抗 PD-L1 抗体及其用途

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体涉及一种抗 PD-L1 抗体，还涉及其与抗 CD137 抗体联合用药用于治疗癌症的方法，还涉及其与抗 CD137 抗体形成的双特异抗体。

背景技术

程序性死亡蛋白-1（programmed death-1, PD-1，又名 CD279）与其配体 PD-L1（又名 B7-H1，CD274）和 PD-L2（又名 B7-DC，CD273）共同提供负性共刺激信号调节 T 细胞活化。缺乏共刺激信号时，T 细胞难以感受抗原刺激，不能产生有效免疫应答，还可导致对异源抗原的衰竭或耐受。PD-1 可在 T 细胞、B 细胞、自然杀伤 T 细胞、激活的单核细胞和树突状细胞（DCs）上表达。PD-1 可由被活化的，但未被刺激的人 $CD4^+$和 $CD8^+$T 细胞、B 细胞和骨髓细胞表达。PD-L1 和 PD-L2 在表达模式上有所不同。PD-L1 可表达于造血细胞，也可在多种非造血细胞表达，而 PD-L2 的表达主要限于树突状细胞和巨噬细胞。B7.1（CD80）也是 PD-L1 的受体，它表达于激活的 B 细胞，T 细胞，巨噬细胞和树突状细胞。作为 PD-1 和 B7.1 的配体，PD-L1 还选择性表达于多种肿瘤细胞。抑制 PD-L1 信号转导，包括阻断 PD-L1 与 PD-1、B7.1 任一或两者的相互作用，从而阻止 PD-L1 发送负性共刺激信号给 T 细胞和其它抗原呈递细胞，这可能增强对感染（如急性和慢性）应答的免疫以及肿瘤免疫。

CD137（又名 4-1BB，TNFRSF9 等）是肿瘤坏死因子受体超家族（TNFRS）的一种跨膜蛋白质。研究表明 CD137 激动型单克隆抗体在许多模型中增加共刺激分子表达，并且显著增强细胞溶解性 T 淋巴细胞应答，发挥抗肿瘤作用。CD137 靶向疗法的抗肿瘤作用通过利用激动型抗小鼠 CD137 单克隆抗体的小鼠体内抗肿瘤疗效研究证实。

目前已批准的 PD-L1 抗体可用于治疗部分癌症，已有的 CD137 抗体展示出治疗多种肿瘤的潜力。已有报道利用荷瘤小鼠动物模型研究了 PD-1 抗体和 CD137 抗体的组合抗肿瘤疗效，结果表明两种抗体联合应用显示出比两者单用显著增强的抑瘤活性，但从顺应性和疼痛的角度给患者带来不便，并且增加了治疗费用。研制这两种单克隆抗体的双特异抗体（Bispecific antibody，BsAb）因其含有两种特异性抗原结合位点可解决以上问题。因此，亟待开发新的抗 PD-L1 抗体使其具有更加的药效和更低的免疫原性，以及 PD-L1/CD137 双特异性抗体以获得更好的抗肿瘤效果。

发明内容

本申请提供了一种 PD-L1 抗体、其抗原结合片段或变体，其具有下列性质中的一种或多

种：1）能够以较高的亲和力和特异性结合 PD-L1 蛋白；2）能够抑制 PD-1 蛋白与 PD-L1 蛋白的结合；3）能够缓解或治疗肿瘤。本申请也提供了一种双特异性抗体具有下列性质中的一种或多种：1）能够以较高的亲和力和特异性结合 PD-L1 蛋白；2）能够以较高的亲和力和特异性结合 CD137 蛋白；3）能够增强 T 细胞功能；4）能够缓解或治疗肿瘤。本申请还提供了所述 PD-L1 抗体、其抗原结合片段或变体、双特异性抗体的制备方法和应用。

一方面，本申请提供了一种抗体、其抗原结合片段或变体，其以 3×10^{-9}M 或更低的 K_D 与 PD-L1 蛋白相结合。

在某些实施方式中，所述抗体包含抗体轻链或其片段，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列 $TGTX_1SX_2VGGYX_3X_4VS$；其中 X_1 是 S、R 或 V；X_2 是 D、E 或 S；X_3 是 N 或 R；X_4 是 Y 或 E，且其中所述 LCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

在某些实施方式中，所述 LCDR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:54-58。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列 X_1NSX_2RPS，其中 X_1 是 G 或 E；X_2 是 N 或 I，且其中所述 LCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。在某些实施方式中，所述 LCDR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 60-61。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列：$QSYDSSLSGX_1V$，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 LCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段还包括框架区 L-FR1，L-FR2，L-FR3，和 L-FR4。在某些实施方式中，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。在某些实施方式中，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 71。在某些实施方式中，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 72。在某些实施方式中，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 73-75。在某些实施方式中，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 76。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 Igλ

恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:42。

在某些实施方式中，所述抗体包含抗体重链或其片段，所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列：X_1YAIS，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 HCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，且其中所述 HCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含选自 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列：TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY，其中 X_1 是 D、E 或 G，X_2 是 G 或 E，X_3 是 S 或 G，X_4 是 Y 或 F，X_5 是 F 或 Y，且其中所述 HCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。在某些实施方式中，所述 HCDR3 包含选自下组所示的氨基酸序列：SEQ ID NO: 50-52。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段还包括框架区 H-FR1，H-FR2，H-FR3，和 H-FR4。在某些实施方式中，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。在某些实施方式中，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 65-67。在某些实施方式中，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 68。在某些实施方式中，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，所述 H-FR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 69。在某些实施方式中，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 H-FR4 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 70。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:35。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 IgG1 恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO:36。

在某些实施方式中，所述 PD-L1 蛋白选自下组：人 PD-L1 蛋白、猴 PD-L1 蛋白和鼠 PD-L1 蛋白。

另一方面，本申请提供了一种抗体、其抗原结合片段或变体，其以 5×10^{-9}M 或更低的 K_D 与 CD137 蛋白相结合。

在某些实施方式中，所述抗体、其抗原结合片段或变体以 3×10^{-9}M 或更低的 K_D 与 CD137 蛋白相结合。

在某些实施方式中，所述抗体、其抗原结合片段或变体可缓解或治疗肿瘤。在某些实施方式中，所述抗体、其抗原结合片段或变体可缓解或治疗结肠癌。

在某些实施方式中，所述抗体包含抗体轻链或其片段。在在某些实施方式中，所述轻链或其片段包含 LCDR1-3，所述 LCDR1-3 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO: 80-82 所示。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段还包括框架区 L-FR1、L-FR2、L-FR3 和 L-FR4。在某些实施方式中，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。在某些实施方式中，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:89。在某些实施方式中，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:90。在某些实施方式中，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:91。在某些实施方式中，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:92。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:20。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:23。

在某些实施方式中，所述抗体包含抗体重链或其片段，所述重链或其片段包含 HCDR1-3，所述 HCDR1-3 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO:77-79 所示。在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段还包括框架区 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4。在某些实施方式中，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。在某些实施方式中，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:84-85。在某些实施方式中，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:86。在某些实施方式中，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，所述 H-FR3 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:87。在某些实施方式中，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 H-FR4 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:88。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH

包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:25。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 IgG 恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:27。

在某些实施方式中，所述 CD137 蛋白包括人 CD137 蛋白。

另一方面，本申请提供了一种双特异性抗体，其以 2×10^{-9}M 或更低的 K_D 值与 PD-L1 蛋白相结合，且以 8×10^{-9}M 或更低的 K_D 值与 CD137 蛋白相结合。

在某些实施方式中，所述的双特异性抗体包含特异性结合所述 PD-L1 蛋白的第一靶向部分，其中所述第一靶向部分包含所述的抗体、其抗原结合片段或变体。

在某些实施方式中，所述的双特异性抗体包含特异性结合所述 CD137 蛋白的第二靶向部分，其中所述第二靶向部分包含结合所述 CD137 蛋白的抗体、其抗原结合片段或变体。在某些实施方式中，所述结合 CD137 蛋白的抗体包含 scFv，且所述 scFv 包含选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 83。在某些实施方式中，所述的双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中所述第一多肽链包含所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区，所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区，以及所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区；且所述第二多肽链包含所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的轻链可变区。

在某些实施方式中，在所述第一多肽链中，所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端，且所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端；或者，所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端，且所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端。

在某些实施方式中，第一多肽链中所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区与所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区构成 scFv。

在某些实施方式中，所述第一多肽链中还包含人 IgG 恒定区，所述人 IgG 恒定区位于所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区的 C 端且位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端；或者，所述人 IgG 恒定区位于所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区的 C 端且位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端。

在某些实施方式中，所述第一多肽链包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:43 和 SEQ ID NO:44。在某些实施方式中，所述第二多肽链包括选自下组氨基酸序列：SEQ

ID NO:15 和 SEQ ID NO: 34。

另一方面，本申请提供一种或多种核酸分子，其编码所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体。

另一方面，本申请提供一种载体，其包含所述的核酸分子。

另一方面，本申请提供一种细胞，其包含所述的核酸分子或所述的载体。

另一方面，本申请提供一种制备所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括在使得所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体表达的条件下，培养所述的细胞。

另一方面，本申请提供一种药物组合物，其包含所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体，所述的核酸分子、所述的载体和/或所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

另一方面，本申请提供一种所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体，所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物在制备缓解或治疗肿瘤的药物中的应用。

另一方面，本申请提供一种抑制 PD-L1 蛋白和 PD-1 蛋白结合的方法，其包括施用所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体，所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物。

在本申请中，所述抗体 CDR 的位置根据抗体 Kabat 定义法确定。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本公开的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本公开的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本公开的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是本申请所述 PD-L1 抗体重链可变区和轻链可变区与相关种系序列的氨基酸序列对比。下划线处为根据 Kabat 定义法确定的 CDR。

图 2. 显示的是本申请所述 PD-L1 抗体抑制人 PD-L1 与人 PD-1 结合的结果。

图 3. 显示的是本申请所述 PD-L1 抗体抑制食蟹猴 PD-L1 与食蟹猴 PD-1 结合的结果。

图 4. 显示的是本申请所述 PD-L1 抗体抑制小鼠 PD-L1 与小鼠 PD-1 的结合的结果。

图 5. 显示的是本申请所述各抗体对 C57BL/6 小鼠中 MC38 肿瘤生长的影响（*, $P< 0.05$; ***, $P< 0.001$；Unpaired t 检验）。

图 6. 显示的是本申请所述 CD137 抗体重链可变区和轻链可变区与相关种系序列的氨基酸序列对比，下划线处为根据 Kabat 定义法确定的 CDR。

图 7. 显示的是本申请所述 CD137 抗体对转入人 CD137 基因的 C57BL/6 雌性小鼠中 MC38 肿瘤生长的影响（*, $P< 0.05$; **, $P< 0.01$；Unpaired t 检验）。

图 8. 显示的是本申请 PD-L1 抗体重链可变区和轻链可变区与相关种系序列的氨基酸序列对比，下划线处为根据 Kabat 定义法确定的 CDR，阴影部分为根据 IMGT 定义法确定的 CDR。进行亲和力成熟时 YN003 各 CDR 区（包括 CDR 区中部分氨基酸残基及与 CDR 区临近的 FR 区中个别氨基酸残基）随机化靶向的氨基酸残基以斜体字母表示。

图 9. 显示的是本申请 PD-L1 抗体重链可变区与相关种系序列的氨基酸序列对比，下划线处为根据 Kabat 定义法确定的 CDR，阴影部分为根据 IMGT 定义法确定的 CDR。

图 10. 显示的是本申请 PD-L1 抗体轻链可变区与相关种系序列的氨基酸序列对比，下划线处为根据 Kabat 定义法确定的 CDR，阴影部分为根据 IMGT 定义法确定的 CDR。

图 11. 显示的是本申请 PD-L1 抗体结合稳定表达人 PD-L1 的 CHO 细胞的情况。

图 12. 显示的是本申请 PD-L1 抗体抑制人 PD-1 与人 PD-L1 结合的情况。

图 13. 显示的是本申请 PD-L1 抗体结合稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞的情况。

图 14. 显示的是本申请 PD-L1 抗体抑制小鼠 PD-1 与小鼠 PD-L1 结合的情况。

图 15. 显示的是本申请 PD-L1 抗体结合 MDA-MB-231 细胞的情况。

图 16. 显示的是本申请 PD-L1 抗体及 PD-L1/CD137 双特异抗体结合稳定表达人 PD-L1 的 CHO 细胞的情况。

图 17. 显示的是本申请 PD-L1 抗体及 PD-L1/CD137 双特异抗体抑制人 PD-1 与人 PD-L1 结合的情况。

图 18.显示的是本申请 PD-L1 抗体及 PD-L1/CD137 双特异抗体结合稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞的情况。

图 19.显示的是本申请 PD-L1 抗体及 PD-L1/CD137 双特异抗体抑制小鼠 PD-1 与小鼠 PD-L1 结合的情况。

图 20.显示的是本申请 CD137 抗体及 PD-L1/CD137 双特异抗体结合稳定表达人 CD137 的 293T 细胞的情况。

图 21. 显示的是 SDS-PAGE 分析本申请所述抗体的分子量情况。a, 非还原；b，还原。

图 22. 显示的是本申请所述各抗体刺激表达人 CD137 以及稳定整合萤光素酶报道基因的 293T 细胞的萤光素酶活性的结果。

图 23. 显示的是本申请所述抗体对转入人 CD137 基因的 C57BL/6 雌性小鼠中 MC38 肿瘤生长的影响（*, P< 0.05;Unpaired *t* 检验）。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

在本申请中，术语“抗体”通常是指一种能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。例如，抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重（H）链和两条轻（L）链组成的免疫球蛋白，并且包括任何包含其抗原结合部分的分子。术语“抗体”包括单克隆抗体、抗体片段或抗体衍生物，包括但不限于人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体（例如，scFv），以及与抗原结合的抗体片段（例如，Fab、Fab’和（Fab）2 片段）。术语“抗体”还包括抗体的所有重组体形式，例如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化的抗体以及本文所述的任何与抗原结合的抗体片段及其衍生物。每条重链可由重链可变区（VH）和重链恒定区构成。每条轻链可由轻链可变区（VL）和轻链恒定区构成。VH 和 VL 区可进一步被区分为称为互补决定区（CDR）的高变区，它们散布在称为构架区（FR）的更保守的区域中。每个 VH 和 VL 可由三个 CDR 和四个 FR 区构成，它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导该免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一成分（Clq）。

在本申请中，术语“PD-L1 蛋白”通常是指程序性死亡蛋白-1（programmed death-1, PD-1）蛋白的配体。PD-1 是 Ig 超级家族的受体，其通过与特异性配体（PD-L）相互作用负调节 T 细胞抗原受体信号传导，并建议在维持自身耐受中起作用。缺乏共刺激信号时，T 细胞难以感受抗原刺激，不能产生有效免疫应答，还可导致对异源抗原的衰竭或耐受。PD-L1 可表达于造血细胞，也可在多种非造血细胞表达。B7.1（CD80）也是 PD-L1 的受体，它表达于激活的 B 细胞，T 细胞，巨噬细胞和树突状细胞。作为 PD-1 和 B7.1 的配体，PD-L1 还选择性表达于多种肿瘤细胞。抑制 PD-L1 信号转导，包括阻断 PD-L1 与 PD-1、B7.1 任一或两者的相

