

图 1 示出了 Duligo-LC1-NT3 的分子结构。

图 2 示出了 Duligo-LC1-NT3 的 RP-HPLC 分析结果。

图 3 示出了 Duligo-LC1-NT3 的 SEC 分析结果。

图 4 示出了 SIB001-DXd 的分子结构。

图 5 示出了 SIB001-DXd 的 RP-HPLC 分析结果。

图 6 示出了 SIB001-DXd 的 SEC 分析结果。

图 7 示出了 Patritumab-DXd 的分子结构。

图 8 示出了 Patritumab-DXd 的 RP-HPLC 分析结果。

图 9 示出了 Patritumab-DXd 的 SEC 分析结果。

图 10 示出了 Duligo-DXd 的分子结构。

图 11 示出了 Dulgio-DXd 的 RP-HPLC 分析结果。

图 12 示出了 Duligo-DXd 的 SEC 分析结果。

图 13 示出了 IgG1LALA-NT3 (DAR=8) 的分子结构。

图 14 示出了 IgG1LALA-NT3 (DAR=8) 的 RP-HPLC 分析结果。

图 15 示出了 IgG1LALA-NT3 (DAR=8) 的 SEC 分析结果。

图 16 示出了 IgG1LALA-NT3 (DAR=4) 的分子结构。

图 17 示出了 IgG1LALA-NT3 (DAR=4) 的 RP-HPLC 分析结果。

图 18 示出了 IgG1LALA-NT3 (DAR=4) 的 SEC 分析结果。

图 19 示出了 IgG1LALA-DXd 的分子结构。

图 20 示出了 IgG1LALA-DXd 的 RP-HPLC 分析结果。

图 21 示出了 IgG1LALA-DXd 的 SEC 分析结果。

图 22 示出了 Duligo-LC1-NT3 在小鼠和猴血浆中的稳定性，用 RP-HPLC 方法分析。

图 23 示出了 Duligo-LC1-NT3 在小鼠和猴血浆中的稳定性，用 LC-MS 方法分析。

图 24 示出了不同肿瘤细胞系上 EGFR&HER3 的表达量检测。

图 25 示出了 Duligotuzumab、Cetuximab、Patritumab 分子在人胰腺癌细胞 AsPC1 上的 Fab-ZAP 内吞-杀伤。

图 26 示出了 Duligotuzumab、Cetuximab、Patritumab 分子在人胃癌细胞 NUGC4 上的 Fab-ZAP 内吞-杀伤

图 27 示出了 Duligotuzumab、Cetuximab、Patritumab 分子在中国仓鼠卵巢细胞 CHO-HER3 上的 Fab-ZAP 内吞-杀伤

图 28 示出了 Duligo-DXd 和 SIB001-DXd 在人乳腺癌细胞 MCF7 上的体外杀伤。

图 29 示出了 Duligo-DXd 和 SIB001-DXd 在人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 上的体外杀伤。

图 30 示出了 Duligo-DXd 和 SIB001-DXd 在人结直肠癌细胞 GP2D 上的体外杀伤。

图 31 示出了 Duligo-DXd 和 SIB001-DXd 在人肺癌细胞 H1568 上的体外杀伤。

图 32 示出了 Duligo-DXd 和 SIB001-DXd 在过表达 HER3 的人结直肠癌细胞 SW480 上的体外杀伤。

图 33 示出了 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 在人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 上的体外杀伤。

图 34 示出了 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 在人肺癌细胞 HCC95 上的体外杀伤。

图 35 示出了 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 在人肺癌细胞 H1568 上的体外杀伤。

图 36 示出了 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 在人结直肠癌细胞 H508 上的体外杀伤。

图 37 示出了 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 在人胰腺癌细胞 AsPC1 上的体外杀伤。

图 38 示出了 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 在过表达 HER3 的人结直肠癌细胞 SW480 上的体外杀伤。

图 39 示出了 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 在过表达 HER3 的人肺癌细胞 H1703 上的体外杀伤。

图 40 示出了 ELISA 检测 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 对 EGFR 的亲和力。
图 41 示出了 ELISA 检测 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 对 EGFR 的亲和力。
图 42 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 H508 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。
图 43 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子对小鼠体重变化的影响。
图 44 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 NUGC-4 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。
图 45 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 NUGC-4 荷瘤小鼠模型上的体重变化。
图 46 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 SW620 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。
图 47 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 SW620 荷瘤小鼠模型上的体重变化。
图 48 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 ASPC1 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。
图 49 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 ASPC1 荷瘤小鼠模型上的体重变化。
图 50 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 NCI-H1568 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。
图 51 示出了 EGFR/HER3-ADCs 分子在 NCI-H1568 荷瘤小鼠模型上的体重变化。

具体实施方式

现在将详述某些实施方案，其实例在随附的具体实施方式中说明。虽然将描述列举的实施方案，但应理解它们并非旨在将本发明限制于这些实施方案。相反，本发明旨在涵盖所有可选方案、修改和等同方案，它们可以包括在由权利要求限定的本发明的范围内。本领域技术人员将认识到许多与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料，它们可用于本发明的实践。本发明决不限于所描述的方法和材料。如果一个或更多个并入的文献和类似材料与本发明不同或相矛盾，包括但不限于定义的术语、术语用法、描述的技术等，以本发明为准。

可以理解，本发明的某些特征，为了清楚，在单独实施方案的背景下进行描述，也可以在单个实施方案中组合提供。相反，为了简洁，在单个实施方案的背景下描述的本发明的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供。

I. 定义

除非另有说明，本发明所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术员通常所理解的含义。

术语“或”是指列举的可选择要素中的单个要素，除非上下文明确地另外指出。术语“和/或”是指所列举的可选择要素中的任意一个、任意两个、任意三个、任意更多个或其全部。

如本文所用，术语“约”表示给定数值的±10％或 5%、4%、3%、2%或 1%范围内的值。

如本文所用，术语“包含”、“含有”、“具有”以及类似的表述表示不排除未列举的要素。这些术语也包括仅由所列举的要素组成的情形。

如本文所用，术语“HER3” (人表皮生长因子受体 3，也称为 ErbB3) 是受体蛋白酪氨酸激酶，并且属于受体蛋白酪氨酸激酶的表皮生长因子受体 (EGFR) 亚家族，其还包括 HER1 (也称为 EGFR)、HER2 和 HER4。HER3 是跨膜受体，并且由细胞外配体结合结构域 (ECD)、ECD 内的二聚结构域、跨膜结构域和胞内蛋白酪氨酸激酶结构域 (TKD) 及 C 末端磷酸化结构域构成。已发现 HER3 在若干类型的癌 (例如胃癌、乳腺癌、结直肠癌和肺癌) 中过表达。已示出 HER2/HER3 的表达与从非侵袭进展至侵袭阶段之间的关联。

如本文所用，术语“抗体”以它的最广泛意义使用，包括包含一个或更多个特异性结合抗原的抗原结合结构域的免疫球蛋白或其他类型分子，为对特定抗原表现出结合特异性的蛋白质或多肽。抗体的具体实例可包括完整抗体 (例如经典四链抗体分子)、单链抗体、单域抗体、多特异性抗体等。经典抗体分子通常为由 2 个相同重链和 2 个相同轻链通过二硫键相互连接组成的四聚体。根据氨基酸序列的保守性差异，将重链和轻链分为位于氨基端的可变区 (V) 和位于羧基端的恒定区 (C)。可变区用于识别和结合抗原，恒定区 (如 Fc 片段) 用于启动下游效应，比如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。在重链和轻链的可变区内，分别有三个局部区域的氨基酸组成和排列顺序具有更高的变异程度，为抗体与抗原结合的关键位置，因而也称为互补决定区 (CDR)。在本文中，三个重链互补决定区分别称为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，三个轻链互补决定区分别称为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，CDR 的氨基酸序列可以使用本领域公认的编号方案，例如 Kabat、Chothia、IMGT、AbM 或 Contact 容易地确定，例如在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各个 CDR 的氨基酸序列可以由上述任一种编号方案中的一种确定，也可以各自独立地分别由上述任一种编号方案中的任一种确定。除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

根据抗体重链恒定区的氨基酸序列，可将抗体分为五种主要的不同类型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。这些抗体类型根据铰链区的大小，链间二硫键的位置和分子量的不同可进一步分为亚类，例如，IgGl、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 等。根据抗体轻链恒定区氨基酸组成和排列的不同，可将轻链分为 κ 和 λ 两种类型。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构象在本领域内是已知的。

如本文所用，用于提及抗体除可变区之外的结构域 (例如恒定区，例如 Fc 区) 中的氨基酸位置时，根据 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interes, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系 (也称作 EU 索引) 进行编号。当将位置编号和/或氨基酸残基赋予特定抗体同种型时，其旨在适用于任何其它抗体同种型的相应的位置和/或氨基酸残基，这是本领域技术人员已知的。

关于人免疫球蛋白轻链和重链的一般信息在 Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中给出。

待突变为半胱氨酸的氨基酸位置一般用“链类型，突变位置”来表示。在本文中，如无特殊说明，则 LLC 代表 λ (lambda) 轻链，LC 代表 κ (kappa) 轻链，HC 代表重链。因此，“LLC160”是指 λ 轻链的 EU 编号位置第 160 位，例如该位置的氨基酸突变为半胱氨酸。在本发明提及重链氨基酸位置时，如无明确说明，是指根据 IgG1 重链编号的氨基酸位置，即其涵盖基于 IgG1 重链编号的氨基酸位置，以及在其他重链上对应于所述氨基酸位置的氨基酸位置。例如，在提及 HC118 时，是指 IgG1 重链的 EU 编号位置第 118 位，还涵盖 IgG1 之外的 IgG 同种型对应于该 IgG1 第 118 位氨基酸的位置。当述及突变组合时，组合的突变之间用短折号(-)连接。“LLC160-LLC166”表示 λ 轻链的 EU 编号位置第 160 位和第 166 位，该两个位置的氨基酸同时突变为半胱氨酸。

如本文所用，抗体的“抗原结合片段”指抗体分子中参与抗原特异性结合的氨基酸片段，例如，Fab、Fab’和 $F(ab')_2$ 等。本领域技术人员已知如何获得这些抗原结合片段。例如，经典抗体分子可经木瓜蛋白酶消化而得到 Fab 片段，经胃蛋白酶消化得到 $F(ab')_2$，通过以还原剂处理断开 $F(ab')_2$ 铰链区之间的二硫键而形成 Fab’片段。

如本文所用，术语“单链抗体 (single chain fragment variable，scFv)”，是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接成一条肽链而构成。通过正确折叠，来自重链和轻链的可变区通过非共价键相互作用形成 Fv 段，因而 scFv 能较好地保留其对抗原的亲和活性。

如本文所用，术语“单域抗体 (single domain antibody，sdAb)”，或者也称为“VHH 抗体”，指具有抗原结合能力，包括重链可变区而无轻链的抗体分子。从结构上看，单域抗体也可以认为是经典四链抗体分子的片段。单域抗体首先在骆驼科动物中被发现，随后，研究人员通过抗体库 (例如噬菌体展示文库) 筛选发现了更多的具有抗原结合能力的单域抗体。单域抗体相对于普通抗体分子 (例如，经典抗体分子) 具有一些优势，例如包括但不限于：分子量更小，使用于人体时易于到达普通抗体分子难以到达的组织或部位，或者，能够接触到蛋白或多肽中普通抗体分子难以接触到的抗原表位；更加稳定，能够耐受例如温度和 pH 的变化以及变性剂和蛋白酶的作用。

如本文所用，术语“Fc 片段”指 Y 形经典抗体分子的柄部区域，即可结晶片段 (fragmentcrystallizable，Fc)，包括重链的第二和第三恒定结构域 (CH2 和 CH3 结构域)。可通过蛋白水解酶 (如木瓜蛋白酶) 水解抗体分子得到抗体 Fc 区。在一些实例中，Fc 区可包含铰链、CH2 和 CH3。当 Fc 区包含铰链时可介导两个含 Fc 的多肽之间的二聚化。Fc 片段可来自 IgG、IgM、IgD、IgE 或 IgA。在一些实例中，Fc 区来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。“Fc 片段”还包括来自天然 Fc 片段，经改动但仍保持其效应功能的变体 Fc 片段。“变体 Fc 片段”包含在天然 Fc 片段的氨基酸序列上具有至少一个氨基酸变动的氨基酸序列。在一些实例中，变体 Fc 片段相比于亲本 Fc 片段 (天然 Fc 片段) 具有至少一个氨基酸取代，例如在亲本 Fc 片段中约 1 至约 10 个氨基酸被取代，且优选约 1 至约 5 个氨基酸取代。在一些实例中，变体 Fc 片段 Fc 区与亲本 Fc 片段具有至少约 80%序列一致性、至少约 90%序列一致性、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%或至少约 99%序列一致性。“Fc 片段”的效应功能可包括与 Fc 受体的结合、Clq 结合和补体依赖性细胞毒性 (CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、介导吞噬作用等。

如本文所用，术语“鼠抗体”指可变区和恒定区 (如果有的话) 衍生自小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗体。鼠抗体可方便地以相应抗原免疫小鼠或大鼠并从其分离目的抗体而获得。或者，在以相应抗原免疫小鼠或大鼠后，分离并培养表达目的抗体的细胞 (如 B 细胞) 而获得。又或者，在以相应抗原免疫小鼠或大鼠后，分离并培养表达目的抗体的细胞，将其与永生化细胞如骨髓瘤细胞融合而获得杂交瘤细胞，培养杂交瘤细胞则可长期和大量获得目的抗体 (如单克隆抗体)。在一些实施方案中，所述“鼠抗体”是小鼠抗体。“人源化抗体”是指对非人抗体，即可变区和恒定区 (如果有的话) 非衍生自人免疫球蛋白的抗体进行人为改造以使其含有人抗体的氨基酸序列，由此获得的嵌合抗体。人源化抗体可以包含人抗体的恒定区和/或骨架区。人源化抗体可以通过基因工程手段获得，例如以人抗体的恒定区替换鼠抗体的恒定区和/或以人抗体的骨架区替换鼠抗体的骨架区。

这种人源化改造通常不影响原抗体与对应抗原的结合特异性，因此这样的抗原也包括在本发明的范围内。

如本文所用，术语“单克隆抗体”指均一的、仅针对某一特定抗原表位的抗体。与典型地包括针对不同抗原决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体相比，每种单克隆抗体针对抗原上的单个抗原决定簇。修饰语“单克隆”表示抗体的均一特征，不解释为需要通过任何特定方法产生的抗体。本发明的单克隆抗体可通过本领域公知的杂交瘤方法或重组 DNA 方法产生，或通过本文其它地方描述的筛选方法获得。

如本文所用，术语“纯化标签”指有助于从表达目的多肽或蛋白的细胞培养物或上清液中分离该目的多肽或蛋白的氨基酸序列。其实例包括但不限于 His6 标签、Flag 标签、MBP 标签、GST 标签、SUMO 标签等。

对于抗体或其抗原结合片段来说，“结合”、“针对”或“特异性结合”指，相对于环境中同时存在的其他分子，一种分子 (例如抗体或其抗原结合片段) 对另一种分子 (如抗原) 具有更高的结合亲和力。一种分子可以结合、针对或特异性结合一种以上的分子，例如双特异性抗体可以对两种不同抗原具有相对于其他分子而言更高的结合亲和力。可以通过一些参数测量来衡量抗体对抗原的结合亲和力，例如抗体与抗原结合的 EC50 值或 KD 值。

EC_{50} (concentration for 50％of maximal effect) 指引起 50％最大效应的浓度。在酶联免疫吸附测定(ELISA)中用于表示抗体分子与对应抗原的结合能力时，可指产生最大检测信号 (如比色或荧光强度) 一半时的抗体分子浓度。EC50 值越低，则与抗原的结合亲和力越大。

KD 值也可以用于衡量抗体与其抗原之间的结合亲和力。KD 值是抗体与其抗原之间的平衡解离常数，即 koff/kon 的比值。因此 KD 值越低 (浓度越低)，抗体的亲和力越高。

如本文所用，术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用且指氨基酸残基的聚合物。氨基酸残基的此类聚合物可含有天然或非天然氨基酸残基且包括但不限于氨基酸残基构成的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。全长蛋白与其片段皆涵盖于该定义中。该术语亦包括多肽的表达后修饰，例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化和类似修饰。此外，出于本发明的目的，“多肽”指一种蛋白质，其包括对天然序列的修饰，诸如缺失、添加和取代(实际上通常为保守的)，只要该蛋白质保持所需活性即可。这些修饰可为有目的的，如经由定点突变诱发；或可为偶然的，诸如经由产生蛋白质的宿主的突变或因 PCR 扩增所致的误差。

如本文所用，术语“功能性变体”指，在母体蛋白分子或亲本蛋白分子 (例如天然蛋白分子) 基础上引入一个或多个氨基酸插入、缺失或替换后所获得的变体分子，其仍然保留了母体蛋白分子的至少部分功能(尤其是所关注的功能，例如与对应抗原的结合能力)。例如，抗体分子的功能性变体可保留其母体分子对抗原结合能力的至少 20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％，或甚至具有比起母体分子更高的结合能力。在一些实施方案中，抗体分子的功能性变体可保留其母体分子对抗原结合亲和力的至少 80％、85％、90％、95％或甚至 100％或以上。对于抗体分子或其抗原结合片段来说，功能性变体通常包括在可变区骨架序列和/或恒定区存在氨基酸改变，但并不排除可对 CDR 区序列进行一个或少数几个氨基酸改动。

如本文所用，术语“核酸分子”、“核酸”和“多核苷酸”可互换使用，指核苷酸聚合物。此类核苷酸聚合物可含有天然和/或非天然核苷酸且包括 (但不限于) DNA、RNA 和 PNA。“核酸序列”指包含于核酸分子或多核苷酸中的核苷酸线性序列。

如本文所用，术语“载体”指可经工程改造以含有目的多核苷酸 (例如目的多肽的编码序列) 的核酸分子或可在宿主细胞中复制的核酸分子 (例如，核酸、质粒、或病毒等)。载体可包括以下组件中的一个或更多个：复制起点、一或更多个调控目的多核苷酸的表达的调控序列 (诸如启动子和/或增强子) 和/或一个或更多个可选择标记物基因 (诸如抗生素抗性基因和可用于比色分析中的基因，例如β-半乳糖)。术语“表达载体”指用于在宿主细胞中表达目的多肽的载体。

如本文所用，术语“宿主细胞”指可为或已为载体或经分离多核苷酸的接受体的细胞。宿主细胞可为原核细胞或真核细胞。示例性真核细胞包括哺乳动物细胞，诸如灵长类动物或非灵长类动物细胞；真菌细胞，诸如酵母；植物细胞；以及昆虫细胞。非限制性示例性哺乳动物细胞包括 (但不限于) CHO 细胞、HEK-293 细胞、BHK 细胞或 PER-C6 细胞，以及其衍生细胞，诸如 293-6E、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-S 和 CHO-DS 细胞。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代，且后代可能由于自然、偶然或故意突变而不一定与原始亲代细胞完全一致 (在形态或基因组 DNA 互补方面)。宿主细胞可以分离的细胞或细胞系，也包括在活体内经本文提供的核酸分子或表达载体转染的细胞。

