(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120035448 A
(43)申请公布日 2025.05.23

(21)申请号 202380067319.3
(22)申请日 2023.07.25
(30)优先权数据
63/391,967 2022.07.25 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/070964 2023.07.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/026319 EN 2024.02.01
(71)申请人 维罗尼斯生物治疗药物公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 全国儿童医院研究所
(72)发明人 T·P·克里普 L·吉尤莱
B·卡斯帕尔 A·卡斯帕尔
S·瓦尔马 J·加迪尼尔·斯科特
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 徐志明
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

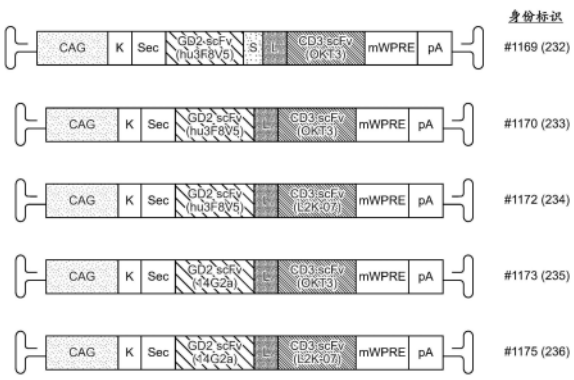
权利要求书3页 说明书119页 附图70页

(54)发明名称

腺相关病毒载体及其用于降低转移的风险、治疗和预防转移的方法

(57)摘要

本公开提供表达结合GD2和CD3的双特异性融合蛋白的重组腺相关病毒(rAAV)载体,以及使用其降低转移的风险、预防或治疗转移的方法。本公开还提供了用于表达双特异性融合蛋白的rAAV载体。



CN 120035448 A

1.一种重组腺相关病毒(rAAV)载体,其从5'至3'包含:

(a)5'AAV末端反向重复序列(ITR);

(b)启动子;

(c)编码双特异性融合蛋白的转基因,所述双特异性融合蛋白包含:

(i)GD2结合位点,其包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),所述轻链可变区(VL)包含分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75或分别为SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81的互补决定区1(CDR1)、互补决定区2(CDR2)和互补决定区3(CDR3)序列;和所述重链可变区包含分别为SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72,分别为SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的CDR1、CDR2和CDR3;

(ii)接头肽,和

(iii)CD3结合位点,其包含抗CD3抗体的VH和VL;

(d)修饰的RNA稳定性调控元件(MRE),和

(e)3'AAVITR。

2.如权利要求1所述的rAAV载体,其中所述启动子选自鸡β-肌动蛋白启动子、延伸因子1α(EF1α)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子或CAG启动子。

3.如权利要求1-2任一项所述的rAAV载体,其中所述启动子是CAG启动子。

4.如权利要求1-3任一项所述的rAAV载体,其中所述启动子包含与SEQ ID NO:66至少95%相同的序列。

5.如权利要求1-4任一项所述的rAAV载体,其中所述抗GD2抗体VL和VH包含分别与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1至少95%相同的序列。

6.如权利要求5所述的rAAV载体,其中所述GD2结合位点是单链可变片段(scFv)。

7.如权利要求6所述的rAAV载体,其中抗GD2抗体VL使用包含SEQ ID NO:25的scFv接头肽与所述抗GD2抗体VH融合。

8.如权利要求5-7任一项所述的rAAV载体,其中所述抗GD2抗体VL通过包含SEQ ID NO:20的序列的scFv接头肽与所述抗GD2抗体VH融合。

9.如权利要求1-4任一项所述的rAAV载体,其中所述抗GD2抗体VL和VH包含分别与SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3至少95%相同的序列。

10.如权利要求9所述的rAAV载体,其中所述GD2结合位点是单链可变片段(scFv)。

11.如权利要求10所述的rAAV载体,其中抗GD2抗体VL通过包含SEQ ID NO:20的序列的scFv接头肽与所述抗GD2抗体VH融合。

12.如权利要求9-11任一项所述的rAAV载体,其中所述GD2结合位点包含与SEQ ID NO:7至少95%相同的序列。

13.如权利要求1-12任一项所述的rAAV载体,其中所述抗CD3抗体VH包含分别为SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87的CDR1、CDR2和CDR3,且所述抗CD3抗体VL包含分别为SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的CDR1、CDR2和CDR3。

14.如权利要求13所述的rAAV载体,其中所述抗CD3抗体VH和VL包含分别与SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15至少95%相同的序列。

15.如权利要求13或14所述的rAAV载体,其中所述CD3结合位点是单链可变片段(scFv)。

16.如权利要求15所述的rAAV载体,其中所述抗CD3抗体VH通过包含与SEQ ID NO:25相同的序列的scFv接头肽与所述抗CD3抗体VL融合。

17.如权利要求13-16任一项所述的rAAV载体,其中所述抗CD3结合位点包含与SEQ ID NO:16至少95%相同的序列。

18.如权利要求1-12任一项所述的rAAV载体,其中所述抗CD3抗体VH包含分别为SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93的CDR1、CDR2和CDR3,和所述抗CD3抗体VL包含分别为SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的CDR1、CDR2和CDR3。

19.如权利要求18所述的rAAV载体,其中所述抗CD3抗体VH和VL包含分别与SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19至少95%相同的序列。

20.如权利要求18或19所述的rAAV载体,其中所述CD3结合位点是单链可变片段(scFv)。

21.如权利要求20所述的rAAV载体,其中所述抗CD3抗体VH通过包含与SEQ ID NO:25相同的序列的scFv接头肽与所述抗CD3抗体VL融合。

22.如权利要求18-21任一项所述的rAAV载体,其中所述CD3结合位点包含与SEQ ID NO:17至少95%相同的序列。

23.如权利要求1-22任一项所述的rAAV载体,其中所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:26至少95%相同的序列的N端信号肽。

24.如权利要求1-23任一项所述的rAAV载体,其中所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13至少95%相同的序列。

25.如权利要求1-24任一项所述的rAAV载体,其中所述转基因包含与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45至少95%相同的序列。

26.如权利要求1-25任一项所述的rAAV载体,其中所述转基因进一步包含所述编码双特异性融合蛋白的序列的5’侧或3’侧的调控元件。

27.如权利要求26所述的rAAV载体,其中所述调控元件是在所述编码双特异性融合蛋白的序列的3’侧。

28.如权利要求27所述的rAAV载体,其中所述调控元件源自土拔鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)并且包含与SEQ ID NO:64至少95%相同的序列。

29.如权利要求1-28任一项所述的rAAV载体,其中所述转基因还包含Kozak序列。

30.如权利要求1-29任一项所述的rAAV载体,其中所述载体还包含所述转基因序列的3’侧和所述3’AAVITR 5’侧的多腺苷酸化序列。

31.如权利要求30所述的rAAV载体,其中所述多腺苷酸化序列是与SEQ ID NO:65至少95%相同的牛生长激素(BGH)多腺苷酸化序列。

32.如权利要求1-31任一项所述的rAAV载体,其中所述3’AAVITR包含与SEQ ID NO:59至少95%相同的序列。

33.如权利要求1-33任一项所述的rAAV载体,其中所述载体还包含抗生素抗性基因序列。

34.如权利要求33所述的rAAV载体,其中所述抗生素抗性基因是卡那霉素抗性基因。

35.如权利要求1-34任一项所述的rAAV载体,其中所述载体包含与SEQ ID NO:53、SEQ

ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57至少95％相同的序列。

36.一种重组腺相关病毒(rAAV)载体,其包含与SEQ ID NO:11至少90％相同的序列。

37.一种降低患者的转移性疾病的风险的方法,其包括向所述患者施用有效量的根据权利要求1-36任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

38.一种延迟患者的转移性疾病的发作的方法,其包括向所述患者施用有效量的根据权利要求1-36任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

39.一种预防患者的转移性疾病的方法,其包括向所述患者施用有效量的根据权利要求1-36任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

40.一种促进患者的T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,其包括向所述患者施用有效量的根据权利要求1-36任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

41.如权利要求37-40任一项所述的方法,其中所述rAAV或其药物制剂与原发性肿瘤的治疗同时施用。

42.如权利要求41所述的方法,其中所述原发性肿瘤的治疗包括手术切除、放疗、化疗或免疫疗法。

43.一种预防倾向于发生GD2+肿瘤的患者的癌症的方法,其包括向所述患者施用有效量的根据权利要求1-36任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

44.一种预防GD2+癌症缓解期患者的癌症复发的方法,其包括向所述患者施用有效量的根据权利要求1-36任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

45.如权利要求37-44任一项所述的方法,其中所述AAV或其药物制剂与选自以下的检查点抑制剂一起施用:CTLA-4抑制剂、PD-1抑制剂和PD-L1抑制剂。

46.如权利要求45所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自:派姆单抗、伊匹单抗、纳武单抗和阿特珠单抗。

47.一种药物制剂,其包含根据权利要求1-36任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体和药学上可接受的载体。

腺相关病毒载体及其用于降低转移的风险、治疗和预防转移的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2022年7月25日提交的美国临时专利申请No.63/391,967的权益和优先权,其全部内容在此引入作为参考。

技术领域

[0003] 本公开总地涉及用于递送转基因序列的腺相关病毒(AAV)载体,所述转基因序列编码包括GD2结合位点和CD3结合位点的双特异性融合蛋白。本公开还涉及杀伤循环肿瘤细胞从而降低癌症和转移性疾病的风险、延迟癌症和转移性疾病的发作以及预防癌症和转移性疾病的方法。

背景技术

[0004] 癌症仍然是世界范围内重要的健康问题,并且是美国第二大死亡原因。目前癌症的治疗选择不是对于所有患者都是有效的,并且通常可能与显著的不良副作用相关。

[0005] 癌症免疫疗法是一种有希望的治疗方式,因为它们表现出比常规化疗剂更高的特异性,并且可以通过引发患者自身的免疫系统来促进肿瘤细胞的破坏。双特异性T细胞衔接蛋白是现有技术中已经描述的重组融合蛋白,其与肿瘤细胞和T细胞两者结合,从而刺激肿瘤细胞的破坏。

[0006] 腺相关病毒(AAV)已被用作基因治疗载体以实现长期、一致的血流水平的癌症免疫疗法。例如,编码双特异性αCD19-αCD3蛋白的AAV在CD19+淋巴瘤模型中实现在血流中超过一年的持续存在和抗肿瘤功效(Cripe等,Science Advances,出版中)。

[0007] 鉴于转移被认为是由可被认为是实体瘤的“白血病区室”的循环肿瘤细胞引起的,因此靶向癌症的长期、持续的免疫压力可有效地用于预防转移的发展。由于循环肿瘤细胞存在于免疫抑制性实体瘤微环境之外,它们可能更容易受到免疫疗法的影响。

[0008] 双唾液酸神经节苷脂(disialoganglioside)GD2(GD2)是一种在正常组织中表达有限但在广泛的肿瘤中过表达的双唾液酸神经节苷脂。根据肿瘤类型,GD2通过增强的细胞增殖、运动、迁移、粘附和侵袭而与肿瘤发生和恶性表型有关。GD2由几乎所有的神经母细胞瘤、大多数黑色素瘤和视网膜母细胞瘤以及许多尤文氏肉瘤高度表达。以更多变的程度,GD2由小细胞肺癌、神经胶质瘤、骨肉瘤和软组织肉瘤表达。

发明内容

[0009] 本公开涉及使用腺相关病毒载体来表达双特异性融合蛋白以降低癌症和转移的风险、预防和治疗癌症和转移的组合物和方法。

[0010] 本公开涉及使用腺相关病毒载体来表达双特异性融合蛋白以降低癌症和转移的风险、预防和治疗癌症和转移的组合物和方法。

[0011] 在一些方面,本公开提供了重组腺相关病毒(rAAV)载体,其从5’到3’包含:(a)5’

AAV末端反向重复序列(ITR);(b)启动子;(c)编码双特异性融合蛋白的转基因,所述双特异性融合蛋白包含:(i)包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)的GD2结合位点,所述轻链可变区(VL)包含分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75或分别为SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81的互补决定区1(CDR1)、互补决定区2(CDR2)和互补决定区3(CDR3)序列,和所述重链可变区(VH)包含分别为SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72,分别为SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的CDR1、CDR2和CDR3序列;(ii)接头肽,和(iii)包含抗CD3抗体的VH和VL的CD3结合位点;(d)修饰的RNA稳定性调控元件(MRE)和(e)3’AAV ITR。在一些实施方式中,启动子选自鸡β-肌动蛋白启动子、延伸因子1α(EF1α)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子或CAG启动子。在一些实施方式中,启动子是CAG启动子。在一些实施方式中,启动子包含与SEQ ID NO:66至少95%相同的序列。在一些实施方式中,抗GD2抗体VL和VH包含分别与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1至少95%相同的序列。在一些实施方式中,GD2结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,抗GD2抗体VL使用包含SEQ ID NO:25的scFv接头肽与抗GD2抗体VH融合。在一些实施方式中,抗GD2抗体VL通过包含SEQ ID NO:20的序列的scFv接头肽与抗GD2抗体VH融合。在一些实施方式中,抗GD2抗体VL和VH包含分别与SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3至少95%相同的序列。在一些实施方式中,GD2结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,抗GD2抗体VL通过包含SEQ ID NO:20的序列的scFv接头肽与抗GD2抗体VH融合。在一些实施方式中,GD2结合位点包含与SEQ ID NO:7至少95%相同的序列。在一些实施方式中,抗CD3抗体VH包含分别为SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且抗CD3抗体VL包含分别为SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的CDR1、CDR2和CDR3序列。在一些实施方式中,抗CD3抗体VH和VL包含分别与SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15至少95%相同的序列。在一些实施方式中,CD3结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,抗CD3抗体VH通过包含与SEQ ID NO:25相同的序列的scFv接头肽与抗CD3抗体VL融合。在一些实施方式中,CD3结合位点包含与SEQ ID NO:16至少95%相同的序列。在一些实施方式中,抗CD3抗体VH包含分别为SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且抗CD3抗体VL包含分别为SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的CDR1、CDR2和CDR3序列。在一些实施方式中,抗CD3抗体VH和VL包含分别与SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19至少95%相同的序列。在一些实施方式中,CD3结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,抗CD3抗体VH通过包含与SEQ ID NO:25相同的序列的scFv接头肽与抗CD3抗体VL融合。在一些实施方式中,CD3结合位点包含与SEQ ID NO:17至少95%相同的序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含N端信号肽,其包含与SEQ ID NO:26至少95%相同的序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13至少95%相同的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45至少95%相同的序列。在一些实施方式中,转基因还包含编码双特异性融合蛋白的序列的5’侧或3’侧的调控元件。在一些实施方式中,调控元件在编码双特异性融合蛋白的序列的3’侧。在一些实施方式中,调控元件源自土拔鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)并且包含与SEQ ID NO:64至少95%相同的序列。在一些实施方式中,转基因还包含Kozak序列。在一些实施方式中,载体还包含转基因序列的3’侧和3’AAV ITR的5’侧的多腺苷酸化序列。

在一些实施方式中,多腺苷酸化序列是与SEQ ID NO:65至少95%相同的牛生长激素(BGH)多腺苷酸化序列。在一些实施方式中,3'AAV ITR包含与SEQ ID NO:59至少95%相同的序列。在一些实施方式中,载体还包含抗生素抗性基因序列。在一些实施方式中,抗生素抗性基因是卡那霉素抗性基因。在一些实施方式中,载体包含与SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57至少95%相同的序列。

[0012] 在一些方面,本公开提供了重组腺相关病毒(rAAV)载体,其包含与SEQ ID NO:11至少90%相同的序列。

[0013] 在一些方面,本公开提供了一种降低患者的转移性疾病的风险的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

[0014] 在一些方面,本公开提供了一种延迟患者的转移性疾病的发作的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

[0015] 在一些方面,本公开提供了一种预防患者的转移性疾病的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

[0016] 在一些方面,本公开提供了一种促进患者的T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些实施方式中,rAAV或其药物制剂与原发性肿瘤的治疗同时施用。在一些实施方式中,原发性肿瘤的治疗包括手术切除、放疗、化疗或免疫疗法。

[0017] 在一些方面,本公开提供了一种预防倾向于发生GD2+肿瘤的患者的癌症的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。

[0018] 在一些方面,本公开提供了一种预防GD2+癌症缓解期的患者的癌症复发的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些实施方式中,AAV或其药物制剂与选自以下的检查点抑制剂一起施用:CTLA-4抑制剂、PD-1抑制剂和PD-L1抑制剂。在一些实施方式中,检查点抑制剂选自:派姆单抗、伊匹单抗、纳武单抗和阿特珠单抗。

[0019] 在一些方面,本公开提供了药物制剂,其包含本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体和药学上可接受的载体。

[0020] 在一些方面,本公开提供了一种降低患者的转移性疾病的风险的方法,其包括向患者施用有效量的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些方面,rAAV载体从5'至3'包含:5'AAV末端反向重复序列(ITR);启动子;包含编码双特异性融合蛋白的序列的转基因;和3'AAV ITR。在一些方面,双特异性融合蛋白包含:GD2结合位点,其包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH);接头肽;和CD3结合位点,其包含抗CD3抗体的VH和VL。

[0021] 在一些方面,本公开提供了一种延迟患者的转移性疾病的发作的方法,其包括向患者施用有效量的腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些方面,rAAV从5'到3'包含:5'AAV末端反向重复序列(ITR);启动子;包含编码双特异性融合蛋白的序列的转基因;和3'AAV ITR。在一些方面中,双特异性融合蛋白包含:GD2结合位点,其包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH);接头肽;和CD3结合位点,其包含抗CD3抗体的VH和VL。

[0022] 在一些方面,本公开提供了一种预防患者的转移性疾病的方法,其包括向患者施用有效量的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些方面,rAAV从5'到3'包含:5'

AAV末端反向重复序列(ITR);启动子;包含编码双特异性融合蛋白的序列的转基因;和3' AAV ITR。在一些方面,双特异性融合蛋白包含:GD2结合位点,其包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH);接头肽;和CD3结合位点,其包含抗CD3抗体的VH和VL。

[0023] 在一些方面,本公开提供了一种促进患者的T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,其包括向患者施用有效量的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些方面,rAAV从5'到3'包含:5' AAV末端反向重复序列(ITR);启动子;包含编码双特异性融合蛋白的序列的转基因;和3' AAV ITR。在一些方面,双特异性融合蛋白包含:GD2结合位点,其包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH);接头肽;和CD3结合位点,其包含抗CD3抗体的VH和VL。

[0024] 在一些方面,rAAV或其药物制剂与原发性肿瘤的治疗同时施用。在一些方面,原发性肿瘤的治疗包括手术切除、放疗、化疗或免疫疗法。

[0025] 在一些方面,本发明提供一种预防倾向于发生GD2+肿瘤的患者的癌症的方法,其包括向患者施用有效量的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些方面,rAAV从5'到3'包含:5' AAV末端反向重复序列(ITR);启动子;包含编码双特异性融合蛋白的序列的转基因;和3' AAV ITR。在一些方面中,双特异性融合蛋白包含:GD2结合位点,其包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH);接头肽;和CD3结合位点,其包含抗CD3抗体的VH和VL。

[0026] 在一些方面,本发明提供一种预防GD2+癌症缓解期的患者的癌症复发的方法,其包括向患者施用有效量的重组腺相关病毒(rAAV)载体或其药物制剂。在一些方面,rAAV从5'到3'包含:5' AAV末端反向重复序列(ITR);启动子;包含编码双特异性融合蛋白的序列的转基因;和3' AAV ITR。在一些方面,双特异性融合蛋白包含:GD2结合位点,其包含抗GD2抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH);接头肽;和CD3结合位点,其包含抗CD3抗体的VH和VL。

[0027] 在一些方面,本公开提供了重组腺相关病毒(rAAV)载体,其从5'到3'包含:5' AAV末端反向重复序列(ITR);启动子;包含编码双特异性融合蛋白的序列的转基因,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13至少95%相同的序列;和3' AAV ITR。

[0028] 在一些方面,rAAV或其药物制剂与选自以下的检查点抑制剂一起施用:CTLA-4抑制剂、PD-1抑制剂和PD-L1抑制剂。在一些方面,检查点抑制剂选自:派姆单抗、伊匹单抗、纳武单抗和阿特珠单抗。

[0029] 在一些方面,5' AAV ITR包含与SEQ ID NO:58至少95%相同的序列。在一些方面,3' AAV ITR包含与SEQ ID NO:59至少95%相同的序列。

[0030] 在一些方面,启动子选自鸡β-肌动蛋白启动子、延伸因子Iα(EF1α)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子和CAG启动子。在一些方面,启动子是CAG启动子。在一些方面,启动子包含与SEQ ID NO:66至少95%相同的序列。

[0031] 在一些方面,GD2结合位点的抗GD2抗体VL具有分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75的互补决定区1(CDR1)、互补决定区2(CDR2)和互补决定区3(CDR3)序列,且GD2结合位点的抗GD2抗体VH具有分别为SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的CDR1、CDR2和CDR3序列。在一些方面,抗GD2抗体VL和VH具有分别与SEQ ID NO:2和SEQ ID

NO:1至少95％相同的序列。在一些方面,GD2结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些方面,GD2结合位点的抗GD2抗体VL通过包含SEQ ID NO:20的序列的scFv接头肽与GD2结合位点的抗GD2抗体VH融合。在一些方面,GD2结合位点包含与SEQ ID NO:5至少95％相同的序列。

[0032] 在一些方面,GD2结合位点的抗GD2抗体VL具有分别为SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81的CDR1、CDR2和CDR3序列,且GD2结合位点的抗GD2抗体VH具有分别为SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的CDR1、CDR2和CDR3序列。在一些方面,GD2结合位点的抗GD2抗体VL和VH具有分别与SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3至少95％相同的序列。在一些方面,GD2结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些方面,GD2结合位点的抗GD2抗体VL通过包含SEQ ID NO:20的scFv接头肽与GD2结合位点的抗GD2抗体VH融合。在一些方面,scFv包含与SEQ ID NO:7至少95％相同的序列。

[0033] 在一些方面,接头肽包含与SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:20相同的序列。

[0034] 在一些方面,CD3结合位点的抗CD3抗体VH具有分别为SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且抗CD3抗体VL具有分别为SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0035] 在一些方面,CD3结合位点的抗CD3抗体VH和VL包含分别与SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15至少95％相同的序列。在一些方面,CD3结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些方面,CD3结合位点的抗CD3抗体VL通过包含与SEQ ID NO:25相同的序列的scFv接头肽与CD3结合位点的抗CD3抗体VH融合。在一些方面,CD3结合位点包含与SEQ ID NO:16至少95％相同的序列。

[0036] 在一些方面,CD3结合位点的抗CD3抗体VH具有分别为SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且抗CD3抗体VL具有分别为SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0037] 在一些方面,CD3结合位点的抗CD3抗体VH和VL包含分别与SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19至少95％相同的序列。在一些方面,CD3结合位点是单链可变片段(scFv)。在一些方面,CD3结合位点的抗CD3抗体VL通过包含与SEQ ID NO:25相同的序列的scFv接头肽与CD3结合位点的抗CD3抗体VH融合。在一些方面,CD3结合位点包含与SEQ ID NO:17至少95％相同的序列。

[0038] 在一些方面,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13至少95％相同的序列。

[0039] 在一些方面,双特异性融合蛋白具有包含与SEQ ID NO:26至少95％相同的序列的N-端信号肽。

[0040] 在一些方面,转基因包含与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45至少95％相同的序列。

[0041] 在一些方面,转基因还具有编码双特异性融合蛋白的序列的5’侧或3’侧的调控元件。在一些方面,调控元件在编码双特异性融合蛋白的序列的3’侧。在一些方面,调控元件源自土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE),并且包含与SEQ ID NO:64至少95％相同的序列。

[0042] 在一些方面,转基因还具有Kozak序列。

[0043] 在一些方面,载体还具有转基因序列的3’侧和3’AAV ITR的5’侧的多腺苷酸化序

列。在一些方面,多腺苷酸化序列是与SEQ ID NO:65至少95%相同的牛生长激素(BGH)多腺苷酸化序列。

[0044] 在一些方面,载体还具有抗生素抗性基因序列。在一些方面,抗生素抗性基因是卡那霉素抗性基因。

[0045] 在一些方面,载体包含与SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57至少95%相同的序列。

[0046] 在一些方面,本公开提供了根据上述任一方面的重组AAV载体。

[0047] 在一些方面,本公开提供了一种药物制剂,其包含上述任一方面的重组腺相关病毒(rAAV)载体和药学上可接受的载体。

附图说明

[0048] 图1A-1E是编码结合GD2和CD3的双特异性融合蛋白的AAV2质粒的载体图谱。图1A是编码包含hu3F8V5的VL和VH以及抗CD3抗体的VH和VL的双特异性融合蛋白的载体图谱。图1B是编码包含hu3F8V5的VL和VH以及抗CD3的VH和VL的双特异性融合蛋白的载体图谱。图1C是编码另一可选的双特异性融合蛋白的载体图谱,所述双特异性融合蛋白包含hu3F8V5的VL和VH以及抗CD3的VH和VL。图1D是编码包含抗GD2抗体(14G2a)的VL和VH以及抗CD3抗体的VH和VL的双特异性融合蛋白的载体图谱。图1E是编码可选的双特异性融合蛋白的载体图谱,所述双特异性融合蛋白包含抗GD2抗体(14G2a)的VL和VH以及抗CD3抗体的VH和VL。

[0049] 图2A-2B描绘了编码双特异性抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的各种构建体的构建体设计。

[0050] 图3描绘了抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的可制造性分析的结果,如基于对照抗体贝林妥欧单抗的标准曲线(下图)通过与所示细胞系的结合(上图)所测量的。

[0051] 图4描绘了所示细胞系在与T细胞和含有所示抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的上清液一起孵育后的存活力的图。

[0052] 图5A-5B描绘了所示细胞系中表面GD2和CD19表达的定量。图5A描绘了所示细胞系中GD2和CD19的染色的直方图。图5B描绘了基于流式细胞术结果,所示细胞系中GD2或CD19表面分子的插值数量。

[0053] 图6描绘了所示细胞系(亲本或表达CD19的)在与T细胞和含有所示抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的上清液孵育后的存活力的图。

[0054] 图7描绘了所示细胞系中表面GD2表达的定量(上图和左下图)和所示细胞系中GD2表面分子的插值数量(右下图)。

[0055] 图8描绘了所示亲本(上图)或荧光素酶报告(下图)细胞系中表面GD2表达的定量。

[0056] 图9描绘了所示细胞系在与人外周血单核细胞(huPBMC)和所示浓度的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白孵育后的存活力(上图)及测定的细胞系中的GD2表达(下图)的图。

[0057] 图10A-10B描绘了通过流式细胞术测量的(图10A)和作为等同可溶性荧光染料的分子定量的(图10B)所示细胞系中表面GD2表达的定量。图10C描绘了所示细胞系在与huPBMC和所示浓度的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白孵育后的存活力的图。

[0058] 图11描绘了所示细胞系在与huPBMC和所示浓度的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白孵育后的存活力的图。

[0059] 图12描绘了所示细胞系在与huPBMC和所示浓度的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白孵育后的存活力的图。

[0060] 图13A-13F描绘了在有和没有溶瘤病毒talimogene laherparepvec(TVEC)共处理的情况下,抗-GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的抗肿瘤作用的鼠模型的结果。图13A描绘了实验概述。图13B显示了待移植的肿瘤细胞中GD2表面染色的图。图13C描绘了在所示天数的小鼠肿瘤的图像。图13D描绘了通过发光测量的肿瘤大小。图13E显示了测量每个组的存活率的图。图13F显示了描绘总体小鼠体重的图。

[0061] 图14A-14P描绘了在两种神经母细胞瘤异种移植模型中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的抗肿瘤作用的鼠模型的结果。图14A描绘了实验概述。图14B显示了待移植的肿瘤细胞中GD2表面染色的图。图14C描绘了小鼠肿瘤在所示天数的图像。图14D描绘了通过发光测量的肿瘤大小。图14E描绘了通过肿瘤体积测量的肿瘤大小。图14F显示了测量每个组的存活率的图。图14G描绘了显示小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白水平的图。图14H描绘了小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线。图14I是描绘总体小鼠体重的图。图14J描绘了小鼠肿瘤在所示天数的图像。图14K描绘了通过发光测量的肿瘤大小。图14L描绘了通过肿瘤体积测量的肿瘤大小。图14M显示了测量每个组的存活率的图。图14N描绘了显示小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的水平的图。图14O描绘了小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线。图14P是描绘总体小鼠体重的图。

[0062] 图15A-15O描绘了抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与抗PDL1或溶瘤疱疹病毒(HSV1716)组合的抗肿瘤作用的鼠模型的结果。图15A描绘了实验概述。图15B描绘了在用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或抗PDL1组合治疗的小鼠中小鼠肿瘤在所示天数的图像。图15C描绘了用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或抗PDL1组合治疗的小鼠中通过发光测量的肿瘤大小。图15D描绘了通过用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或抗PDL1组合治疗的小鼠中通过肿瘤体积测量的肿瘤大小。图15E显示了测量用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或抗PDL1组合治疗的每组小鼠的存活率的图。图15F描绘了显示用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或抗PDL1组合治疗的小鼠的血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的水平的图。图15G描绘了用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或抗PDL1组合治疗的小鼠的血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线。图15H是描绘用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或抗PDL1组合治疗的小鼠的总体体重变化的图。图15I描绘了用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或HSV1716组合治疗的小鼠中小鼠肿瘤在所示天数的图像。图15J描绘了用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或HSV1716组合治疗的小鼠中通过发光测量的肿瘤大小。图15K描绘了用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或HSV1716组合治疗的小鼠中通过肿瘤体积测量的肿瘤大小。图15L显示了测量用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或HSV1716组合治疗的每组小鼠的存活率的图。图15M描绘了显示用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或HSV1716组合治疗的小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的水平的图。图15N描绘了用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或HSV1716组合治疗的小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线。图15O是描绘用抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白与对照或HSV1716组合治疗的小鼠的总体体重变化的图。

[0063] 图16A-16B描绘了小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的药代动力学分析的结果。图16A描绘了在直接注射后的所示时间处,小鼠血清中的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度。图16B描绘了在施用编码抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的AAV构建体的所示时间处,小鼠血清中的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度。

[0064] 图17描绘了在施用编码抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的AAV构建体的所示时间处,小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度。

[0065] 图18A-18J描绘了用于初步测试播散性疾病的AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法的鼠转移性神经母细胞瘤模型的结果。图18A描绘了实验概述。图18B描绘了小鼠肿瘤在所示天数的图像。图18C描绘了通过发光测量的肿瘤大小。图18D描绘了描述总体小鼠体重变化的图。图18E显示了说明小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的水平的图。图18F描绘了尸检后小鼠器官的图像。图18G描绘了尸检后小鼠脑样品的荧光图像。图18H描绘了尸检后小鼠肝脏样品的荧光图像。图18I是尸检后小鼠脑(上图)、肝(中图)和肺(下图)样品的荧光图像。图18J描绘了所示循环免疫细胞的比例的测量。

[0066] 图19A-19G描绘了在鼠CHLA255-luc转移性神经母细胞瘤模型中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的抗肿瘤作用的鼠模型的结果。图19A描绘了实验概述。图19B描绘了在注射5×10^5个肿瘤细胞的小鼠中小鼠肿瘤在所示天数的图像。图19C显示了描绘注射5×10^5个肿瘤细胞的每组小鼠的总体存活率的图。图19D描绘了描述注射5×10^5个肿瘤细胞的小鼠的总体体重变化的图。图19E描绘了注射1×10^5个肿瘤细胞的小鼠中小鼠肿瘤在所示天数的图像。图19F显示了描绘注射1×10^5个肿瘤细胞的每组小鼠的总体存活率的图。图19G描绘了描述注射1×10^5个肿瘤细胞的小鼠的总体体重变化的图。

[0067] 图20A-20F描绘了在建立的转移性神经母细胞瘤模型中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的抗肿瘤作用的鼠模型的结果。图20A描绘了实验概述。图20B描绘了小鼠肿瘤在所示天数的图像。图20C描绘了通过发光测量的肿瘤大小。图20D描绘了显示小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的水平的图。图20E显示了测量每个组的存活率的图。图20F是描绘小鼠总体体重变化的图。

[0068] 图21A-21F描绘了在肿瘤接种后不久预防CHLA255-luc转移性结节生长的AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法的鼠模型的结果。图21A描绘了实验概述。图21B描绘了所示时的小鼠肿瘤的图像。图21C描绘了通过发光测量的肿瘤大小。图21D显示了测量每个组的存活率的图。图21E是描绘小鼠总体体重变化的图。图21F描绘了显示小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的水平的图。

[0069] 图22A-22F描绘了AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法的功效的GD2表达肺癌模型的结果。图22A描绘了实验概述。图22B描绘了小鼠肿瘤在所示天数的图像。图22C描绘了通过发光测量的肿瘤大小。图22D显示了测量每个组的存活率的图。图22E是描绘小鼠总体体重变化的图。图22F描绘了显示小鼠血清中抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的水平的图。

具体实施方式

[0070] 本公开提供了重组腺相关病毒(rAAV)载体,其包含编码双特异性融合蛋白的核酸,所述双特异性融合蛋白包含抗GD2抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),以及抗

CD3抗体的VH和VL。

[0071] 本公开还提供了使用本文所述的rAAV来降低患者中转移的风险、预防或治疗患者的转移的方法。

[0072] 为了便于理解本公开,下面定义了许多术语和短语。

[0073] 本文所用的术语“一(a)”和“一个(an)”是指“一个或多个”,并且包括复数,除非上下文是不适宜的。

[0074] 术语“核酸”、“核苷酸”或“寡核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限制,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢。除非另有说明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子置换)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子置换可以通过产生其中一个或多个所选择(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换的序列来实现(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985)和Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0075] 术语“基因”可以指参与产生或编码多肽链的DNA片段。它可以包括编码区之前和之后的区域(前导序列和尾随序列)以及单个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0076] “启动子”定义为指导核酸转录的一个或多个核酸控制序列。如本文所用,启动子包括转录起始位点附近的核酸序列。启动子还任选地包括远端增强子或阻遏子元件,其可以位于距转录起始位点多达数千个碱基对处。

[0077] 本文所用的“调控元件”是指能够调节基因(例如转基因)的转录和/或调节转录的mRNA产物的稳定性或翻译的核酸序列。在一些实施方式中,调控元件可调节基因的组织特异性转录。调控元件可包含至少一个转录因子结合位点,例如肌肉特异性转录因子的转录因子结合位点。与在不存在调控元件的情况下从单独的启动子的基因转录相比时,如本文所用的调控元件增加或增强启动子驱动的基因表达。如本文所用的调控元件可以存在于距它们调节的转基因的任何距离处(即,近端或远端)。如本文所用的调控元件可包含参与转录控制的较大序列的部分,例如启动子序列的部分。然而,单独的调控元件通常不足以自身启动转录,而是需要启动子的存在。

[0078] 当核酸被置于与另一核酸序列的功能关系中时,它是“可操作地连接的”。例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则启动子或增强子与编码序列可操作地连接;或者如果核糖体结合位点被定位以促进翻译,则核糖体结合位点与编码序列可操作地连接。

[0079] 如本文所用,术语“等同编码潜力的序列”是指与另一参考核酸具有功能等同性的核酸序列。具有等同编码潜力的序列可以具有或不具有相同的一级核苷酸序列。例如,对于编码所表达的多肽的参考核酸,具有等同编码潜力的序列在功能上能够编码相同的所表达的多肽,并且可以包含与参考核酸相同的一级核苷酸序列,或者可以包含与参考核酸相比的一个或多个可选密码子。例如,可以通过密码子优化来改变编码多肽的内源核酸序列,以得到编码相同多肽的序列。密码子优化的序列可以是其中编码多肽的多核苷酸中的密码子已被替换以改变多核苷酸的活性、表达和/或稳定性的序列。例如,密码子优化可用于改变与内源基因序列相比具有等同编码潜力的序列的序列相似性程度,同时保留编码内源基因的蛋白质产物的潜力。

[0080] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指氨基酸残基的聚合物。如本文所用,该术语包括任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质及其功能片段,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0081] 术语“可变结构域”(例如,VH结构域或VL结构域)和“可变区”可互换使用,并且是指抗体或免疫球蛋白结构域的表现出序列的可变性并且参与决定特定抗体的特异性和结合亲和力的部分。可变性不是均匀分布在抗体的整个可变结构域中;它集中在重链和轻链可变区各自的亚结构域中。这些亚结构域被称为“高变区”或“互补决定区”(CDR)。可变结构域的更保守(即,非高变)部分被称为“框架”区(FRM或FR),并且在三维空间中为六个CDR提供支架以形成抗原结合表面。

[0082] 如本文所用,术语“互补的”或“互补性”是指核苷酸或核酸之间的特异性碱基配对。互补的核苷酸通常是A与T(或A与U),以及G与C。

[0083] 如本文所用,术语“转基因”是指人工引入细胞基因组中的外源基因,或人工引入细胞基因组中非天然基因座中的内源基因。转基因可以指参与产生或编码多肽链的DNA区段。转基因可以包括编码区之前和之后的区域(前导序列和尾随序列)以及单个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0084] 如本文所用,在核酸(例如AAV载体)的上下文中,术语“引入”或“递送”是指核酸从细胞外易位到细胞(例如肌细胞)内。在一些情况下,引入是指核酸从细胞外易位到细胞的细胞核内。考虑了这种易位的各种方法,包括但不限于电穿孔、与纳米线或纳米管的接触、受体介导的内化、经由细胞穿透肽的易位、脂质体介导的易位等。

[0085] 如本文所用,术语“包装的”或“衣壳化的”是指AAV载体包含在病毒衣壳中以形成AAV颗粒。

[0086] 在多核苷酸或多肽序列的上下文中使用的术语“基本同一性”或“基本上相同”是指与参考序列具有至少60%序列同一性的序列。或者,同一性百分比可以是60%至100%的任何整数。示例性实施方式包括至少:60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,如使用本文所述的程序与参考序列相比较的;优选地使用标准参数的BLAST,如下所述。本领域技术人员将认识到,通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,可以适当地调整这些值以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。

[0087] 对于序列比较,通常将一个序列用作与测试序列比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0088] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法是BLAST和BLAST 2.0算法,其描述于Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等(1977)Nucleic Acids Res.25:3389-3402。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(NCBI)网站公开获得。该算法涉及首先通过确定查询序列中长度W的短字来鉴定高评分序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的字比对时,所述短字匹配或满足一些正值阈值评分T。T被称为邻域字评分阈值(Altschul等,同上)。这些初始邻域字命中充当用于启动搜索以找到含有它们的更长HSP的种子。然后字命中沿着每个序列在两个方向上延伸,直到可以增加累积

比对评分。对于核苷酸序列,使用参数M(对于一对匹配残基的奖励分数;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)计算累积评分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积评分。以下情况时字命中在每个方向上的延伸中止:累积比对评分从其最大实现值下降量X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积评分变为零或低于零;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用默认的字长(W)28、期望值(E)10、M=1、N=-2以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用默认的字长(W)3、期望值(E)10和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff&Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915(1989))。

[0089] BLAST算法还进行两个序列之间相似性的统计分析(参见,例如,Karlin和Altschul,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 90:5873-5787(1993))。BLAST算法提供的相似性的一种量度是最小总和概率(P(N)),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.01,更优选小于约10^{-5},最优选小于约10^{-20},则认为核酸与参考序列相似。

[0090] 术语"接受者"、"个体"、"受试者"、"宿主"和"患者"在本文中可互换使用,并且在一些实施方式中,是指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者,特别是人。用于治疗目的的"哺乳动物"是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜和农场动物,以及实验室、动物园、运动或宠物动物,如狗、马、猫、牛、绵羊、山羊、猪、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴等。在一些实施方式中,哺乳动物是人。这些术语都不需要医务人员的监督和/或癌症诊断或当前的癌症治疗。

[0091] 如本文所用,术语"有效的递送"或"有效地递送"是指施用编码转基因的重组腺相关病毒载体,从而导致转基因在所需细胞或组织中表达。

[0092] 如本文所用,术语"有效量"是指足以实现有益或所需结果(例如,蛋白质的表达,或所需的预防或治疗效果)的物质(例如,本公开的重组腺相关病毒)的量。有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用,并且不旨在限于特定的制剂或施用途径。如本文所用,术语"治疗"包括导致病症、疾病、障碍等的改善或其症状改善的任何效果,例如减轻、减少、调节、改善或消除。

[0093] 在整个说明书中,在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,或者在工艺和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤的情况下,预期另外存在基本上由所列举的组分组成,或者由所列举的组分组成的本公开的组合物,以及存在基本上由所述处理步骤组成或由所述处理步骤组成的根据本公开的工艺和方法。

[0094] 1.重组腺相关病毒(AAV)载体

[0095] 如本文所用,"重组腺相关病毒(rAAV)载体"是指包含启动子和一个或多个转基因或目的多核苷酸的载体(例如核酸载体),所述转基因或目的多核苷酸侧翼为AAV末端反向重复(ITR)序列。本文所述的rAAV载体可以复制,并且在引入还包含编码rep和cap基因产物的一种或多种载体的宿主细胞中时包装成病毒颗粒。

[0096] 末端反向重复序列

[0097] 末端反向重复序列(ITR)是在转基因侧翼的回文145核苷酸的序列。重组腺相关病毒(rAAV)载体的5'和3' ITR对于将转基因整合到宿主细胞基因组(例如,人中的染色体19)中及对于衣壳化到AAV颗粒中都是必需的。