互作用，从而阻止 PD-L1 发送负性共刺激信号给 T 细胞和其它抗原呈递细胞，这可能增强对感染（如急性和慢性）应答的免疫以及肿瘤免疫。

在本申请中，术语“CD137 蛋白”，又名 4-1BB 或 TNFRS9，通常是指肿瘤坏死因子受体超家族（TNFRS）的一种跨膜蛋白质，是激活诱导的共刺激分子是免疫应答的重要调节剂。研究表明 CD137 激动型单克隆抗体在许多模型中增加共刺激分子表达，并且显著增强细胞溶解性 T 淋巴细胞应答，发挥抗肿瘤作用。CD137 靶向疗法的抗肿瘤作用可以通过利用激动型抗小鼠 CD137 单克隆抗体的小鼠体内抗肿瘤疗效研究证实。CD137 已经成为免疫细胞的有力激活剂，并成为治疗各种疾病的重要候选抗原。（参见 Vinay, Dass S., and Byoung S. Kwon. "4-1BB（CD137）, an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy." BMB reports 47.3 （2014）: 122.）

在本申请中，术语“NFκB”是指核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子（nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells，NFκB）。这是一种控制 DNA 转录的蛋白复合体。NFκB 几乎存在于所有类型的动物细胞中并参与细胞对诸多刺激的响应，这些刺激包括应激、细胞因子、自由基、紫外线照射、氧化 LDL 及细菌或病毒抗原。在针对感染的免疫反应中，NFκB 起到了重要的调节作用（κ 轻链是免疫球蛋白的重要组成部分）。NFκB 的调控失常与癌症、炎症和自身免疫病、感染性休克、病毒感染以及免疫发育异常有关。NFκB 亦与突触可塑性及记忆过程有着密切关系。NFκB 的主要靶细胞是趋化因子，免疫受体，黏附分子，应激反应基因，凋亡调节剂，转录因子，生长因子，酶和细胞周期调节剂。此外，NFκB 对几种病毒启动子/增强子（例如 HIV-1 和 CMV）的转录有重要的影响（参见 Tergaonkar, Vinay. "NFκB pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target." The international journal of biochemistry & cell biology 38.10 （2006）: 1647-1653.）。

在本申请中，术语“K_D”可与“KD”互换使用，通常是指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，单位为 M（mol/L）。KD 可通过物质 AB 和其解离得到的物质 A 和物质 B 的浓度来计算：KD =c（A）*c（B）/c（AB）。由该公式可知，KD 值越大，说明解离越多，代表物质 A、B 之间的亲和力越弱；反之，KD 值越小，说明解离越少，代表物质 A、B 之间的亲和力越强。

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常是指一群基本同源的抗体的抗体，即包含该群的各个抗体除了可能的以微量存在的天然发生的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，直接针对单个抗原性位点。此外，与包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物相反，每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇修饰语"单克隆"不是被解释为需要通过任何特殊方法产生抗体。例如，所述单克隆抗体可以通过杂交瘤技术制备或者通过使用重

组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中产生单克隆抗体也可以得自噬菌体抗体文库，使用例如 Clackson etal. , Nature, 352:624-628（1991）和 Marks et al., Mol.Biol.，222:581-597（1991）所述的技术进行。

在本申请中，术语“单链抗体”通常是指（scFv）通常是指通常是指是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接子（linker）连接而成的分子。

在本申请中，术语“嵌合抗体”通常是指这样的抗体，其中每个重链或轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种的抗体中相应氨基酸序列同源，或者属于特定的类别，而该链的其余区段则与另一物种中的相应序列同源。例如，轻链和重链的可变区均来自一个动物物种（如小鼠、大鼠等）的抗体的可变区，而恒定部分则与来自另一物种（如人）的抗体序列同源。例如，为获得嵌合抗体，可利用非人源的 B 细胞或杂交瘤细胞产生可变区，而与其组合的恒定区则来自人。所述可变区具有易于制备的优点，并且其特异性不受与其组合的恒定区的来源的影响。同时，由于嵌合抗体的恒定区可来源于人类，因此嵌合在注射时抗体引发免疫应答的可能性会低于使用恒定区为非人来源的抗体。

在本申请中，术语“人源化抗体”通常是指使用遗传工程技术将衍生自非人物种（例如小鼠或大鼠）的抗体、免疫球蛋白结合蛋白和多肽对人体的免疫原性降低，同时仍保留原始抗体的抗原结合特性的改造抗体。例如，可以使用 CDR 移植（Jones et al., Nature 321:522（1986））及其变体；包括“重塑”（reshaping），（Verhoeyen, et al., 1988 Science 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337; Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271），“高度加成”（hyperchimerization），（Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033; Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149-1154）和“贴面”（veneering），（Mark, et al., “Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies.” In: Metcalf B W, Dalton B J, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312）等技术手段，对非人源的结合域进行人源化。如果其他区域，例如铰链区和恒定区结构域也源自非人来源，则这些区域也可以被人源化。

在本申请中，术语“全人源抗体”通常是指抗体所有全部（包括抗体的恒定区部分，CH 和 CL 区）均由人类来源的基因所编码。全人源抗体可以大大减少异源抗体对人体造成的免疫副反应。

在本申请中，术语“双特异抗体（Bispecific antibody，BsAbs）”通常是指在其结合臂中具有双重特异性的抗体或抗体构建体。天然存在的抗体是单特异性的，并且在它们的抗原结合臂中具有相同的特异性。双特异性抗体是从两种不同来源获得，并通过重组 DNA 或细胞融

合技术构建而成，使得它们保留原始抗体的两种特异性。双特异性抗体携带两个不同的抗原结合位点。双特异性抗体的 Fc 部分不同于任意亲本单特异性抗体中的 Fc 部分。由于双特异性抗体对于药物和肿瘤细胞都具有双重特异性，理论上其可导致在肿瘤中药物积累高于在体内无肿瘤部位的积累。大部门双特异新抗体可以重定向细胞毒性效应细胞（如 Tc 细胞，NK 细胞，嗜中性粒细胞）至靶向细胞（例如肿瘤细胞）。双特异性抗体能够同时阻断在发病机制中发挥独特或重叠功能的两种不同介质/通路，还可能通过与两种不同细胞表面抗原而不是一种相互作用而增加结合特异性。（Fanger, Michael W., and Paul M. Guyre. "Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity." Trends in biotechnology, 1991: 375-380），（Fan, Gaowei, et al. "Bispecific antibodies and their applications." Journal of hematology & oncology, 2015: 130）

在本申请中，术语“序列同源性”通常是指同源蛋白质的氨基酸序列具有明显的相似性。

在本申请中，术语“表位”通常是指抗原决定簇，即指分子中被免疫系统识别（例如被抗体识别）的部分。例如，表位是被免疫系统识别的抗原上不连续的三维位点。表位通常由分子的化学活性表面基团（例如氨基酸或糖侧链）组成，并通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位根据结构，可分为构象表位和非构象表位（线性表位）。构象表位与非构象表位的区别在于在变性溶剂存在下前者丧失结合，而后者则不会。只位于抗原物质表面、易与抗原识别受体或抗体结合的表位可称为功能性表位；位于分子内部、无免疫原性的表位可称为隐藏性表位。表位可以由连续的残基构成，或者由被抗原聚合物的折叠造成领近的不连续残基形成。在蛋白质中连续氨基酸所形成的表位通常在暴露到变性溶剂时仍被保持，然而不连续氨基酸所形成的表位通常会在所述暴露后丧失。

在本申请中，术语“抗原结合片段”通常是指完整抗体的一部分，例如，完整抗体的抗原结合区和/或可变区。在某些实施方式中，所述抗原结合片段可包括 Fab、Fab'、F（ab）$_2$、F（ab'）$_2$和 Fv 片段。在某些实施方式中，本申请所述的抗体可包括双链抗体、线性抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。由木瓜蛋白酶消化具有完整结构的抗体后（例如，去除了 Fc 区和铰链区）而产生两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段。Fab 片段由完整的轻链、重链可变区（VH）和重链的第一恒定结构域（CH1）组成。每个 Fab 片段相对于抗原结合是单价的，即它具有单一的抗原结合位点。F（ab）$_2$ 抗体片段最初作为成对的 Fab 片段产生，在它们之间有半胱氨酸相连接。由胃蛋白酶消化具有完整结构的抗体后产生单一的大的 F（ab'）$_2$片段，其粗略地相当于两个通过二硫键相连具有不同的抗原结合活性的 Fab 片段，且仍能够交联抗原。Fab'片段与 Fab 片段不同之处在于在 CH1 结构域的羧基末端具有几个额外的残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fv 片段由抗体单臂的 VL 和

VH 结构域组成。

在本申请中，术语“变体”通常是指包括与其具有基本上相同的功能（例如，能够特异性结合 PD-L1），且与其具有至少 85%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述氨基酸序列的变体为与其具有基本上相同的功能（例如，能够特异性结合 PD-L1），且在其基础上包含一个或多个（例如，1-2 个、1-3 个、1-4 个、1-5 个、1-6 个、1-7 个、1-8 个、1-9 个、1-10 个或更多个）氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列。

在本申请中，术语“同一性”通常是指候选序列与特定肽或多肽序列相比，相同的氨基酸残基的数目占所有的氨基酸残基的数目的百分比。

在本申请中，术语“IgG”通常是指免疫球蛋白 G（Immunoglobulin G）。IgG 是人的免疫球蛋白之一，其他还有 lgA、lgM、IgD 和 lgE。IgG 是血清主要的抗体成分，约占血清 Ig 的 75%。根据 IgG 分子中的 γ 链抗原性差异，人 IgG 有四个亚型：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。IgG 在免疫中发挥重要的作用。在本申请中，术语“IgG1”通常是指 IgG 中占比最高的一类亚型，与 Fc 受体有较高亲和性。

在本申请中，术语“核酸分子”通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述载体可包括主要用于将 DNA 或 RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制 DNA 或 RNA 的载体，以及主要用于 DNA 或 RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的宿主细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。

在本申请中，术语“宿主细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体，或者能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段的个体细胞，细胞系或细胞培养物。所述宿主细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于天然的，意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段即可。所述宿主细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述宿主细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如 COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，HeLa 细胞，HEK293 细胞，COS-1 细胞，

NS0 细胞或骨髓瘤细胞）。在一些实施方案中，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。例如，所述哺乳动物细胞可以是 CHO-K1 细胞。在本申请中，术语“重组宿主细胞”通常指在其中引入了重组表达载体的细胞。所述重组宿主细胞不仅包括某种特定的细胞，还包括这些细胞的后代。

在本申请中，术语“癌症”通常是指或描述哺乳动物的生理状况，其典型特征在于细胞增殖或存活失调。癌症的例子包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病以及淋巴恶性肿瘤。例如，可以为淋巴瘤。

在本申请中，术语“在……之间”通常是指某种氨基酸片段的 C 端与第一氨基酸片段的 N 端直接或间接连接，并且其 N 端与第二氨基酸片段的 C 端直接或间接连接。在轻链中，例如，所述 L-FR2 的 N 末端与所述 LCDR1 的 C 末端直接或间接相连，且所述 L-FR2 的 C 末端与所述 LCDR2 的 N 末端直接或间接相连。又例如，所述 L-FR3 的 N 末端与所述 LCDR2 的 C 末端直接或间接相连，且所述 L-FR3 的 C 末端与所述 LCDR3 的 N 末端直接或间接相连。在重链中，例如，所述 H-FR2 的 N 末端与所述 HCDR1 的 C 末端直接或间接相连，且所述 H-FR2 的 C 末端与所述 HCDR2 的 N 末端直接或间接相连。又例如，所述 H-FR3 的 N 末端与所述 HCDR2 的 C 末端直接或间接相连，且所述 H-FR3 的 C 末端与所述 HCDR3 的 N 末端直接或间接相连。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10%的范围内变动。

在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

抗体或其抗体结合片段

在一个方面，本申请提供了一种抗体或其抗原结合片段或变体，其以 3×10^{-9}M 以下（例如，所述 K_D 的值不高于约 3×10^{-9}M、不高于约 2×10^{-9}M、不高于约 1×10^{-9}M、不高于约 9×10^{-10}M、不高于约 8×10^{-10}M、不高于约 7×10^{-10}M、不高于约 6×10^{-10}M、不高于约 5×10^{-10}M、不高于约 4×10^{-10}M、不高于约 3×10^{-10}M、不高于约 2×10^{-10}M、不高于 1×10^{-10}M、不高于约 9×10^{-11}M、不高于约 8×10^{-11}M、不高于约 7×10^{-11}M、不高于约 6×10^{-11}M、不高于约 1×10^{-11}M 或以下）的 K_D 值与 PD-L1 蛋白相结合。例如，所述的抗体、其抗原结合片段或变体可以以 8×10^{-11}M 以下的 K_D 值与 PD-L1 蛋白相结合。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段或变体可抑制 PD-L1 与 PD-1 的结合。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段或变体可缓解或治疗与肿瘤相关的疾病。所述肿瘤

包括结肠癌。

本申请中，所述抗体可选自以下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

在本申请中，所述的抗原结合片段可选自以下组：Fab，Fab'，F（ab）2 和 Fv 片段。

在本申请中，所述变体可以为与其具有基本上相同的功能（例如，能够特异性结合 PD-L1），且与其具有至少 85%以上（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述氨基酸序列的变体为与其具有基本上相同的功能（例如，能够特异性结合 PD-L1），且在其基础上包含一个或多个（例如，1-2 个、1-3 个、1-4 个、1-5 个、1-6 个、1-7 个、1-8 个、1-9 个、1-10 个或更多个）氨基酸的添加、缺失或置换的氨基酸序列。又例如，本申请中所述变体可以选自以下组：在所述抗体或所述其抗原结合片段中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述抗体或所述其抗原结合片段具有 85%以上（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体可包含抗体轻链或其片段，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列 $TGTX_1SX_2VGGYX_3X_4VS$；其中 X_1 是 S、R 或 V；X_2 是 D、E 或 S；X_3 是 N 或 R；X_4 是 Y 或 E，且其中所述 LCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:54-58。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列 X_1NSX_2RPS，其中 X_1 是 G 或 E；X_2 是 N 或 I，且其中所述 LCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:60-61。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列：$QSYDSSLSGX_1V$，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 LCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:63 和 SEQ ID NO:64。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段还可包括框架区 L-FR1，L-FR2，L-FR3，和 L-FR4。例如，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端可直接或间接相连，所述 L-FR1 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:71。所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，

所述 L-FR2 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:72。所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:73-75。所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:76。在某些实施方式中，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体的轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:33，SEQ ID NO:37，SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41。

在本申请所述的抗体或其抗原结合片段或变体中，所述抗体轻链或其片段还可包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

在本申请中，所述抗体轻链或其片段可包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:34，SEQ ID NO:38，SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:42。

在本申请中，本申请所述抗体可包含抗体重链或其片段，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可包含选自 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列：X_1YAIS，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 HCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:46 和 SEQ ID NO:47。

在本申请中，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:48，且其中所述 HCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

在本申请中，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列：TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY，其中 X_1 是 D、E 或 G，X_2 是 G 或 E，X_3 是 S 或 G，X_4 是 Y 或 F，X_5 是 F 或 Y，且其中所述 HCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:50~52。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段还包括框架区 H-FR1，H-FR2，H-FR3，和 H-FR4。例如，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 可包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:65，SEQ ID NO:66 和 SEQ ID NO:67。所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:68。所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，所述 H-FR3 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:69。所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 H-FR4 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:70。在某些实施方式中，所述框架区选自以下组：人