当提及氨基酸或核苷酸序列时，术语“序列同一性 (sequence identity)” (也称为“序列一致性”) 指两氨基酸或核苷酸序列 (例如查询序列和参照序列) 之间一致性程度的量，一般以百分比表示。通常，在计算两氨基酸或核苷酸序列之间的一致性百分比之前，先进行序列比对 (alignment) 并引入缺口 (gap)(如果有的话)。如果在某个比对位置，两序列中的氨基酸残基或碱基相同，则认为两序列在该位置一致或匹配；两序列中的氨基酸残基或碱基不同，则认为在该位置不一致或错配。在一些算法中，用匹配位置数除以比对窗口中的位置总数以获得序列一致性。在另一些算法中，还将缺口数量和/或缺口长度考虑在内。常用的序列对比算法或软件包括 DANMAN、CLUSTALW、MAFFT、BLAST、MUSCLE 等。出于本发明的目的，可以采用公开的比对软件 BLAST (可从 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/获得)，通过使用缺省设置来获得最佳序列比对并计算出两氨基酸或核苷酸序列之间的序列一致性。

如本文所用，术语“脂烃基”是指取代或未取代的直链、支链和/或环状的，饱和或不饱和的仅由碳原子和氢原子组成且通过单键与分子的其余部分连接的基团，包括直链的、支链的、环状的或其组合的烷基、烯基和炔基。在一些实施方案中，术语“脂烃基”可以和“脂肪族基团”互换使用。在一些实施方案中，脂烃基包含一个或多个，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个不饱和碳碳双键 (-C=C-)、碳碳三键 (-C≡C-) 基团，和/或其任意组合。烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基和环炔基均如下文所定义。在本发明中，脂烃基是指烷基、烯基、炔基、环烷基和/或环烯基，优选是指烷基和/或环烷基。脂烃基上的氢均可任选地被适宜的任何基团取代，例如卤素、羟基、氨基、单取代氨基、二取代氨基、烷氧基、杂环基等等。术语“亚脂烃基”是指二价取代的脂烃基，其由脂烃基上的一个氢原子被价键取代而形成，术语“亚烷基”、“亚烯基”、“亚炔基”、“亚环烷基”、“亚环烯基”和“亚环炔基”具有类似的含义。

如本文所用，作为独立的基团或其它基团的一部分，术语“烷基”意指仅由碳原子和氢原子组成、不含不饱和键且通过单键与分子的其余部分连接的直链或支链的基团。烷基可以具有例如 1 至 18 个、优选 1 至 12 个、更优选 1 至 8 个碳原子。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、2-戊基、己基、正己基、庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、辛基、壬基和癸基等，优选甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基，更优选甲基、乙基、丙基和异丙基。烷基上的氢可任选地被适宜的任何基团取代，例如卤素、羟基、氨基、单取代氨基、二取代氨基、烷氧基、杂环基等等。

如本文所用，作为独立的基团或其它基团的一部分，术语“烯基”意指仅由碳原子和氢原子组成、含有至少一个双键、具有例如 2 至 18 个、优选 2 至 10 个、更优选 2 至 8 个碳原子且通过单键与分子的其余部分连接的直链或支链的烃链基团，包括但不限于乙烯基、丙烯基、烯丙基、丁-1-烯基、丁-2-烯基、戊-1-烯基、戊-2-烯基、戊-1,4-二烯基等，优选乙烯基、丙烯基。烯基上的氢可任选地被适宜的任何基团取代，例如卤素、羟基、氨基、单取代氨基、二取代氨基、烷氧基、杂环基等等。

如本文所用，作为独立的基团或其它基团的一部分，术语“炔基”意指仅由碳原子和氢原子组成、含有至少一个三键和任选的一个或多个双键、具有例如 2 至 18 个、优选为 2 至 10 个、更优选 2 至 8 个碳原子且通过单键与分子的其余部分连接的直链或支链的烃链基团。炔基的实例包括但不限于乙炔基、丙-1-炔基、戊-1-烯-4-炔基等。炔基上的氢可任选地被适宜的任何基团取代，例如卤素、羟基、氨基、烷氧基、杂环基等等。

如本文所用，作为独立的基团或其它基团的一部分，术语“环烷基”意指仅由碳原子和氢原子组成的稳定的饱和的非芳香族单环或多环烃基，其可包括稠合环体系或桥环体系，具有例如 3 至 15 个、优选 3 至 10 个、更优选 3 至 8 个碳原子，例如 3 至 6 个或 5 至 6 个碳原子，且经由环上任何适宜的碳原子通过单键与分子的其余部分连接。环烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、二环[2.2.1]庚基、7,7-二甲基-二环[2.2.1]庚基、二环[2.2.2]辛基、二环[3.1.1]庚基、二环[3.2.1]辛基、和金刚烷基等，优选环丁基、环戊基、环己基。环烷基上的氢可任选地被适宜的任何基团取代，例如卤素、羟基、氨基、单取代氨基、二取代氨基、烷基、烷氧基、杂环基等等。

如本文所用，作为独立的基团或其它基团的一部分，术语“环烯基”意指仅由碳原子和氢原子组成的、含有至少一个双键的稳定的非芳香族单环或多环烃基，其可包括稠合环体系或桥环体系。其具有例如 3 至 15 个、优选 3 至 10 个、更优选 3 至 8 个碳原子例如 3 至 6 个或 5 至 6 个碳原子，且经由环上任何适宜的碳原子通过单键与分子的其余部分连接。环烯基的实例包括但不限于环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、1,3-环己二烯、1,4-环己二烯、1H-茚基、2,3-二氢化茚基、1,2,3,4-四氢-萘基、5,6,7,8-四氢-萘基、8,9-二氢-7H-苯并环庚烯-6-基、6,7,8,9-四氢-5-氢-苯并环庚烯基、5,6,7,8,9,10-六氢-苯并环辛烯基、芴基、二环[2.2.1]庚烯基、二环[2.2.2]辛基、二环[2.2.2]辛烯基、二环[3.2.1]辛烯基、八氢-4,7-亚甲基-1-氢-茚基和八氢-2,5-亚甲基-并环戊二烯基等。环烯基上的氢可任选地被适宜的任何基团取代，例如卤素、羟基、氨基、单取代氨基、二取代氨基、烷基、烷氧基、杂环基等等。

如本文所用，作为独立的基团或其它基团的一部分，术语“环炔基”意指仅由碳原子和氢原子组成的、含有至少一个三键的稳定的非芳香族单环或多环烃基，其可包括稠合

环体系或桥环体系。其具有例如 3 至 15 个、优选 3 至 10 个、更优选 3 至 8 个碳原子例如 3 至 6 个或 5 至 6 个碳原子，且经由环上任何适宜的碳原子通过单键与分子的其余部分连接。环炔基的实例包括但不限于环丁炔基、环戊炔基、环己炔基等。环炔基上的氢可任选地被适宜的任何基团取代，例如卤素、羟基、氨基、单取代氨基、二取代氨基、烷基、烷氧基、杂环基等等。

如本文所用，术语“杂脂烃基”是指含有选自 N、O 和 S 的杂原子的取代或未取代的直链、支链和/或环状的，饱和或不饱和的碳氢化合物基团，包括直链的、支链的、环状的或其组合的烷基、烯基和炔基。在一些实施方案中，术语“杂脂烃基”可以和“杂脂肪族基团”互换使用。在一些实施方案中，杂脂烃基中包含的杂原子可以与碳原子一起构成杂脂肪族基团的主链，例如但不限于-C-N-C-、-C-O-C-、-C-O-O-C、-C-S-C-、-C-S-S-C 等基团结构或其任意组合。在一些实施方案中，杂脂烃基中包含的杂原子可以是连接在碳原子上的取代基，例如但不限于-C≡N、-C=N-、-C-N=、-C=O、-C-OH、-C=S、-C-SH 等取代结构。在一些所述实施方案中，杂脂烃基中包含的杂原子可以是上述所列基团结构的任意组合。在一些实施方案中，杂脂肪族基团包含一个或多个，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个不饱和碳碳双键 (-C=C-)、碳碳三键 (-C≡C-)、、-NH-、-NH_2-、OH、-OR^m、-O-、-C(O)-、-C(OR^n)-、-C(O)O-、-SH、-SR^o、-S-、-C(S)-、-C(SR^p)-、-C(S)O-、-P(O)-，和/或其任意组合，其中 R^m、R^n、R^o 和 R^p 各自独立地为经取代或未取代的 C_1-C_{14} 的脂烃基，例如 C_1-C_{12}、C_1-C_{10}、C_1-C_8、C_1-C_6、C_1-C_4 脂烃基，经取代或未取代的 C_1-C_{14} 脂烃基的非限制性具体实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基和异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、新戊基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、亚乙基(乙烯基)、丙烯基、丁烯基、戊烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基、5-己烯基、乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基等。

如本文所用，术语“芳基”或“芳环”是指具有至少一个芳环的单环、双环或多环碳环系统。除非另有说明，否则芳基可以是 6 至 10 元。在某些实施方案中，芳基基团可以含有 6 个成环碳原子。碳环芳基基团内的所有原子均是碳原子。芳基基团的非限制性实例包括苯基、萘基、1,2-二氢萘基、1,2,3,4-四氢萘基、芴基、茚满基、茚基等。在本发明的背景下，术语“芳基”和“芳环”可以互换使用。

如本文所用，术语“脂烃氧基”是指基团-O-脂烃基，其中脂烃基具有如本文所定义的含义。

如本文所用，术语“脂烃硫基”是指基团-S-脂烃基，其中脂烃基具有如本文所定义的含义。

如本文所用，术语“杂芳基”或“杂芳环”是指单环系统，或稠合或桥接的双环系统，其中环系含有一个、两个、三个或四个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的杂原子；并且至少一个环是芳环。除非另有说明，否则杂芳基基团可以是 5 至 10 元。在某些实施方案中，杂芳基基团可以是 5 元或 6 元的。在某些实施方案中，杂芳基基团可以含有一个、两个或三个杂原子。在某些实施方案中，杂芳基基团可以含有一个或两个杂原子。杂芳基基团的非限制性实例包括苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噻唑基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、呋喃基、咪唑基、吲哚基、异吲唑基、异喹啉基、异噻唑基、异噻唑基、异噁唑基、噁二唑基、噁唑基、噁吟基、吡咯基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、喹啉基、

喹啉基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、三唑基、四唑基、二氢吲哚基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基等。杂芳基基团包括至少一个具有至少一个如上所述的杂原子的环和至少一个芳环。例如，具有至少一个杂原子的环可以稠合至一个、两个或三个碳环，例如芳基环、环己烷环、环己烯环、环戊烷环、环戊烯环或另一个单环杂环。稠合杂芳基基团的非限制性实例包括 1,2,3,5,8,8a-六氢中氮茚、2,3-二氢苯并呋喃、2,3-二氢吲哚、2,3-二氢苯并噻吩等。在本发明的背景下，术语“杂芳基”和“杂芳环”可以互换使用。

如本文所用，术语“杂原子”是指氮（N）、氧（O）和硫（S），并且可以包括氮和硫的任何氧化形式，以及碱性氮的任何季铵化形式，除非另有说明。

如本文所用，术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中的生理状况，其中细胞群体以不受调节的细胞生长为特征。如本文所用，术语“癌细胞”和“肿瘤细胞”是指来自肿瘤的细胞总数，包括构成肿瘤细胞群的大部分的致瘤性干细胞 (癌症干细胞) 和非致瘤性细胞。癌症的例子包括但不限于：癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。这类癌症的更具体的例子包括黑色素瘤、鳞状细胞癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、胃癌、头颈鳞癌，以及各种类型的头颈癌。

如本文所用，术语“肿瘤”是指由细胞过度生长或增殖引起的任何组织团块，无论是良性的 (非癌性的) 还是恶性的 (癌性的)，包括癌前病变。

术语“癌症”和“肿瘤” 在本文中可互换地使用，并包括实体瘤和血液瘤。

如本文所用，术语“转移”是指癌症随着在新位置发生类似的癌性病变而从起源部位扩散或转移到身体的其他区域的过程。“转移”细胞是失去与邻近细胞的粘附接触并通过血液或淋巴从疾病的原发部位迁移到侵入邻近身体结构的细胞。

如本文所用，术语“受试者”是指任何动物 (例如，哺乳动物)，包括但不限于人类、非人类灵长类动物、啮齿动物等，其将成为特定治疗的接受者。通常，术语“受试者”和“患者”在本文中可互换地用于指代人类受试者。

如本文所用，术语“治疗”和“预防”是指：1) 治愈、减缓、缓解症状和/或停止诊断的病理状况或疾病的进展；2) 阻止、延迟或减缓目标病理状况或疾病发展的预先实施的方法。因此，需要治疗的人包括那些已经患有疾病的人；易患这种疾病的人；以及需要预防的人群。如果患者表现出以下一种或多种情况，则受试者根据本发明的方法被成功“治疗”：癌细胞减少或完全没有；肿瘤大小减小；抑制或不使癌细胞向外周器官浸润 (这些包括癌细胞扩散到软组织和骨骼)；抑制或不存在肿瘤转移；抑制或不存在肿瘤生长；缓解与特定癌症相关的一种或多种症状；降低发病率和死亡率；以及生活质量的提高。在适用于癌症的背景下，术语“预防”指在与癌症相关的症状或病理状况出现前，向受试者特别是具有癌症风险的受试者施以药物等医疗手段。

II. 抗体

本发明提供了一种抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其包括

重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，

HCDR1 的氨基酸序列为 GFTLSGDWIH (SEQ ID NO: 1)，

HCDR2 的氨基酸序列为 EISAAGGYTDYADSVKG (SEQ ID NO: 2)，

HCDR3 的氨基酸序列为 ESRVSFEAAMDY (SEQ ID NO: 3)，

LCDR1 的氨基酸序列为 RASQNIATDVA (SEQ ID NO: 4)，

LCDR2 的氨基酸序列为 SASFLYS (SEQ ID NO: 5)，

LCDR3 的氨基酸序列为 QQSEPEPYT (SEQ ID NO: 6)，

优选地，HCDR1 应用 AbM 编号系统定义；HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 应用 Kabat 编号系统定义；以及

重链恒定区和轻链恒定区，其中

所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括突变为半胱氨酸的一个或多个例如 1、2、3、4 个或更多个突变，例如选自以下突变中的一个或多个例如 1、2、3、4 个或更多个突变：重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸、重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述重链可变区 (V_H)

(i) 包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，任选地所述氨基酸替换、插入或缺失不发生在 CDR 区中，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换，

其中 SEQ ID NO:7 的序列如下：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIHWVRQAPGKGLEWVGEISAAGGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)。

编码该氨基酸序列的核酸序列如下：

GAAGTGCAACTCGTCGAGAGCGGCGGGGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCCTGAGCGGCGACTGGATCCACTGGGTGCGGCAAGCCCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGGTCGGGGAAATTAGCGCCGCTGGCGGCTACACCGACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACACAAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGAGAGCAGAGTGAGCTTCGAGGCCGCCATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 8)。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述重链可变区 (V_H)

(i) 包含与 SEQ ID NO: 8 的核酸序列所编码的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 8 的核酸序列所编码的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 8 的核酸序列所编码的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，任选地所述氨基酸替换、插入或缺失不发生在 CDR 区中，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述轻链可变区 (V_L)

(i) 包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，任选地所述氨基酸替换、插入或缺失不发生在 CDR 区中，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换，

其中 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列如下：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIATDVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 9)。

编码该氨基酸序列的核酸序列如下：
GACATTCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGCAGAGCTAGCCAAAACATCGCCACCGACGTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCTAGCTTCCTGTAC AGCGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGAGCGA GCCCGAGCCCTACACCTTCGGCCAAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 10)。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述轻链可变区 (V_L)

(i) 包含与 SEQ ID NO: 10 的核酸序列所编码的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 10 的核酸序列所编码的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 10 的核酸序列所编码的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，任选地所述氨基酸替换、插入或缺失不发生在 CDR 区中，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体在恒定区较为隐蔽的位点具有半胱氨酸突变，从而为包含其的 ADC 带来更好的稳

定性和/或亲水性。如本文所定义的“半胱氨酸突变”是指在蛋白质中将原来并非半胱氨酸的氨基酸取代为半胱氨酸。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括选自以下突变中的任意两种突变：重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸、重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述轻链恒定区是 λ 轻链恒定区或 κ 轻链恒定区。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体还包括重链恒定区第 234 位和第 235 位突变为丙氨酸（LALA 突变）。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述重链恒定区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述轻链恒定区是人 λ 轻链恒定区或 κ 轻链恒定区。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，氨基酸残基位置编号是依据 EU 编号系统，例如恒定区氨基酸残基位置编号是依据 EU 编号系统。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述恒定区的突变是各自独立地相对于亲本重链恒定区或亲本轻链恒定区而言的。亲本重链恒定区或亲本轻链恒定区可以是天然的重链恒定区或轻链恒定区，也可以是变体重链恒定区或轻链恒定区，只要在待突变位置上的氨基酸与要突变成的氨基酸不同即可。例如，在一些实施方案中，亲本重链恒定区是天然人 IgG1 或天然人 IgG4 免疫球蛋白的重链恒定区或轻链恒定区相比而言的。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，所述突变是各自独立地相对于天然人 IgG1 免疫球蛋白的重链恒定区或轻链恒定区相比而言的。

在一些实施方案，天然人 IgG1 重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示。在一些实施方案，天然人 λ 轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示。在一些实施方案，天然人 κ 轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。

在一些实施方案中，与天然人 IgG1 轻链恒定区和/或重链恒定区相比，本发明的双特异性抗体包括以下任意一组的突变组合：(1) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和 λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸；(2) 重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸；(3) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸；(4) λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸；(5) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸；和 (6) λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸。

在一些实施方案中，与天然人 IgG1 轻链恒定区和/或重链恒定区相比，本发明的双特异性抗体包括以下任意一组的半胱氨酸突变组合：(1) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和 λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸；(2) 重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸；(3) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸；(4) λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸和重链

恒定区第 118 位突变为半胱氨酸；(5) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸；和 (6) λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸，以及所述双特异性抗体任选地在重链恒定区还包含 LALA 突变。

在一些实施方案中，与天然人 IgG1 轻链恒定区和/或重链恒定区相比，本发明的双特异性抗体包括以下重链恒定区和轻链恒定区组合：

(i) 在第 160 位和第 166 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区；以及无半胱氨酸突变的重链恒定区；

