



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106939050 A

(43)申请公布日 2017. 07. 11

(21)申请号 201710189120.4

(22)申请日 2017.03.27

(71)申请人 顺昊细胞生物技术(天津)股份有限公司

地址 300300 天津市滨海新区天津港保税区空港经济区空港商务园B园E11-102

(72)发明人 王继明 张云 赵青 朱泽 李镜
李向臣 李相国 钟殿胜 陈镭
王立祥 王华庆 李忠廉 刘卫平

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

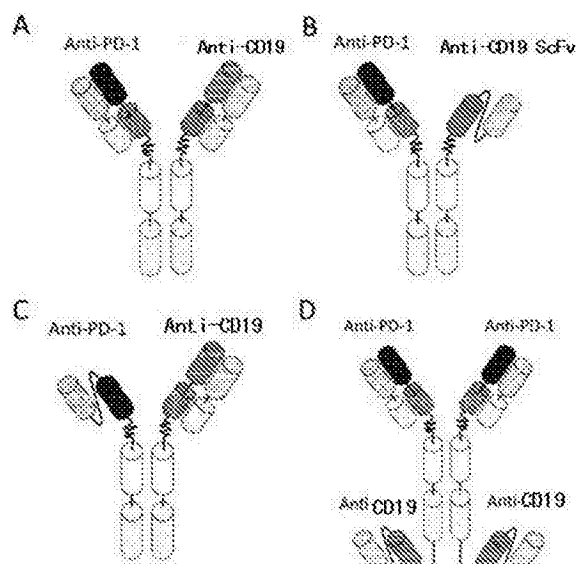
权利要求书3页 说明书56页
序列表29页 附图8页

(54)发明名称

抗PD1和CD19双特异性抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及抗PD1和CD19双特异性抗体及其应用,所述抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段包括:特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域,其包括抗PD-1特异性抗体的重链可变区(抗PD-1 VH);以及特异性识别和结合CD19的结构域,其包括抗CD19特异性抗体的重链可变区(抗CD19 VH)。该双特异性抗体具有全人源序列,有效地避免了临床治疗应用中HAMA的发生,能够更有效地减少耐药现象的发生,提高药物的利用效率和治疗效果。本发明提供的抗PD-1和CD19双特异性抗体能够获得比已有抗PD-1、抗CD19特异性抗体更好的介导T细胞高效特异性杀伤B淋巴细胞来源的肿瘤细胞的效果。



1. 一种抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段,其包括:

a. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域,其包括抗PD-1特异性抗体的重链可变区(抗PD-1VH);以及

b. 特异性识别和结合CD19的结构域,其包括抗CD19特异性抗体的重链可变区(抗CD19VH)。

2. 根据权利要求1所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段,其中所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域由依次连接的抗PD-1特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)、重链可变区(抗PD-1VH)、铰链区和Fc片段(抗PD-1CH2-CH3)组成,或由一组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成,或由两组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成,或由抗PD-1特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)和重链可变区(抗PD-1VH)组成;

优选地,所述特异性识别和结合CD19的结构域由依次连接的抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)、重链可变区(抗CD19VH)、铰链区和Fc片段(抗CD19CH2-CH3)组成,或由一组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成,或由两组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成,或由抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)和重链可变区(抗CD19VH)组成。

3. 根据权利要求1或2所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段,其包括:

a'. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域,其由一组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成;以及

b'. 特异性识别和结合CD19的结构域,其由一组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成;

优选地,所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域与所述特异性识别和结合CD19的结构域通过一个或多个二硫键,例如一个或多个位于铰链区的二硫键连接;或者

其包括:

a''. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域,其由一组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成;以及

b''. 特异性识别和结合CD19的结构域,其由依次连接的抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)、重链可变区(抗CD19VH)、铰链区和Fc片段(抗CD19CH2-CH3)组成;

优选地,所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域与所述特异性识别和结合CD19的结构域通过一个或多个二硫键,例如一个或多个位于铰链区的二硫键连接;或者

其包括:

a'''. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域,其由依次连接的抗PD-1特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)、重链可变区(抗PD-1VH)、铰链区和Fc片段(抗PD-1CH2-CH3)组成;以及

b^{'''}. 特异性识别和结合CD19的结构域, 其由一组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成;

优选地, 所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域与所述特异性识别和结合CD19的结构域通过一个或多个二硫键, 例如一个或多个位于铰链区的二硫键连接; 或者

其包括:

a^{'''}. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域, 其由两组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成; 以及

b^{'''}. 特异性识别和结合CD19的结构域, 其由两组抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)和重链可变区(抗CD19VH)组成;

优选地, 所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域中的每个抗PD-1特异性抗体的重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)的CH3分别与所述特异性识别和结合CD19的结构域中的每个抗CD19特异性抗体的重链可变区(抗CD19VH)通过化学键连接。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段, 其是嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段, 其中所述特异性识别和结合PD-1的结构域中的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No: 1、5、9或21所示; 轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No: 3、7、11或23所示;

优选地, 所述特异性识别和结合CD19的结构域中的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No: 13、17或25所示; 轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No: 15、19或27所示;

优选地, 所述抗PD-1特异性抗体的重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)的氨基酸序列为SEQ ID No: 29, 核苷酸编码序列为SEQ ID No: 30; 所述抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)的氨基酸序列为SEQ ID No: 31, 核苷酸编码序列为SEQ ID No: 32; 由依次连接的抗PD-1特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)、重链可变区(抗PD-1VH)、铰链区和Fc片段(抗PD-1CH2-CH3)组成的所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域的氨基酸编码序列为SEQ ID No: 33, 核苷酸编码序列为SEQ ID No: 34;

优选地, 所述抗CD19特异性抗体的重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)的氨基酸序列为SEQ ID No: 35, 核苷酸编码序列为SEQ ID No: 36; 所述抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)的氨基酸序列为SEQ ID No: 37, 核苷酸编码序列为SEQ ID No: 38; 由依次连接的抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)、重链可变区(抗CD19VH)、铰链区和Fc片段(抗CD19CH2-CH3)组成的所述特异性识别和结合CD19的结构域的氨基酸序列为SEQ ID No: 39, 核苷酸编码序列为SEQ ID No: 40; 由抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)和重链可变区(抗CD19VH)组成的所述特异性识别和结合CD19的结构域的氨基酸序列为SEQ ID No: 41, 核苷酸编码序列为SEQ ID No: 42;

优选地, 所述特异性识别和结合PD-1的结构域中的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No: 2、6、10或22所示; 轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No: 4、8、12或24所示;

优选地, 所述特异性识别和结合CD19的结构域中的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No: 14、18、26所示; 轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No: 16、20、28所示。

6. 一种编码根据权利要求1至5中任一项所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变

体、或其功能性片段的核酸分子。

7. 一种包含根据权利要求6所述的核酸分子的表达载体。

8. 一种包含根据权利要求7所述的表达载体的宿主细胞。

9. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1至5中任一项所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段,或根据权利要求6所述的核酸分子,或根据权利要求7所述的表达载体或根据权利要求8所述的宿主细胞。

优选地,所述药物组合物还包括一种或多种其他抗肿瘤药物;优选地,所述药物组合物还与一种或多种其他抗肿瘤治疗方法,例如化学疗法、放射疗法和/或生物疗法一起使用。

10. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段、或根据权利要求6所述的核酸分子、或根据权利要求7所述的表达载体或根据权利要求8所述的宿主细胞以及通过抑制PD-1,PD-L1或PD-L2等免疫抑制信号通路而使免疫增强联合靶向CD19在治疗肿瘤(例如非霍奇金淋巴瘤)的药物中的应用。

抗PD1和CD19双特异性抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于抗体药物开发和生产领域,涉及抗PD-1和CD19的双特异性抗体及其应用。本发明提供了特异性识别和结合PD-1和CD19的双特异性抗体或其功能性片段,还提供了编码所述的双特异性抗体或其功能性片段的核酸分子、用于表达所述双特异性抗体或其功能性片段的表达载体和宿主细胞,和它们在制备治疗癌症的药物中的应用,以及所述双特异性抗体或其功能性片段的制备方法。

背景技术

[0002] PD-1基因是一种55kDa的跨膜蛋白,其分子由4个亚基组成: δ 、 ϵ 、 γ 、 ζ ,各自的分子质量分别为18.9kDa、23.1kDa、20.5kDa、18.7kDa,其为Ig基因超家族的一员。PD-1是在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达的CD28家族的抑制性成员。

[0003] CD19是95kDa的膜受体,它在B细胞分化早期表达,并且继续表达直到B细胞被触发最终分化。CD19的胞外域含有两个被较小的潜在二硫键连接的结构域分隔开的C2型免疫球蛋白(IG)样结构域。CD19胞质域在结构上是独特的,但是在人、小鼠和豚鼠之间高度保守(Fujimoto等人, *Semin Immunol.* (1998) 10:267)。CD19是在B淋巴细胞表面上发现的蛋白质复合物的一部分。

[0004] CD19在正常及恶性B淋巴细胞中均有表达,被视为B细胞发育过程中的一个涵盖阶段较长的最为可靠的表面标记物。在正常淋巴组织中,CD19表达于生发中心的B细胞和滤泡树突状细胞、套细胞、滤泡间T细胞区的树突状大细胞,与CD19和CD22染色模式基本相同。但同CD22相比,CD19在前B细胞中也表达。此外,通过流式细胞学检测方法,CD19在人体组织分离得到的浆细胞中可以检测到。通常来说,CD19在B淋巴细胞瘤中表达,其中包括B淋巴细胞淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤、边缘区淋巴瘤。

[0005] B淋巴细胞白血病和恶性淋巴瘤是原发于骨髓造血系统和淋巴结并弥漫全身的恶性肿瘤。传统的放化疗虽然有一定疗效,但没有选择性,对正常组织的损伤很大。近年来,生物治疗方法广泛应用于肿瘤治疗,尤其是单克隆抗体,并因其特异靶向性、高亲和性而收到了良好效果。单抗通过Fc段与效应细胞表面活性受体PD-L1结合,从而介导杀伤作用,但具有免疫杀伤作用的T细胞因为表面缺乏上述受体而不能被有效介导,从而削弱了机体对肿瘤的免疫效应。

[0006] 慢性淋巴细胞白血病(CLL)是一种淋巴细胞克隆性增殖的肿瘤性疾病,淋巴细胞在骨髓、淋巴结、血液、脾脏、肝脏及其他器官聚集。95%以上的CLL为B细胞的克隆性增殖(即B-CLL),仅有不到5%的病例为T细胞表型(即T-CLL)。随着对PD-1/PD-L通路的深入研究,其在树突状细胞(DC)、T淋巴细胞、B淋巴细胞等中的作用逐渐被揭示,而CD19是B淋巴细胞表面特异标志,是分子量为 95×10^3 的穿膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,与B细胞活化和信号的转导有关,在前B淋巴细胞、未成熟B淋巴细胞、成熟B淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)中对肿瘤杀伤,被认为是传统的手术治疗、放化疗方法之外最有希望清除残余肿瘤细胞和微小转移病灶从而根治肿瘤的辅助治疗措施,许多动物实验和临床试验已

经证实了该生物治疗措施的疗效。患者体内B细胞表面的PD-1表达量明显高于健康组；B细胞淋巴瘤患者、恶性肿瘤细胞表面PD-L1的表达量也异常增高，慢性淋巴细胞白血体内B淋巴细胞常出现急性消耗，应用PD-1阻滞剂后这种现象有所减少。另外阻断PD-1后，B细胞的反应性也有所增强。

[0007] 抗体药物是以细胞工程技术和基因工程技术为主体的抗体工程技术制备的生物大分子药物，其具有特异性高、性质均一、可针对特定靶点定向制备等优点。单克隆抗体在临床上主要应用于以下三个方面：肿瘤治疗、免疫性疾病治疗以及抗感染治疗。其中，肿瘤的治疗是目前单抗应用最为广泛的领域，目前已经进入临床试验和单抗产品上市的阶段，用于肿瘤治疗的产品数量占比大概为50%。单克隆抗体治疗肿瘤是一种针对病变细胞特异靶点刺激免疫系统来杀伤靶细胞的免疫疗法，为了增强抗体的效应功能，特别是杀伤肿瘤细胞的效果，人们尝试多种方法改造抗体分子，双特异性抗体是改善抗体治疗效果的发展方向之一，现已成为抗体工程研究领域的热点。

[0008] 双特异性抗体(bispecific antibody, BiAb)是含有两种特异性抗原结合位点的人工抗体，即一个抗体分子中的两个抗原结合部位可分别结合两种不同的抗原表位的抗体，能在靶细胞和功能分子(细胞)之间架起桥梁，产生导向性的效应功能。双特异性抗体的一条臂结合肿瘤标志物，另一条臂结合T-细胞特异表面抗原，例如PD-1，可以克服上述问题并且连接肿瘤细胞和T-细胞。BiAb在生物医学中，特别是在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。通过BiAb介导的细胞毒作用杀死肿瘤细胞是当前免疫治疗应用研究的热点，其主要特点是BiAb能同时结合肿瘤相关抗原和免疫效应细胞上的靶分子，直接触发免疫效应细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤。

[0009] 用于免疫治疗的双特异性抗体是含有2种特异性抗原结合位点的人工抗体，能激发具有导向性的免疫反应，在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。双特异性抗体是通过鼠源性单克隆抗体的化学偶联、双杂交瘤和基因工程3个发展阶段所制备的一种非天然抗体或抗体杂合分子，随着生物技术的日益进步，国内外双特异性抗体的相关研究日趋深入，其在临床治疗中作为一种新的二次导向系统具有潜在的应用价值。

[0010] 随着计算机科学的迅猛发展，近年来计算机辅助药物设计成为研究与开发新药的崭新技术，明显加快了新药设计的速度和效率。蛋白质结构的不断解析，PDB数据不断增长，使计算机辅助设计蛋白质药物成为可能。基于蛋白质空间结构的蛋白质药物研究倍受重视。

发明内容

[0011] 本发明所要解决的技术问题是提供一种新型抗PD-1和CD19双特异性抗体及其应用。该双特异性抗体具有全人源序列，有效地避免了临床治疗应用中HAMA的发生，能够更有效地减少耐药现象的发生，提高药物的利用效率和治疗效果。本发明提供新的抗PD-1和CD19双特异性抗体融合蛋白具有针对第一目的抗原的第一特异性和针对第二目的抗原的第二特异性，具有对两种不同受体的结合特异性，同时本发明还涉及该双特异性抗体融合蛋白的生产方法、该融合蛋白的药物用途和使用该融合蛋白的治疗方法。因此，本发明提供的抗PD-1和CD19双特异性抗体能够获得比已有抗PD-1、抗CD19特异性抗体更好的介导T细胞高效特异性杀伤B淋巴细胞来源的肿瘤细胞的效果。

[0012] 本发明用于解决上述技术问题的技术方案如下：

[0013] 一种抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段，其包括：

[0014] a. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域，其包括抗PD-1特异性抗体的重链可变区(抗PD-1VH)；以及

[0015] b. 特异性识别和结合CD19的结构域，其包括抗CD19特异性抗体的重链可变区(抗CD19VH)。

[0016] 优选地，所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域由依次连接的抗PD-1特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)、重链可变区(抗PD-1VH)、铰链区和Fc片段(抗PD-1CH2-CH3)组成，或由一组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成，或由两组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成，或由抗PD-1特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)和重链可变区(抗PD-1VH)组成。