共有框架序列和人种系序列。

本申请所述的抗体重链或其片段可包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 可包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:9，SEQ ID NO:31，和 SEQ ID NO:35。在本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中，所述抗体重链或其片段还可包含人恒定区。例如，所述人恒定区可包括人 IgG 恒定区。例如，所述人 IgG 恒定区可包含人 IgG1 恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段可包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:13，SEQ ID NO:32，和 SEQ ID NO:36。

在某些实施方式中，本申请所述抗体包含抗体轻链或其片段，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列 $TGTX_1SX_2VGGYX_3X_4VS$；其中 X_1 是 S、R 或 V；X_2 是 D、E 或 S；X_3 是 N 或 R；X_4 是 Y 或 E，且其中所述 LCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含选自下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:54-58。所述抗体轻链或其片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列 X_1NSX_2RPS，其中 X_1 是 G 或 E；X_2 是 N 或 I，且其中所述 LCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含选自下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:60-61。所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列：$QSYDSSLSGX_1V$，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 LCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含选自下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:63-64。并且，本申请所述抗体包含抗体重链或其片段，所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列：X_1YAIS，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 HCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。例如，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:46 和 SEQ ID NO:47。例如，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:48，且其中所述 HCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。又例如，所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列：$TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY$，其中 X_1 是 D、E 或 G，X_2 是 G 或 E，X_3 是 S 或 G，X_4 是 Y 或 F，X_5 是 F 或 Y，且其中所述 HCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。所述抗体重链或其片段可包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:50~52。

本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO:54 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO:60 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO:63 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO:46；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :50 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-002 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些情形中，所述抗体、其抗原结合片段或变体中 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :73 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :65 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；且 H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-002 与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :4 或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :2 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-002 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示且所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-002 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合 PD-L1 蛋白（例如，人 PD-L1 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3，且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :54 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :60 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :63 或其变体；其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :46 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :50 或其变体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 YN-002 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体包含 L-FR1-4 及 H-FR1-4，且 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :73 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :65 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；

H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 YN-002 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :4 或其变体；且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :2 或其变体。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-002 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:8 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:6 所示。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-002 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :54 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :60 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :63 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :46 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :50 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些情形中，所述抗体、其抗原结合片段或变体中 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :74 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :66 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；且 H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :11 或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :9 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示且所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合

PD-L1 蛋白(例如,人 PD-L1 蛋白)。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3,且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :54 或其变体; LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :60 或其变体; LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :63 或其变体; 其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :46 或其变体; HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体; HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :50 或其变体。在某些实施方式中,所述参比抗体可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中,所述参比抗体包含 L-FR1-4 及 H-FR1-4, 且 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体;L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体;L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :74 或其变体; L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体; 且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :66 或其变体;H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体; H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体; H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如,该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中,所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :11 或其变体; 且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :9 或其变体。例如,该参比抗体可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中,所述参比抗体可包含轻链和重链,所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:15 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:13 所示。例如,该参比抗体可包括抗体 YN-003 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中,本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :55 或其变体; LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :60 或其变体; LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体; 且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体; HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体; HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :51 或其变体。例如,该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些情形中,所述抗体、其抗原结合片段或变体中 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体; L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体; L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :74 或其变体; L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体; 且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体; H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体; H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体; 且 H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。

例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :33 或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :31 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示且所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合 PD-L1 蛋白（例如，人 PD-L1 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3，且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :55 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :60 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体；其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :51 或其变体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体包含 L-FR1-4 及 H-FR1-4，且 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :74 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :33 或其变体；且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :31 或其变体。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:34 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:32 所示。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-035 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列

可包括 SEQ ID NO :55 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :60 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些情形中，所述抗体、其抗原结合片段或变体中 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :74 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；且 H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :33 或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示且所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合 PD-L1 蛋白（例如，人 PD-L1 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3，且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :55 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :60 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体；其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体包含 L-FR1-4 及 H-FR1-4，且 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :74 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；

H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :33 或其变体；且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:34 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:36 所示。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-036 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :56 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :61 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些情形中，所述抗体、其抗原结合片段或变体中 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :75 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；且 H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :37 或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示且所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合

PD-L1 蛋白(例如,人 PD-L1 蛋白)。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3,且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :56 或其变体; LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :61 或其变体; LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体; 其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体; HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体; HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。在某些实施方式中,所述参比抗体可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中,所述参比抗体包含 L-FR1-4 及 H-FR1-4, 且 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体;L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体;L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :75 或其变体; L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体; 且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体;H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体; H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体; H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如, 该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中,所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :37 或其变体; 且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如, 该参比抗体可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中,所述参比抗体可包含轻链和重链,所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:38 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:36 所示。例如, 该参比抗体可包括抗体 YN-037 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中,本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :57 或其变体; LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :61 或其变体; LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体; 且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体; HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体; HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。例如, 该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些情形中,所述抗体、其抗原结合片段或变体中 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体; L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体; L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :75 或其变体; L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体; 且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体; H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体; H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体; 且 H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。

例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :39 或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:40 所示且所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合 PD-L1 蛋白（例如，人 PD-L1 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3，且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :57 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :61 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体；其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体包含 L-FR1-4 及 H-FR1-4，且 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :75 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :39 或其变体；且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:40 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:36 所示。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-038 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列

可包括 SEQ ID NO :58 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :61 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些情形中，所述抗体、其抗原结合片段或变体中 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :75 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；且 H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :41 或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:42 所示且所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合 PD-L1 蛋白（例如，人 PD-L1 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3，且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :58 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :61 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :64 或其变体；其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :52 或其变体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体包含 L-FR1-4 及 H-FR1-4，且 L-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :71 或其变体；L-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :72 或其变体；L-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :75 或其变体；L-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :76 或其变体；且 H-FR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :67 或其变体；H-FR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :68 或其变体；

H-FR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :69 或其变体；H-FR4 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :70 或其变体。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的 LCDR1-3、HCDR1-3、L-FR1-4 及 H-FR1-4 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :41 或其变体；且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :35 或其变体。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:42 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:36 所示。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-039 或与其具有相同的轻链及重链。

本申请中，所述 PD-L1 蛋白选自以下组：人 PD-L1 蛋白、猴 PD-L1 蛋白和鼠 PD-L1 蛋白。

在另一方面，本申请还提供了一种抗体、其抗原结合片段或变体，其以 5×10^{-9}M 以下（例如，所述 K_D 的值不高于约 5×10^{-9}M、不高于约 4×10^{-9}M、不高于约 3×10^{-9}M、不高于约 2×10^{-9}M、不高于约 1×10^{-9}M 或不高于约 1×10^{-10}M 或以下）的 K_D 值与 CD137 蛋白相结合。例如，以 3×10^{-9}M 以下的 K_D 值与 CD137 蛋白相结合。

本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可缓解或治疗肿瘤。例如，所述肿瘤可包括结肠癌。

在本申请中，所述抗体可选自以下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

本申请中，所述抗原结合片段可选自以下组：Fab，Fab'，F（ab）2 和 Fv 片段。

本申请中，所述变体可为与所述抗体具有基本上相同的功能（例如，能够特异性结合 CD137），且与其具有至少 85%以上（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述氨基酸序列的变体为与其具有基本上相同的功能（例如，能够特异性结合 CD137），且在其基础上包含一个或多个（例如，1-2 个、1-3 个、1-4 个、1-5 个、1-6 个、1-7 个、1-8 个、1-9 个、1-10 个或更多个）氨基酸的添加、缺失或置换的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体可包含抗体轻链或其片段。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR1，且所述 LCDR1 可包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:80。例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:81。又例如，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3 或其变体，且所述 LCDR3 可包含以

下的氨基酸序列：SEQ ID NO:82。

在某些实施方式中，所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包括框架区 L-FR1、L-FR2、L-FR3 和 L-FR4。例如，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:89。所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:90。所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:91。所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:92。

在某些实施方式中，所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 可包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:20。

在本申请中，所述抗体轻链或其片段还可包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

在本申请中，所述抗体的所述轻链或其片段可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:23。

在某些实施方式中，所述的抗体可包含抗体重链或其片段。所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:77。所述抗体重链或其片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 可包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:78。所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 可包含以下的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:79。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段还可包括框架区 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4。所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:84-85。所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:86。所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，所述 H-FR3 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:87。所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 H-FR4 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:88。

本申请所述的抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 可包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO：25。

在本申请的抗体、其抗原结合片段或变体中，所述抗体重链或其片段还可包含人恒定区。例如，所述人恒定区可包括人 IgG 恒定区。例如，所述人 IgG 恒定区可包含人 IgG1 恒定区。

在本申请中，所述抗体重链或其片段可包含选自以下组的氨基酸序列或其变体：SEQ ID

NO:21 或 SEQ ID NO：27。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO:80 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :81 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :82 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :77 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :78 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :79 或其变体。例如，所述抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-005 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :20 或其变体；且其重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :18 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-005 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:23 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:21 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-005 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合 CD137 蛋白（例如，人 CD137 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3，且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :80 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :81 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :82 或其变体；其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :77 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :78 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :79 或其变体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 YN-005 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :20 或其变体；且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO 18 或其变体。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-005 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:23 所示且所述重链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:21 所示。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-005 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO:80 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :81 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :82 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :77 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :78 或其变体；HCDR3 的氨基

酸序列可包括 SEQ ID NO :79 或其变体。例如，所述抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-006 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :20 或其变体；且其重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :25 或其变体。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-006 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:23 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:27 所示。例如，该抗体、其抗原结合片段或变体可包括抗体 YN-006 或与其具有相同的轻链及重链。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体与参比抗体竞争结合 CD137 蛋白（例如，人 CD137 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1-3 和 HCDR1-3，且其 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :80 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :81 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :82 或其变体；其 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :77 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :78 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :79 或其变体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 YN-006 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :20 或其变体；且所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO 25 或其变体。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-006 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:23 所示且所述重链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO：27 所示。例如，该参比抗体可包括抗体 YN-006 或与其具有相同的轻链及重链。

在本申请中，所述 CD137 蛋白可包括人 CD137 蛋白。

在另一方面，本申请还提供了一种双特异性抗体，其以 2×10^{-9}M 以下（例如，所述 K_D 的值不高于约 2×10^{-9}M、不高于约 1×10^{-9}M、不高于约 1×10^{-10}M 或不高于约 8×10^{-11}M 或以下）的 K_D 值与 PD-L1 蛋白相结合，且其以 8×10^{-9}M 以下（例如，所述 K_D 的值不高于约 8×10^{-9}M、不高于约 7×10^{-9}M、不高于约 6×10^{-9}M、不高于约 5×10^{-9}M、不高于约 4×10^{-9}M、不高于约 3×10^{-9}M、不高于约 2×10^{-9}M、不高于约 1×10^{-9}M 或不高于约 1×10^{-10}M 或以下）的 K_D 值与 CD137 蛋白相结合。

在本申请中，所述 PD-L1 蛋白选自以下组：人 PD-L1 蛋白、猴 PD-L1 蛋白和鼠 PD-L1 蛋白；且所述 CD137 蛋白包括人 CD137 蛋白。

在本申请中，所述的双特异性抗体包含特异性结合所述 PD-L1 蛋白的第一靶向部分，其中所述第一靶向部分可包含结合 PD-L1 的所述的抗体、其抗原结合片段或变体。

例如，所述第一靶向部分中所述抗原结合片段可选自以下组：Fab，Fab'，F（ab）2 和 Fv 片段。又例如，所述第一靶向部分中所述变体可选自以下组：在所述抗体或所述其抗原结合片段中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述抗体或所述其抗原结合片段具有 85%以上（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。所述抗体、其抗原结合片段或变体可以是结合所述 PD-L1 蛋白的抗体、其抗原结合片段或变体。

在某些实施方式中，所述的双特异性抗体中结合 PD-L1 蛋白的抗体可包含轻链或其片段。例如，所述轻链或其片段包含 LCDR1-3，所述 LCDR1 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:54~58；所述 LCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:60~61；和，所述 LCDR3 的氨基酸序列选自以下组：SEQ ID NO:63-64。在某些实施方式中，所述轻链或其片段可包含轻链可变区，且所述轻链可变区的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:33，SEQ ID NO:37，SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41。在某些实施方式中，所述抗体的轻链或其片段可包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

在某些实施方式中，所述轻链或其片段可包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:34，SEQ ID NO:38，SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:42。

在某些实施方式中，所述结合 PD-L1 蛋白的抗体可包含重链或其片段。例如，所述重链或其片段包含 HCDR1-3，所述 HCDR1 的氨基酸序列选自以下组：SEQ ID NO:46~47；所述 HCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:48；和，所述 HCDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:50~52。

在某些实施方式中，所述重链或其片段可包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:9，SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:35。

在某些实施方式中，所述重链或其片段还可包含人恒定区，且所述人恒定区可包括人 IgG 恒定区。例如，所述人 IgG 恒定区为人 IgG1 恒定区。

在某些实施方式中，所述重链或其片段可包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:6，SEQID NO:13，SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:36。

在某些实施方式中，所述的双特异性抗体包含特异性结合所述 CD137 蛋白的第二靶向部分，其中所述第二靶向部分可包含结合所述 CD137 蛋白的抗体、其抗原结合片段或变体。在某些实施方式中，所述抗原结合片段选自以下组：Fab，Fab'，F（ab）2 和 Fv 片段。在某些

实施方式中，所述变体选自以下组：在所述抗体或所述其抗原结合片段中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述抗体或所述其抗原结合片段具有 85%以上（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在某些实施方式中，所述结合 CD137 蛋白的抗体可包含轻链或其片段。例如，所述轻链或其片段包含 LCDR1-3，所述 LCDR1-3 的氨基酸序列可依次为 SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81 和 SEQ ID NO:82。在某些实施方式中，所述轻链或其片段可包含轻链可变区，且所述轻链可变区包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:20。

在某些实施方式中，所述结合 CD137 蛋白的抗体可包含重链或其片段。在某些实施方式中，所述抗体的重链或其片段可包含 HCDR1-3，所述 HCDR1-3 的氨基酸序列可依次为 SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78 和 SEQ ID NO:79。在某些实施方式中，所述抗体的重链或其片段可包含重链可变区，且所述重链可变区的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:25。

在某些实施方式中，所述结合 CD137 蛋白的抗体可包含 scFv，且所述 scFv 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:83。

在本申请中，所述的双特异性抗体可包含第一多肽链和第二多肽链，其中所述第一多肽链可包含所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区，所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区，以及所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区；且所述第二多肽链可包含所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的轻链可变区。

例如，在所述第一多肽链中，所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区可位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端，且所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区可位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端。又例如，在所述第一多肽链中，所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区可位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端，且所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区可位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端。

例如，所述第一多肽链中所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区可与所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区构成 scFv。例如，所述 scFv 可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:83。

所述第一多肽链还可包含人 IgG 恒定区。例如，所述人 IgG 恒定区可以为人 IgG1 恒定区。

在某些实施方式中，所述人 IgG 恒定区可位于所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区的 C 端且可位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端；或者，所述人 IgG 恒定

区可位于所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区的 C 端且可位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端。