(ii) 无半胱氨酸突变的 κ 轻链恒定区，以及在第 118 位和第 239 位突变为半胱氨酸的重链恒定区；

(iii) 在第 160 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区；以及在第 118 位突变为半胱氨酸的重链恒定区；

(iv) 在第 166 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区；以及在第 118 位突变为半胱氨酸的重链恒定区；

(v) 在第 160 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区；以及在第 239 位突变为半胱氨酸的重链恒定区；

(vi) 在第 166 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区；以及在第 239 位突变为半胱氨酸的重链恒定区；

任选地，所述重链恒定区还包含 LALA 突变。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，重链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 11、15、19 和 23 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 11、15、19 和 23 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 11、15、19 和 23 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，包含 LALA 突变的重链恒定区包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一些实施方案中，包含 LALA 突变和在第 118 位和 239 位突变为半胱氨酸的重链恒定区包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一些实施方案中，包含 LALA 突变和在第 118 位突变为半胱氨酸的重链恒定区包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一些实施方案中，包含 LALA 突变和在第 239 位突变为半胱氨酸的重链恒定区包含与

SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 13、17、21 和 25 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 13、17、21 和 25 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 13、17、21 和 25 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，包含在第 160 位和第 166 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区包含与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，包含在第 160 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，包含在第 160 位突变为半胱氨酸的 λ 轻链恒定区包含与 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，κ 轻链恒定区包含与 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含两条相同的重链恒定区或包含两条不同的重链恒定区，例如在一条重链恒定区上包含半胱氨酸突变但是在另一条重链恒定区上不包含半胱氨酸突变。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含两条相同的轻链恒定区或包含两条不同的轻链恒定区，例如在一条轻链恒定区上包含半胱氨酸突变但是在另一条轻链恒定区上不包含半胱氨酸突变。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含两条相同的重链恒定区和两条相同的轻链恒定区，例如在两条重链恒定区包含相同的半胱氨酸突变，和/或在两条轻链恒定区包含相同的半胱氨酸突变。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，

重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 12、16、20 和 24 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 12、16、20 和 24 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 12、16、20 和 24 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换；以及

轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 14、18、22 和 26 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 14、18、22 和 26 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 14、18、22 和 26 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，其中氨基酸的改变 (即替换、插入或缺失) 的个数不超过 10 个，例如不超过 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，氨基酸的替换例如是氨基酸的保守置换。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体选自以下组的抗体：

(I) 组

重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

(II) 组

重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

(III) 组

重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

(IV) 组

重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

(V) 组

重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

和

(VI) 组

重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体选自如下抗体：

(1) Duligo-LC1，重链如 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列所示，轻链如 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列所示；

(2) DU-v-01，重链如 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列所示，轻链如 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列所示；

(3) DU-v-02，重链如 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列所示，轻链如 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列所示；

(4) DU-v-03，重链如 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列所示，轻链如 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列所示；

(5) DU-v-04，重链如 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列所示，轻链如 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列所示；和

(6) DU-v-05，重链如 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列所示，轻链如 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列所示。

III. 免疫缀合物

在一个方面，本发明提供了免疫缀合物，其包含本发明所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，免疫缀合物包含本发明所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段以及与其缀合的一种或多种其他物质，例如标记、治疗剂或诊断剂。在免疫缀合物中，可以使用连接子来共价连接缀合物的不同部分。例如，使用连接子将所述抗体或其抗原结合片段与所述一种或多种其他物质共价连接。缀合物的适宜的连接子包括化学连接子或肽连接子，并包括可裂解连接子和不可裂解的连接子

在一些实施方案中，所述治疗剂包括但不限于细胞毒性化合物。

在一些实施方案中，所述标记或诊断剂包括但不限于多种酶，例如辣根过氧化物酶；辅基，例如链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；荧光物质；发光物质；放射性物质，例如放射性标记的示踪化合物和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

在一些实施方案中，所述免疫缀合物是抗体-药物偶联物。

在一方面，本发明提供了一种具有式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_n \quad (I)$$

其中，

Ab 是本发明所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，

L 是连接子，

D 是生物活性化合物部分，例如细胞毒性化合物，

n 表示连接数，即 Ab 上连接的-L-D 的数目，且 n 是选自 1-15 的自然数，例如 1-14、2-13、3-12、4-11、5-10、6-9、7-8、1-6、1-5、1-4、2-4、3-4 范围内的自然数，例如由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15 中任意两个数值为端点的数值范围内的自然数，例如 n 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

如本文所用，术语“免疫缀合物”通常指通过将一种或多种免疫球蛋白相关分子或其片段(例如文中的抗体或其片段)与一种或多种其他分子缀合而形成的分子。在一些情况下，所述其他分子可以是蛋白质性质的分子，例如肽、多肽或蛋白质。在一些情况下，所述其他分子也可以是非蛋白质性质的分子。在一些实施方案中，所述其他分子例如标记、治疗剂或诊断剂。在一些情况下，所述一种或多种其他分子可以相同或彼此不同。例如，所述其他分子可以是靶标结合元件和/或效应子元件，诸如化疗剂，细胞毒性化合物，放射性元素，探针或信号分子等。

如本文所用，术语“抗体-药物偶联物”是指生物活性化合物片段 (药物分子例如细胞毒性化合物) 与抗体或其抗原结合片段部分通过连接单元相连从而得到的靶向生物制剂药物。所述连接单元，又称为连接子在特定环境 (例如胞内低 pH 值环境) 中或特定作用 (例如溶酶体蛋白酶的作用) 下能够断裂，从而使生物活性化合物片段与抗体或其抗原结合片段分离。ADC 可以利用靶标抗体高亲和性和特异性识别肿瘤细胞表面抗原，通过胞

内强内化作用，将生物活性化合物，例如小分子细胞毒性药物递送至肿瘤细胞，进而实现对肿瘤细胞的精准和高效杀伤。应当理解，在抗体-药物偶联物中，当提及生物活性化合物例如细胞毒性化合物时，意指与抗体-药物偶联物其余部分连接的生物活性化合物部分/片段(例如细胞毒性化合物部分/片段)。

如本文所用，术语“连接子”是指将生物活性化合物片段 (药物分子) 与抗体或其抗原结合片段部分连接起来的片段。

如本文所用，术语“生物活性化合物片段”是指本领域中均知的，抗体-药物偶联物(或称抗体偶联药物，antibody-drug conjugate，ADC) 中，在肿瘤组织间或肿瘤细胞内连接子裂解/降解/酶切后，能够形成具有生物活性的药物，例如小分子细胞毒性药物。其也可称为“生物活性化合物部分”。

如本文所用，术语“DAR (drug to antibody ratio)”也称为“药物与抗体比率”，是指在抗体-药物偶联物分子中，偶联至抗体的药物部分的数量。DAR 可以变化，并且将由抗体上可用位点的数量进行限制。应当理解，对于式(I)的抗体-药物偶联物，DAR 为 0 以上的自然数，即正整数。在一些实施方案中，本发明所述的抗体-药物偶联物具有的 DAR 为 1-15，例如 1-14、2-13、3-12、4-11、5-10、6-9、7-8、1-6、1-5、1-4、2-4 或 3-4，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15，又例如由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15 中任意两个数值为端点的整数数值范围。在偶联过程中，通常产生不同抗体-药物偶联物 (ADC) 分子 (即具有不同 DAR 的 ADC 分子) 的异质混合物。因此，术语“抗体-药物偶联物 (ADC)”也指这样的具有不同 DAR 的 ADC 分子的混合物。术语“平均 DAR”是指这样的混合物中 ADC 分子群体的 DAR 的平均值，在本发明中也称为“平均连接数”。如本领域中公知的，可例如通过使用疏水作用色谱法 (hydrophobic interaction chromatography，HIC) 或反相高效液相色谱法 (reversed phase high-performance liquid chromatography，RP-HPLC) 来确定 DAR 和药物负载分布，其中 HIC 特别适用于确定平均 DAR。在一些实施方案中，本发明所述的抗体-药物偶联物的平均 DAR (平均连接数) 为 1-15 的数值，例如 1-14、2-13、3-12、4-11、5-10、6-9、7-8、1-6、1-5、1-4、2-4 或 3-4 范围内的数值，例如由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15 中任意两个数值为端点的数值范围内的数值。应当理解，对于平均 DAR，所述的“数值”包括整数和小数。1-15 之间的数值是指 1-15 之间的任意数值，包括整数和小数，并且包括端点值。在一些实施方案中，平均 DAR (平均连接数)例如是 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 或 10.0，或者选自以这些数值中的两个作为端点的范围内的数值。应当理解，当提及平均 DAR 值时，本发明的 ADC 是指 ADC 分子群体或 ADC 分子混合物，其包含具有相同和/或不同 DAR 的 ADC 分子。

“反应半胱氨酸”或“游离半胱氨酸”指具有硫醇官能基(-SH)(巯基)的、且没有配对或以其它方式成为分子内或分子间二硫桥一部分的半胱氨酸残基。

在一些实施方案中，本发明的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物中，所述 L 是连接子，该连接子能够将抗体部分 (Ab) 与生物活性化合物部分连接在一起。

在一些实施方案中，本发明的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物中，Ab 包含半胱氨酸。在一些实施方案中，本发明的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物中，所述 Ab 通过其半胱氨酸与连接子连接，例如所述连接子通过半胱氨酸的巯基与所述 Ab 偶联。在一些实施方案中，所述 Ab 包含半胱氨酸突变，从而所述连接子经由该突变的半胱氨酸的巯基与所述抗体偶联。在一些实施方案中，所述 Ab 在其重链或轻链上包含将一个或多个非半胱氨酸突变为半胱氨酸，从而连接子与该半胱氨酸偶联，例如定点偶联。本文中详细描述了适用于本发明 ADC 的包含所述半胱氨酸突变的抗 EGFR 和 HER3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述突变后获得的半胱氨酸与连接子偶联，例如定点偶联。

在一些实施方案中， Ab 经由如下突变获得的半胱氨酸与连接子偶联：

(i) 一条或两条 Lamda 轻链恒定区在第 160 位和第 166 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(ii) 一条或两条重链恒定区在第 118 位和第 239 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(iii)一条或两条 Lamda 轻链恒定区在第 160 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和一条或两条重链恒定区在第 118 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(iv) 一条或两条 Lamda 轻链恒定区在第 166 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和一条或两条重链恒定区在第 118 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(v)一条或两条 Lamda 轻链恒定区在第 160 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和一条或两条重链恒定区在第 239 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(vi) 一条或两条 Lamda 轻链恒定区在第 166 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和一条或两条重链恒定区在第 239 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸。

在一些具体的实施方案中，具有半胱氨酸突变的 Ab 包含两条重链和两条轻链，且经由如下的突变获得的半胱氨酸与连接子偶联：

(i)两条 Lamda 轻链恒定区在第 160 位和第 166 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(ii) 两条重链恒定区在第 118 位和第 239 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(iii)两条 Lamda 轻链恒定区在第 160 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和两条重链恒定区在第 118 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

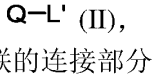
(iv)两条 Lamda 轻链恒定区在第 166 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和两条重链恒定区在第 118 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(v)两条 Lamda 轻链恒定区在第 160 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和两条重链恒定区在第 239 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸；

(vi)两条 Lamda 轻链恒定区在第 166 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸和两条重链恒定区在第 239 位半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸。

本文提及的任何抗体或其抗原结合片段经由任何本文所述的半胱氨酸突变后获得的半胱氨酸都可以用于与连接子偶联，例如定点偶联来获得本发明的 ADC 分子。

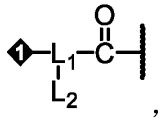
在一些实施方案中，连接子 L 具有式 (II) 所示的结构：



(II)，

Q 表示通过硫醚键 (-S-) 与 Ab 偶联的连接部分；

L'表示将 Q 与细胞毒性化合物 D 连接的连接部分，其具有如下结构：



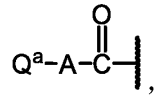
，

其中，L_1 是由 3 至 8 个氨基酸残基组成的多肽残基，任选地该多肽残基包括至少一个带有侧链羧酸的氨基酸残基，"-C(=O)-"表示多肽残基 C 端氨基酸残基的羰基；

L_2 不存在或者是与多肽残基 L_1 的氨基酸残基侧链羧酸反应后的羰基相连的亲水基团，且 L_2 是-NHR_{L2}，R_{L2} 选自任选地被 1 至 6 个羟基取代的 C_{1-6} 烷基；

❶表示与连接部分 Q 共价连接的多肽残基的 N 端。

在一些实施方案中，连接部分 Q 具有以下结构：

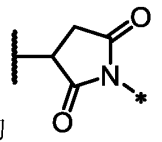
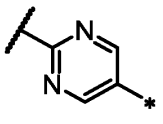


，

其中，Q^a 是与 Ab 偶联的官能团；

A 选自任选取代的亚脂烃基或任选取代的亚杂脂烃基，其中该亚脂烃基和亚杂脂烃基任选地被独立选自卤素、-CN、-OR_{Qa1}、-SR_{Qa1}、-$N(R_{Qa1})_2$ 组成的组的 1 至 4 个取代基取代，其中每个 R_{Qa1} 独立选自氢、C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 卤代烷基。在一些实施方案中，A 选自任选取代的 C_{1-10} 亚脂烃基。在一些实施方案中，A 选自任选取代的包含 1-6 个选自氮、氧和硫的杂原子的 C_{1-18} 亚杂脂烃基。

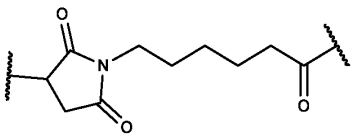
优选地，A 是任选取代的 C_{1-10} 亚烷基，C_{1-8} 亚烷基，C_{1-6} 亚烷基，C_{3-6} 亚烷基，或 C_{4-6} 亚烷基，例如亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基、亚癸基。

在一些实施方案中，官能团 Q^a 不存在或者选自马来酰亚胺、碘乙酰胺、溴乙酰胺、嘧啶、嘧啶基硫化物、乙烯基嘧啶、乙烯基三嗪、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、卤代乙酰胺、α-卤代乙酰基、活性酯诸如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、酰氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯，优选地，官能团 Q^a 选自马来酰亚胺，如以下结构 ，或嘧啶，如以下结构：，

"*"表示与 A 共价连接的位点；

"〰"表示与抗体 Ab 共价连接的位点。

在一些实施方案中，连接部分 Q 具有以下结构：



。

在一些实施方案中，连接部分 L_1 具有以下结构：

^{NH}-$AA^1AA^2AA^3\ldots AA^p$-$^{C(=O)}$，

其中 AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的每一个独立地是任选取代的氨基酸残基，任选地 AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的至少一个是带有侧链羧酸的氨基酸残基，例如 Glu 或 Asp；

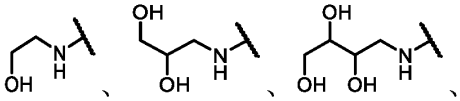
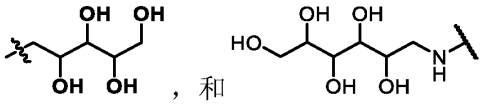
p 是 3 到 8 的整数，例如是 3 到 5；

"NH-"表示多肽残基的 N 端；

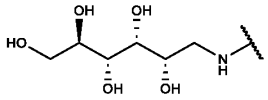
"-C(=O)"表示多肽残基的 C 端。

在一些实施方案中，AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的每一个独立地是任选取代的选自 Glu、Asp、Pro、Nva、Leu、Ile、Met、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln、Arg、Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Gly 和 N-烷基氨基酸组成的组的氨基酸残基，且 AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的至少一个是 Glu 或 Asp。

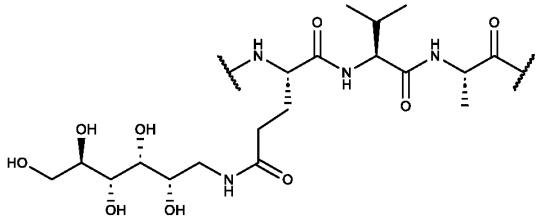
在一些实施方案中，连接部分 L_1 是 ^{NH}-Glu-Val-Ala-$^{C(=O)}$。

在一些实施方案中，L_2 选自以下所示的结构：、，和。

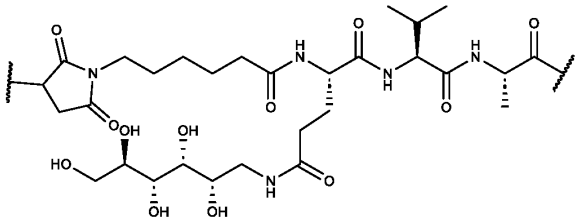
在一些实施方案中，L2 具有以下结构：

。

在一些实施方案中，连接部分 L'具有以下结构：

。

在一些实施方案中，连接子 L 具有以下结构：

。

在一些实施方案中，连接子 L 通过马来酰亚胺 (maleimide) 接头与抗体的半胱氨酸侧链相连，例如通过-S-键接。

在一些实施方案中，连接子 L 可以由一种或多种连接子构件构成。示例性的连接子构件包括 6-马来酰亚氨基己酰基 (“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基 (“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸 (“val-cit”或“vc”)、己酰基-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸 (GGFG)、丙氨酸-苯丙氨酸 (“ala-phe”或“af”)、对氨基苄氧羰基 (“PAB”)、N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯

(“SPP”)、N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1 羧酸酯(“SMCC”)，和 N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)、亚乙基氧基-CH_2CH_2O-作为一个或多个重复单元(“EO”或“PEO”)。

示例性的连接子 L 包括但不限于马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-丙氨酸 (maleimido-caproyl-valinealaine，mc-va) 连接子、马来酰亚胺基丁酸-缬氨酸-瓜氨酸 (maleimidobutanoic acid-valine-citrulline，mb-vc) 连接子，或马来酰亚胺基-己酰基-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸连接子 (mc-GGFG)。

在一些实施方案中，本发明的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物中，所述 D 是生物活性化合物，例如是对肿瘤起生物作用的活性化合物 (也称为抗肿瘤化合物)。抗肿瘤化合物可以是细胞毒性化合物。

在一些实施方案中，细胞毒性化合物 D 具有式 (III) 所示的结构：

Z—D' (III)

Z 不存在或者选自-NH-或-NH-R_{z1}-Y-R_{z2}-，其中 R_{z1} 和 R_{z2} 各自独立地不存在或者选自任选取代的 C_{1-8} 亚脂烃基、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-亚芳基、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-羰基 (-C(O)-)、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-氧羰基 (-C(O)O-或-OC(O)-)、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-羰基-亚氨基、任选取代的亚芳基-羰基 (-C(O)-)、任选取代的亚芳基-氧羰基 (-C(O)O-或-OC(O)-)、任选取代的亚芳基-羰基-亚氨基，其中任选取代是指任选地被独立选自 C_{1-8} 脂烃基、卤素、-CN、-OR_{z3}、-SR_{z3}、-$N(R_{z3})_2$ 组成的组的 1 至 4 个取代基取代，其中每个 R_{z3} 独立选自氢、C_{1-6} 脂烃基、C_{1-6} 卤代脂烃基，Y 不存在或者选自-O-或-S-；