[0017] 优选地，所述特异性识别和结合CD19的结构域由依次连接的抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)、重链可变区(抗CD19VH)、铰链区和Fc片段(抗CD19CH2-CH3)组成，或由一组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成，或由两组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成，或由抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)和重链可变区(抗CD19VH)组成。

[0018] 根据本发明的一个优选的实施方案，所述抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段包括：

[0019] a'. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域，其由一组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成；以及

[0020] b'. 特异性识别和结合CD19的结构域，其由一组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成。

[0021] 优选地，所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域与所述特异性识别和结合CD19的结构域通过一个或多个二硫键，例如一个或多个位于铰链区的二硫键连接。

[0022] 根据本发明的一个优选的实施方案，所述抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段包括：

[0023] a''. 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域，其由一组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成；以及

[0024] b''. 特异性识别和结合CD19的结构域，其由依次连接的抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)、重链可变区(抗CD19VH)、铰链区和Fc片段(抗CD19CH2-CH3)组成。

[0025] 优选地，所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域与所述特异性识别和结合CD19的结构域通过一个或多个二硫键，例如一个或多个位于铰链区的二硫键连接。

[0026] 根据本发明的一个优选的实施方案，所述抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段包括：

[0027] a''' . 特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域，其由依次连接的抗PD-1

特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)、重链可变区(抗PD-1VH)、铰链区和Fc片段(抗PD-1CH2-CH3)组成;以及

[0028] b^{'''}.特异性识别和结合CD19的结构域,其由一组抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)和重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成。

[0029] 优选地,所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域与所述特异性识别和结合CD19的结构域通过一个或多个二硫键,例如一个或多个位于铰链区的二硫键连接。

[0030] 根据本发明的一个优选的实施方案,所述抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段包括:

[0031] a^{'''}.特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域,其由两组抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)和重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)组成;以及

[0032] b^{'''}.特异性识别和结合CD19的结构域,其由两组抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)和重链可变区(抗CD19VH)组成。

[0033] 优选地,所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域中的每个抗PD-1特异性抗体的重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)的CH3分别与所述特异性识别和结合CD19的结构域中的每个抗CD19特异性抗体的重链可变区(抗CD19VH)通过化学键连接。

[0034] 优选地,所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段是嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

[0035] 优选地,所述特异性识别和结合PD-1的结构域中的重链可变区的氨基酸序列如SEQ No:1、5、9或21所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No:3、7、11或23所示。

[0036] 优选地,所述特异性识别和结合CD19的结构域中的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No:13、17或25所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No:15、19或27所示。

[0037] 优选地,所述抗PD-1特异性抗体的重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)的氨基酸序列为SEQ ID No:29,核苷酸编码序列为SEQ ID No:30;所述抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)的氨基酸序列为SEQ ID No:31,核苷酸编码序列为SEQ ID No:32;由依次连接的抗PD-1特异性抗体的轻链可变区(抗PD-1VL)、重链可变区(抗PD-1VH)、铰链区和Fc片段(抗PD-1CH2-CH3)组成的所述特异性识别和结合免疫细胞表面抗原PD-1的结构域的氨基酸编码序列为SEQ ID No:33,核苷酸编码序列为SEQ ID No:34。

[0038] 优选地,所述抗CD19特异性抗体的重链(抗CD19VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)的氨基酸序列为SEQ ID No:35,核苷酸编码序列为SEQ ID No:36;所述抗CD19特异性抗体的轻链(抗CD19VL-CL)的氨基酸序列为SEQ ID No:37,核苷酸编码序列为SEQ ID No:38;由依次连接的抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)、重链可变区(抗CD19VH)、铰链区和Fc片段(抗CD19CH2-CH3)组成的所述特异性识别和结合CD19的结构域的氨基酸序列为SEQ ID No:39,核苷酸编码序列为SEQ ID No:40;由依次连接的抗CD19特异性抗体的轻链可变区(抗CD19VL)和重链可变区(抗CD19VH)组成的所述特异性识别和结合CD19的结构域的氨基酸序列为SEQ ID No:41,核苷酸编码序列为SEQ ID No:42。

[0039] 另一方面,本发明还提供了一种编码所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段的核酸分子,或者一种包含所述核酸分子的表达载体,或者一种包含所述表达载体的宿主细胞。

[0040] 优选地,所述特异性识别和结合PD-1的结构域中的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:2、6、10或22所示;轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4、8、12或24所示。

[0041] 优选地,所述特异性识别和结合CD19的结构域中的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:14、18、26所示;轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:16、20、28所示。

[0042] 再一方面,本发明还提供了一种药物组合物,其包括所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段,或所述的核酸分子,或所述的表达载体或所述的宿主细胞。优选地,所述药物组合物还包括一种或多种其他抗肿瘤药物;优选地,所述药物组合物还与一种或多种其他抗肿瘤治疗方法,例如化学疗法、放射疗法和/或生物疗法一起使用。

[0043] 进一步地,本发明还提供了所述的抗PD-1和CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段、或所述的核酸分子、或所述的表达载体或所述的宿主细胞在制备治疗肿瘤的药物中的应用。具体地,所述肿瘤为非霍奇金淋巴瘤。

[0044] 本发明提供了能够同时特异结合程序性死亡因子1 (PD-1) 和CD19的双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段。本发明的双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段具有以下特性的至少一种:

[0045] a. 能够与PD-1以高特异性结合,并阻断PD-1和PD-L1的相互作用;

[0046] b. 与其它CD28家族成员(如ICOS、CTLA-4和CD28)不发生结合;

[0047] c. 能够与CD19以高特异性结合;

[0048] d. 与其他B细胞分化抗原(如CD20,CD22)不发生结合;

[0049] e. 激活免疫细胞(如肿瘤特异性T细胞),并特异识别CD19阳性肿瘤细胞,促进CD8⁺T细胞进入肿瘤组织,使IFN- γ 等免疫效应物的水平大大增加,从而实现靶向杀伤肿瘤细胞。

[0050] 本发明还提供了人源化PD-1/CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段。所述人源化抗体由免疫小鼠产生的鼠源抗体经由计算机模拟设计并结合噬菌体展示技术而得到,并且根据其于不同物种的PD-1和CD19蛋白胞外结构域的结合特性,鉴定其相应的结合表位。本发明所述的人源化抗PD-1/CD19双特异性抗体、或其变体、或其功能性片段具备上述PD-1/CD19双特异性抗体或其功能性片段的有利特性。

[0051] 本发明所述变体和功能片段包括通过化学修饰或通过掺入脂质体中能够增加半寿期的任何片段,修饰后的片段保留与其来源抗体相同的结合特异性和亲和力,这样获得的新的具有双特异结合特性的蛋白分子也在本发明保护的范围内。

[0052] 在不实质性影响抗体活性的前提下,本领域技术人员可以对本发明的序列替换、添加和/或缺失一个或更多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个)氨基酸,以获得所述抗体或其功能性片段之序列的变体。它们都被视为包括在本发明保护的范围内。

[0053] 本发明所述双特异抗体、突变体及功能性片段可以是全长抗体、可仅包含两抗原结合部分,如Fab、F(ab')₂、Fv或单链(scFv)或全长抗体与抗原结合部分组成的融合蛋白(如图2),如上所述,任何形式组合所形成的双特异性结合蛋白分子均在本发明保护的范围内。

[0054] 本领域技术人员可以将编码本发明所述PD-1/CD19双特异性抗体的DNA分子克隆到载体中,进而转化宿主细胞。因此,本发明还提供了以图1(A)所示双特异抗体为例的重组

DNA载体,编码图1(B-C)以及图2所示PD-1/CD19双特异抗体的突变体及功能片段的载体及宿主细胞也在本发明保护的范围内。

[0055] 本发明所述的宿主细胞可以为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。所述原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、乳酸菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核宿主细胞可以为如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌,如草地粘虫等昆虫细胞,如烟草等植物细胞,如BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方案中,本发明所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞,更优选为BHK细胞、CHO细胞、NS0细胞或COS细胞。

[0056] 本发明提供的包含PD-1抗体和CD19抗体的人源双特异性抗体蛋白在体内外都具有良好的生物活性和稳定性,能够同时结合PD-1和CD19阳性的细胞,并且能够激活人T淋巴细胞,靶向杀伤非霍奇金淋巴瘤细胞,杀伤率达30%以上。

[0057] 本发明的有益效果在于提供了一种人源化的PD-1/CD19双特异性抗体,其可以结合PD-1和CD19阳性的细胞,并且能够增强T淋巴细胞的功能,从而达到靶向抗非霍奇金淋巴瘤细胞的作用,较目前临床应用的PD-1抗体和CD19单克隆抗体相比,具有更加强大的杀伤能力,在临床应用中具有很好的应用前景。

附图说明

[0058] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0059] 图1为本发明所述PD-1/CD19双特异性抗体的结构示意图。

[0060] 图2为本发明所述PD-1/CD19双特异性抗体的功能性片段或变体的结构示意图。

[0061] 图3为纯化人源化PD-1、CD19胞外结构域的SDS-PAGE检测结果。

[0062] 图4为抗PD-1单克隆抗体的ELISA检测结果。

[0063] 图5为抗CD19单克隆抗体的ELISA检测结果。

[0064] 图6分别显示抗PD-1单克隆3、21、45与77与CD28家族蛋白的结合。

[0065] 图7分别显示抗PD-1单克隆3、21、45与77对PD-L1蛋白与人T细胞的PD-1结合的封闭作用。

[0066] 图8分别显示抗CD19单克隆16、75与CD19蛋白的特异性结合。

[0067] 图9显示编码本发明的双特异抗体的重组质粒图谱。

[0068] 图10显示本发明的PD-1/CD19双特异性抗体对PD-1和CD19的特异结合。

[0069] 图11显示双特异性抗体抑制小鼠体内移植瘤的生长的实验结果。

具体实施方式

[0070] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0071] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0072] 实施例1PD-1/CD19双特异性抗体的结构设计

[0073] 本发明提供了一些可同时特异性结合PD-1与CD19胞外结构域的双特异性抗体的结构模型,此类抗体4种主要实施例的结构如图1所示,图1(A-C)中3种异源二聚体的形成均

基于本领域技术员所熟知的CH3结构域突变技术(“knob and hole mutation”(Von Kreudenstein et al., Mabs. 2013 5 (5):646-54)。(其中, (A) 抗PD-1特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)-重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)对与抗CD19特异性抗体的轻链(抗PD-1VL-CL)-重链(抗PD-1VH-CH1-铰链区-CH2-CH3)对组成的双特异性结合蛋白; (B) 抗PD-1特异性抗体的轻链-重链对与CD19轻链可变区(抗CD19VL)、重链可变区(抗CD19VH)、铰链区和Fc片段(抗CD19CH2-CH3)融合蛋白组成的双特异性结合蛋白; (C) 抗PD-1轻链可变区、重链可变区、铰链区和Fc片段融合蛋白与抗CD19特异性抗体的轻链-重链对组成的双特异性结合蛋白; (D) 抗PD-1特异性抗体的轻链与抗PD-1特异性抗体的重链、抗CD19轻链可变区(抗CD19VL)和重链可变区(抗CD19VH)融合蛋白组成的双特异性结合蛋白。

[0074] PD-1/CD19双特异性抗体的变体及功能性片段的实施例如图2所示,图2E-H中的双特异抗体变体及功能性片段的形成基于本领域技术员所熟知的融合肽技术(以多肽链或蛋白质将不同结构域连接,进而实现融合表达),图2I中的异源二聚体的形成基于本领域技术员所熟知的CH3结构域突变技术(同图1A-C) (E) 抗PD-1的重链可变区(抗PD-1VH)与抗CD19重链可变区(抗CD19VH)的融合蛋白; (F) 抗PD-1的单链可变片段(scFv)与抗CD19的scFv组成的融合蛋白; (G) 抗PD-1的单链可变片段(scFv)与抗CD19的scFv组成的非免疫球蛋白融合蛋白; (H) 抗PD-1轻链可变区、重链可变区、铰链区、Fc片段与抗CD19轻链可变区、重链可变区组成的四价融合蛋白; (I) 抗PD-1轻链可变区、重链可变区、铰链区和Fc片段融合蛋白与抗CD19轻链可变区、重链可变区、铰链区和Fc片段融合蛋白组成的双特异性结合蛋白(注:图中特异识别PD-1与CD19的功能片段位置可互换)。

[0075] 实施例2PD-1/CD19双特异性抗体抗原(人PD-1和CD19胞外可溶结构域)的制备

[0076] 在UniProt数据库获得人源PD-1和CD19胞外结构域的编码基因序列,通过全基因合成的方式获得编码基因PD-1ED-CDS和CD19ED-CDS,合成产物在经BamH I、EcoR I (PD-1ED-CDS)和BamH I、Xba I (CD19ED-CDS)双酶切后,克隆到pcDNA3.1载体,利用CHO-S细胞作为宿主细胞进行蛋白质表达,利用亲和层析、离子交换层析等纯化技术对目的蛋白进行纯化。

[0077] 图3为人源PD-1与CD19胞外结构域蛋白纯化并进行去糖基化处理后的SDS-PAGE检测结果图。

[0078] 实施例3抗人PD-1与CD19抗体的获得

[0079] 1. 免疫动物

[0080] 将1mg/ml已纯化的人PD-1或CD19胞外结构域蛋白100 μ l分别与等体积弗氏完全佐剂在室温下均匀混合后,腹部皮下多点注射入6-8周BALB/C小鼠体内。7天后,将1mg/ml蛋白100 μ l与等体积弗氏不完全佐剂在室温下均匀混合后,腹部皮下多点注射入小鼠体内。七天后,重复上面步骤。七天后,重复上面步骤。第四次注射后三天,断鼠尾尖取血15 μ l,室温静置2h, 25 $^{\circ}$ C, 6000-8000rpm,离心10-15min,取上清,通过ELISA实验检测效价。若效价检测可用即眼部取全血,室温静置2h, 25 $^{\circ}$ C, 6000-8000rpm,离心10min,取上清, -80 $^{\circ}$ C保存。若效价不可用,继续免疫一次。

[0081] 2. 细胞融合

[0082] 无菌取小鼠脾细胞并制成细胞悬液,将 1×10^8 个脾细胞与 $2-5 \times 10^7$ 个骨髓瘤(SP2/0-Ag14)细胞融合, 50%PEG作融合剂,以HAT选择培养基培养3-10天后,以HT培养基进行培

养,培养条件为5%CO₂,37℃。

[0083] 3.阳性克隆筛选

[0084] 利用ELISA反应筛选单克隆杂交瘤细胞中可分泌结合PD-1或CD19胞外结构域蛋白抗体的克隆,分别是筛选出结合PD-1(克隆3、21、45、77)和CD19(克隆16、75)的优选克隆,检测结果如图4和5所示,克隆均可特异识别相应的抗原蛋白。

[0085] 实施例4抗PD-1抗体与其他CD28家族蛋白结合的鉴定

[0086] 为鉴定筛选出的抗PD-1抗体的特异性,将CD28家族的成员蛋白PD-1、CD28、CTLA-4和ICOS(R&D System)于酶标板中在37℃温箱中静置包被2h;4℃封闭过夜;洗涤后加入100μl 候选抗体(1μg/ml),37℃孵育1h;洗涤5次后加入稀释的HRP标记山羊抗小鼠抗体(Abcam),室温孵育1h;洗涤5次后加入OPD底物溶液100μl/孔,显色5min后加入50μl/孔的2M H₂SO₄终止反应。用酶标仪测定490nm处各孔的吸光值。实验结果如图6,候选克隆分泌的抗体不结合除PD-1外的CD28家族成员蛋白。