[0098] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含来自任何一种AAV血清型的ITR序列,例如AAVrh.74、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13。在优选的实施方式中,本文所述的重组AAV载体包含AAV2 5'和3'ITR序列。在一些实施方式中,AAV血清型选自:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh20、AAV-rh39、AAV-rh74、AAV-rhm4-1、AAV-hu37、AAV-Anc80、AAV-Anc80L65、AAV-7m8、AAV-PHP-B、AAV-PHP-EB、AAV-2.5、AAV-2tYF、AAV-3B、AAV-LK03、AAV-HSC1、AAV-HSC2、AAV-HSC3、AAV-HSC4、AAV-HSC5、AAV-HSC6、AAV-HSC7AAV-Myo、AAV-NP40、AAV-NP59、AAV-NP22、AAV-NP66或AAV-HSC16,或其衍生物。在一些实施方式中,本文公开的重组AAV载体包含AAV2 5'和3'ITR序列。在一些实施方式中,本文公开的重组AAV载体包含AAV8 5'和3'ITR序列。

[0099] 在一些实施方式中,本文所述的重组AAV载体包含与SEQ ID NO:58具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的5'AAV2 ITR(参见表1A)。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约80%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:58具有100%同一性的序列。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR包含SEQ ID NO:58。在一些实施方式中,5'AAV2 ITR由SEQ ID NO:58组成。

[0100] 在一些实施方式中,本文所述的重组AAV载体包含与SEQ ID NO:59具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的3'AAV2 ITR(参见表1A)。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约80%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含与SEQ ID NO:59具有100%同一性的序列。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR包含SEQ ID NO:59。在一些实施方式中,3'AAV2 ITR由SEQ ID NO:59组成。

[0101] 表1A-AAV ITR序列

[0102]

元件	核苷酸序列
AAV2 ITR (SEQ ID NO: 58)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCG CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC T
AAV2 ITR (SEQ ID NO: 59)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC GCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

[0103] 启动子

[0104] 启动子驱动AAV载体转基因的表达,并且通常位于它们调节其表达的转基因的上游(或5’侧)。

[0105] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含哺乳动物启动子,例如人、非人灵长类动物(例如,食蟹猴)、小鼠、马、牛、猪、猫和狗启动子。在一些实施方式中,本文公开的重组AAV载体包含强的组成型活性启动子以驱动转基因的高水平表达。例如,启动子是CAG启动子(与鸡β-肌动蛋白启动子融合的巨细胞病毒早期增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子/增强子、延伸因子1α(EF1α)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子或鸡β-肌动蛋白启动子。

[0106] 在一些实施方式中,本文所述的启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的CAG启动子。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约80%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,CAG启动子包含与SEQ ID NO:66具有100%同一性的序列。

[0107] CAG启动子序列:

[0108] CTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA
TGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
ACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTT
ATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTT
ATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCG
CCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCG
GGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGT

GAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGT
GGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCC
GCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGC
GTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCCTGCACCCCCC
TCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGG
GCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGC
GGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAG
GGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGC
GCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCC
CTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG
CTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGG
GCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTG

[0109] (SEQ ID NO:66)

[0110] SV40内含子

[0111] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含SV40内含子。SV40内含子是基因治疗载体中常用的调控元件,并增强表达的RNA转录物的翻译和稳定性。

[0112] 在某些实施方式中,SV40内含子在启动子的下游(即,3’侧)和转基因的上游(即,5’侧)。在其他实施方式中,SV40内含子可以在转基因的下游(即,3’侧)。

[0113] 在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含SEQ ID NO:67。在一些实施方式中,SV40内含子由SEQ ID NO:67组成。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约80%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40内含子包含与SEQ ID NO:67具有100%同一性的序列。

[0114] SV40内含子序列:

[0115] GTAAGTTTAGTCTTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGC
TCCTCAGTCGATGTTGCCTTTACTTCTAG

[0116] (SEQ ID NO:67)

[0117] 多腺苷酸化序列

[0118] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含编码多腺苷酸化序列的序列,如牛生长激素(BGH)多腺苷酸化序列(SEQ ID NO:65)或SV40多腺苷酸化序列(SEQ ID NO:68)。多腺苷酸化序列是基因治疗载体中常用的核酸元件,其有助于RNA从细胞核输出、RNA翻译和RNA稳定性。

[0119] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含编码与SEQ ID NO:65具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的BGH聚(A)尾的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约80%同一性的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,所述BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,BGH聚(A)尾包含与SEQ ID NO:65具有100%同一性的序列。在一些实施例中,BGH聚(A)尾包含根据SEQ ID NO:65的序列。在一些实施例中,BGH聚(A)尾由根据SEQ ID NO:65的序列组成。

[0120] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含编码与SEQ ID NO:68具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的SV40聚(A)尾的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约80%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含与SEQ ID NO:68具有100%同一性的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾包含根据SEQ ID NO:68的序列。在一些实施方式中,SV40聚(A)尾由根据SEQ ID NO:68的序列组成。

[0121] BGH聚(A)尾序列:

[0122] CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGA

[0123] (SEQ ID NO:65)

[0124] SV40聚(A)尾序列:

[0125] AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGC

[0126] (SEQ ID NO:68)

[0127] 增强子

[0128] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含一个或多个增强子序列。增强子序列可以增加转基因的转录水平,例如,通过充当转录因子的结合位点和辅助DNA成环和将转录机制募集到启动子的共调节子。

[0129] 在一些实施方式中,增强子在5'ITR的下游(即,3'侧)和启动子的上游(即,5'侧)。在一些实施方式中,增强子在启动子的下游(即,3'侧)和转基因的上游(即,5'侧)。在一些实施方式中,增强子在转基因的下游(即,3'侧)和3'UTR的上游(即,5'侧)。

[0130] 抗生素抗性基因

[0131] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含抗生素抗性基因。在一些实施方式中,抗生素抗性基因编码卡那霉素、壮观霉素、链霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素、博来霉素、红霉素、多粘菌素B、四环素、氯霉素、新霉素、吉欧霉素或其衍生物。在一些实施方式中,抗生素抗性基因编码卡那霉素。

[0132] 在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:97的核酸序列具有至少85%(例如,85%、90%、95%、97%、98%或99%)序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:97的核酸序列具有至少85%的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:97的核酸序列具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:97的核酸序列具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:97的核酸序列具有至少97%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:97的核酸序列具有至少98%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:97的核酸序列具有至少99%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含具有SEQ ID NO:97的核酸序列的核苷酸序列。

[0133] 在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:122的核酸序列具有至少85%(例如,85%、90%、95%、97%、98%或99%)序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:122的核酸序列具有至少85%的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:122的核酸序列具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:122的核酸序列具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:122的核酸序列具有至少97%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:122的核酸序列具有至少98%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含与SEQ ID NO:122的核酸序列具有至少99%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,卡那霉素抗性基因包含具有SEQ ID NO:122的核酸序列的核苷酸序列。

[0134] 卡那霉素变体1

[0135] ATGGCTAAAATGAGAATATCACCGGAATTGAAAAAACTGATCGAAAAATACCGCTGCGTAAAAGATACG
GAAGGAATGTCTCCTGCTAAGGTATATAAGCTGGTGGGAGAAAATGAAAACCTATATTTAAAAATGACGGACAGCCG
GTATAAAGGGACCACCTATGATGTGGAACGGGAAAAGGACATGATGCTATGGCTGGAAGGAAAGCTGCCTGTTCCAA
AGGTCCTGCACTTTGAACGGCATGATGGCTGGAGCAATCTGCTCATGAGTGAGGCCGATGGCGTCCTTTGCTCGGAA
GAGTATGAAGATGAACAAAGCCCTGAAAAGATTATCGAGCTGTATGCGGAGTGCATCAGGCTCTTTCACTCCATCGA
CATATCGGATTGTCCCTATACGAATAGCTTAGACAGCCGCTTAGCCGAATTGGATTACTTACTGAATAACGATCTGG
CCGATGTGGATTGCGAAAACTGGGAAGAAGACACTCCATTTAAAGATCCGCGCGAGCTGTATGATTTTTTAAAGACG
GAAAAGCCCGAAGAGGAACTTGTCTTTTCCCACGGCGACCTGGGAGACAGCAACATCTTTGTGAAAGATGGCAAAGT

AAGTGGCTTTATTGATCTTGGGAGAAGCGGCAGGGCGGACAAGTGGTATGACATTGCCTTCTGCGTCCGGTCGATCA
GGGAGGATATCGGGGAAGAACAGTATGTCGAGCTATTTTTTGACTTACTGGGGATCAAGCCTGATTGGGAGAAAATA
AAATATTATATTTTACTGGATGAATTGTTTTAG

[0136] (SEQ ID NO:97)

[0137] 卡那霉素变体2

[0138] ttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatatt
tttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggtatcg
gtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgag
aaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagcttatgcatttctttccagacttgttcaacag
gccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgag
acgaaatacgcgatcgctgttaaaaggacaattacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagc
gcatcaacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaatgctgttttcccggggatcgcagtgg
tgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgtcagccagtt
tagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcg
ggcttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaat
cagcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcat

[0139] (SEQ ID NO:122)

[0140] Kozak序列

[0141] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体包含Kozak序列。在一些实施方式中,Kozak序列是AAV2 Kozak序列。在一些实施方式中,Kozak序列是AAV8 Kozak序列。在一些实施方式中,Kozak序列是AAV-rh74 Kozak序列。示例性Kozak序列见下表1B。

[0142] 表1B.示例性Kozak序列

[0143]

SEQ ID NO	序列
98	CAUUGUAUGUC
99	UCGUUUAUGGA
100	CAGUUUAUGGU
101	CAUUGUAUGGU
102	UAGUGUAUGCU
103	UCUUUUAUGUC
104	UGUUUUAUGUC
105	UAGUUUAUGUC
106	UAGUGUAUGUC
107	UAGCGCAUGGC
108	UGGUAUAUGGC
109	UAGUUUAUGGC
110	CAGUGUAUGGC
111	CAUUGUAUGGC
112	CCGUUUAUGGG
113	ACUUGUAUGGG
114	CAUUUUAUGGG
115	UAGUGUAUGGG
116	UAGUUUAUGGG
117	UGUUUUAUGGG

[0144]

118	UCUUUUAUGGG
119	UAGUGUAUGGC
120	UGUUUUAUGGC
121	UCUUUUAUGGC

[0145] 在一些实施方式中,Kozak序列包含与SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列具有至少85%(例如,85%、90%、95%、97%、98%或99%)序列同一性的序列。在一些实施方式中,Kozak序列包含与SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列具有至少85%的序列同一性的序列。在一些实施方式中,Kozak序列包含与SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方式中,Kozak序列包含与SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方式中,Kozak序列包含与SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方式

中,Kozak序列包含与SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方式中,Kozak序列包含与SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方式中,Kozak序列包含具有SEQ ID NO:98-121中任一个的核酸序列的序列。

[0146] αGD2-αCD3转基因

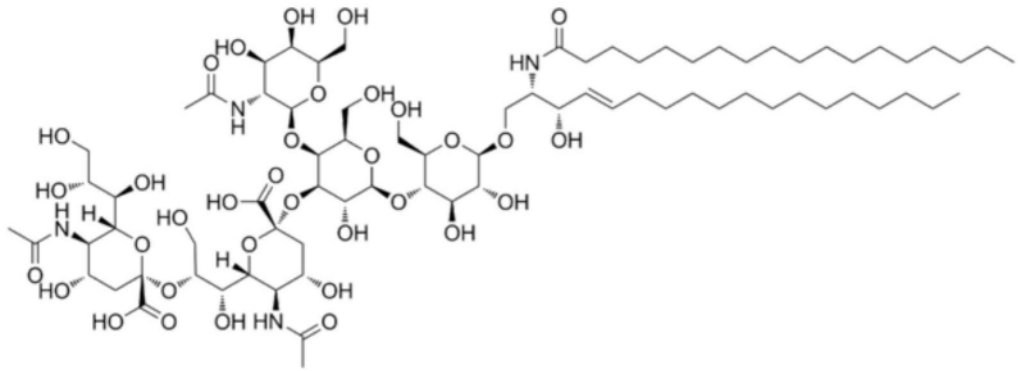
[0147] 在一些实施方式中,本公开的转基因是编码具有GD2结合位点和CD3结合位点的双特异性融合蛋白的核酸序列。在一些实施方式中,GD2结合位点包含抗GD2抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且CD3结合位点包含抗CD3抗体的VH和VL。

[0148] 在一些实施方式中,转基因并入细胞的基因组中或可以以游离方式表达。

[0149] GD2结合位点

[0150] GD2结合位点可以包含特异性结合具有以下所示结构的双唾液酸神经节苷脂的多肽或者两个或更多个多肽的复合物。

[0151] GD2

[0152] 

GalNAcβ1-4 (NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1

[0153] 在一些实施方式中,GD2结合位点包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。表2A列出了抗GD2抗体的VH和VL结构域,及其相应的互补决定区(CDR),其组合可以特异性地结合GD2。表2B列出了抗GD2抗体的VH和VL结构域的相应核苷酸序列。

[0154] 表2A-αGD2 VH/VL和CDR氨基酸序列

[0155]

身份标识	VH	VL
hu3F8V5	QVQLVESGPGVVQPGRSL RLSCAVSGFSVTNYGVHW VRQPPGKGLEWLGVIWA GGITNYNSSVKGRLTISKD NSKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCASRGGHYGYAL DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1) CDR1: NYGVH (SEQ ID NO: 70) CDR2: VIWAGGITNYNSAFMS (SEQ ID NO: 71) CDR3: RGGHYGYALDY (SEQ ID NO: 72)	KIVMTQTPATLSVSAGERVTITC RASQSVSNHVTWYQQKPGQAP RLLIYSASNRYTGIPARFSGSGY GTEFTFTISSVQSEDFAVYFCQQ DYSSFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 2) CDR1: KASQSVSNDVT (SEQ ID NO: 73) CDR2: SASNRYS (SEQ ID NO: 74) CDR3: QQDYSS (SEQ ID NO: 75)
14G2a	DVVMTQTPLSLPVSLGDQ ASISCRSSQSLVHRNGNTY LHWYLQKPGQSPKLLIHK VSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYF CSQSTHVPPLTFGAGTKLE	EVQLLQSGPELEKPGASVMISC KASGSSFTGYNMNWVRQNIGK SLEWIGAIDPYYGGTSYNQKFK GRATLTVDKSSSTAYMHLKSLT SEDSAVYYCVSGMEYWGQGTS VTVSS

[0156]

	L (SEQ ID NO: 3) CDR1: RSSQSLVHRNGNTYLH (SEQ ID NO: 76) CDR2: KVSNRFS (SEQ ID NO: 77) CDR3: SQSTHVPPLT (SEQ ID NO: 78)	 (SEQ ID NO: 4) CDR1: GYNMN (SEQ ID NO: 79) CDR2: AIDPYYGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 80) CDR3: GMEY (SEQ ID NO: 81)

[0157] 表2B-αGD2 VH/VL核苷酸序列

[0158]

身份识别	核苷酸序列
hu3F8V5 VH (SEQ ID NO: 27)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGACCAGGAGTGGTGC AGCCTGGCAGGAGTCTGAGGCTGTCATGTGCTGTGTCA GGCTTCTCTGTGACCAATTATGGAGTGCACTGGGTGAG ACAGCCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGGGTG ATCTGGGCAGGAGGGATCACAAACTATAACAGCTCAGT GAAGGGAAGGCTGACAATCAGCAAAGATAATTCCAAG AACACAGTCTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGA AGATACAGCAGTGTACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGA CACTATGGCTATGCCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACT CTGGTGACAGTGAGCAGT
hu3F8V5 VL (SEQ ID NO: 28)	AAGATTGTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTCTGT CTCTGCTGGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCAGGGCC AGCCAGTCTGTGAGCAATCATGTGACATGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACTCTG CTTCTAATAGGTACACAGGCATCCCTGCCAGGTTCTCTG GCAGTGGGTATGGCACAGAGTTCACATTTACTATCAGCT CAGTGCAGTCAGAGGACTTTGCTGTGTATTTTTGCCAG CAGGACTACTCCTCTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGA AATTAAGAGA
14G2a VH (SEQ ID NO: 29)	GATGTGGTGATGACACAGACCCCTCTGAGCCTGCCAGT GTCCCTGGGAGACCAGGCCTCTATCAGCTGCAGGTCCA GCCAGAGCCTGGTGCACAGGAATGGCAACACATACCTG CACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGTCCAAAGCT GCTCATCCACAAGGTGTCCAACAGATTTTCAGGAGTGC CAGACAGGTTCTCCGGCTCAGGCTCTGGAACTGACTTT ACACTCAAGATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGACTTGG

[0159]

	GAGTGTATTTCTGTAGCCAGAGCACCCATGTGCCTCCTC TGACTTTTGGGGCCGGTACTAAGCTGGAGCTG
14G2a VL (SEQ ID NO: 30)	GAGGTGCAGCTGCTGCAGAGTGGGCCAGAGCTGGAGA AGCCCGGGGCCTCTGTGATGATCTCTTGCAAGGCCTCA GGAAGCTCCTTCACAGGTTACAACATGAATTGGGTGCG CCAGAATATTGGTAAAAGCCTGGAATGGATTGGAGCCA TTGACCCCTATTATGGGGGCACTTCCTACAATCAGAAGT TCAAAGGAAGAGCAACACTGACTGTGGATAAGTCCTCT AGCACAGCCTACATGCACCTGAAATCTCTGACAAGTGA GGATAGTGCAGTGTACTATTGTGTCTCAGGGATGGAATA TTGGGGCCAGGGAACCTCTGTGACAGTGAGCAGT

[0160] 在一些实施方式中,GD2结合位点包含VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列,其选自表2A中列出的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列,依据Kabat确定(参见Kabat等,(1991)Sequences of Proteins of Immunology Interest,NIH Publication No.91-3242,Bethesda)、IMGT独特编号方案、Chothia(参见,例如,Chothia C&Lesk A M(1987),J.Mol.Biol.215:495-495)、MacCallum(参见MacCallum R M等,(1996)J.Mol.Biol.196:901-917),或本领域已知的任何其他CDR确定方法。

[0161] 除非另有说明,表2A中提供的CDR序列根据Kabat编号方案确定。

[0162] 在一些实施方式中,GD2结合位点包含:(i)包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VH CDR1;(v)包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VH CDR2;和(vi)包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VH CDR3。

[0163] 在一些实施方式中,GD2结合位点包含:(i)包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的VL CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH CDR1;(v)包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VH CDR2;和(vi)包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VH CDR3。

[0164] 表2A另外列出了可以组合特异性地结合GD2的示例性VH和VL结构域的氨基酸序列。在一些实施方式中,本公开的GD2结合位点包含与表2A中列出的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH和VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ IDNO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少96%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有含与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少96%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH;和含有根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL。

[0165] 在一些实施方式中,本公开的GD2结合位点包含:(i)与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH;和(ii)与SEQ ID NO:2具有

至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少85％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少95％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少96％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少96％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少97％的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少97％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少98％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少98％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少99％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少99％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH;和含有根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列的VL。

[0166] 在一些实施方式中,本公开的GD2结合位点包含:(i)与SEQ ID NO:3具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VH;和(ii)与SEQ ID NO:4具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少95％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少95％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少96％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少96％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根

据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少97％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少97％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少98％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少98％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少99％序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少99％序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,GD2结合位点包含含有根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH;和含有根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL。

[0167] 在一些实施方式中,GD2结合位点包括,但不限于单链可变片段(scFv)、抗体、Fab、Fab'、F(ab')$_2$、微抗体或纳米抗体(VHH)。例如,在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含各自特异性结合GD2的scFv多肽。

[0168] 在一些实施方式中,本公开的GD2结合位点是scFv形式。在一些实施方式中,本公开的GD2结合scFv包含可操作地连接VH结构域和VL结构域的scFv接头多肽。例如,GD2结合scFv从N端到C端包含抗GD2抗体的VL结构域、scFv接头多肽和抗GD2抗体的VH结构域。在其他实施方式中,GD2结合scFv从N端到C端包含抗GD2抗体的VH结构域、scFv接头多肽和抗GD2抗体的VL结构域。

[0169] 在一些实施方式中,scFv接头多肽包含选自表3A中的接头序列的序列。

[0170] 表3A-scFv接头肽序列

[0171]

scFv 接头	序列
接头 1 (SEQ ID NO: 20)	GGGGSGGGGSGGGGS
接头 2 (SEQ ID NO: 21)	GGGGSGGGGSGGGGSGGGG

[0172]

接头 3 (SEQ ID NO: 22)	GGGSGGGGSGGGGS
接头 4 (SEQ ID NO: 23)	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
接头 5 (SEQ ID NO: 24)	GGSGGSGGSGGS

[0173] 在一些实施方式中,本公开的GD2结合scFv包含在VH区的C端或在VL结构域的C端与scFv接头肽的N-末端融合的间隔肽。在一些实施方式中,间隔肽包含选自表3B中列出的间隔序列的序列。

[0174] 表3B-间隔肽序列

[0175]

间隔子	序列
间隔子 1 (SEQ ID NO: 82)	ASTKGP
间隔子 2 (SEQ ID NO: 83)	TKLEIKR
间隔子 3 (SEQ ID NO: 84)	TKLELK

[0176] 表4A列出了示例性GD2结合scFv的氨基酸序列。在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含GD2结合scFv,其包含与表4A中列出的scFv序列至少85%相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的序列。表4B列出了示例性GD2结合scFv的相应核苷酸序列。

[0177] 表4A-GD2结合scFv氨基酸序列

[0178]

身份标识	scFv 序列
hu3F8V5 scFv (VL +VH) (SEQ ID NO: 5)	KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQ QKPGQAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTIS SVQSEDFAVYFCQQDYSSFGQGTKLEIKR*GGGGSGGG GSGGGGS*QVQLVESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVT NYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNSSVKGR LTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCASRGGHY GYALDYWGQGTLVTVSS
hu3F8V5 scFv (VH + VL) (SEQ ID NO: 6)	QVQLVESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHW VRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNSSVKGRLTISKDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCASRGGHYGYALDY WGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*KIVMTQTPAT

[0179]

	LSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQKPGQAPRLL IYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDFAVY FCQQDYSSFGQGTKLEIKR
14G2a scFv (VL +VH) (SEQ ID NO: 7)	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWV RQNIGKSLEWIGAIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDK SSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVT VSS*GGGGSGGGGSGGGGS*DVVMTQTPLSLPVSLGDQ ASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPPLTFGAGTKLEL
14G2a scFv (VH + VL) (SEQ ID NO: 8)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTY LHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLEL *GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLLQSGPELEKPGASVMISC KASGSSFTGYNMNWVRQNIGKSLEWIGAIDPYYGGTS YNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYY CVSGMEYWGQGTSVTVSS

[0180] *下划线的斜体文本表示scFv接头序列。

[0181] 表4B-GD2结合scFv核苷酸序列

[0182]

身份标识	**核苷酸序列**
hu3F8V5 scFv - (VL-VH) (SEQ ID NO: 31)	AAGATTGTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTC TGTCTCTGCTGGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCA GGGCCAGCCAGTCTGTGAGCAATCATGTGACATGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCCCCTAGGCTGCTG ATCTACTCTGCTTCTAATAGGTACACAGGCATCCCTG CCAGGTTCTCTGGCAGTGGGTATGGCACAGAGTTC ACATTTACTATCAGCTCAGTGCAGTCAGAGGACTTT GCTGTGTATTTTTGCCAGCAGGACTACTCCTCTTTTG GCCAGGGCACCAAGCTGGAAATTAAGAGAGGAGGT GGGGGGTCTGGGGGAGGGGGCAGTGGAGGGGGAG GATCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGACCAGGA GTGGTGCAGCCTGGCAGGAGTCTGAGGCTGTCATG TGCTGTGTCAGGCTTCTCTGTGACCAATTATGGAGT GCACTGGGTGAGACAGCCTCCAGGAAAGGGCCTGG AGTGGCTGGGGGTGATCTGGGCAGGAGGGATCACA AACTATAACAGCTCAGTGAAGGGAAGGCTGACAAT CAGCAAAGATAATTCCAAGAACACAGTCTATCTGCA GATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACAGCAGTGT ACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGACACTATGGCTAT GCCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGAC

[0183]

	AGTGAGCAGT
14G2a scFv (VL-VH) (SEQ ID NO: 32)	GAGGTGCAGCTGCTGCAGAGTGGGCCAGAGCTGGA GAAGCCCGGGGCCTCTGTGATGATCTCTTGCAAGGC CTCAGGAAGCTCCTTCACAGGTTACAACATGAATTG GGTGCGCCAGAATATTGGTAAAAGCCTGGAATGGAT TGGAGCCATTGACCCCTATTATGGGGGCACTTCCTA CAATCAGAAGTTCAAAGGAAGAGCAACACTGACTG TGGATAAGTCCTCTAGCACAGCCTACATGCACCTGA AATCTCTGACAAGTGAGGATAGTGCAGTGTACTATT GTGTCTCAGGGATGGAATATTGGGGCCAGGGAACC TCTGTGACAGTGAGCAGTGGAGGGGGAGGCTCAGG AGGGGGAGGGTCCGGGGGCGGAGGGAGTGATGTG GTGATGACACAGACCCCTCTGAGCCTGCCAGTGTC CCTGGGAGACCAGGCCTCTATCAGCTGCAGGTCCA GCCAGAGCCTGGTGCACAGGAATGGCAACACATAC CTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGTCC AAAGCTGCTCATCCACAAGGTGTCCAACAGATTTTC AGGAGTGCCAGACAGGTTCTCCGGCTCAGGCTCTG GAACTGACTTTACACTCAAGATCAGCAGGGTGGAG GCTGAGGACTTGGGAGTGTATTTCTGTAGCCAGAGC ACCCATGTGCCTCCTCTGACTTTTGGGGCCGGTACT AAGCTGGAGCTG

[0184] *下划线文本表示scFv接头序列。

[0185] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含特异性结合GD2的scFv,所述scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:5具有100%同一性的序列。

[0186] 在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少约96%同一性的序列。在一些

实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:6具有100%同一性的序列。

[0187] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含特异性结合GD2的scFv,所述scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:7具有100%同一性的序列。

[0188] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含特异性结合GD2的scFv,所述scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合GD2的scFv包含与SEQ ID NO:8具有100%同一性的序列。

[0189] CD3结合位点

[0190] 本公开的双特异性融合蛋白可包括特异性结合T细胞表面上的CD3的多肽或者两个或更多个多肽的复合物。在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白结合在成熟T淋巴细胞(例如αβT细胞、γδT细胞、NK-T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞及其表型亚群)上表达的CD3。在一些实施方式中,当桥接至GD2时,CD3的结合诱导T细胞的活化。

[0191] 如本文所用,在一些实施方式中,CD3结合位点是特异性结合CD3(SEQ ID NO:69)的多肽者或两个或更多个多肽的复合物。例如,CD3结合位点结合CD3ε链。

[0192] CD3序列(ε链):

[0193] MRWNTFWGILCLSLLAVGTCQDDAENIEYKVSISGTSVELTCPLDSDENLKWEKNGQELPQKHDKHLVL
QDFSEVEDSGYYVCYTPASNKNTYLYLKARVCEYCVEVDLTAVAIIIIVDICITLGLLMVIYYWSKNRKAKAKPVTR

GTGAGSRPRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRAV

[0194] (SEQ ID NO:69)

[0195] 在一些实施方式中,CD3结合位点包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。表5A列出了抗CD3抗体的VH和VL区及其相应的互补决定区(CDR),其组合可以特异性结合CD3。表5B列出了抗CD3抗体的VH和VL区的相应核苷酸序列。

[0196] 表5A-αCD3 VH/VL序列和CDR

[0197]

身份标识	VH	VL
L2K07	DIKLQQSGAELARPGASVKM SCKTSGYTFTRYTMHWVKQ RPGQGLEWIGYINPSRGYTN YNQKFKDKATLTTDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTLTVSS VE	GGVDDIQLTQSPAIMSASPGE KVTMTCRASSSVSYMNWYQ QKSGTSPKRWIYDTSKVASG VPYRFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCQQWSSNPLTFG AGTKLELK
	(SEQ ID NO: 14) CDR1: RYTMH (SEQ ID NO: 85) CDR2: YINPSRGYTNYNQKFKD (SEQ ID NO: 86) CDR3: YYDDHYCLDY (SEQ ID NO: 87)	(SEQ ID NO: 15) CDR1: RASSSVSYMN (SEQ ID NO: 88) CDR2: DTSKVAS (SEQ ID NO: 89) CDR3: QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 90)

[0198]

huOKT3	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRL SCKASGYTFTRYTMHWVRQ APGKGLEWIGYINPSRGYTN YNQKFKDRFTISRDNSKNTAF LQMDSLRPEDTGVYFCARYY DDHYCLDYWGQGTPVTVSS (SEQ ID NO: 18) CDR1: RYTMH (SEQ ID NO: 91) CDR2: YINPSRGYTNYNQKFKD (SEQ ID NO: 92) CDR3: YYDDHYCLDY (SEQ ID NO: 93)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCSASSSVSYMNWYQQTPGK APKRWIYDTSKLASGVPSRFS GSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT YYCQQWSSNPFTFGQGTKLQ ITR (SEQ ID NO: 19) CDR1: SASSSVSYMN (SEQ ID NO: 94) CDR2: DTSKLAS (SEQ ID NO: 95) CDR3: QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 96)

[0199] 表5B-αCD3VH/VL核苷酸序列

[0200]

身份标识	核苷酸序列
L2K07 VH (1) (SEQ ID NO: 33)	GACATCAAACTGCAGCAGAGTGGGGCTGAGCTGGCCAG ACCTGGAGCCTCTGTCAAGATGAGCTGCAAAACCTCAG GCTACACATTCACCAGATACACCATGCACTGGGTGAAAC AGAGACCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGCTACATT AACCCATCAAGAGGCTATACCAACTATAACCAGAAATTC AAGGACAAGGCCACCCTGACCACAGACAAAAGCAGCA GTACAGCTTACATGCAGCTGTCCTCCCTGACCTCTGAGG ACTCTGCTGTGTACTATTGTGCCAGATACTATGATGACCA CTACTGCCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACAACACTGAC AGTGTCTTCTGTGGAG
L2K07 VL (1) (SEQ ID NO: 34)	GGTGGAGTGGATGACATCCAGCTCACACAGTCCCCTGC CATCATGTCTGCCTCCCCTGGAGAGAAGGTGACAATGAC CTGCAGAGCAAGCTCATCTGTTTCCTACATGAACTGGTA TCAGCAGAAGTCTGGGACAAGCCCCAAAAGGTGGATCT ATGACACCAGCAAAGTGGCCTCTGGAGTGCCTTACAGA TTCTCTGGATCTGGATCTGGCACCAGCTATTCTCTGACCA TCTCCAGTATGGAAGCTGAGGATGCTGCCACCTACTACT GCCAGCAGTGGTCATCTAATCCCCTGACCTTTGGAGCTG GAACCAAACTGGAGCTGAAG
L2K07 VH (2) (SEQ ID NO: 35)	GATATTAAGCTCCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCCAG ACCTGGAGCCTCTGTGAAGATGAGTTGCAAGACCTCTG GCTACACCTTTACCAGATACACAATGCATTGGGTGAAGC AGAGGCCAGGACAGGGGCTGGAATGGATTGGCTATATC AACCCATCTAGAGGCTATACCAACTACAACCAGAAGTTT AAGGATAAAGCCACACTGACCACAGACAAGAGCTCCTC CACAGCCTATATGCAGCTGTCTAGTCTGACCTCTGAGGA TTCTGCTGTGTATTATTGTGCCAGGTATTATGATGACCATT ACTGCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCACTCTGACA GTGAGCTCTGTGGAG
L2K07 VL (2) (SEQ ID NO: 36)	GGGGGAGTGGATGACATCCAACTGACCCAGTCCCCTGC CATCATGTCTGCCTCCCCAGGGGAAAAGGTCACCATGAC CTGTAGAGCCTCTTCCTCTGTGTCCTACATGAACTGGTAT CAGCAGAAGTCTGGCACCTCTCCTAAGAGGTGGATTTAT GATACTAGCAAGGTGGCTTCTGGGGTGCCATACAGGTTT TCTGGATCTGGTTCTGGAACCTCCTACTCCCTGACAATC TCCTCCATGGAAGCTGAGGATGCAGCCACTTACTACTGT CAGCAGTGGAGTTCCAATCCACTCACTTTTGGGGCAGG CACAAAACTGGAGCTGAA
L2K07 VH (3) (SEQ ID NO: 37)	GACATCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCTAG ACCTGGAGCCTCTGTGAAGATGTCCTGTAAGACCTCTGG TTACACATTTACCAGATATACTATGCATTGGGTGAAACAG AGACCAGGCCAGGGACTGGAGTGGATTGGGTACATCAA CCCTTCCAGAGGCTACACCAATTACAATCAGAAGTTTAA GGATAAAGCCACTCTGACCACTGACAAGTCCAGCAGCA CAGCTTACATGCAGCTGAGCTCCCTGACATCTGAGGACT CTGCTGTGTATTATTGTGCAAGATATTATGATGATCACTAT TGCCTGGACTACTGGGGGCAGGGCACTACACTGACAGT GTCCTCTGTGGAA
L2K07 VL (3) (SEQ ID NO: 38)	GGAGGAGTGGATGATATCCAGCTGACACAGAGCCCTGC AATCATGTCTGCTTCTCCTGGAGAGAAAGTGACCATGAC ATGCAGAGCCTCATCCTCTGTGAGCTATATGAATTGGTAC CAACAGAAGTCTGGGACATCCCCCAAGAGATGGATCTAT

[0201]

[0202]

	GATACAAGCAAAGTGGCCTCTGGGGTGCCATACAGATTC TCTGGATCTGGCTCTGGAACATCCTACAGCCTGACTATT AGCAGTATGGAGGCTGAGGATGCTGCCACCTACTACTGC CAGCAGTGGTCCAGCAACCCACTGACCTTTGGAGCTGG AACCAAACTGGAGCTGAAG
L2K07 VH (4) (SEQ ID NO: 39)	GACATCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCCAG ACCTGGAGCCTCAGTGAAGATGAGCTGCAAAACATCTG GATACACCTTCACCAGATACACCATGCACTGGGTCAAGC AGAGACCTGGACAGGGACTGGAGTGGATTGGCTATATTA ACCCTTCTAGAGGCTACACCAACTACAACCAAAAGTTC AAGGACAAAGCCACACTGACCACAGACAAGTCCTCCA GCACTGCATACATGCAGTTGAGTAGCCTGACCTCAGAGG ATTCTGCTGTGTACTATTGTGCTAGGTATTATGATGACCAT TACTGTCTGGATTATTGGGGACAGGGCACCACCCTGACA GTGAGCTCTGTGGAA
L2K07 VL (4) (SEQ ID NO: 40)	GGAGGAGTGGATGACATTCAGCTGACCCAGAGCCCTGC CATTATGTCTGCATCACCAGGAGAGAAGGTGACCATGAC ATGCAGGGCAAGTTCTTCTGTGTCCTACATGAACTGGTA TCAGCAGAAGTCTGGAACCTCCCCTAAAAGATGGATCTA TGATACCAGTAAGGTGGCATCAGGAGTGCCCTACAGATT CTCTGGGTCTGGATCTGGAACAAGCTACTCCCTGACCAT CTCTAGCATGGAGGCTGAGGATGCTGCCACCTACTACTG CCAGCAGTGGTCCAGCAACCCCCTGACATTTGGGGCTG GGACCAAGCTGGAACTGAAA
OKT3 VH (SEQ ID NO: 50)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGGGTGGTTCA GCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGTCATGCAAGGCCTCAG GGTATACTTTCACCAGATATACAATGCACTGGGTGAGAC AGGCCCCAGGCAAGGGACTGGAATGGATTGGCTACATT AACCCATCTAGGGGATATACAAATTATAATCAGAAATTCA AGGACAGATTTACAATCTCCAGGGACAACTCTAAGAATA CTGCCTTTCTGCAGATGGACTCTCTGAGGCCTGAGGACA CTGGAGTGTATTTCTGTGCCAGATACTATGATGACCATTA TTGTCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACACCTGTGACAGT GTCCAGT
OKT3 VL (SEQ ID NO: 51)	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGTAGCCTGAGTGCC TCAGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGCTCTGCAAG CAGCTCTGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGACACC AGGCAAGGCCCCCAAGAGGTGGATTTATGACACCTCCA AGCTGGCTTCTGGGGTGCCAAGCAGATTCTCAGGATCTG GAAGTGGGACAGACTACACATTTACCATCAGTTCACTGC AGCCTGAGGACATTGCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGT CCTCCAACCCCTTCACCTTTGGCCAGGGAACCAAGCTG CAGATCACCAGG

[0203] 在一些实施方式中,CD3结合位点包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列,其选自在表5A中列出的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列,依据IMGT独特编号方案、Kabat(参见Kabat等,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,NIH公开号91-3242,Bethesda)、Chothia(参见,例

如,Chothia C&Lesk AM,(1987),J.Mol.Biol.196:901-917)、MacCallum(参见MacCallum RM等,(1996)J.Mol.Biol.262:732-745)或本领域已知的任何其他CDR确定方法来确定。

[0204] 除非另有说明,表5A中提供的CDR序列根据Kabat编号方案确定。

[0205] 在一些实施方式中,CD3结合位点包含:(i)包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的VH CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的VH CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的VH CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的VL CDR1;(v)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的VL CDR2;和(vi)包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的VL CDR3。

[0206] 在一些实施方式中,CD3结合位点包含:(i)包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的VH CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的VH CDR2;(iii)包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的VH CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VL CDR1;(v)包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL CDR2;和(vi)包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的VL CDR3。

[0207] 表5A另外列出了可以组合地特异性结合CD3的示例性VH和VL结构域的氨基酸序列。在一些实施方式中,本公开的CD3结合位点包含与表5A中列出的VH和VL序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH和VL。

[0208] 在一些实施方式中,本公开的CD3结合位点包含:(i)与SEQ ID NO:14具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH;和(ii)与SEQ ID NO:15具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少96%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少96%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有根

据SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH;和含有根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL。

[0209] 在一些实施方式中,本公开的CD3结合位点包含:(i)与SEQ ID NO:18具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH;和(ii)与SEQ ID NO:19具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少96%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少96%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有与根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH;和含有与根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施方式中,CD3结合位点包含含有根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH;和含有根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL。

[0210] 在一些实施方式中,CD3结合位点包括,但不限于单链可变片段(scFv)、抗体、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、微抗体或纳米抗体(VHH)。例如,在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含各自特异性结合CD3的scFv多肽。

[0211] 在一些实施方式中,本公开的CD3结合位点是scFv形式。在一些实施方式中,本公开的CD3结合scFv包含可操作地连接VH结构域和VL结构域的scFv接头多肽。例如,在一些实施方式中,结合CD3的scFv从N端到C端包含抗CD3抗体的VL结构域、scFv接头多肽和抗CD3抗体的VH结构域。在其他实施方式中,结合CD3的scFv从N端到C端包含抗CD3抗体的VH结构域、scFv接头多肽和抗CD3抗体的VL结构域。

[0212] 在一些实施方式中,scFv接头多肽包含选自表3A中的接头序列的序列。

[0213] 表6A列出了示例性CD3结合scFv的氨基酸序列。在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含CD3结合scFv,其包含与表6A中列出的scFv序列至少85%相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的序列。表6B列出了示例性CD3结合scFv的相应核苷酸

序列。

[0214] 表6A-αCD3 scFv氨基酸序列

[0215]

身份标识	scFv
L2K07 scFv (VH-VL) (SEQ ID NO: 16)	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVK QRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL TVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPAIMSASPGE KVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVAS GVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP LTFGAGTKLEL
huOKT3 scFv (VH-VL) (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSK NTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGT PVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTF GQGTKLQITR

[0216] *下划线文本表示scFv接头序列。

[0217] 表6B-αCD3 scFv核苷酸序列

[0218]

标识符	scFv
L2K07 scFv (VH-VL) (SEQ ID NO: 46)	GACATCAAACTGCAGCAGAGTGGGGCTGAGCTGGCCA GACCTGGAGCCTCTGTCAAGATGAGCTGCAAAACCTC AGGCTACACATTCACCAGATACACCATGCACTGGGTGA AACAGAGACCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGCTA CATTAACCCATCAAGAGGCTATACCAACTATAACCAGA AATTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCACAGACAAAAG CAGCAGTACAGCTTACATGCAGCTGTCCTCCCTGACCT CTGAGGACTCTGCTGTGTACTATTGTGCCAGATACTATG ATGACCACTACTGCCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACA ACACTGACAGTGTCTTCTGTGGAGGGTGGCTCAGGTG GGTCTGGGGGCTCTGGAGGCTCTGGTGGAGTGGATGA CATCCAGCTCACACAGTCCCCTGCCATCATGTCTGCCT CCCCTGGAGAGAAGGTGACAATGACCTGCAGAGCAAG CTCATCTGTTTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGT CTGGGACAAGCCCCAAAAGGTGGATCTATGACACCAG CAAAGTGGCCTCTGGAGTGCCTTACAGATTCTCTGGAT CTGGATCTGGCACCAGCTATTCTCTGACCATCTCCAGTA TGGAAGCTGAGGATGCTGCCACCTACTACTGCCAGCA GTGGTCATCTAATCCCCTGACCTTTGGAGCTGGAACCA AACTGGAGCT
L2K07 (2) scFv (VH-VL) (SEQ ID NO:	GATATTAAGCTCCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCCAG ACCTGGAGCCTCTGTGAAGATGAGTTGCAAGACCTCT GGCTACACCTTTACCAGATACACAATGCATTGGGTGAA