在某些实施方式中，所述第一多肽链可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:30，SEQ ID NO:43 和 SEQ ID NO:44。

在某些实施方式中，所述第二多肽链还可包含人 Igλ 恒定区。

在本申请中，所述第二多肽链可包括以下氨基酸序列：SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:34。

例如，在本申请所述的双特异抗体的第一靶向部分中，LCDR1 的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57 和 SEQ ID NO:58 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO :61 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:63 和 SEQ ID NO:64 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:46 和 SEQ ID NO:47 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :48 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO :50~52 或其变体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可变区的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41 或其变体；且其重链可变区的氨基酸序列可选自以下组：SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:35 或其变体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:42 且所述重链氨基酸序列可选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:36。

例如，在本申请所述的双特异抗体的第二靶向部分中，LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO:80 或其变体；LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :81 或其变体；LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :82 或其变体；且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :77 或其变体；HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :78 或其变体；HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :79 或其变体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体的轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO :20 或其变体；且其重链可变区的氨基酸序列可选自以下组或其变体：SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :25。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体可包含轻链和重链，所述轻链的氨基酸序列可如 SEQ ID NO:23 所示且所述重链氨基酸序列可如 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:27 所示。

例如，在本申请所述的双特异抗体中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:30 所示的氨基

酸序列，且所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列。该双特异性抗体可包括抗体 YN-007 或与其具有相同的第一多肽及第二多肽。其中，所述第一多肽中，可包含如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列；且，所述第二多肽中，可包含如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列。

又例如，在本申请所述的双特异抗体中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列，以及所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。该双特异性抗体可包括抗体 YN-051 或与其具有相同的第一多肽及第二多肽。其中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列；且，所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。

又例如，在本申请所述的双特异抗体中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列，以及所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。该双特异性抗体可包括抗体 YN-052 或与其具有相同的第一多肽及第二多肽。其中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列；且，所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。

例如，在本申请所述的双特异抗体中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列，且所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列。该双特异性抗体可包括抗体 YN-007 或与其具有相同的第一多肽及第二多肽。其中，所述第一多肽中，可包含如 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列；且，所述第二多肽中，可包含如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列。

又例如，在本申请所述的双特异抗体中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列，以及所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。该双特异性抗体可包括抗体 YN-051 或与其具有相同的第一多肽及第二多肽。其中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列；且，所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。

又例如，在本申请所述的双特异抗体中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列，以及所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。该双特异性抗体可包括抗体 YN-052 或与其具有相同的第一多肽及第二多肽。其中，所述第一多肽可包含如 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列；且，所述第二多肽可包含如 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。

核酸、载体、宿主细胞和制备方法

在另一个方面，本申请还提供了一种分离的一种或多种核酸分子，所述一种或多种核酸分子可编码本申请所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体。例如，所述一种或多种核酸分子中的每一个核酸分子可以编码完整的所述抗体或其抗原结合片段，也可以编码其中一部分（例如，HCDR1-3、LCDR1-3、VL、VH、轻链或重链中的一种或多种）。

本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如，其可以是通过以下方法产生或合成的：（i）在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应（PCR）扩增产生的，（ii）通过克隆重组产生的，（iii）纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者（iv）合成的，例如通过化学合成。在某些实施方式中，所述分离的核酸是通过重组 DNA 技术制备的核酸分子。

在本申请中，可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸，这些方法包括但不限于，采用限制性片段操作或采用合成性寡核苷酸的重叠延伸 PCR，具体操作可参见 Sambrook 等人，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，1989；和 Ausube 等人 Current Protocols in Molecular Biology，Greene Publishing and Wiley-Interscience，New York N.Y.，1993。

另一个方面，本申请提供了一种或多种载体，其中包含本申请所述的一种或多种核酸分子。每种载体中可包含一种或多种所述核酸分子。此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或 mRNA 翻译的其他控制元件等。在某些实施方式中，所述表达控制序列为可调的元件。所述表达控制序列的具体结构可根据物种或细胞类型的功能而变化，但通常包含分别参与转录和翻译起始的 5’非转录序列和 5’及 3’非翻译序列，例如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列等。例如，5’非转录表达控制序列可包含启动子区，启动子区可包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。本申请所述的一种或多种核酸分子可以与所述表达控制元件可操作地连接。

所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如，所述载体为表达载体。

在另一个方面，本申请提供了细胞，所述细胞可包含本申请所述的核酸分子和/或本申请所述的载体。所述细胞可以是宿主细胞。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含多个（例如，2 个或以上）或多种（例如，2 种或以上）本申请所述的核酸分子或载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如真核细胞，如来自植物的细胞、真菌或酵

母细胞等。可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如电穿孔、lipofectine 转染、lipofectamin 转染等。

在另一个方面，本申请提供了所述的一种或多种宿主细胞，其包含所述的核酸分子或所述的载体。

在另一个方面，本申请提供了制备所述抗体或其抗原结合片段或变体，或所述双特异性抗体的方法。所述方法可包括，在使得所述抗体、其抗原结合片段或变体，或所述双特异性抗体表达的条件下，培养所述本申请所述的宿主细胞。且任选地收获所述抗体、其抗原结合片段或变体。例如，可通过使用适当的培养基、适当的温度和培养时间等，这些方法是本领域普通技术人员所了解的。

药物组合物、应用

在另一个方面，本申请提供了一种药物组合物，其可包含所述抗体、其抗原结合片段或变体，或所述双特异性抗体，所述的核酸分子，所述的载体和/或所述的宿主细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

所述药学上可接受的佐剂可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

在本申请中，所述药物组合物可被配制用于口服给药，静脉内给药，肌肉内给药，在肿瘤部位的原位给药，吸入，直肠给药，阴道给药，经皮给药或通过皮下储存库给药。

另一方面，本申请提供了所述抗体、其抗原结合片段或变体，或所述双特异性抗体，所述的核酸分子，所述的载体，所述的宿主细胞和/或所述药物组合物在制备缓解或治疗肿瘤的药物中的应用。其中，所述肿瘤包括结肠癌。

另一方面，本申请提供了增强 T 细胞功能的方法，其包括向有需要的受试者施用所述结合 PD-L1 蛋白的抗体、其抗原结合片段或变体，所述结合 CD137 蛋白的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体，所述的核酸分子、所述的载体、所述的宿主细胞和/或所述的药物组合物。其中所述 T 细胞为肿瘤相关的功能失调 T 细胞。

另一方面，本申请提供了抑制 PD-L1 蛋白和 PD-1 蛋白结合的方法，其包括向有需要的受试者施用所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或所述的双特异性抗体，所述的核酸分子、所述的载体所述的宿主细胞和/或所述的药物组合物。

在本申请中，所述抗体 CDR 的位置可以根据抗体 Kabat 定义法确定。

本申请还包括以下的实施方式：

1. 抗体、其抗原结合片段或变体，其以 3×10^{-9}M 或更低的 K_D 值与 PD-L1 蛋白相结合。

2. 根据实施方案 1 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其以 8×10^{-11}M 或更低的 K_D 与 PD-L1 蛋白相结合。

3. 根据实施方案 1-2 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其抑制 PD-L1 与 PD-1 的结合。

4. 根据实施方案 1-3 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其可缓解或治疗与肿瘤相关的疾病。

5. 根据实施方案 4 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述肿瘤包括结肠癌。6. 根据实施方案 1-5 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体选自以下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

7. 根据实施方案 1-6 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗原结合片段选自以下组：Fab，Fab'，F（ab）$_2$ 和 Fv 片段。

8.根据实施方案 1-7 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述变体选自以下组：

1）在所述抗体或所述其抗原结合片段中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和

2）与所述抗体或所述其抗原结合片段具有 90%以上序列同源性的蛋白质或多肽。

9. 根据实施方案 1-8 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其与参比抗体竞争结合所述 PD-L1 蛋白，其中所述参比抗体包含轻链可变区和重链可变区，所述参比抗体的轻链可变区包含 LCDR1-3，所述参比抗体的轻链可变区包含 LCDR1-3，所述 LCDR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 54-58；所述 LCDR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 60-61；和，所述 LCDR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 63-64；且，所述参比抗体的重链可变区包含 HCDR1-3，所述 HCDR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 46-47；所述 HCDR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 48；和，所述 HCDR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 50-52。

10. 根据实施方案 9 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其中所述参比抗体的轻链可变区包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41，且所述参比抗体的重链可变区包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:35。

11. 根据实施方案 9-10 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其中所述参比抗体的轻链包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:42；且所述参比抗体的重链包含选自下组的氨基酸序列：

SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO:36。

12. 根据实施方案 1-11 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体轻链或其片段，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列 $TGTX_1SX_2VGGYX_3X_4VS$；其中 X_1 是 S、R 或 V；X_2 是 D、E 或 S；X_3 是 N 或 R；X_4 是 Y 或 E，且其中所述 LCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

13. 根据实施方案 12 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 LCDR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 54-58。

14. 根据实施方案 11-13 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列 X_1NSX_2RPS，其中 X_1 是 G 或 E；X_2 是 N 或 I，且其中所述 LCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

15. 根据实施方案 14 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 LCDR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 60-61。

16. 根据实施方案 11-15 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列：$QSYDSSLSGX_1V$，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 LCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

17. 根据实施方案 11-16 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包括框架区 L-FR1，L-FR2，L-FR3，和 L-FR4。

18. 根据实施方案 17 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

19. 根据实施方案 17-18 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 71

20. 根据实施方案 17-19 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 72。

21. 根据实施方案 17-20 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 73-75。

22. 根据实施方案 17-21 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 76。

23. 根据实施方案 12-22 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41。

24. 根据实施方案 12-23 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

25. 根据实施方案 12-24 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:42。

26. 根据实施方案 1-25 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体重链或其片段，所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列：X_1YAIS，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 HCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

27. 根据实施方案 26 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，且其中所述 HCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

28. 根据实施方案 26-27 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列：TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY，其中 X_1 是 D、E 或 G，X_2 是 G 或 E，X_3 是 S 或 G，X_4 是 Y 或 F，X_5 是 F 或 Y, 且其中所述 HCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

29. 根据实施方案 28 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 HCDR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 50-52。

30. 根据实施方案 26-29 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包括框架区 H-FR1，H-FR2，H-FR3，和 H-FR4。

31. 根据实施方案 30 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

32. 根据实施方案 30-31 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 65-67。

33. 根据实施方案 30-32 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 68。

34. 根据实施方案 30-33 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR3 位于所述HCDR2与所述HCDR3之间，所述H-FR3包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 69。

35. 根据实施方案 30-34 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 H-FR4 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 70。

36. 根据实施方案 26-35 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:35。

37. 根据实施方案 26-36 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 IgG1 恒定区。

38. 根据实施方案 26-37 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO:36。

39. 根据实施方案 1-38 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 PD-L1 蛋白选自下组：人 PD-L1 蛋白、猴 PD-L1 蛋白和鼠 PD-L1 蛋白。

40. 抗体、其抗原结合片段或变体，其以 5×10^{-9}M 或更低的 K_D 与 CD137 蛋白相结合。

41. 根据实施方案 40 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其以 3×10^{-9}M 或更低的 K_D 与 CD137 蛋白相结合。

42. 根据实施方案 40-41 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其具有 CD137 激动活性。

43. 根据实施方案 40-42 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其可缓解或治疗肿瘤。

44. 根据实施方案 43 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述肿瘤包括结肠癌。

45. 根据实施方案 40-44 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体选自以下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

46. 根据实施方案 40-45 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗原结合片段选自以下组：Fab，Fab'，F（ab）$_2$ 和 Fv 片段。

47. 根据实施方案 40-46 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述变体选自以下组：

1）在所述抗体或所述其抗原结合片段中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白

质或多肽；和

2）与所述抗体或所述其抗原结合片段具有 90%以上序列同源性的蛋白质或多肽。

48. 根据实施方案 40-47 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其与参比抗体竞争结合所述 CD137 蛋白，其中所述参比抗体包含轻链可变区和重链可变区，所述参比抗体的轻链可变区包含 LCDR1-3，所述 LCDR1-3 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO:80-82 所示，且，所述参比抗体的重链可变区包含 HCDR1-3，所述 HCDR1-3 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO: 77-79 所示。

49. 根据实施方案 48 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其中所述参比抗体的轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可变区包含选自 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列。

50. 根据实施方案 48-49 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其中所述参比抗体的轻链包含选自 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列；且所述参比抗体的重链包含选自 SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列。

51. 根据实施方案 40-50 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体轻链或其片段。

52. 根据实施方案 51 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含选自 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列。

53. 根据实施方案 51-52 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含选自 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列。

54. 根据实施方案 51-53 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列。

55. 根据实施方案 51-54 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包括框架区 L-FR1、L-FR2、L-FR3 和 L-FR4。

56. 根据实施方案 55 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

57. 根据实施方案 55-56 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 包含选自 SEQ ID NO:89 所示的氨基酸序列。

58. 根据实施方案 55-57 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 包含选自 SEQ ID NO:90 所示的氨基酸序列。

59. 根据实施方案 55-58 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 包含选自 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列。

60. 根据实施方案 55-59 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 包含选自 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列。

61. 根据实施方案 51-60 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含选自 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列。

62. 根据实施方案 51-61 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

63. 根据实施方案 51-62 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含选自 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。

64. 根据实施方案 40-63 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体重链或其片段。

65. 根据实施方案 64 述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:77 所示的氨基酸序列。

66. 根据实施方案 64-65 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列。

67. 根据实施方案 64-66 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:79 所示的氨基酸序列。

68. 根据实施方案 64-67 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包括框架区 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4。

69. 根据实施方案 68 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

70. 根据实施方案 68-69 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 包含选自 SEQ ID NO:84-85 所示的氨基酸序列。

71. 根据实施方案 68-70 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 包含选自 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列。

72. 根据实施方案 68-71 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR3 位

于所述HCDR2与所述HCDR3之间，所述H-FR3包含选自SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列。

73. 根据实施方案68-72中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述H-FR4的N末端与所述HCDR3的C末端直接或间接相连，所述H-FR4包含选自SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列。

74. 根据实施方案68-73中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含重链可变区VH，且所述重链可变区VH包含选自SEQ ID NO:18 或SEQ ID NO：25所示的氨基酸序列。

75. 根据实施方案64-74中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人IgG恒定区。

76. 根据实施方案75所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述IgG恒定区包含人IgG1恒定区。

77. 根据实施方案64-76中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含选自SEQ ID NO:21 或SEQ ID NO：27所示的氨基酸序列。

78. 根据实施方案40-77中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述CD137蛋白包括人CD137蛋白。

79. 双特异性抗体，其以2×10^{-9}M或更低的K_D值与PD-L1蛋白相结合，且以8×10^{-9}M或更低的K_D值与CD137蛋白相结合。

80. 根据实施方案30所述的双特异性抗体，其包含特异性结合所述PD-L1蛋白的第一靶向部分，其中所述第一靶向部分包含实施方案1-39中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体。

81. 根据实施方案30-31中任一项所述的双特异性抗体，其包含特异性结合所述CD137蛋白的第二靶向部分，其中所述第二靶向部分包含实施方案40-78中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体。。

82. 根据实施方案79-81中任一项所述的双特异性抗体，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中所述第一多肽链包含所述结合PD-L1蛋白的抗体的重链可变区，所述结合CD137蛋白的抗体的重链可变区，以及所述结合CD137蛋白的抗体的轻链可变区；且所述第二多肽链包含所述结合PD-L1蛋白的抗体的轻链可变区。

83. 根据实施方案82所述的双特异性抗体，其中所述第一多肽链中，所述结合PD-L1蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合CD137蛋白的抗体的重链可变区的N端，且所述结合CD137蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合CD137蛋白的抗体的轻链可变区的N端；或

者，

所述结合PD-L1蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合CD137蛋白的抗体的轻链可变区的N端，且所述结合CD137蛋白的抗体的轻链可变区位于所述结合CD137蛋白的抗体的重链可变区的N端。

84. 根据实施方案 82-83 中任一项所述的双特异性抗体，所述第一多肽链中所述结合CD137蛋白的抗体的轻链可变区与所述结合CD137蛋白的抗体的重链可变区构成scFv。

85. 根据实施方案82-84中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一多肽链中还包含人IgG恒定区，所述人IgG恒定区位于所述结合PD-L1蛋白的抗体的重链可变区的C端且位于所述结合CD137蛋白的抗体的轻链可变区的N端；或者，所述人IgG恒定区位于所述结合PD-L1蛋白的抗体的重链可变区的C端且位于所述结合CD137蛋白的抗体的重链可变区的N端。

86. 根据实施方案82-85中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一多肽链包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44。

87. 根据实施方案82-86中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第二多肽链包括选自下组氨基酸序列：SEQ ID NO:15和SEQ ID NO: 34。

88. 分离的一种或多种核酸分子，其编码实施方案1-39中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，实施方案 40-78 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或实施方案79-87中任一项所述的双特异性抗体。

89. 载体，其包含根据实施方案88所述的核酸分子。

90. 细胞，其包含根据实施方案88所述的核酸分子或根据实施方案89所述的载体.