[0087] 实施例5抗PD-1抗体对人T细胞的PD-1受体与PD-L1结合的封闭实验

[0088] 1.人外周血T细胞的分离

[0089] 抽取健康志愿者外周血10mL,缓慢加入装有5ml淋巴细胞分离液的离心管中,2500rpm,20min,取出白膜层,以PBS洗涤3次,获得人外周血单核细胞PBMC。分离得到的PBMC,加入100μl/ml CD3抗体(Invitrogen),轻吹混匀,室温孵育15min;加入5μl/ml免疫磁珠(Invitrogen),4℃孵育60min,每10分钟震荡一次;以PBS冲洗并稀释,将细胞悬液注入填有不锈钢毛的特制试管中,放入分离器进行分离纯化,强磁场下T细胞不能通过分离器,得以纯化。

[0090] 2.人PD-L1胞外结构域与绿色荧光蛋白融合蛋白的制备

[0091] 在UniProt数据库获得人PD-L1胞外结构域的编码基因序列,通过全基因合成的方式获得编码基因,合成产物在经EcoR I、Xho I双酶切后,克隆到pEGFP-N1载体,利用CHO-S细胞作为宿主细胞进行蛋白质表达,利用亲和层析、离子交换层析等纯化技术对目的蛋白进行纯化,获得绿色荧光蛋白融合表达的人源PD-L1胞外结构域蛋白rh-PD-L1-GFP,图7(A)为融合蛋白的表达与纯化并进行区糖基化处理后的SDS-PAGE结果。

[0092] 3.抗PD-1抗体对人T细胞的PD-1受体与PD-L1结合的封闭实验

[0093] 将优选克隆产生的4种抗体(1μg/ml)与rh-PD-L1-GFP(1μg/ml)室温下轻柔混合30min,然后将混合蛋白溶液加入分离纯化出的人外周血T细胞,室温孵育15分钟后以PBS清洗3次,以流式细胞仪进行分析。

[0094] 由图7(B-F)可见,克隆3、21和77可阻碍PD-L1与人T细胞上的PD-1受体的结合,克隆45的阻断效果较差。

[0095] 实施例6抗CD19抗体与CD20、CD33和CD138的结合鉴定

[0096] 将CD19、CD20、CD33和CD138(R&D System)于酶标板中在37℃温箱中静置包被2h;4℃封闭过夜;洗涤后加入100μl 候选抗体(1μg/ml),37℃孵育1h;洗涤5次后加入稀释的HRP标记山羊抗小鼠抗体(Abcam),室温孵育1h;洗涤5次后加入OPD底物溶液100μl/孔,显色5min后加入50μl/孔的2M H₂SO₄终止反应。用酶标仪测定490nm处各孔的吸光值。实验结果如图8,候选克隆分泌的抗体不结合CD20、CD33和CD138蛋白。

[0097] 实施例7抗PD-1和CD19候选抗体可变区序列的获得

[0098] 分别扩大培养抗PD-1克隆3、21、45、77和抗CD19克隆16、75,培养至细胞量为 10^9 个,离心收集细胞,去除细胞培养液,以预冷的PBS缓冲液(6-8mL)轻轻洗涤细胞两次;以Trizol试剂盒(TAKARA)提取总RNA,以紫外分光光度计检测RNA的纯度与浓度;以总RNA为模板,逆转录获得cDNA,逆转录体系20 μ l,其中5 $\times$ 逆转录Buffer(4 μ l),dNTP(1 μ l),MgCl₂(2.4 μ l),PD(N6)随机引物(1.5 μ l),RNA模板(2 μ g),逆转录酶(1 μ l),DEPC水(至20 μ l)。

[0099] 以cDNA为模板,扩增杂交瘤中可变区的DNA序列,扩增引物序列与抗体可变区第一框架区和恒定区互补(Orlandi R,et al.Cloning immunoglobulin variable domains for expression by polymerase chain reaction.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86:3833),扩增体系50 μ l,其中5 $\times$ PCR Buffer(10 μ l),dNTP(4 μ l),引物(2 μ l),cDNA模板(1 μ l),PCR酶(0.5 μ l),PCR水(至50 μ l)。

[0100] 扩增产物克隆至pMD19载体,经蓝白斑筛选后,重组子测序,获得的抗PD-1克隆3、21、77重链和轻链可变区氨基酸序列见SEQ No.1和3,5和7,9和11;编码相应氨基酸的核苷酸序列见SEQ No.2和4,6和8,10和12。获得的抗CD19克隆8、65重链和轻链可变区氨基酸序列见SEQ No.13和15,17和19;编码相应氨基酸的核苷酸序列见SEQ No.14和16,18和20。

[0101] 实施例8抗PD-1与CD19抗体的人源化改造

[0102] 利用获得的抗PD-1与CD19抗体的可变区氨基酸序列利用IMGT/V-Quest在线服务器分析抗体亚型,综合Kabat、Chothia及IMGT三种抗体的CDR区的Numbering方案确定抗体轻链与重链的六个CDR区序列;利用DS软件进行小鼠亲本抗体Fab及其嵌合人源化抗体Fab的空间结构,获得嵌合抗体的分子模型后,对亲本Fab和嵌合抗体Fab初始模型采用分子动力学模拟进行全面的优化,提取稳定的平均构象;利用表位扫描检验设计的人源化抗体可能存在的线性表位与构象表位,确定必须保留的框架区氨基酸位点后,设计不同的氨基酸突变位点获得人源化抗体。

[0103] 在此基础上,我们得到了多个人源化抗体,其中评分最高的抗PD-1和抗CD19抗体序列分别为克隆81和克隆22。

[0104] 在此基础上,我们得到了多个人源化抗体,其中评分最高的抗PD-1和抗CD20抗体序列分别为克隆81和克隆22,克隆81的重链和轻链氨基酸序列分别SEQ ID No.21和23,编码相应氨基酸的核苷酸序列分别SEQ ID No.22和24;克隆22的重链和轻链氨基酸序列分别SEQ ID No.25和27,编码相应氨基酸的核苷酸序列分别为SEQ ID No.26和28。

[0105] 实施例9抗PD-1/CD19双特异性抗体表达载体的构建

[0106] 本发明抗PD-1/CD19双特异性抗体中抗PD-1(克隆81,制备方法见实施例8)的可变区编码核苷酸PD-1-VH和PD-1-VL,抗CD19(克隆22,制备方法见实施例8)的可变区编码核苷酸CD19-VH和CD19-VL,IgG1重链恒定区CH1、铰链区、Fc和Fc-knob和Fc-hole编码核苷酸,以及轻链恒定区CL的kappa链编码核苷酸,以及链接scFv的多肽(GGGGS)3编码基因得自于Life Technologies Inc.(Carlsbad,CA)。

[0107] 图1中所示的4种结构的双特异性抗体中各个不同链,VL和CL、VH和CH1、CH1和Fc(Fc-knob、Fc-hole)、ScFv和Fc(Fc-knob、Fc-hole)、Fc和ScFv通过重叠PCR的方式获得。pcDNA3.1和pIRES作为表达载体以制备双特异性抗体,图1中所示的4种双特异抗体的重组质粒图谱见图9。

[0108] 实施例10抗PD-1/CD19双特异性抗体的制备

[0109] 1. 利用293F宿主细胞表达双特异性抗体

[0110] 在转染之前24小时,将 1×10^6 个293F细胞接种于烧瓶中的293freestyle培养基中于37℃,8%CO₂,130rpm条件下培养。将100μl 293fectin加入至1ml的OPTiMEM中,搅拌条件下,室温孵育5分钟。同时,将重组质粒(实施例9制备的),溶解于1ml OPTiMEM中,DNA总量为30μg。将上述DNA与293fectin完全混合,并且总体积为2ml,在室温下孵育20分钟。然后将该混合物加入至细胞培养物中。在37℃下培养细胞,且培养箱中有5%CO₂,以130rpm培养5天。

[0111] 2. 抗体纯化

[0112] 将细胞培养基于2000×g离心,收集上清并用0.22μm过滤器过滤。将收集的液体用10倍(以体积算)结合缓冲液(9.5mM NaH₂PO₄+40.5mM Na₂HPO₄,pH 7.0)稀释,然后通过Sepharose Fast Flow protein A亲和色谱柱(购自GE公司,5ml体积)、FabAffinity KBPAgarose亲和填料(购自ACROBiosystems公司,5ml体积),和SP阳离子交换色谱柱(购自GE公司,10ml)进行纯化,依使用手册操作。

[0113] 实施例11抗PD-1/CD19双特异性抗体的特异性结合鉴定

[0114] 将PD-1、CTLA-4、CD19和CD19(R&D System)于酶标板中在37℃温箱中静置包被2h;4℃封闭过夜;洗涤后加入纯化后4种按照实施例10制备的抗体(100μg/ml)的梯度稀释液(PBS连续稀释(1:10²,1:10³,1:10⁴,1:10⁵,1:10⁶,1:10⁷,1:10⁸,1:10⁹),100μl/孔,37℃孵育1h;洗涤5次后加入稀释的HRP标记山羊抗小鼠抗体(Abcam),室温孵育1h;洗涤5次后加入OPD底物溶液100μl/孔,显色5min后加入50μl/孔的2MHSO₄终止反应。用酶标仪测定490nm处各孔的吸光值。实验结果如图10,图1的4种双特异性抗体可同时特异性识别PD-1和CD19。

[0115] 实施例12PD-1/CD19双特异抗体的体内杀伤实验

[0116] 1. 异植瘤模型建立

[0117] 将处于对数生长期的非霍奇金淋巴瘤Raji细胞重悬于无血清的RPMI1640培养液,使得细胞浓度为 1×10^7 个细胞/ml。小鼠腋下接种Raji细胞 1×10^7 个/ml,0.2ml/只,建立淋巴瘤裸鼠模型。每两天测一次荷瘤的最长直径和最短直径,荷瘤的体积用公式:体积(mm³)=长×宽²/2。实验第30天,肿瘤的体积达到了500mm³,处死小鼠,分离肿瘤。

[0118] 2. 抗PD-1/CD19双特异性抗体杀伤实验

[0119] 将种植瘤小鼠分为4组,每组4只,以纯化的按照实施例10制备的PD-1/CD19双特异性抗体(图1D)尾静脉注射至成瘤小鼠体内,用量分别为A组:0mg/kg,B组:5mg/kg,C组:30mg/kg和D组:100mg/kg。每隔一周注射1次,连续注射4次,记录小鼠体内肿瘤大小变化。抗PD-1/CD19双特异性抗体不仅抑制小鼠体内肿瘤的生长,同时具有缩小肿瘤的作用,以30mg/kg和100mg/kg剂量注射6周后,肿瘤体积分别缩小至初始体积的49.7%和37.8%(见图11A)。

[0120] 表1双抗对肿瘤的抑制作用结果

[0121]

组别	肿瘤大小	肿瘤体积增率
对照组	1255±43mg	1255.8%
5mg/kg组	427±37mg**	432.6%
30mg/kg组	75±19mg**	49.7%
100mg/kg组	49±16mg**	37.8%

[0122] 注：与对照组比较** $P < 0.01$ 。

[0123] 3. 抗PD-1单克隆抗体、抗CD19单克隆抗体与抗PD-1/CD19双特异性抗体肿瘤杀伤效率比较实验

[0124] 将种植瘤小鼠分为5组，每组4只，以纯化的抗PD-1单克隆抗体（克隆81）、抗CD19单克隆抗体（克隆22）与抗PD-1/CD19双特异性抗体（序列参见克隆81和克隆22，图1D）尾静脉注射至成瘤小鼠体内，用量分别为A组：PBS，B组：30mg/kg抗PD-1单抗（克隆81），C组：30mg/kg抗CD19单抗（克隆75），D组：30mg/kg抗PD-1/CD19双特异性抗体（图1中的双抗D）。每隔一周注射1次，连续注射4次，记录小鼠体内肿瘤大小变化。抗PD-1/CD19双特异性抗体缩小肿瘤的作用明显优于抗PD-1单抗和抗CD19单抗，在抗PD-1单抗、抗CD19单抗和抗PD-1/CD19双抗作用下肿瘤体积分别缩小至初始体积的71.5%，62.8%和85.3%（见图11B）。

[0125] 表2不同抗体对肿瘤的抑制作用结果

[0126]

组别	肿瘤大小	肿瘤体积增率
对照组	1412±38mg	1321.8%
抗PD-1单抗组	537±17mg*	71.5%
抗CD19单抗组	130±16mg**	62.8%
抗PD-1/CD19双抗组	49±15mg***##&	85.3%

[0127] 注：与对照组比较** $P < 0.01$ ；与PD-1组比较*** $P < 0.01$ ；与CD19组比较* $P < 0.05$ 。

[0128] 实施例13抗PD-1/CD19双特异抗体的变体（图2所示5种变体）体内肿瘤杀伤实验

[0129] 将种植瘤小鼠分为6组，每组4只，以纯化的5种抗PD-1/CD19双特异抗体的变体（图2E-I所示的双抗变体，序列参见克隆81和克隆22）尾静脉注射至成瘤小鼠体内，用量分别为A组：PBS，B组：20mg/kg变体1（图2E），C组：20mg/kg变体2（图2F），D组：20mg/kg变体3（图2G），E组：20mg/kg变体4（图2H），和F组：20mg/kg变体5（图2I）。每隔一周注射1次，连续注射4次，记录小鼠体内肿瘤大小变化。5种抗PD-1/CD19双特异性抗体的变体同样具备抑制肿瘤生长的功效。（ $p < 0.01$ ）。

[0130] 表3不同抗体的变体对肿瘤的抑制作用结果

[0131]

组别	肿瘤大小
----	------

[0132]

对照组	1427±27mg
变体1（图2E）组	223±41mg**
变体2（图2F）组	157±19mg**
变体3（图2G）组	102±18mg**
变体4（图2H）组	86±15mg**
变体5（图2I）组	82±17mg**

[0133] 注：与对照组比较** $P < 0.01$ 。

<110> 顺昊细胞生物技术（天津）股份有限公司

<120> 抗 PD1 和 CD19 双特异性抗体及其应用

<130> SHUNHOBiMab-PD-1XCD19

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 3 重链的氨基酸序列

<400> 1

[0134] Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Phe Phe Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 3 重链可变区的核苷酸序列

<400> 2

cagggccagc tggcgcagag cggcggcgag gtgaagaagc cggcgcagc cctgaggetg 60

gactgcaagg ccagcggcta caccctcacc aactactaca tgcactgggt gaggcaggcc 120

cccggccagg gccctggagt gatgggcggc atctggtacg acggcagcaa gaggtactac 180

[0135]

aacgagaagt tcaagaacag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240

atggagetga gcagcctgag gaggcaggac accgccgtgt actactgcgc caggagggac 300

tacttctteg actggtactt cgactactgg ggccagggca ccacgtgac cgtgagcagc 360

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 3 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser

	20	25	30
Gly Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro			
35	40	45	
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala			
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser			
65	70	75	80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Ser			
85	90	95	
Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

[0136]

<210> 4
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆 3 轻链可变区的核苷酸序列

<400> 4
 gagatcgtgc tgaccagag cccgccacc ctgagcctga gcccggcga gagggccagc 60
 atcagctgca gggccagcca gacgtgagc accagcggct acagctacct ggcctggtac 120
 cagcagaagc ccggccaggc ccccagcctg ctgatctacg acgccagcta cctggagagc 180
 ggcatacccg ccaggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttaacct gaagatcagc 240
 agcctggagc ccgaggacgt gggcgtgtac tactgccagc acagcagcaa ctggcccttg 300
 accteggcc agggcaccaa gctggagatc aag 333