[0219]

47)	GCAGAGGCCAGGACAGGGGCTGGAATGGATTGGCTAT ATCAACCCATCTAGAGGCTATACCAACTACAACCAGAA GTTTAAGGATAAAGCCACACTGACCACAGACAAGAGC TCCTCCACAGCCTATATGCAGCTGTCTAGTCTGACCTCT GAGGATTCTGCTGTGTATTATTGTGCCAGGTATTATGAT GACCATTACTGCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAC TCTGACAGTGAGCTCTGTGGAGGGGGGGTCTGGGGGC TCTGGAGGCTCTGGGGGCAGTGGGGGAGTGGATGACA TCCAACTGACCCAGTCCCCTGCCATCATGTCTGCCTCC CCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGTAGAGCCTCTT CCTCTGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCT GGCACCTCTCCTAAGAGGTGGATTTATGATACTAGCAA GGTGGCTTCTGGGGTGCCATACAGGTTTTCTGGATCTG GTTCTGGAACCTCCTACTCCCTGACAATCTCCTCCATG GAAGCTGAGGATGCAGCCACTTACTACTGT
L2K07 (3) scFv (VH-VL) (SEQ ID NO: 48)	GACATCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCTA GACCTGGAGCCTCTGTGAAGATGTCCTGTAAGACCTCT GGTTACACATTTACCAGATATACTATGCATTGGGTGAAA CAGAGACCAGGCCAGGGACTGGAGTGGATTGGGTACA TCAACCCTTCCAGAGGCTACACCAATTACAATCAGAAG TTTAAGGATAAAGCCACTCTGACCACTGACAAGTCCA GCAGCACAGCTTACATGCAGCTGAGCTCCCTGACATCT GAGGACTCTGCTGTGTATTATTGTGCAAGATATTATGAT GATCACTATTGCCTGGACTACTGGGGGCAGGGCACTAC ACTGACAGTGTCCTCTGTGGAAGGAGGTTCTGGAGGC TCTGGAGGCTCTGGGGGCTCTGGAGGAGTGGATGATAT CCAGCTGACACAGAGCCCTGCAATCATGTCTGCTTCTC CTGGAGAGAAAGTGACCATGACATGCAGAGCCTCATC CTCTGTGAGCTATATGAATTGGTACCAACAGAAGTCTG GGACATCCCCCAAGAGATGGATCTATGATACAAGCAAA GTGGCCTCTGGGGTGCCATACAGATTCTCTGGATCTGG CTCTGGAACATCCTACAGCCTGACTATTAGCAGTATGG AGGCTGAGGATGCTGCCACCTACTACTGCCAGCAGTG GTCCAGCAACCCACTGACCTTTGGAGCTGGAACCAAA CTGGAGCTGAAG
L2K07 (4) scFv (VH-VL) (SEQ ID NO: 49)	GACATCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCCA GACCTGGAGCCTCAGTGAAGATGAGCTGCAAAACATC TGGATACACCTTCACCAGATACACCATGCACTGGGTCA AGCAGAGACCTGGACAGGGACTGGAGTGGATTGGCTA TATTAACCCTTCTAGAGGCTACACCAACTACAACCAAA AGTTCAAGGACAAAGCCACACTGACCACAGACAAGTC CTCCAGCACTGCATACATGCAGTTGAGTAGCCTGACCT CAGAGGATTCTGCTGTGTACTATTGTGCTAGGTATTATG

[0220]

	ATGACCATTACTGTCTGGATTATTGGGGACAGGGCACC ACCCTGACAGTGAGCTCTGTGGAAGGAGGCTCTGGAG GCTCTGGAGGCTCTGGAGGCAGTGGAGGAGTGGATGA CATTCAGCTGACCCAGAGCCCTGCCATTATGTCTGCAT CACCAGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAGGGCAA GTTCTTCTGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAG TCTGGAACCTCCCCTAAAAGATGGATCTATGATACCAG TAAGGTGGCATCAGGAGTGCCCTACAGATTCTCTGGGT CTGGATCTGGAACAAGCTACTCCCTGACCATCTCTAGC ATGGAGGCTGAGGATGCTGCCACCTACTACTGCCAGCA GTGGTCCAGCAACCCCCTGACATTTGGGGCTGGGACC AAGCTGGAACTGAAA
huOKT3 scFv (VH-VL) (SEQ ID NO: 52)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGGGTGGTTC AGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGTCATGCAAGGCCTC AGGGTATACTTTCACCAGATATACAATGCACTGGGTGA GACAGGCCCCAGGCAAGGGACTGGAATGGATTGGCTA CATTAACCCATCTAGGGGATATACAAATTATAATCAGAA ATTCAAGGACAGATTTACAATCTCCAGGGACAACTCTA AGAATACTGCCTTTCTGCAGATGGACTCTCTGAGGCCT GAGGACACTGGAGTGTATTTCTGTGCCAGATACTATGA TGACCATTATTGTCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACAC CTGTGACAGTGTCCAGTGGAGGAGGAGGCTCAGGGG GAGGGGGCTCTGGAGGGGGAGGCTCTGATATCCAGAT GACCCAGTCCCCAAGTAGCCTGAGTGCCTCAGTGGGA GACAGAGTGACCATCACCTGCTCTGCAAGCAGCTCTG TGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGACACCAGGCAA GGCCCCCAAGAGGTGGATTTATGACACCTCCAAGCTG GCTTCTGGGGTGCCAAGCAGATTCTCAGGATCTGGAA GTGGGACAGACTACACATTTACCATCAGTTCACTGCAG CCTGAGGACATTGCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGTC CTCCAACCCCTTCACCTTTGGCCAGGGAACCAAGCTG CAGATCACCAGG

[0221] *下划线的文本表示scFv接头序列。

[0222] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含特异性结合CD3的scFv,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:16具有100%同一性的序列。

[0223] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含特异性结合CD3的scFv,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,特异性结合CD3的scFv包含与SEQ ID NO:17具有100%同一性的序列。

[0224] 示例性αGD2-αCD3双特异性融合蛋白

[0225] 下面列出的是本公开的双特异性融合蛋白的实例,其包含通过接头肽与CD3结合位点融合的GD2结合位点。

[0226] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含(i)GD2结合位点,其包含选自表2A中列出的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含选自表7的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自表5A中列出的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含(i)CD3结合位点,其包含选自表5A中列出的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列;(ii)包含选自表7的序列的接头肽;和(iii)GD2结合位点,其包含选自表2A中列出的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列。GD2结合位点和CD3结合位点的顺序并不意味着受到限制。例如,GD2结合位点位于双特异性融合蛋白的氨基末端,并且CD3结合位点位于双特异性融合蛋白的羧基末端。在一些实施方式中,CD3结合位点位于双特异性融合蛋白的氨基末端,并且GD2结合位点位于双特异性融合蛋白的羧基末端。

[0227] 表7-接头肽

[0228]

接头	序列
接头1(SEQ ID NO:20)	GGGGSGGGGSGGGGS
接头6(SEQ ID NO:25)	GGGGS

[0229] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0230] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;(ii)包含对应于SEQ ID NO:29的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0231] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0232] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0233] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别与表2A中列出的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含选自表7的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与表5A中列出的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0234] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别与对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含分别与对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0235] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别与对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少

96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含分别与对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VH结构域和VL结构域。

[0236] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别与对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含分别与对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VH结构域和VL结构域。

[0237] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含分别与对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VH结构域和VL结构域。

[0238] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含与表4A中列出的scFv序列具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含选自表7的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与表6A中列出的scFv序列具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0239] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0240] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0241] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0242] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0243] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含在GD2 scFv的VH结构域的C端、在GD2 scFv的VL结构域的C端、在CD3 scFv的VH结构域的C端和/或在CD3 scFv的VL结构域的C端与scFv接头肽的N端融合的间隔肽。在一些实施方式中,间隔肽包含选自表3B中列出的间隔序列的序列。

[0244] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白具有对应于表8A中所列序列的氨基酸序列。表8B列出了双特异性融合蛋白的相应核苷酸序列。

[0245] 表8A-双特异性融合蛋白氨基酸序列

[0246]

身份标识	氨基酸序列
hu3F8V5 scFv-	KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQK

[0247]

间隔子-huOKT3 scFv (SEQ ID NO: 9)	PGQAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQS EDFAVYFCQQDYSSFGQGTKLEIKR*GGGGSGGGGSGGG GS*QVQLVESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHW VRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNSSVKGRLTISKDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQG TLVTVSS**ASTKGP**GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGG VVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWI GYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLR PEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSS*GGGGS GGGGSGGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVS YMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGT DYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
hu3F8V5 scFv -huOKT3 scFv (SEQ ID NO: 10)	KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQK PGQAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQS EDFAVYFCQQDYSSFGQGTKLEIKR*GGGGSGGGGSGGG GS*QVQLVESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHW VRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNSSVKGRLTISKDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGR SLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPS RGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSS*GGGGSGGGGS GGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNW YQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTI SSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
hu3F8V5 scFv -L2K07 scFv (SEQ ID NO: 11)	KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQK PGQAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQS EDFAVYFCQQDYSSFGQGTKLEIKR*GGGGSGGGGSGGG GS*QVQLVESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHW VRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNSSVKGRLTISKDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQG TLVTVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGY TFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK DKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHY CLDYWGQGTTLTVSSVE*GGSGGSGGSGGS*GGVDDIQLTQ SPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPK RWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT YYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
14G2a scFv-huOKT3 scFv (SEQ ID NO: 12)	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVR QNIGKSLEWIGAIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSST AYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSS*GGG GSGGGGSGGGGS*DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQ SLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPD

[0248]

	RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFG AGTKLELGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPG RSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINP SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSS*GGGGSGGGGS* *GGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNW YQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTI SSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
14G2a scFv--L2K07 scFv (SEQ ID NO: 13)	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVR QNIGKSLEWIGAIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSST AYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSS*GGG* *GSGGGGSGGGGS*DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQ SLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFG AGTKLELGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSG YTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKF KDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDH YCLDYWGQGTTLTVSSVE*GGSGGSGGSGGS*GGVDDIQLT QSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSP KRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA TYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

[0249] *下划线的斜体文本表示scFv接头序列;下划线文本表示接头肽序列;粗体文本表示间隔序列。

[0250] 表8B-双特异性融合蛋白核苷酸序列

[0251]

身份标识	**核苷酸序列**
hu3F8V5 scFv 间隔子 -huOKT3 scFv (SEQ ID NO: 41)	AAGATTGTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTCTG TCTCTGCTGGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCAGGGC CAGCCAGTCTGTGAGCAATCATGTGACATGGTACCAGC AGAAACCTGGCCAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACTCT GCTTCTAATAGGTACACAGGCATCCCTGCCAGGTTCTC TGGCAGTGGGTATGGCACAGAGTTCACATTTACTATCA GCTCAGTGCAGTCAGAGGACTTTGCTGTGTATTTTTGC CAGCAGGACTACTCCTCTTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAAATTAAGAGAGGAGGTGGGGGGTCTGGGGGAG GGGGCAGTGGAGGGGGAGGATCCCAGGTGCAGCTGG TGGAGTCAGGACCAGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGGA GTCTGAGGCTGTCATGTGCTGTGTCAGGCTTCTCTGTG ACCAATTATGGAGTGCACTGGGTGAGACAGCCTCCAG GAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGGGTGATCTGGGCAGG AGGGATCACAAACTATAACAGCTCAGTGAAGGGAAGG CTGACAATCAGCAAAGATAATTCCAAGAACACAGTCTA

[0252]

	TCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACAGCA GTGTACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGACACTATGGCTA TGCCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAG TGAGCAGTGCCAGCACAAAGGGCCCAGGGGGAGGAG GCAGTGGAGGGGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGAGTC AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGGGTGGTTCA GCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGTCATGCAAGGCCTCA GGGTATACTTTCACCAGATATACAATGCACTGGGTGAG ACAGGCCCCAGGCAAGGGACTGGAATGGATTGGCTAC ATTAACCCATCTAGGGGATATACAAATTATAATCAGAAA TTCAAGGACAGATTTACAATCTCCAGGGACAACTCTAA GAATACTGCCTTTCTGCAGATGGACTCTCTGAGGCCTG AGGACACTGGAGTGTATTTCTGTGCCAGATACTATGAT GACCATTATTGTCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACACC TGTGACAGTGTCCAGTGGAGGAGGAGGCTCAGGGGG AGGGGGCTCTGGAGGGGGAGGCTCTGATATCCAGATG ACCCAGTCCCCAAGTAGCCTGAGTGCCTCAGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACCTGCTCTGCAAGCAGCTCTGT GTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGACACCAGGCAAG GCCCCCAAGAGGTGGATTTATGACACCTCCAAGCTGG CTTCTGGGGTGCCAAGCAGATTCTCAGGATCTGGAAGT GGGACAGACTACACATTTACCATCAGTTCACTGCAGCC TGAGGACATTGCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGTCCT CCAACCCCTTCACCTTTGGCCAGGGAACCAAGCTGCA GATCACCAGG
hu3F8V5 scFv -huOKT3 scFv (SEQ ID NO: 42)	AAGATTGTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTCTG TCTCTGCTGGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCAGGGC CAGCCAGTCTGTGAGCAATCATGTGACATGGTACCAGC AGAAACCTGGCCAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACTCT GCTTCTAATAGGTACACAGGCATCCCTGCCAGGTTCTC TGGCAGTGGGTATGGCACAGAGTTCACATTTACTATCA GCTCAGTGCAGTCAGAGGACTTTGCTGTGTATTTTTGC CAGCAGGACTACTCCTCTTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAAATTAAGAGAGGAGGTGGGGGGTCTGGGGGAG GGGGCAGTGGAGGGGGAGGATCCCAGGTGCAGCTGG TGGAGTCAGGACCAGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGGA GTCTGAGGCTGTCATGTGCTGTGTCAGGCTTCTCTGTG ACCAATTATGGAGTGCACTGGGTGAGACAGCCTCCAG GAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGGGTGATCTGGGCAGG AGGGATCACAAACTATAACAGCTCAGTGAAGGGAAGG CTGACAATCAGCAAAGATAATTCCAAGAACACAGTCTA TCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACAGCA GTGTACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGACACTATGGCTA

[0253]

	TGCCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAG TGAGCAGTGGGGGAGGAGGCAGTGGAGGGGGAGGAT CTGGAGGAGGAGGGAGTCAGGTGCAGCTGGTGCAGT CTGGAGGAGGGGTGGTTCAGCCTGGCAGAAGCCTGAG ACTGTCATGCAAGGCCTCAGGGTATACTTTCACCAGAT ATACAATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCAGGCAAGGG ACTGGAATGGATTGGCTACATTAACCCATCTAGGGGATA TACAAATTATAATCAGAAATTCAAGGACAGATTTACAAT CTCCAGGGACAACTCTAAGAATACTGCCTTTCTGCAGA TGGACTCTCTGAGGCCTGAGGACACTGGAGTGTATTTC TGTGCCAGATACTATGATGACCATTATTGTCTGGATTATT GGGGCCAGGGCACACCTGTGACAGTGTCCAGTGGAGG AGGAGGCTCAGGGGGAGGGGGCTCTGGAGGGGGAGG CTCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGTAGCCTGA GTGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGCTC TGCAAGCAGCTCTGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGC AGACACCAGGCAAGGCCCCCAAGAGGTGGATTTATGA CACCTCCAAGCTGGCTTCTGGGGTGCCAAGCAGATTCT CAGGATCTGGAAGTGGGACAGACTACACATTTACCATC AGTTCACTGCAGCCTGAGGACATTGCTACCTACTATTG TCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTTCACCTTTGGCCAGG GAACCAAGCTGCAGATCACCAGG
hu3F8V5 scFv - L2K07 scFv (SEQ ID NO: 43)	AAGATTGTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTCTG TCTCTGCTGGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCAGGGC CAGCCAGTCTGTGAGCAATCATGTGACATGGTACCAGC AGAAACCTGGCCAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACTCT GCTTCTAATAGGTACACAGGCATCCCTGCCAGGTTCTC TGGCAGTGGGTATGGCACAGAGTTCACATTTACTATCA GCTCAGTGCAGTCAGAGGACTTTGCTGTGTATTTTTGC CAGCAGGACTACTCCTCTTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAAATTAAGAGAGGAGGTGGGGGGTCTGGGGGAG GGGGCAGTGGAGGGGGAGGATCCCAGGTGCAGCTGG TGGAGTCAGGACCAGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGGA GTCTGAGGCTGTCATGTGCTGTGTCAGGCTTCTCTGTG ACCAATTATGGAGTGCACTGGGTGAGACAGCCTCCAG GAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGGGGTGATCTGGGCAGG AGGGATCACAAACTATAACAGCTCAGTGAAGGGAAGG CTGACAATCAGCAAAGATAATTCCAAGAACACAGTCTA TCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACAGCA GTGTACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGACACTATGGCTA TGCCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAG TGAGCAGTGGGGGAGGAGGCAGTGACATTAAGCTGCA GCAAAGTGGAGCTGAGCTGGCTAGACCTGGAGCCAGT

		GTGAAGATGAGCTGTAAAACATCTGGGTATACTTTCAC CAGATACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCAGGA CAGGGACTGGAATGGATTGGGTACATCAACCCTTCCAG AGGCTACACAAACTACAACCAGAAATTCAAGGATAAG GCTACCCTCACTACAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTA CATGCAGCTGTCAAGTCTCACCTCAGAGGACTCAGCT GTGTACTACTGTGCAAGGTATTATGATGACCACTATTGC CTGGACTATTGGGGTCAGGGCACCACACTGACAGTGA GCTCAGTGGAGGGGGGCTCTGGAGGCAGTGGAGGATC TGGAGGCTCTGGAGGGGTGGATGATATCCAGCTGACCC AGAGCCCTGCCATCATGTCAGCTTCTCCAGGGGAGAA GGTGACAATGACCTGCAGAGCCAGCAGCTCTGTGTCTT ACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCAGGTACTTCTCCC AAGAGATGGATATATGATACTAGCAAGGTGGCCAGTGG AGTGCCCTACAGGTTCTCTGGAAGTGGGTCAGGCACA AGCTATAGCCTGACCATTTCCTCTATGGAAGCAGAGGA TGCAGCTACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTTCCAACC CCCTGACTTTTGGAGCAGGAACCAAACTGGAGCTGAAA A
[0254]	14G2a scFv-huOKT3 scFv (SEQ ID NO: 44)	GAGGTGCAGCTGCTGCAGAGTGGGCCAGAGCTGGAG AAGCCCGGGGCCTCTGTGATGATCTCTTGCAAGGCCTC AGGAAGCTCCTTCACAGGTTACAACATGAATTGGGTGC GCCAGAATATTGGTAAAAGCCTGGAATGGATTGGAGCC ATTGACCCCTATTATGGGGGCACTTCCTACAATCAGAA GTTCAAAGGAAGAGCAACACTGACTGTGGATAAGTCC TCTAGCACAGCCTACATGCACCTGAAATCTCTGACAAG TGAGGATAGTGCAGTGTACTATTGTGTCTCAGGGATGG AATATTGGGGCCAGGGAACCTCTGTGACAGTGAGCAG TGGAGGGGGAGGCTCAGGAGGGGGAGGGTCCGGGGG CGGAGGGAGTGATGTGGTGATGACACAGACCCCTCTG AGCCTGCCAGTGTCCCTGGGAGACCAGGCCTCTATCA GCTGCAGGTCCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGGAATGG CAACACATACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCC AGAGTCCAAAGCTGCTCATCCACAAGGTGTCCAACAG ATTTTCAGGAGTGCCAGACAGGTTCTCCGGCTCAGGCT CTGGAACTGACTTTACACTCAAGATCAGCAGGGTGGA GGCTGAGGACTTGGGAGTGTATTTCTGTAGCCAGAGC ACCCATGTGCCTCCTCTGACTTTTGGGGCCGGTACTAA GCTGGAGCTGGGGGGAGGAGGCAGTGGAGGGGGAGG ATCTGGAGGAGGAGGGAGTCAGGTGCAGCTGGTGCAG TCTGGAGGAGGGGTGGTTCAGCCTGGCAGAAGCCTGA GACTGTCATGCAAGGCCTCAGGGTATACTTTCACCAGA TATACAATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCAGGCAAGG

[0255]

	GACTGGAATGGATTGGCTACATTAACCCATCTAGGGGA TATACAAATTATAATCAGAAATTCAAGGACAGATTTACA ATCTCCAGGGACAACTCTAAGAATACTGCCTTTCTGCA GATGGACTCTCTGAGGCCTGAGGACACTGGAGTGTATT TCTGTGCCAGATACTATGATGACCATTATTGTCTGGATT ATTGGGGCCAGGGCACACCTGTGACAGTGTCCAGTGG AGGAGGAGGCTCAGGGGGAGGGGGCTCTGGAGGGGG AGGCTCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGTAGCC TGAGTGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTG CTCTGCAAGCAGCTCTGTGTCCTACATGAACTGGTATC AGCAGACACCAGGCAAGGCCCCCAAGAGGTGGATTTA TGACACCTCCAAGCTGGCTTCTGGGGTGCCAAGCAGA TTCTCAGGATCTGGAAGTGGGACAGACTACACATTTAC CATCAGTTCACTGCAGCCTGAGGACATTGCTACCTACT ATTGTCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTTCACCTTTGGC CAGGGAACCAAGCTGCAGATCACCAGG
14G2a scFv--L2K07 scFv (SEQ ID NO: 45)	GAGGTGCAGCTGCTGCAGAGTGGGCCAGAGCTGGAG AAGCCCGGGGCCTCTGTGATGATCTCTTGCAAGGCCTC AGGAAGCTCCTTCACAGGTTACAACATGAATTGGGTGC GCCAGAATATTGGTAAAAGCCTGGAATGGATTGGAGCC ATTGACCCCTATTATGGGGGCACTTCCTACAATCAGAA GTTCAAAGGAAGAGCAACACTGACTGTGGATAAGTCC TCTAGCACAGCCTACATGCACCTGAAATCTCTGACAAG TGAGGATAGTGCAGTGTACTATTGTGTCTCAGGGATGG AATATTGGGGCCAGGGAACCTCTGTGACAGTGAGCAG TGGAGGGGGAGGCTCAGGAGGGGGAGGGTCCGGGGG CGGAGGGAGTGATGTGGTGATGACACAGACCCCTCTG AGCCTGCCAGTGTCCCTGGGAGACCAGGCCTCTATCA GCTGCAGGTCCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGGAATGG CAACACATACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCC AGAGTCCAAAGCTGCTCATCCACAAGGTGTCCAACAG ATTTTCAGGAGTGCCAGACAGGTTCTCCGGCTCAGGCT CTGGAACTGACTTTACACTCAAGATCAGCAGGGTGGA GGCTGAGGACTTGGGAGTGTATTTCTGTAGCCAGAGC ACCCATGTGCCTCCTCTGACTTTTGGGGCCGGTACTAA GCTGGAGCTGGGGGGAGGAGGCAGTGACATTAAGCTG CAGCAAAGTGGAGCTGAGCTGGCTAGACCTGGAGCCA GTGTGAAGATGAGCTGTAAAACATCTGGGTATACTTTC ACCAGATACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCAG GACAGGGACTGGAATGGATTGGGTACATCAACCCTTCC AGAGGCTACACAAACTACAACCAGAAATTCAAGGATA AGGCTACCCTCACTACAGACAAGTCATCCAGCACAGC CTACATGCAGCTGTCAAGTCTCACCTCAGAGGACTCA

[0256]

	GCTGTGTACTACTGTGCAAGGTATTATGATGACCACTAT TGCCTGGACTATTGGGGTCAGGGCACCACACTGACAG TGAGCTCAGTGGAGGGGGGCTCTGGAGGCAGTGGAG GATCTGGAGGCTCTGGAGGGGTGGATGATATCCAGCTG ACCCAGAGCCCTGCCATCATGTCAGCTTCTCCAGGGGA GAAGGTGACAATGACCTGCAGAGCCAGCAGCTCTGTG TCTTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCAGGTACTTC TCCCAAGAGATGGATATATGATACTAGCAAGGTGGCCA GTGGAGTGCCCTACAGGTTCTCTGGAAGTGGGTCAGG CACAAGCTATAGCCTGACCATTTCCTCTATGGAAGCAG AGGATGCAGCTACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTTCC AACCCCCTGACTTTTGGAGCAGGAACCAAACTGGAGC TGAAA

[0257] 除了表8A中所示的序列之外,本公开的双特异性融合蛋白还可以包含与N端融合的信号肽。应当理解,表达信号肽从其切割的蛋白质的成熟形式。

[0258] 例如,本公开的双特异性融合蛋白进一步包含信号肽,所述信号肽包含与SEQ ID NO:26至少85%相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0259] 信号肽序列:

[0260] MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWAA

[0261] (SEQ ID NO:26)

[0262] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少约85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少约90%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少约95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少约96%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少约97%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少约98%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少约99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有100%同一性的氨基酸序列。

[0263] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少约85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少约90%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少约95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少约96%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至

少约97％同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少约98％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少约99％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有100％同一性的氨基酸序列。

[0264] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少约85％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少约90％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少约95％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少约96％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少约97％同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少约98％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少约99％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有100％同一性的氨基酸序列。

[0265] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少约85％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少约90％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少约95％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少约96％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少约97％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少约98％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少约99％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有100％同一性的氨基酸序列。

[0266] 在一些实施方式中,本公开的双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少85％序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少约85％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少约90％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少约95％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少约96％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少约97％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少约98％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少约99％同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性融合蛋白包

含与SEQ ID NO:13具有100%同一性的氨基酸序列。

[0267] 示例性rAAV载体

[0268] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含对应于表8B中列出的任一序列的转基因核苷酸序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,转基因包含与SEQ ID NO:41-45中的任一个具有100%同一性的序列。

[0269] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含与SEQ ID NO:41具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0270] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含与SEQ ID NO:42具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0271] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含与SEQ ID NO:43具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0272] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含与SEQ ID NO:44具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0273] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含与SEQ ID NO:45具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0274] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含一个或多于一个调控元件。在一些实施方式中,一个或多于一个调控元件在编码双特异性融合蛋白的序列的5'侧。在一些实施方式中,一个或多于一个调控元件在编码双特异性融合蛋白的序列的3'侧。例如,在一些实施方式中,调控元件在编码双特异性融合蛋白的序列的3'侧,并且衍生自土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。在一些实施方式中,调控元件与SEQ ID NO:64至少85%相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少100%)。在一些实施方式中,WPRE包含与SEQ ID NO:64具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,WPRE包含与SEQ ID NO:64具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,WPRE包含与SEQ ID NO:64具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,WPRE包含与SEQ ID NO:64具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,WPRE包含与SEQ ID NO:64具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,WPRE包含与SEQ ID NO:64具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,WPRE包含

与SEQ ID NO:64具有至少约99％同一性的序列。在一些实施方式中,WPRE包含与SEQ ID NO:64具有100％同一性的序列。

[0275] WPRE源的调控元件:

[0276] TAACGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGG

[0277] (SEQ ID NO:64)

[0278] 在一些实施方式中,调控元件在编码双特异性融合蛋白的序列的3’侧,并且是修饰的RNA稳定性调控元件(MRE)。在一些实施方式中,调控元件与SEQ ID NO:123至少85％相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有至少约85％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有至少约90％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有至少约95％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有至少约96％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有至少约97％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有至少约98％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有至少约99％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:123具有100％同一性的序列。

[0279] 在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有至少约85％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有至少约90％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有至少约95％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有至少约96％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有至少约97％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有至少约98％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有至少约99％同一性的序列。在一些实施方式中,MRE包含与SEQ ID NO:124具有100％同一性的序列。

[0280] 修饰的RNA稳定性调控元件(MRE)变体1

[0281] CGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGG

[0282] (SEQ ID NO:123)

[0283] 修饰的RNA稳定性调控元件(MRE)变体2

[0284] GAGCATCTTACCGCCATTTATACCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTC

[0285] (SEQ ID NO:124)

[0286] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体具有与表9中列出的核苷酸序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸序列。

[0287] 表9-示例性AAV2载体序列

[0288]

构建体	核苷酸序列

[0289]

AAV2-hu3F8V5-间隔子-接头-huOKT3 (SEQ ID NO: 53)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTTGT ATAGAAAAGTTGCTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAA TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTA TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGT GAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGC GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC GGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCG CCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTC CGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCT TTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAG GGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGC GTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCG CTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGG GCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGC CGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGG GGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGG TGAGCAGGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCG GCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGT GCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGC TGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGT AATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAA TCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCC CCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGC AGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCC

[0290]

	GCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGT CCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG GGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAG AGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTAC AGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCA TTTTGGCAAAGAATTGCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TGCCACCATGTGGTGGAGACTGTGGTGGCTGCTGCTGCT CCTGCTGCTGCTGTGGCCTATGGTGTGGGCTGCCAAGATT GTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTCTGTCTCTGCT GGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCT GTGAGCAATCATGTGACATGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACTCTGCTTCTAATAGGT ACACAGGCATCCCTGCCAGGTTCTCTGGCAGTGGGTATGG CACAGAGTTCACATTTACTATCAGCTCAGTGCAGTCAGAG GACTTTGCTGTGTATTTTTGCCAGCAGGACTACTCCTCTTT TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATTAAGAGAGGAGGTG GGGGGTCTGGGGGAGGGGGCAGTGGAGGGGGAGGATCC CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGACCAGGAGTGGTGCA GCCTGGCAGGAGTCTGAGGCTGTCATGTGCTGTGTCAGG CTTCTCTGTGACCAATTATGGAGTGCACTGGGTGAGACAG CCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGGGTGATCTGG GCAGGAGGGATCACAAACTATAACAGCTCAGTGAAGGGA AGGCTGACAATCAGCAAAGATAATTCCAAGAACACAGTC TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACAGCA GTGTACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGACACTATGGCTATG CCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTGA GCAGTGCCAGCACAAAGGGCCCAGGGGGAGGAGGCAGT GGAGGGGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGAGTCAGGTGCA GCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGGGTGGTTCAGCCTGGCAG AAGCCTGAGACTGTCATGCAAGGCCTCAGGGTATACTTTC ACCAGATATACAATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCAGGC AAGGGACTGGAATGGATTGGCTACATTAACCCATCTAGGG GATATACAAATTATAATCAGAAATTCAAGGACAGATTTACA ATCTCCAGGGACAACTCTAAGAATACTGCCTTTCTGCAGA TGGACTCTCTGAGGCCTGAGGACACTGGAGTGTATTTCTG TGCCAGATACTATGATGACCATTATTGTCTGGATTATTGGG GCCAGGGCACACCTGTGACAGTGTCCAGTGGAGGAGGA GGCTCAGGGGGAGGGGGCTCTGGAGGGGGAGGCTCTGAT ATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGTAGCCTGAGTGCCTCA GTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGCTCTGCAAGCAGC TCTGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGACACCAGGCA AGGCCCCCAAGAGGTGGATTTATGACACCTCCAAGCTGG CTTCTGGGGTGCCAAGCAGATTCTCAGGATCTGGAAGTG

[0291]

GGACAGACTACACATTTACCATCAGTTCACTGCAGCCTGA
GGACATTGCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGTCCTCCAAC
CCCTTCACCTTTGGCCAGGGAACCAAGCTGCAGATCACC
AGGTGAGAATTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATT
TGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTT
TACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG
CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATA
AATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGA
CGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCA
GCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCA
CGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGA
CAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGT
TGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTG
TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC
GTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCG
GCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCT
TCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCC
CCGCATCGGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATTCC
TAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC
CAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAA
TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTA
TTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG
GATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGC
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC
CCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA
GCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTA
TTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATAC
GTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTA
AGCGCGGCGGGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCT
ACACTTGCCAGCGCCTTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCT
TCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCA
AGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGT
GCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGTG
ATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTT
TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGA
CTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACTCTATCTCGG
GCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGTCT
ATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC
GAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCA
CTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCA

[0292]

	GCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
	GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTG
	ACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGT
	CATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATAC
	GCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTT
	AGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA
	CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC
	CGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAT
	TGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCG
	CCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTG
	CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAG
	ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT
	CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGA
	ACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTG
	GCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACT
	CGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAG
	TACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGA
	CAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGA
	TAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
	ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA
	TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAAT
	GAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCT
	GTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGC
	GAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
	GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCT
	CGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
	AGCCGGTGAGCGTGGAAGCCGCGGTATCATTGCAGCACT
	GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC
	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGA
	CAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
	AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT
	TTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGAT
	CCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT
	TTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCA
	AAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
	TGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTT
	TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGG
	TAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCT
	TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
	GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
	AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGG
	GTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG
	GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT

[0293]

	GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCG TGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG TATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTA TGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTG GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT
AAV2-hu3F8V5-接头-huOKT3 (SEQ ID NO: 54)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTTGT ATAGAAAAGTTGCTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAA TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTA TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGT GAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGC GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC GGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCG CCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTC CGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCT TTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAG GGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGC GTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCG CTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGG GCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGC CGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGG GGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGG TGAGCAGGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCG GCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG

[0294]

	CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGT GCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGC TGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGT AATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAA TCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCC CCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGC AGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCC GCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGT CCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG GGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAG AGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTAC AGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCA TTTTGGCAAAGAATTGCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TGCCACCATGTGGTGGAGACTGTGGTGGCTGCTGCTGCT CCTGCTGCTGCTGTGGCCTATGGTGTGGGCTGCCAAGATT GTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTCTGTCTCTGCT GGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCT GTGAGCAATCATGTGACATGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACTCTGCTTCTAATAGGT ACACAGGCATCCCTGCCAGGTTCTCTGGCAGTGGGTATGG CACAGAGTTCACATTTACTATCAGCTCAGTGCAGTCAGAG GACTTTGCTGTGTATTTTTGCCAGCAGGACTACTCCTCTTT TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATTAAGAGAGGAGGTG GGGGGTCTGGGGGAGGGGGCAGTGGAGGGGGAGGATCC CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGACCAGGAGTGGTGCA GCCTGGCAGGAGTCTGAGGCTGTCATGTGCTGTGTCAGG CTTCTCTGTGACCAATTATGGAGTGCACTGGGTGAGACAG CCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGGGTGATCTGG GCAGGAGGGATCACAAACTATAACAGCTCAGTGAAGGGA AGGCTGACAATCAGCAAAGATAATTCCAAGAACACAGTC TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACAGCA GTGTACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGACACTATGGCTATG CCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTGA GCAGTGGGGGAGGAGGCAGTGGAGGGGGAGGATCTGGA GGAGGAGGGAGTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGG AGGGGTGGTTCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGTCATG CAAGGCCTCAGGGTATACTTTCACCAGATATACAATGCAC TGGGTGAGACAGGCCCCAGGCAAGGGACTGGAATGGATT GGCTACATTAACCCATCTAGGGGATATACAAATTATAATCA GAAATTCAAGGACAGATTTACAATCTCCAGGGACAACTCT AAGAATACTGCCTTTCTGCAGATGGACTCTCTGAGGCCTG AGGACACTGGAGTGTATTTCTGTGCCAGATACTATGATGA

[0295]

CCATTATTGTCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACACCTGTG
ACAGTGTCCAGTGGAGGAGGAGGCTCAGGGGGAGGGGG
CTCTGGAGGGGGAGGCTCTGATATCCAGATGACCCAGTCC
CCAAGTAGCCTGAGTGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACC
ATCACCTGCTCTGCAAGCAGCTCTGTGTCCTACATGAACT
GGTATCAGCAGACACCAGGCAAGGCCCCCAAGAGGTGGA
TTTATGACACCTCCAAGCTGGCTTCTGGGGTGCCAAGCAG
ATTCTCAGGATCTGGAAGTGGGACAGACTACACATTTACC
ATCAGTTCACTGCAGCCTGAGGACATTGCTACCTACTATT
GTCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTTCACCTTTGGCCAGG
GAACCAAGCTGCAGATCACCAGGTGAGAATTCCGATAAT
CAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTA
TTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCT
GCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTT
TATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTG
GTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGG
GGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCG
CTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGC
CTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG
CACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCC
TTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC
GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCC
AGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCG
GCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGG
ATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGACCCAGCTTT
CTTGTACAAAGTGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCC
TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC
CCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC
CACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG
GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCA
GGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGA
GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG
GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCC
CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT
GCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTG
TGCGGTATTTCACACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTA
CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGGGTGGT
GGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCTT
AGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCA
CGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCT
CCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGAC

[0296]

CCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGC
CATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGA
GTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGA
ACAACACTCAACTCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATA
AGGGATTTTGCCGATTTCGGTCTATTGGTTAAAAAATGAG
CTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATT
AACGTTTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCT
CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAA
CACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGG
CATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCT
GCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCG
CGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGT
TAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCA
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTT
TTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA
ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTT
TGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACG
CTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
ATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA
TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC
CGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATA
CACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT
ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCC
AACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCC
TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAA
CAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCT
AGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT
AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT
GGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
GAAGCCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTA
AGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCA
GGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAG
TTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTT
AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTC
ATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAG
CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG
ATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA

		AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC AGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGT AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAAC GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGA CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT ATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACG AGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTC CTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG CCTTTTGCTCACATGT
[0297]	AAV2-hu3F8V5-接头-CD3 (SEQ ID NO: 55)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTTGT ATAGAAAAGTTGCTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAA TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTA TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGT GAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGC GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC GGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCG CCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTC CGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCT TTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAG GGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGC

[0298]

GTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCG
CTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGG
GCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGC
CGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGG
GGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGG
TGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC
CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCG
GCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG
CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGT
GCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGC
TGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGT
AATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAA
TCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCC
CCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGC
AGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCC
GCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGT
CCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG
GGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAG
AGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTAC
AGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCA
TTTTGGCAAAGAATTGCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
TGCCACCATGTGGTGGAGACTGTGGTGGCTGCTGCTGCT
CCTGCTGCTGCTGTGGCCTATGGTGTGGGCTGCCAAGATT
GTGATGACCCAGACACCAGCCACACTGTCTGTCTCTGCT
GGGGAGAGGGTCACAATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCT
GTGAGCAATCATGTGACATGGTACCAGCAGAAACCTGGC
CAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACTCTGCTTCTAATAGGT
ACACAGGCATCCCTGCCAGGTTCTCTGGCAGTGGGTATGG
CACAGAGTTCACATTTACTATCAGCTCAGTGCAGTCAGAG
GACTTTGCTGTGTATTTTTGCCAGCAGGACTACTCCTCTTT
TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATTAAGAGAGGAGGTG
GGGGGTCTGGGGGAGGGGGCAGTGGAGGGGGAGGATCC
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGACCAGGAGTGGTGCA
GCCTGGCAGGAGTCTGAGGCTGTCATGTGCTGTGTCAGG
CTTCTCTGTGACCAATTATGGAGTGCACTGGGTGAGACAG
CCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGGGTGATCTGG
GCAGGAGGGATCACAAACTATAACAGCTCAGTGAAGGGA
AGGCTGACAATCAGCAAAGATAATTCCAAGAACACAGTC
TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACAGCA
GTGTACTACTGTGCAAGCAGAGGAGGACACTATGGCTATG
CCCTGGATTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTGA
GCAGTGGGGGAGGAGGCAGTGACATTAAGCTGCAGCAA

[0299]

	AGTGGAGCTGAGCTGGCTAGACCTGGAGCCAGTGTGAAG ATGAGCTGTAAAACATCTGGGTATACTTTCACCAGATACA CCATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGACTG GAATGGATTGGGTACATCAACCCTTCCAGAGGCTACACAA ACTACAACCAGAAATTCAAGGATAAGGCTACCCTCACTAC AGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGCAGCTGTCAAG TCTCACCTCAGAGGACTCAGCTGTGTACTACTGTGCAAG GTATTATGATGACCACTATTGCCTGGACTATTGGGGTCAGG GCACCACACTGACAGTGAGCTCAGTGGAGGGGGGCTCTG GAGGCAGTGGAGGATCTGGAGGCTCTGGAGGGGTGGATG ATATCCAGCTGACCCAGAGCCCTGCCATCATGTCAGCTTC TCCAGGGGAGAAGGTGACAATGACCTGCAGAGCCAGCA GCTCTGTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCAGG TACTTCTCCCAAGAGATGGATATATGATACTAGCAAGGTG GCCAGTGGAGTGCCCTACAGGTTCTCTGGAAGTGGGTCA GGCACAAGCTATAGCCTGACCATTTCCTCTATGGAAGCAG AGGATGCAGCTACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTTCCAA CCCCCTGACTTTTGGAGCAGGAACCAAACTGGAGCTGAA ATGAGAATTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGT GAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTAC GCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTAT TGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATC CTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTC AGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCA ACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCC TTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGC GGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCG GGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTG CCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCC TTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTG CTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCC CTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCA TCGGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATTCCTAGAG CTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG GAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG GGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGA ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA

[0300]

GCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTC
TCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACGTCA
AAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
GCGGCGGGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACA
CTTGCCAGCGCCTTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCC
CTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGC
TCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT
TACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATG
GTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTC
TTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACTCTATCTCGGGCT
ATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGTCTATT
GGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAA
TTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACTC
TCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCC
CCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGC
TTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACC
GTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCAT
CACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCC
TATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGA
CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCC
CTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
TCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGA
AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCC
TTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTC
ACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATC
AGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCA
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAC
GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC
GCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCG
GTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA
CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGAT
AACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGAT
CATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG
AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG
TAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCG
AACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTG
GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGGTGAGCGTGGAAGCCGCGGTATCATTGCAGCACTG
GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACA

[0301]

	CGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT TAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC CTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT GCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTT GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTT CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTG TAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA GTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGT TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG AGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAG GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGG AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT ATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAG CGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGG CCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT
AAV2 14G2a-接头 -huOKT3 (SEQ ID NO: 56)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTTGT ATAGAAAAGTTGCTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAA TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTA TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGT GAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGC GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC

[0302]

GGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA
GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCG
CCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT
TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTC
CGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCT
TTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAG
GGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGC
GTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCG
CTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGG
GCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGC
CGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGG
GGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGG
TGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC
CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCG
GCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG
CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGT
GCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGC
TGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGT
AATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAA
TCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCC
CCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGC
AGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCC
GCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGT
CCGCGGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG
GGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAG
AGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTAC
AGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCA
TTTTGGCAAAGAATTGCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
TGCCACCATGTGGTGGAGGCTGTGGTGGCTGCTGCTCCT
GCTGCTGCTGTTGTGGCCAATGGTGTGGGCTGCAGAGGT
GCAGCTGCTGCAGAGTGGGCCAGAGCTGGAGAAGCCCG
GGGCCTCTGTGATGATCTCTTGCAAGGCCTCAGGAAGCTC
CTTCACAGGTTACAACATGAATTGGGTGCGCCAGAATATT
GGTAAAAGCCTGGAATGGATTGGAGCCATTGACCCCTATT
ATGGGGGCACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGAAGAG
CAACACTGACTGTGGATAAGTCCTCTAGCACAGCCTACAT
GCACCTGAAATCTCTGACAAGTGAGGATAGTGCAGTGTA
CTATTGTGTCTCAGGGATGGAATATTGGGGCCAGGGAACC
TCTGTGACAGTGAGCAGTGGAGGGGGAGGCTCAGGAGG
GGGAGGGTCCGGGGGCGGAGGGAGTGATGTGGTGATGA
CACAGACCCCTCTGAGCCTGCCAGTGTCCCTGGGAGACC
AGGCCTCTATCAGCTGCAGGTCCAGCCAGAGCCTGGTGC

[0303]

	ACAGGAATGGCAACACATACCTGCACTGGTATCTGCAGA AGCCTGGCCAGAGTCCAAAGCTGCTCATCCACAAGGTGT CCAACAGATTTTCAGGAGTGCCAGACAGGTTCTCCGGCT CAGGCTCTGGAACTGACTTTACACTCAAGATCAGCAGGG TGGAGGCTGAGGACTTGGGAGTGTATTTCTGTAGCCAGA GCACCCATGTGCCTCCTCTGACTTTTGGGGCCGGTACTAA GCTGGAGCTGGGGGGAGGAGGCAGTGGAGGGGGAGGAT CTGGAGGAGGAGGGAGTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT GGAGGAGGGGTGGTTCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACT GTCATGCAAGGCCTCAGGGTATACTTTCACCAGATATACA ATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCAGGCAAGGGACTGGA ATGGATTGGCTACATTAACCCATCTAGGGGATATACAAATT ATAATCAGAAATTCAAGGACAGATTTACAATCTCCAGGGA CAACTCTAAGAATACTGCCTTTCTGCAGATGGACTCTCTG AGGCCTGAGGACACTGGAGTGTATTTCTGTGCCAGATACT ATGATGACCATTATTGTCTGGATTATTGGGGCCAGGGCAC ACCTGTGACAGTGTCCAGTGGAGGAGGAGGCTCAGGGG GAGGGGGCTCTGGAGGGGGAGGCTCTGATATCCAGATGA CCCAGTCCCCAAGTAGCCTGAGTGCCTCAGTGGGAGACA GAGTGACCATCACCTGCTCTGCAAGCAGCTCTGTGTCCTA CATGAACTGGTATCAGCAGACACCAGGCAAGGCCCCCAA GAGGTGGATTTATGACACCTCCAAGCTGGCTTCTGGGGTG CCAAGCAGATTCTCAGGATCTGGAAGTGGGACAGACTAC ACATTTACCATCAGTTCACTGCAGCCTGAGGACATTGCTA CCTACTATTGTCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTTCACCTT TGGCCAGGGAACCAAGCTGCAGATCACCAGGTGAGAATT CCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATT GACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTG GATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCC GTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGC TGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACG TGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCAC TGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCA TCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGC TGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATC ATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCC TCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGC TCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACG AGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGACCC AGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGA TCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG

[0304]

TTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
CACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCA
TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTG
GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAG
AATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAG
TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCT
CACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGG
GCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTAC
GCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACGTCAAAGCAAC
CATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGG
GGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA
GCGCCTTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTT
CTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATC
GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGT
AGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGA
CGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACTCTATCTCGGGCTATTCTTTT
GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGTCTATTGGTTAAA
AAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAC
AAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTG
CTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCG
GGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGA
AACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTT
ATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAG
GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG
ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG
AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
CTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAG
AAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
GTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCC
AATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTA
TTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCC
GCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACC
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAG
AGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT
GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAG
GAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA

[0305]

	CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAT GGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTT ACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCC GGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAG CGTGGAAGCCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTG AGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTC TTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA CAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGG ATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTT CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCA AGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGA ACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAAC GACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA GAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAC GAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT CCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTG GCCTTTTGCTCACATGT
AAV2-14G2a –接头-CD3 (SEQ ID NO: 57)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTTGT ATAGAAAAGTTGCTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAA TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTA

[0306]

TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGT
GAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC
TCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG
CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGC
GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG
CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC
GGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA
GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCG
CCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT
TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTC
CGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCT
TTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAG
GGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGC
GTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCG
CTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGG
GCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGC
CGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGG
GGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGG
TGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC
CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCG
GCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG
CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGT
GCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGC
TGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGT
AATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAA
TCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCC
CCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGC
AGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCC
GCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGT
CCGCGGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG
GGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAG
AGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTAC
AGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCA
TTTTGGCAAAGAATTGCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
TGCCACCATGTGGTGGAGGCTGTGGTGGCTGCTGCTCCT
GCTGCTGCTGTTGTGGCCAATGGTGTGGGCTGCAGAGGT
GCAGCTGCTGCAGAGTGGGCCAGAGCTGGAGAAGCCCG
GGGCCTCTGTGATGATCTCTTGCAAGGCCTCAGGAAGCTC
CTTCACAGGTTACAACATGAATTGGGTGCGCCAGAATATT
GGTAAAAGCCTGGAATGGATTGGAGCCATTGACCCCTATT

[0307]

	ATGGGGGCACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGAAGAG CAACACTGACTGTGGATAAGTCCTCTAGCACAGCCTACAT GCACCTGAAATCTCTGACAAGTGAGGATAGTGCAGTGTA CTATTGTGTCTCAGGGATGGAATATTGGGGCCAGGGAACC TCTGTGACAGTGAGCAGTGGAGGGGGAGGCTCAGGAGG GGGAGGGTCCGGGGGCGGAGGGAGTGATGTGGTGATGA CACAGACCCCTCTGAGCCTGCCAGTGTCCCTGGGAGACC AGGCCTCTATCAGCTGCAGGTCCAGCCAGAGCCTGGTGC ACAGGAATGGCAACACATACCTGCACTGGTATCTGCAGA AGCCTGGCCAGAGTCCAAAGCTGCTCATCCACAAGGTGT CCAACAGATTTTCAGGAGTGCCAGACAGGTTCTCCGGCT CAGGCTCTGGAACTGACTTTACACTCAAGATCAGCAGGG TGGAGGCTGAGGACTTGGGAGTGTATTTCTGTAGCCAGA GCACCCATGTGCCTCCTCTGACTTTTGGGGCCGGTACTAA GCTGGAGCTGGGGGGAGGAGGCAGTGACATTAAGCTGCA GCAAAGTGGAGCTGAGCTGGCTAGACCTGGAGCCAGTGT GAAGATGAGCTGTAAAACATCTGGGTATACTTTCACCAGA TACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGG ACTGGAATGGATTGGGTACATCAACCCTTCCAGAGGCTAC ACAAACTACAACCAGAAATTCAAGGATAAGGCTACCCTC ACTACAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGCAGCTG TCAAGTCTCACCTCAGAGGACTCAGCTGTGTACTACTGTG CAAGGTATTATGATGACCACTATTGCCTGGACTATTGGGGT CAGGGCACCACACTGACAGTGAGCTCAGTGGAGGGGGG CTCTGGAGGCAGTGGAGGATCTGGAGGCTCTGGAGGGGT GGATGATATCCAGCTGACCCAGAGCCCTGCCATCATGTCA GCTTCTCCAGGGGAGAAGGTGACAATGACCTGCAGAGCC AGCAGCTCTGTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGT CAGGTACTTCTCCCAAGAGATGGATATATGATACTAGCAA GGTGGCCAGTGGAGTGCCCTACAGGTTCTCTGGAAGTGG GTCAGGCACAAGCTATAGCCTGACCATTTCCTCTATGGAA GCAGAGGATGCAGCTACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTT CCAACCCCCTGACTTTTGGAGCAGGAACCAAACTGGAGC TGAAATGAGAATTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAA TTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCT TTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCAT GCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTAT AAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCG TTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTC AGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC ACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGG ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTG

[0308]

TTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCT
GTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTA
CGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGC
GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCC
TTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTC
CCCGCATCGGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATTC
CTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG
CCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAA
ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGA
GGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCG
CAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG
CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCG
AGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGT
ATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATA
CGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AAGCGCGGCGGGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC
TACACTTGCCAGCGCCTTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC
TTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAG
TGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGT
GATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGG
ACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACTCTATCTCG
GGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGT
CTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAC
GCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTG
CACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGC
CAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGA
CGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTG
TGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACC
GTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGAT
ACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTC
TTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA
TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAAT
ATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGT
CGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTT
TGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGA
TCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAA

[0309]

	GAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTAT GTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCA ACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTT GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC ATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTG AATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTG GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGA CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCG CTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG GAGCCGGTGAGCGTGGAAGCCGCGGTATCATTGCAGCAC TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTA CACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGG TAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGA TTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGA TCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAG TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCA AAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC TGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTT TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGG TAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCT TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGG GTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCG TGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG TATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTA TGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTG GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

[0310] 在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:53-57中任一个具有至少约85%同一性的序列。在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:53-57中任一个具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:53-57中任一个具有至少约95%同一性的序列。在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:53-57中任一个具有至少约96%同一性的序列。在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:53-57中任一个具有至少约97%同一性的序列。在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:53-57中任一个具有至少约98%同一性的序列。在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:53-57中任一个具有至少约99%同一性的序列。在一些实施方式中,rAAV载体包含与SEQ ID

NO:53-57中任一个具有100%同一性的序列。

[0311] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体具有与SEQ ID NO:53至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸序列。

[0312] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体具有与SEQ ID NO:54至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸序列。

[0313] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体具有与SEQ ID NO:55至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸序列。

[0314] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体具有与SEQ ID NO:56至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸序列。

[0315] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体具有与SEQ ID NO:57至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸序列。

[0316] 在一些实施方式中,本公开的rAAV载体包含一种或多种组分(例如,调控元件、转基因),其与亲本等同物相比包含减少的CpG二核苷酸和/或增加的CpG二核苷酸甲基化。在一些实施方式中,与亲本等同物相比,CpG二核苷酸减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或超过99%。在一些实施方式中,CpG二核苷酸减少约5%至约90%、约10%至约80%、约15%至约75%、约20%至约70%、约25%至约65%或约30%至约60%的范围。在一些实施方式中,与亲本等同物相比,CpG二核苷酸的甲基化增加至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或超过95%。在一些实施方式中,CpG二核苷酸的甲基化增加约5%至约90%、约10%至约80%、约15%至约75%、约20%至约70%、约25%至约65%或约30%至约60%的范围。

[0317] 2.重组腺相关病毒(AAV)载体产生

[0318] 重组AAV颗粒可以通过任何标准方法产生(参见例如,WO 2001/083692;Masic等,2014.Molecular Therapy,22(11):1900-1909;Carter,1992,Current Opinions in Biotechnology,1533-539;Muzyczka,1992,Curr.Topics in Microbial,and Immunol.,158:97-129);Ratschin等,Mol.Cell.Biol.4:2072(1984);Hermonat等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6466(1984);Tratschin等,Mol.Cell.Biol.5:3251(1985);McLaughlin等,J.Virol,62:1963(1988);和Lebkowski等,Mol.Cell.Biol.7:349(1988);Samulski等,J.Virol.,63:3822-3828(1989);美国专利号5,173,414;WO 95/13365;美国专利号5,658,776;WO95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;WO 97/09441(PCT/US 96/14423);WO 97/08298(PCT/US96/13872);WO 97/21825(PCT/US96/20777);WO 97/06243(PCT/FR96/01064);WO 99/11764;Perrin等,Vaccine 13:1244-1250(1995);Paul等,Human Gene Therapy 4:609-615(1993);Clark等,Gene Therapy 3:1124-1132(1996);美国专利号5,786,211;美国专利号5,871,982;和美国专利号6,258,595,其通过引用整体并入本

文)。例如,在一些实施方式中,可以将本文所述的rAAV载体转化到大肠杆菌中以扩大DNA产生,使用任何标准方法(例如,Maxi-Prep K,Thermo Scientific)纯化,并通过限制性消化或测序验证。然后可以使用标准方法(例如,磷酸钙转染、脂质体、聚乙烯亚胺、电穿孔等)将纯化的rAAV载体与包含AAV rep和AAV cap基因的质粒和AAV辅助质粒组合来转染到适当的包装细胞系(例如,HEK293、HeLa、Sf9、PerC.6、MRC-5、WI-38、Vera或FRhL-2细胞)中。AAV rep和cap基因可以来自任何AAV血清型,并且可以与重组AAV载体ITR的血清型相同或不同,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAV13。在某些实施方式中,本文所述的重组AAV包含分别衍生自AAV2和AAV9的AAV rep和cap基因。AAV辅助质粒可以来自任何AAV血清型,并且可以与重组AAV载体ITR的血清型相同或不同,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAV13。在某些实施方式中,本文所述的重组AAV包含具有衍生自AAV2的辅助基因的质粒。

[0319] 在一些实施方式中,AAV rep和cap基因来自AAVrh.74。在一些实施方式中,rep和cap基因包含与SEQ ID NO:125的核酸序列具有至少85%(例如85%、90%、95%、97%、98%或99%)序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,rep和cap基因包含与SEQ ID NO:125的核酸序列具有至少85%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,rep和cap基因包含与SEQ ID NO:125的核酸序列具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,rep和cap基因包含与SEQ ID NO:125的核酸序列具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,rep和cap基因包含与SEQ ID NO:125的核酸序列具有至少97%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,rep和cap基因包含与SEQ ID NO:125的核酸序列具有至少98%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,rep和cap基因包含与SEQ ID NO:125的核酸序列具有至少99%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,rep和cap基因包含具有SEQ ID NO:125的核酸序列的核苷酸序列。

[0320] 表10.Rep和Cap序列

[0321]

描述	SEQ ID NO	序列
Rep 和 Cap	125	CGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGGGGGA GCTCGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTG AACGCGCAGCCGCCATGCCGGGGTTTTACGAGAT TGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCAT CTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGT GGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCT GACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCC TGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCT GACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCGGAG GCTCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAG CTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAAACCACC GGGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCCTGAG TCAGATTCGCGAAAAACTGATTCAGAGAATTTAC CGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCG CGGTCACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCG GGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAA TTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGT GGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGC CTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTG GCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGCAGG AGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGA

[0322]

		TGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACTTCAGCCAGG TACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGG GGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGTGAG TAATTGACAAAGCCAAACACCACCATTTGCCGAG CACTTTAGAGTTTACAGGTTTGTTTCTCTTGACCCT CAAAACAAACCTGTGAGGCATAGGGAGTATTGCT ATCCCTTAAGAATTCACCCCCAGTGTGCCCATCAA AACCTCCCAGGCTGAGTCTGCACAGTTGAAGGAG GAAGGATAGGAATGGGAGGGTCGATGGGTGAAA GCATGATTCTCTTAACCAGTCCAGATTATCAGGTA ATCCCTTCAACAACCACCACCCACTCCCTGGGCA ATCCAGCTGGAGTTTACAGACAGACTTAGCTGGC TATAGCACCACCGTGCTACTCTCTGTTCTTCCTGG TTGCTCAAATGCCCTAGAAAAGTGGAACAGGTGA GCATCAACTCACAGGGCTCTATGCTGGCTGCTGCT GCGAGGGATGTTATGCTATAGTACCAGGGGCCAC CATTCCATAGGCACTTCCTGTGTTTAATACCCTAT ATGCTTTACTTCATCTCATCTTCCTCCATATCCTGA GAGGTGGTTCTATTCTTCTCCCCATTTTACGGATG AAAAAACCGAGACACAGAAAGGTGAAATAGCTT AAGATAAATGGTGCCTTGCAGCCTTAGACTCTGGT GGCCTCTAGTTAATGTGGGAAATTAAGGGTGAGG GGATTGGCAGCTGATGGAGGGTGCAGGGTGCCAG ACAGAGGCGTTTAGCTCTGATCCCTTAGCAATAG AGAGTCCTTGTAGGCACTTGGTCAGGCGAGTGAT GCGATGAAAGCTGTGTTTAAGAAAGATTATGCTTT CTGCTGATTTCATACCCCCAACACCCAAGCTCTGA GGCCCCTCCTCACAGGTCCTTGCAGGGCTGGCCA AAATAAAGCAGCTTCACTCCGTTGTGCTGCTTTCC AGCTAATGTGTCTGTTTGGCAGAAGTTTCCCTCAA AGGCAGATCAGTGAAATAAGCAGAAGCCTCGACC CCCCTTTGTCAGCCAGAGCTGCTGAAGTGCCTTGC CCCAGGGTCACTTTGTGTGAGGGGATTAGAGAGC ACTGGGGCTGCCAAGAAACACTGCCGTTTCTACA GATTAGCAGGACGCTGGCTTGTGGCCTTCTAGCG AGGCTCAGAGCTGCGGTGGCCCTAGTCTGCATGG GCTAAAGACAAGCTCCATCTCCTGTCCTTGTTCCC

[0323]

		TCCTTCCTGGGCACAGCCGCCCTGCTTCTTGGTTC TCTCTGTTGGTTCCTGTCCGCACGGTAGTTAGGCT GGCAGCGTGTGTAGGATTTGGCTTAGAAGATTGA CAACATTGCCTTTGAGCCCTTCTTTGCTACTCCTC CCTCTCCCCTCCCATCAGACTCCTCTCTGGAGTCT GCTCTGCGAGGCCTCTGCTCTGTGGTATCCCAGCA GCCTTCTCAGCCTTGACTTCCAGAAGGGGGCTGTG CAGTGTCCGGGGTGTGCAGGCCCCAGACACGGGG TAGGCTCATGGAGATCCAAGTGCTGATCTAGTGTC AAGGCTGGCCTGGAGACTGGGCTGGGTTGGTGTC TGCCTGCTGTGGTCATGTGCCCTCCCTTGGGCCTG TATCCTCTCTCCAGACTTGCTGCAGGGAGAGGTG GCAGATGTCAGCCTAGTTCTGGCCTCTCAGAGCA GCATGGCAGCTCCCTTTCACTCAGGCCCAGGCTG GGCCCTCCTGCTGGCTGACCCCTGGGGAGAGGGT GCTCCAGAGCTCCCCAAGGAACAGCTTCCCGAAG CAGCCAGGCCAGCCCAGAGGGGCTGTGGCCAATC CTGAAGCTTTATGTTCCTGCTGACATTTTTTCTAA GTTTTCTCTTGCTTTCCTCTTAAATGCCAATCTGGA GAGTCTCCGTTAGGAGAAATGGACCCCAGCCAGG AAGAAGAGTTGAGTTGTATTTAAAACACGAGCTC CCCCTAAAGCATCCTTCTTTAGCTTCTAAGGAGAG GCAGAGACTGACAGGCAGGACTCAGCAGGAAAA GGTACCCCCCTGACCTGCTCAGTCAGGCCCTAGG CCCAGCTCCACCCAGCCTGTGGCCCCCAGAGTTTC GGTAAAGAGTTCCCTGGGCCTTAAGGAACCTTGA GAGAGCATTTGAGGGGTGCCACCACAAACTTGGC AGAAAAAACCCTCCCCCTCCAAGTCCAGTCCTAG AGAAGGAGCTGGCAACCTTGCCTTGCTTTGTAAG CAAAAGCCTCTTAGGGCTTGAGCTCAGATGTAGT GTTTGAGCTGTGGCTGGTGCCCTGCCCCATCAGGG AGCCAATGGTAGACATCCTATGGGCATCTTTGTTT TCCGTAAGAGCAGGCTGTCTGGGGATGGGCCAGA GGAAGAGGCGACCTGGAGTCAACCAAGAGGAGG CCTTAACCAAGCCTTAACCACAGAGGTTAACCAA GCCTTGAAAGCGCTTCCCCCTGAGCAGGCAGGAA GCACTGAGTCCACATGGTTGCCTCGCTGTTTCATT

[0324]

		TCCTTACACTCAATTCTCTCAGTCTTTAAATGATC ACTTGGCCTTGAAGTTACGGATATTTGGGGTCTGA ACTGAAGTTGAAGAAAAGAGGAAATGATTTAAGC TTTGTTTAAGATTAGGGGCCAGGTGCGGTGGCTCA CGCCTGTAATCCCAGCACCTTGGGAGCCTGAGGC GGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCCAGACCA GCCTGGCCAACATAGCAAAACCCAGTCTCTACTA AAAATAACAATAAAAAAATTAGCCAGGTGTGGTG ACACATGCCTGTAATCCCAGTTACTCAGGAGGCT GAGGCAGAATTGCTTGAACTTGAGAGGTGGAGGT TGTAGTGAGCCAAGACCGCACCACTGCACTCCAG CCTGGCGACAGAGCCAGACTCCGTCTCAAAAACA ACAACAAAAAAGATTAGAAGAAGCCCATTACTGC CTTCTGGCCACCCACTCGCACAGACACCAAAACT GCAGCCCACACCTCGCCATCCTCGTGCTCTGCCCT GGGACACCCCAGGCACAGTGTGTCCTTCGTTTTCT GTAAGGGTGGGCTGGGAGCAGGGACGGACAGGG CCTGTGGGCACCTCTCATGGTCACTTCCTTCTTGC TCACAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCA ATGCGGCCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCAAGGC TGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTG ACTAAAACCGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGC AGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTA TAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAA TATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAA AAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTT GGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGG AGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTG CGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAAC GACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGG AGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGC CAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTG GACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCCCAGATAGACC CGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACAT GTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTC GAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCA AATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTT

[0325]

		GGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTT TCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGA GCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAG AAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTG AGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCC ATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC GCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACG TGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAA TGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCT TCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTT CCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAA AAAGGCGTATCAGAAACTGTGCTACATTCATCAT ATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCT GCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATC TTTGAACAATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTG CCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAA CCTCTCTGAGGGCATTCGCGAGTGGTGGGACCTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGC AAAAGCAGGACAACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCC TGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTC GACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCA GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGC AGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTA TAATCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTG CAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGC GCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGCGGGTTCTCGA ACCTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCGGTTAAGACG GCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCAC CCCAGCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGC AAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAAAGAGACTC AATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCC CCGACCCTCAACCAATCGGAGAACCACCAGCAGG CCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAG GCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGG CGCCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCAGGAAATTGG CATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCA TCACCACCAGCACCCGCACCTGGGCCCTGCCCAC

[0326]

		CTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAAC GGGACCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCT ACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGGTATTTTGAC TTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGA CTGGCAGCGACTCATCAACAACAACTGGGGATTC CGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACA TCCAAGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCAC CAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATT CAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGT ACGTGCTCGGCTCGGCGCACCAGGGCTGCCTGCC TCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCTCAGT ACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGC TGTGGGCCGGTCGTCCTTCTACTGCCTGGAGTACT TTCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACTTT GAATTCAGCTACAACTTCGAGGACGTGCCCTTCC ACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCG GCTGATGAACCCTCTCATCGACCAGTACTTGTACT ACCTGTCCCGGACTCAAAGCACGGGCGGTACTGC AGGAACTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGG CCTAACAACATGTCGGCTCAGGCCAAGAACTGGC TACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCTCC ACGACACTGTCGCAGAACAACAACAGCAACTTTG CCTGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGG CAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATG GCTACCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTC CATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGG AGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTG ATGCTAACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACC AACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGG CCGATAACCTGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTAT TGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTACCT GGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGC AGGGTCCCATCTGGGCCAAGATTCCTCATACGGA CGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCT TTGGACTGAAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATT AAAAACACACCTGTTCCCGCGGATCCTCCGACCA CCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACG

[0327]

		CAGTACAGTACCGGCCAGGTCAGCGTGGAGATCG AGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCT GGAACCCAGAGATTCAGTACACTTCCAACTACTA CAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACTG AGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACC CGTTACCTCACCCGTAATCTGTAATTACATGTTAA TCAATAAACCGGTTAATTCGTTTCAGTTGAACTTT GGTCTCCTGTCCTTCTTATCTTATCGGTTACCATA GAAACTGGTTACTTATTAACTGCTTGGTGCGCTTC GCGATAAAAGACTTACGTCATCGGGTTACCCCTA GTGATGGAGCGGCCGCTTTCAGTTGAACTTTGGTC TCTGCGTATTTCTTTCTTATCTAGTTTCCATGCTCT AGAGGTCCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTGTTTTG CGACATTTTGCGACACCATGTGGTCACGCTGGGT ATTTAAGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATT TTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCAAG CCGAATTCTGCAGATAATTCCGTGTATTCTATAGT GTCACCTAAATCGTATGTGTATGATACATAAGGTT ATGTATTAATTGTAGCCGCGTTCTAACGACAATAT GTACAAGCCTAATTGTGTAGCATCTGGCTTACTGA AGCAGACCCTATCATCTCTCTCGTAAACTGCCGTC AGAGTCGGTTTGGTTGGACGAACCTTCTGAGTTTC TGGTAACGCCGTCCCGCACCCGGAAATGGTCAGC GAACCAATCAGCAGGGTCATCGCTAGCCAGATCC TCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGG CGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCC GACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACT TCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATG GTGGCAGGCCGCCCTTAGAAAAACTCATCGAGCA TCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTA TCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAA TGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGG ATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGA CTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCC TCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCAC CATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAA AAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAG

[0328]

		GCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGC ATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCT GAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGG ACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGC AGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCAC CTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCT GTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATG CATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGT CGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGT CTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCT ACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCAT CGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCT GATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCC ATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCG GCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTC ATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGA CAGTTTTATTGTTCATGATGATATATTTTTATCTTG TGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACG TGGTTTGCAGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTG ATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTC ATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTT AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGAT AATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC AAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTA CCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTAC CAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGA GCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCC GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCA CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGC ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG

[0329]

		CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT ATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGA CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCC TTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCT CACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCA TTAATGCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTG TGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGT ATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAG AAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA ACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCC CCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCC ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCC GAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGAACAAACAGCTT TTTTGGGGTGAACATATTGACTGAATTGGCGAAC GTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCA CGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAA TGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCA GGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCG GGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGG GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGC CAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC GGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAG GGCGAATTGGGTAC

[0330] 在一些实施方式中,本文所述的重组AAV从包装细胞中收获,并通过本领域的标准方法纯化(例如Clark等,Hum.Gene Ther.,10(6):1031-1039(1999);Schenpp和Clark,Methods Mol.Med.,69 427-443(2002);美国专利号6,566,118和WO 98/09657,其全部内容通过引用并入本文),如通过氯化铯超速离心梯度或柱色谱进行纯化。

[0331] 在一些实施方式中,本公开的rAAV包含与表9中列出的核苷酸序列具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸序列。

[0332] 在一些实施方式中,本公开的rAAV选自:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh20、AAV-rh39、AAV-rh74、AAV-rhM4-1、AAV-hu37、AAV-Anc80、AAV-Anc80L65、AAV-7m8、AAV-PHP-B、AAV-PHP-EB、AAV-2.5、AAV-2tYF、AAV-3B、AAV-LK03、AAV-HSC1、AAV-HSC2、AAV-HSC3、AAV-HSC4、AAV-HSC5、AAV-HSC5、AAV-HSC6、AAV-HSC7、AAV-HSC8、AAV-HSC9、AAV-HSC10、AAV-HSC11、AAV-HSC12、AAV-HSC13、AAV-HSC14、AAV-HSC15、AAV-TT、AAV-DJ/8、AAV-Myo、AAV-NP40、AAV-NP59、AAV-NP22、AAV-NP66或AAV-HSC16,或其衍生物。在一些实施方式中,rAAV是AAV2或其衍生物。在一些实施方式中,rAAV是AAV8或其衍生物。在一些实施方式中,rAAV是AAV-rh74或其衍生物。

[0333] 3.药物组合物

[0334] 本文所述的重组AAV载体可用于制备药物组合物。在一些实施方式中,本文公开的药物组合物包含本公开的重组AAV载体和药学上可接受的载体,以及任选地,其他药用剂、药物制剂、稳定剂、缓冲剂、载体、辅助剂、稀释剂等。“药学上可接受的”是指没有毒性或另外方面不期望的材料,即该材料可以施用于受试者而不引起任何不期望的生物学效应。

[0335] 在一些实施方式中,药物组合物包含无菌水性和非水性注射溶液,其任选地与药物组合物将被递送的受试者的血液等渗。药物组合物可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,其使组合物与待施用的预期受试者的血液等渗。水性和非水性无菌悬浮液、溶液和乳液可包括悬浮剂和增稠剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。在一些实施方式中,药物组合物包含药学上可接受的媒剂,并且可包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或非挥发油。还可以存在防腐剂和其他添加剂,如,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0336] 在一些实施方式中,药物组合物可以存在于单位/剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶中,并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,其仅需要在使用前即时加入无菌液体载体,例如盐水或注射用水。

[0337] 在一些实施方式中,本文公开的药物组合物可以配制用于静脉内、肌内、鞘内或脑室内施用。

[0338] 4.治疗方法

[0339] 本公开的重组AAV(rAAV)载体或包含其的药物组合物可以通过任何递送方式施用于有需要的受试者,所述递送方式包括但不限于静脉内、腹膜内和肌内施用。

[0340] 在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体或包含其的药物组合物可以以一个、两个、三个、四个、五个或更多个剂量施用。在一些实施方式中,当施用多个剂量时,该剂量可以同时或间隔地向有需要的受试者施用。

[0341] 本申请提供通过向患者施用如本文所述的rAAV或其药物制剂来降低转移的风险、预防和治疗转移的方法。

[0342] 在其它实施方式中,本公开的重组AAV载体或包含其的药物组合物可以作为单一静脉内剂量或分开的静脉内剂量施用。在一些实施方式中,用于静脉内递送的剂量可以是1×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、2×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、3×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、4×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、5×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、6×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、7×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、$8\times$

10^{10}至1×10^{13}vg/kg、9×10^{10}至1×10^{13}vg/kg、1×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、2×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、3×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、4×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、5×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、6×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、7×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、8×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、9×10^{11}至1×10^{13}vg/kg、1×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、2×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、3×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、4×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、5×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、6×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、7×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、8×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、9×10^{12}至1×10^{13}vg/kg、1×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、2×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、3×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、4×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、5×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、6×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、7×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、8×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、9×10^{10}至1×10^{12}vg/kg、1×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、2×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、3×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、4×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、5×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、6×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、7×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、8×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、9×10^{11}至1×10^{12}vg/kg、1×10^{10}至1×10^{11}vg/kg、2×10^{10}至1×10^{11}vg/kg、3×10^{10}至1×10^{11}vg/kg、4×10^{10}至1×10^{11}vg/kg、5×10^{10}至1×10^{11}vg/kg、6×10^{10}至1×10^{11}vg/kg、7×10^{10}至1×10^{11}vg/kg、8×10^{10}至1×10^{11}vg/kg或9×10^{10}至1×10^{11}(病毒基因组(vg)/千克(kg)(vg/kg))。在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体或包含其的药物组合物以1×10^{11}vg/kg的单静脉内剂量施用。在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体或包含其的药物组合物以3×10^{11}vg/kg的单静脉内剂量施用。在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体或包含其的药物组合物以1×10^{12}vg/kg的单静脉内剂量施用。在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体或包含其的药物组合物以3×10^{12}vg/kg的单静脉内剂量施用。在一些实施方式中,本公开的重组AAV载体或包含其的药物组合物以5×10^{12}vg/kg的单静脉内剂量施用。

[0343] 在一些实施方式中,本申请提供通过向患者施用有效量的如本文所述的rAAV载体或其药物制剂来治疗患者的癌症的方法。在一些实施方式中,癌症是神经母细胞瘤、黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、尤文氏肉瘤、小细胞肺癌、神经胶质瘤、骨肉瘤或软组织肉瘤。例如,在一些实施方式中,癌症是神经母细胞瘤。

[0344] 降低转移风险的方法

[0345] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。在一些实施方式中,患者未被诊断患有癌症。在一些实施方式中,患者未接受癌症治疗。

[0346] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89

和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0347] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0348] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0349] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0350] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0351] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序

列具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VH结构域和VL结构域。

[0352] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VH结构域和VL结构域。

[0353] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0354] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0355] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0356] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0357] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0358] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0359] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0360] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0361] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0362] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:41至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0363] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体或其药物制剂来降低转移风险的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:42至少85%序列相同(例如,

至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0364] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来降低转移风险的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:43至少85％序列相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0365] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来降低转移风险的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:44至少85％序列相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0366] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来降低转移风险的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:45至少85％序列相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0367] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来降低转移风险的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:53的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0368] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来降低转移风险的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:54的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0369] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来降低转移风险的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:55的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0370] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来降低转移风险的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:56的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0371] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来降低转移风险的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:57的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0372] 预防转移的方法

[0373] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3

序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。在一些实施方式中,患者未被诊断患有癌症。在一些实施方式中,患者未接受癌症治疗。

[0374] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0375] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0376] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0377] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0378] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合

蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0379] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0380] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0381] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0382] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包

含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0383] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0384] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0385] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0386] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0387] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0388] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0389] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0390] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:41至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0391] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:42至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0392] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:43至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0393] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:44至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0394] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:45至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0395] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:53的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0396] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:54的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0397] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:55的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0398] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:56的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、

至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0399] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:57的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0400] 治疗转移的方法

[0401] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0402] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0403] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0404] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0405] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0406] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0407] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0408] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0409] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至

少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0410] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0411] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0412] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0413] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0414] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0415] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0416] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0417] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0418] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体或其药物制剂来治疗转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:41至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0419] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来治疗转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:42至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0420] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来治疗转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:43至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0421] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来治疗转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:44至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0422] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来治疗转移的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:45至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0423] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来治疗转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:53的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0424] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来治疗转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:54的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0425] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来治疗转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:55的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0426] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来治疗转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:56的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0427] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAA来治疗转移的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:57的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0428] 促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法

[0429] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0430] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0431] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ

ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0432] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0433] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0434] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0435] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域

和VL结构域。

[0436] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0437] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0438] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0439] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0440] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至

少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0441] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0442] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0443] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0444] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0445] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的氨基酸序列。

[0446] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:41至少85％序列相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0447] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:42至少85％序列相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0448] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:43至少85％序列相

同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0449] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:44至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0450] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:45至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0451] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:53的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0452] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:54的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0453] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:55的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0454] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:56的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0455] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来促进T细胞介导的循环肿瘤细胞杀伤的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:57的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0456] 预防易发生肿瘤的患者的癌症的方法

[0457] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序

列。

[0458] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0459] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0460] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0461] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0462] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合

蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0463] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0464] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0465] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0466] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,

所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0467] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0468] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的scFv。

[0469] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0470] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0471] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0472] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,

所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0473] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0474] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:41至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0475] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:42至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0476] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:43至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0477] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:44至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0478] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:45至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0479] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:53的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0480] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:54的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)。

[0481] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:55的至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少

95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0482] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:56的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0483] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防易发生肿瘤(例如,GD2+肿瘤)的患者的癌症的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:57的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0484] 预防癌症复发的方法

[0485] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0486] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0487] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0488] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含分别对应于SEQ ID NO:79、SEQ

ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3序列;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含选自分别对应于SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3序列。

[0489] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0490] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0491] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的VH结构域和VL结构域序列具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的VH结构域和VL结构域。

[0492] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:4和SEQ

ID NO:3的VL结构域和VH结构域序列具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VL结构域和VH结构域;(ii)包含对应于SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与分别对应于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的VH结构域和VL结构域序列具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的VH结构域和VL结构域。

[0493] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0494] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:5具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0495] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:20的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:17具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0496] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白具有:(i)GD2结合位点,其包含与SEQ ID NO:7具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv;(ii)包含SEQ ID NO:25的序列的接头肽;和(iii)CD3结合位点,其包含与SEQ ID NO:16具有至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的scFv。

[0497] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0498] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:10具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0499] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:11具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0500] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0501] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的编码双特异性融合蛋白的rAAV载体或其药物制剂来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述双特异性融合蛋白包含与SEQ ID NO:13具有至少85%的序列同一性(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的氨基酸序列。

[0502] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:41至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0503] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:42至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0504] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:43至少85%序列相同(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的转基因序列。

[0505] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:44

至少85％序列相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0506] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV载体来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV载体包含与SEQ ID NO:45至少85％序列相同(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)的转基因序列。

[0507] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:53的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0508] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:54的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0509] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:55的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0510] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:56的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0511] 在一些实施方式中,本申请提供一种通过向患者施用有效量的rAAV来预防癌症(例如,GD2+癌症)缓解期的患者的癌症复发的方法,所述rAAV包含与SEQ ID NO:57的至少85％的序列同一性(例如,至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)。

[0512] 组合治疗

[0513] 在本公开的另一个方面,rAAV载体或其药物制剂与原发性肿瘤的治疗同时施用。

[0514] 在本公开的一些实施方式中,rAAV载体或其药物制剂与原发性肿瘤的手术切除、放疗、化疗或免疫疗法同时施用。

[0515] 在一些实施方式中,如本文所述的rAAV载体或其药物制剂与选自CTLA-4抑制剂、PD-1抑制剂和PD-L1抑制剂的检查点抑制剂组合施用。

[0516] 在一些实施方式中,如本文所述的rAAV载体或其药物制剂与选自伊匹单抗和曲美木单抗的CTLA-4抑制剂组合施用。例如,在一些实施方式中,如本文所述的rAAV或其药物制剂与伊匹单抗组合施用。

[0517] 在一些实施方式中,如本文所述的rAAV或其药物制剂与选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、多塔利单抗(dostarlimab)、JTZ-4014、斯巴达珠单抗(spartalizumab)、卡瑞利珠单抗(camrelizumab)、辛迪利单抗(sintilimab)、替雷利珠单抗(tislelizumab)、特瑞普利单抗(toripalimab)、INCMGA 00012、AMP-224和AMP-514的PD-1抑制剂组合施用。例

如,在一些实施方式中,如本文所述的rAAV载体或其药物制剂与派姆单抗或纳武单抗组合施用。

[0518] 在一些实施方式中,如本文所述的rAAV载体或其药物制剂与选自阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、KN035、CK-301、AUNP12、CA-170或BMS-986189的PD-L1抑制剂组合施用。例如,在一些实施方式中,如本文所述的rAAV载体或其药物制剂与阿特珠单抗组合施用。

[0519] 本申请提供降低转移的风险、预防或治疗转移的方法,其中本文所述的rAAV载体或其药物制剂与原发性肿瘤的治疗同时施用。在一些实施方式中,原发性肿瘤是神经母细胞瘤、黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、尤文氏肉瘤、小细胞肺癌、神经胶质瘤、骨肉瘤或软组织肉瘤。例如,在一些实施方式中,原发性肿瘤是神经母细胞瘤。

[0520] 在一些实施方式中,如本文所述的rAAV载体或其药物制剂与一种或多于一种编码靶向不同的肿瘤相关抗原的不同双特异性融合蛋白的AAV组合施用。

[0521] 实施例

[0522] 通过参考以下实施例,将更容易理解现在一般性描述的本公开,所述实施例仅出于说明本公开的某些方面和实施方式的目的而包括,并且不意图限制本公开。

[0523] 实施例1:AAV转基因构建体的分子克隆

[0524] 通过从5’到3’可操作地接合以下序列合成双特异性融合蛋白转基因:(i)编码抗GD2抗体VL结构域的密码子优化的核苷酸序列;(ii)编码第一scFv接头肽的核苷酸序列;(iii)编码抗GD2抗体VH结构域的密码子优化的核苷酸序列;(iv)编码接头肽的核苷酸序列;(v)编码抗CD3抗体VH结构域的密码子优化的核苷酸序列;(vi)编码第二scFv接头肽的核苷酸序列;和(vii)编码抗CD3抗体VL结构域的密码子优化的核苷酸序列。