91. 制备实施方案 1-39 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，实施方案 40-78中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或实施方案 79-87 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括在使得实施方案1-39中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，实施方案 40-78 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或实施方案 79-87 中任一项所述的双特异性抗体表达的条件下，培养根据实施方案90所述的细胞。

92. 药物组合物，其包含实施方案1-39中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，实施方案 40-78 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或实施方案 79-87 中任一项所述的双特异性抗体，实施方案88所述的核酸分子、实施方案89所述的载体和/或实施方案90所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

93. 实施方案1-39中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，实施方案40-78中任

一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或实施方案 79-87 中任一项所述的双特异性抗体，实施方案 88 所述的核酸分子、实施方案 89 所述的载体、实施方案 90 所述的细胞和/或实施方案 92 所述的药物组合物在制备缓解或治疗肿瘤的药物中的应用。

94. 根据实施方案 93 所述的应用，其中所述肿瘤包括结肠癌。

95. 抑制 PD-L1 蛋白和 PD-1 蛋白结合的方法，其包括施用实施方案 1-39 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，实施方案 40-78 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或实施方案 79-87 中任一项所述的双特异性抗体，实施方案 88 所述的核酸分子、实施方案 89 所述的载体、实施方案 90 所述的细胞和/或实施方案 92 所述的药物组合物。

96. 增强 T 细胞功能的方法，其包括施用实施方案 1-39 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，实施方案 40-78 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或实施方案 79-87 中任一项所述的双特异性抗体，实施方案 88 所述的核酸分子、实施方案 89 所述的载体、实施方案 90 所述的细胞和/或实施方案 92 所述的药物组合物。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的装置、方法和系统的工作方式，而不用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 利用噬菌体抗体文库筛选抗 PD-L1 抗体

利用人 PD-L1-Fc 蛋白（上海原能细胞医学技术有限公司）为抗原，进行噬菌体天然人源性抗体文库（上海原能细胞医学技术有限公司）分选。用含有 20 μg/ml（第一、二轮）或 10 μg/ml（第三、四轮）PD-L1 蛋白的 CBS 缓冲液在 4℃包被酶联免疫管过夜。该管随后用 PBS 缓冲液洗涤，向其中加入 10%的脱脂奶粉封闭免疫管，然后加入 1 ml 封闭过的 phage，在室温（20±5℃）孵育 1 小时。用 PBST 充分洗涤后，加入 800μl pH2.2 的 Gly-HCl 缓冲液洗脱，随后立即加 400μl 的 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中和。然后加入到 20ml 处于对数生长期的 *E. coli* SS320 中，*E. coli* 的 OD 值约 0.8，混匀后在 37℃静置 1 小时。取出 500μl 菌液进行噬菌体滴度测定及甘油保菌，剩余菌液用来涂平板，在 37℃过夜培养。次日，将平板上的菌按比例接入到 80ml 2YT-Amp 培养基中，使菌液 OD 值等于 0.2。培养数小时，当 OD 值达到 0.8 时，加入 160μl helper phage 混匀，在 37℃静置 1 小时。然后加入 IPTG、Kan 抗生素，在 250rpm，30℃振荡过夜培养。随后收集上清，用 PEG/NaCl 溶液沉淀噬菌体，重悬于 1.5ml 的 PBS 缓冲液中进行富集筛选。

分别用含有 1μg/ml 的人 PD-L1-Fc 蛋白（上海原能细胞医学技术有限公司）和小鼠

PD-L1-Fc 蛋白（M5251，购自北京百普赛斯生物科技有限公司）在 4℃包被 96 孔 ELISA 板过夜。该板随后用 10%脱脂奶粉封闭非特异性结合位点，充分洗涤后，取单克隆的噬菌体上清加入96孔板，在37℃孵育2小时。充分洗涤后，每孔加入HRP标记的抗M13抗体（27-9421-01，GE healtcare），在 37℃反应 45 分钟。充分洗涤后，每孔加入 TMB 显色，在室温（20±5℃）反应 5-10 分钟后，每孔加入硫酸终止反应，用酶标仪在 450 nm 处测定各孔 OD 值。

通过 ELISA 鉴定获得了一株能既能特异性结合人 PD-L1 又能特异性结合小鼠 PD-L1 的噬菌体抗体克隆 1B10。测序结果显示，编码所述噬菌体抗体 1B10 的重链可变区 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，噬菌体抗体 1B10 的重链可变区 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；编码所述噬菌体抗体 1B10 的轻链可变区 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，噬菌体抗体 1B10 的轻链可变区 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

实施例 2 抗 PD-L1 全人源完整抗体的表达和纯化

设计引物对噬菌体抗体 1B10 的 VH 进行 PCR 扩增，将 PCR 产物通过重组克隆至经 AgeI 和 SalI 双酶切的 pCMV-IgG1NDL 载体；设计引物对噬菌体抗体 1B10 的 VL 进行 PCR 扩增，将 PCR 产物通过重组克隆至经 AgeI 和 BsiWI 双酶切的 pCMV-λ 载体。测序正确后将重、轻链表达载体共转染 293F 细胞进行瞬时表达，并通过 ProteinA 柱纯化，得到噬菌体抗体 1B10 的完整 IgG1,λ 抗体，将此抗 PD-L1 全人源抗体命名为 YN-002。

测序结果显示，编码抗体 YN-002 的 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，抗体 YN-002 的 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。编码抗体 YN-002 的 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，抗体 YN-002 的 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。编码抗体 YN-002 的重链的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示，YN-002 的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。编码抗体 YN-002 的轻链的核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示，抗体 YN-002 的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

实施例 3 抗 PD-L1 全人源抗体 YN-002 的种系形式（germlined version）

对比抗体 YN-002 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列，证实抗体 YN-002 重链利用来自人种系 IGHV1-69*09 的 VH 节段、来自人种系 IGHD5-18*01 的 D 节段及来自人种系 IGHJ4*02 的 JH 节段。

对比抗体 YN-002 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列，证实抗体 YN-002 轻链利用来自人种系 IGLV2-14*01 的 VL 节段，来自人种系 IGLJ2*01 的 JL 节段。

使用 Kabat 系统分析抗体 YN-002 的 CDR 区序列（参见图 1）。

测序结果显示，抗体 YN-002 的 LCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO:63 所示；且其 HCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:50 所示。

为了使抗体 YN-002 的免疫原性最小化，可将一些氨基酸残基突变回种系序列。抗体 YN-003 是抗体 YN-002 的一种种系形式（germlined version），是通过将 YN-002 重链可变区的 FR1 区中的 1 个氨基酸突变回种系序列，以及将 YN-002 轻链可变区中 FR2 区中 1 个氨基酸和 FR3 区中 6 个氨基酸突变回种系序列而制备得到的（参见图 1）。抗 PD-L1 全人源抗体 YN-003 的重链表达载体在上述构建的 YN-002 的重链表达质粒的基础上利用突变试剂盒（天根点突变试剂盒，KM101）定点突变而获得。YN-003 轻链表达载体是在 YN-002 轻链表达质粒的基础上利用突变试剂盒（天根点突变试剂盒，KM101）定点突变而获得。

抗体 YN-003 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，其可通过突变抗体 YN-002 VH 的氨基酸序列中 1 个氨基酸残基而得到，编码 YN-003 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:10 所示。抗体 YN-003 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示，其可通过突变抗体 YN-002 VL 的氨基酸序列中 7 个氨基酸残基而得到，编码 YN-003VL 对应的核苷酸序列如 SEQ ID NO:12 所示。抗体 YN-003 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示；编码 YN-003 重链的核苷酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；抗体 YN-003 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示；编码抗体 YN-003 轻链的核苷酸序列如 SEQ ID NO:16 所示。

YN-003 抗体的表达、纯化参照实施例 2 中 YN-002 抗体的表达、纯化的步骤。

实施例 4 抗 PD-L1 抗体的结合亲和力检测

使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司）测量抗体 YN-002 和抗体 YN-003 针对重组的人、食蟹猴、小鼠、犬 PD-L1 蛋白的结合亲和力。用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin,Pierce,21327）标记以下蛋白：重组的人 PD-L1-Fc、重组的食蟹猴 PD-L1-Fc（90251-C02H，购自北京义翘神州生物技术有限公司）、重组的小鼠 PD-L1-Fc（M5251，购自北京百普赛斯生物科技有限公司）、重组的犬 PD-L1-Fc（70110-D02H，购自北京义翘神州生物技术有限公司）。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司），使用含有 0.1% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液，进行抗原抗体结合动力学分析。使用浓度为 50nM 经过 biotin 偶联的抗原蛋白与 SA 传感器（Pall ForteBio 公司）固定，以 1500rpm 结合 10 分钟；然后再与对倍稀释的抗体溶液以 1500rpm 结合 10 分钟，最后以 1500rpm 解离 10 分钟。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall ForteBio

公司）进行数据分析，得到 K_D 值，K_{on}（1/Ms）值和 K_{off}（1/s）值。

测量得到的抗 PD-L1 抗体 YN-002 和 YN-003 的结合亲和力结果参见表 1-4。

表 1 PD-L1 抗体与人 PD-L1-Fc 的结合亲和力

抗体	人 PD-L1-Fc-Biotin		
	k_{on}（1/Ms）	k_{off}（1/s）	K_D（M）
YN002	6.69×10^{5}	5.94×10^{-4}	8.88×10^{-10}
YN003	1.50×10^{6}	6.11×10^{-4}	4.08×10^{-10}

表 2 PD-L1 抗体与小鼠 PD-L1-Fc 的结合亲和力

抗体	小鼠 PD-L1-Fc-Biotin		
	k_{on}（1/Ms）	k_{off}（1/s）	K_D（M）
YN002	9.77×10^{5}	1.68×10^{-3}	1.72×10^{-9}
YN003	1.03×10^{6}	9.97×10^{-4}	9.96×10^{-10}

表 3 PD-L1 抗体与食蟹猴 PD-L1-Fc 的结合亲和力

抗体	食蟹猴 PD-L1-Fc-Biotin		
	k_{on}（1/Ms）	k_{off}（1/s）	K_D（M）
YN002	1.77×10^{6}	1.90×10^{-3}	1.07×10^{-9}
YN003	2.08×10^{6}	1.36×10^{-3}	6.54×10^{-10}

表 4 PD-L1 抗体与犬 PD-L1-Fc 的结合亲和力

抗体	犬 PD-L1-Fc-Biotin		
	k_{on}（1/Ms）	k_{off}（1/s）	K_D（M）
YN002	1.02×10^{6}	7.59×10^{-4}	7.43×10^{-10}
YN003	8.64×10^{5}	5.14×10^{-4}	5.94×10^{-10}

实施例 5：PD-L1 抗体抑制人 PD-L1 和人 PD-1 之间的结合

用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，Pierce，21327）标记人 PD-1-Fc 蛋白（北京百普赛斯生物科技有限公司，H5257），用亚饱和浓度生物素标记的人 PD-1-Fc 加入 1×10^{6}/ml 的稳定表达人 PD-L1 的 CHO 细胞中，随后立即加入五倍比稀释的各抗体，混匀后孵育（4°C，

1 小时）。洗细胞后加入 Streptavidin R-PE Conjugate（life technology，SA10041），孵育（4°C，30 分钟）。洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。结果如图 2 所示：YN-002 和 YN-003 均能有效抑制人 PD-1 与表达人 PD-L1 的 CHO 细胞的结合。

实施例 6：PD-L1 抗体抑制食蟹猴 PD-L1 和食蟹猴 PD-1 之间的结合

使用 Octet RED384 仪器（（Pall ForteBio 公司）评估抗 PD-L1 抗体 YN-002 和 YN-003 阻断食蟹猴 PD-L1-Fc（北京义翘神州生物技术有限公司，90251-C02H）和食蟹猴 PD-1-Fc（北京义翘神州生物技术有限公司，90311-C02H）结合的能力。首先，用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin,Pierce,21327）标记食蟹猴 PD-1-Fc。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用 fortebio octet RED384 仪器（PALL）分子相互作用分析仪来进行 PD-L1 抗体抑制食蟹猴 PD-L1 和食蟹猴 PD-1 之间的结合动力学分析（抗原、抗体稀释均使用 0.1%BSA 及 0.02%tween20 的 PBS 缓冲液）。使用浓度为 100nM 经过 biotin 偶联的重组的人 PD-1-Fc 与 SA 传感器固定，1500rpm/min，结合 10min；终浓度 75nM 的食蟹猴 PD-L1 与三倍比稀释的抗体溶液混合，孵育 60 分钟后上机结合 10min，1500rpm/min。最后进行解离 10 分钟，1500rpm/min。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall Fortebio 公司）进行数据分析。结果如图 3 所示：YN-002 和 YN-003 均能有效抑制食蟹猴 PD-L1-Fc 与食蟹猴 PD-1-Fc 的结合。

实施例 7：PD-L1 抗体抑制小鼠 PD-L1 和小鼠 PD-1 之间的结合

用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，Pierce，21327）标记小鼠 PD-1-Fc（北京百普赛斯生物科技有限公司，M5259），用亚饱和浓度生物素标记的小鼠 PD-1-Fc 加入 1×10^6/ml 的稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞中，随后立即加入五倍比稀释的各抗体，混匀后孵育（4°C，1 小时）。洗细胞后加入 Streptavidin R-PE Conjugate（life technology，SA10041），孵育（4°C，30 分钟）。洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。结果如图 4 所示：YN-002 和 YN-003 均能有效抑制小鼠 PD-1 与表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞的结合。