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 21 重链可变区的氨基酸序列

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Thr Phe Ser Asp
20 25 30

Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
35 40 45

[0137] Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 6

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 21 重链可变区的核苷酸序列

<400> 6

```
cagggtgcagc tggtaggagag cggcgccgag gtggtgcagc ccggcaggag cctgaggctg      60
gaetgcaagg ccagcggcta catcaccctc agegactact acatgtactg ggtgaggcag      120
gcccccggcc acggcctgga gtggatcggc tacatcaacc ccagcaacgg cggcaccaac      180
ttcaacgaga agttcaaggg cagggtcacc atcagcaggg acaacagcaa gaacaccctg      240
ttcctgcaga tgaacagcct gcagttcgac gacaccgccg tgtactactg cgccaccaac      300
gacgactact ggggccaggg caccctgggt accgtgagca gc      342
```

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

[0138]

<220>

<223> 克隆 21 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 7

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Ser Tyr
          20           25           30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
65           70           75           80
```

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Asp Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 21 轻链可变区的核苷酸序列

<400> 8

gacatcgtga tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gagggccagc 60

atcagctgca gggccagcaa gggcgtgagc agctacctgc actggtacca gcagaagecc 120

ggccagagcc ccaggctgct gatctacctg gccagctacc tggagagcgg cgtgcccgac 180

[0139]

aggttcagcg gcagcggcag cggcacegac ttcacctga agatcagcag ggtggaggcc 240

gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agcagggacc tgccctacac cticggccag 300

ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 77 重链可变区的氨基酸序列

<400> 9

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ser Trp Asn
20 25 30

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Ile His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
 35 40 45

Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ala Val Thr
 50 55 60

Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Phe Gly
 85 90 95

Ser Thr Ala Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

[0140]

<210> 10

<211> 345

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 77 重链可变区的核苷酸序列

<400> 10

cagggccagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccac ctgcaccgtg 60

accggctaca gcatcaccag cgactacagc tggaactgga tcaggcaggc ccccatccac 120

ggcctggagt ggatcggeta catcaactac gccggcagca ccagctacaa cccagcctg 180

gaggccgtga ccatcaccgc cgacaagagc accagcaccg cctacatgga gctgagcagc 240

ctgaggagcg aggacaccgc cgtgtactac tgcgccaggt ggttcggcag caccgcctgg 300

tacatcgacg tgtggggcca gggcaccacc gtgaccgtga gcagc 345

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 77 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 11

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gln
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ala Leu Leu His Ser Asp
20 25 30

Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

[0141]

Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Leu Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Ile Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
65 70 75 80

Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly Val His Ile
85 90 95

Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 77 轻链可变区的核苷酸序列

<400> 12

gaegtgggtga tgaccacagag cccctgagc ctgcccgtga ccctgcagcc cgcacagatc 60

agctgcaaga gcagccaggc cctgctgcac agcgacggca agacctacct gtactggtac 120

ctgcagaagc cgggccagag cccaagctg ctgactctacg agctgagcag caggttcagc 180

ggcatccccc acaggatcac cggcagcggc accgacttca ccctgaagat cagcagggtg 240

gaggecgagg acctgggggt gtacttctgc ttccagggcg tgcacatccc ctacagcttc 300

ggccagggca ccaagctgga gatcaag 327

<210> 13

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

[0142]

<220>

<223> 克隆 16 重链可变区的氨基酸序列

<400> 13

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115 120

<210> 14

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 16 重链可变区的核苷酸序列

<400> 14

[0143]

caagttcagt tattggaatc tggtagctgag ctgtccgctc ctggtctctc agtaaaaatt 60
tcgtgtaagg ccagtgata tgcatcttagc tcttactgga tgaattgggt gaaacaacgc 120
ccccggcagg gtctcgaatg gatcgcccaa atatggccag gagatgggga cactaactat 180
aatggtaagt tcaaaggcaa ggcgacccta acagctgatg agtctctate gacggcctac 240
atgcagctga gtagcttacg atctgaagac tccgcagttt attcatgcgc gaggagagag 300
actaccacag tcggaaggta ctattacgt atggattatt gggggcaagg tacgactgta 360
acc 363

<210> 15

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 16 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 15

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

[0144]

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Arg Ser

<210> 16

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 16 轻链可变区的核苷酸序列

<400> 16

gaattagttt tgaactcaatc tcttgettcc cttgccgtct cactcgggtca gcgtgcaacc 60

atttcgtgta aagegagtca aagcgtagat tatgacggcg attcttacct aaattgggtat 120

cagcaantcc ccggacagcc accgaagctg ttaataaacg acgettccaa cttgggtgtca 180

gggattcctc cccgcttttc gggtagtggc agcggaacag atttcacgct taatatccat 240
ccagttgaga aagtcgacgc cgcaacttat cactgccaac agtctaccga agatccgtgg 300
acatttgggg gtggcagcaa gctcgagata aaacgacggt cc 342

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 75 重链可变区的氨基酸序列

<400> 17

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

[0145] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr
115 120

<210> 18

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 75 重链可变区的核苷酸序列

<400> 18

gaattagttt tgactcaatc tectgettec ctigccgtct cactcggta gcgtgcaacc 60

atttcgtgta aagcgagta aagcgtagat taigacggcg attcttacct aaattggat 120

cagcaaatcc ccggacagcc accgaagctg ttaatatagc acgtctccaa ctiggtgtca 180

gggattcttc ccegttttc gggtagtggc agcggaacag atttcacgt taatatccat 240

ccagttgaga aagtcgacgc cgcaacttat cactgccaac agtctaccga agatccgtgg 300

[0146]

acatttgggg gttgcacgaa gctcgagata aaacgacggt cc 342

<210> 19

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 75 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 19

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Leu Leu Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Arg Ser

[0147]

<210> 20

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 75 轻链可变区的核苷酸序列

<400> 20

gaattagttt tgactcaatc tctgtctgcc ctgcagtc cctcggtea gctgcgacc 60

atttcattgt ctgcctcgca aagtgtagat tatgacggcg atagctacct aaattggtat 120

cagcaaatcc ccggacagcc accgaaactg ttaatatatg acgcatctaa ctgggtgtcc 180

gggattcttc cccgcttttc aggttcgggc agtggaaacag atttcacgct taatatccat 240

ccagttgaga aggtcgacgc gtcctatat cactgccaac agagcaactga agatccgtgg 300

acctttgggg gtggcacaaa actggagata aagcgacggt ct 342

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 81 重链可变区的氨基酸序列

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Thr Ala Tyr Asn Pro Ala Leu Lys
50 55 60

[0148]

Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu
65 70 75 80

Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Asp Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 81 重链可变区的核苷酸序列

<400> 22
 cagggtgcagc tggatgcagag cggcgtggag gtaagaagc ccggcgccag cgtgaaggatg 60
 agetgcaagg ccagcggeta caccctcacc agcgactaca gctactgggt gaggcaggcc 120
 cccggccagg gccctggagt gatgggcggc atcaacccca gcaacggcac cgcctacaac 180
 cccgccctga agagggtgac cctgaccacc gacagcagca ccaccaccgc ctacatggag 240
 ctgaagagcc tgcagttcga cgacaccgcc gtgtactact gcgccaggag ggactacagg 300
 ttcgacatgg gcgacctggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagc 348

<210> 23
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆 81 轻链可变区的氨基酸序列

[0149] <400> 23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Asp Gly
 20 25 30

Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro

85

90

95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 24

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 81 轻链可变区的核苷酸序列

<400> 24

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gagggccacc 60

ctgagctgca gggccagcaa gggcgtgagc gacggcaaga cctacctgta ctggtaccag 120

cagaagcccg gccaggcccc caggctgctg atctacgagg ccagctacct ggagagcggc 180

[0150] gggcccgcaa ggccagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaecalag cagcctggag 240

cccaggact tcgccgtgta ctactgccag cacagcaggg acctgccta caccttcggc 300

ggcggcacca aggtggagat caag 324

<210> 25

<211> 91

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 22 重链可变区的氨基酸序列

<400> 25

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp
20 25 30

Val Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Lys Phe Lys Gly Lys
35 40 45

Ala Thr Leu Thr Ala Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Tyr
50 55 60

Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Lys
85 90

<210> 26

<211> 282

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0151] <223> 克隆 22 重链可变区的核苷酸序列

<400> 26

caaggcagc tagttcaatc tggcgctgaa gtcaaaaagc ctggagccac ttgtaccgta 60

acagggtatg cattttcctc atactggatg aattgggtgt ggcccggatga tggcgacacg 120

aactataata aattcaaggg aaaagcgact ttgaccgctg ttgggcgtta ctattacgcc 180

atggattatt actattacgc aatggactat tggggctctt gcacaacggt caettaatgg 240

ggacagggga ccacagtaac ggtgtcgagt ctcaagtagt ga 282

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 22 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gln
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp
20 25 30

Tyr Gln Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Leu Gly Val Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
85 90 95

[0152]

Met Gln Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 28

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆 22 轻链可变区的核苷酸序列

<400> 28

gatgttgtca tgactcaatc tcttttatcc ttgcccgtaa cccttcagcc agcttcaatt 60

tctgtgtaa atgacggtga tagttacetc aattgggtatc aagccagcaa cctagtgtct 120

ggeatcccgc ctcgtttttc cggatcaggg tcgggtacag acgcaagtaa tctggttagc 180

ggeataccccc gcttcctctgg atccgggacg gattttactt taaagatttc acgagtcgaa 240

gcggaggact tgggtgtaac cgctgatgaa tegagtagca catcttacat gcagcttggc 300

acgaaactcg agatcaagcg g 321

<210> 29

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 PD-1 特异性抗体的重链的氨基酸序列

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asp
20 25 30

[0153]

Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Thr Ala Tyr Asn Pro Ala Leu Lys
50 55 60

Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu
65 70 75 80

Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Asp Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220

[0154]

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

[0155]

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 30

<211> 1335

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 PD-1 特异性抗体的重链的核苷酸编码序列

<400> 30

cagggtgcagc tggtagcagag cggcgtggag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaagggtg

60

	agctgcaagg ccagcggcta caccitcacc agcgactaca gctactgggt gaggcaggcc	120
	cccgccagg gccctggagt gatgggcggc atcaacecca gcaacggcac cgcctacaac	180
	ccccccctga agagggtgac cctgaccacc gacagcagca ccaccaccgc ctacatggag	240
	ctgaagagcc tgcagttcga cgacaccgcc gtgtactact gcgccaggag ggactacagg	300
	ttcgacatgg gcgacctggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagcgc cagcaccaag	360
	ggccccagcg tgttccccct ggccccctgc agcaggagca ccagcgagag caccgcccgc	420
	ctgggctgcc tggatgaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggc	480
	gcccctgacca gggcgctgca caccitcccc gccgtgttgc agagcagcgg cctgtacagc	540
	ctgagcagcg tggatgacct gccccagcgc agcctgggca ccaagacctc cacctgcaac	600
	gtggaccaca agcccagcaa caccaaggct gacaagaggg tggagagcaa gtacggcccc	660
	ccctgcccc ccctgccccg ccccagttc ctgggcggcc ccagcgtgtt ccgttcccc	720
[0156]	cccaagecca aggacacct gatgatcagc aggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg	780
	gacgtgagcc aggaggacct cgagggtcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt	840
	cacaacgcca agaccaagcc cagggaggag cagttcaaca gcacctacag ggtggtagc	900
	gtgtgacctg tcttgcacca ggactgctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtgagc	960
	aacaagggcc tgcccagcag catcgagaag accatcagca aggccaaggg ccagcccagg	1020
	gagccccagg tglacacct gcccccagc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtgagc	1080
	ctgacctgcc tggatgaagg ctcttcccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac	1140
	ggccagcccg agaacaacta caagaccacc cccccctgc tggacagcga cggcagcttc	1200
	ttctgtaca gcaggctgac cgtggacaag agcaggctgc aggagggcaa cgtgttcagc	1260
	tgcagcgtga tgcacgagc cctgcacaac cactacacc agaagacct gagcctgagc	1320
	ctgggcaagt gataa	1335

<210> 31

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 PD-1 特异性抗体的轻链的氨基酸序列

<400> 31

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Asp Gly
20 25 30

Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

[0157]

Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145	150	155	160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu			
165	170	175	
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
180	185	190	
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys			
195	200	205	
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		

[0158]

<210> 32

<211> 651

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 PD-1 特异性抗体的轻链的核苷酸编码序列

<400> 32

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gcgcgccacc	60
ctgagctgcc gcgccagcaa ggccgtgagc gacggcaaga cctacctgta ctggtaccag	120
cagaagcccg gccagccccc ccgcctgctg atctacgagg ccagctacct ggagagcggo	180
gtgcccgcgc gcttcagcgg cagcggcacc gaettcacc tgaccatcag cagcctggag	240
cccgaggact tcgcctgta ctactgccag cacagcccg acctgcccta caccttcggc	300
ggcggcacca aggtggagat caagcgcacc gtggccgccc ccagcgtgtt catcttcccc	360
cccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc	420
tacccccgcg aggccaaaggt gcagtgaag gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc	480
caggagagcg tgaccagaca ggacagcaag gacagcacct acagcctgag cagcacccctg	540

accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaggt gaccaccag 600

ggcctgagca gccccgtgac caagagcttc aaccgcggcg agtgctgata a 651

<210> 33

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 scFv-Fc 融合蛋白氨基酸序列

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Asp Gly
20 25 30

[0159]

Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
115 120 125

Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
130 135 140

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Tyr Trp Val
145 150 155 160

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro
165 170 175

Ser Asn Gly Thr Ala Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Arg Val Thr Leu Thr
180 185 190

Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln
195 200 205

Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe
210 215 220

[0160]

Asp Met Gly Asp Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu
225 230 235 240

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

[0161]

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 34

<211> 1410

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-I scFv-Fc 融合蛋白核酸序列

<400> 34

gagatcgtgc tgaccacagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gagggccacc 60

ctgagctgca gggccagcaa gggcgtgagc gacggcaaga cctacctgta ctggtaccag 120

cagaagcccg gccaggcccc caggctgctg atctacgagg ccagctacct ggagagcggc 180

gtgcccgcca ggctcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggag 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cacagcaggg acctgcccta cacttcggc 300

ggcggcacca aggtggagat caagggcggc ggcggcagcg gcggcgcgcg cagcggcggc 360

ggcggcagcc aggtgcagct ggtgcagagc ggcgtggagg tgaagaagcc cggcgccagc 420

gtgaaggatga gctgcaagcc cagcggctac accttcacca gcgactacag ctactgggtg 480

[0162]

aggcagcccc ccggccaggg cctggagtgg atggggcgca tcaaccccag caacggcacc 540

gcctacaacc ccgccctgaa gagggtgacc ctgaccaccg acagcagcac caccaccgcc 600

tacatggagc tgaagagcct gcagttcgac gacaccgccg tgtactactg cgccaggagg 660

gactacaggt tcgacatggg cgacctgggc cagggcacca ccgtgacctg gacgagcgag 720

agcaagtaag gccccccctg cccccctgc cccgcccccg agtccctggg cgccccagc 780

gtgttcctgt tcccccccaa gcccaaggac acctgatga tcagcaggac ccccagggtg 840

acctgcgtgg tgggtggacgt gaggcaggag gaccccaggg tgcagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgagg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccaggg aggagcagtt caacagcacc 960

tacagggtgg tgagcgtgct gacctgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020

aagtgaagg tgagcaacaa ggccctgccc agcagcatcg agaagacct cagcaaggcc 1080

aagggccagc ccaggagacc ccaggtgtac acctgcccc ccagccagga ggagatgacc 1140

aagaaccagg tgagcctgac ctgcctgggtg aagggtttct accccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc cgtgctggac 1260
agcgacggca gcttcttcct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1320
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag 1380
agcctgagcc tgagcctggg caagtataa 1410

<210> 35

<211> 418

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 CD19 特异性抗体的重链的氨基酸序列

<400> 35

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0163]

Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp
20 25 30

Val Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Lys Phe Lys Gly Lys
35 40 45

Ala Thr Leu Thr Ala Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Tyr
50 55 60

Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Lys Ala Ser Thr Lys Gly
85 90 95

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
100 105 110

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
115 120 125

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
130 135 140

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
145 150 155 160

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
165 170 175

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
180 185 190

[0164] Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
195 200 205

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
210 215 220

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
225 230 235 240

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
245 250 255

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
260 265 270

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
275 280 285

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
290 295 300

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
305 310 315 320

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
325 330 335

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
340 345 350

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
355 360 365

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
370 375 380

[0165]

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
385 390 395 400

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
405 410 415

Gly Lys

<210> 36

<211> 1257

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 CD19 特异性抗体的重链的核苷酸编码序列

<400> 36

cagggccagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccac ctgcaccgtg 60

	accggctacg ccttcagcag ctactggatg aactgggtgt ggcccggcga eggegacacc	120
	aactacaaca agttcaaggg caaggccacc ctgaccgccg tgggccgcta ctactaegcc	180
	atggactact actactacgc catggactac tggggcctgg gcaccaccgt gacctggggc	240
	cagggcacca cctgaccgt gacgagcctg aagagacca agggccccag cgtgtcccc	300
	ctggccccct gcagcaggag caccagcgag agcaccgccg cctgggctg cctggtgaag	360
	gactacttcc ccgagcccg gaccgtgagc tggaacagcg gggccctgac cagcggcgtg	420
	cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggccigtaca gcctgagcag cgtggtgacc	480
	gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc tacacctgca acgtggacca caagcccagc	540
	aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc aaglacggcc cccctgccc cccctgccc	600
	gcccccgagt tcttggggcg cccagcgtg ttcctgttcc cccccaagcc caaggacacc	660
	ctgatgatca gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtgtgtg tggacgtgag ccaggaggac	720
[0166]	cccgaggtgc agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag	780
	cccagggagg agcagttcaa cagcacctac aggtgtgtga gcgtgcigac cgtgctgcac	840
	caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtga gcaacaagg cctgcccagc	900
	agcatcgaga agaccatcag caaggccaag ggccagccca gggagcccca ggtgtacacc	960
	ctgcccccca gccaggagga gatgaccaag aaccaggtga gcctgacctg cctggtgaag	1020
	ggtttctacc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac	1080
	tacaagacca cccccccgt gctggacagc gacggcagct tcttctgtga cagcaggtg	1140
	accgtggaca agagcaggtg gcaggaggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag	1200
	gccctgcaaa accactacac ccagaagagc ctgagcctga gcctgggcaa gtgataa	1257

<210> 37

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 CD19 特异性抗体的轻链的氨基酸序列

<400> 37

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gln
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp
20 25 30

Tyr Gln Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Arg
50 55 60

[0167] Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Leu Gly Val Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
85 90 95

Met Gln Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0168]

<223> CD19 特异性抗体的轻链的核苷酸编码序列

<400> 38