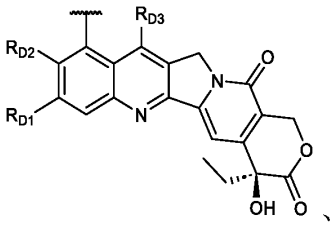
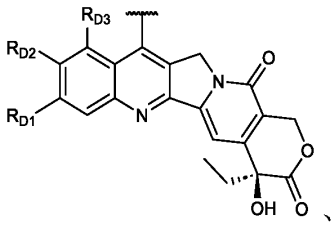
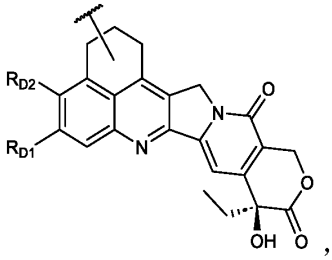
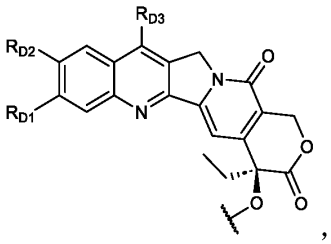
D'是喜树碱化合物，或其类似物或衍生物。

在一些实施方案中，Z 是-NH-CH_2-O-C_3-C_4 亚烷基-。

在一些实施方案中，Z 是-NH-CH_2-O-C_3H_6-、-NH-CH_2-O-C_4H_8-。

在一些实施方案中，Z 是-NH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-或-NH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-。

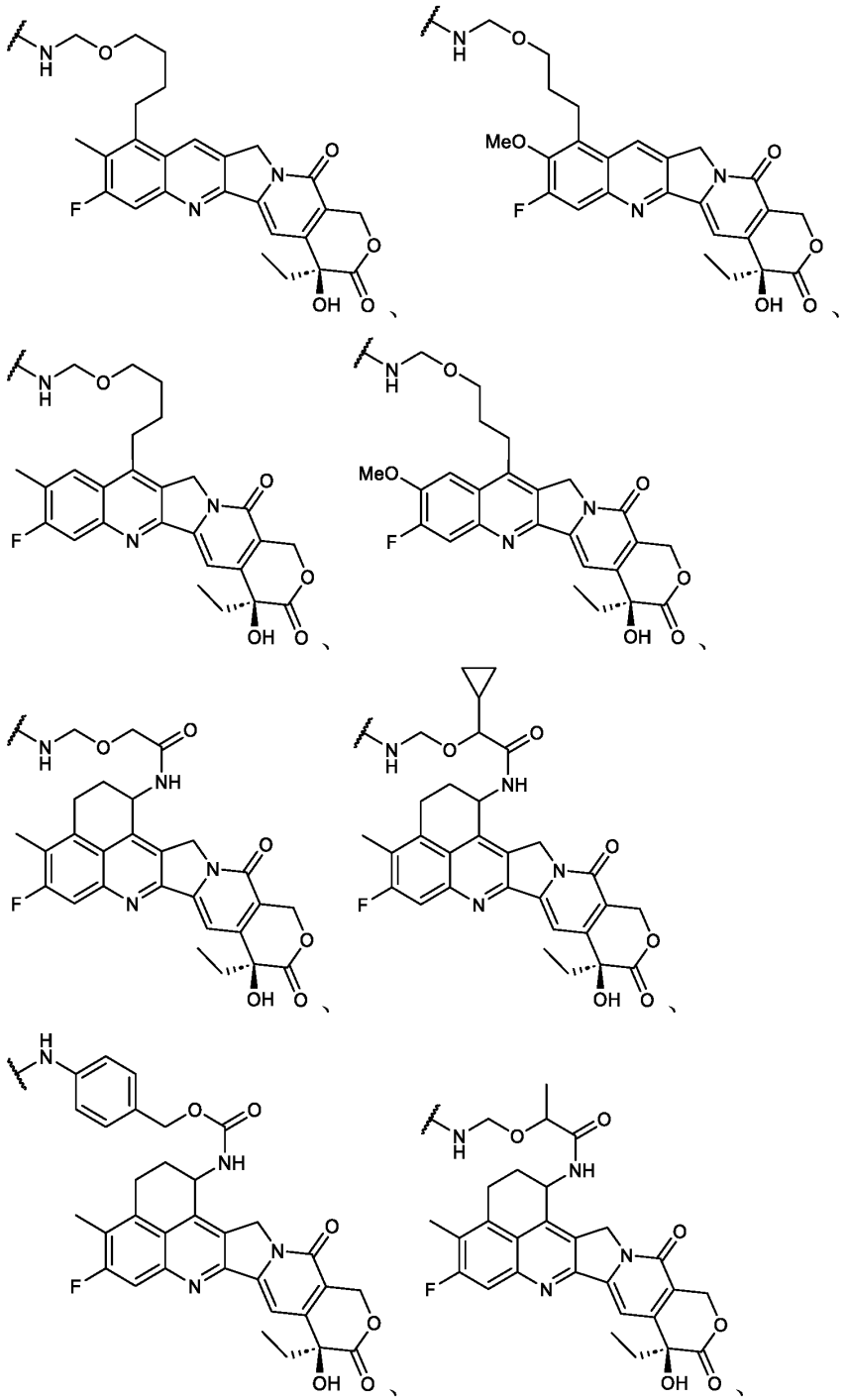
在一些实施方案中，D'是具有以下结构的喜树碱化合物，或其类似物或衍生物：

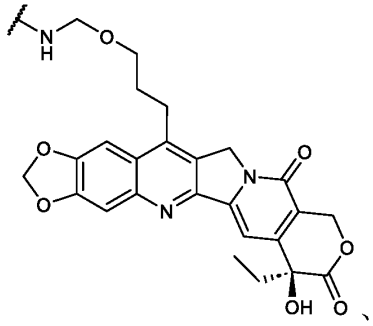
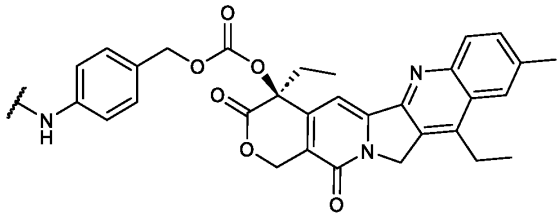
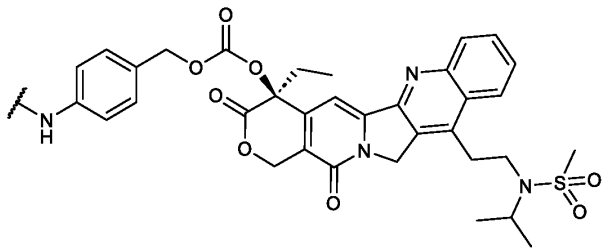
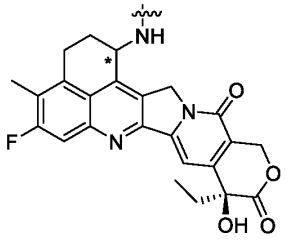

、

、

，或

，

其中 R_{D1}、R_{D2} 和 R_{D3} 各自独立地选自由 H、羟基、氰基、卤素、任选取代的 C_{1-6} 脂烃基、任选取代的 C_{1-6} 脂烃氧基、任选取代的 C_{1-6} 脂烃硫基、任选取代的 C_{1-6} 卤代脂烃

基组成的组，或者 R_{D1} 和 R_{D2} 连同其连接的碳原子共同组成 5-8 元环基或杂环基，其中任选取代是指任选地被独立选自 C_{1-8} 脂烃基、卤素、-CN、-$OR_{D'}$、-$SR_{D'}$、-$S(O)R_{D'}$和-$S(O)_2R_{D'}$，和-$N(R_{D'})_2$ 组成的组的 1 个或多个取代基取代，其中每个 $R_{D'}$ 独立选自氢、C_{1-6} 脂烃基、C_{1-6} 卤代脂烃基、-$SR_{D''}$、-$S(O)R_{D''}$和-$S(O)_2R_{D''}$，每个 $R_{D''}$ 独立选自氢、C_{1-6} 脂烃基、C_{1-6} 卤代脂烃基。

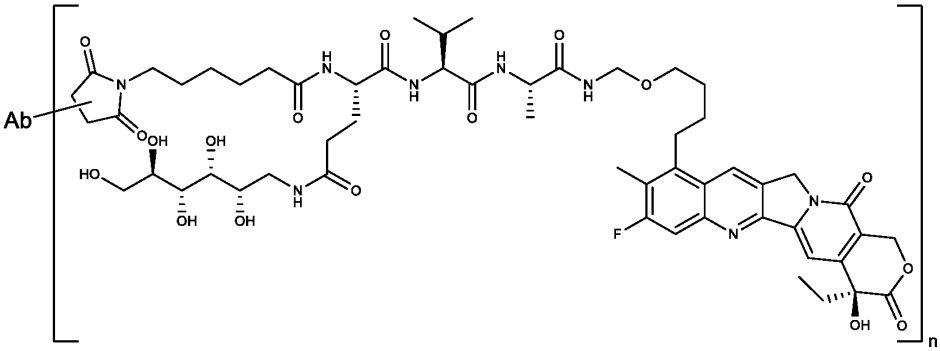
在一些实施方案中，细胞毒性化合物 D 选自以下化合物：




、

、

。


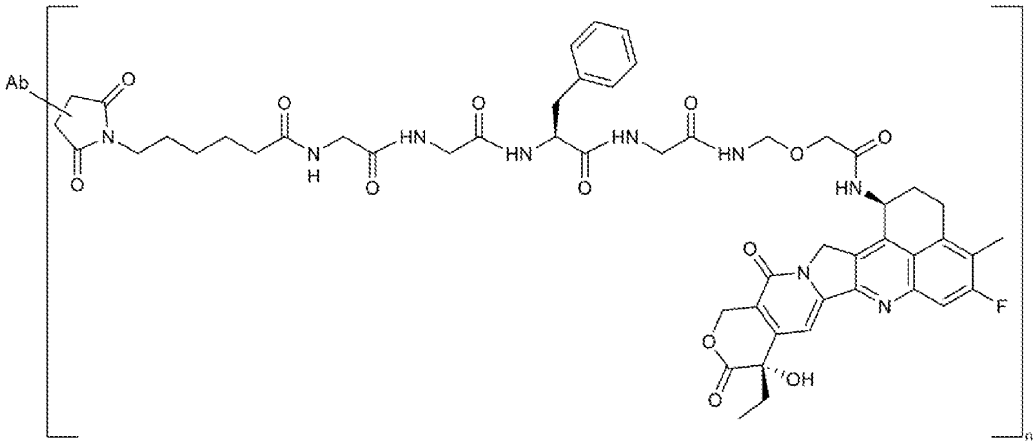
在一些实施方案中，D 的 结构片段中带*号的手性碳为 S 构型。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体-药物偶联物具有以下结构：



其中，Ab 和 n 如本发明所定义。在本发明中，该双特异性抗体-药物偶联物的-L-D 部分称为 NT3，即方括号内所示的结构部分。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体-药物偶联物具有以下结构：



其中，Ab 和 n 如本发明所定义。在本发明中，该双特异性抗体-药物偶联物的-L-D 部分为 mc-GGFG-DXd (在描述抗体-药物偶联物的名称时，也可更简化为 DXd)，即方括号内所示的结构部分。

在一些实施实施方案中，所述抗体-药物偶联物具有 1-10、2-8、3-5、3.0-4.0、3.5-4.5、6-10、7-9 或 7.5-8.5 的平均 DAR。

参考通式和具体化合物描述本文提供的双特异性抗体-药物偶联物。此外，本发明的双特异性抗体-药物偶联物可以以多种不同的形式或衍生物存在，所有均在本发明的范围内。这些包括例如药学上可接受的盐、互变异构体、立体异构体、外消旋混合物、位置异构体、前药、溶剂化形式、不同晶型或多晶型物以及活性代谢物等。

如本文所用，除非另有说明，否则术语“药学上可接受的盐”包括保持特定化合物的游离酸/碱形式的生物学有效性并且在生物学或其他方面不是非期望的盐。药学上可接受的盐可以包括与无机碱或酸和有机碱或酸形成的盐。在本发明的双特异性抗体-药物偶联物含有一个或更多个酸性或碱性基团的情况下，本发明还包括它们相应的药学上可接受的盐。因此，含有酸性基团 (例如羧基基团) 的本发明的双特异性抗体-药物偶联物可以盐形式存在，并且可以根据本发明使用，例如，碱金属盐、碱土金属盐、铝盐或铵盐。此类盐的更多非限制性实例包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、钡盐或与氨或有机胺 (例如乙胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、哌啶、N-甲基谷氨酰胺、或氨基酸) 的盐。例如，通过使具有酸性基团的化合物与合适的碱 (例如氢氧化锂、氢氧化钠、丙醇钠、氢氧化钾、乙醇钾、氢氧化镁、氢氧化钙或氢氧化钡) 反应，这些盐是容易获得的。本发明的双特异性抗体-药物偶联物的其他碱盐包括但不限于铜(I)、铜(II)、铁(II)、铁(III)、锰(II)和锌盐。本发明的双特异性抗体-药物偶联物含有一个或更多个碱性基团，例如可以质子化的基团，可以以盐的形式存在，并且可以根据本发明以它们与无机酸或有机酸的加成盐的形式使用。合适的酸的实例包括氯化氢、溴化氢、碘化氢、磷酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、磺基乙酸、三氟乙酸、草酸、乙酸、酒石酸、乳酸、水杨酸、苯甲酸、碳酸、甲酸、丙酸、新戊酸、二乙基乙酸、丙二酸、琥珀酸、庚二酸、富马酸、丙二酸、马来酸、苹果酸、帕莫酸、扁桃酸、氨基磺酸、苯丙酸、葡糖酸、抗坏血酸、异烟酸、柠檬酸、己二酸、牛磺胆酸、戊二酸、硬脂酸、谷氨酸或天冬氨酸，以及本领域技术人员已知的其他酸。所形成的盐尤其是盐酸盐、氯化物、氢溴酸盐、溴化物、碘化物、硫酸盐、磷酸盐、甲基磺酸盐 (甲磺酸盐)、

甲苯磺酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、甲酸盐、乙酸盐、磺基乙酸盐、三氟甲磺酸盐、草酸盐、丙二酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、帕莫酸盐、扁桃酸盐、富马酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、戊二酸盐、硬脂酸盐、天冬氨酸盐和谷氨酸盐。此外，由本发明的双特异性抗体-药物偶联物形成的盐的化学计量可以是 1 的整数倍或非整数倍。

含有碱性含氮基团的本发明的双特异性抗体-药物偶联物可以使用试剂例如 C_{1-4} 卤代烷进行季铵化，例如，甲基、乙基、异丙基和叔丁基氯、溴和碘；二 C_{1-4} 烷基硫酸盐，例如硫酸二甲酯、二乙酯和二戊酯；C_{10-18} 烷基卤化物，例如癸基、十二烷基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基氯化物、溴化物和碘化物；以及芳基 C_{1-4} 烷基卤化物，例如苄基氯和苯乙基溴。

如果本发明的双特异性抗体-药物偶联物在分子中同时含有酸性基团和碱性基团，则除了上述盐形式外，本发明还包括内盐或甜菜碱 (两性离子)。相应的盐可以通过本领域技术人员已知的常规方法获得，例如通过将它们与有机或无机酸或碱在溶剂或分散剂中接触，或通过与其他盐的阴离子交换或阳离子交换。本发明还包括本发明的双特异性抗体-药物偶联物的所有盐，由于低生理相容性，它们不直接适用于药物，但可用于，例如，作为化学反应的中间体或用于制备药学上可接受的盐。有关更合适的盐的综述，参见 Stahl 和 Wermuth，药用盐手册：特性、选择和使用 (Wiley-VCH, 2002)。

式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物及其药学上可接受的盐可以以非溶剂化和溶剂化形式存在。如本文所用，术语“溶剂合物”是指包含式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或其药学上可接受的盐和一种或更多种药学上可接受的溶剂分子的分子复合物。例如，当溶剂是水时使用术语“水合物”。

式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物可以具有一个或更多个手性 (不对称) 中心。本发明涵盖式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物的所有立体异构形式。存在于式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物中的不对称中心可以彼此独立地具有 (*R*) 或 (*S*) 构型。当手性碳的键在本发明的结构式中被描述为直线时，或当化合物名称在没有手性碳的 (*R*) 或 (*S*) 手性名称的情况下被描述时，应当理解，每种此类手性碳的 (*R*)和 (*S*) 构型以及因此每种对映异构体或非对映异构体及其混合物均包含在该式或名称中。特定立体异构体或其混合物的产生可以在获得此类立体异构体或混合物的实例中进行鉴定，但这绝不限制所有立体异构体及其混合物被包括在本发明的范围内。当手性碳的键在本发明的结构式中被描述为三角实线或虚线时，或当化合物名称在有手性碳的 (*R*) 或 (*S*) 手性名称的情况下被描述时，应当理解此时的结构式或名称所代表的化合物在该手性碳位置处具有确定的立体构型，而将与其他立体异构体或对映异构体或非对映异构体或其混合物相区分。

本发明包括所有可能的对映异构体和非对映异构体以及两种或更多种立体异构体的混合物，例如所有比例的对映异构体和/或非对映异构体的混合物。因此，对映异构体是本发明主题的对映异构体纯形式 (作为左旋和右旋对映体)、外消旋体形式和两种对映异构体以所有比例的混合物形式。在顺式/反式异构体的情况下，本发明包括顺式形式和反式形式以及这些形式的所有比例的混合物。如有需要，可以通过常规方法 (例如通过色谱或结晶、通过使用立体化学均一的合成起始材料或通过立体选择性合成) 分离混合物来制备单个立体异构体。任选地，可以在立体异构体分离之前进行衍生化。立体异构体混合物的分离可以在式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物合成期间的中间步骤中进行，或者可以在最终外消旋产物上进行。绝对立体化学可以通过结晶产物或结晶中间体

的 X-射线晶体学来确定，如有需要，用含有已知构型的立体中心的试剂衍生这些结晶产物或结晶中间体。可选地，绝对立体化学可以通过振动圆二色性 (VCD) 光谱分析来确定。