实施例 8:抗 PD-L1 单克隆抗体在结肠癌荷瘤小鼠中的抗肿瘤作用研究

在第 0 天时，用 3×10^6 个 MC38 小鼠结直肠癌细胞（上海林渊生物科技有限公司）皮下接种 6-8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠。在第 3 天时将小鼠平均分为 7 组，每组 8-9 只，给每组荷瘤小鼠分别腹腔注射人抗体 IgG-Fc 蛋白（10 mg/kg，每周二次，共两周），YN-003 抗体（10

mg/kg，每周二次，共两周）、Atezolizumab（10 mg/kg，每周二次，共两周）。定期观测各组小鼠体重和肿瘤大小的变化。实验结果表明：与对照 IgG1-Fc 相比，YN-003 和 Atezolizumab 均可有效抑制肿瘤生长，其中 YN-003 的抗肿瘤作用更为显著（图 5）。

实施例 9：利用噬菌体抗体文库筛选抗 CD137 抗体

利用 CD137 蛋白（购自北京义翘神州科技有限公司）为抗原，进行噬菌体天然人源性抗体文库（上海原能细胞医学技术有限公司）分选。用含有 20μg/ml（第一、二轮）或 10μg/ml（第三、四轮）CD137 蛋白的 CBS 缓冲液在 4℃包被酶联免疫管过夜。该管随后用 PBS 缓冲液洗涤，向其中加入 10%的脱脂奶粉封闭免疫管，然后加入 1ml 封闭过的 phage，在室温（20±5℃）孵育 1 小时。用 PBST 充分洗涤后，加入 800 μl pH2.2 的 Gly-HCl 缓冲液洗脱，随后立即加 400 μl 的 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中和。然后加入到 20 ml 处于对数生长期的 *E. coli* SS320 中，*E. coli* 的 OD 值约 0.8，混匀后在 37℃静置 1 小时。取出 500μl 菌液进行噬菌体滴度测定及甘油保菌，剩余菌液用来涂平板，在 37℃过夜培养。次日，将平板上的菌按比例接入到 80ml 2YT-Amp 培养基中，使菌液 OD 值等于 0.2。培养数小时，当 OD 值达到 0.8 时，加入 160 μl helper phage 混匀，在 37℃静置 1 小时。然后加入 IPTG、Kan 抗生素，在 250 rpm，30℃振荡过夜培养。随后收集上清，用 PEG/NaCl 溶液沉淀噬菌体，重悬于 1.5ml 的 PBS 缓冲液中进行富集筛选。

用含有 1 μg/ml 人 CD137 蛋白在 4℃包被 96 孔 ELISA 板过夜。该板随后用 10％脱脂奶粉封闭非特异性结合位点，充分洗涤后，取单克隆的噬菌体上清加入 96 孔板，在 37℃孵育 2 小时。充分洗涤后，每孔加入 HRP 标记的抗 M13 抗体（27-9421-01，购自 GE healtcare），在 37℃反应 45 分钟。充分洗涤后，每孔加入 TMB 显色，在室温（20±5℃）反应 5-10 分钟后，每孔加入硫酸终止反应，用酶标仪在 450 nm 处测定各孔 OD 值。

通过 ELISA 鉴定获得了一株能特异性结合人 CD137 的噬菌体抗体克隆 1A6，测序后获得 VH 和 VL 基因序列。测序结果显示，编码噬菌体抗体 1A6 的 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:17 所示，噬菌体抗体 1A6 的 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；编码噬菌体抗体 1A6 的 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:19 所示，噬菌体抗体 1A6 的 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示。

实施例 10 抗 CD137 全人源完整抗体的表达和纯化

设计引物对噬菌体抗体 1A6 的 VH 进行 PCR 扩增，将 PCR 产物通过重组克隆至经 AgeI 和 SalI 双酶切的 pCMV-IgG2 载体；设计引物对噬菌体抗体 1A6 的 VL 进行 PCR 扩增，将 PCR

产物通过重组克隆至经 AgeI 和 BsiWI 双酶切的 pCMV-λ 载体。测序正确后将重、轻链表达载体共转染 293F 细胞进行瞬时表达，并通过 ProteinA 柱纯化，将 1A6 的完整 IgG2,λ 抗体，将此抗 CD137 全人源完整抗体命名为 YN-005。

测序结果显示，抗体 YN-005 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示，编码抗体 YN-005 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:17 所示；且抗体 YN-005 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示，编码抗体 YN-005 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:19 所示。抗体 YN-005 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示，编码抗体 YN-005 重链的核苷酸序列如 SEQ ID NO:22 所示；抗体 YN-005 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示，编码抗体 YN-005 轻链的核苷酸序列如 SEQ ID NO:24 所示。

实施例 11：抗 CD137 全人源抗体 YN-005 的种系形式（germlined version）

对比抗体 YN-005 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列，证实抗体 YN-005 重链利用来自人种系 IGHV3-23*04 的 VH 节段、来自人种系 IGHD7-27*01 的 D 节段及来自人种系 IGHJ3*02 的 JH 节段。

对比 YN-005 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列，证实抗体 YN-005 轻链利用来自人种系 IGLV1-44*01 的 VL 节段，来自人种系 IGLJ1*01 的 JL 节段。

使用 Kabat 系统分析抗体 YN-005 的 CDR 区序列(参见图 6)，测序结果显示抗体 YN-005 的 HCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78 和 SEQ ID NO:79。抗体 YN-005 的 LCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81 和 SEQ ID NO:82 所示。

为了使抗体 YN-005 的免疫原性最小化，可将一些氨基酸残基突变回种系序列。抗体 YN-006 是抗体 YN-005 的一种种系形式（germlined version），是通过将 YN-005 重链可变区的 FR1 区中的 1 个氨基酸突变回种系序列（参见图 6）。抗 CD137 全人源抗体 YN-006 的重链表达载体在上述构建的 YN-005 的重链表达质粒的基础上利用突变试剂盒（天根点突变试剂盒，KM101）定点突变获得。

测序显示，抗体 YN-006 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示，编码 YN-006 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:26 所示。抗体 YN-006 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示，编码抗体 YN-006 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:19 所示。抗体 YN-006 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:27 所示；编码抗体 YN-006 重链的核苷酸序列如 SEQ ID NO:28 所示；且抗体 YN-006 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示，编码 YN-006 轻链的核苷酸序列如 SEQ ID

NO:24 所示。

YN-006 抗体的表达、纯化参照实施例 9 中 YN-005 抗体的表达、纯化的具体步骤。

实施例 12：测定抗 CD137 抗体的结合亲和力

使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司）测量抗体 YN-005 和 YN-006 针对重组的人 CD137-His 蛋白（上海原能细胞医学技术有限公司）的结合亲和力。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司），使用含有 0.1% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液，进行抗原抗体结合动力学分析。使用浓度为 50nM 的抗体与 AHC 传感器固定，以 1500rpm 结合 5 分钟；然后再与对倍稀释的重组人 CD137-His 蛋白抗原溶液（100,50,25,12.5,6.25, 3.125,1.56nM）以 1500 rpm 结合 5 分钟，最后以 1500 rpm 解离 10 分钟。AHC 传感器通过甘氨酸脉冲再生后重复使用。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall ForteBio 公司）进行数据分析，得到 K_D 值，K_{on}（1/Ms）值和 K_{off}（1/s）值。测量得到的 CD137 抗体 YN-005 和 YN-006 的结合亲和力结果参见表 5。

表 5 CD137 抗体与人 CD137-His 的亲和力

抗体	CD137-His		
	K_{on}（1/Ms）	K_{off}（1/s）	K_D（M）
YN005	9.38×10^{4}	4.55×10^{-5}	4.85×10^{-10}
YN006	9.68×10^{4}	1.33×10^{-5}	1.37×10^{-10}

实施例 13: CD137 单克隆抗体在结肠癌荷瘤小鼠中的抗肿瘤作用研究

在第 0 天时，用 1.5×10^{6} 个 MC38 小鼠结直肠癌细胞（上海林渊生物科技有限公司）皮下接种 6-8 周龄的转入人 CD137 基因的 C57BL/6 雌性小鼠（B-hTNFRSF9（4-1BB） mice，购自北京百奥赛图基因生物技术有限公司）。在第 3 天时将小鼠平均分为 3 组，每组 7 只，给每组荷瘤小鼠分别腹腔注射人抗体 IgG-Fc 蛋白（3 mg/kg，每周二次，共两周），CD137 抗体 YN-006 抗体（3 mg/kg，每周二次，共两周）、CD137 抗体 Utomilumab（3 mg/kg，每周二次，共两周）。定期观测各组小鼠体重和肿瘤大小的变化。实验结果表明：与对照 IgG1-Fc 相比，YN-006 和 Utomilumab 均可有效抑制肿瘤生长，值得注意的是，YN-006 的抗肿瘤作用显著强于 Utomilumab（如图 7 所示）。

实施例 14：构建抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007

利用抗 PD-L1 抗体 YN-003 的重链基因和抗人 CD137 抗体 YN-006 的重、轻链基因通过 Overlap PCR、定点突变等分子克隆方法构建抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 的第一多肽基因，并将其通过重组克隆至经 AgeI 和 BamHI 双酶切的 pCMV-IgG1AEM 载体，构建成 YN-007 的第一多肽表达载体。

YN-007 的第二多肽基因与 YN-003 的轻链基因相同。YN-007 的第二多肽表达载体为上述构建的 YN-003 的轻链表达载体。

测序结果正确后将第一多肽、第二多肽表达载体共转染至 293F 细胞进行瞬时表达，并通过 ProteinA 柱纯化获得抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007。

编码抗体 YN-007 的第一多肽的核苷酸序列如 SEQ ID NO:29 所示，抗体 YN-007 的第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示；且编码抗体 YN-007 第二多肽的核苷酸序列如 SEQ ID NO:16 所示，抗体 YN-007 第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示。

实施例 15：测定抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 的结合亲和力

使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司）测量抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 分别针对重组的人 PD-L1-Fc 蛋白和重组的小鼠 PD-L1-Fc 的结合亲和力。用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin,Pierce,21327）标记重组的人 PD-L1-Fc 和重组的小鼠 PD-L1-Fc。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司），使用含有 0.1% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液，进行抗原抗体结合动力学分析。使用浓度为 50nM 经过 biotin 偶联的抗原蛋白与 SA 传感器（Pall ForteBio 公司）固定，以 1500rpm 结合 10 分钟；然后再与对倍稀释的 YN-007 抗体溶液以 1500rpm 结合 10 分钟，最后以 1500rpm 解离 10 分钟。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall ForteBio 公司）进行数据分析，得到 K_D 值，K_{on}（1/Ms）值和 K_{off}（1/s）值。

测量得到的 YN-007 与人 PD-L1-Fc 的结合亲和力结果参见表 6。

测量得到的 YN-007 与小鼠 PD-L1-Fc 的结合亲和力结果参见表 7。

表 6. 抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 与人 PD-L1-Fc 的结合亲和力

抗体	人 PD-L1-Fc-Biotin		
	k_{on}（1/Ms）	k_{off}（1/s）	K_D（M）
YN007	1.13×10^{6}	5.92×10^{-4}	5.25×10^{-10}

表 7. 抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 与小鼠 PD-L1-Fc 的结合亲和力

	小鼠 PD-L1-Fc-Biotin

抗体	k_{on}（1/Ms）	k_{off}（1/s）	K_D（M）
YN007	8.1×10^{5}	1.09×10^{-3}	1.34×10^{-9}

使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司）测量抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 针对重组的人 CD137-His 蛋白的结合亲和力。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司），使用含有 0.1% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液，进行抗原抗体结合动力学分析。使用浓度为 50nM 的抗体与 AHC 传感器固定，以 1500rpm 结合 5 分钟；然后再与对倍稀释的重组人 CD137-His 蛋白抗原溶液（100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56nM）以 1500rpm 结合 5 分钟，最后以 1500rpm 解离 10 分钟。AHC 传感器通过甘氨酸脉冲再生后重复使用。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall ForteBio 公司）进行数据分析，计算出抗原与抗体的结合强度，得到 K_D 值，K_{on}（1/Ms）值和 K_{off}（1/s）值。

测量得到的抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 对人 CD137 的结合亲和力结果参见表 8。

表 8 抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007 与人 CD137-His 的结合亲和力

抗体	人 CD137-His		
	K_{on}（1/Ms）	K_{off}（1/s）	K_D（M）
YN007	8.96×10^{4}	9.83×10^{-5}	1.1×10^{-9}

实施例 16：PD-L1 抗体 YN-003 的亲和力成熟

设计引物利用重叠 PCR 构建 PD-L1 抗体 YN-003 的单链抗体（ScFv）基因，并将其克隆到 pDF 噬菌粒载体，记作 pDF-YN-003 ScFv。以 pDF-YN-003 ScFv 为模板设计简并引物利用重叠 PCR 对抗体 YN-003 的六个 CDR 区（包括 CDR 区中部分氨基酸残基及与 CDR 区临近的 FR 区中个别氨基酸残基）分别进行随机化（如图 8 所示）。

将重叠 PCR 获得的 CDR 区随机化后的 scFv 基因片段用 BssHII 和 NheI 双酶切后，与经 BssHII 和 NheI 双酶切的 pDF 噬菌粒载体连接，将 1μg 连接产物电穿孔转入 TG1 电转感受态细胞中，倍比稀释后涂 2YT+AG 平板，次日将菌苔从平板上刮下，扩大至 300ml 2YT+Amp 培养基，37℃培养至 OD 0.8 左右，加入 helper phage 混匀后静置 1 小时，加入终浓度为 1mM IPTG，50μg/ml 的卡纳，30℃振摇过夜。次日离心收上清，0.45 滤膜过滤除菌，加入 1/5 体积的 PEG-NaCl 沉淀 phage，离心取沉淀，1/10 体积的 PBS 重悬沉淀，测 OD260 计算噬菌体 pfu，4℃保存，该噬菌体抗体库可直接用于后期淘选。