```

gacgtggtga tgaccagag cccctgagc ctgcccgtga cctgcagcc cgccagcatc      60
agctgcaagt acgacggcga cagctacctg aactggtacc aggccagcaa cctggtgagc      120
ggcatcccc cccgcttcag cggcagcggc agcggcaccg acgccagcaa cctggtgagc      180
ggcatcccc gcttcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaagatcag ccgcgtggag      240
gccgaggacc tgggcgtgac cgcgcagcag agcagcagca ccagctacat gcagctgggc      300
accaagctgg agatcaagcg caccgtggcc gccccagcg tgttcatttt cccccccagc      360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc ggggtgtgcc tgcagaacaa ctcttaccce      420
cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccttgc agagcggcaa cagccaggag      480
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg      540
agcaaggccg actacagaaa gcacaaggctg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggccctg      600
agcagccccc tgaccaagag cttaaccgcg ggcgagtgtc gataaa                      645

```

<210> 39

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19 scFv-Fc 融合蛋白氨基酸序列

<400> 39

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gln
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp
20 25 30

Tyr Gln Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
35 40 45

[0169]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Leu Gly Val Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
85 90 95

Met Gln Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Gly Gln Leu Val Gln
115 120 125

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Cys Thr Val Thr Gly
130 135 140

Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Trp Pro Gly Asp Gly
145 150 155 160

Asp Thr Asn Tyr Asn Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val
165 170 175

Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
180 185 190

Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
195 200 205

Val Ser Ser Leu Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

[0170] Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

[0171]

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 40

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19 scFv-Fc 融合蛋白核苷酸序列

<400> 40

gacgtggtga tgaccagag cccctgagc ctgcccgtga cctgcagcc cgccagcacc 60

agctgcaagt acgaaggcga cagctacctg aactggtacc aggccagcaa cctggtgagc 120

ggcatccccc cccgttcag cggcagcggc agcggcaccg acgccagcaa cctggtgagc 180

	ggcatcccc gcttcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaagatcag ccgcgtggag	240
	gccgaggacc tgggctlgac cgcgcagcag agcagcagca ccagctacat gcagctgggc	300
	accaagctgg agatcaageg cggcggcggc gccagcggcg gcgcggcgag cggcggcggc	360
	ggcagccagg gccagctggt gcagagcggc gccaggtga agaagcccg cgcacctgc	420
	accgtgaccg gctacgcctt cagcagctac tggatgaact ggggtgtggc cggcgacggc	480
	gacaccaact acaacaagtt caagggaag gccaccctga ccgcctggg ccgtactac	540
	tacgccatgg actactacta ctacgccatg gactactggg gcctgggcac caccgtgacc	600
	tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc agcctgaagg agagcaagta cggccccc	660
	tgcceccct gccccgcgc cagtttctg ggcggcccga gcgtgttct gtccccc	720
	aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac	780
	gtgagccagg aggacccga ggtgcagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac	840
[0172]	aacgccaaga ccaagcccag ggaggagcag ttcaacagca cctacagggt ggtgagcgtg	900
	ctgaccgtgc tgcaccagga ctggtgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtgagcaac	960
	aagggcctgc ccagcagcat cgagaagacc atcagcaagg ccaaggcca gccagggag	1020
	cccaggtgt acacctgcc cccagccag gaggagatga ccaagaacca ggtgagcctg	1080
	acctgcctgg tgaagggtt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc	1140
	cagcccagga acaactacaa gaccacccc cccgtgctgg acagcgacgg cagcttctt	1200
	ctgtacagca ggtgaccgt ggacaagagc aggtggcagg agggcaacgt gttcagctgc	1260
	agcgtgatgc acgagccct gcacaaccac tacaccaga agagcctgag cctgagcctg	1320
	ggcaagtgat aa	1332

<210> 41

<211> 666

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 重链-CD19 scFv 氨基酸序列

<400> 41

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Thr Ala Tyr Asn Pro Ala Leu Lys
50 55 60

[0173] Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu
65 70 75 80

Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Asp Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

[0174]

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

[0175] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
450 455 460

Pro Val Thr Leu Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Tyr Asp Gly Asp
465 470 475 480

Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro
485 490 495

Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Ser Asn Leu Val
500 505 510

Ser Gly Ile Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
515 520 525

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Thr Ala Asp Glu Ser
530 535 540

Ser Ser Thr Ser Tyr Met Gln Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
545 550 555 560

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
565 570 575

Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr
580 585 590

Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val
595 600 605

Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Lys Phe Lys Gly Lys Ala
610 615 620

[0176]

Thr Leu Thr Ala Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Tyr Tyr
625 630 635 640

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Trp Gly Gln
645 650 655

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Lys
660 665

<210> 42

<211> 1974

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 重链-CD19 scFv 核苷酸序列

<400> 42

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgtggag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg

60

	agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcgactaca gctactgggt gaggcaggcc	120
	cccggccagg gcctggagtg gatgggcggc atcaacccca gcaacggcac cgcttacaac	180
	cccgcctga agagggtgac cctgaccacc gacagcagca ccaccaaccg ctacatggag	240
	ctgaagagcc tgcagttcga cgacaccgcc gtgtactact gcgccaggag ggaactacagg	300
	ttcgacatgg gcgacciggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagcgc cagcaccaag	360
	ggccccagcg tgttccccct ggccccctgc agcaggagca ccagcgagag caccgccgcc	420
	ctgggcctgc ttgtgaagga ctacttcccc gagccctga ccgtgagctg gaacagcggc	480
	gccctgacca gggcggtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc	540
	ctgagcagcg ttgtgaccgt gcccagcagc agcctgggca ccaagacctc cacctgcaac	600
	gtggaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaggg tggagagcaa gtacggcccc	660
	ccctgcccc cctgccccgc ccccgagttc ctgggcggcc ccagcgtgtt cctgttcccc	720
[0177]	cccaagccca aggacacctt gatgatcagc aggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg	780
	gacgtgagcc aggaggacc cagaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg	840
	cacaacgcca agaccaagcc cagggaggag cagtccaaca gcacctacag ggtggtgagc	900
	gtgtgaccg tgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtgagc	960
	aacaagggcc tgcccagcag catcgagaag accatcagca aggccaagg ccagcccagg	1020
	gagccccagg tgtacacctt gccccccagc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtgagc	1080
	ctgacctgcc ttgtgaaggg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac	1140
	ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cccccctgc tggacagcga cggcagcttc	1200
	ttcctgtaca gcaggtgac cgtggacaag agcaggtggc aggagggcaa cgtgttcagc	1260
	tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagacct gagcctgagc	1320
	ctgggcaagg acgtggtgat gaccagagc cccctgagcc tgcctgtgac cctgcagccc	1380
	gccagcatca gctgcaagta cgacggcgac agctacctga actggtacca ggccagcaac	1440

	ctggtgagcg gcatccccc ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccga cgccagcaac	1500
	ctggtgagcg gcatcccccg cticagcggc agcggcaccg acttcaccct gaagatcagc	1560
	cgcgtggagg ccgaggacct gggcgtgacc gccgacgaga gcagcagcac cagctacatg	1620
	cagctgggca ccaagctgga gatcaagcgc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc	1680
[0178]	ggcggcggcg gcagccaggg ccagctggtg cagagcggcg ccgaggtgaa gaagcccggc	1740
	gccacctgca ccgtgaccgg ctacgccttc agcagctact ggatgaactg ggtgtggccc	1800
	ggcgaaggcg acaccaacta caacaagttc aagggaagg ccacctgac cgccgtgggc	1860
	cgtactact acgccatgga ctactactac tacgccatgg actactgggg cctgggcacc	1920
	accgtgacct ggggccaggg caccaccgtg accgtgagca gcctgaagtg ataa	1974

<110> 顺昊细胞生物技术(天津)股份有限公司

<120> 抗PD1和CD19双特异性抗体及其应用

<130> SHUNHOBiMab-PD-1XCD19

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆3重链的氨基酸序列

<400> 1

```
Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Gly Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Arg Asp Tyr Phe Phe Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
           100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
           115          120
```

<210> 2

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆3重链可变区的核苷酸序列

<400> 2

```
cagggccagc tggcgcagag cggcggcgag gtgaagaagc cggcgccag cctgaggctg 60
gactgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactactaca tgcactgggt gaggcaggcc 120
cccgccaggg gcctggagtg gatgggcggc atctggtacg acggcagcaa gaggtactac 180
```

aacgagaagt tcaagaacag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
 atggagctga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc caggaggagc 300
 tacttcttcg actggtactt cgactactgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgagcagc 360
 <210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆3轻链可变区的氨基酸序列

<400> 3

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
			20					25						30	
Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
			35					40						45	
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
			50					55						60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser
65					70					75					80
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Ser
					85					90					95
Asn	Trp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100						105					110	

<210> 4

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆3轻链可变区的核苷酸序列

<400> 4

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gagggccagc 60
 atcagctgca gggccagcca gagcgtgagc accagcgget acagctacct ggctgtgtac 120
 cagcagaagc ccggccaggc cccaggetg ctgatctacg acgccagcta cctggagagc 180
 ggcatccccg ccaggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcacct gaagatcagc 240
 agcctggagc ccaggagcgt gggcgtgtac tactgccagc acagcagcaa ctggccccctg 300
 accttcggcc agggcaccaa gctggagatc aag 333

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆21重链可变区的氨基酸序列

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Thr Phe Ser Asp
 20 25 30
Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys
 50 55 60
Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80
Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
Ser Ser

<210> 6

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆21重链可变区的核苷酸序列

<400> 6

caggtgcagc tgggtggagag cggcgccgag gtggtgcagc ccggcaggag cctgaggctg 60
gactgcaagg ccagcggcta catcaccttc agcgactact acatgtactg ggtgaggcag 120
gccccggcc acggcctgga gtggatcggc tacatcaacc ccageaacgg cggcaccaac 180
ttcaacgaga agttcaaggg caggttcacc atcagcaggg acaacagcaa gaacaccctg 240
ttcctgcaga tgaacagcct gcagttcgac gacaccgccg tgtactactg cgccaccaac 300
gacgactact ggggccaggg caccctggtg accgtgagca gc 342

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆21轻链可变区的氨基酸序列

<400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Asp Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆21轻链可变区的核苷酸序列

<400> 8

gacatcgtga tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gagggccagc 60
 atcagctgca gggccagcaa gggcgtgagc agctacctgc actggtacca gcagaagccc 120
 ggccagagcc ccaggctgct gatctacctg gccagctacc tggagagcgg cgtgccccgac 180
 aggttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga agatcagcag ggtggaggcc 240
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agcagggacc tgccctacac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆77重链可变区的氨基酸序列

<400> 9

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ser Trp Asn
 20 25 30

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Ile His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
 35 40 45
 Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ala Val Thr
 50 55 60
 Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Phe Gly
 85 90 95
 Ser Thr Ala Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 345

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆77重链可变区的核苷酸序列

<400> 10

cagggccagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccac ctgcaccgtg 60
 accggctaca gcataccag cgactacagc tggaactgga tcaggcaggc ccccatccac 120
 ggccctggagt ggatcggcta catcaactac gccggcagca ccagctacaa cccagcctg 180
 gaggccgtga ccatcaccgc cgacaagagc accagcaccg cctacatgga gctgagcagc 240
 ctgaggagcgc aggacaccgc cgtgtactac tgcgccaggt ggttcggcag caccgcctgg 300
 tacatcgacg tgtggggcca gggcaccacc gtgaccgtga gcagc 345

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆77轻链可变区的氨基酸序列

<400> 11

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ala Leu Leu His Ser Asp
 20 25 30
 Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Leu Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ile Pro Asp

50	55	60	
Arg Ile Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val			
65	70	75	80
Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly Val His Ile			
	85	90	95
Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 12

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆77轻链可变区的核苷酸序列

<400> 12

gacgtggtga tgaccagag cccctgagc ctgcccgtga ccctgcagcc cgccagcatc 60
 agctgcaaga gcagccaggc cctgctgcac agcgacggca agacctacct gtactggtac 120
 ctgcagaagc ccggccagag cccaagctg ctgatctacg agctgagcag caggttcagc 180
 ggcatccccg acaggatcac cggcagcggc accgacttca ccctgaagat cagcagggtg 240
 gaggccgagg acctgggcgt gtacttctgc ttccagggcg tgcacatccc ctacagcttc 300
 ggccagggca ccaagctgga gatcaag 327

<210> 13

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆16重链可变区的氨基酸序列

<400> 13

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser	
1	5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr	
20	25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35	40 45
Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe	
50	55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65	70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys	
85	90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 115 120

<210> 14

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆16重链可变区的核苷酸序列

<400> 14

caagttcagt tattggaatc tgggtctgag cttgtcgcgc ctggctcctc agtaaaaatt 60
 tcgtgtaagg ccagtggata tgcattttagc tcttactgga tgaattgggt gaaacaacgc 120
 cccgggcagg gtctcgaatg gatcggccaa atatggccag gagatgggga cactaactat 180
 aatggtaagt tcaaaggcaa ggcgacccta acagctgatg agtcctcacc gacggcctac 240
 atgcagctga gtagcttacg atctgaagac tccgcagttt attcatgcgc gcggagagag 300
 actaccacag tcggaaggta ctattacgct atggattatt gggggcaagg tacgactgta 360
 acc 363

<210> 15

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆16轻链可变区的氨基酸序列

<400> 15

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Arg Ser

<210> 16

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆16轻链可变区的核苷酸序列

<400> 16