除非另有说明，否则本文描述的结构还意在包括仅在存在一种或更多种同位素富集原子时不同的化合物，换言之，其中一个或更多个原子被具有相同原子序数的原子替换，但原子质量或质量序数不同于自然界中占优势的原子质量或质量序数的化合物。此类化合物被称为“同位素变体”。本发明旨在包括式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物的所有药学上可接受的同位素变体。适合包括在本发明的双特异性抗体-药物偶联物中的同位素的实例包括但不限于氢的同位素，例如 ^{2}H (即，D，氘) 和 ^{3}H (即氚)；碳，例如 ^{11}C、^{13}C 和 ^{14}C；氯，例如 ^{36}Cl；氟，例如 ^{18}F；碘，例如 ^{123}I 和 ^{125}I；氮，例如 ^{13}N 和 ^{15}N；氧，例如 ^{15}O、^{17}O 和 ^{18}O；磷，例如 ^{32}P；和硫，例如 ^{35}S。式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物的某些同位素变体，例如掺入放射性同位素的那些，可用于药物和/或底物组织分布研究。特别地，具有仅在用较重同位素替换 (例如用氘 (^{2}H 或 D) 替换氢) 中不同的所描绘结构的化合物可以提供某些治疗优势，例如，由于更高的代谢稳定性、增加的体内半衰期或减少的剂量要求，因此可以在一些特定情况下使用。式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物的同位素变体通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与所附实施例中描述的那些类似的方法以及使用适当的同位素标记试剂代替先前采用的非标记试剂合成进行制备。

当在本文中描述化合物的结构时，所示出的结构式中未标明氢原子是 D (即，^{2}H) 时，一般应理解为此位置的氢以氢同位素“^{1}氢 (^{1}H)”的形式存在或者以具有天然状态下天然同位素丰度的形式存在。所示出的结构中标明氢原子是 D (即，^{2}H，氘) 时，应理解为此位置的氢以氢同位素“^{2}氢 (^{2}H，D，氘)”的形式存在或者以其中氘以大于天然氘同位素丰度的形式存在 (例如氘丰度为大于 50%，大于 60%、大于 70%、大于 80%、大于 90%、大于 95%、大于 96%、大于 97%、大于 98%、大于 99%、大于 99.5%，或者为 100%)。

根据本发明的药学上可接受的溶剂合物可以包括其中结晶溶剂可以被同位素取代的那些，例如 D_2O、d_6-丙酮、d_6-DMSO。

III. 使用和施用

本发明的双特异性抗体-药物偶联物 (式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体) - 或其药学上可接受的盐、溶剂合物，包括其所有比例的混合物 - 可用作药物。发现它们表现出靶向 EGFR 和/或 HER3 并借此杀死高表达 EGFR 和/或 HER3 的癌细胞的药理活性。通过这种活性，本发明的双特异性抗体-药物偶联物可以用于治疗与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的病症或疾病，例如 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤。

因此，能够靶向 EGFR 和/或 HER3 的本发明的双特异性抗体-药物偶联物特别适用于治疗与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状，例如癌症和肿瘤，包括但不限于以下各项：淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、胃癌、头颈鳞癌，以

及各种类型的头颈癌等，特别地，乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结直肠癌、胃癌、头颈鳞癌、卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌和膀胱癌等。

本发明的双特异性抗体-药物偶联物可以以有效治疗本文所述的疾病或病状的量施用。本发明的双特异性抗体-药物偶联物可以作为抗体-药物偶联物本身施用，或可选地，作为药学上可接受的盐施用。为了施用和给药目的，本发明的双特异性抗体-药物偶联物本身 (式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体) 或其药学上可接受的盐、溶剂合物将被简称为本发明的双特异性抗体-药物偶联物。

本发明的双特异性抗体-药物偶联物通过任何合适的途径以适合这种途径的药物组合物的形式施用，并且以对预期治疗有效的剂量施用。本发明的双特异性抗体-药物偶联物可以静脉内、皮下、鼻内、口服、直肠、阴道、肠胃外或外用施用等。

如本文所用，术语“施用”是指吸收、摄取、注射、吸入、植入或以其他方式引入本发明的双特异性抗体-药物偶联物或其药物组合物。术语“治疗”是指逆转、减轻、延迟本文所述的“病理状况” (例如，疾病、病症或病状，或其一种或更多种体征或症状) 的发作或抑制其进展。在某些实施方案中，可以在疾病或病状的一种或更多种体征或症状已经发展或已经观察到之后施用治疗。在其他实施方案中，可以在没有疾病或病状的体征或症状的情况下进行治疗。例如，可以在症状发作之前对易感个体进行治疗 (例如，根据症状史和/或根据遗传或其他易感性因素)。在症状消退后也可以继续治疗，例如延迟或预防复发。如本文所用，术语“疾病”、“病症”、“病状”和“病理状况”可互换使用。

本领域技术人员可以通过常规实验确定施用的剂量水平。本发明的双特异性抗体-药物偶联物和/或包含所述抗体-药物偶联物的组合物的剂量方案基于多种因素，包括患者的类型、年龄、体重、性别和医疗状况；病状的严重程度；施用途径；和所用特定抗体-药物偶联物的活性。因此，剂量方案可以有很大的不同。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体-药物偶联物可与一种或多种其它治疗剂联合使用。在一些实施方案中，该其他治疗剂的非限制性实例包括化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物、免疫调节剂和靶向降解剂等。这些治疗剂可在施用本发明的双特异性抗体-药物偶联物之前、之后或同时施用或以任意顺序先后施用。

IV 药物组合物

在一些方面，本发明涉及药物组合物，其包含如本文提供的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体，或其药学上可接受的盐或溶剂合物，以及至少一种药学上可接受的载体或辅料。

如本文所用，术语“药学上可接受的载体和/或辅料”是指可用于制备药物组合物的载体或辅料，其通常是安全的、无毒的并且在生物学上或其他方面均不是非期望的，并且包括可接受用于兽医用途以及人药物用途的载体或辅料。如本文所用的药学上可接受的载体或辅料包括一种和多于一种此类载体或辅料。使用的具体载体或辅料将取决于应用本发明的双特异性抗体-药物偶联物的方式和目的。合适的载体和辅料是本领域技术人员所熟知，并详述于，例如，Ansel, Howard C et al., Ansel’s Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004；Gennaro, Alfonso R. et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott,

Williams & Wilkins, 2000；和 Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005。还可以包括缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、润滑剂、乳化剂、混悬剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、助流剂、加工助剂、着色剂、甜味剂、加香剂、调味剂、稀释剂和其他已知的添加剂中的一种或更多种，以提供药物 (即本文提供的双特异性抗体-药物偶联物或药物组合物) 的治疗表现或有助于生产药物产品 (即药物)。

本发明的组合物可以制剂成多种形式。这些包括，例如，液体、半固体和固体剂型，例如液体溶液 (例如，可注射和可输注的溶液)、分散体或混悬剂、片剂、丸剂、粉剂、脂质体、栓剂等。形式取决于预期施用的方式和治疗应用。

本发明的药物组合物可以通过任何熟知的药学技术 (例如有效制剂和施用程序) 制备。上述关于有效制剂和施用程序的考虑是本领域熟知的，并且在标准教科书中有所描述。例如，在 Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1975；Liberman et al., 编辑，Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980；和 Kibbe et al., 编辑，Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第 3 版, American Pharmaceutical Association, Washington, 1999 中讨论了药物产品的制剂。

在还一方面，本发明涉及用于治疗 HER3 活性相关的疾病和病状，例如癌症的试剂盒，其包含如本文提供的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体，或其药学上可接受的盐或溶剂合物，或如本文提供的包含式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体，或其药学上可接受的盐或溶剂合物的药物组合物，任选的容器和任选的指示治疗的包装插页或标签。

V 治疗方法

在还一方面，本发明涉及一种治疗有需要的受试者的 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状，例如癌症的方法，该方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文提供的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体，或其药学上可接受的盐或溶剂合物或本发明的药物组合物。

如本文所用，术语"有需要的受试者"是患有 EGFR 和/或 HER3 活性相关，例如癌症的受试者，或相对于整个人群具有增加的发展 EGFR 和/或 HER3 活性相关疾病或病状的风险的受试者。在某些实施方案中，受试者是温血动物。在某些实施方案中，温血动物是哺乳动物。在某些实施方案中，温血动物是人。

如本文所用，术语"治疗有效量"指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体药物缀合物或药物组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，"治疗有效量"优选地抑制可度量参数(例如肿瘤体积)至少约 30%、甚至更优选地至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%甚至 100%。

如本文所用，术语"EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状"是指 EGFR 和/或 HER3 的抑制将是有益的任何病理生理情况。在某些实施方案中，EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状是癌症。在一些实施方案中，EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤，例如 EGFR 和/或 HER3 过表达肿瘤。在一些实施方案中，

所述受试者（特别是成年受试者）中具有 EGFR 和/或 HER3 表达，尤其是 EGFR 和/或 HER3 过表达。在一些实施方案中，所述受试者中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平或活性）EGFR 和/或 HER3（例如相比健康受试者）。在一些实施方案中，所述受试者的生物样品（例如肿瘤细胞或肿瘤组织）中具有（例如升高水平的，例如升高大于 10%、大于 20%、大于 50%、大于 80%、大于 90%、大于 1 倍、大于 2 倍、大于 3 倍、大于 5 倍、大于 10 倍、大于 50 倍，大于 100 倍或这些数值之间的范围（例如 10%-2 倍），例如核酸或蛋白质水平或活性的）EGFR 和/或 HER3（例如相比健康受试者的生物样品（例如健康受试者中的相应组织或细胞），或者相比所述受试者的临近健康组织或细胞中的 EGFR 和/或 HER3）。在某些实施方案中，EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状是选自由以下组成的组的癌症或肿瘤：淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、胃癌、头颈鳞癌，以及各种类型的头颈癌，特别地，乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结直肠癌、胃癌、头颈鳞癌、卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌和膀胱癌等。

在一些实施方案中，本发明的治疗方法还包括与一种或多种其它治疗剂联合施用。该其他治疗剂的非限制性实例包括化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物、免疫调节剂和靶向降解剂等。这些治疗剂可在施用本发明的双特异性抗体-药物偶联物之前、之后或同时施用或以任意顺序先后施用。

在一些实施方案中，所述方法还包括向患者施用选自由放射疗法、细胞疗法、基因疗法、RNA 治疗和手术等组成的组的一种或多种治疗方式。

在还一方面，本发明涉及如本文提供的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体，或其药学上可接受的盐或溶剂合物，或本发明的药物组合物，用于治疗 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状，例如癌症或肿瘤。在一些实施方案中，所述 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状如文中所定义。

在还一方面，本发明涉及如本文提供的式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体，或其药学上可接受的盐或溶剂合物或本发明的药物组合物在制备用于治疗 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状，例如癌症或肿瘤的药物中的用途。在一些实施方案中，所述 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病和病状如文中所定义。

实施例

下面通过实施例，并结合附图，对本发明的技术方案作进一步详细的说明。除非另有说明，下文描述的实施例的方法和材料均为可以通过市场购买获得的常规产品。本发明所属领域技术员将会理解，下文描述的方法和材料，仅是示例性的，而不应视为限定本发明的范围。

本发明的实施方式并不限于上述实施例所述，在不偏离本发明的精神和范围的情况下，本领域普通技术人员可以在形式和细节上对本发明做出各种改变和改进，而这些均被认为落入了本发明的保护范围。

实施例 1：Duligotuzumab、Duligo-LC1、Patritumab、SIB001、IgG1LALA 和 Cetuximab 的抗体分子制备

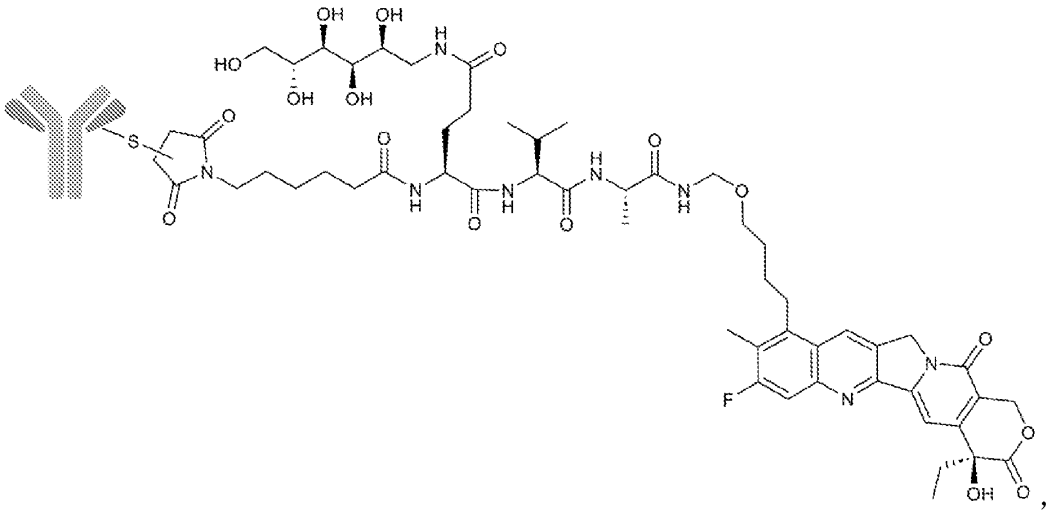
采用 Expi293F 细胞(购自 Gibco，A14527)进行瞬时转染制备重组抗体 Duligotuzumab（重链序列：SEQ ID NO:29；轻链序列：SEQ ID NO:30）、Duligo-LC1（基于 Duligotuzumab 进行半胱氨酸突变的抗体）、Patritumab（重链序列：SEQ ID NO:33；轻链序列：SEQ ID NO:34）、SIB001(重链序列：SEQ ID NO:27；轻链序列：SEQ ID NO:28）、IgG1LALA(重链序列：SEQ ID NO:31；轻链序列：SEQ ID NO:32）和 Cetuximab(重链序列：SEQ ID NO:38；轻链序列：SEQ ID NO:39）。

根据所需转染体积传代 Expi293 细胞，转染当天将细胞密度调整为 3×10^6 个细胞/ml。取 1/10 转染终体积的 Opti-MEM 培养基 (Gibco，REF# 31985-070) 作为转染缓冲液，按照 1mg/L 的比例加入待转染的 DNA，其中轻重链质粒 pCDNA3.1 配比为 1:1，混匀，按照 DNA：PEI 质量比 1:3 加入 PEIMax (Polysciences Inc. Cat# 24765-1)，混匀，室温孵育 20 min，然后将混合物轻柔地倒入 Expi293F 细胞悬液中，边倒边摇，细胞置于摇床培养，培养条件为 8 % CO_2、36.5℃、120 rpm。培养 16~18h 后，向细胞悬液中补加 2% (体积比) 的浓度为 200 g/L 的 Feed (100 g/L Phytone Peptone + 100g/L Difco Select Phytone)、终浓度为 5 g/L 的葡萄糖溶液和终浓度为 2.2 mM 的 VPA (Merck，Cat# P4543-100G)，轻轻混匀，在 8 % CO_2、36.5℃、120 rpm 培养继续培养 7 天。

收集细胞上清进行抗体纯化。选用 HiTrap MabSelect PrismA (GE Healthcare，Cat# 17549853) 亲和层析柱进行亲和捕获，纯化前用 0.1 M NaOH 亲和层析柱处理 2 小时，然后用 10-20 倍柱体积的蒸馏水清洗管路以及柱子，用 5 倍柱体积的 1×PBS (Gibco) 平衡填料柱；将过滤后的细胞料液通过柱子，再用 10 倍柱体积的 1×PBS 清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100 mM sodium citrate，pH 3.5) 冲洗填料，收集洗脱液，用 2 M Tris 调节 pH 至 6.0，过滤除菌，待 SEC 纯度检测合 (>98%) 后进行抗体偶联。

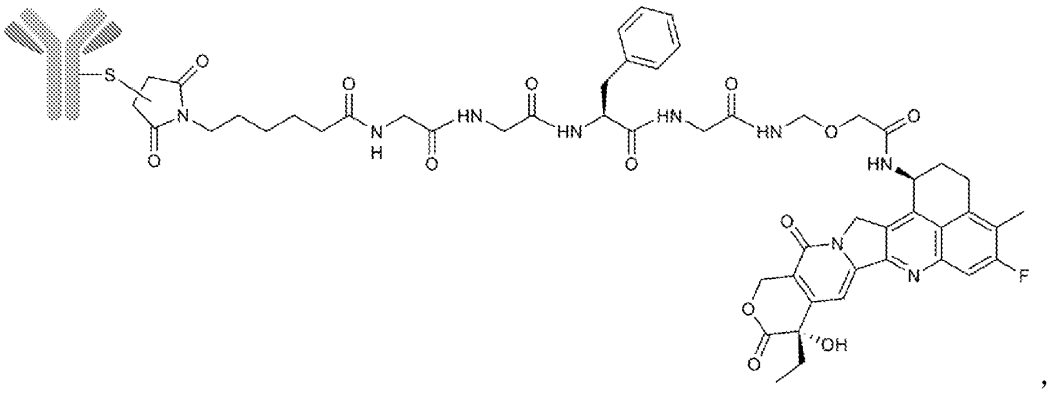
在以下实施例中分别合成了包括 NT3 的抗体-药物偶联物 (NT3-ADC) (NT3 即 WO2021173773A1 的实施例 4 中的 MB3)和包括 Dxd 的抗体-药物偶联物 (DXd-ADC)，如下所示，应当理解的是，在以下结构示意图中仅示例性地具体示出了一个药物分子部分，但这些抗体-药物偶联物可具有大于 1 的 DAR，例如 1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、2-4 或 3-4 范围内的自然数。实施例制备的抗体-药物偶联物的测定的 DAR 即平均 DAR 在下面部分提供。

NT3-ADC 结构示意图如下：



具体地，抗体部分例如是 Duligo-LC1、DU-v-01、DU-v-02、DU-v-03、DU-v-04、DU-v-05 和 IgG1LALA，其氨基酸序列详见序列表部分。同时，抗体部分可以是单抗、双抗或者多抗以及抗原结合片段，此处示意图仅以 Y 型抗体作为示例。

DXd-ADC 结构示意图如下



具体地，抗体部分例如是 SIB001、Patritumab、Duligotuzumab (也简称为 Duligo) 和 IgG1LALA，其氨基酸序列详见序列表部分。同时，抗体部分可以是单抗、双抗或者多抗以及抗原结合片段，此处示意图仅以 Y 型抗体作为示例。

实施例 2：Duligo-LC1-NT3 的合成与表征

图 1 示出了本发明的双特异性抗体-药物偶联物 Duligo-LC1-NT3 的分子结构示意图。

取 Duligo-LC1 (36.8 mg) 溶解于 20 mM 组氨酸 (8.6 mL, pH = 5.5)，加入 10 mM TCEP 溶液(513 μL, 20 当量)，混合均匀后于 37°C反应 3 小时。RP-HPLC 确认所有链间二硫键均被还原，将反应液转移至透析盒 (Thermo Scientific, Slide-A-Lyzer 20K MWCO)，以 20 mM 组氨酸(800 mL, pH = 6.5)作为透析液，依次于 2 小时，4 小时置换新鲜缓冲液，并透析过夜，以去除反应液中带有巯基的小分子杂质和 TCEP。透析完成后得到抗体 35 mg (95%)。