[0525] 通过可操作地接合CAG启动子序列、双特异性融合蛋白转基因和牛生长激素(BGH)多腺苷酸化序列来合成转基因盒。将转基因盒克隆到适当的克隆载体(例如,pUC)中并通过DNA测序确认。将确认的构建体进行限制性消化并凝胶纯化用于随后克隆到含有AAV2 ITR位点和卡那霉素抗性基因的适当AAV8骨架载体中。

[0526] 连接后,将DNA转化到大肠杆菌(例如,VB UltraStable™,Vector Builder,Chicago,IL)中,在卡那霉素选择性培养基上生长并纯化。通过限制性消化鉴定已经经历成功连接的基因构建体。

[0527] 克隆然后通过在大肠杆菌中的细菌转化放大。通过限制性消化重新确认正确的质粒序列。

[0528] 瞬时转染和病毒包装

[0529] 使用标准磷酸钙转染方法(例如,如Vandendriessche等(2007.J Thromb Haemost 5:16-24)所述,其通过引用并入本文),将确认的AAV载体与腺病毒辅助质粒和递送AAV rep基因以及AAV cap基因的包装构建体组合瞬时转染到HEK293细胞中。转染后两天,收获AAV颗粒并使用连续两轮氯化铯密度梯度超速离心纯化并滴定。

[0530] 实施例2:双特异性融合蛋白与GD2和CD3的结合

[0531] 将实施例1所述的纯化的AAV颗粒用于转导生产细胞(例如HEK293细胞)以表达双特异性融合蛋白。从培养上清液和/或细胞裂解物收集和纯化双特异性融合蛋白,并对于GD2和CD3结合进行测定。

[0532] 将表达GD2的人癌细胞系(例如,具有高水平GD2表达的细胞系或经工程化以表达外源GD2的细胞系)用于测定双特异性融合蛋白与GD2的结合。将各种浓度的双特异性融合蛋白与表达GD2的细胞一起孵育,并使用荧光团缀合的二抗检测结合。通过流式细胞术分析细胞,并与用GD2结合的对照抗体孵育的细胞的结合进行比较。

[0533] 类似地,将T细胞系或外周血单核细胞(PBMC)用于测定双特异性融合蛋白与CD3的结合。将各种浓度的双特异性融合蛋白与T细胞系或PBMC一起孵育,并使用荧光团缀合的二抗检测结合。通过流式细胞术分析细胞,并与用抗CD3对照抗体孵育的细胞的结合进行比较。

[0534] 还使用纯化的双特异性融合蛋白在单独的培养基中以及在100%小鼠或汇合的人血清中的稀释滴定进行标准共培养细胞毒性测定。测定48小时后在标准条件下杀伤10%(EC10)、50%(EC50)和90%(EC90)靶细胞所需的双特异性融合蛋白的浓度。测定其GD2表达不同的10种不同细胞系(例如,T98G、U87MG、C3c GBM细胞)的ED10/50/90。

[0535] 实施例3:双特异性融合蛋白在体外诱导T细胞介导的细胞毒性

[0536] 使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层分离PBMC。然后在各种浓度的双特异性融合蛋白或对照α-GD2抗体存在下,将PBMC与表达GD2的人癌细胞共培养。共培养后,将细胞裂解并根据制造商的说明书使用市售细胞毒性测定法(例如,CytoTox96®非放射性细胞毒性测定法,Promega,Madison,WI)进行分析。

[0537] 实施例4:剂量确定

[0538] 为了确定在人类患者中施用的载体剂量和血清水平,以半对数增量(1×10^{11}、3×10^{11}、1×10^{12}和3×10^{12})给小鼠施用不同剂量的AAV,在预计为稳定状态(例如,28天)后的时间点,从眼眶后抽血中分析血清水平。选择动物研究中的载体剂量,其使大多数细胞系的血清水平达到实施例2中测定的EC90以上。

[0539] 实施例5:双特异性融合蛋白的AAV8递送预防转移

[0540] 为了确定AAV8递送的双特异性融合蛋白在预防转移中的功效,小鼠治疗组由以下组成:(1)无局部对照,(2)溶瘤HSV1,(3)手术切除,和(4)放疗。出于比较的目的,每个处理组包括其自身的媒剂对照(即,无双特异性融合蛋白)组。

[0541] 将GD2+人类癌细胞(例如GFP+或CD45-CD56+、CD81+、NB84+、GD2+细胞)以各种浓度在小鼠侧腹中施用于测试组,然后向小鼠施用对照或纯化的AAV8以用于双特异性融合蛋白的体内表达。通过在不同时间点测量移植的肿瘤和卫星转移(如果有的话)的生物发光来监测原发性肿瘤大小和转移病灶的存在。在尸检时确认和/或计数转移。通过免疫组织化学和/或流式细胞术分析转移性组织(例如,肺和肝)的T细胞浸润、活化和/或耗竭。外周T细胞每2周还通过流式细胞术分析活化和检查点标志物表达。流式细胞术也用于每2周监测循环肿瘤细胞。

[0542] 或者,使用多种神经母细胞瘤异种移植模型中的任何一种(例如TH-MYCN;Braekeveldt和Bexell,Cell Tissue Res.2018;372(2):233-243;Ornell和Coburn,BMC Biomedical Engineering.2019;33;Weiss等,Embo J.1997;16(11):2985-95)。例如,小鼠(例如,Balb/c)皮下植入表达荧光素酶或绿色荧光蛋白(GFP)的GD2+人类癌细胞。使肿瘤生长至适当大小,然后向小鼠静脉内施用对照或纯化的AAV8颗粒以用于体内表达双特异性融合蛋白。通过在各个不同时间点测量移植的肿瘤和卫星转移(如果有的话)的生物发光来监

测原发性肿瘤大小和转移病灶的存在。在尸检时确认和/或计数转移。通过免疫组织化学和/或流式细胞术分析转移性组织(例如,肺和肝)的T细胞浸润、活化和/或耗竭。外周T细胞每2周还通过流式细胞术分析活化和检查点标志物表达。流式细胞术也用于每2周监测循环肿瘤细胞。

[0543] 实施例6:确定AAV8递送的双特异性融合蛋白的免疫原性和表达随时间的丧失

[0544] 为了确定AAV8递送的双特异性融合蛋白是否引发免疫反应,将AAV静脉内施用给免疫活性的C57B1/6小鼠。在前3个月内以每周血液测试监测小鼠的以测量双特异性融合蛋白的水平,然后在接下来的9个月内每月监测。在每次抽血时监测体重作为安全性/毒性的读数。

[0545] 实施例7:抗GD2/抗CD3ε融合蛋白对GD2表达细胞系的作用的评估

[0546] 制备各自编码五种抗GD2/抗CD3ε双特特异性融合蛋白之一的AAV构建体,所述双特异性融合蛋白含有通过接头连接的两种抗GD2 scFv(hu3F8V5和14G2a)中的一种和两种抗CD3 scFv(OKT3和L2K-07)中的一种。制备一种含有额外的间隔子部分的hu3F8V5/okt3蛋白(1169)。AAV构建体设计详述于图2A-2B中。在体外和体内测试了图2B中的构建体并且发现生成了dimert蛋白并在体外引起了一些杀伤(数据未显示)。在侧腹肿瘤模型中,图2B中的构建体未能控制侧腹肿瘤。

[0547] 通过测量293T细胞中蛋白质的产生以及与表达GD2的神经母细胞瘤细胞系SK-N-Be(2)-CD19、CHP-134-CD19和SK-N-AS-CD19的结合来评估可制造性(图3)。这些结果表明蛋白质1172(hu3F8V5/L2K-07)在293T细胞中显示出最佳的蛋白质产生。

[0548] 为了评估抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白对表达GD2的神经母细胞瘤细胞的作用,从通过AAV转导来工程化以产生对照或上文详述的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白(1169、1170、1172、1173或1175)之一的293T细胞收集上清液。将SK-N-Be(2)-CD19、CHP-134-CD19和SK-N-AS-CD19细胞各自与人外周血单核细胞(huPBMC)和来自293T细胞的上清液以10:1的效应:靶(E:T)比率孵育。孵育48小时后,测量靶细胞存活力(图4)。结果显示,用huPBMC和双特异性融合蛋白1169、1170、1172、1173或1175共处理表达GD2的靶细胞导致SK-N-AS-CD19,而非SK-N-Be(2)-CD19或CHP-134-CD19细胞的靶细胞杀伤增加。分析了靶细胞的GD2表达(图5A-5B),其显示测试的SK-N-Be(2)-CD19和CHP-134-CD19细胞均失去表面GD2表达。这些结果表明抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白可以诱导靶标特异性的细胞杀伤。

[0549] 为了评估各种抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白对表达GD2的神经母细胞瘤细胞的相对细胞杀伤能力,将SK-N-AS、SK-N-Be(2)和CHP-134细胞以及表达CD19的原型以10:1的E:T比与含有抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白(1172、huOKT3/5F11-HDD或CAG-193/dCGMRE)的293T上清液和huPBMC一起孵育。孵育48小时后,测量靶细胞存活力(图6)。这些结果表明与其他测试的蛋白质相比,蛋白质1172诱导优异的细胞杀伤,且在CHP-134中观察到降低的效应。分析靶细胞的GD2表达(图7),其显示测试的CHP-134亲本和CD19细胞丧失表面GD2表达。这些结果表明抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白可以诱导靶标特异性的细胞杀伤。

[0550] 在进一步实验之前,评估SK-N-AS、SK-N-Be(2)和CHP-134神经母细胞瘤细胞的GD2表达。将各种细胞系的5×10^5用抗GD2抗体染色并通过流式细胞术评估GD2染色(图8)。结果显示正常的BT474细胞和克隆5细胞都表达高水平的GD2。这些结果表明SK-N-Be(2)和CHP-134保留GD2表达。为了评估抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白1172的细胞杀伤能力,将CHP-

134、SK-N-AS和SK-N-SH细胞以10:1的E:T比与含有浓度0pM、10pM、100pM和1000pM的蛋白质1172的293T上清液和huPBMC一起孵育。孵育48小时后,测量靶细胞存活力(上图)和GD2表达(下图)(图9)。

[0551] 为了进一步评估抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白1172的靶标特异性细胞杀伤能力,通过流式细胞术评估各种神经母细胞瘤细胞的GD2表面表达(图10A-10B)。然后将细胞以10:1的E:T比与含有浓度0pM、100pM和1000pM的蛋白质1172的293T上清液和huPBMC一起孵育。孵育48小时后,测量靶细胞存活力(图10C)。这些结果表明抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白1172的细胞杀伤能力与靶细胞上GD2的表面表达相关。

[0552] 为了评估人血清对抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白1172的靶标特异性细胞杀伤能力的潜在作用,将各种神经母细胞瘤细胞系以10:1的E:T比与含有浓度0pM、50pM、100pM、500pM、1000pM和5000pM的蛋白质1172的293T上清液;浓度10%、50%和100%的人血清;和huPBMC一起孵育。孵育48小时后,测量靶细胞存活力(图11)。这些结果表明人血清的存在对抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白1172的靶标特异性细胞杀伤能力的影响有限。

[0553] 为了评估抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白1172对表达GD2的肺癌细胞的靶标特异性细胞杀伤能力,将H446、H446-Luc和H2228细胞以10:1的E:T比与含有浓度0pM、100pM和1000pM的蛋白质1172的293T上清液和huPBMC一起孵育。孵育48小时后,测量靶细胞存活力(图12)。这些结果表明抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白1172成功地介导表达GD2的肺癌细胞的杀伤。

[0554] 实施例8:抗GD2/抗CD3ε融合蛋白的作用的体内评估

[0555] 为了评估原型AAV8抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白(GD2 scFv:5F11)的抗肿瘤效果(具有和没有溶瘤病毒talimogene laherparepvec(TVEC)共处理),向携带SK-N-Be(2)-CD19/Luc肿瘤的huPBMC-NSGS小鼠注射5×10^{12}个基因组拷贝/千克(gc/kg)的AAV载体(抗GD2/抗CD3ε或GFP对照),具有使用TVEC共处理的组。所有小鼠共同注射单剂量的huPBMC。实验概况提供于图13A中并且图13B显示了GD2表面染色。在所示天的小鼠肿瘤的图像显示于图13C中。通过发光测量的肿瘤生长显示于图13D中。每组的存活率显示于图13E中。总体小鼠体重显示于图13F中。结果也表明TVEC治疗的小鼠中的毒性,而与其他治疗无关。随后的测试揭示了SK-N-Be(2)-CD19/Luc肿瘤细胞上GD2表达的损失。

[0556] 为了评估rAAV8-CAG-234-MRE抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白在两种神经母细胞瘤异种移植模型中的抗肿瘤效果,向携带SK-N-Be(2)-Luc或CHP 134-Luc肿瘤的huPBMC-NSGS小鼠注射5×10^{12}gc/kg的AAV载体或对照。实验概况提供于图14A中,并且图14B显示了肿瘤细胞的GD2表面染色。在所示天的携带SK-N-Be(2)-Luc肿瘤的小鼠的图像显示于图14C中。通过发光和肿瘤体积测量的肿瘤生长分别显示于图14D和14E中。每组的存活率显示于图14F中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图14G中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线显示于图14H中。总体小鼠体重显示于图14I中。在所示天的携带CHP-Luc肿瘤的小鼠的图像显示于图14J中。通过发光和肿瘤体积测量的肿瘤生长分别显示于图14K和14L中。每组的存活率显示于图14M中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图14N中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线显示于图14O中。总体小鼠体重显示于图14P中。这些结果显示了两种模型中对于抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白治疗的小鼠观察到的存活率的显著增加。

[0557] 为了评估rAAV8-CAG-234-MRE抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白组合抗PDL1或溶瘤疱疹病毒(HSV1716)的抗肿瘤效果,向携带CHP134-Luc肿瘤的huPBMC-NSGS小鼠注射5×10^{12}gc/kg的AAV载体或对照。在肿瘤移植后第14天、第21天和第28天给予三个剂量的huPBMC。小鼠的子集在肿瘤移植后给予五个腹膜内剂量的100μg抗PDL1(第18天、第21天、第25天、第28天、第32天、第35天)或在第18天、第25天、第32天给予三个肿瘤内剂量的1×10^{5}pfu的HSV1716。实验概况提供于图15A中。在所示天的用AAV载体或对照+抗PDL1治疗的荷瘤小鼠的图像显示于图15B中。通过发光和肿瘤体积测量的肿瘤生长分别显示于图15C和15D中。每组的存活率显示于图15E中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图15F中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线显示于图15G中。总体小鼠体重显示于图15H中。在所示天用AAV载体、HSV1716或AAV载体+HSV1716治疗的荷瘤小鼠的图像显示于图15I中。通过发光和肿瘤体积测量的肿瘤生长分别显示于图15J和15K中。每组的存活率显示于图15L中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图15M中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白浓度的标准曲线显示于图15N中。总体小鼠体重显示于图15O中。这些结果表明单独的HSV1716治疗的显著益处。没有可测量的原发性肿瘤的两只HSV1716对照小鼠产生了转移性疾病,而在抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白+HSV1716联合(combo)治疗小鼠中未观察到转移性疾病。

[0558] 为了评估抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的药代动力学,NSGS小鼠注射10μg(0.4mg/kg)的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白或5×10^{12}gc/kg的AAV载体。在指定的时间点收集血清。注射后纯化的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图16A中。AAV表达的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图16B中。这些结果表明纯化的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白水平在注射的5小时内降低至低于检测阈值,而AAV表达的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白首先在72小时时可检测并在14天内达到稳态浓度。直至注射后200天还可检测到持续水平的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白。

[0559] 为了评估抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白在免疫活性小鼠中的药代动力学,BALB/c小鼠注射5×10^{12}gc/kg的AAV载体,并在指定的时间点收集血清。所示时间点的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的血清浓度显示于图17中。这些结果表明在14天内实现了稳态浓度。直至注射后250天还可检测到持续水平的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白。

[0560] 为了开发用于初步测试用于播散性疾病的AAV-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法的鼠CHLA255-luc转移性神经母细胞瘤模型,NSG-SGM3小鼠眼球后注射5×10^{12}gc/kg的AAV载体或GFP对照。在rAAV8注射后25天,小鼠输注5×10^{6}huPBMC,接下来5个每周注射(眼球后或尾静脉)。在初始huPBMC输注后4小时,通过将1×10^{6}人CHLA255-Luc神经母细胞瘤注入这些小鼠的尾静脉中来建立转移性疾病。所有注射(与试剂无关)在100μL总体积中使用无菌PBS作为稀释剂来制备。在rAAV8注射后第21天从每只小鼠的眶后窦收集少量血液用于血清药代动力学分析。用Xenogen IVIS光谱监测小鼠的肿瘤生长并用Living Image 4.4软件(Caliper Life Sciences,Hopkinton,MA)分析疾病进展。在肿瘤细胞注射后7天开始小鼠成像并随后每周进行直至满足实验终点标准,此时将动物人道地安乐死。在第42天将所有存活的动物处死用于组织学分析。在治疗和对照组中观察到一些移植物抗宿主疾病的证据。实验概况提供于图18A中。荷瘤小鼠在所示天的图像显示于图18B中。通过发光测量的肿瘤生长显示于图18C中。总体小鼠体重显示于图18D中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的

浓度显示于图18E中。通过尸检提取的小鼠器官的图像显示于图18F中。脑样品和肝样品的荧光图像分别显示于图18G和18H中。脑、肝、肺组织的比较荧光图像显示于图18I中。循环免疫系统的测量显示于图18J中。这些结果表明抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法相对于对照防止或控制转移性疾病的生长。

[0561] 为了开发用于AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法功效的鼠CHLA255-luc转移性神经母细胞瘤模型,NSG-SGM3小鼠眼球后注射5×10^{12}基因组拷贝/千克(gc/kg)的AAV载体或GFP对照。在rAAV8注射后25天,小鼠输注5×10^{6}huPBMC,此后接着4个每周huPBMC注射(眼球后或尾静脉)。在初始huPBMC输注后4小时,通过将1×10^{5}或5×10^{5}人CHLA255-Luc神经母细胞瘤注射到这些小鼠的尾静脉中来建立转移性疾病。所有注射(与试剂无关)在100μL总体积中使用无菌PBS作为稀释剂来制备。在rAAV8注射后第21天从每只小鼠的眶后窦收集少量血液用于血清药代动力学分析。用Xenogen IVIS光谱监测小鼠的肿瘤生长并用Living Image 4.4软件(Caliper Life Sciences,Hopkinton,MA)分析疾病进展。在肿瘤细胞注射后7天开始小鼠成像并随后每周进行直至满足实验终点标准,此时将动物人道地安乐死。实验概况提供于图19A中。在所示天的注射5×10^{5}的小鼠的图像显示于图19B中。总体小鼠存活率显示于图19C中,且总体小鼠体重显示于图18D中。在所示天的注射1×10^{5}的小鼠的图像显示于图19E中。总体小鼠存活率显示于图19F中,且总体小鼠体重显示于图19G中。这些结果表明AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法相对于对照防止或控制转移性疾病的生长。

[0562] 为了测试AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法在建立的转移性神经母细胞瘤模型中的功效,NSG-SGM3小鼠眼球后注射5×10^{12}gc/kg的AAV载体或GFP对照。通过将1×10^{6}人CHLA255-Luc神经母细胞瘤细胞注射到这些小鼠的尾静脉中建立转移性疾病。在肿瘤移植后7天,小鼠输注5×10^{6}huPBMC,此后接着3个每周huPBMC注射(眼球后或尾静脉)。该研究中总共使用20只小鼠,性别均匀分配。治疗组和对照组各自由5只雄性和5只雌性小鼠组成。所有注射(与试剂无关)在100μL总体积中使用无菌PBS作为稀释剂来制备。在rAAV8注射后第21天从每只小鼠的眶后窦收集少量血液用于血清药代动力学分析。用Xenogen IVIS光谱监测小鼠的肿瘤生长并用Living Image 4.4软件(Caliper Life Sciences,Hopkinton,MA)分析疾病进展。在肿瘤细胞注射后7天开始小鼠成像并随后每周进行直至满足实验终点标准,此时将动物人道地安乐死。实验概况提供于图20A中。荷瘤小鼠在所示天的图像显示于图20B中。通过发光测量的肿瘤生长显示于图20C中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图20D中。总体小鼠存活率显示于图20E中,且总体小鼠体重显示于图20F中。这些结果显示了用AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白治疗的雌性小鼠具有轻微的肿瘤生长延迟,而5只雄性小鼠中的4只没有肿瘤并且最终死于GvHD。还发现雄性小鼠与雌性小鼠相比,其血清中具有大约2倍的抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白。

[0563] 为了测试AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法在肿瘤接种后不久防止CHLA255-luc转移性结节生长中的功效,NSG-SGM3小鼠眼球后注射5×10^{12}gc/kg的AAV载体或GFP对照。rAAV8注射后25天,通过将1×10^{6}人CHLA255-Luc神经母细胞瘤细胞注射到这些小鼠的尾静脉中来建立转移性疾病。在肿瘤移植后4小时,小鼠输注1×10^{6}huPBMC,此后接着4个每周huPBMC注射(眼球后或尾静脉)。所有注射(与试剂无关)在100μL总体积中使用无菌PBS作为稀释剂来制备。在rAAV8注射后第21天从每只小鼠的眶后窦收集少量血液用于血

清药代动力学分析。用Xenogen IVIS光谱监测小鼠的肿瘤生长并用Living Image 4.4软件(Caliper Life Sciences,Hopkinton,MA)分析疾病进展。在肿瘤细胞注射后7天开始小鼠成像并随后每周进行直至满足实验终点标准,此时将动物人道地安乐死。所有存活动物在第42天处死用于组织学分析。在处理组和对照组观察到移植物抗宿主疾病的一些证据。实验概况提供于图21A中。荷瘤小鼠在所示天的图像显示于图21B中。通过发光测量的肿瘤生长显示于图21C中。总体小鼠存活率显示于图21D中,且总体小鼠体重显示于图21E中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图21F中。

[0564] 为了测试AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法在表达GD2的肺癌肿瘤模型中的功效,雄性小鼠眼球后注射1×10^{12}gc/kg的AAV载体或GFP对照,而雌性小鼠注射2×10^{12}、3×10^{12}或1×10^{13}gc/kg AAV载体或GFP对照(n=5/组)。所有rAAV8注射在尾静脉注射1×10^{6}H446-Luc小细胞肺癌细胞之前25天进行。在肿瘤移植后第3天施用HuPBMC,然后持续每周施用,总共4次输注。雌性小鼠以1×10^{12}gc/kg rAAV8剂量水平输注等体积的PBS(无huPBMC)以用作对照。实验概况提供于图22A中。荷瘤小鼠在所示天的图像显示于图22B中。通过发光测量的肿瘤生长显示于图22C中。总体小鼠存活率显示于图22D中,且总体小鼠体重显示于图22E中。抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白的浓度显示于图22F中。这些结果表明在3-4周后观察到转移性肿瘤,主要在小鼠的胸部和颅部区域。

[0565] 在另一实验中,经由侧尾静脉向25只NSG-SGM3小鼠(10只雌性,15只雄性)注射1×10^{6}H446-Luc细胞;少数错失的注射替代地经由眼球后途径施用,但这些动物最终从进一步的分析中排除。在肿瘤注射后第17天,小鼠输注5×10^{6}huPBMC,这每周持续,总共4次输注。在肿瘤注射后第18天,小鼠眼球后注射rAAV8-αGD2-αCD3(对于雄性,5×10^{12}gc/kg,或对于雌性,2.5×10^{13}gc/kg)以获得相当的循环dimert蛋白的水平。在rAAV8注射后第21天从每只小鼠的眶后窦收集少量血液用于血清药代动力学分析。在肿瘤细胞注射后18天开始小鼠成像并随后每周进行直至满足实验终点标准,此时将动物人道地安乐死。

[0566] 在另一实验中,经由侧尾静脉向25只NSG-SGM3小鼠(10只雌性,15只雄性)注射1×10^{6}CHLA255-Luc细胞。根据涉及担任试剂配制者、密钥管理员(盲者)、看门人(外部人员)、数据收集者(盲者),数据分析师(盲者)和分析后评估员(非盲者)的角色的不少于三名实验室人员和一名外部人员的实验室方案,该研究是双盲的。在肿瘤细胞注射后第6天施用huPBMC,然后每周持续,总共5次输注。在肿瘤植入后第7天,经由眼球后注射将rAAV8-αGD2-αCD3(对于雄性,5×10^{12}gc/kg,或对于雌性,2.5×10^{13}gc/kg)或5×10^{12}gc/kg的rAAV8-GFP施用于小鼠。在rAAV8注射后第21天从每只小鼠的眶后窦收集少量血液用于血清药代动力学分析。截至本文撰写时,正监测小鼠的肿瘤生长、体重/行为变化及存活。实验结束时,每只小鼠治疗的身份将被开盲。

[0567] 实施例9:体内评估抗GD2/抗CD3ε融合蛋白对预防癌症复发的作用

[0568] 使用hu-PBMC-NSG-SGM3小鼠中的转移性BT474克隆5肿瘤模型来评估AAV8-抗GD2/抗CD3ε双特异性融合蛋白疗法在预防癌症复发中的抗肿瘤潜力。

[0569] 简言之,将小鼠分成三组:未处理组、AAV8-GFP对照+huPBMC组和AAV8-抗GD2/抗CD3ε+huPBMC组。将1.0×10^{6}个BT474克隆5EGFP-Luc肿瘤细胞注射到每只小鼠的尾静脉中。肿瘤接种后4天,将小鼠称重并用化疗剂(例如,吉西他滨)治疗。化疗发生在第14、21、28、35和42天。然后停止化疗,并用AAV剂治疗小鼠,然后用AAV剂和huPBMC治疗。在第14、21、28、35

和42天重复AAV和huPBMC治疗。通过测量体重、体内成像(IVIS)和存活来追踪小鼠。

[0570] 通过引用并入

[0571] 本文提及的每篇专利文献和科学文章的全部公开内容通过引用并入本文用于所有目的。

[0572] 等同物

[0573] 在不脱离本公开的精神或基本特征的情况下,本公开可以以其他具体形式体现。因此,前述实施方式在所有方面都被认为是说明性的,而不是限制本文所述的公开内容。因此,本公开的范围由所附权利要求而不是由前述说明书指示,并且落入权利要求的等同物的含义和范围内的所有改变旨在被包含在其中。

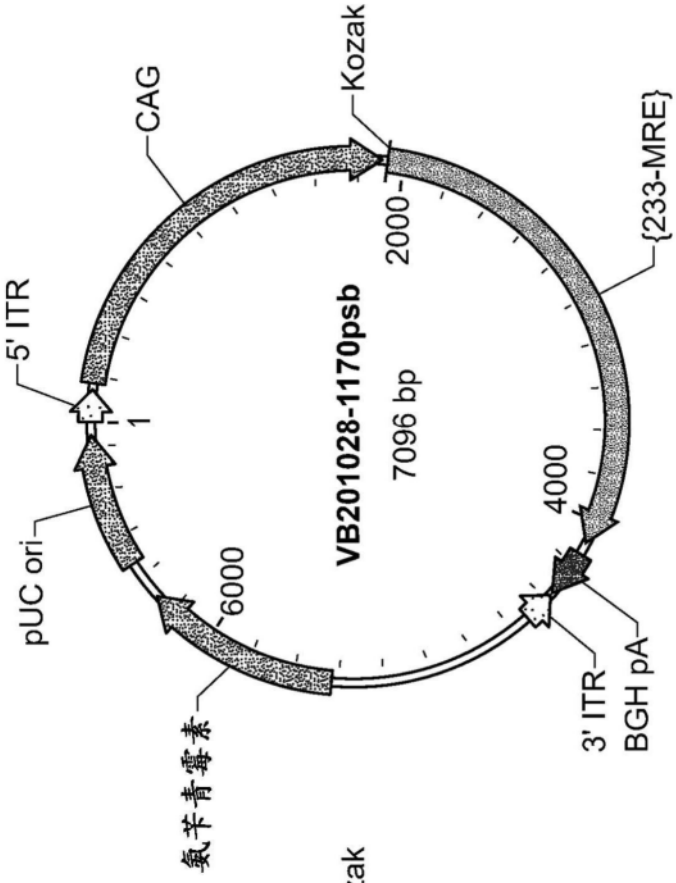

Kozak
CAG
2000
{233-MRE}
5' ITR
1
VB201028-1170psb
7096 bp
4000
pUC ori
6000
3' ITR
BGH pA
氯苄青霉素

图 1B

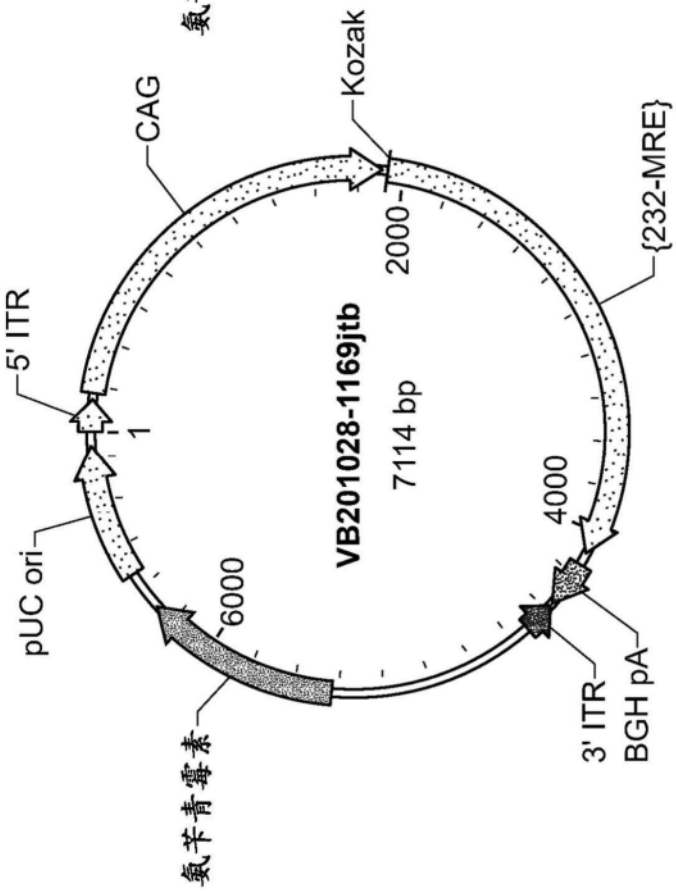

Kozak
CAG
2000
{232-MRE}
5' ITR
1
VB201028-1169jtb
7114 bp
4000
pUC ori
6000
3' ITR
BGH pA
氯苄青霉素

图 1A

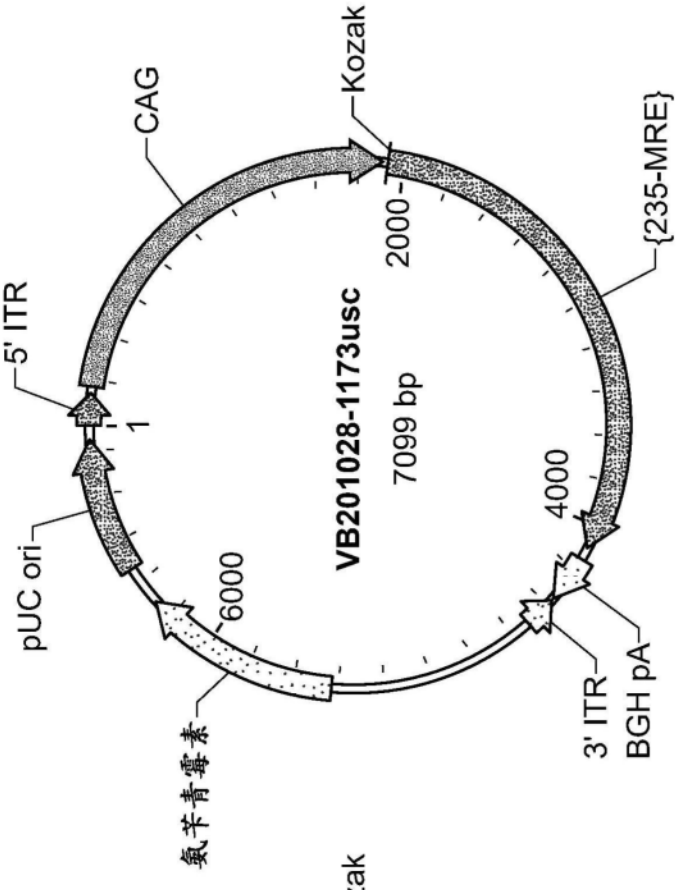

VB201028-1173usc
7099 bp
5' ITR
CAG
Kozak
{235-MRE}
pUC ori
氨苄青霉素
3' ITR
BGH pA
1
2000
4000
6000

图 1D

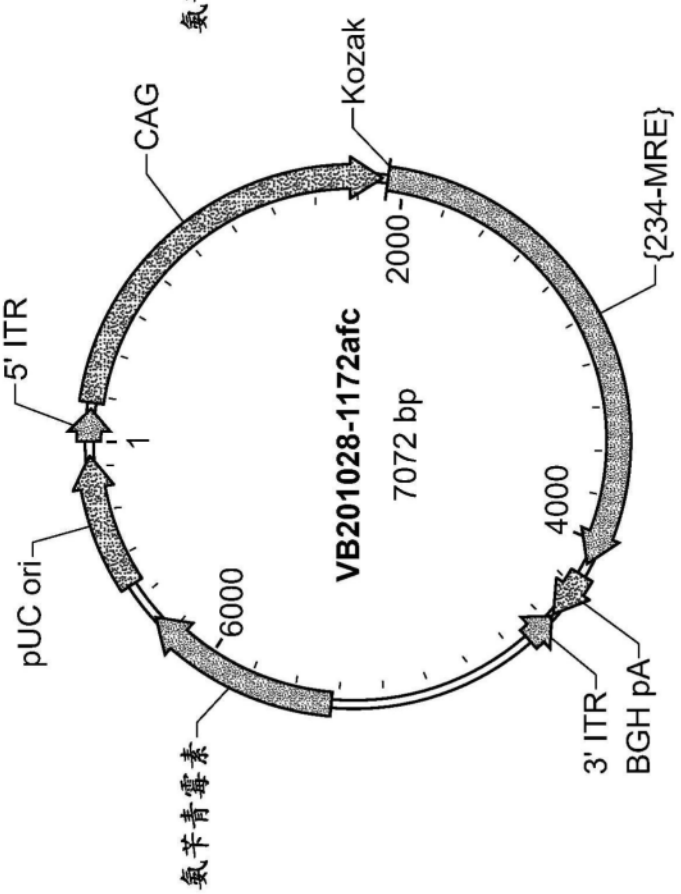

VB201028-1172afc
7072 bp
5' ITR
CAG
Kozak
{234-MRE}
pUC ori
氨苄青霉素
3' ITR
BGH pA
1
2000
4000
6000

图 1C

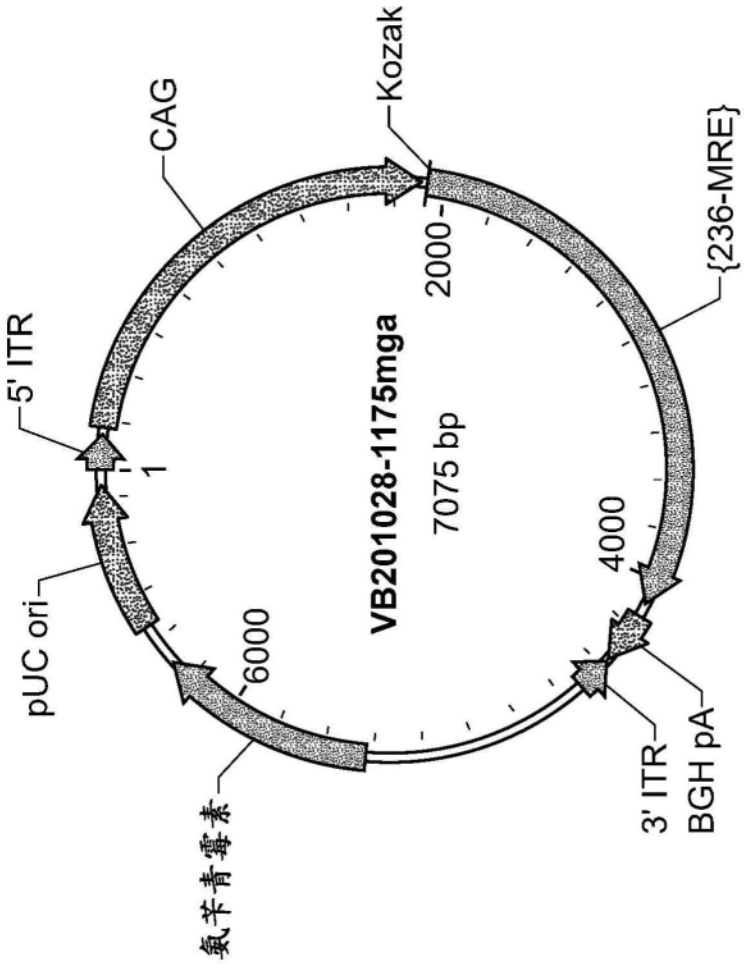

Kozak
CAG
{236-MRE}
2000
5' ITR
VB201028-1175mga
7075 bp
1
4000
pUC ori
6000
3' ITR
BGH pA
氯苄青霉素

图1E


身份标识
#1169 (232)
#1170 (233)
#1172 (234)
#1173 (235)
#1175 (236)
CAG
K
Sec
GD2-scFv (hu3F8V5)
S
L
CD3-scFv (OKT3)
CD3-scFv (L2K-07)
GD2-scFv (14G2a)
mWPRE
pA