```
gaattagttt tgactcaatc tcttgettec cttgccgtct cactcggtea gcgtgcaacc 60
atttcgtgta aagcgagtca aagcgtagat tatgacggcg attettacct aaattggtat 120
cagcaaatcc ccggacagcc accgaagctg ttaatatacg acgttccaa cttgggtgtca 180
gggattcctc cccgcttttc gggtagtgge agcggaacag atttcacgct taatatccat 240
ccagttgaga aagtcgacgc cgcaacttat cactgccaac agtctaccga agatccgtgg 300
acatttgggg gtggcacgaa gctcgagata aaacgacggt cc 342
```

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆75重链可变区的氨基酸序列

<400> 17

```
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ser
1          5          10          15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
          50          55          60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
65          70          75          80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys
          85          90          95
Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
          100          105          110
Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr
          115          120
```

<210> 18

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆75重链可变区的核苷酸序列

<400> 18

```
gaattagttt tgactcaatc tcctgcttcc cttgccgtct cactcgggtca gcgtgcaacc 60
atttcgtgta aagcgagtca aagcgtagat tatgacggcg attcttacct aaattggtat 120
cagcaaatcc ccggacagcc accgaagctg ttaatatagc acgcttccaa cttgggtgtca 180
gggattcctc cccgcttttc gggtagtggc agcggaacag atttcacgct taatatccat 240
ccagttgaga aagtcgacgc cgcaacttat cactgccaac agtctaccga agatccgtgg 300
acatttgggg gtggcacgaa gctcgagata aaacgacggt cc 342
```

<210> 19

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆75轻链可变区的氨基酸序列

<400> 19

```
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly
1          5          10          15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
          20          25          30
Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
          35          40          45
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
          50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65          70          75          80
Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Leu Leu Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
          85          90          95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
```

Arg Ser

<210> 20

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆75轻链可变区的核苷酸序列

<400> 20

gaattagttt tgactcaatc tcctgctgcc cttgcagtct ccctcggtea gcgtgcgacc 60
atttcatgtg ctgcctcgca aagtgtagat tatgacggcg atagctacct aaattggtat 120
cagcaaatcc ccggacagcc accgaaactg ttaatatacg acgcatctaa cttggtgtcc 180
gggattcctc cccgcttttc aggttcgggc agtggaaacag atttcacgct taatatccat 240
ccagttgaga aggtcgacgc gctcctatat cactgccaac agagcactga agatccgtgg 300
accctttgggg gtggcacaaa actggagata aagcgacggt ct 342

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆81重链可变区的氨基酸序列

<400> 21

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp
			20					25					30		
Tyr	Ser	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40					45				
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Thr	Ala	Tyr	Asn	Pro	Ala	Leu	Lys
	50					55				60					
Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
65				70					75					80	
Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			85					90					95		
Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
		100					105						110		
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 22

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆81重链可变区的核苷酸序列

<400> 22

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgtggag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcgactaca gctactgggt gaggcaggcc 120

cccgccagg gcctggagtg gatgggcggc atcaaccca gcaacggcac cgcctacaac 180
 ccgcctga agagggtagac cctgaccacc gacagcagca ccaccaccgc ctacatggag 240
 ctgaagagcc tgcagttcga cgacaccgcc gtgtactact gcgccaggag ggactacagg 300
 ttcgacatgg gcgacctggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagc 348

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆81轻链可变区的氨基酸序列

<400> 23

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Asp	Gly
			20					25					30		
Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg
		35				40						45			
Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg
	50					55					60				
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65				70				75						80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro
			85					90						95	
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 24

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆81轻链可变区的核苷酸序列

<400> 24

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gagggccacc 60
 ctgagctgca gggccagcaa gggcgtgagc gacggcaaga cctacctgta ctggtaccag 120
 cagaagcccc gccaggcccc caggetgctg atctacgagg ccagctacct ggagagcggc 180
 gtgcccgcga ggttcagcgg cagcggeacc gaattcacc tgaccatcag cagcctggag 240
 cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cacagcaggg acctgccta caccttcggc 300
 ggcggcacca aggtggagat caag 324

<210> 25

<211> 91

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆22重链可变区的氨基酸序列

<400> 25

```
Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp
          20           25           30
Val Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Lys Phe Lys Gly Lys
          35           40           45
Ala Thr Leu Thr Ala Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Tyr
          50           55           60
Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Trp Gly
65           70           75           80
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Lys
          85           90
```

<210> 26

<211> 282

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆22重链可变区的核苷酸序列

<400> 26

```
caaggtcagt tagttcaatc tggcgctgaa gtcaaaaagc ctggagccac ttgtaccgta 60
acagggtatg cattttcctc atactggatg aattgggtgt ggcccgggtga tggcgacacg 120
aactataata aattcaaggg aaaagcgact ttgaccgctg ttgggcgtta ctattacgcc 180
atggattatt actattacgc aatggactat tgggggtcttg gcacaacggt cacttaatgg 240
ggacagggga ccacagtaac ggtgtcgagt ctcaagtagt ga 282
```

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆22轻链可变区的氨基酸序列

<400> 27

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gln
1           5           10           15
```

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp
 20 25 30
 Tyr Gln Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Leu Gly Val Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
 85 90 95
 Met Gln Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 28

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆22轻链可变区的核苷酸序列

<400> 28

gatgttgatca tgactcaatc tcctttatcc ttgcccgtaa cccttcagcc agcttcaatt 60
 tcgtgtaaat atgacggatga tagttacctc aattggatc aagccagcaa cctagtgtct 120
 ggcatcccgcc ctcgtttttc cggatcaggg tcgggtacag acgcaagtaa tctggtttagc 180
 ggcatacccc gcttctctgg atccgggacg gattttactt taaagatttc acgagtcgaa 240
 gcggaggact tgggtgtaac cgctgatgaa tcgagtagca catcttacat gcagcttggc 300
 acgaaactcg agatcaagcg g 321

<210> 29

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗PD-1特异性抗体的重链的氨基酸序列

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ser Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Thr Ala Tyr Asn Pro Ala Leu Lys

50	55	60
Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu		
65	70	75
Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
85	90	95
Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Asp Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro		
210	215	220
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
225	230	235
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
245	250	255
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn		
260	265	270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
275	280	285
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
290	295	300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
305	310	315
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
325	330	335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu		
340	345	350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
355	360	365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 30

<211> 1335

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗PD-1特异性抗体的重链的核苷酸编码序列

<400> 30

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgtggag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcgactaca gctactgggt gaggcaggcc 120
 cccggccagg gcctggagtg gatgggcggc atcaaccca gcaacggcac cgcctacaac 180
 cccgccctga agaggggtgac cctgaccacc gacagcagca ccaccaccgc ctacatggag 240
 ctgaagagcc tgcagttcga cgacaccgcc gtgtactact gcgccaggag ggactacagg 300
 ttgcacatgg gcgacctggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagcgc cagcaccaag 360
 ggccccagcg tgttccccct ggccccctgc agcaggagca ccagcgagag caccgccgcc 420
 ctgggctgcc tgggtgaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggc 480
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc 540
 ctgagcagcg tgggtgaccgt gcccagcagc agcctgggca ccaagaccta cacctgcaac 600
 gtggaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaggg tggagagcaa gtacggcccc 660
 ccctgcccc cctgccccgc ccccagttc ctgggcggcc ccagcgtgtt cctgttcccc 720
 cccaagccca aggacaccct gatgatcagc aggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg 780
 gacgtgagcc aggaggaccc cgaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840
 cacaacgcca agaccaagcc cagggaggag cagttcaaca gcacctacag ggtggtgagc 900
 gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtgagc 960
 aacaagggcc tgcccagcag catcgagaag accatcagca aggccaaggg ccagcccagg 1020
 gagccccagg tgtacaccct gccccccagc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtgagc 1080
 ctgacctgcc tgggtgaaggg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac 1140
 ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cccccctgc tggacagcga cggcagcttc 1200
 ttctgtaca gcaggctgac cgtggacaag agcaggtggc aggagggcaa cgtgttcagc 1260
 tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagagcct gagcctgagc 1320

ctgggcaagt gataa 1335

<210> 31

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗PD-1特异性抗体的轻链的氨基酸序列

<400> 31

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Asp	Gly
			20					25					30		
Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg
		35					40					45			
Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg
	50					55					60				
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro
			85						90				95		
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
			100					105					110		
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
		115					120					125			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
		130				135					140				
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145					150					155				160	
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
			165						170				175		
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
		180						185					190		
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
		195					200					205			
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
		210				215									

<210> 32

<211> 651

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗PD-1特异性抗体的轻链的核苷酸编码序列

<400> 32

```

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gcgcgccacc 60
ctgagctgcc gcgccagcaa gggcgtgagc gacggcaaga cctacctgta ctggtaccag 120
cagaagccccg gccaggcccc ccgcctgctg atctacgagg ccagctacct ggagagcggc 180
gtgccccggc gcttcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggag 240
cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cacagccgcg acctgcccta caccttcggc 300
ggcggcacca aggtggagat caagcgcacc gtggccgccc ccagcgtgtt catcttcccc 360
cccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 420
tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaa gtggacaacg cctgcagag cggcaacagc 480
caggagagcg tgaccgagca ggacagcaag gacagacct acagcctgag cagcacctg 540
accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaggt gaccaccag 600
ggcctgagca gccccgtgac caagagcttc aaccgcggcg agtgctgata a 651

```

<210> 33

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 scFv-Fc 融合蛋白氨基酸序列

<400> 33

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Asp Gly
          20          25          30
Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
          35          40          45
Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
          50          55          60
Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65          70          75          80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro
          85          90          95
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
          100         105         110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
          115         120         125
Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser

```

130	135	140
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Tyr Trp Val		
145	150	155
Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro		
165	170	175
Ser Asn Gly Thr Ala Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Arg Val Thr Leu Thr		
180	185	190
Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln		
195	200	205
Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe		
210	215	220
Asp Met Gly Asp Leu Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu		
225	230	235
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu		
245	250	255
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
260	265	270
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
275	280	285
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
290	295	300
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
305	310	315
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
325	330	335
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser		
340	345	350
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
355	360	365
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
370	375	380
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
385	390	395
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
405	410	415
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		
420	425	430
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
435	440	445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Gly Lys
 465

<210> 34

<211> 1410

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1 scFv-Fc 融合蛋白核酸序列

<400> 34

```

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gagggccacc 60
ctgagctgca gggccagcaa gggcgtgagc gacggcaaga cctacctgta ctggtaccag 120
cagaagcccc gccaggcccc caggetgctg atctacgagg ccagctacct ggagagcggc 180
gtgcccccca ggttcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggag 240
cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cacagcaggg acctgcccta caccttcggc 300
ggcggcacca aggtggagat caagggcggc ggcggcagcg gcggcggcgg cagcggcggc 360
ggcggcagcc aggtgcagct ggtgcagagc ggcgtggagg tgaagaagcc cggcgccagc 420
gtgaaggtga gctgcaaggc cagcggctac accttcacca gcgactacag ctactgggtg 480
aggcaggccc ccggccaggg cctggagtgg atgggcggca tcaaccccag caacggcacc 540
gcctacaacc ccgcccgtaa gaggtgacc ctgaccaccg acagcagcac caccaccgcc 600
tacatggagc tgaagagcct gcagttcgac gacaccgccg tgtactactg cgccaggagg 660
gactacaggt tcgacatggg cgacctgggc cagggcacca ccgtgaccgt gagcagcgag 720
agcaagtacg gccccccctg cccccctgc cccgcccccg agttcctggg cggccccagc 780
gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac acctgatga tcagcaggac ccccgaggtg 840
acctgcgtgg tgggtggacgt gagccaggag gaccccgagg tgcagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccaggg aggagcagtt caacagcacc 960
tacagggtgg tgagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020
aagtgcgaagg tgagcaacaa gggcctgccc agcagcatcg agaagaccat cagcaaggcc 1080
aagggccagc ccaggagacc ccaggtgtac acctgcccc ccagccagga ggagatgacc 1140
aagaaccagg tgagcctgac ctgcctggtg aagggtttct accccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc cgtgctggac 1260
agcgacggca gcttcttcct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1320
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag 1380
agcctgagcc tgagcctggg caagtataa 1410

```

<210> 35

<211> 418

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD19特异性抗体的重链的氨基酸序列

<400> 35

Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	20	25	30	
Val	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	35	40	45	
Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Val	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Tyr	50	55	60	
Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Trp	Gly	65	70	75	80
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	85	90	95	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	100	105	110	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	115	120	125	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	130	135	140	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	165	170	175	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	180	185	190	
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	195	200	205	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	210	215	220	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	225	230	235	240
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	245	250	255	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	260	265	270	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	275	280	285	

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu			
290	295	300	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
305	310	315	320
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	325	330	335
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	340	345	350
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	355	360	365
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp			
	370	375	380
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
385	390	395	400
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu			
	405	410	415

Gly Lys

<210> 36

<211> 1257

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD19特异性抗体的重链的核苷酸编码序列

<400> 36

```

cagggccagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccac ctgcaccgtg 60
accggctacg ccttcagcag ctactggatg aactgggtgt ggcccggcga cggcgacacc 120
aactacaaca agttcaaggg caaggccacc ctgaccgccg tgggcccgcta ctactacgcc 180
atggactact actactacgc catggactac tggggcctgg gcaccaccgt gacctggggc 240
cagggcacca ccgtgaccgt gagcagcctg aagagcacca agggccccag cgtgttcccc 300
ctggccccct gcagcaggag caccagcgag agcaccgccg ccctgggctg cctgggtgaag 360
gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc tggaacagcg gcgccctgac cagcggcgtg 420
cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggccgtgtaca gcctgagcag cgtggtgacc 480
gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc tacacctgca acgtggacca caagcccagc 540
aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc aagtacggcc cccctgccc cccctgccc 600
gcccccgagt tcctgggcgg cccagcgtg ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc 660
ctgatgatca gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaggac 720
cccaggtgc agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag 780
cccagggagg agcagttcaa cagcacctac aggggtgtga gcgtgctgac cgtgctgcac 840
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtga gcaacaagg cctgcccagc 900

```

agcatcgaga agaccatcag caaggccaag ggccagccca gggagcccca ggtgtacacc 960
 ctgcccccca gccaggagga gatgaccaag aaccaggtga gcctgacctg cctggtgaag 1020
 ggctttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac 1080
 tacaagacca cccccccgt gctggacagc gacggcagct tcttcctgta cagcaggctg 1140
 accgtggaca agagcaggtg gcaggagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag 1200
 gccctgcaca accactacac ccagaagagc ctgagcctga gcctgggcaa gtgataa 1257

<210> 37

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD19特异性抗体的轻链的氨基酸序列

<400> 37

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gln
1				5				10						15	
Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp
			20					25					30		
Tyr	Gln	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly
		35					40					45			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Arg
	50					55					60				
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu
65				70					75					80	
Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Tyr
			85						90					95	
Met	Gln	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro
			100						105					110	
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr
		115						120						125	
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
		130					135					140			
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
145					150					155				160	
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
			165						170					175	
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
			180						185					190	
Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe
		195						200						205	

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 38

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD19特异性抗体的轻链的核苷酸编码序列

<400> 38