于上述透析完成后的抗体溶液(2.55 mg/mL)中加入 10 mM dhAA (脱氢抗坏血酸，975 μL, 40 当量)，混合均匀后于 37°C反应 3 小时。RP-HPLC 确认游离轻链信号消失，依次

加入 DMSO (164 μL)和 NT3 的 DMSO 溶液 (277 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25℃反应 2 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，并将溶液置换为 20 mM 组氨酸，pH = 5.5 的缓冲液，得到目标 ADC 产物 Duligo-LC1-NT3 (32 mg, 90%)。

取 Duligo-LC1-NT3 (50 μg) 加 H_2O 稀释至 1 mg/mL，加入 dithiothreitol (DTT) 溶液(1 M, 1.0 μL) 并调节 pH = 7.5，于 37℃孵育 30 分钟后，按照如下方法进行 RP-HPLC 分析。

设备	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01	
柱子	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm	
柱温	70℃	
流动相	A: 0.1% TFA in H_2O, B: 0.1% TFA in ACN.	
流速	0.3 mL/min	
注入量	10 μg	
检测波长	280 nm; 360 nm	
梯度	梯度	
时间	30 min	
时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	70	30
3	70	30
23	50	50
24	10	90
25	10	90
26	70	30
30	70	30

RP-HPLC 测定结果如图 2 所示，经计算得到平均 DAR 值为 3.64。

取 Duligo-LC1-NT3 (50 μg) 加 H_2O 稀释至 3 mg/mL，按照如下方法进行 SEC 分析。

设备	Agilent, 1260, AS-146
柱子	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
柱温	25℃
流动相	0.2 M PB, 0.25 M KCl, 15% (v/v) IPA, pH 7.0
流速	0.75 mL/min
注入量	30 μg
检测波长	280 nm, 360 nm
梯度	等度
时间	16 min

SEC 测定结果如图 3 所示，高分子量组分和单体 ADC 占比分别为 0.59%，99.41%，未观测到低分子量片段。

试剂与色谱柱

名称	**制造商, Cat#, Lot#**
TFA	Thermo Scientific, Lot# W1334149
组氨酸	Sigma, Lot# SLCG1233
TCEP	Aldrich, Lot# SLBZ2552

DMSO	Sigma, Lot# RNBJ3655
Na_2HPO_4	SCR, Lot# 10039-32-4
NaH_2PO_4	SCR, Lot# 13472-35-0
NaCl	SCR, Lot# 7647-14-5
$(NH_4)_2SO_4$	Aladdin, Lot# H2007071
异丙醇	Wochem, Lot# 67-63-0
脱盐柱	Zeba™ Spin Desalting Columns, 40K MWCO, 2/5/10 mL
Slide-A-Lyzer 透析盒 assette	Thermo Scientific, 20K MWCO
Amicon 30K	Amicon, Cat# UFC503096, Lot# R0PB38507
SEC 柱	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
RP 柱	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm
HIC 柱	TSKgel Butyl-NPR, 2.5 μm, 4.6 × 100 mm

设备

分析	**设备**
RP-HPLC	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01
SEC 纯度	Agilent, 1260, AS-146
HIC 色谱	Agilent, 1260, AS-146

实施例 3：不同偶联位点突变体的制备、对应定点偶联 ADC 的合成与表征、偶联位点的选择

参考实施例 1，基于 Duligotuzumab，对其重链恒定区或轻链恒定区进行突变，制备了 DU-v-01、DU-v-02、DU-v-03、DU-v-04 和 DU-v-05 五个抗体分子（全长序列见序列表），分别带有不同的半胱氨酸 (Cysteine) 突变位点。参考实施例 2，合成并表征了 DU-v-01-NT3、DU-v-02-NT3、DU-v-03-NT3、DU-v-04-NT3 和 DU-v-05-NT3 五个 ADC 分子。各个突变体的位点、蛋白表达产率和一步纯化效率、ADC 偶联的平均 DAR 值和 ADC 偶联后 SEC 纯度总结如下表所示，

分子	**突变**	**全长重链序列/全长轻链序列**	**表达量 (mg/L)**	**一步法纯度**	**ADC 平均 DAR (NT3)**	**单体% (NT3)**
Duligo-LC1	LLC 160, LLC166	SEQ ID NO:12/14	149.4	95.85%	3.53	99.41
DU-v-01	HC118, HC239	SEQ ID NO:16/18	214.2	98.55%	3.24	88.57
DU-v-02	LLC160 (LC1), HC118	SEQ ID NO:20/22	128.2	92.23%	3.54	88.38
DU-v-03	LLC166 (LC1), HC118	SEQ ID NO:20/26	56.9	97.13%	3.19	81.46
DU-v-04	LLC160 (LC1), HC239	SEQ ID NO:24/22	90.2	86.90%	3.54	98.45

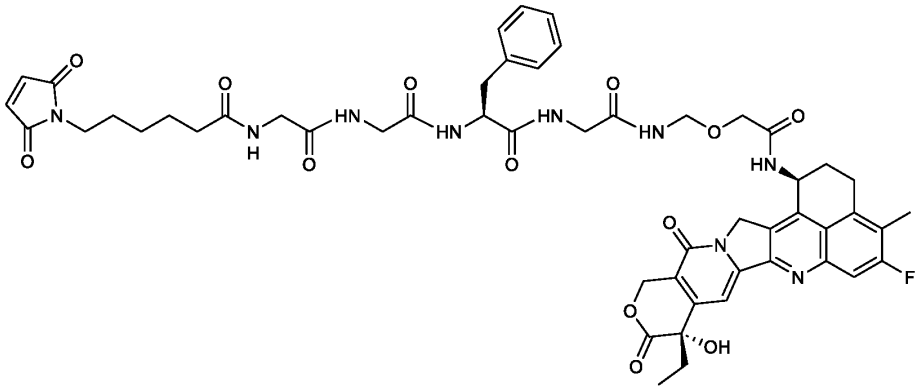
DU-v-05	LLC166 (LC1), HC239	SEQ ID NO:24/26	23.5	99.32%	3.50	99.16

Duligo-LC1 突变体在抗体的表达产率、一步纯化效率、偶联后 ADC 分子的 DAR 值和 SEC 纯度 (聚集情况) 都展现了优异的性质，相比其他突变组合，LLC160-LLC166 突变位点组合体现出来最佳的偶联优效性。

实施例 4：SIB001-DXd 的合成与表征

SIB001-DXd 分子结构示意图如图 4 所示。

取 SIB001 (30.0 mg) 溶解于 20 mM 组氨酸 (7.5 mL, pH = 6.5)，加入 10 mM TCEP 溶液 (228 μL, 15 当量)，混合均匀后于 37℃反应 2 小时。RP-HPLC 确认所有链间二硫键均被还原，依次加入 DMSO (545 μL) 和 mc-GGFG-DXd 的 DMSO 溶液 (205 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25℃反应 1 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，并将溶液置换为 20 mM 组氨酸，pH = 6.5 的缓冲液，得到目标 ADC 产物 SIB001-DXd (28 mg, 91%)。其中，mc-GGFG-DXd 具有以下结构：



。

取 SIB001-DXd (50 μg) 加 H_2O 稀释至 1 mg/mL，按照如下方法进行 RP-HPLC 分析。

设备	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01	
柱子	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm	
柱温	70℃	
流动相	A: 0.1% TFA in H_2O, B: 0.1% TFA in ACN.	
流速	0.3 mL/min	
注入量	10 μg	
检测波长	280 nm; 360 nm	
梯度	梯度	
时间	30 min	
时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	70	30
3	70	30
23	50	50
24	10	90
25	10	90
26	70	30

30	70	30

RP-HPLC 测定结果如图 5 所示，经计算得到平均 DAR 值为 7.51。

取 SIB001-DXd (50 μg) 加 H_2O 稀释至 3 mg/mL，按照如下方法进行 SEC 分析。

设备	Agilent, 1260, AS-146
柱子	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
柱温	25℃
流动相	0.2 M PB, 0.25 M KCl, 15% (v/v) IPA, pH 7.0
流速	0.75 mL/min
注入量	30 μg
检测波长	280 nm, 360 nm
梯度	等度
时间	16 min

SEC 测定结果如图 6 所示，高分子量组分和单体 ADC 占比分别为 2.24%，97.76%，未观测到低分子量片段。

实施例 5：Patritumab-DXd 的合成与表征

Patritumab-DXd 分子结构如图 7 所示。

取 Patritumab (35.0 mg)溶解于 20 mM 组氨酸(7.8 mL, pH = 6.5)，加入 10 mM TCEP 溶液(477 μL, 20 当量)，混合均匀后于 37℃反应 2 小时。RP-HPLC 确认所有链间二硫键均被还原，依次加入 DMSO (457 μL)和 mc-GGFG-DXd 的 DMSO 溶液 (321 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25℃反应 1 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，并将溶液置换为 20 mM 组氨酸，pH = 6.5 的缓冲液，得到目标 ADC 产物 Patritumab-DXd (29 mg, 83%)。

取 Patritumab-DXd (50 μg) 加 H_2O 稀释至 1 mg/mL，按照如下方法进行 RP-HPLC 分析。

设备	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01	
柱子	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm	
柱温	70℃	
流动相	A: 0.1% TFA in H_2O, B: 0.1% TFA in ACN.	
流速	0.3 mL/min	
注入量	10 μg	
检测波长	280 nm; 360 nm	
梯度	梯度	
时间	30 min	
时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	70	30
3	70	30
23	50	50
24	10	90
25	10	90

26	70	30
30	70	30

RP-HPLC 测定结果如图 8 所示，经计算得到平均 DAR 值为 7.75。

取 Patritumab-DXd (50 μg) 加 H_2O 稀释至 3 mg/mL，按照如下方法进行 SEC 分析。

设备	Agilent, 1260, AS-146
柱子	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
柱温	25℃
流动相	0.2 M PB, 0.25 M KCl, 15% (v/v) IPA, pH 7.0
流速	0.75 mL/min
注入量	30 μg
检测波长	280 nm, 360 nm
梯度	等度
时间	16 min

SEC 测定结果如图 9 所示，高分子量组分和单体 ADC 占比分别为 0.22%，99.78%，未观测到低分子量片段。

实施例 6：Duligo-DXd 的合成与表征

Duligo-DXd 分子结构如图 10 所示。

取 Duligotuzumab (20.0 mg)溶解于 20 mM 组氨酸(6.7 mL, pH = 6.5)，加入 10 mM TCEP 溶液(276 μL, 20 当量)，混合均匀后于 37℃反应 2 小时。RP-HPLC 确认所有链间二硫键均被还原，依次加入 DMSO (481 μL)和 mc-GGFG-DXd 的 DMSO 溶液 (186 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25℃反应 1 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，并将溶液置换为 20 mM 组氨酸，pH = 6.5 的缓冲液，得到目标 ADC 产物 Duligo-DXd (17.1 mg, 85%)。

取 Duligo-DXd (50 μg) 加 H_2O 稀释至 1 mg/mL，按照如下方法进行 RP-HPLC 分析。

设备	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01	
柱子	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm	
柱温	70℃	
流动相	A: 0.1% TFA in H_2O, B: 0.1% TFA in ACN.	
流速	0.3 mL/min	
注入量	10 μg	
检测波长	280 nm; 360 nm	
梯度	梯度	
时间	45 min	
时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	75	25
3	75	25
5	70	30
35	58	42
40	10	90
41	75	25

45	75	25

RP-HPLC 测定结果如图 11 所示，经计算得到平均 DAR 值为 7.70。

取 Duligo-DXd (50 μg) 加 H_2O 稀释至 3 mg/mL，按照如下方法进行 SEC 分析。

设备	Agilent, 1260, AS-146
柱子	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
柱温	25℃
流动相	0.2 M PB, 0.25 M KCl, 15% (v/v) IPA, pH 7.0
流速	0.75 mL/min
注入量	30 μg
检测波长	280 nm, 360 nm
梯度	等度
时间	16 min

SEC 测定结果如图 12 所示，高分子量组分和单体 ADC 占比分别为 0.80%，99.20%，未观测到低分子量片段。

实施例 7：IgG1LALA-NT3 (DAR=8)的合成与表征

IgG1LALA-NT3 (DAR=8) 分子结构如图 13 所示。

取 IgG1LALA (20.0 mg)溶解于 20 mM 组氨酸(5.0 mL, pH = 6.5)，加入 10 mM TCEP 溶液(271 μL, 20 当量)，混合均匀后于 37℃反应 2 小时。RP-HPLC 确认所有链间二硫键均被还原，依次加入 DMSO (300 μL)和 NT3 的 DMSO 溶液 (200 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25℃反应 1 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，并将溶液置换为 20 mM 组氨酸，pH = 6.5 的缓冲液，得到目标 ADC 产物 IgG1LALA-NT3 (DAR=8) (18.2 mg, 91%)。

取 IgG1LALA-NT3 (DAR=8) (50 μg) 加 H_2O 稀释至 1 mg/mL，按照如下方法进行 RP-HPLC 分析。

设备	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01	
柱子	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm	
柱温	70℃	
流动相	A: 0.1% TFA in H_2O, B: 0.1% TFA in ACN.	
流速	0.3 mL/min	
注入量	10 μg	
检测波长	280 nm; 360 nm	
梯度	梯度	
时间	30 min	
时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	70	30
3	70	30
23	50	50
24	10	90
25	10	90

26	70	30
30	70	30

RP-HPLC 测定结果如图 14 所示，经计算得到平均 DAR 值为 7.75。

取 IgG1LALA-NT3 (DAR=8) (50 μg) 加 H_2O 稀释至 3 mg/mL，按照如下方法进行 SEC 分析。

设备	Agilent, 1260, AS-146
柱子	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
柱温	25°C
流动相	0.2 M PB, 0.25 M KCl, 15% (v/v) IPA, pH 7.0
流速	0.75 mL/min
注入量	30 μg
检测波长	280 nm, 360 nm
梯度	等度
时间	16 min

SEC 测定结果如图 15 所示，高分子量组分和单体 ADC 占比分别为 1.09%，98.91%，未观测到低分子量片段。

实施例 8：IgG1LALA-NT3 (DAR=4)的合成与表征

IgG1LALA-NT3 (DAR=4) 分子结构如图 16 所示。

取 IgG1LALA (1.0 mg)溶解于 20 mM 组氨酸(0.25 mL, pH = 6.5)，加入 5 mM TCEP 溶液(4.06 μL, 3 当量)，混合均匀后于 37°C反应 2 小时，依次加入 DMSO (18.8 μL)和 NT3 的 DMSO 溶液 (6.2 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25°C反应 1 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，取样 (50 μg) 加 H_2O 稀释至 1 mg/mL，按照如下方法进行 RP-HPLC 分析测定平均 DAR。

设备	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01	
柱子	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm	
柱温	70°C	
流动相	A: 0.1% TFA in H_2O, B: 0.1% TFA in ACN.	
流速	0.3 mL/min	
注入量	10 μg	
检测波长	280 nm; 360 nm	
梯度	梯度	
时间	45 min	
时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	70	30
3	70	30
23	50	50
24	10	90
25	10	90
26	70	30

30	70	30

重复以上步骤，分别测定 TCEP 当量为 4.0 和 5.0 情况下制备得到 ADC 的 DAR，拟合 DAR 与 TCEP 当量的线性关系，确定 TCEP 当量为 2.5 时，理论 DAR 为 4.0。取 IgG1LALA (40.0 mg)溶解于 20 mM 组氨酸(10.0 mL, pH = 6.5)，加入 5 mM TCEP 溶液(135 μL, 2.5 当量)，混合均匀后于 37℃反应 2 小时，冷却至室温后依次加入 DMSO (754 μL)和 NT3 的 DMSO 溶液 (246 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25℃反应 1 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，并将溶液置换为 20 mM 组氨酸，pH = 6.5 的缓冲液，得到目标 ADC 产物 IgG1LALA-NT3 (DAR=4) (35.2 mg, 88%)。

按上述方法进行 RP-HPLC 测定结果如图 17 所示，经计算得到平均 DAR 值为 3.89。

取 IgG1LALA-NT3 (DAR=4) (50 μg) 加 H_2O 稀释至 3 mg/mL，按照如下方法进行 SEC 分析。

设备	Agilent, 1260, AS-146
柱子	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
柱温	25℃
流动相	0.2 M PB, 0.25 M KCl, 15% (v/v) IPA, pH 7.0
流速	0.75 mL/min
注入量	30 μg
检测波长	280 nm, 360 nm
梯度	等度
时间	16 min

SEC 测定结果如图 18 所示，单体 ADC 占比分别为 100%，未观测到高分子量组分和低分子量片段。

实施例 9：IgG1LALA-DXd 的合成与表征

IgG1LALA-DXd 分子结构如图 19 所示。

取 IgG1LALA (15.0 mg)溶解于 20 mM 组氨酸(5.0 mL, pH = 6.5)，加入 10 mM TCEP 溶液(196 μL, 20 当量)，混合均匀后于 37℃反应 2 小时。RP-HPLC 确认所有链间二硫键均被还原，依次加入 DMSO (378 μL)和 DXd 的 DMSO 溶液 (122 μL, 10 mg/mL)，混合均匀后于 25℃反应 1 小时。反应结束后以脱盐柱纯化除去小分子杂质，并将溶液置换为 20 mM 组氨酸，pH = 6.5 的缓冲液，得到目标 ADC 产物 IgG1LALA-DXd (DAR=8) (13.4 mg, 89%)。

取 IgG1LALA-DXd (DAR=8) (50 μg) 加 H_2O 稀释至 1 mg/mL，按照如下方法进行 RP-HPLC 分析。

设备	Waters, ACQuity H class UPLC, SZ-A2-DD-HPLC01
柱子	Waters, BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 15 cm
柱温	70℃
流动相	A: 0.1% TFA in H_2O, B: 0.1% TFA in ACN.
流速	0.3 mL/min
注入量	10 μg

检测波长	280 nm; 360 nm	
梯度	梯度	
时间	30 min	
时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	70	30
3	70	30
23	50	50
24	10	90
25	10	90
26	70	30
30	70	30

RP-HPLC 测定结果如图 20 所示，经计算得到 DAR 值为 7.97。

取 IgG1LALA-DXd (DAR=8) (50 μg) 加 H_2O 稀释至 3 mg/mL，按照如下方法进行 SEC 分析。

设备	Agilent, 1260, AS-146
柱子	TSK gel G3000SWXL, 7.8 mm × 30 cm, 5 μm
柱温	25°C
流动相	0.2 M PB, 0.25 M KCl, 15% (v/v) IPA, pH 7.0
流速	0.75 mL/min
注入量	30 μg
检测波长	280 nm, 360 nm
梯度	等度
时间	16 min