图2A

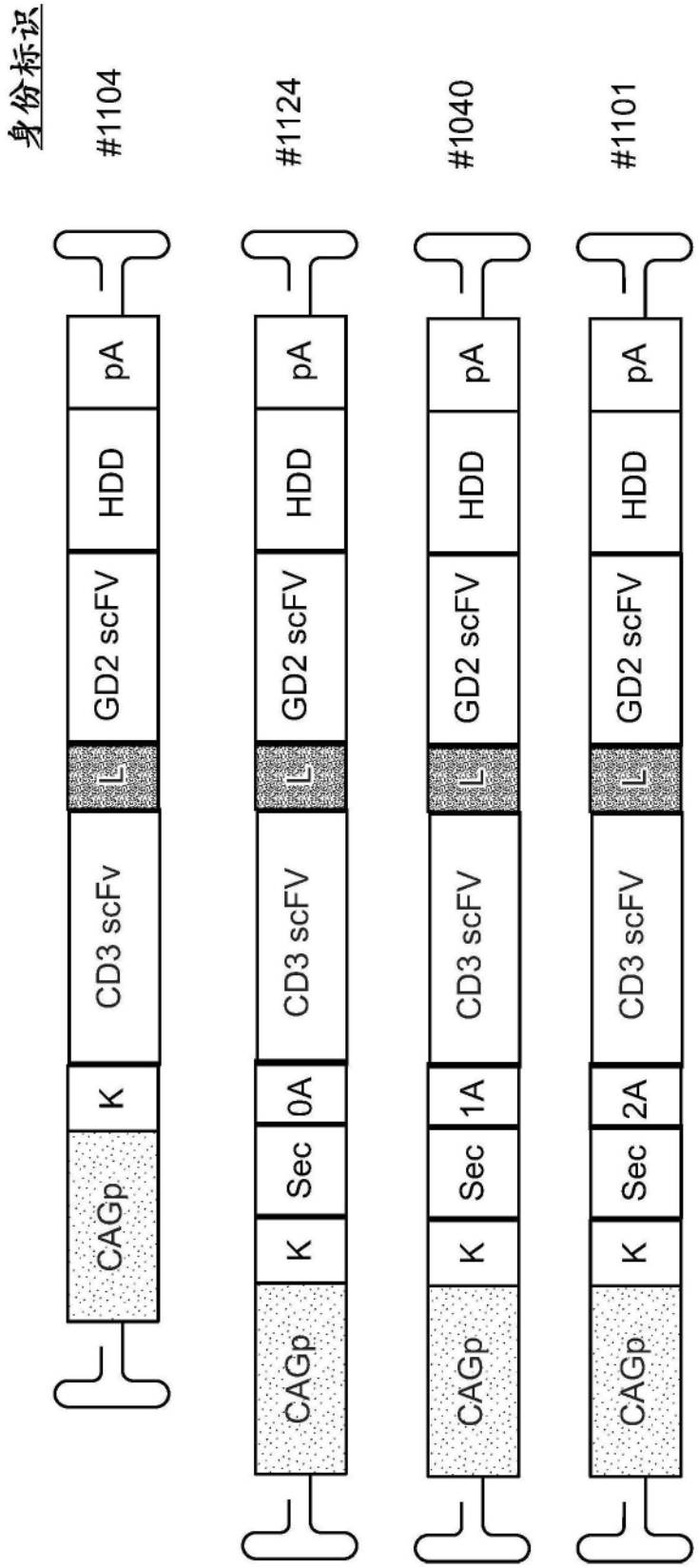

身份标识
#1104
#1124
#1040
#1101
CAGp
K
CD3 scFv
L
GD2 scFv
HDD
pA
Sec
0A
1A
2A

图2B

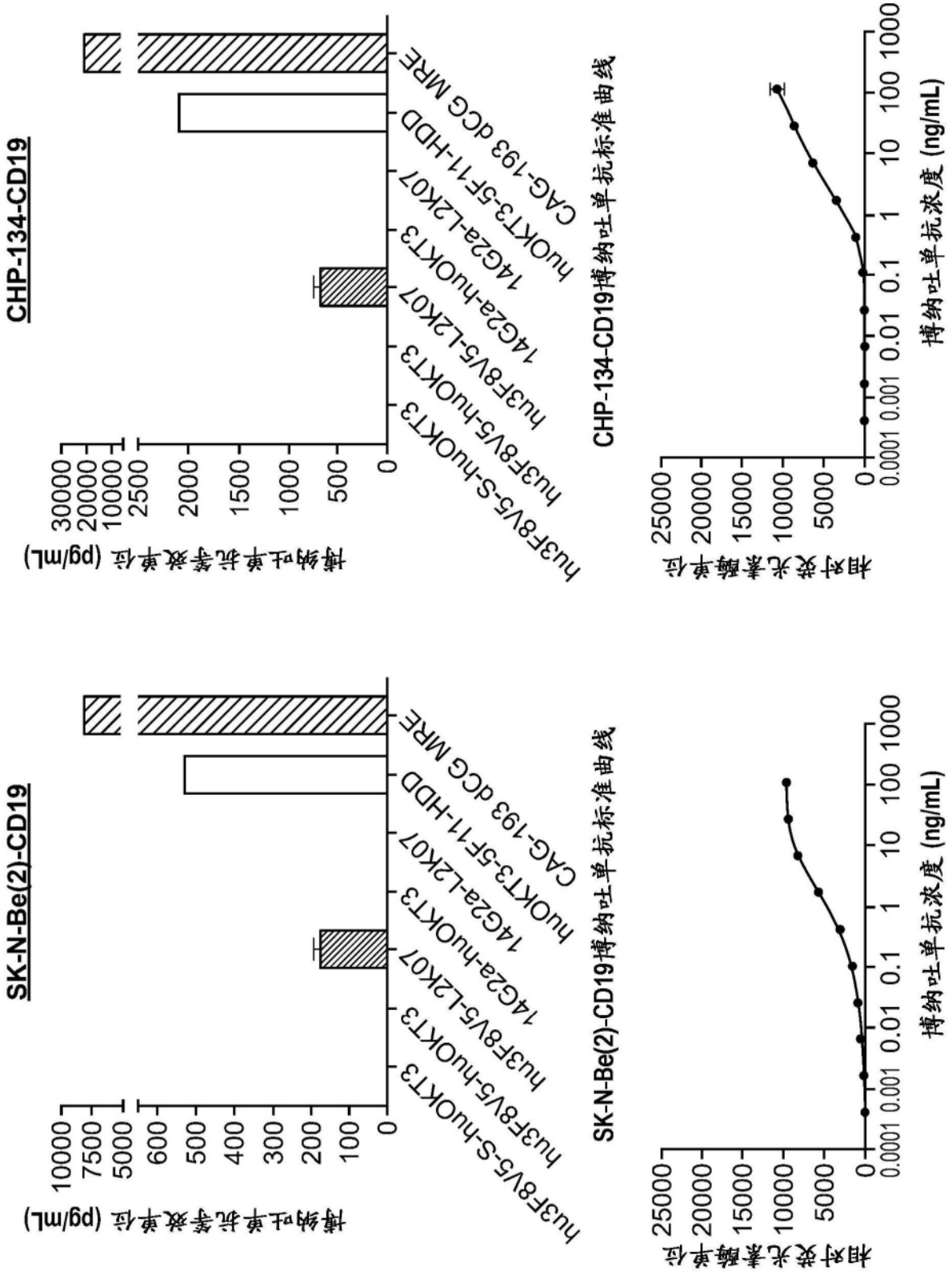

CHP-134-CD19
博纳吐单抗等效单位 (pg/mL)
30000
20000
10000
2500
2000
1500
1000
500
0
hu3F8V5-S-huOKT3
hu3F8V5-huOKT3
hu3F8V5-L2K07
14G2a-huOKT3
14G2a-L2K07
huOKT3-5F11-HDD
CAG-193 dCG MRE
CHP-134-CD19博纳吐单抗标准曲线
相对荧光素酶单位
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
博纳吐单抗浓度 (ng/mL)
SK-N-Be(2)-CD19
博纳吐单抗等效单位 (pg/mL)
10000
7500
5000
600
500
400
300
200
100
0
hu3F8V5-S-huOKT3
hu3F8V5-huOKT3
hu3F8V5-L2K07
14G2a-huOKT3
14G2a-L2K07
huOKT3-5F11-HDD
CAG-193 dCG MRE
SK-N-Be(2)-CD19博纳吐单抗标准曲线
相对荧光素酶单位
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
博纳吐单抗浓度 (ng/mL)

图3

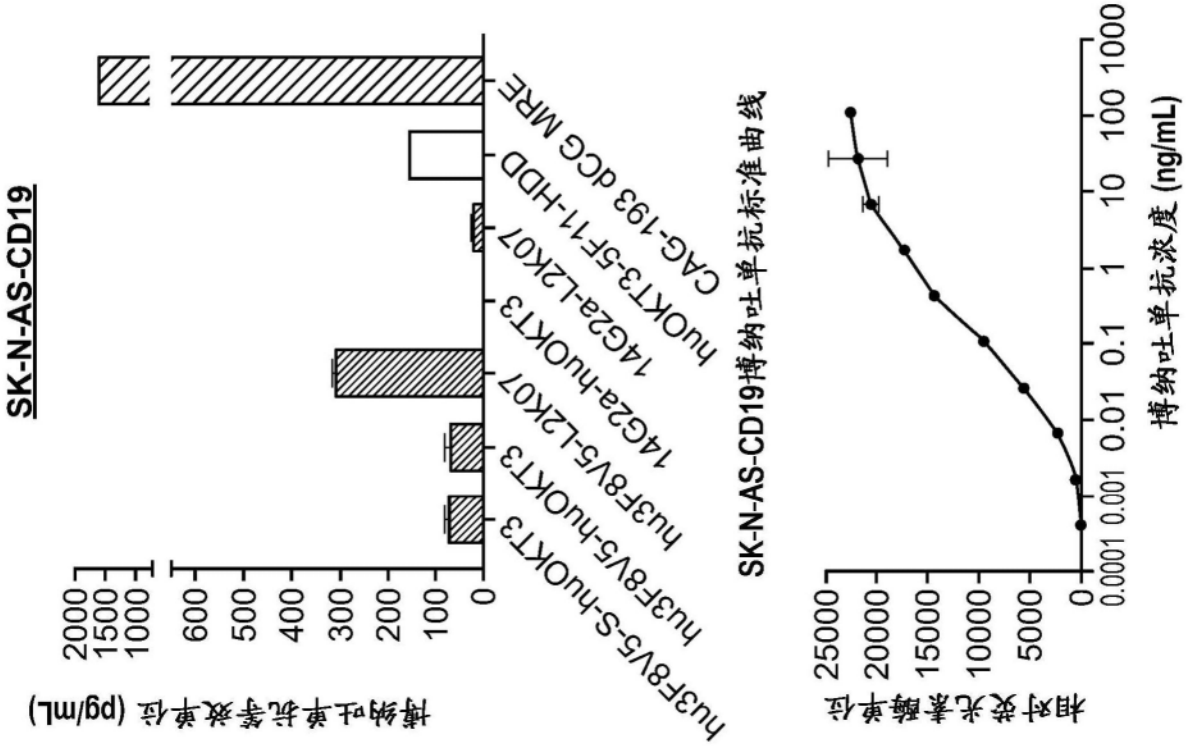

SK-N-AS-CD19
博纳吐单抗等效单位 (pg/mL)
2000
1500
1000
600
500
400
300
200
100
0
hu3F8V5-S-huOKT3
hu3F8V5-huOKT3
hu3F8V5-L2K07
14G2a-L2K07
14G2a-huOKT3
huOKT3-5F11-HDD
CAG-193 dCG MRE
SK-N-AS-CD19博纳吐单抗标准曲线
相对荧光素酶单位
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
博纳吐单抗浓度 (ng/mL)

图3 (续)

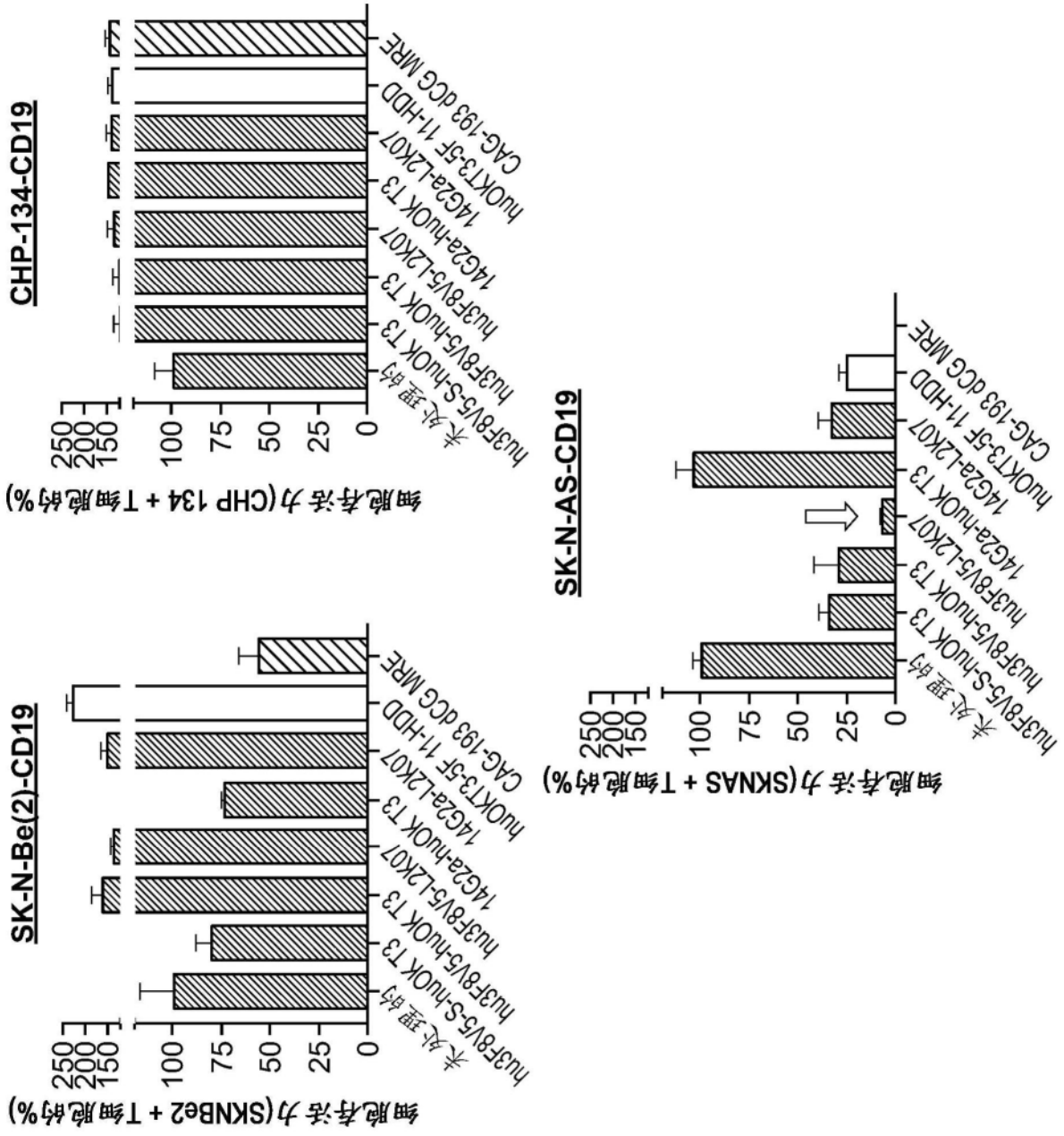

SK-N-Be(2)-CD19
细胞存活力(SKNBe2 + T细胞的%)
未处理的
hu3F8V5-S-huOK T3
hu3F8V5-huOK T3
hu3F8V5-L2K07
14G2a-huOK T3
14G2a-L2K07
huOKT3-5F 11-HDD
CAG-193 dCG MRE
SK-N-AS-CD19
细胞存活力(SKNAS + T细胞的%)
CHP-134-CD19
细胞存活力(CHP 134 + T细胞的%)
250
200
150
100
75
50
25
0

图4

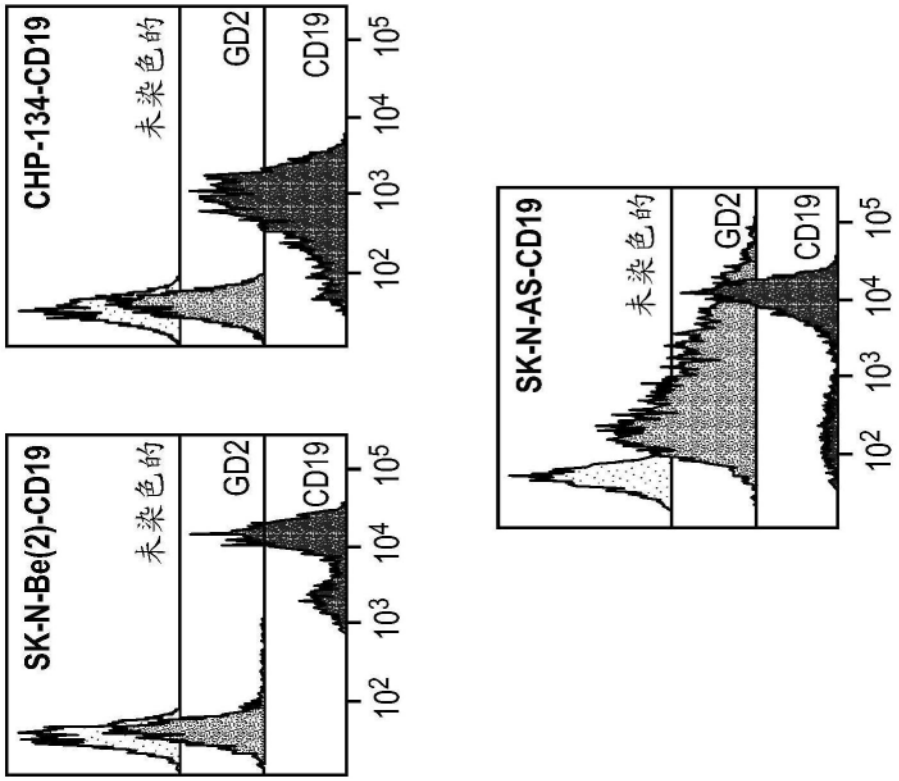

CHP-134-CD19
未染色的
GD2
CD19
SK-N-Be(2)-CD19
未染色的
GD2
CD19
SK-N-AS-CD19
未染色的
GD2
CD19
10^2 10^3 10^4 10^5

图5A

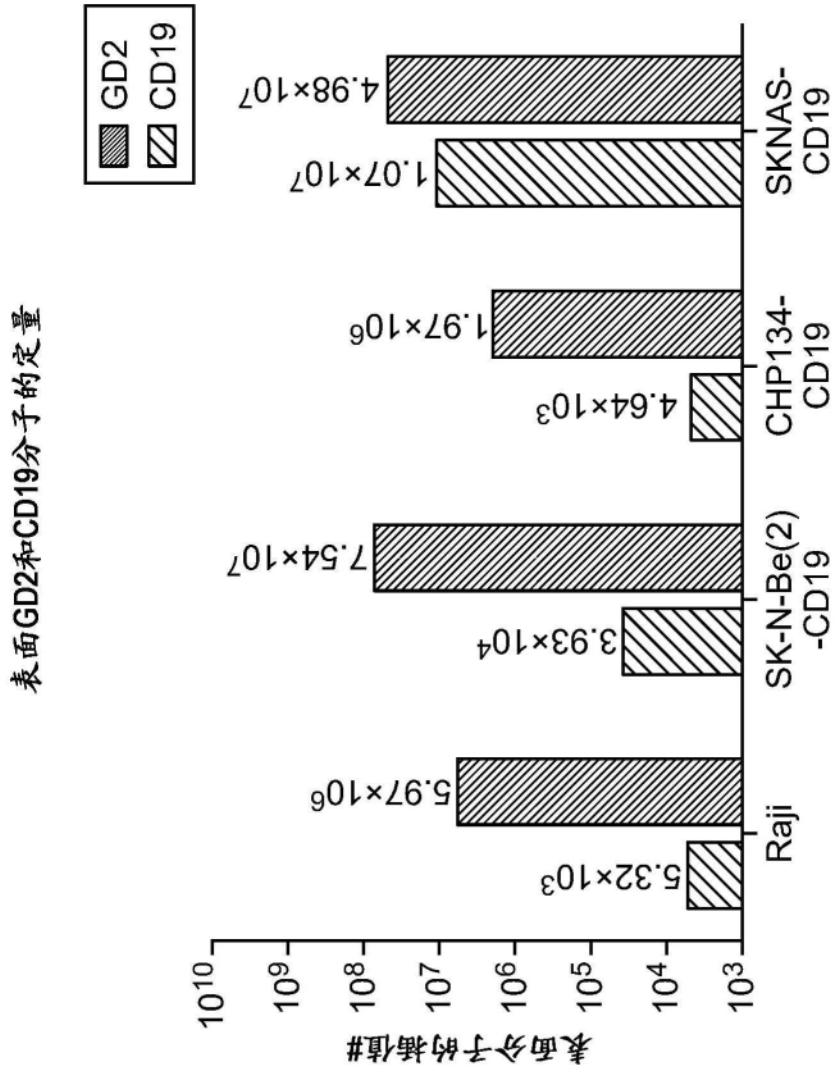

GD2
CD19
表面GD2和CD19分子的定量
表面分子的插值#
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
5.32×10^3
5.97×10^6
3.93×10^4
7.54×10^7
4.64×10^3
1.97×10^6
1.07×10^7
4.98×10^7
Raji
SK-N-Be(2)-CD19
CHP134-CD19
SKNAS-CD19

图5B

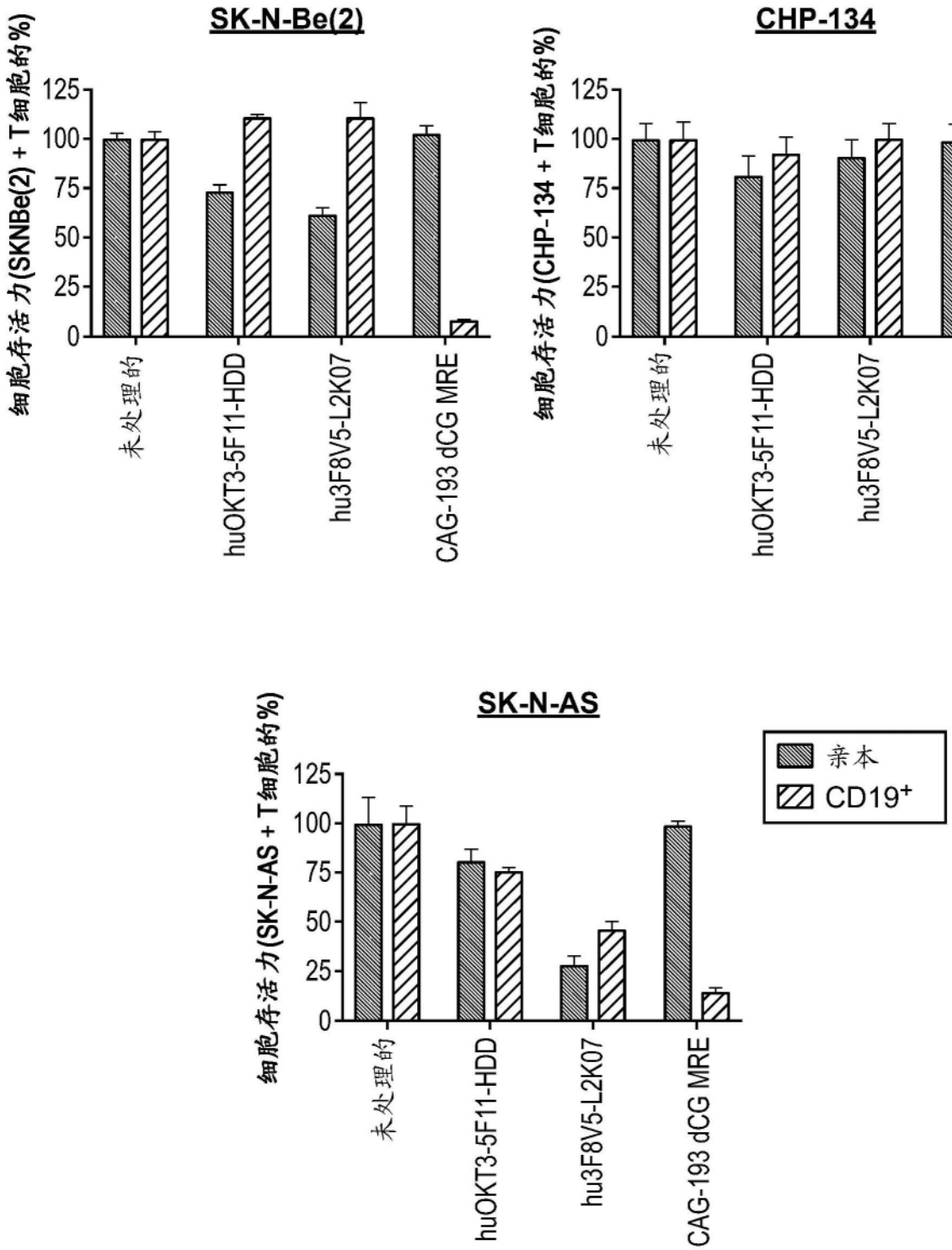

SK-N-Be(2)
细胞存活力(SKNBe(2) + T细胞的%)
125
100
75
50
25
0
未处理的
huOKT3-5F11-HDD
hu3F8V5-L2K07
CAG-193 dCG MRE
CHP-134
细胞存活力(CHP-134 + T细胞的%)
SK-N-AS
细胞存活力(SK-N-AS + T细胞的%)
亲本
CD19+

图6

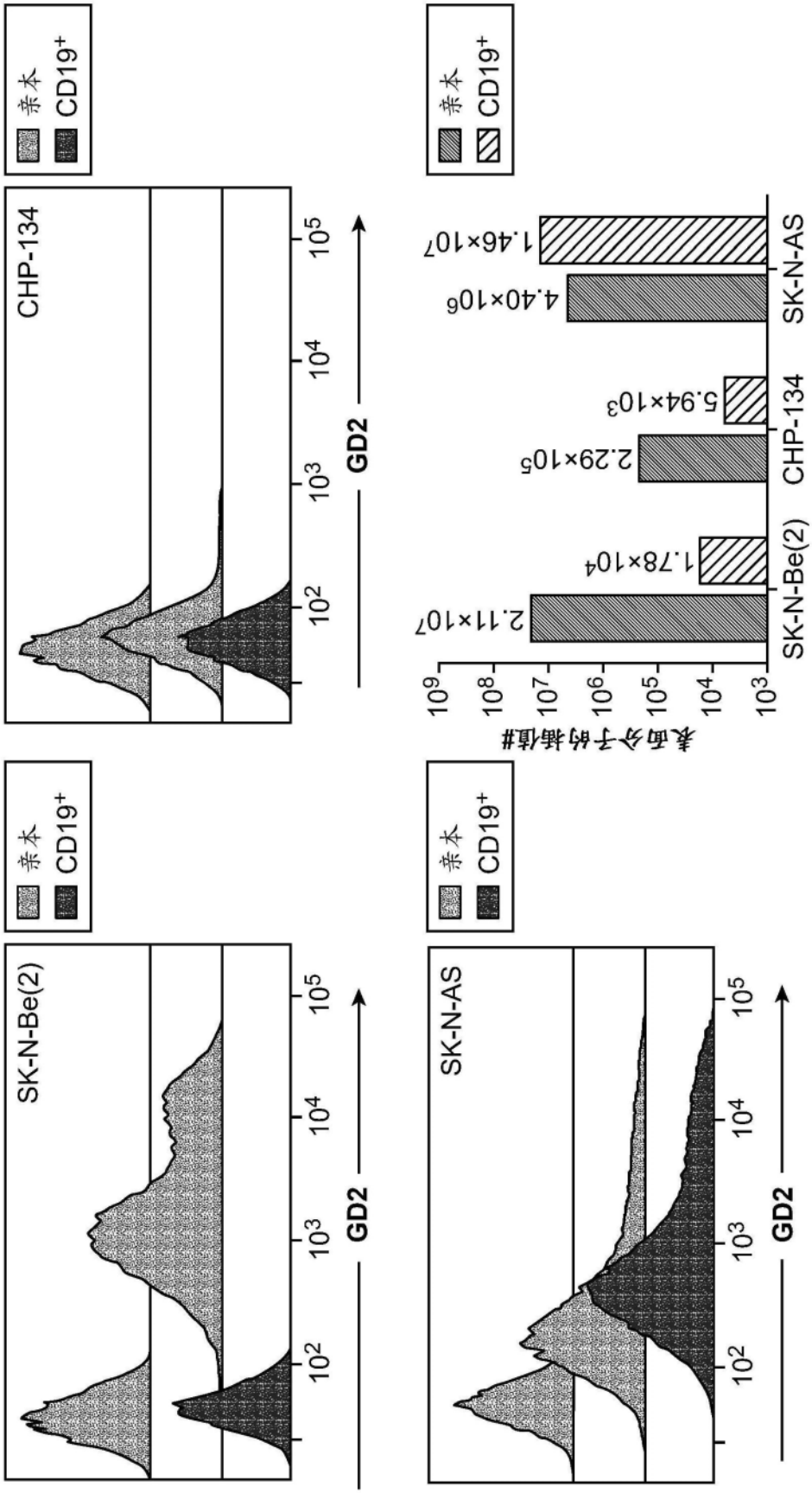

亲本
CD19+
CHP-134
SK-N-Be(2)
SK-N-AS
GD2
表面分子的插值#
2.11×10^7
1.78×10^4
2.29×10^5
5.94×10^3
4.40×10^6
1.46×10^7

图7

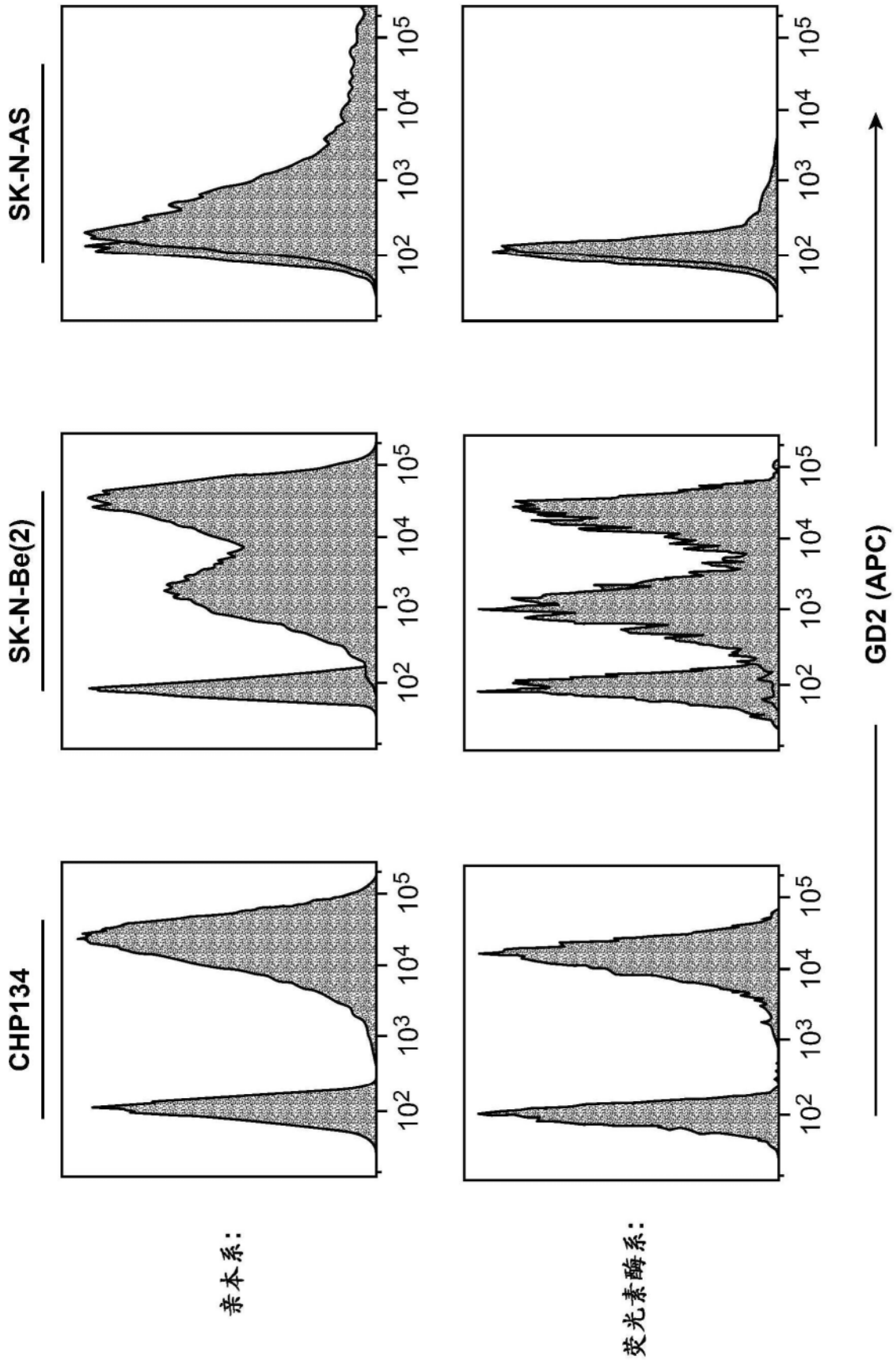


图8

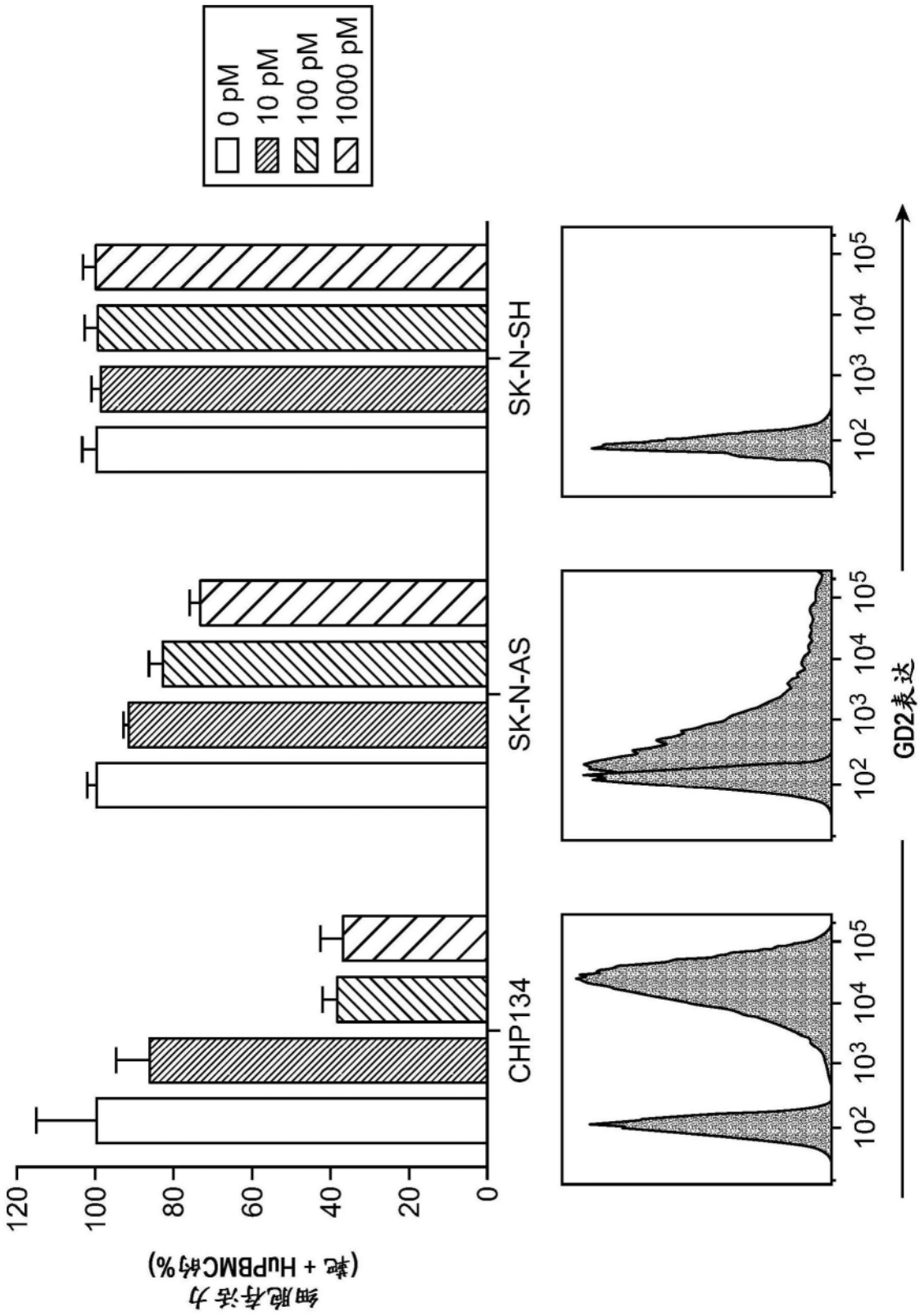

0 pM
10 pM
100 pM
1000 pM
细胞存活力
(靶 + HuPBMC的%)
120
100
80
60
40
20
0
CHP134
SK-N-AS
SK-N-SH
GD2表达
10²
10³
10⁴
10⁵

图9

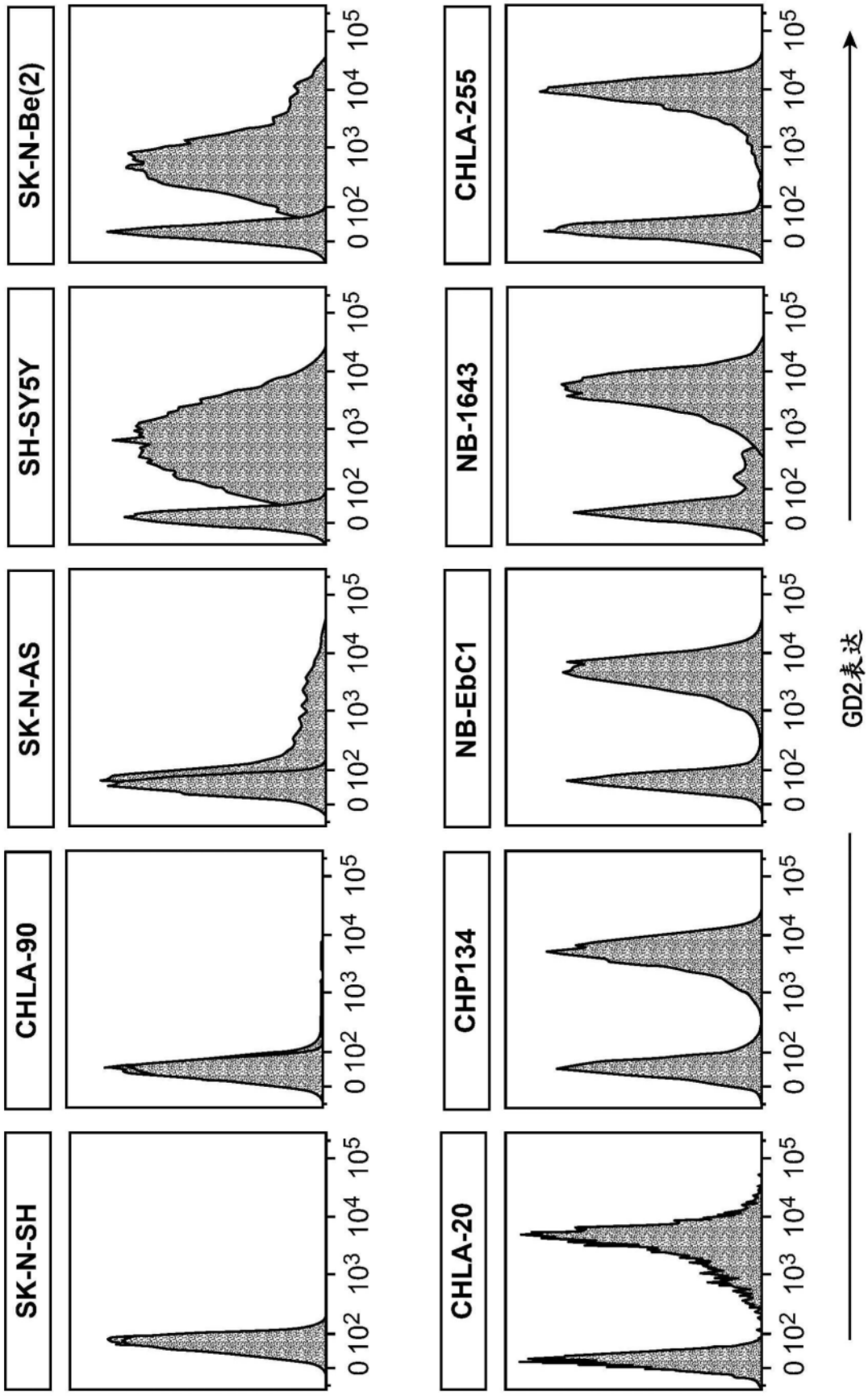

SK-N-SH
CHLA-90
SK-N-AS
SH-SY5Y
SK-N-Be(2)
CHLA-20
CHP134
NB-EbC1
NB-1643
CHLA-255
0 10^2 10^3 10^4 10^5
GD2表达

图10A

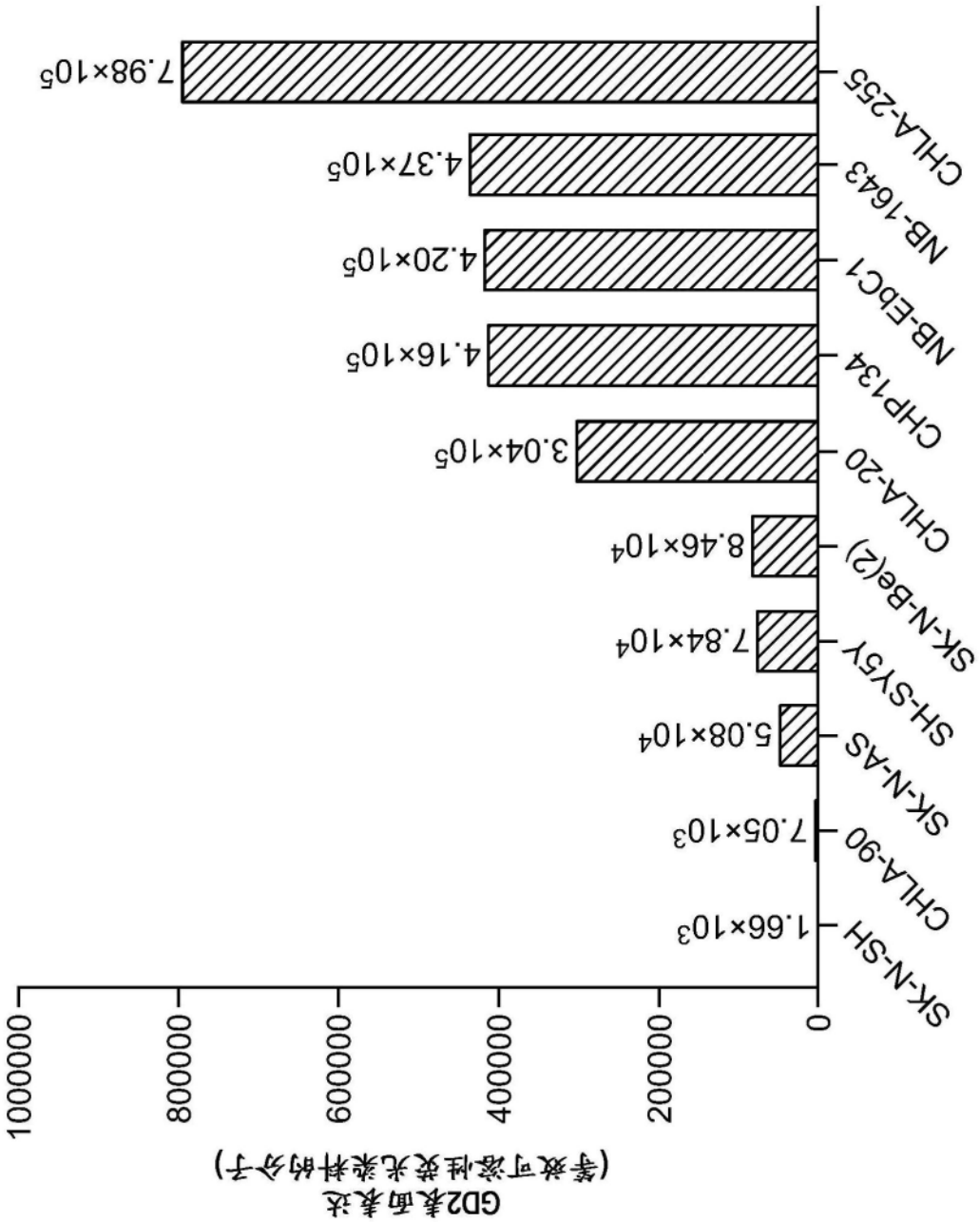

GD2表面表达
(荧光可溶性荧光染料的分子)
0
200000
400000
600000
800000
1000000
SK-N-SH
CHLA-90
SK-N-AS
SH-SY5Y
SK-N-Be(2)
CHLA-20
CHP134
NB-EBC1
NB-1643
CHLA-255
1.66×10³
7.05×10³
5.08×10⁴
7.84×10⁴
8.46×10⁴
3.04×10⁵
4.16×10⁵
4.20×10⁵
4.37×10⁵
7.98×10⁵