```

gacgtggtga tgacccagag cccctgagc ctgcccgtga ccctgcagcc cgccagcatc 60
agctgcaagt acgacggcga cagctacctg aactggtacc aggccagcaa cctggtgagc 120
ggcatcccc cccgcttcag cggcagcggc agcggcaccg acgccagcaa cctggtgagc 180
ggcatcccc gcttcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaagatcag ccgcgtggag 240
gccgaggacc tgggcgtgac cgccgacgag agcagcagca ccagctacat gcagctgggc 300
accaagctgg agatcaagcg caccgtggcc gccccagcg tgttcatttt cccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agagcggcaa cagccaggag 480
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
agcagccccg tgaccaagag cttcaaccgc ggcgagtgtc gataa 645

```

<210> 39

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19 scFv-Fc 融合蛋白氨基酸序列

<400> 39

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gln
1           5           10           15
Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp
          20           25           30
Tyr Gln Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
          35           40           45
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Arg
          50           55           60
Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
65           70           75           80
Ala Glu Asp Leu Gly Val Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
          85           90           95

```

Met	Gln	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
100				105				110							
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Gln
115				120				125							
Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly
130				135				140							
Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly
145				150				155				160			
Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Val
165				170				175							
Gly	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
180				185				190							
Trp	Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
195				200				205							
Val	Ser	Ser	Leu	Lys	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys
210				215				220							
Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
225				230				235				240			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
245				250				255							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp
260				265				270							
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
275				280				285							
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
290				295				300							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305				310				315				320			
Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
325				330				335							
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu
340				345				350							
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
355				360				365							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
370				375				380							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385				390				395				400			
Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn

	405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
	420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	435	440	
<210> 40			
<211> 1332			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗-CD19 scFv-Fc 融合蛋白核苷酸序列			
<400> 40			
gacgtggtga tgacccagag cccctgagc ctgcccgtga ccctgcagcc cgccagcatc 60			
agctgcaagt acgacggcga cagctacctg aactggtacc aggccagcaa cctggtgagc 120			
ggcatccccc ccgcttcag cggcagcggc agcggcaccg acgccagcaa cctggtgagc 180			
ggcatccccc gcttcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaagatcag ccgcgtggag 240			
gccgaggacc tgggcgtgac cgccgacgag agcagcagca ccagctacat gcagctgggc 300			
accaagctgg agatcaagcg cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc 360			
ggcagccagg gccagctggt gcagagcggc gccgaggtga agaagcccgg cgccacctgc 420			
accgtgaccg gctacgcctt cagcagctac tggatgaact ggggtgtggc cggcgacggc 480			
gacaccaact acaacaagtt caagggcaag gccaccctga ccgccgtggg ccgctactac 540			
tacgccatgg actactacta ctacgccatg gactactggg gcctgggcac caccgtgacc 600			
tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc agcctgaagg agagcaagta cggccccccc 660			
tgccccccct gccccgcccc cgagttcctg ggcgggccca gcgtgttcct gttccccccc 720			
aagcccaagg acacctgat gatcagcagg acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac 780			
gtgagccagg aggaccccga ggtgcagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac 840			
aacgccaaga ccaagcccag ggaggagcag ttcaacagca cctacagggt ggtgagcgtg 900			
ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgagcaac 960			
aagggcctgc ccagcagcat cgagaagacc atcagcaagg ccaagggcca gcccaggag 1020			
ccccaggtgt acacctgcc cccagccag gaggagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1080			
acctgcctgg tgaagggtt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc 1140			
cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc cccgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc 1200			
ctgtacagca ggctgaccgt ggacaagagc aggtggcagg agggcaacgt gttcagctgc 1260			
agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacaccaga agagcctgag cctgagcctg 1320			
ggcaagtgat aa 1332			
<210> 41			
<211> 666			
<212> PRT			
<213> 人工序列			

<220>

<223> 抗-PD-1重链-CD19 scFv氨基酸序列

<400> 41

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp
				20				25						30	
Tyr	Ser	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
				35				40						45	
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Thr	Ala	Tyr	Asn	Pro	Ala	Leu	Lys
				50				55						60	
Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
65						70				75					80
Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
				85						90					95
Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
				100						105					110
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
				115						120					125
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
				130						135					140
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145						150						155			160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165						170					175
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				180						185					190
Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
				195				200							205
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro
				210				215							220
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
225						230					235				240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245						250					255
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
				260						265					270
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
				275						280					285

Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	290	295	300
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	305	310	315
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	325	330	335
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	340	345	350
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	355	360	365
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	370	375	380
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	385	390	395
Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	405	410	415
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	420	425	430
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	435	440	445
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	450	455	460
Pro	Val	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Tyr	Asp	Gly	Asp	465	470	475
Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	485	490	495
Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	500	505	510
Ser	Gly	Ile	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	515	520	525
Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	530	535	540
Ser	Ser	Thr	Ser	Tyr	Met	Gln	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	545	550	555
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	565	570	575
Gly	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Thr	580	585	590
Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val			

595	600	605
Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Lys Phe Lys Gly Lys Ala		
610	615	620
Thr Leu Thr Ala Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Tyr Tyr		
625	630	635
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Val Thr Trp Gly Gln		
645	650	655
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Lys		
660	665	

<210> 42

<211> 1974

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-PD-1重链-CD19 scFv核苷酸序列

<400> 42

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgtggag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcgactaca gctactgggt gaggcaggcc 120
cccggccagg gcctggagtg gatgggcggc atcaacccca gcaacggcac cgcctacaac 180
cccgccctga agaggggtgac cctgaccacc gacagcagca ccaccaccgc ctacatggag 240
ctgaagagcc tgcagttcga cgacaccgcc gtgtactact gcgccaggag ggactacagg 300
ttcgacatgg gcgacctggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagcgc cagcaccaag 360
ggccccagcg tgttccccct ggccccctgc agcaggagca ccagcgagag caccgcccgc 420
ctgggctgcc tgggtgaagga ctacttcccc gagcccgtaga ccgtgagctg gaacagcggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc 540
ctgagcagcg tggtgaccgt gcccagcagc agcctgggca ccaagaccta cacctgcaac 600
gtggaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaggg tggagagcaa gtacggcccc 660
ccctgcccc cctgccccgc ccccagttc ctgggcgggc ccagcgtgtt cctgttcccc 720
cccaagccca aggacaccct gatgatcagc aggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg 780
gacgtgagcc aggaggaccc cgaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 840
cacaacgcca agaccaagcc cagggaggag cagttcaaca gcacctacag ggtggtgagc 900
gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtgagc 960
aacaagggcc tgcccagcag catcgagaag accatcagca aggccaagg ccagcccagg 1020
gagccccagg tgtacaccct gccccccagc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtgagc 1080
ctgacctgcc tgggtgaaggg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac 1140
ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cccccctgc tggacagcga cggcagcttc 1200
ttcctgtaca gcaggctgac cgtggacaag agcaggtggc aggagggcaa cgtgttcagc 1260
tgcagcgtga tgcacgagc cctgcacaac cactacaccc agaagagcct gacgctgagc 1320
ctgggcaagg acgtggtgat gaccagagc cccctgagcc tgcccgtgac cctgcagccc 1380

gccagcatca gctgcaagta cgacggcgac agctacctga actggtacca ggccagcaac 1440
ctggtgagcg gcatcccccc ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccga cgccagcaac 1500
ctggtgagcg gcatcccccg cttcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaagatcagc 1560
cgcggtggagg ccgaggacct gggcgtgacc gccgacgaga gcagcagcac cagctacatg 1620
cagctgggca ccaagctgga gatcaagcgc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc 1680
ggcggcggcg gcagccaggg ccagctggtg cagagcggcg ccgaggtgaa gaagcccggc 1740
gccacctgca ccgtgaccgg ctacgccttc agcagctact ggatgaactg ggtgtggccc 1800
ggcgacggcg acaccaacta caacaagttc aagggcaagg ccaccctgac cgccgtgggc 1860
cgctactact acgccatgga ctactactac tacgccatgg actactgggg cctgggcacc 1920
accgtgacct ggggccaggg caccaccgtg accgtgagca gcctgaagtg ataa 1974