SEC 测定结果如图 21 所示，高分子量组分和单体 ADC 占比分别为 0.20%，99.80%，未观测到低分子量片段。

实施例 10：Duligo-LC1-NT3 在小鼠和猴血浆稳定性测试

取 Duligo-LC1-NT3 (100 μg) 加入小鼠血浆或猴血浆稀释至 100 μL (两种血浆分别制备 5 管样品)，于 37°C分别孵育 0、1、3、7、14 天，利用亲和层析纯化 ADC 样品进行 RP-HPLC 和 LC-MS 分析，测定 DAR 值随时间的变化趋势。结果如图 22 和图 23 所示，表明 Duligo-LC1-NT3 在两种血浆中均非常稳定，没有观测到明显的药物脱落。

RP-HPLC 分析

样品	**Duligo-LC1-NT3**	
血浆	小鼠血浆	猴血浆
第 0 日	3.57	3.59
第 1 日	3.54	3.55
第 3 日	3.51	3.47
第 7 日	3.46	3.43
第 14 日	3.34	3.32

LC-MS 分析

样品	Duligo-LC1-NT3	
血浆	小鼠血浆	猴血浆
第 0 日	3.61	3.60
第 1 日	3.60	3.56
第 3 日	3.58	3.53
第 7 日	3.63	3.47
第 14 日	3.59	3.46

实施例 11：不同肿瘤细胞系上 EGFR&HER3 的表达量检测

检测方法：

复苏后的细胞经过 2-3 次传代后，先倒去培养基，用 10mL PBS (货号：10010-023，厂家：Gibco) 润洗一遍，再用 4mL 胰蛋白酶 (货号：25200-072，厂家：Gibco) 消化细胞，培养基终止以后 400xg 离心 3min 弃上清，预先将 2% 的 FBS (货号：10091-148，厂家：Gibco) 加入 PBS 中配置为 FACS Buffer，用 FACS Buffer 重悬计数，调整细胞密度至 $4x10^6$/mL，每孔 50 uL 加入圆底 96 孔板，400xg 离心 5min；

将抗体 PE anti-human EGFR (货号：352904，厂家：Bio Legend) 和 PE anti-human erbB3/HER-3 (货号：324706，厂家：Bio Legend) 用 FACS Buffer 按 1：100 稀释后，各两个孔每孔 50 uL 重悬细胞，同时有两个孔使用 FACS Buffer 重悬作为对照，4℃避光孵育 1 h；每孔加入 150 uL FACS buffer，400xg 离心 5min；每孔用 200 uL FACS buffer 重悬后 400xg 离心 5min，最后每孔用 100 uL FACS Buffer 重悬细胞，进行流式检测，对于各样品，在 PE 通道中收集 20000 个数据采集点。

使用软件分析并导出 PE 通道的 MFI 值后取平均，将各个细胞染了抗体孔的数值除以对照孔数值分别得出相应的值，最后作图。

不同肿瘤细胞系 EGFR&HER3 的表达量检测结果：

通过一系列细胞系上 EGFR 和 HER3 的表达量测定，验证了 EGFR 和 HER3 在不同肿瘤细胞系上有多样的表达谱，结果如图 24 所示。

实施例 12：抗体分子的 Fab-ZAP 内吞-杀伤实验

检测方法：

复苏后的 AsPC1 细胞经过 2-3 次传代后，先倒去培养基，用 10mL PBS 润洗一遍，再用 4mL 胰蛋白酶消化细胞，培养基终止以后 400xg 离心 3min 弃上清，培养基再次重悬计数。调整细胞密度至 3E4/mL，每孔 50 uL 加入平底 96 孔板；用完全培养基将待测抗体稀释到 160nM(最高使用浓度 40nM)，将 Fab-ZAP 稀释到 640nM(最高使用浓度 160nM, Fab-ZAP: antibody= 4:1)后取等体积抗体与 Fab-ZAP 按 1:1 混匀，并以此作为初始浓度按 1/4 比例梯度稀释 10 个孔后室温孵育 30min，每孔 50 uL 加入细胞中混匀后放置

于 37°C培养 5 天后取出 96 孔板，板子平衡至室温，每孔加入 100uL CTG 检测液，摇床 300 rpm 20 min,吸取 100uL 到白底 96 孔板，使用多功能酶标仪检测发光值。

Fab-ZAP 内吞实验结果：

Fab-ZAP 作为单抗和核糖体失活蛋白皂草素的化学缀合物，通过其 F(ab)片段，识别目标抗体的 Fc 端与抗体偶联后抗体引导 ZAP 复合物到达目的细胞，随后与目的细胞结合并内化，ZAP 复合物进入细胞质后经酶解作用释放皂草素，影响核糖体功能的正常发挥从而杀伤细胞，最后通过检测抗体复合物对细胞的杀伤效率来计算抗体的内吞率。

在 EGFR 和 HER3 均有较高表达(MFI-fold (EGFR) = 186, MFI-fold(HER3)=12.4)的人胰腺癌细胞 AsPC1 上 Duligotuzumab 和 Cetuximab 比 Patritumab 有更强的内吞，IC50 降低了大约 80 倍 (Duligotuzumab 的 IC50 是 0.028nM，Cetuximab 的 IC50 是 0.021nM，Patritumab 的 IC50 是 2.127nM)，如图 25 所示。

在 EGFR 和 HER3 均中等表达(MFI-fold (EGFR) = 14.7, MFI-fold(HER3)=44.9)的人胃癌细胞 NUGC4 上 Duligotuzumab 和 Cetuximab 比 Patritumab 有更强的内吞，如图 26 所示；在 EGFR 不表达，HER3 过表达的中国仓鼠卵巢 CHO-HER3 细胞上 Duligotuzumab 和 Patritumab 比 Cetuximab 有更强的内吞，如图 27 所示。

实施例 13：抗体药物偶联物 Duligo-DXd 和 SIB001-DXd 的体外细胞杀伤检测

检测方法：

复苏后的 MCF7 细胞经过 2-3 次传代后，先倒去培养基，用 10mL PBS 润洗一遍，再用 4mL 胰蛋白酶消化细胞，培养基终止以后 400xg 离心 3min 弃上清，培养基再次重悬计数。调整细胞密度至 3E4/mL，每孔 50 uL 加入圆底低吸附 96 孔板；将待测抗体梯度稀释后每孔 50uL 加入相应的细胞中，37°C培养 5 天后取出 96 孔板，板子平衡至室温，每孔加入 100uL CTG 检测液，摇床 300 rpm 20 min，吸取 100uL 到白底 96 孔板，使用多功能酶标仪检测发光值。

体外细胞杀伤实验结果：

在 EGFR 表达较低，HER3 较高表达 (MFI-fold (EGFR) = 3.3, MFI-fold(HER3) = 19.1)的人乳腺癌细胞 MCF7 上 Duligo-DXd 比 SIB001-DXd 有显著的更强杀伤效果，IC50 降低了大约 250 倍 (Duligo-DXd 的 IC50 是 0.049nM，SIB001-DXd 的 IC50 是 13.23nM)，如图 28 所示。

在人乳腺癌如 MDA-MB-453 细胞上 Duligo-DXd 也比 SIB001-DXd 有显著的更强杀伤效果，如图 29 所示；在人结直肠癌细胞 GP2D，人肺癌细胞 H1568 以及过表达 HER3 的人结直肠癌细胞 SW480 上 Duligo-DXd 与 SIB001-DXd 有相似的体外杀伤效果，如图 30-32 所示。

实施例 14：抗体药物偶联物 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 的体外细胞杀伤检测

检测方法：

复苏后的 MDA-MB-453 细胞经过 2-3 次传代后，先倒去培养基，用 10mL PBS 润洗一遍，再用 4mL 胰蛋白酶消化细胞，培养基终止以后 400xg 离心 3min 弃上清，培养基再次重悬计数。调整细胞密度至 3E4/mL，每孔 50 uL 加入圆底低吸附 96 孔板；将待测抗体梯度稀释后每孔 50uL 加入相应的细胞中，37°C培养 5 天后取出 96 孔板，板子平衡

至室温，每孔加入 100uL CTG 检测液，摇床 300 rpm 20 min，吸取 100uL 到白底 96 孔板，使用多功能酶标仪检测发光值。

体外细胞杀伤实验结果：

在 EGFR 表达较低，HER3 较高表达(MFI-fold (EGFR) = 2.2, MFI-fold(HER3)=55.2)的人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 上 Duligo-LC1-NT3 比 SIB001-DXd 有显著的杀伤效果，IC50 降低了大约 250 倍 (Duligo-LC1-NT3 的 IC50 是 0.037nM，SIB001-DXd 的 IC50 是 9.36nM)，结果如图 33 所示。

在肺癌、结直肠癌、胰腺癌以及过表达了 HER3 的一些细胞系上，Duligo-LC1-NT3 (DAR=4)和 SIB001-DXd (DAR=8)展现了相似的体外杀伤活性，结果如图 34-39 所示。

实施例 15：ELISA 检测 Duligo-LC1-NT3 和 SIB001-DXd 对人 EGFR 和人 HER3 的亲和力

亲和力检测方法：

提前一天包被 96 孔酶标板，使用包被液将 EGFR 或 HER3 抗原稀释至 0.25μg/mL 后每孔加入 100 μL，封板膜封板，4℃过夜；倒掉 96 孔酶标板中预包被溶液，在吸水纸上拍干，然后每孔加入 230 μL 洗液，拍干洗液后，重复洗涤 3 次；排枪每孔加入 200 μL 封闭液，封板膜封板，37℃封闭 2h 后洗板；将待测样本按照最高浓度 100nM,1:4 稀释 12 个孔稀释好后每孔加入 100 μL，室温下避光孵育 2 小时，洗板；每孔加入 100μL 按照 1：80000 稀释好的 Goat anti-Human IgG Fc-HRP，室温避光孵育 1 小时，洗板；将 TMB 底物每孔 100 μL 加入到 96 孔酶标板中，室温下避光显色 2~5 分钟后每孔加入 50 μL ELISA 终止液，30 分钟内，读取 OD_{450nm} 和 OD_{620nm} 的值。

亲和力实验结果：

Duligo-LC1-NT3 比 SIB001-DXd 对 EGFR 的亲和力强，Kd 降低了大约 2.5 倍 (Kd(Duligo-LC1-NT3)=0.03517nM， Kd(SIB001-DXd)=0.08833nM)，如图 40 所示；Duligo-LC1-NT3 对 HER3 的亲和力较强 (Kd(Duligo-LC1-NT3)=0.02574nM)，SIB001-DXd 对 HER3 结合很弱，如图 41 所示。

实施例 16：EGFR/HER3-ADCs 抗体在 H508 模型中的治疗作用

本实验采用 H508 细胞接种 BALB/c NUDE 小鼠测定本发明的 EGFR/HER3-ADCs 抗体的抗肿瘤作用。

BALB/c NUDE 小鼠：

雌性 BALB/c NUDE 背景的小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证编号为 NO. 110011230103807467。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

H508 细胞购自南京科佰(CAT#: CBP60795)，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 25×10^6 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 BALB/c nude 小鼠右侧腹部区域中来建立 H508 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 37 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在约 120-140 mm^3 之间的小鼠按瘤体积平均分组 (每组 6 只小鼠) 分组，给药剂量和方式如表 1 所示，h-IgG（购自 EQUITECH-BIO, SLH56-0001）作为阴性对照，分别在接种后第 37、44 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第 55 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)，计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W)，肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 1. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG, 10 mg/kg	10 mg/kg	QWx2	腹腔注射
Duligo-LC1-NT3	10 mg/kg	QWx2	腹腔注射
SIB001-DXd	10 mg/kg	QWx2	腹腔注射

Duligo-LC1-NT3 组的肿瘤抑制率为 147%，SIB001-DXd 组的肿瘤抑制率分别为 155%。SIB001-DXd 组的肿瘤抑制效果与 Duligo-LC1-NT3 组相似，二者均强于 h-IgG 单药组，药效结果如图 42。同时我们对小鼠体重进行监测，结果如图 43 所示，小鼠体重无显著差异。因此，本发明中 EGFR/HER3-ADCs 药物对肿瘤有明显的抑制效果。

表 2. 第 55 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积 (mm^3)	TGI (%)
h-IgG, 10 mg/kg	326	N/A
Duligo-LC1-NT3, 10 mg/kg	44	147
SIB001-DXd, 10 mg/kg	30	155

实施例 17：EGFR-HER3 ADC 在 NUGC-4 模型中的治疗作用

本实验采用 NUGC-4 细胞接种 BALB/c-NUDE 小鼠测定 EGFR-HER3 ADC 的抗肿瘤作用。

BALB/c-NUDE 鼠：

雌性 BALB/c-NUDE 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证编号为 NO.110011230103807533。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

NUGC-4 细胞购自 NIBIOHN (CAT#: JCRB0834)，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 20×10^6 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 BALB/c-NUDE 小鼠右侧腹部区域中来建立 NUGC-4 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 13 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在约 200 mm^3 左右的小鼠按瘤体积平均分组 (每组 7 只小鼠) 分组，给药剂量和方式如表 3 所示，h-IgG（购自 EQUITECH-BIO, SLH56-0001）作为阴性对照，分别在接种后第 13 天给药，每周 2 次监

测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第32天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)，计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W)，肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 3. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	10 mg/kg	Single dose	腹腔注射
SIB001-DXd	10 mg/kg	Single dose	腹腔注射
Patritumab-DXd	10 mg/kg	Single dose	腹腔注射
Duligo-LC1-NT3	10 mg/kg	Single dose	腹腔注射
Duligo-DXd	10 mg/kg	Single dose	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 44 和表 4 所示：在接种后第 32 天，Patritumab-DXd / SIB001-DXd / Duligo-LC1-NT3/ Duligo-DXd 的肿瘤抑制率分别为：51% / 70% / 95% / 75%. Duligo-LC1-NT3 药效要强于 SIB001-DXd 以及 Duligo-DXd 并且有统计学差异。同时对小鼠体重进行检测，结果如图45所示，小鼠体重无显著差异。因此，EGFR/HER3 ADC对NUGC-4 肿瘤有明显的抑制效果。

表 4. 第 32 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积 (mm^3)	TGI(%)
h-IgG, 10 mg/kg	1127	/
SIB001-DXd, 10 mg/kg	457	70
Patritumab-DXd, 10 mg/kg	636	51
Duligo-LC1-NT3, 10 mg/kg	220	95
Duligo-DXd, 10 mg/kg	414	75

实施例 18：EGFR-HER3 ADC 在 SW620 模型中的治疗作用

本实验采用 SW620 细胞接种 BALB/c-NUDE 小鼠测定 EGFR-HER3 ADC 的抗肿瘤作用。

BALB/c-NUDE 鼠：

雌性 BALB/c-NUDE 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证编号为 20230614Abzz0619000190。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

SW620 细胞来自南京科佰生物科技有限公司。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 10×10^6 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 BALB/c-NUDE 右侧腹部区域中来建立 SW620 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 14 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在约 200 mm^3 左右的小鼠按瘤体积平均分组 (每组 7 只小鼠) 分组，给药剂量和方式如表 5 所示，h-IgG（购自 EQUITECH-BIO, SLH56-0001）作为阴性对照，分别在接种后第 14、21、28 天给药，每

周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第 42 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)，计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W)，肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 5. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射
IgG1LALA-NT3 (DAR=4)	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射
SIB001-DXd	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射
Duligo-LC1-NT3	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 46 和表 6 所示：在接种后第 42 天，IgG1LALA-NT3 (DAR=4) / SIB001-DXd / Duligo-LC1-NT3 的肿瘤抑制率分别为：45% / 39% / 100%. Duligo-LC1-NT3 药效要强于 SIB001-DXd。同时我们对小鼠体重进行检测，结果如图 47 所示，小鼠体重无显著差异。因此，EGFR-HER3 ADC 对 SW620 肿瘤有明显的抑制效果。

表 6. 第 42 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积 (mm^3)	TGI(%)
h-IgG, 10 mg/kg	1877	/
IgG1LALA-NT3 (DAR=4), 10 mg/kg	1134	45
Duligo-LC1-NT3, 10 mg/kg	220	100
SIB001-DXd, 10 mg/kg	1235	39

实施例 19：EGFR-HER3 ADC 在 ASPC1 模型中的治疗作用

本实验采用 ASPC1 细胞接种 BALB/c-NUDE 小鼠测定 EGFR-HER3 ADC 的抗肿瘤作用。

BALB/c-NUDE 鼠：

雌性 BALB/c-NUDE 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证编号为 20230531Abzz0619000787，小鼠购自维通利华小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

ASPC1 细胞购自南京科佰生物科技有限公司，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 25×10^6 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 BALB/c-NUDE 小鼠右侧腹部区域中来建立 ASPC1 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在约 200 mm^3 左右的小鼠按瘤体积平均分组 (每组 7 只小鼠) 分组，给药剂量和方式如表 7 所示，h-IgG（购自 EQUITECH-BIO, SLH56-0001）作为阴性对照，分别在接种后第 7、14、21 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第 28 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)，计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤

体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W)，肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 7. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射
SIB001-DXd	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射
Duligo-LC1-NT3	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 48 和表 8 所示：在接种后第 28 天，SIB001-DXd / Duligo-LC1-NT3 的肿瘤抑制率分别为： 67% / 75% . Duligo-LC1-NT3 药效要略强于 SIB001-DXd。同时我们对小鼠体重进行检测，结果如图 49 所示，小鼠体重无显著差异。因此，EGFR-HER3 ADC 对 ASPC1 肿瘤有明显的抑制效果。

表 8. 第 28 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积 (mm^3)	TGI(%)
h-IgG, 10 mg/kg	629	/
SIB001-DXd, 10 mg/kg	347	67
Duligo-LC1-NT3, 10 mg/kg	314	75

实施例 20：EGFR-HER3 ADC 在 NCI-H1568 模型中的治疗作用

本实验采用 NCI-H1568 细胞接种 BALB/c-NUDE 小鼠测定 EGFR-HER3 ADC 的抗肿瘤作用。

BALB/c-NUDE 鼠：

雌性 BALB/c-NUDE 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证编号为 NO.110011231105795417。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

NCI-H1568 细胞购自南京科佰生物科技有限公司，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 25×106 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 BALB/c-NUDE 小鼠右侧腹部区域中来建立 NCI-H1568 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 11 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在约 200 mm^3 左右的小鼠按瘤体积平均分组 (每组 7 只小鼠) 分组，给药剂量和方式如表 9 所示，h-IgG（购自 EQUITECH-BIO, SLH56-0001）作为阴性对照，分别在接种后第 11、18、27 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第 30 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)，计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W)，肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 9. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射
SIB001-DXd	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射
Duligo-LC1-NT3	10 mg/kg	QWx3	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 50 和表 10 所示：在接种后第 30 天，SIB001-DXd / Duligo-LC1-NT3 的肿瘤抑制率分别为： 61% / 81%。Duligo-LC1-NT3 药效要强于 SIB001-DXd。同时我们对小鼠体重进行检测，结果如图 51 所示，给药组小鼠体重有轻微下降。因此，EGFR-HER3 ADC 对 NCI-H1568 肿瘤有明显的抑制效果。