利用人 PD-L1-His 蛋白（上海原能细胞医学技术有限公司）为抗原用于以上噬菌体抗体库分选。酶联免疫管中使用 CBS 缓冲液包被抗原 PD-L1 1ml，PD-L1 浓度为 100 nM（第一、二轮）或 5 nM（第三轮），4℃过夜；次日用含 10%的脱脂奶粉的 PBS 缓冲液 2ml 封闭免疫管；将 1ml 的封闭过的 phage 加入到免疫管中，室温孵育 1h；PBST 洗涤 20 次（第一轮）、50 次（第二轮）或 100 次（第三轮）；加入 pH2.2 的 Gly-HCl 缓冲液 800μl 洗脱，立即加 400μl 的 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中和；加入到 20ml 对数生长期 OD 约 0.8 的 E. coli TG1 中，混匀 37℃静置 1h；取出 500μl 用来测定噬菌体滴度及甘油保菌；剩余菌液涂平板，培养箱中 37℃过夜培养；第二天刮下平板的菌，按一定比例接入 80ml 的 2YT-Amp 培养基中，使 OD 等于 0.2，培养数小时以 OD 达到 0.8 时，加入 160μl 的 helper phage，然后混匀 37℃静置 1h ；加入 IPTG、Kan 抗生素，250rpm，30℃，振荡培养过夜；收集上清，用 PEG/NaCl 溶液沉淀噬菌体，重悬于 1.5ml 的 PBS 缓冲液中；重悬的噬菌体用于下一轮的富集筛选，3 轮淘选之后，观察到显著的富集。利用 ELISA 对淘选得到的噬菌体抗体克隆进行鉴定：在 96 孔 ELISA 板上包被人 PD-L1-His 蛋白，浓度 1μg/ml，4℃过夜。然后用 10%脱脂奶粉封闭非特异性结合位点，充分洗涤后，取单克隆的噬菌体上清加入 96 孔板，37℃孵育 2 小时。充分洗涤后，加入 HRP 标记的抗 M13 抗体（GE healtcare，27-9421-01），37℃作用 45min，充分洗涤后加入 TMB 显色，室温下作用 5-10 min 后，最后用硫酸终止反应，于 450 nm 处测定各孔 OD 值，选择 OD450 值高的噬菌体抗体克隆进行测序。获得各噬菌体抗体克隆的重、轻链可变区基因序列后，将各噬菌体抗体重新设计成全长 IgG1，λ 抗体：设计引物对各噬菌体抗体克隆的 VH 进行 PCR 扩增，将 PCR 产物通过重组克隆至经 AgeI 和 SalI 双酶切的 pCMV-IgG1NDL 抗体重链表达载体；设计引物对各噬菌体抗体克隆的的 VL 进行 PCR 扩增，将 PCR 产物通过重组克隆至经 AgeI 和 BsiWI 双酶切的 pCMV-λ 抗体轻链表达载体。测序正确后分别将各抗体的重、轻链表达载体共转染 293F 细胞进行瞬时表达，用无血清培养基培养 7 天后收集细胞培养上清通过 ProteinA 柱纯化获得抗体蛋白，将纯化抗体用 PBS 进行透析，最后用 BCA Protein Assay Kit 定量（Pierce，23225）。使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司）测量以上全长抗体针对重组的人 PD-L1-His 蛋白（上海原能医学技术有限公司）的结合亲和力。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司），使用含有 0.1% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液，进行抗原抗体结合动力学分析。使用浓度为 50nM 的抗体与 AHC 传感器固定，以 1500rpm 结合 5 分钟；然后再与对倍稀释的抗原溶液（50，25，12.5，6.25，3.125，1.56nM），7 个浓度梯度，以 1500rpm 结合 5 分钟。最后在以 1500rpm 解离 10 分钟。AHC 传感器通过甘氨酸脉冲再生后重复使

用。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall ForteBio 公司）进行数据分析，得到 K_D 值，K_{on}（1/Ms）值和 K_{off}（1/s）值。筛选获得的亲和力提高的各突变体克隆后，将不同 CDR 区中亲和力提高的氨基酸突变点利用 Overlapping PCR 等方法进行组合，然后再按照以上方法表达、纯化抗体蛋白并测定亲和力。经过多轮筛选和组合，将亲和力最高的 5 个 YN-003 抗体突变体克隆分别命名为 YN-035 抗体、YN-036 抗体、YN-037 抗体、YN-038 抗体、YN-039 抗体。这 5 个抗体通过以上方法测定获得的亲和力数值参见表 9。结果显示 YN-035 抗体、YN-036 抗体、YN-037 抗体、YN-038 抗体、YN-039 抗体的亲和力均高于抗 PD-L1 抗体 Atezolizumab 和 Avelumab。

表 9 PD-L1 抗体与人 PD-L1-His 的结合亲和力

抗体	人 PD-L1-His						
	K_D (M)	K_D Error	K_{on} (1/Ms)	K_{on} Error	K_{off} (1/s)	K_{off} Error	Full R^2
Atezolizumab	9.16×10^{-10}	8.79×10^{-12}	3.78×10^{5}	1.95×10^{3}	3.46×10^{-4}	2.80×10^{-6}	0.9984
Avelumab	1.03×10^{-9}	9.20×10^{-12}	2.96×10^{5}	1.31×10^{3}	3.05×10^{-4}	2.37×10^{-6}	0.9991
YN-035	4.52×10^{-10}	3.54×10^{-12}	4.27×10^{5}	1.16×10^{3}	1.93×10^{-4}	1.42×10^{-6}	0.9995
YN-036	4.74×10^{-10}	4.95×10^{-12}	3.69×10^{5}	1.22×10^{3}	1.75×10^{-4}	1.73×10^{-6}	0.9994
YN-037	3.82×10^{-10}	5.66×10^{-12}	3.55×10^{5}	1.36×10^{3}	1.36×10^{-4}	1.94×10^{-6}	0.9991
YN-038	4.47×10^{-10}	4.61×10^{-12}	3.50×10^{5}	1.05×10^{3}	1.56×10^{-4}	1.54×10^{-6}	0.9995
YN-039	4.85×10^{-10}	4.41×10^{-12}	3.56×10^{5}	1.02×10^{3}	1.73×10^{-4}	1.49×10^{-6}	0.9995

YN-035 抗体重链可变区（YN-035 VH）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示，YN-035 抗体重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示，YN-035 抗体轻链可变区（YN-035 VL）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示，YN-035 抗体轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

YN-036 抗体重链可变区（YN-036 VH）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示，YN-036 抗体重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示，YN-036 抗体轻链可变区（YN-036VL）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示， YN-036 抗体轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

YN-037 抗体重链可变区（YN-037 VH）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示，YN-037 抗体重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示，YN-037 抗体轻链可变区（YN-037VL）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:37 所示， YN-037 抗体轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

YN-038 抗体重链可变区（YN-038 VH）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示，YN-038 抗体重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示，YN-038 抗体轻链可变区（YN-038VL）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示， YN-038 抗体轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:40 所示。

YN-039 抗体重链可变区（YN-039VH）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示，YN-039 抗体重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示，YN-039 抗体轻链可变区（YN-039 VL）的氨基酸序列如 SEQ ID NO:41 所示， YN-039 抗体轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:42 所示。

图 9 显示了抗体 YN003、YN035~YN039 的重链可变区与相关种系序列的氨基酸序列对比，其中下划线处为根据 Kabat 定义法确定的 CDR。图 10 显示了抗体 YN003、YN035~YN039 的轻链可变区与相关种系序列的氨基酸序列对比，其中下划线处为根据 Kabat 定义法确定的 CDR。其中，抗体 YN003 的 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示，YN035~YN039 的 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:47 所示；抗体 YN003 的 HCDR2 的氨基酸序列和抗体 YN035~YN039 的 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:48 所示；YN-003 的 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:50 所示；YN-035 的 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:51 所示；抗体 YN036~YN039 的 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:52 所示。

抗体 YN003 的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:54 所示，抗体 YN035 和抗体 YN036 的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:55 所示，抗体 YN037 的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:56 所示，抗体 YN038 的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:57 所示，抗体 YN039 的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:58 所示；抗体 YN003、抗体 YN035~YN036 的 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示；抗体 YN037~YN039 的 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:61 所示；抗体 YN003 的 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:63 所示；抗体 YN035~YN039 的 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:64 所示。

用流式细胞术检测 PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 与人 PD-L1 的结合活性：1×10^6/ml 稳定表达人 PD-L1 的 CHO 细胞中分别加入两倍比稀释的各 PD-L1 抗体，混匀后于 4℃孵育 1 小时，洗细胞后加入 Goat F（ab'）2 Anti-Human IgG - Fc （DyLight 650）（ab98593，Abcam），于 4℃孵育 30 分钟，洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。试验结果如图 11 所示：YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 均能有效结合表达人 PD-L1 的 CHO 细胞。

用流式细胞术检测 PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 对人 PD-L1/人 PD-1 结合的抑制能力：用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，Pierce，21327）标记人 PD-1-Fc 蛋白（上海原能医学技术有限公司），用亚饱和浓度生物素标记的人 PD-1-Fc 加入 1×10^6/ml 的稳定表达人 PD-L1 的 CHO 细胞中，随后立即加入两倍比稀释的各抗体，混匀后孵育（4°C，1 小时）。洗细胞后加入 Streptavidin R-PE Conjugate（life technology，SA10041），孵育（4°C，30 分钟）。洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。实验结果如图 12 所示： PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 均能有效抑制人 PD-1 与表达人 PD-L1 的 CHO 细胞的结合。

用流式细胞术检测 PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 与小鼠 PD-L1

的结合活性：1×10^6/ml 稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞中分别加入两倍比稀释的各 PD-L1 抗体，混匀后于 4℃孵育 1 小时，洗细胞后加入 Goat F（ab'）2 Anti-Human IgG - Fc （DyLight 650）（ab98593），于 4℃孵育 30 分钟，洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。试验结果如图 13 所示：YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 均能有效结合表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞。

用流式细胞术检测 PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 对小鼠 PD-L1/小鼠 PD-1 结合的抑制能力：用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，Pierce，21327）标记小鼠 PD-1-Fc（上海原能医学技术有限公司），用亚饱和浓度生物素标记的小鼠 PD-1-Fc 加入 1×10^6/ml 的稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞中，随后立即加入两倍比稀释的各抗体，混匀后孵育（4℃，1 小时）。洗细胞后加入 Streptavidin R-PE Conjugate（life technology，SA10041），孵育（4°C，30 分钟）。洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。结果如图 14 所示：PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-037、YN-038、YN-039 均能有效抑制小鼠 PD-1 与稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞的结合。

实施例 17：构建和鉴定抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 和 YN-052

利用抗 PD-L1 抗体 YN-035 的重链基因和抗人 CD137 抗体 YN-006 的重、轻链基因通过 Overlap PCR、定点突变等分子克隆方法构建抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 的第一多肽基因，并将其通过重组克隆至经 AgeI 和 BamHI 双酶切的 pCMV-IgG1AEM 载体，构建成 YN-051 的第一多肽表达载体。YN-051 的第二多肽基因与 YN-035 的轻链基因相同。YN-035 的第二多肽表达载体为 YN-035 的轻链表达载体。

测序结果正确后将抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 的第一多肽、第二多肽表达载体共转染至 293F 细胞进行瞬时表达，用无血清培养基培养 7 天后收集细胞培养上清通过 ProteinA 柱纯化获得抗体蛋白，将纯化抗体用 PBS 进行透析，最后用 BCA Protein Assay Kit 定量（Pierce，23225）。

YN-051 的第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示，YN-051 第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

利用抗 PD-L1 抗体 YN-036 的重链基因和抗人 CD137 抗体 YN-006 的重、轻链基因通过 Overlap PCR、定点突变等分子克隆方法构建抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-052 的第一多肽基因，并将其通过重组克隆至经 AgeI 和 BamHI 双酶切的 pCMV-IgG1AEM 载体，构建成 YN-052 的第一多肽表达载体。YN-052 的第二多肽基因与 YN-036 的轻链基因相同。YN-052 的第二多肽表达载体为 YN-036 的轻链表达载体。

测序结果正确后将抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-052 的第一多肽、第二多肽表达载体共转染至 293F 细胞进行瞬时表达，用无血清培养基培养 7 天后收集细胞培养上清通过 ProteinA 柱纯化获得抗体蛋白，将纯化抗体用 PBS 进行透析，最后用 BCA Protein Assay Kit 定量（Pierce，23225）。

YN-052 的第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示，YN-052 第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司）测量抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 和 YN-051 针对重组的人 PD-L1-His 蛋白（上海原能医学技术有限公司）的结合亲和力。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司），使用含有 0.1% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液，进行抗原抗体结合动力学分析。使用浓度为 50nM 的抗体与 AHC 传感器固定，以 1500rpm 结合 5 分钟；然后再与对倍稀释的抗原溶液（50，25，12.5，6.25，3.125，1.56nM），7 个浓度梯度，以 1500rpm 结合 5 分钟。最后在以 1500rpm 解离 10 分钟。AHC 传感器通过甘氨酸脉冲再生后重复使用。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall ForteBio 公司）进行数据分析，得到 K_D 值，K_{on}（1/Ms）值和 K_{off}（1/s）值。测量得到的 YN-007 与人 PD-L1-Fc 的结合亲和力结果参见表 10。

表 10. 抗 PD-L1/CD137 双特异抗体与人 PD-L1-His 的结合亲和力

抗体	人 PD-L1-His						
	K_D（M）	K_D Error	K_{on}（1/Ms）	K_{on} Error	K_{off}（1/s）	K_{off} Error	Full R^2
YN-051	5.17×10^{-10}	4.97×10^{-12}	5.32×10^{5}	2.54×10^{3}	2.75×10^{-4}	2.29×10^{-6}	0.9981
YN-052	5.72×10^{-10}	5.69×10^{-12}	4.48×10^{5}	2.06×10^{3}	2.57×10^{-4}	2.26×10^{-6}	0.9984

使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司）测量抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 和 YN-052 针对重组的人 CD137-His 蛋白（上海原能医学技术有限公司）的结合亲和力。通过生物膜干涉（BLI）技术，使用分子相互作用分析仪（Octet RED384，购自 Pall ForteBio 公司），使用含有 0.1% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS 缓冲液，进行抗原抗体结合动力学分析。使用浓度为 50nM 的抗体与 AHC 传感器固定，以 1500rpm 结合 5 分钟；然后再与对倍稀释的重组人 CD137-His 蛋白抗原溶液（100、50、25、12.5、6.25、 3.125、1.56nM）以 1500rpm 结合 5 分钟，最后以 1500rpm 解离 10 分钟。AHC 传感器通过甘氨酸脉冲再生后重复使用。得到的结果将通过 Octet Data Analysis 9.0 软件（Pall ForteBio 公司）进行数据分析，得到 K_D 值，K_{on}（1/Ms）值和 K_{off}（1/s）值。

测量得到的抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 和 YN-052 对人 CD137 的结合亲和力结果参见表 11。

表 11 抗 PD-L1/CD137 双特异抗体与人 CD137-His 的结合亲和力

抗体	人 4-1BB-His						
	KD （M）	KD Error	kon（1/Ms）	kon Error	kdis（1/s）	kdis Error	Full R^2
YN-051	1.64×10^{-9}	3.93×10^{-11}	8.99×10^{4}	7.25×10^{2}	1.47×10^{-4}	3.33×10^{-6}	0.9981
YN-052	2.08×10^{-9}	4.36×10^{-11}	8.37×10^{4}	6.93×10^{2}	1.74×10^{-4}	3.35×10^{-6}	0.9982

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231（上海中科院细胞库）高表达人 PD-L1 分子。用流式细胞术检测 PD-1 抗体 YN-035、YN-036 及抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 和 YN-052 与 MDA-MB-231 细胞的结合：1×10^{6}/ml 的 MDA-MB-231 细胞中分别加入两倍比稀释的各抗体，混匀后于 4℃孵育 1 小时，洗细胞后加入 Goat F（ab'）2 Anti-Human IgG - Fc （DyLight 650）（ab98593，abcam），于 4℃孵育 30 分钟，洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。试验结果如图 15 所示：YN-035、YN-036、YN-051 和 YN-052 均能有效结合 MDA-MB-231 细胞。

用流式细胞术检测 PD-1 抗体 YN-035、YN-036 及抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051 和 YN-052 与人 PD-L1 的结合活性：1×10^{6}/ml 稳定表达人 PD-L1 的 CHO 细胞中分别加入两倍比稀释的各抗体，混匀后于 4℃孵育 1 小时，洗细胞后加入 Goat F（ab'）2 Anti-Human IgG - Fc （DyLight 650）（ab98593，abcam），于 4℃孵育 30 分钟，洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。试验结果如图 16 所示：YN-035、YN-036、YN-051、YN-052、YN007 均能有效结合表达人 PD-L1 的 CHO 细胞。