图10B

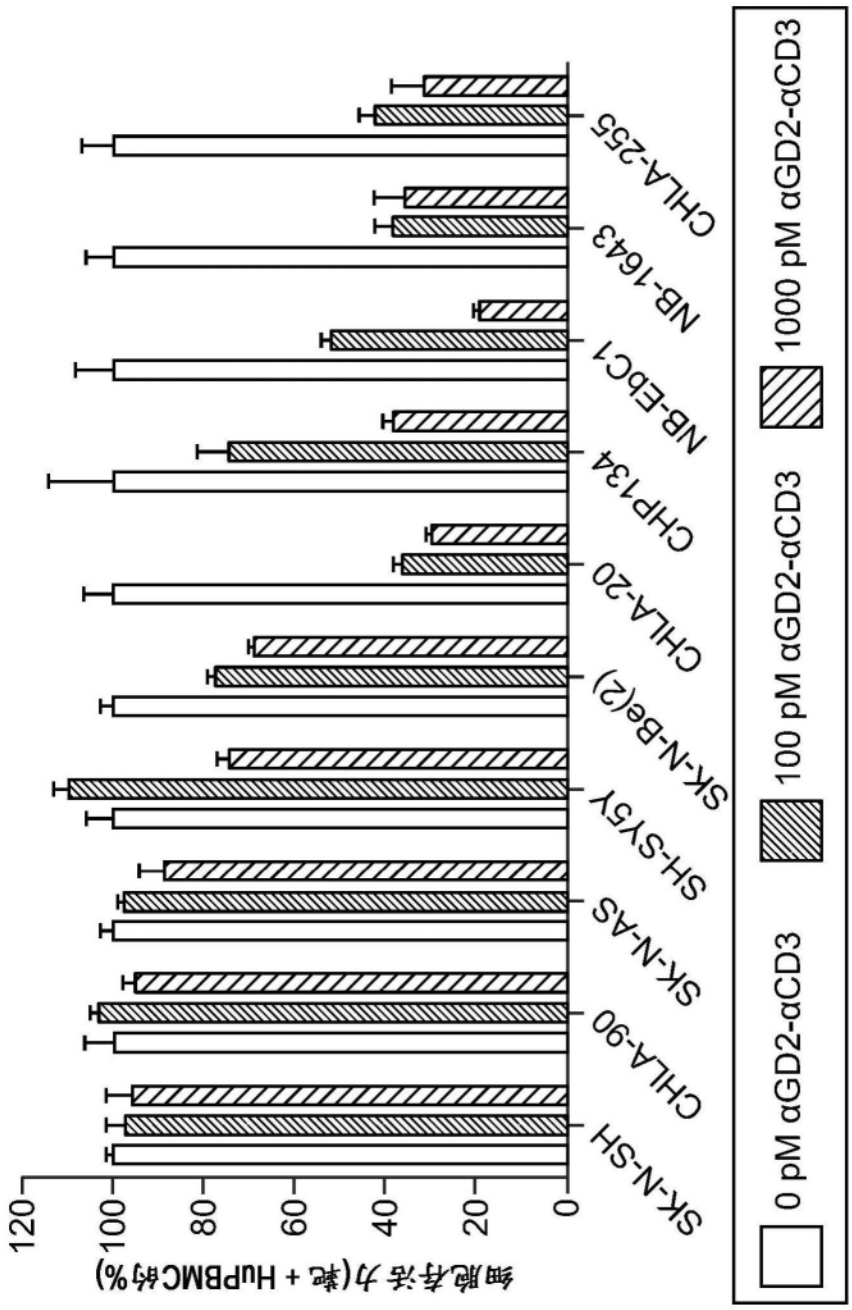

0 pM αGD2-αCD3
100 pM αGD2-αCD3
1000 pM αGD2-αCD3
SK-N-SH
CHLA-90
SK-N-AS
SH-SY5Y
SK-N-Be(2)
CHLA-20
CHP134
NB-EBC1
NB-1643
CHLA-255
0
20
40
60
80
100
120
细胞存活力(靶 + HuPBMC的%)

图10C

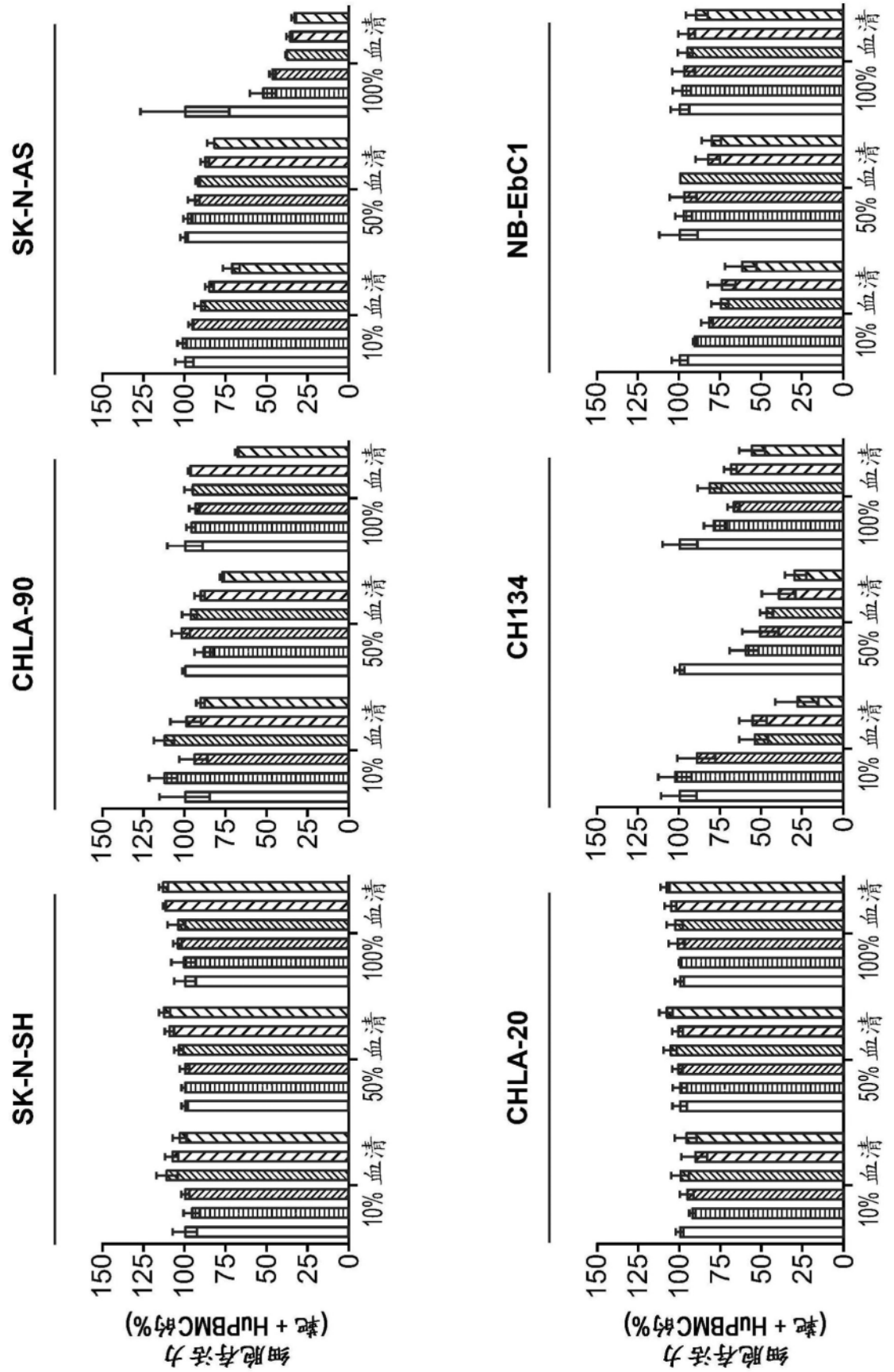

SK-N-SH
CHLA-90
SK-N-AS
CHLA-20
CH134
NB-EbC1
细胞存活力
(靶 + HuPBMC的%)
150
125
100
75
50
25
0
10% 血清
50% 血清
100% 血清

图11

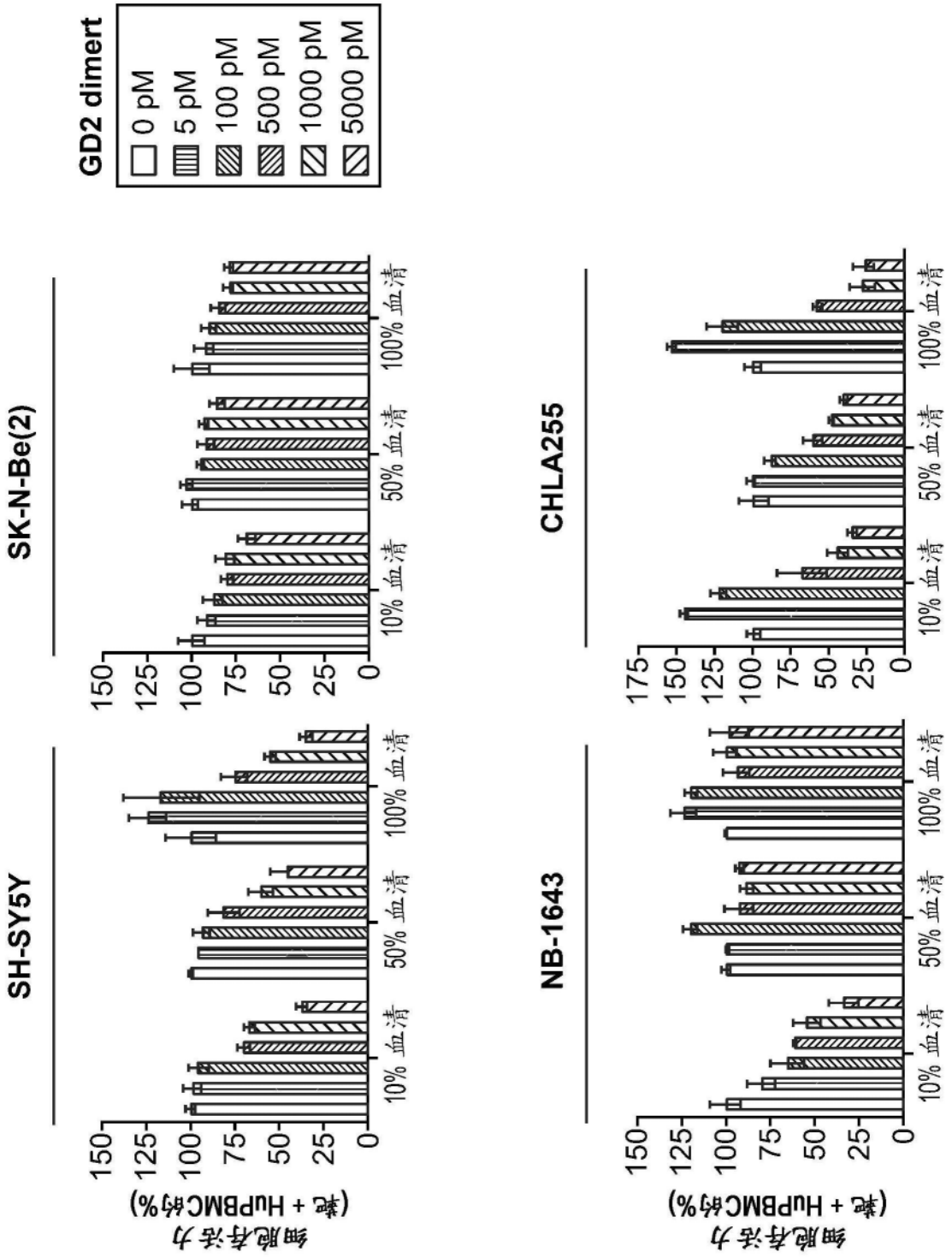

GD2 dimert
0 pM
5 pM
100 pM
500 pM
1000 pM
5000 pM
SH-SY5Y
SK-N-Be(2)
NB-1643
CHLA255
细胞存活力
(靶 + HuPBMC的%)
10% 血清
50% 血清
100% 血清

图11(续)

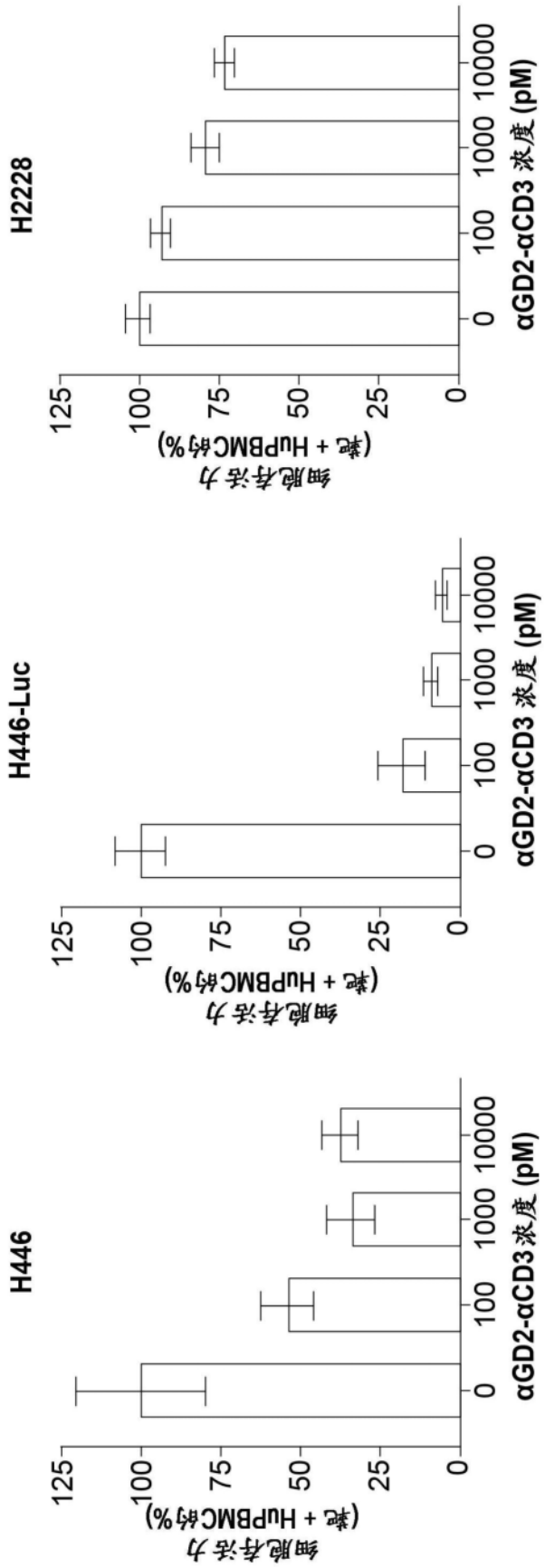

H446
H446-Luc
H2228
细胞存活力
(靶 + HuPBMC的%)
0
25
50
75
100
125
0
100
1000
10000
αGD2-αCD3浓度 (pM)

图12

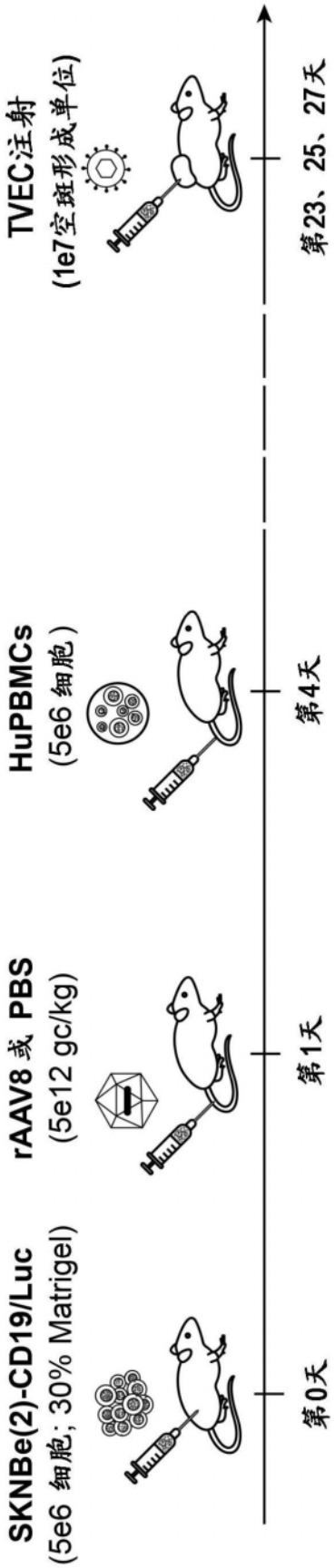

SKNBe(2)-CD19/Luc
(5e6 细胞; 30% Matrigel)
rAAV8 或 PBS
(5e12 gc/kg)
HuPBMCs
(5e6 细胞)
TVEC注射
(1e7空斑形成单位)
第0天
第1天
第4天
第23、25、27天

图13A

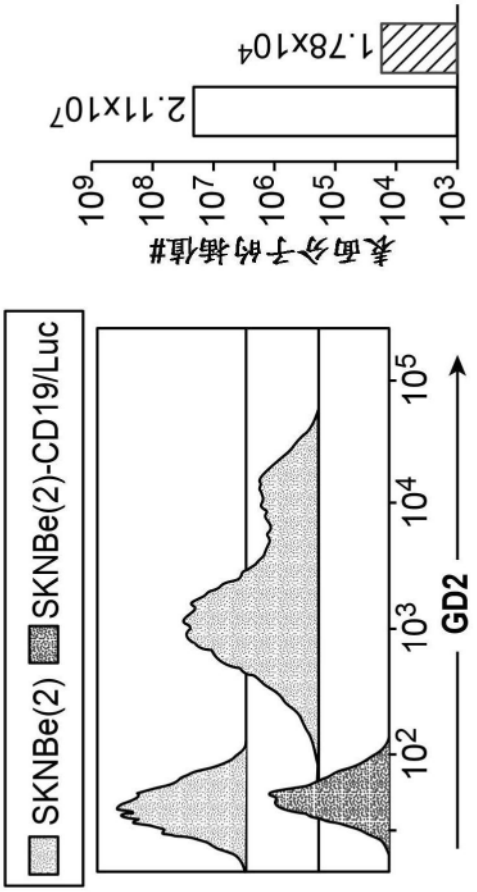

SKNBe(2)
SKNBe(2)-CD19/Luc
GD2
10^2
10^3
10^4
10^5
表面分子的捕值#
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
$2.11x10^7$
$1.78x10^4$

图13B

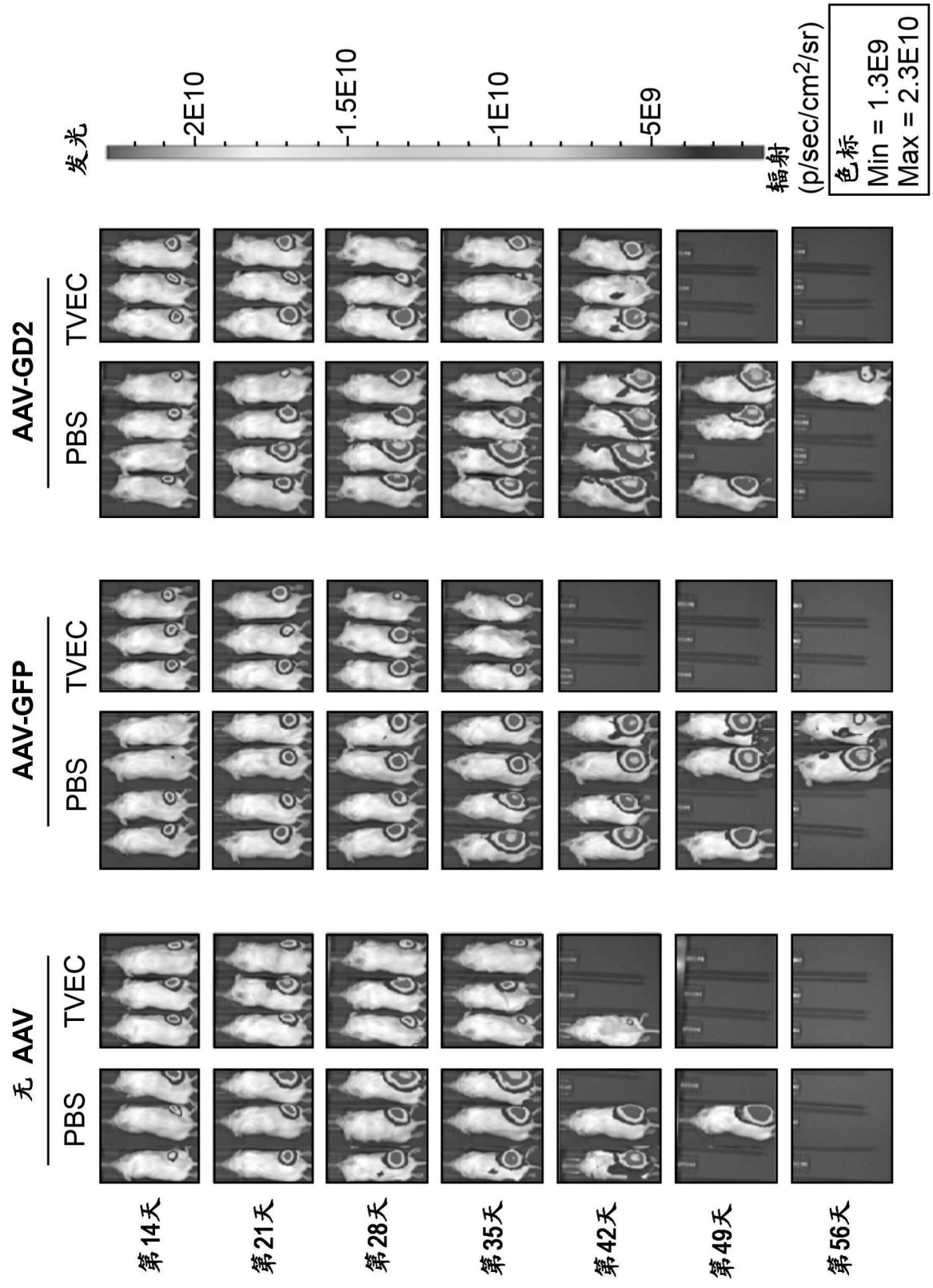

发光
2E10
1.5E10
1E10
5E9
辐射
(p/sec/cm²/sr)
色标
Min = 1.3E9
Max = 2.3E10
无 AAV
AAV-GFP
AAV-GD2
PBS
TVEC
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天

图13C

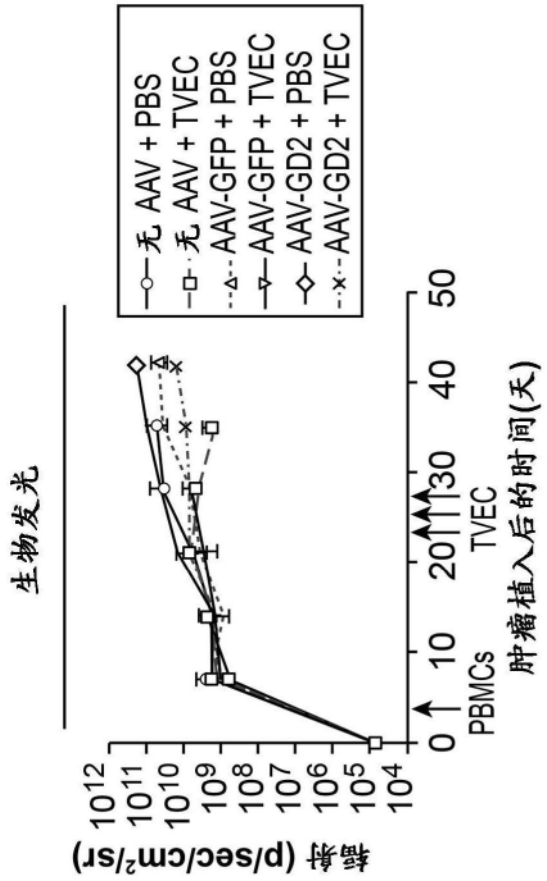

生物发光
辐射 (p/sec/cm²/sr)
10¹²
10¹¹
10¹⁰
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
0
10
20
30
40
50
PBMCs
TVEC
肿瘤植入后的时间(天)
无 AAV + PBS
无 AAV + TVEC
AAV-GFP + PBS
AAV-GFP + TVEC
AAV-GD2 + PBS
AAV-GD2 + TVEC

图13D

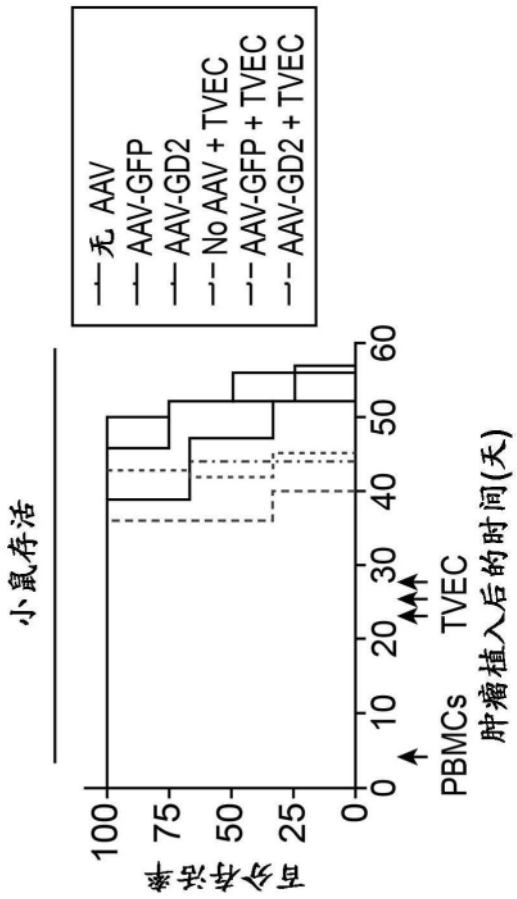

无 AAV
AAV-GFP
AAV-GD2
No AAV + TVEC
AAV-GFP + TVEC
AAV-GD2 + TVEC
小鼠存活
百分存活率
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
50
60
PBMCs
TVEC
肿瘤植入后的时间(天)

图13E

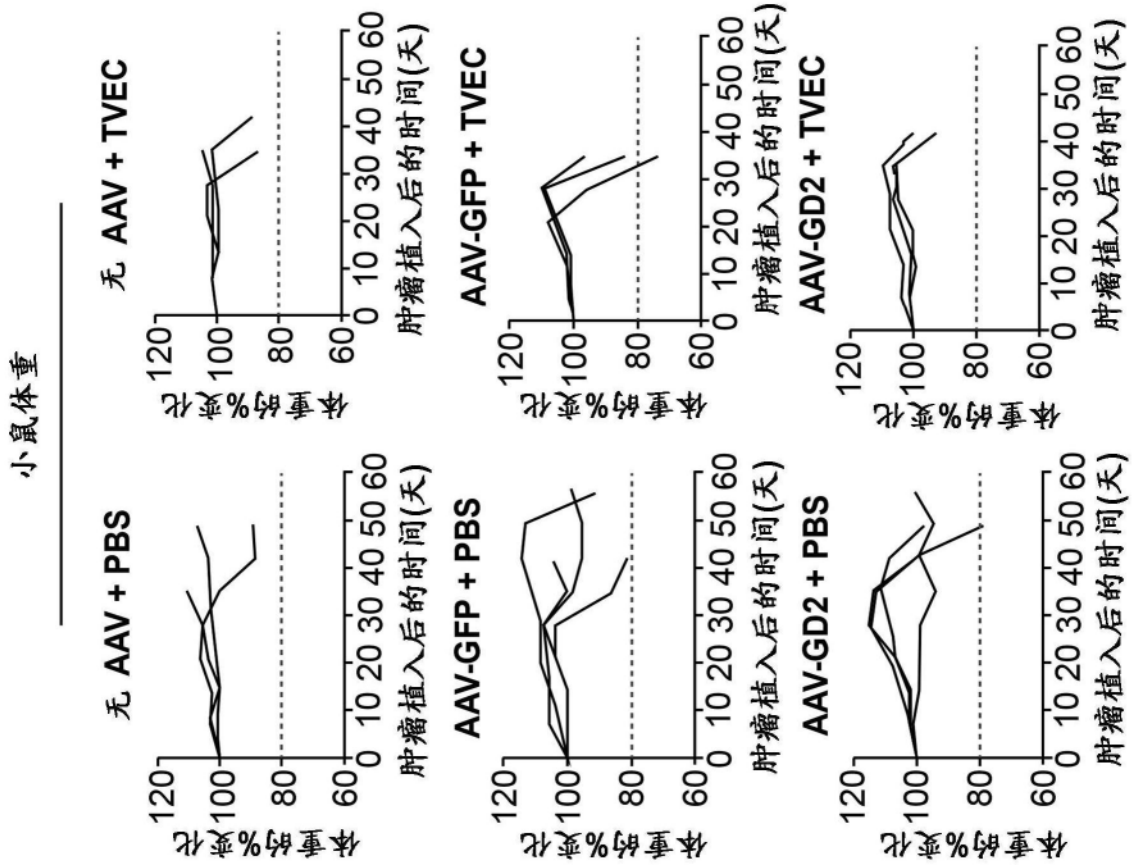

小鼠体重
无 AAV + PBS
无 AAV + TVEC
AAV-GFP + PBS
AAV-GFP + TVEC
AAV-GD2 + PBS
AAV-GD2 + TVEC
体重的%变化
肿瘤植入后的时间(天)
120
100
80
60
0 10 20 30 40 50 60

图13F

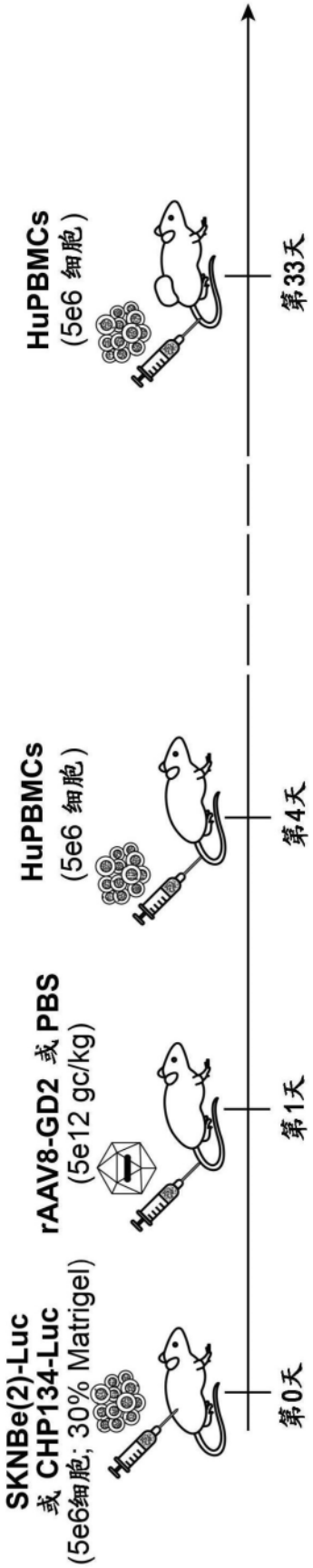

SKNBe(2)-Luc
或 CHP134-Luc
(5e6细胞; 30% Matrigel)
第0天
rAAV8-GD2 或 PBS
(5e12 gc/kg)
第1天
HuPBMCs
(5e6 细胞)
第4天
HuPBMCs
(5e6 细胞)
第33天

图14A

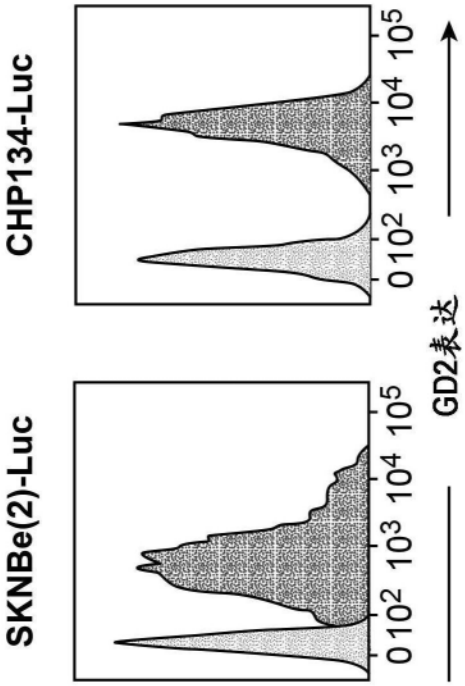


图14B

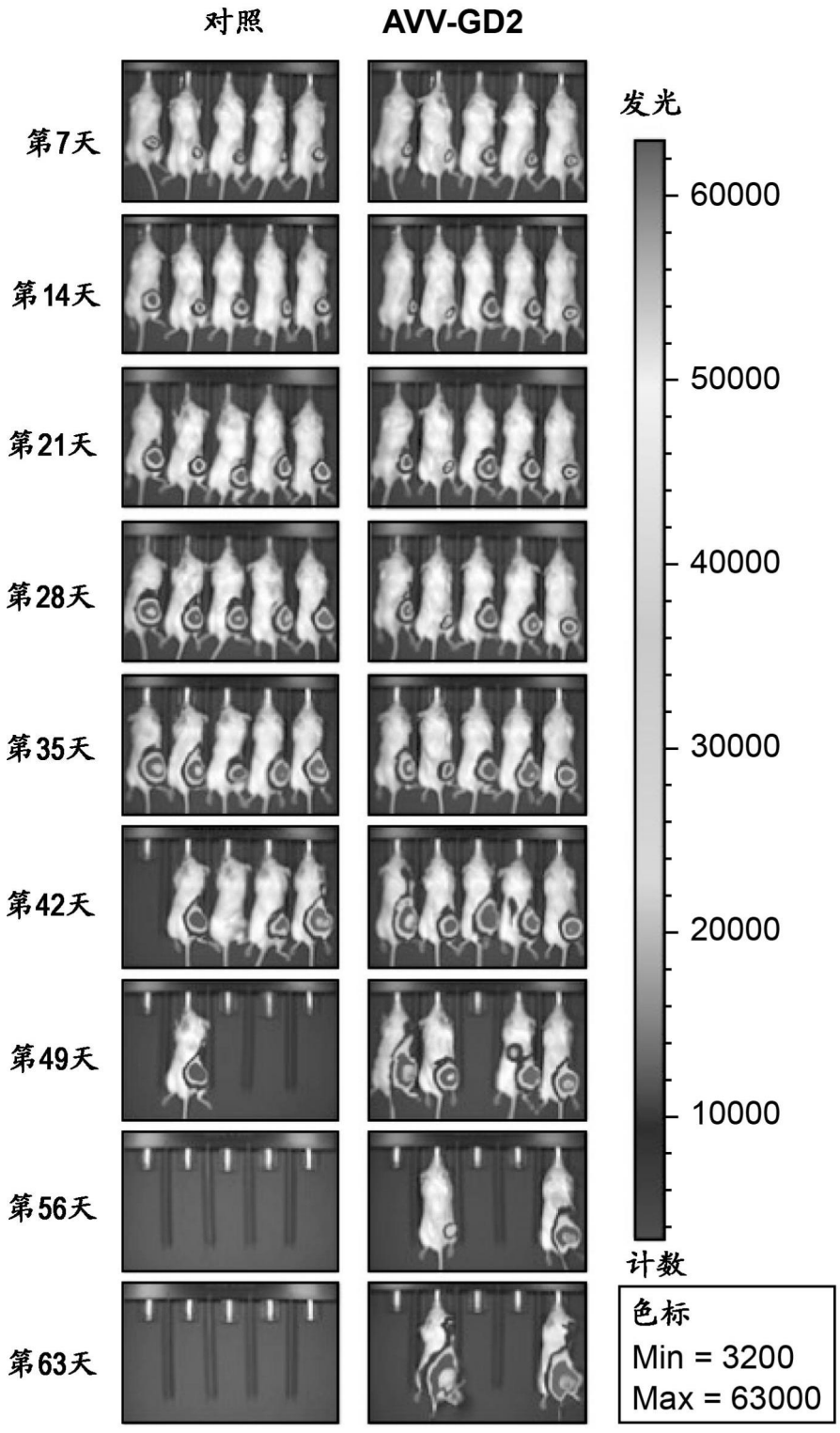

对照
AVV-GD2
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天
第63天
发光
60000
50000
40000
30000
20000
10000
计数
色标
Min = 3200
Max = 63000

图14C

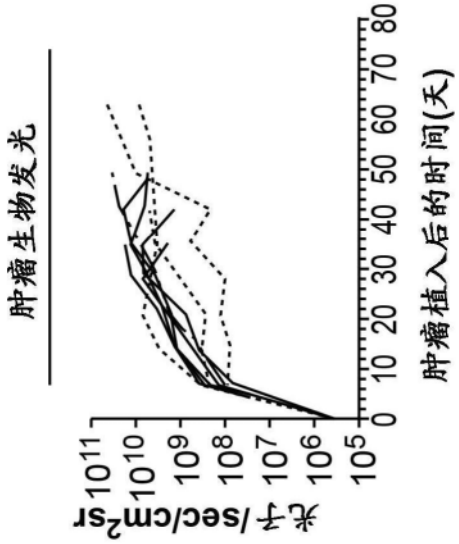


图14D

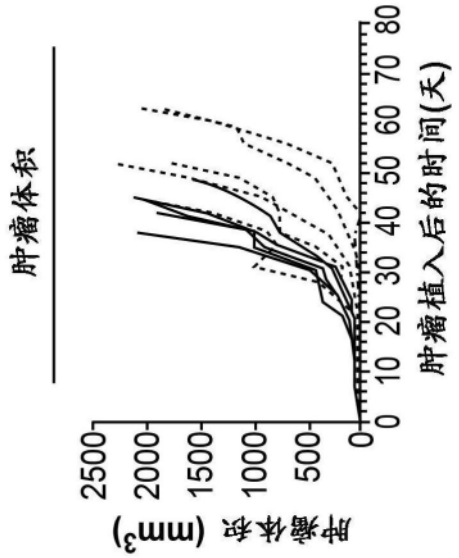


图14E

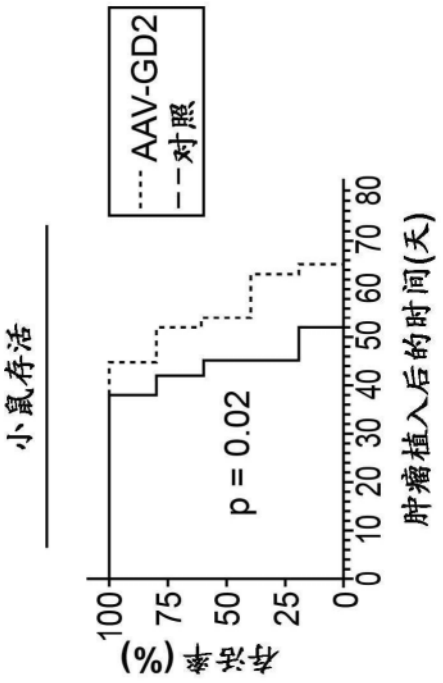

小鼠存活
存活率 (%)
100
75
50
25
0
p = 0.02
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)
AAV-GD2
对照

图14F

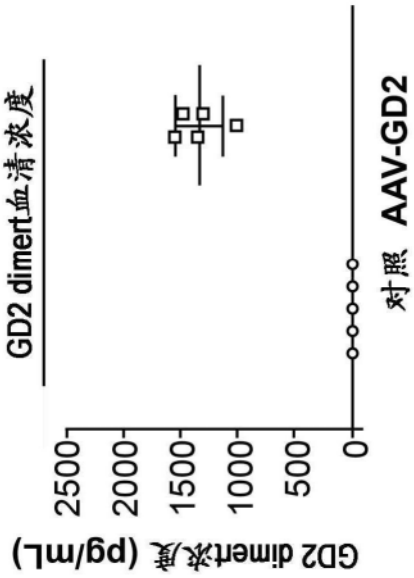

GD2 dimert血清浓度
GD2 dimert浓度 (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
对照
AAV-GD2

图14G

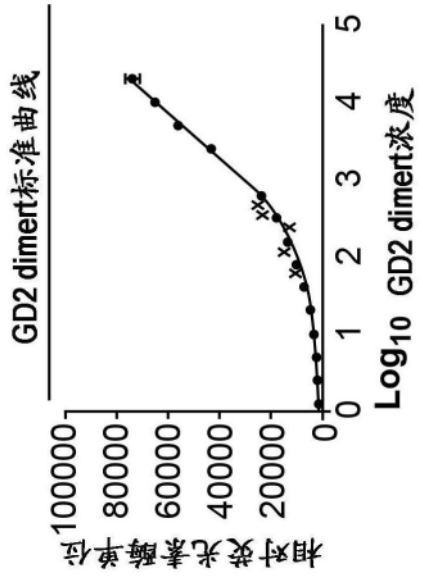

GD2 dimert标准曲线
相对荧光素酶单位
100000
80000
60000
40000
20000
0
0 1 2 3 4 5
Log10 GD2 dimert浓度