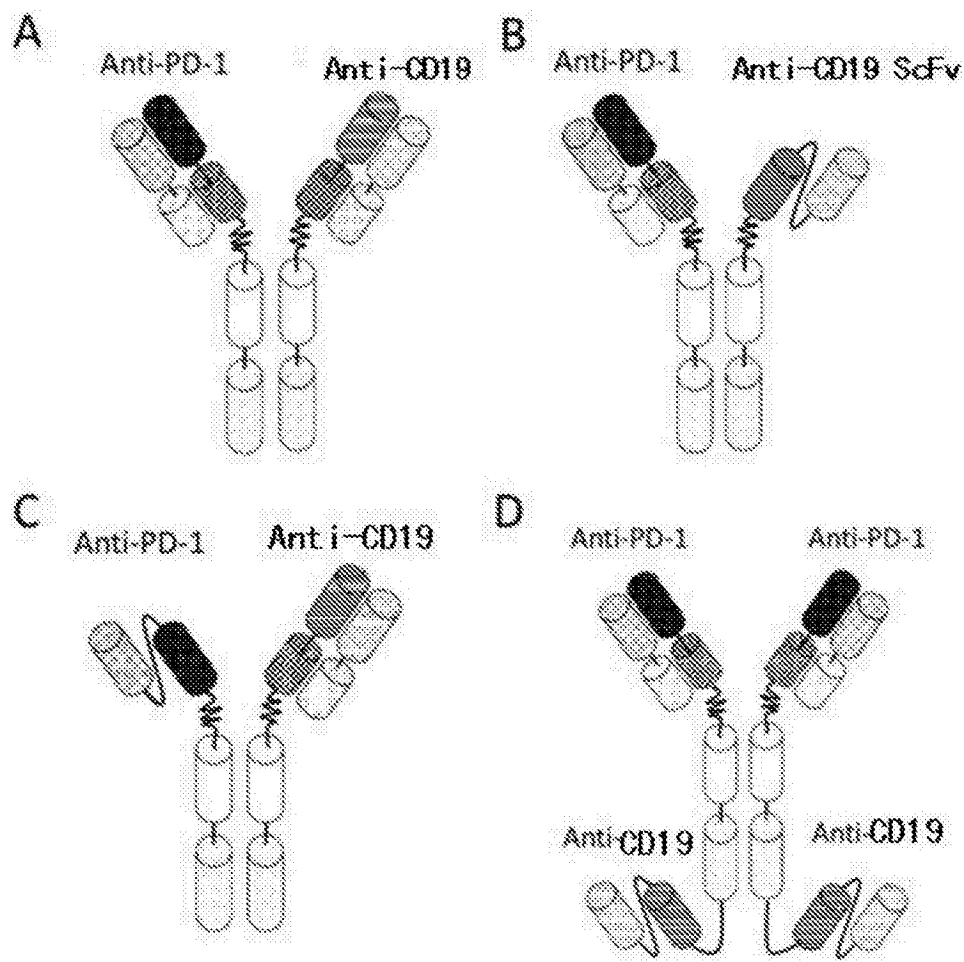


图1

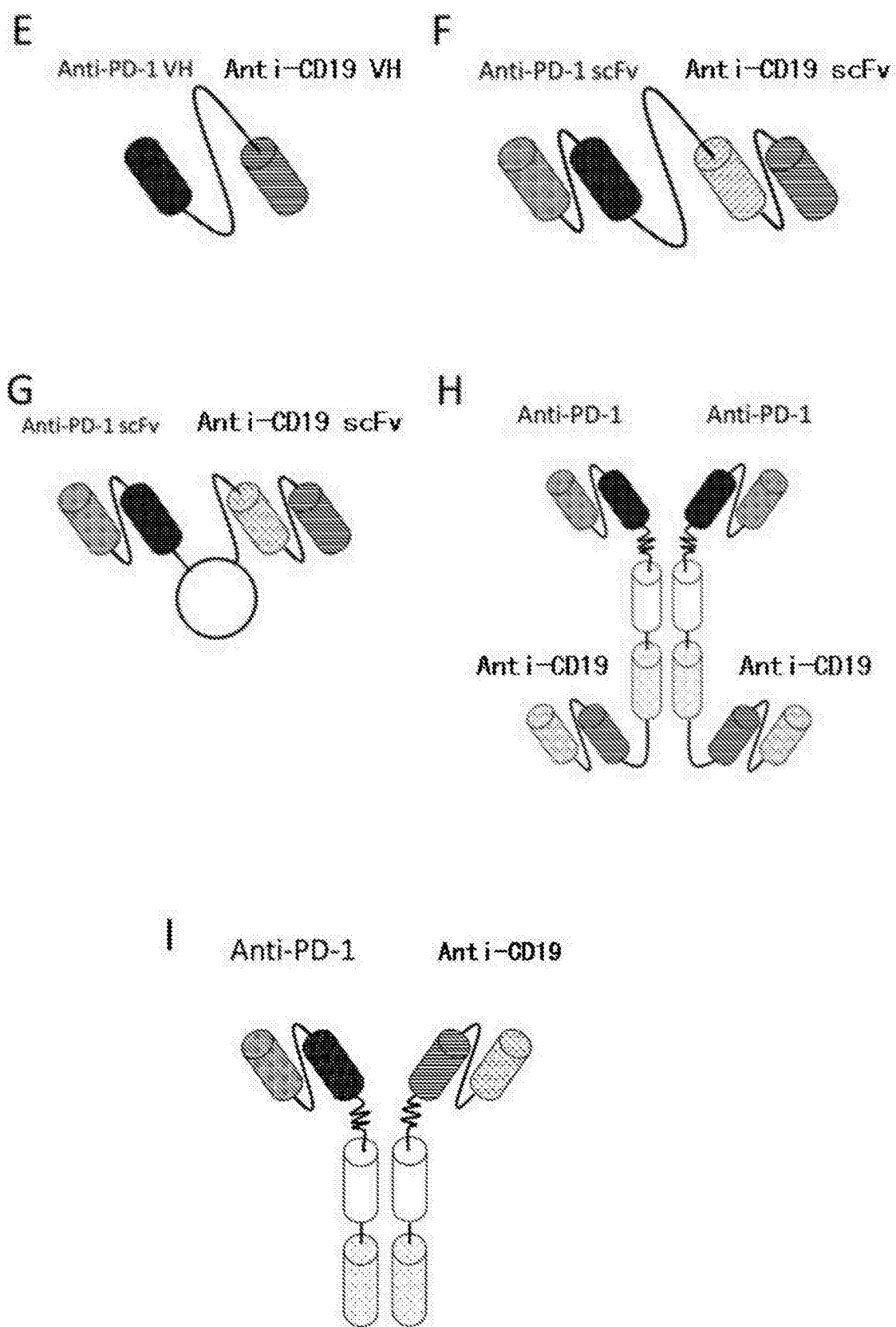


图2

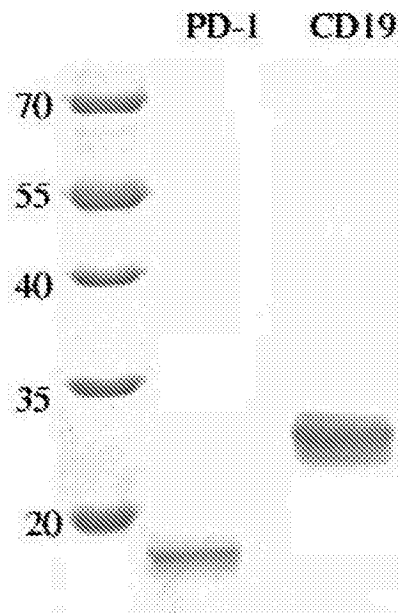


图3

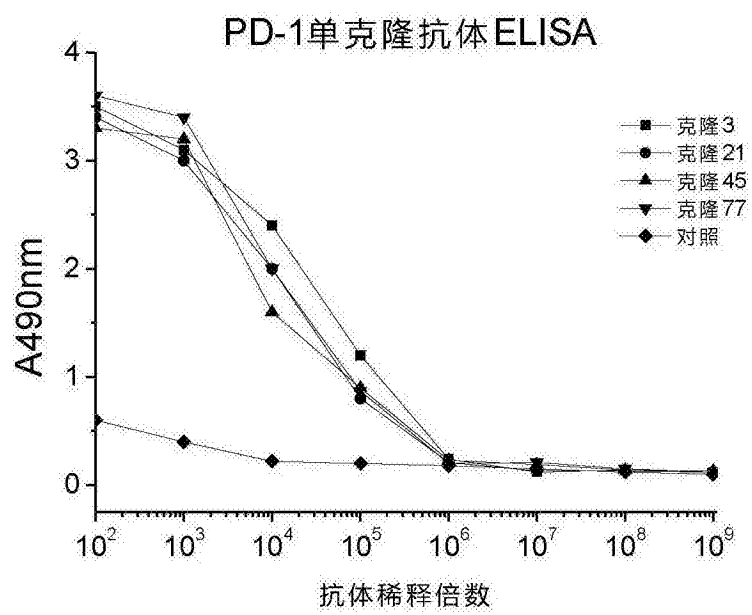


图4

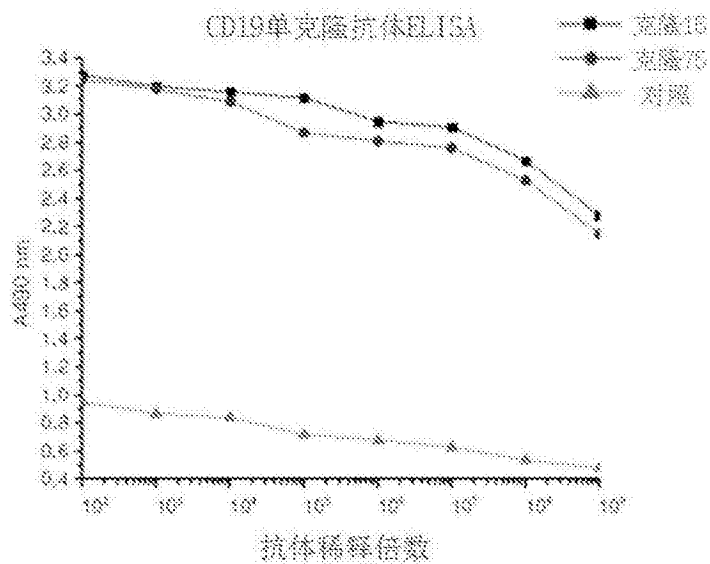


图5

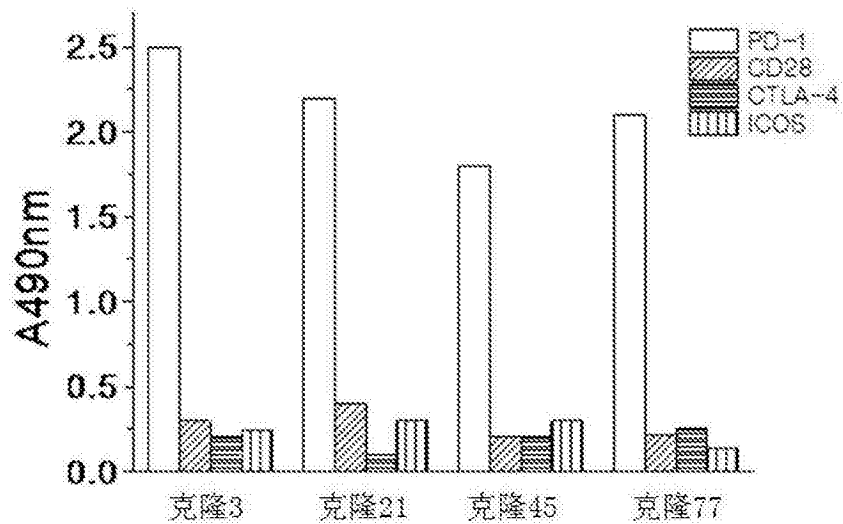


图6

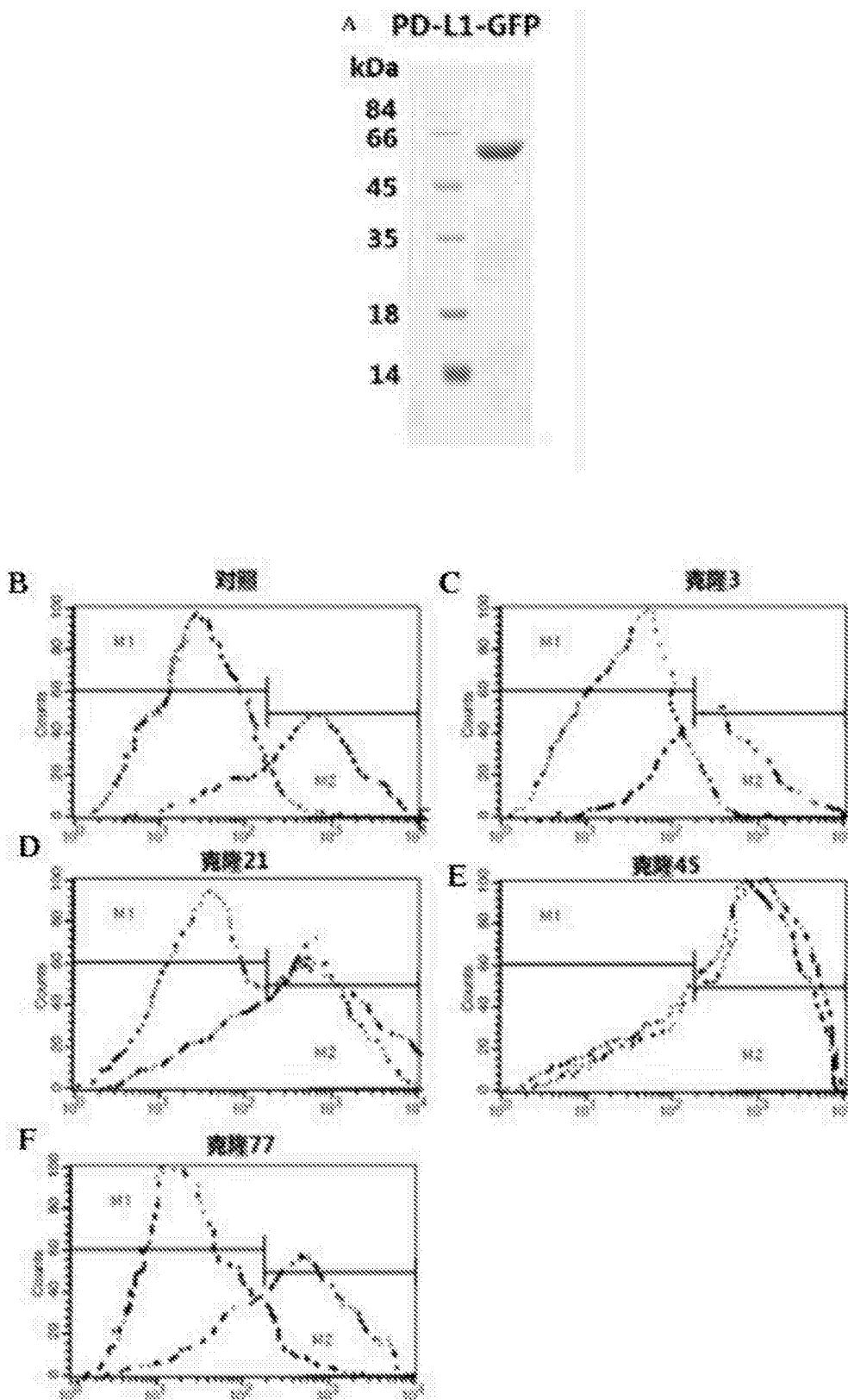


图7

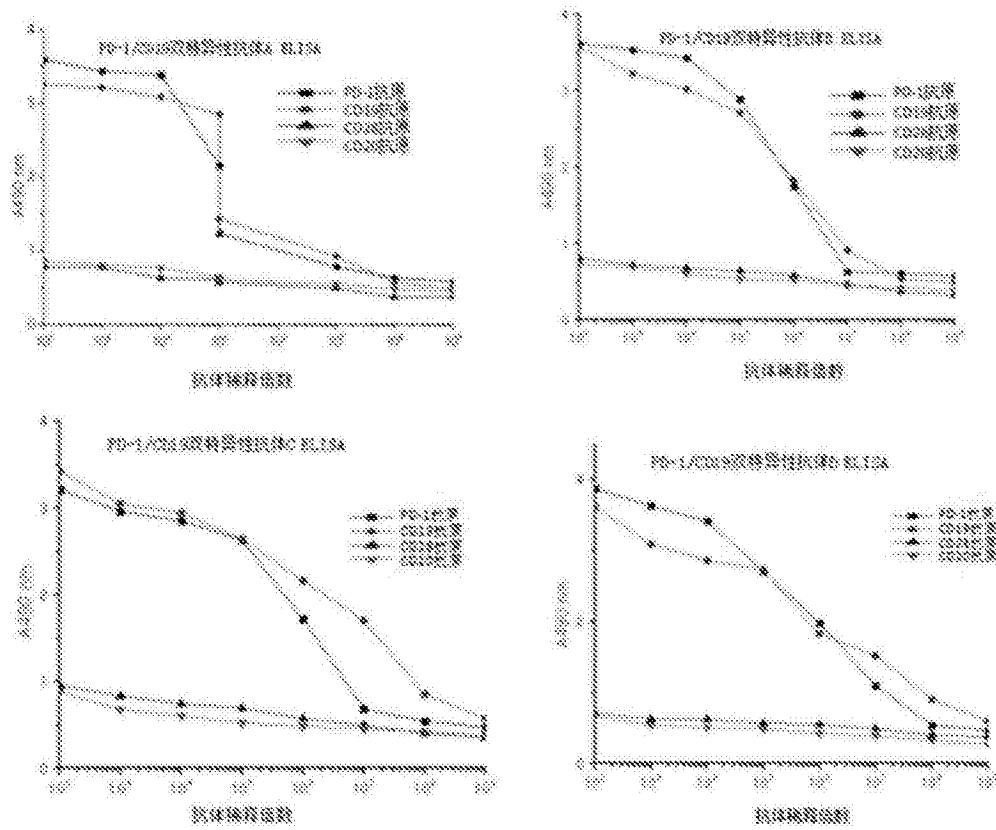


图10

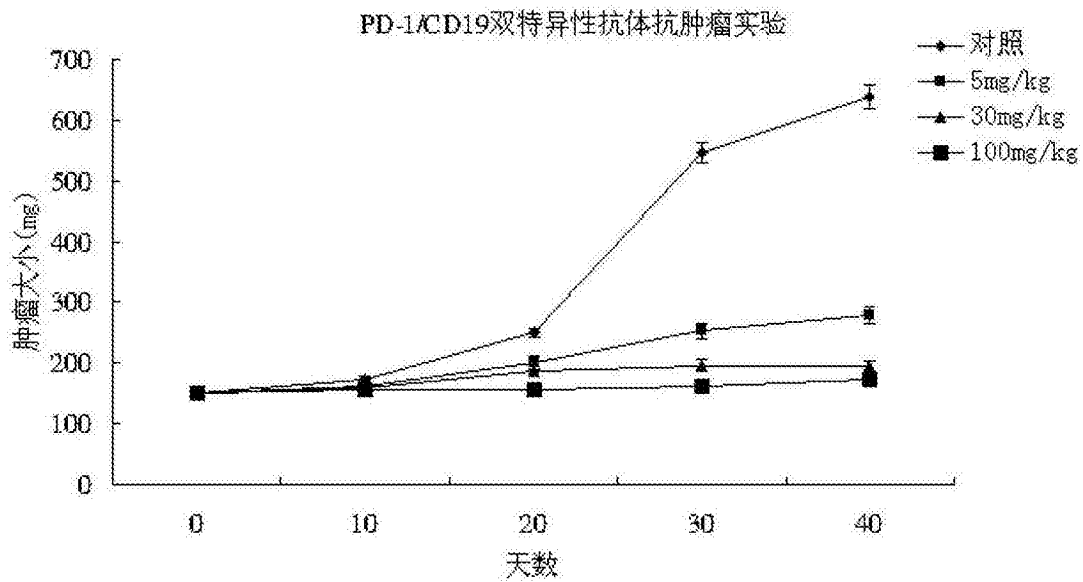


图11A

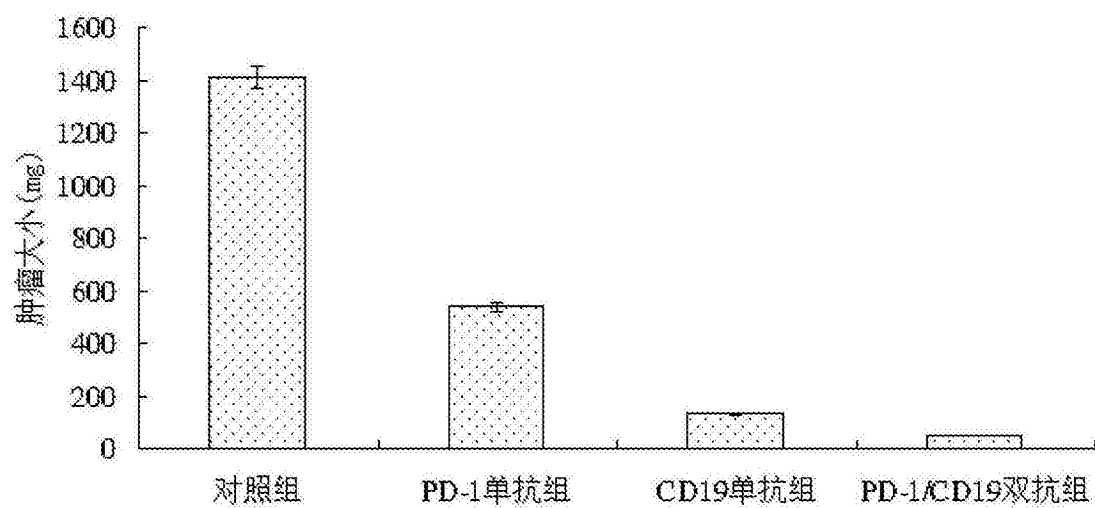


图11B