用流式细胞术检测 PD-1 抗体 YN-035、YN-036 及抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051、YN-052、YN007 对人 PD-L1/人 PD-1 结合的抑制能力：用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，Pierce，21327）标记人 PD-1-Fc 蛋白，用亚饱和浓度生物素标记的人 PD-1-Fc 加入 1×10^{6}/ml 的稳定表达人 PD-L1 的 CHO 细胞中，随后立即加入两倍比稀释的各抗体，混匀后孵育（4°C，1 小时）。洗细胞后加入 Streptavidin R-PE Conjugate（life technology，SA10041），孵育（4°C，30 分钟）。洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。实验结果如图 17 所示：PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-051、YN-052、YN007 均能有效抑制人 PD-1 与表达人 PD-L1 的 CHO 细胞的结合。

用流式细胞术检测 PD-1 抗体 YN-035、YN-036 及抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007、YN-051 和 YN-052 与小鼠 PD-L1 的结合活性： 1×10^{6}/ml 稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞

中分别加入两倍比稀释的各抗体，混匀后于 4℃孵育 1 小时，洗细胞后加入 Goat F（ab'）2 Anti-Human IgG - Fc （DyLight 650）（ab98593，abcam），于 4℃孵育 30 分钟，洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。试验结果如图 18 所示：YN-035、YN-036、YN-051、YN-052、YN007 均能有效结合表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞。

用流式细胞术检测 PD-1 抗体 YN-035、YN-036 及抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007、YN-051 和 YN-052 对小鼠 PD-L1/小鼠 PD-1 结合的抑制能力：用生物素（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，Pierce，21327）标记小鼠 PD-1-Fc，用亚饱和浓度生物素标记的小鼠 PD-1-Fc 加入 1×10^6/ml 的稳定表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞中，随后立即加入两倍比稀释的各抗体，混匀后孵育（4°C，1 小时）。洗细胞后加入 Streptavidin R-PE Conjugate（life technology，SA10041），孵育（4°C，30 分钟）。洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。结果如图 19 所示：PD-L1 抗体 YN-035、YN-036、YN-051、YN-052、YN007 均能有效抑制小鼠 PD-1 与表达小鼠 PD-L1 的 CHO 细胞的结合。

用流式细胞术检测 CD137 抗体 YN-006 及抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-007、YN-051 和 YN-052 与人 CD137 的结合活性：1×10^6/ml 的稳定表达人 CD137 的 293T 细胞中分别加入两倍比稀释的各抗体，混匀后于 4℃孵育 1 小时，洗细胞后加入 Goat F（ab'）2 Anti-Human IgG - Fc （DyLight 650）（ab98593，abcam），于 4℃孵育 30 分钟，洗细胞后用流式细胞仪（Intellicyt iQue Screener）检测荧光强度。试验结果如图 20 所示：YN-006、YN-007、YN-051 和 YN-052 均能有效结合表达人 CD137 的 293T 细胞。

实施例 18：SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析

上述纯化后的抗体 YN-003、YN-006、YN-007、YN-035、YN-036、YN-051、YN-052 分别在还原和非还原条件下用 SDS-PAGE 检测其分子量大小，结果如图 21 所示：在非还原条件下（如图 21a 所示），单克隆抗体 YN-003、YN006、YN-035、YN-036 均呈现为分子量大小约 150kDa 的一条条带，而双特异抗体 YN-007、YN-051、YN-052 均呈现为分子量大小约为 200kDa 的一条条带；在还原条件下（如图 21b 所示），单克隆抗体 YN-003、YN006、YN-035、YN-036 均呈现为分子量大小约 55kDa 和 25kDa 的两条条带，而双特异抗体 YN-007、YN-051、YN-052 均呈现为分子量大小约为 75kDa 和 25kDa 的两条条带。

实施例 19：抗 PD-L1/CD137 双特异抗体的激动剂活性（萤光素酶活性测定）

制备表达人 CD137 以及稳定整合的 NFκB 萤光素酶报道基因的 293T 细胞。收获细胞，洗涤及重悬浮于无酚红完全培养基（含有 10% 胎牛血清，HEPES 缓冲液，非必需氨基酸及

L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基），密度为 6×10^5 个细胞/mL。96 孔平板（购自 PerkinElmer）铺板，每孔加入 50μl 细胞悬液。以 2.5:1 的比率加入交联抗体（山羊抗人 IgG Fc），随后分别加入 YN-006（10 μg/ml）、YN-035（10 μg/ml）、YN-035+YN-006（10 μg/ml+10μg/ml）、YN-051（10 μg/ml）、YN-003+YN006（10 μg/ml+10μg/ml）、YN-007（10 μg/ml）、及对照抗体 IgG Fc（10 μg/ml），在 37℃孵育 5 小时。然后加入 75μL 的 Bright-Glo Luciferase 试剂（购自 Promega），使用酶标仪（购自 Tecan）测量萤光素酶活性。比较各抗体处理细胞组与未经抗体处理组的细胞荧光值之比（参见图 22）。结果表明，与对照 IgG Fc 相比，YN-006、YN035+YN006、YN003+YN006、YN-007、YN-051 均具有明显的激动活性，而抗 PD-L1 抗体 YN-035 则无激动活性（参见图 22）。

实施例 20:抗 PD-L1/CD137 双特异抗体在结肠癌荷瘤小鼠中的抗肿瘤作用研究

在第 0 天时，用 3×10^6 个小鼠结直肠癌细胞 MC38（上海林渊生物科技有限公司）皮下接种 6-8 周龄的转入人 4-1BB 基因的 C57BL/6 雌性小鼠（B-hTNFRSF9（4-1BB） mice，购自北京百奥赛图基因生物技术有限公司）。在第 6 天时将小鼠平均分为 8 组，每组荷瘤小鼠分别腹腔注射 PBS（每周二次，共两周）、对照抗体人 IgG-Fc 蛋白（7.5 mg/kg，每周二次，共两周）、CD137 抗体 YN-006 抗体（3 mg/kg，每周二次，共两周）、PD-L1 抗体 YN-035（7.5 mg/kg，每周二次，共两周）、CD137 抗体 YN-006 抗体（3 mg/kg，每周二次，共两周）+PD-L1 抗体 YN-035（7.5 mg/kg，每周二次，共两周）、抗 PD-L1/CD137 双特异抗体 YN-051（7.5 mg/kg，每周二次，共两周）、抗 PD-L1 抗体 Atezolizumab（7.5 mg/kg，每周二次，共两周）、抗 PD-L1 抗体 Avelumab（7.5 mg/kg，每周二次，共两周）。除了 PBS 组 5 只小鼠，其余 7 组每组 6 只。定期观测各组小鼠体重和肿瘤大小的变化。实验结果如图 23 和表 12 所示。图 23 显示与 PBS 组或对照抗体人 IgG-Fc 组相比，YN006、YN035、YN006+YN035、YN051、Atezolizumab、Avelumab 均具有显著抑瘤活性。其中，YN006+YN035 及 YN051 的抗肿瘤活性明显强于 YN006、YN035、Atezolizumab、Avelumab。表 12 显示本动物实验结束时，YN051 组有 5 只小鼠肿瘤完全消退，而 YN006+YN035 组只有 1 只小鼠肿瘤完全消退，表明 YN051 的治疗效果优于 YN006+YN035。

表 12. 各治疗组肿瘤完全消退小鼠数量

抗体	肿瘤完全消退小鼠数量/每组实验小鼠总数
PBS	0/5

人 IgG1 Fc	0/6
Atezolizumab	0/6
Avelumab	0/6
YN006	0/6
YN035	1/6
YN006+YN035	1/6
YN051	5/6

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本文所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。

权 利 要 求 书

1. 抗体、其抗原结合片段或变体，其以 3×10^{-9}M 或更低的 K_D 值与 PD-L1 蛋白相结合。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体轻链或其片段，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列 $TGTX_1SX_2VGGYX_3X_4VS$；其中 X_1 是 S、R 或 V；X_2 是 D、E 或 S；X_3 是 N 或 R；X_4 是 Y 或 E，且其中所述 LCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 LCDR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:54-58。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列 X_1NSX_2RPS，其中 X_1 是 G 或 E；X_2 是 N 或 I，且其中所述 LCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

5. 根据权利要求 4 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 LCDR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:60-61。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列：$QSYDSSLSGX_1V$，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 LCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包括框架区 L-FR1，L-FR2，L-FR3，和 L-FR4。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

9. 根据权利要求 7-8 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:71。

10. 根据权利要求 7-9 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:72。

11. 根据权利要求 7-10 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:73-75。

12. 根据权利要求 7-11 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:76。

13. 根据权利要求 2-12 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或

其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41。

14. 根据权利要求 2-13 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

15. 根据权利要求 2-14 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:42。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体重链或其片段，所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列：X_1YAIS，其中 X_1 是 S 或 T，且其中所述 HCDR1 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

17. 根据权利要求 16 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，且其中所述 HCDR2 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

18. 根据权利要求 16-17 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列：TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY，其中 X_1 是 D、E 或 G，X_2 是 G 或 E，X_3 是 S 或 G，X_4 是 Y 或 F，X_5 是 F 或 Y，且其中所述 HCDR3 根据抗体 Kabat 编号的索引确定。

19. 根据权利要求 18 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 HCDR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:50-52。

20. 根据权利要求 16-19 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包括框架区 H-FR1，H-FR2，H-FR3，和 H-FR4。

21. 根据权利要求 20 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

22. 根据权利要求 20-21 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:65-67。

23. 根据权利要求 20-22 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:68。

24. 根据权利要求 20-23 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR3 位于

所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，所述 H-FR3 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:69。

25. 根据权利要求 20-24 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 H-FR4 包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:70。

26. 根据权利要求 16-25 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:35。

27. 根据权利要求 16-26 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 IgG1 恒定区。

28. 根据权利要求 16-27 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO:36。

29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 PD-L1 蛋白选自下组：人 PD-L1 蛋白和鼠 PD-L1 蛋白。

30. 抗体、其抗原结合片段或变体，其以 5×10^{-9}M 或更低的 K_D 与 CD137 蛋白相结合。

31. 根据权利要求 30 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其以 3×10^{-9}M 或更低的 K_D 与 CD137 蛋白相结合。

32. 根据权利要求 30-31 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，其可缓解或治疗肿瘤。

33. 根据权利要求 32 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述肿瘤包括结肠癌。

34. 根据权利要求 30-33 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体轻链或其片段。

35. 根据权利要求 34 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述轻链或其片段包含 LCDR1-3，所述 LCDR1-3 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO: 80-82 所示。

36. 根据权利要求 34-35 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包括框架区 L-FR1、L-FR2、L-FR3 和 L-FR4。

37. 根据权利要求 36 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

38. 根据权利要求 36-37 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID

NO:89。

39. 根据权利要求 36-38 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:90。

40. 根据权利要求 38-39 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:91。

41. 根据权利要求 38-40 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 L-FR4 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:92。

42. 根据权利要求 34-41 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:20。

43. 根据权利要求 34-42 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区且所述人恒定区包括人 Igλ 恒定区。

44. 根据权利要求 34-43 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体轻链或其片段包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:23。

45. 根据权利要求 30-44 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体包含抗体重链或其片段，所述重链或其片段包含 HCDR1-3，所述 HCDR1-3 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO:77-79 所示。

46. 根据权利要求 45 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包括框架区 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4。

47. 根据权利要求 46 所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述框架区选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

48. 根据权利要求 46-47 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:84-85。

49. 根据权利要求 46-48 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:86。

50. 根据权利要求 46-49 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，所述 H-FR3 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:87。

51. 根据权利要求 46-50 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，所述 H-FR4 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID

NO:88。

52. 根据权利要求 46-51 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:25。

53. 根据权利要求 45-52 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区，且所述人恒定区包括人 IgG 恒定区。

54. 根据权利要求 45-53 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述抗体重链或其片段包含选自以下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:27。

55. 根据权利要求 30-54 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，所述 CD137 蛋白包括人 CD137 蛋白。

56. 双特异性抗体，其以 2×10^{-9}M 或更低的 K_D 值与 PD-L1 蛋白相结合，且以 8×10^{-9}M 或更低的 K_D 值与 CD137 蛋白相结合。

57. 根据权利要求 56 所述的双特异性抗体，其包含特异性结合所述 PD-L1 蛋白的第一靶向部分，其中所述第一靶向部分包含权利要求 1-29 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体。

58. 根据权利要求 56-57 中任一项所述的双特异性抗体，其包含特异性结合所述 CD137 蛋白的第二靶向部分，其中所述第二靶向部分包含权利要求 30-55 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体。

59. 根据权利要求 57-58 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述结合 CD137 蛋白的抗体包含 scFv，且所述 scFv 包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:83。

60. 根据权利要求 56-59 中任一项所述的双特异性抗体，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中所述第一多肽链包含所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区，所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区，以及所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区；且所述第二多肽链包含所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的轻链可变区。

61. 根据权利要求 60 所述的双特异性抗体，其中所述第一多肽链中，所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端，且所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端；

或者，所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端，且所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端。

62. 根据权利要求 60-61 中任一项所述的双特异性抗体，所述第一多肽链中所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区与所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区构成 scFv。

63. 根据权利要求 60-62 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一多肽链中还包含人 IgG 恒定区，所述人 IgG 恒定区位于所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区的 C 端且位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的轻链可变区的 N 端；或者，所述人 IgG 恒定区位于所述结合 PD-L1 蛋白的抗体的重链可变区的 C 端且位于所述结合 CD137 蛋白的抗体的重链可变区的 N 端。

64. 根据权利要求 60-63 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一多肽链包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:43 和 SEQ ID NO:44。

65. 根据权利要求 60-64 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第二多肽链包括选自下组氨基酸序列：SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO: 34。

66. 分离的一种或多种核酸分子，其编码权利要求 1-29 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，权利要求 30-55 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或权利要求 56-65 中任一项所述的双特异性抗体。

67. 载体，其包含根据权利要求 66 所述的核酸分子。

68. 细胞，其包含根据权利要求 66 所述的核酸分子或根据权利要求 67 所述的载体。

69. 制备权利要求 1-29 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，权利要求 30-55 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或权利要求 56-65 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括在使得权利要求 1-29 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，权利要求 30-55 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或权利要求 56-65 中任一项所述的双特异性抗体表达的条件下，培养根据权利要求 68 所述的细胞。

70. 药物组合物，其包含权利要求 1-29 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，权利要求 30-55 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或权利要求 56-65 中任一项所述的双特异性抗体，权利要求 66 所述的核酸分子、权利要求 67 所述的载体和/或权利要求 68 所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

71. 权利要求 1-29 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，权利要求 30-55 中任一项所述的抗体、其抗原结合片段或变体，或权利要求 56-65 中任一项所述的双特异性抗体，权利要求 66 所述的核酸分子、权利要求 67 所述的载体、权利要求 68 所述的细胞和/或权利要求 70 所述的药物组合物在制备缓解或治疗肿瘤的药物中的应用。

72. 抑制 PD-L1 蛋白和 PD-1 蛋白结合的方法，其包括施用权利要求 1-29 中任一项所述

的抗体、其抗原结合片段或变体，或权利要求 56-65 中任一项所述的双特异性抗体，权利要求 66 所述的核酸分子、权利要求 67 所述的载体、权利要求 68 所述的细胞和/或权利要求 70 所述的药物组合物。