表 10. 第 30 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积 (mm^3)	TGI(%)
h-IgG, 10 mg/kg	917	/
SIB001-DXd, 10 mg/kg	480	61
Duligo-LC1-NT3, 10 mg/kg	332	81

本文涉及的抗体分子的氨基酸序列以及编码抗体分子的核酸序列如下。

EGFR/HER3 双特异性抗体 HCDR1 氨基酸序列 SEQ ID NO: 1
GFTLSGDWIH

EGFR/HER3 双特异性抗体 HCDR2 氨基酸序列 SEQ ID NO: 2
EISAAGGYTDYADSVKG

EGFR/HER3 双特异性抗体 HCDR3 氨基酸序列 SEQ ID NO: 3
ESRVSFEAAMDY

EGFR/HER3 双特异性抗体 LCDR1 氨基酸序列 SEQ ID NO: 4
RASQNIATDVA

EGFR/HER3 双特异性抗体 LCDR2 氨基酸序列 SEQ ID NO: 5
SASFLYS

EGFR/HER3 双特异性抗体 LCDR3 氨基酸序列 SEQ ID NO: 6
QQSEPEPYT

EGFR/HER3 双特异性抗体重链可变区氨基酸序列 SEQ ID NO: 7
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIHWVRQAPGKGLEWVGEISAA
GGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAM
DYWGQGTLVTVSS

EGFR/HER3 双特异性抗体重链可变区的核苷酸编码序列 SEQ ID NO: 8
GAAGTGCAACTCGTCGAGAGCGGCGGGGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCC
TGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCCTGAGCGGCGACTGGATCCA
CTGGGTGCGGCAAGCCCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGGTCGGGGAAATTAGC
GCCGCTGGCGGCTACACCGACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA
TCAGCGCCGACACAAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG
AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGAGAGCAGAGTGAGCTTC
GAGGCCGCCATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链可变区氨基酸序列 SEQ ID NO: 9
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIATDVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIK

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链可变区的核苷酸编码序列 SEQ ID NO: 10
GACATTCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
GAGTGACCATCACCTGCAGAGCTAGCCAAAACATCGCCACCGACGTGGCCTG
GTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCTAGC
TTCCTGTACAGCGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG
ACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTAC

TGTCAGCAGAGCGAGCCCGAGCCCTACACCTTCGGCCAAGGCACCAAGGTGG
AGATCAAG

EGFR/HER3 双特异性抗体重链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 11（仅 LALA 突变，无半胱氨酸突变）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

EGFR/HER3 双特异性抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIHWVRQAPGKGLEWVGEISAA
GGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAM
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 13（LLC160-LLC166）

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVCT
TTPSCQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 14

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIATDVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIKGQPKA
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVCTTTPSC
QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

EGFR/HER3 双特异性抗体重链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 15（HC118 和 HC239 和 LALA 突变）

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

EGFR/HER3 双特异性抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 16

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIHWVRQAPGKGLEWVGEISAA
GGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAM
DYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 17(Kappa 轻链恒定区，无突变)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 18

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIATDVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

EGFR/HER3 双特异性抗体重链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 19（HC118 突变，LALA 突变）

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

EGFR/HER3 双特异性抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIHWVRQAPGKGLEWVGEISAA
GGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAM
DYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 21（LLC160）
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVCT
TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 22
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIATDVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIKGQPKA
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVCTTTPSK
QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

EGFR/HER3 双特异性抗体重链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 23(HC239, LALA 突变)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

EGFR/HER3 双特异性抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 24
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIHWVRQAPGKGLEWVGEISAA
GGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAM
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 25（LLC166 突变）
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
TTPSCQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

EGFR/HER3 双特异性抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 26
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIATDVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIKGQPKA
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSCQ
SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SIB001 抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 27
QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG
GNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAY

WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYW
MSWVRQAPGKGLEWVANINRDGSASYYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARDRGVGYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQ
PASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSDRPSGVS
DRFSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSSYGSSSTHVIFGGGTKVTVL

SIB001 抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 28

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Duligotuzumab 抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 29

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWIHWVRQAPGKGLEWVGEISAA
GGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAM
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

Duligotuzumab 抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIATDVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG1LALA 抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 31

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWMGWINP
YNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDD
SPQDNYYMDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

IgG1LALA 抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 32
EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRA
SGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Patritumab 抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 33
QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS
GSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

Patritumab 抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 34
DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

人 IgG1 重链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 35
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

人 λ 轻链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO: 36
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Cetuximab 抗体重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 38
QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG
GNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAY
WGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG

ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

Cetuximab 抗体轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 39

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

权 利 要 求

1. 一种抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其包括

重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

重链恒定区和轻链恒定区，其中所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括突变为半胱氨酸的一个或多个突变，例如选自以下突变中的一个或多个突变：重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸、重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸；其中，氨基酸残基位置编号是依据 EU 编号系统。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述重链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，任选地所述氨基酸替换、插入或缺失不发生在 CDR 区中。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述轻链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，任选地所述氨基酸替换、插入或缺失不发生在 CDR 区中。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括选自以下突变中的任意两种突变：重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸、重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸、轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述轻链恒定区是 λ 轻链恒定区或 κ 轻链恒定区。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体还包括重链恒定区第 234 位和第 235 位突变为丙氨酸。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述重链恒定区是人 IgG1 的重链恒定区。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述轻链恒定区是人 λ 轻链恒定区或人 κ 轻链恒定区。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述突变是各自独立地相对于天然人 IgG1 免疫球蛋白的重链恒定区或轻链恒定区相比而言的。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括以下任意一组的半胱氨酸突变组合：(1) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和 λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸；(2) 重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸；(3) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸；(4) λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 118 位突变为半胱氨酸；(5) λ 轻链恒定区第 160 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸；和 (6) λ 轻链恒定区第 166 位突变为半胱氨酸和重链恒定区第 239 位突变为半胱氨酸，以及所述双特异性抗体任选地在重链恒定区还包含 LALA 突变。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体的重链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 11、15、19 和 23 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 11、15、19 和 23 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 11、15、19 和 23 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体的轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 13、17、21 和 25 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 13、17、21 和 25 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 13、17、21 和 25 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括重链和轻链，其中

所述重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 12、16、20 和 24 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 12、16、20 和 24 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 12、16、20 和 24 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 14、18、22 和 26 中任一项的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 14、18、22 和 26 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 14、18、22 和 26 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体包括重链和轻链，其中

(I) 所述重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(II) 所述重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(III) 所述重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(IV) 所述重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(V) 所述重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

或者

(VI) 所述重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；以及

所述轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个的氨基酸替换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

15. 免疫缀合物，其包含权利要求根据权利要求 1-14 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段。

16. 一种具有式 (I) 的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_n \quad (I)$$

其中，

Ab 是根据权利要求 1-14 中任一项所述的抗 EGFR 和 HER3 的双特异性抗体或其抗原结合片段，

L 是连接子，

D 是细胞毒性化合物，

n 表示连接数，且 n 是选自 1-15 的自然数；

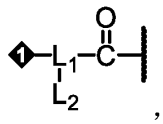
优选地，所述 L 与 Ab 中的突变半胱氨酸偶联。

17. 根据权利要求 16 所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，连接子 L 具有式 (II) 所示的结构：

$$Q\text{—}L' \quad (II),$$

Q 表示通过硫醚键 (-S-) 与 Ab 偶联的连接部分；

L'表示将 Q 与细胞毒性化合物 D 连接的连接部分，其具有如下结构：



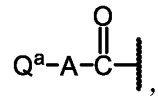
，

其中，L_1 是由 3 至 8 个氨基酸残基组成的多肽残基，任选地该多肽残基包括至少一个带有侧链羧酸的氨基酸残基，"-C(=O)-"表示多肽残基 C 端氨基酸残基的羰基；

L_2 不存在或者是与多肽残基 L_1 的氨基酸残基侧链羧酸反应后的羰基相连的亲水基团，且 L_2 是-NHR_{L2}，R_{L2} 选自任选地被 1 至 6 个羟基取代的 $C_{1\text{-}6}$ 烷基；

❶表示与连接部分 Q 共价连接的多肽残基的 N 端。

18. 根据权利要求 17 所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，连接部分 Q 具有以下结构：



，

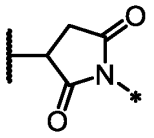
其中，Q^a 是与 Ab 偶联的官能团；

A 选自任选取代的亚脂烃基或任选取代的亚杂脂烃基，其中该亚脂烃基和亚杂脂烃基任选地被独立选自卤素、-CN、-OR_{Qa1}、-SR_{Qa1}、-$N(R_{Qa1})_2$ 组成的组的 1 至 4 个取代基取代，其中每个 R_{Qa1} 独立选自氢、$C_{1\text{-}6}$ 烷基、$C_{1\text{-}6}$ 卤代烷基； 和

"〰"表示与连接部分 L 共价连接的位点。

19. 根据权利要求 18 所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，官能团 Q^a 不存在或者选自马来酰亚胺、碘乙酰胺、溴乙酰胺、嘧啶、嘧啶基硫化物、乙烯基嘧啶、乙烯基三嗪、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基

二硫化物、卤代乙酰胺、α-卤代乙酰基、活性酯，优选为马来酰亚胺，如下结构：

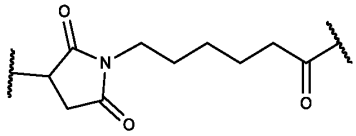


，

"*"表示与 A 共价连接的位点；

"〰"表示与抗体 Ab 共价连接的位点。

20. 根据权利要求 17-19 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，连接部分 Q 具有以下结构：



。

21. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，连接部分 L_1 具有以下结构：

^{NH}-$AA^1AA^2AA^3\ldots AA^p$-$^{C(=O)}$，

其中 AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的每一个独立地是任选取代的氨基酸残基，任选地 AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的至少一个是带有侧链羧酸的氨基酸残基，例如 Glu 或 Asp；

p 是 3 到 8 的整数，例如是 3 到 5；

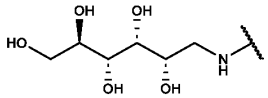
"NH-"表示多肽残基的 N 端；

"-C(=O)"表示多肽残基的 C 端。

22. 根据权利要求 21 所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的每一个独立地是任选取代的选自 Glu、Asp、Pro、Nva、Leu、Ile、Met、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln、Arg、Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Gly 和 N-烷基氨基酸组成的组的氨基酸残基，且 AA^1、AA^2、AA^3、.....AA^p 中的至少一个是 Glu 或 Asp。

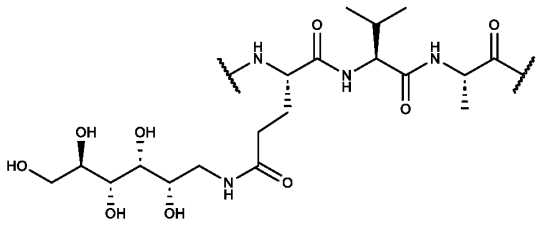
23. 根据权利要求 21 或 22 所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，连接部分 L_1 是 ^{NH}-Glu-Val-Al a-$^{C(=O)}$。

24. 根据权利要求 17-23 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，L_2 具有以下结构：



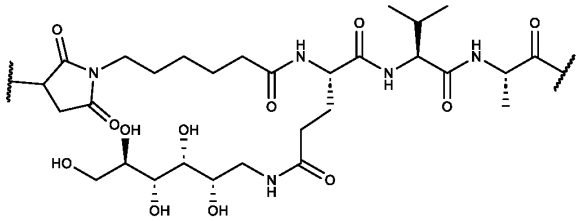
。

25. 根据权利要求 17-24 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，连接部分 L'具有以下结构：



。

26. 根据权利要求 17-25 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，连接子 L 具有以下结构：



。

27. 根据权利要求 16-26 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，所述连接子 L 通过半胱氨酸残基侧链与 Ab 连接。

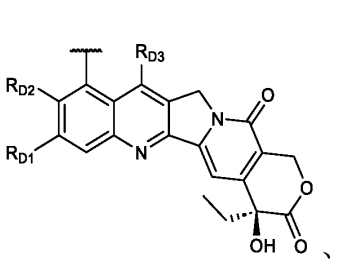
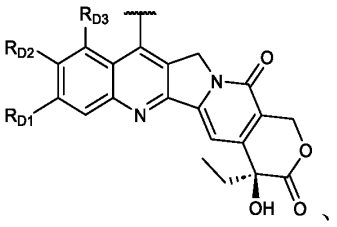
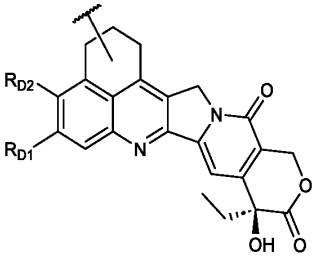
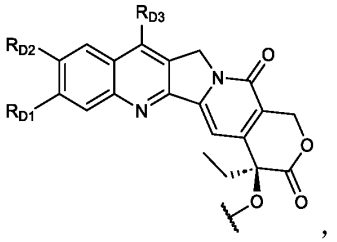
28. 根据权利要求 16-27 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，细胞毒性化合物 D 具有式 (III) 所示的结构：

Z—D' (III)

Z 不存在或者选自-NH-或-NH-R_{z1}-Y-R_{z2}-，其中 R_{z1} 和 R_{z2} 各自独立地不存在或者选自任选取代的 C_{1-8} 亚脂烃基、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-亚芳基、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-羰基 (-C(O)-)、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-氧羰基 (-C(O)O-或-OC(O)-)、任选取代的 C_{0-8} 亚脂烃基-羰基-亚氨基、任选取代的亚芳基-羰基 (-C(O)-)、任选取代的亚芳基-氧羰基 (-C(O)O-或-OC(O)-)、任选取代的亚芳基-羰基-亚氨基，其中任选取代是指任选地被独立选自 C_{1-8} 脂烃基、卤素、-CN、-OR_{z3}、-SR_{z3}、-$N(R_{z3})_2$ 组成的组的 1 至 4 个取代基取代，其中每个 R_{z3} 独立选自氢、C_{1-6} 脂烃基、C_{1-6} 卤代脂烃基，Y 不存在或者选自-O-或-S-；

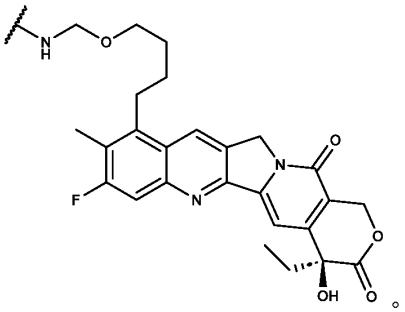
D'是喜树碱化合物，或其类似物或衍生物。

29. 根据权利要求 28 所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，D'是具有以下结构的喜树碱化合物，或其类似物或衍生物：

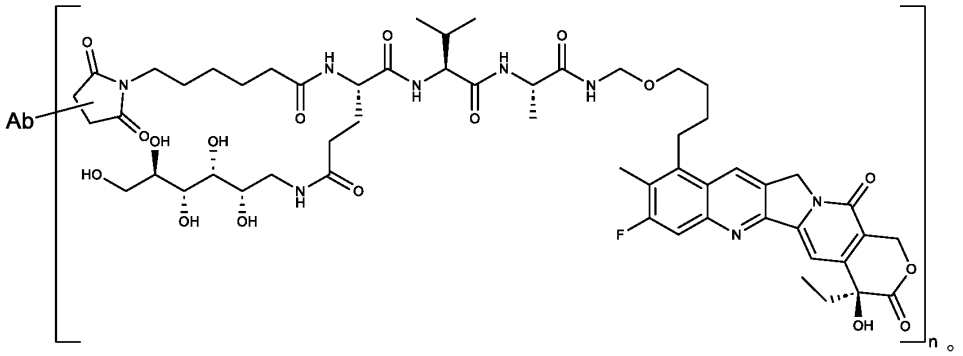

、

、

、或

，

其中 R_{D1}、R_{D2} 和 R_{D3} 各自独立地选自由 H、羟基、氰基、卤素、C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 烷氧基、C_{1-6} 烷硫基，和 C_{1-6} 卤代烷基组成的组，或者 R_{D1} 和 R_{D2} 连同其连接的碳原子共同组成 5-8 元环基或杂环基，其中任选取代是指任选地被独立选自 C_{1-8} 脂烃基、卤素、-CN、$-OR_{D'}$、$-SR_{D'}$、$-S(O)R_{D'}$ 和 $-S(O)_2R_{D'}$，和 $-N(R_{D'})_2$ 组成的组的 1 个或多个取代基取代，其中每个 $R_{D'}$ 独立选自氢、C_{1-6} 脂烃基、C_{1-6} 卤代脂烃基、$-SR_{D''}$、$-S(O)R_{D''}$ 和 $-S(O)_2R_{D''}$，每个 $R_{D''}$ 独立选自氢、C_{1-6} 脂烃基、C_{1-6} 卤代脂烃基。

30. 根据权利要求 16-29 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中，细胞毒性化合物 D 选自以下化合物：


。

31. 根据权利要求 16 所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述抗体-药物偶联物具有以下结构：



其中 Ab 和 n 如权利要求 16 所定义。

32. 根据权利要求 16-31 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其具有 1-10 例如 3-5 或 7-9 的平均 DAR。

33. 一种药物组合物，其包含权利要求 16-32 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，和药学上可接受的载体或辅料。

34. 根据权利要求 16-32 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物在制备用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症的药物中的用途。

35. 根据权利要求 34 所述的用途，其中所述与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤。

36. 根据权利要求 35 所述的用途，其中所述 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤选自由淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、胃癌、头颈鳞癌，以及各种类型的头颈癌组成的组。

37. 根据权利要求 16-32 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症。

38. 根据权利要求 37 所述的用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤。

39. 根据权利要求 38 所述的用于治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物，其

中所述 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤选自由淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、胃癌、头颈鳞癌，以及各种类型的头颈癌组成的组。

40. 一种治疗或预防与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症的方法，该方法包括向受试者施用有效量的根据权利要求 16-32 中任一项所述的双特异性抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中所述与 EGFR 和/或 HER3 活性相关的疾病或病症是 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤。

42. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述 EGFR 和/或 HER3 阳性肿瘤选自由淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、胃癌、头颈鳞癌，以及各种类型的头颈癌组成的组。

43. 根据权利要求 40-42 中任一项所述的方法，其中所述方法还包括联合施用选自由化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物、免疫调节剂和靶向降解剂等组成的组的一种或多种治疗剂。

44. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述抗体-药物偶联物、其立体异构体或药学上可接受的盐或溶剂合物和一种或多种治疗剂同时施用或以任意顺序先后施用。

45. 根据权利要求 40-44 所述的方法，其中所述方法还包括向患者施用选自由放射疗法、细胞疗法、基因疗法、RNA 治疗和手术等组成的组的一种或多种治疗方式。