图14H

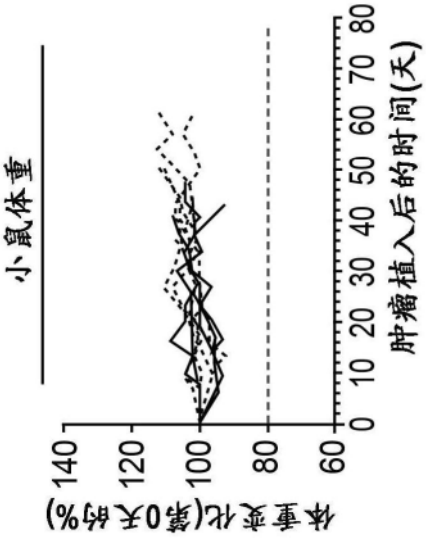

小鼠体重
体重变化(第0天的%)
140
120
100
80
60
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图14I

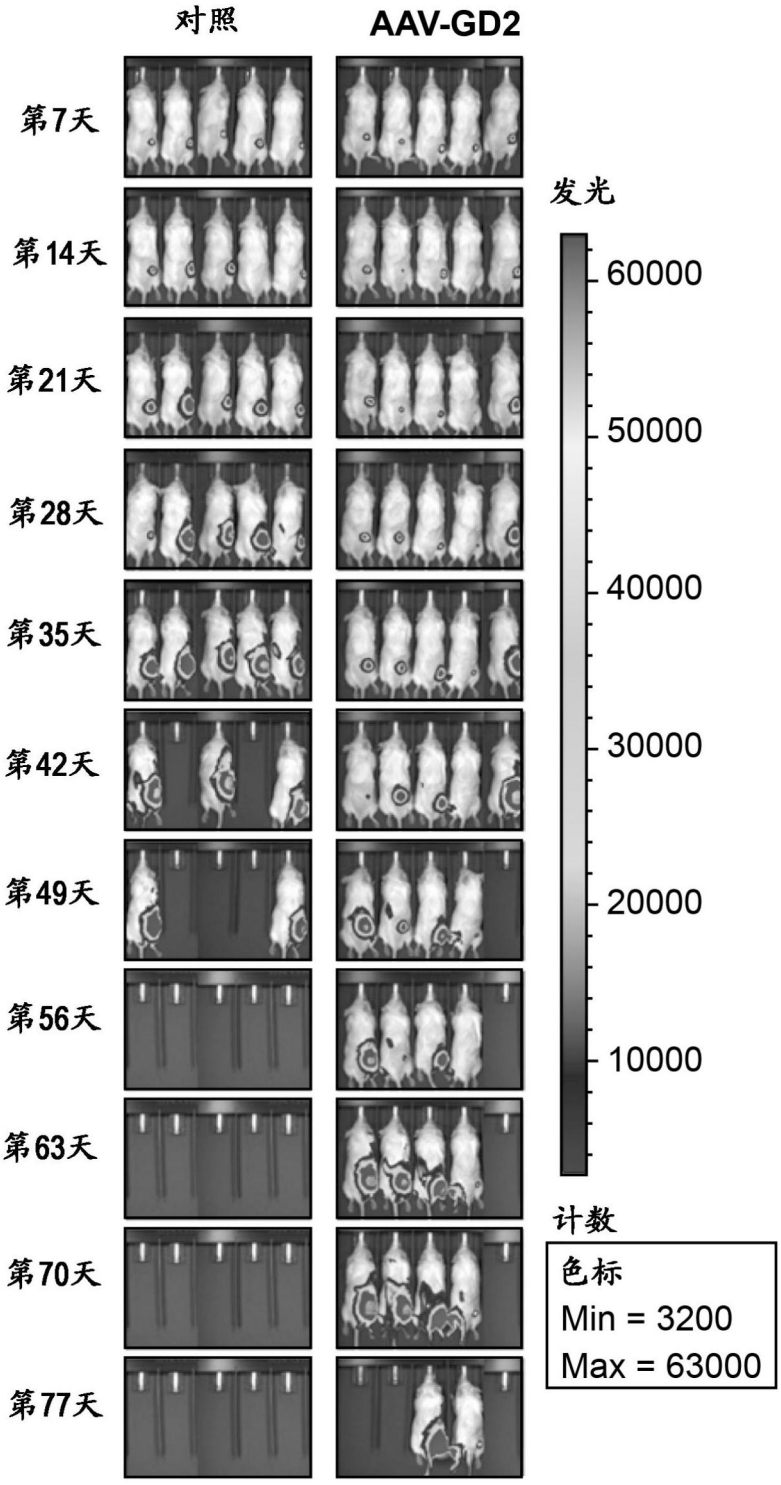

对照
AAV-GD2
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天
第63天
第70天
第77天
发光
60000
50000
40000
30000
20000
10000
计数
色标
Min = 3200
Max = 63000

图14J

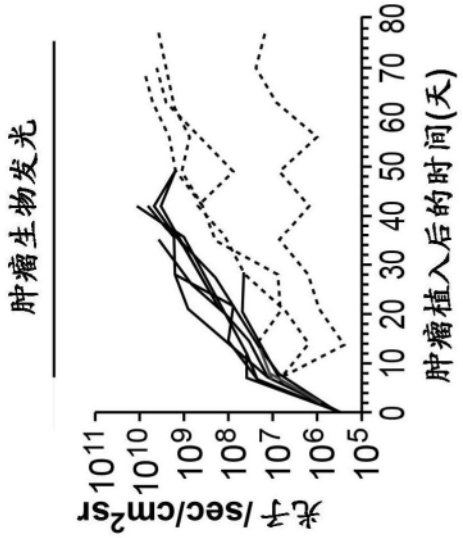

肿瘤生物发光
光子/sec/cm²sr
10¹¹
10¹⁰
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图14K

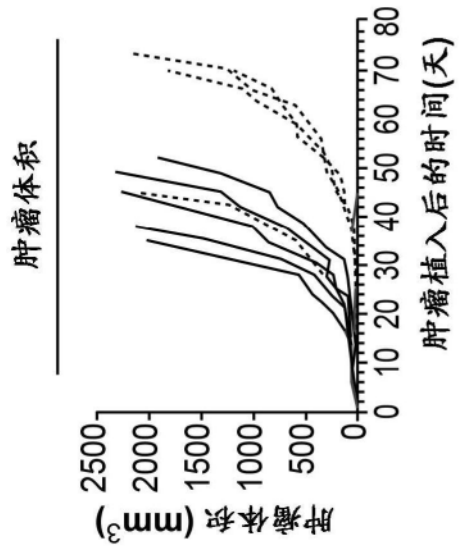

肿瘤体积
肿瘤体积 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图14L

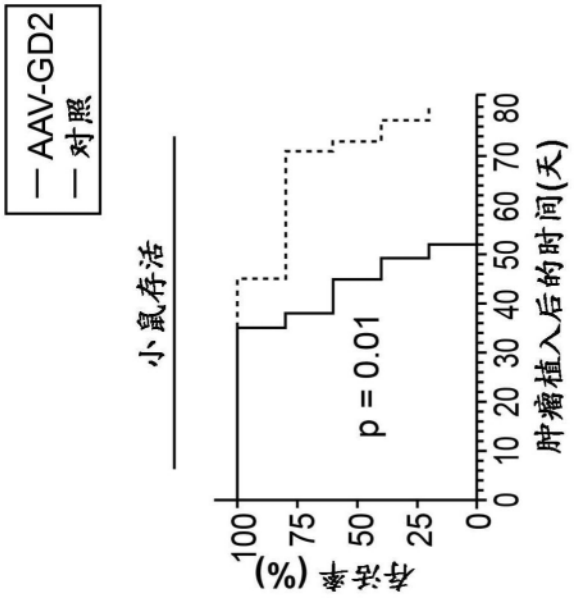

AAV-GD2
对照
小鼠存活
p = 0.01
存活率 (%)
100
75
50
25
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图14M

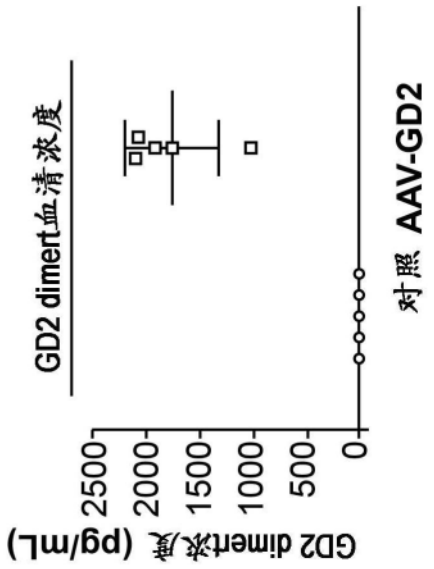

GD2 dimer血清浓度
GD2 dimer浓度 (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
对照
AAV-GD2

图14N

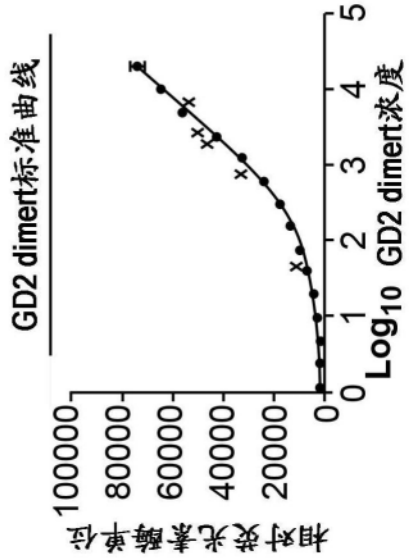

GD2 dimert标准曲线
相对荧光素酶单位
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
1
2
3
4
5
Log10 GD2 dimert浓度

图140

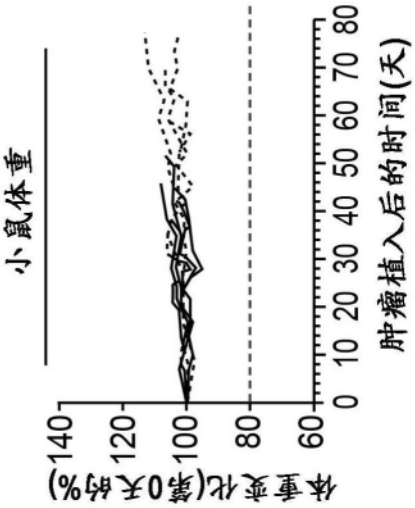

小鼠体重
体重变化(第0天的%)
140
120
100
80
60
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图14P

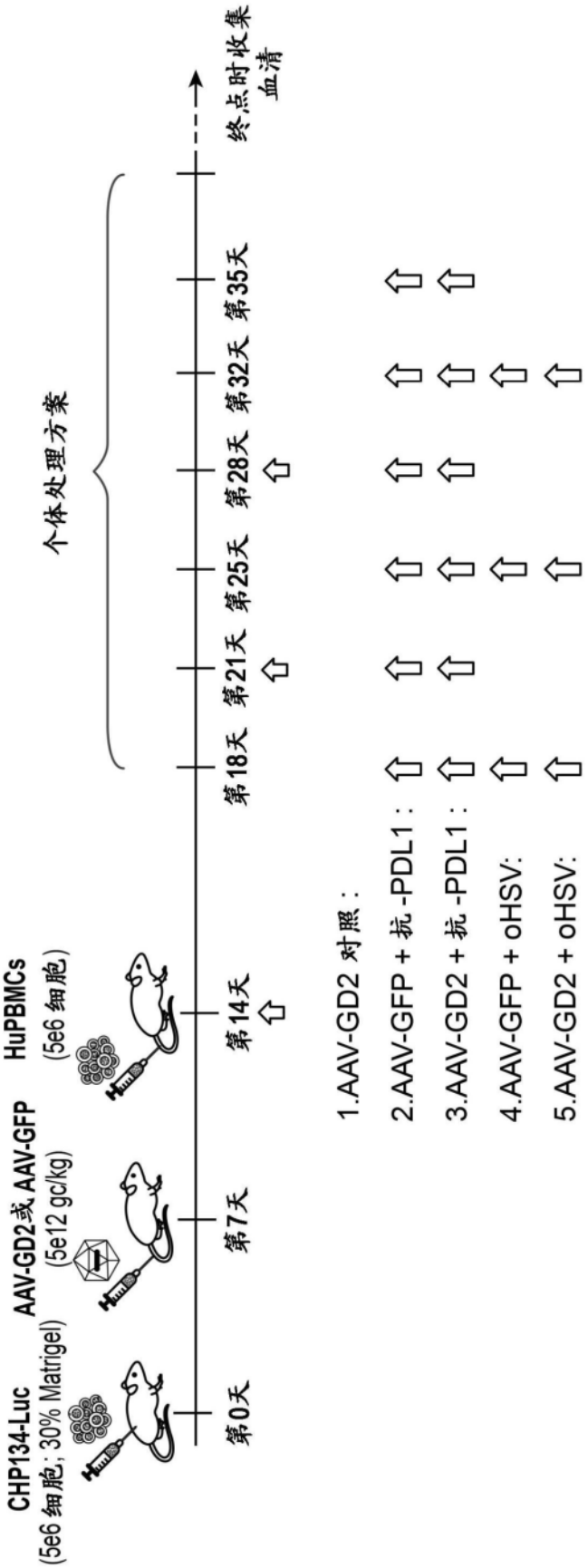

CHP134-Luc
(5e6 细胞; 30% Matrigel)
AAV-GD2或 AAV-GFP
(5e12 gc/kg)
HuPBMCs
(5e6 细胞)
个体处理方案
第0天
第7天
第14天
第18天
第21天
第25天
第28天
第32天
第35天
终点时收集血清
1.AAV-GD2 对照:
2.AAV-GFP + 抗 -PDL1:
3.AAV-GD2 + 抗 -PDL1:
4.AAV-GFP + oHSV:
5.AAV-GD2 + oHSV:

图15A

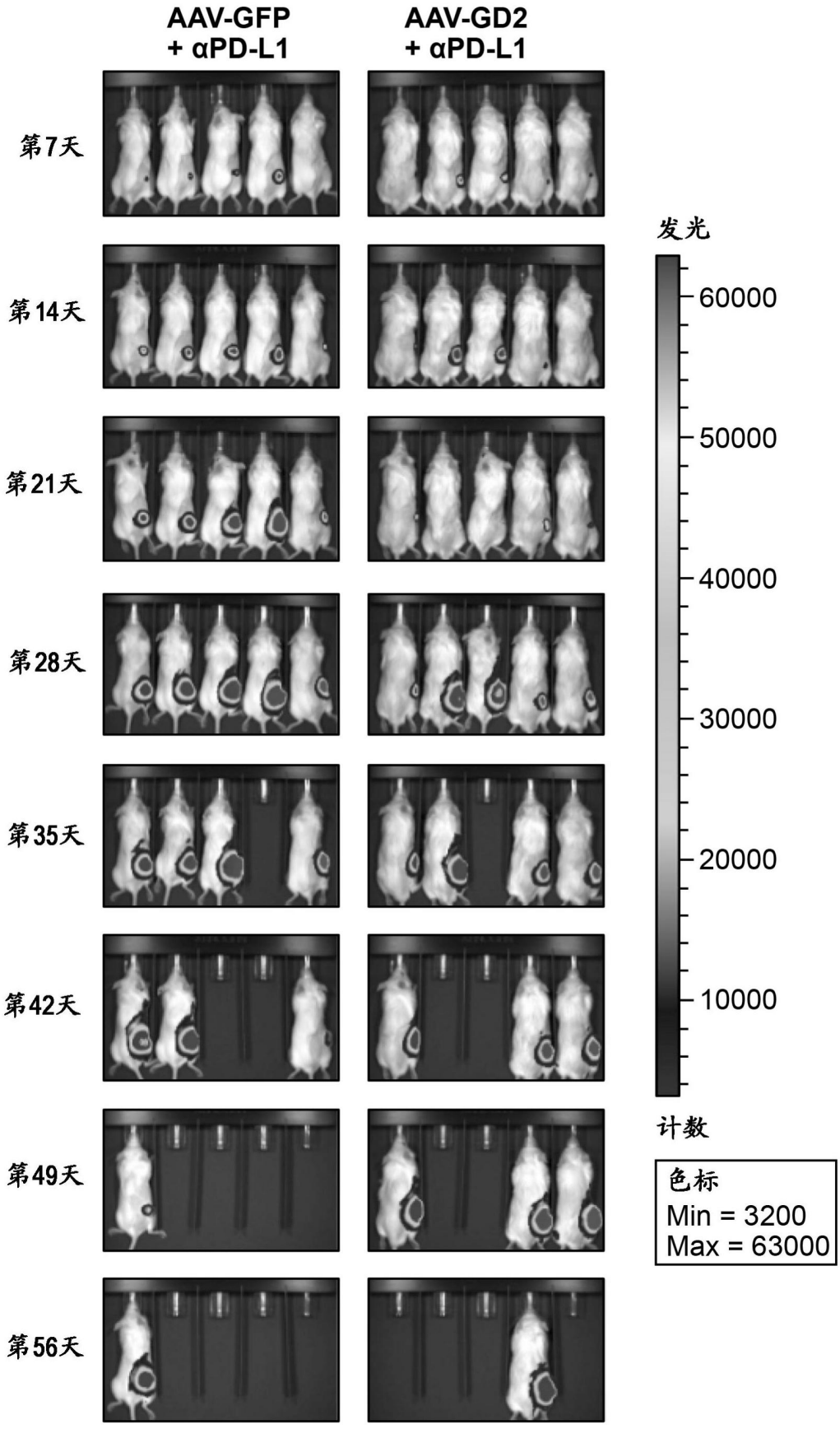

AAV-GFP
+ αPD-L1
AAV-GD2
+ αPD-L1
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天
发光
60000
50000
40000
30000
20000
10000
计数
色标
Min = 3200
Max = 63000

图15B

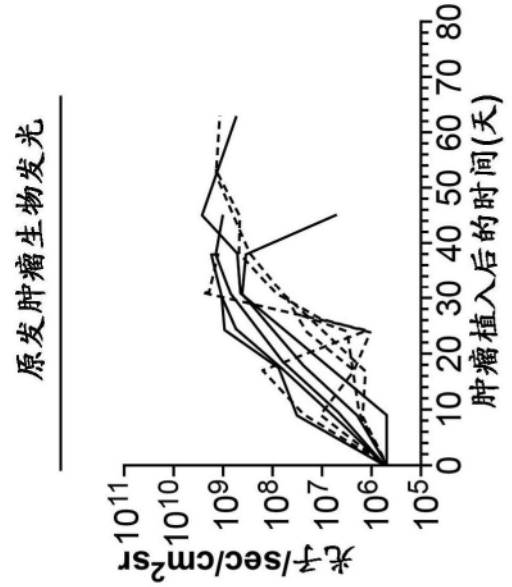

原发肿瘤生物发光
光子/sec/cm2sr
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图15C

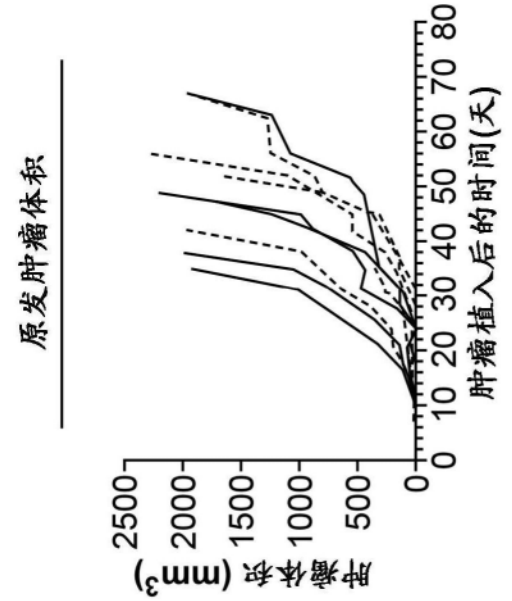

原发肿瘤体积
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图15D

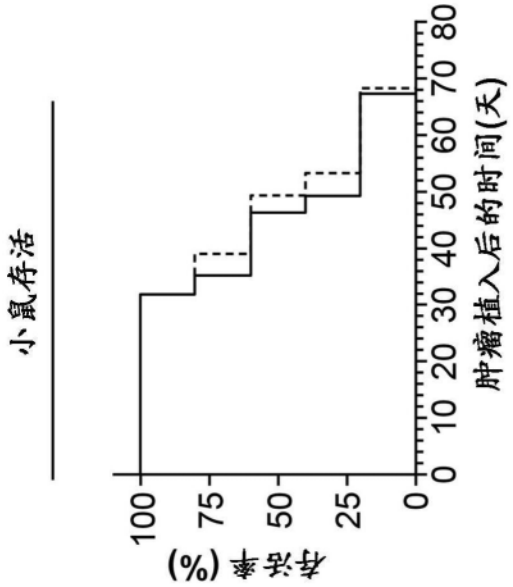

小鼠存活
存活率 (%)
100
75
50
25
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)

图15E

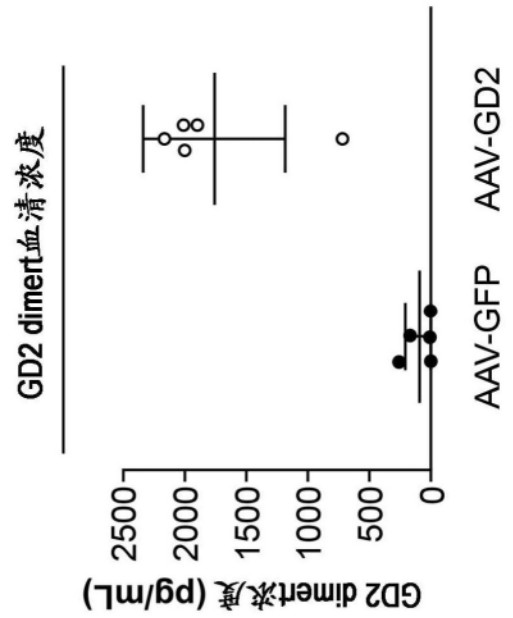

GD2 dimert血清浓度
GD2 dimert浓度 (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
AAV-GFP
AAV-GD2

图15F

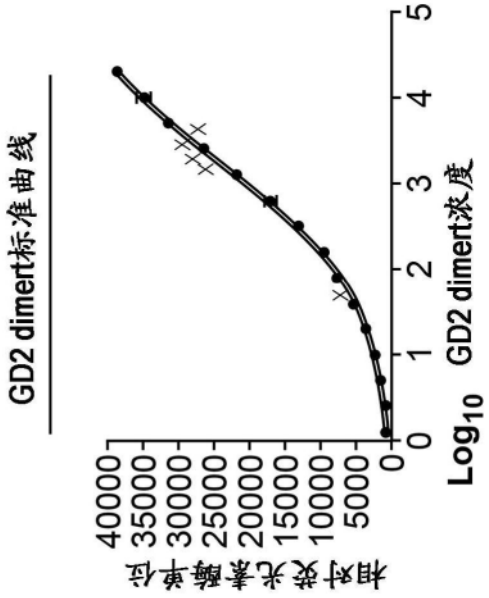

GD2 dimert标准曲线
相对荧光素酶单位
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
1
2
3
4
5
Log10 GD2 dimert浓度

图15G

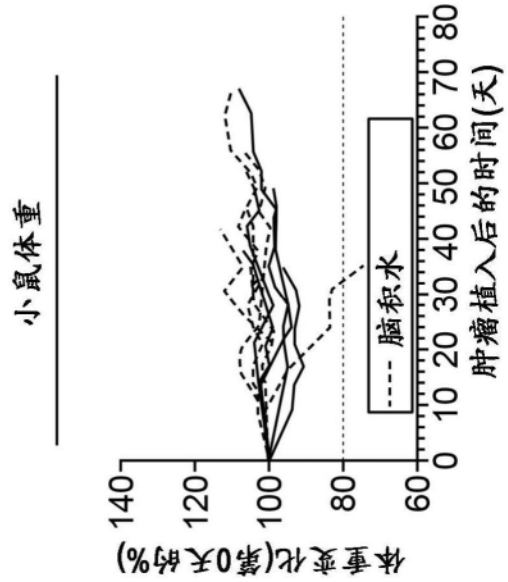
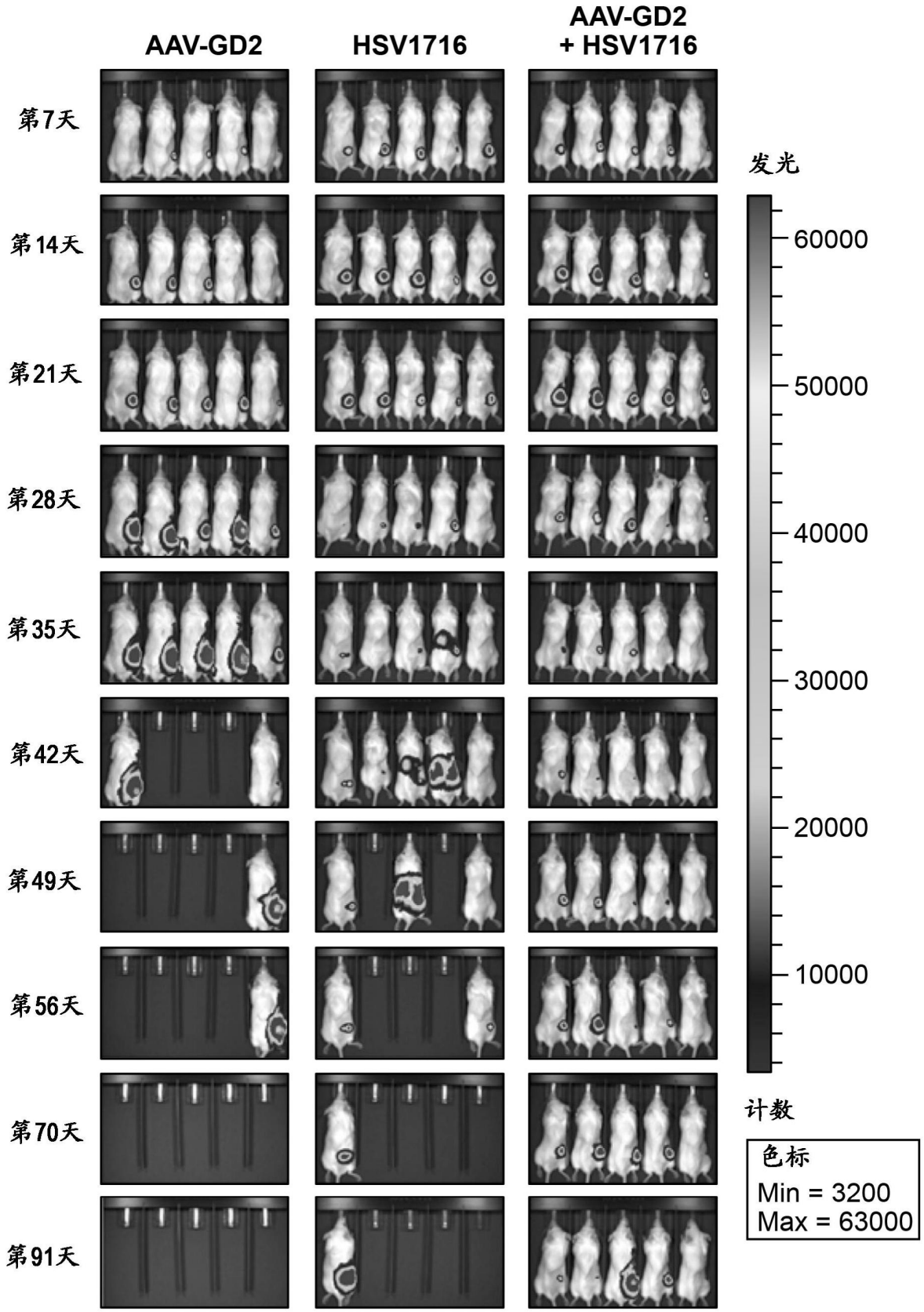
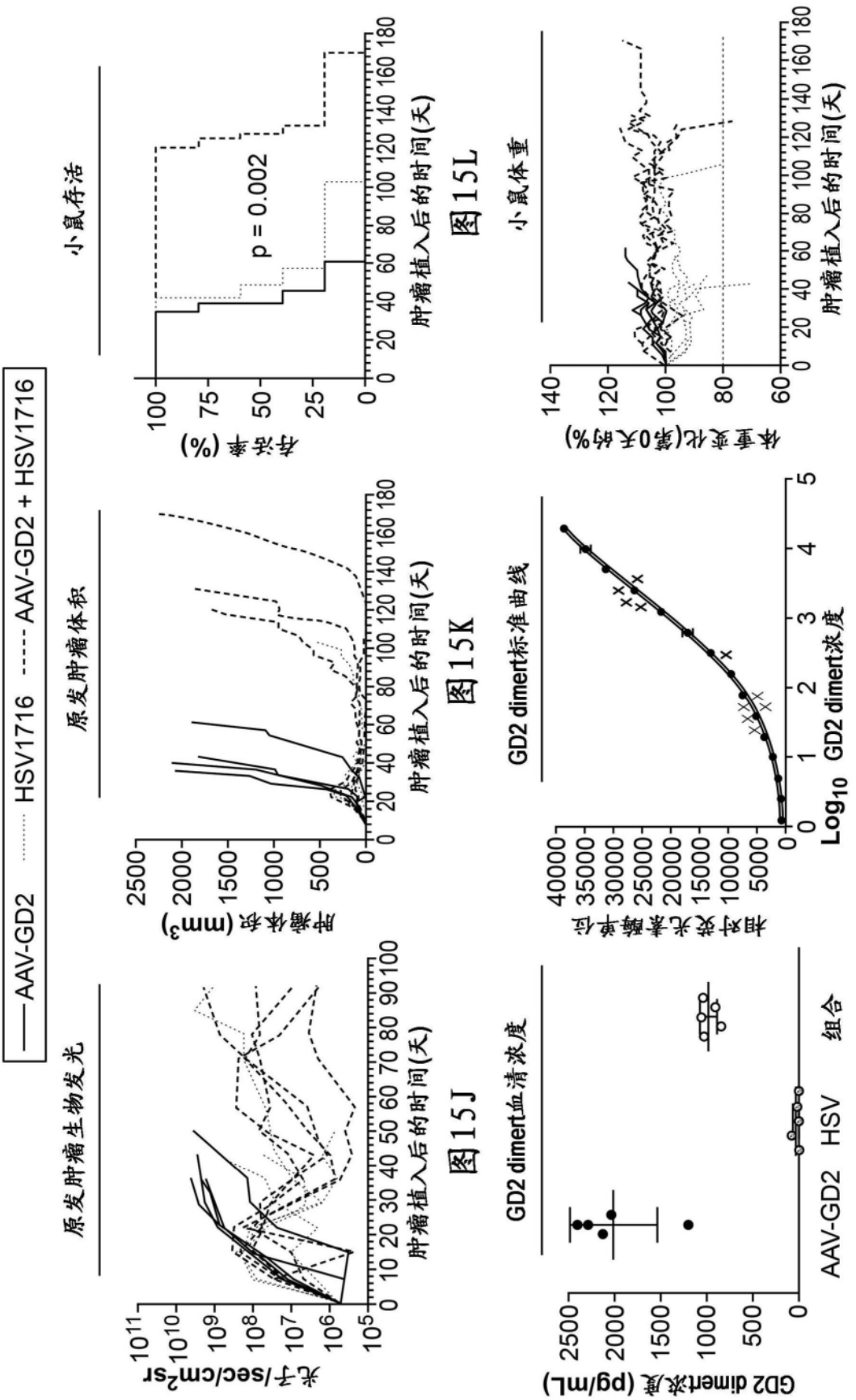

小鼠体重
体重变化(第0天的%)
140
120
100
80
60
0 10 20 30 40 50 60 70 80
肿瘤植入后的时间(天)
脑积水

图15H



*存活小鼠在第84天接受额外的HuPBMC剂量

图15I


AAV-GD2
HSV1716
AAV-GD2 + HSV1716
原发肿瘤生物发光
光子/sec/cm²sr
肿瘤植入后的时间(天)
图15J
原发肿瘤体积
肿瘤体积 (mm³)
肿瘤植入后的时间(天)
图15K
小鼠存活
存活率 (%)
p = 0.002
肿瘤植入后的时间(天)
图15L
GD2 dimer血清浓度
GD2 dimer浓度 (pg/mL)
AAV-GD2
HSV
组合
图15M
GD2 dimer标准曲线
相对荧光素酶单位
Log10 GD2 dimer浓度
图15N
小鼠体重
体重变化(第0天的%)
肿瘤植入后的时间(天)
图15O

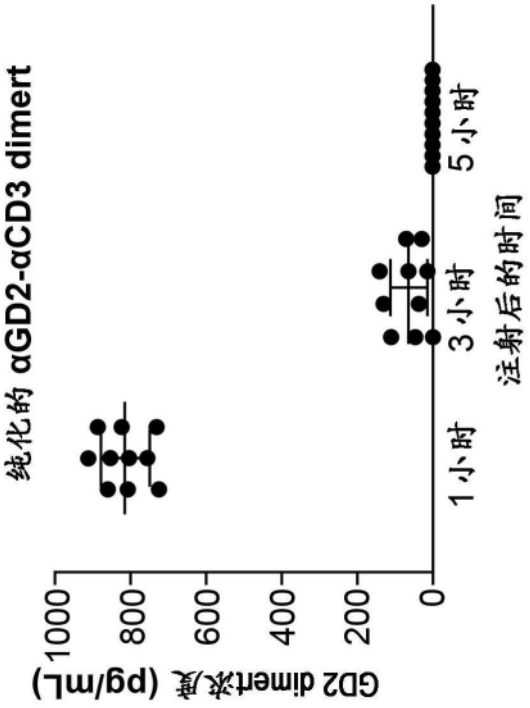

纯化的 αGD2-αCD3 dimert
GD2 dimert浓度 (pg/mL)
1000
800
600
400
200
0
1小时
3小时
5小时
注射后的时间

图16A

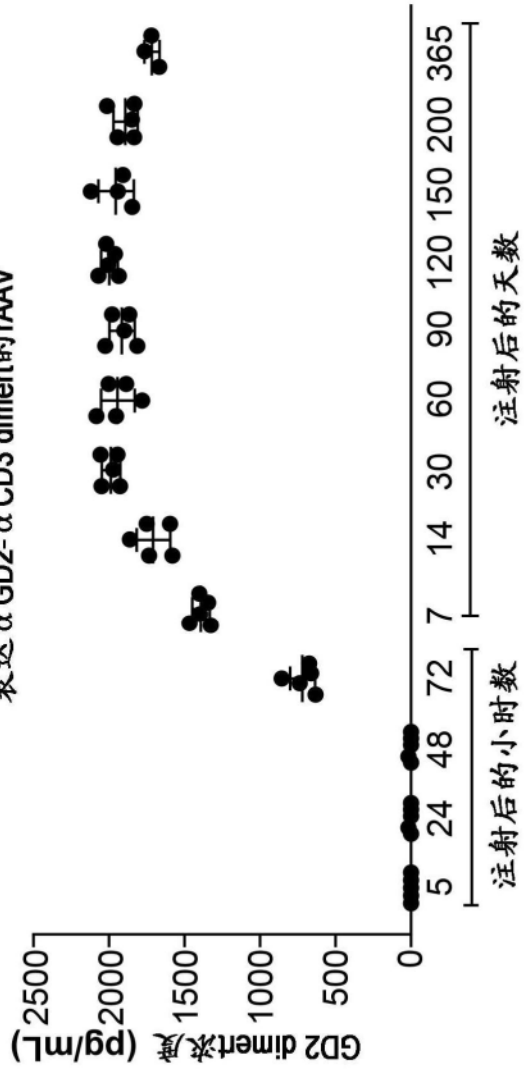

表达αGD2-αCD3 dimert的rAAV
GD2 dimert浓度 (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
5
24
48
72
7
14
30
60
90
120
150
200
365
注射后的小时数
注射后的天数

图16B

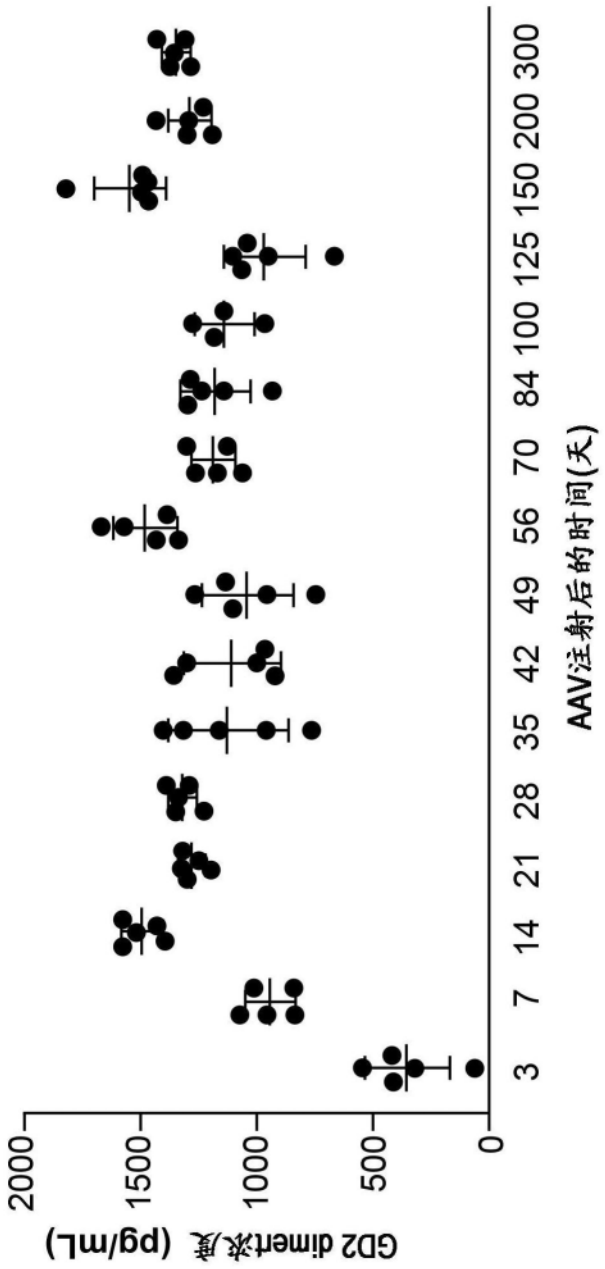

GD2 dimer水平 (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
3
7
14
21
28
35
42
49
56
70
84
100
125
150
200
300
AAV注射后的时间(天)

图17

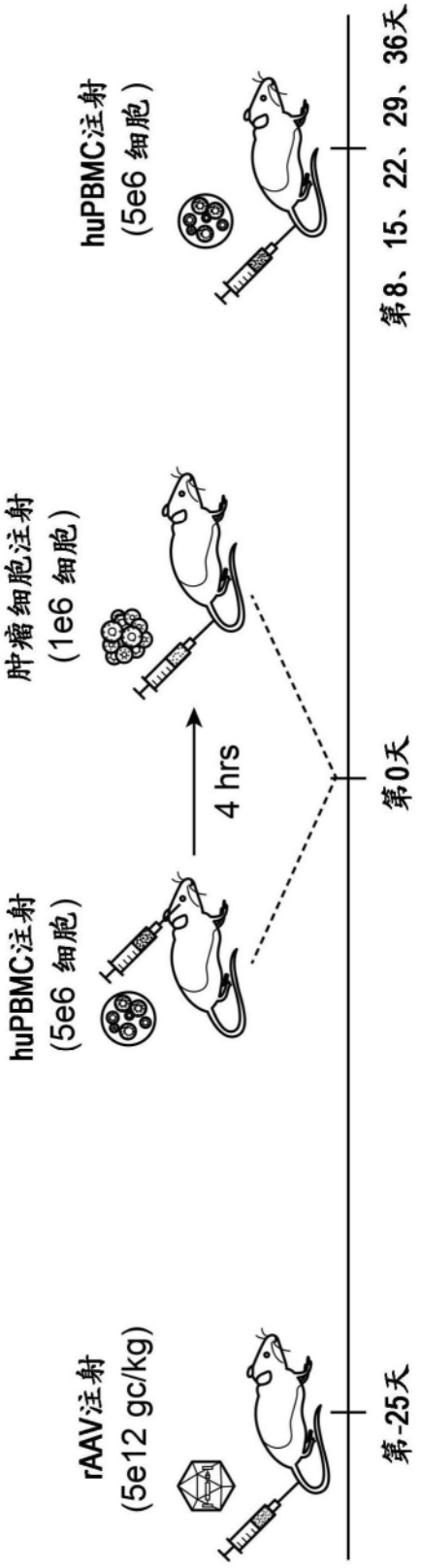

rAAV注射
(5e12 gc/kg)
第-25天
huPBMC注射
(5e6 细胞)
肿瘤细胞注射
(1e6 细胞)
4 hrs
第0天
huPBMC注射
(5e6 细胞)
第8、15、22、29、36天

图18A

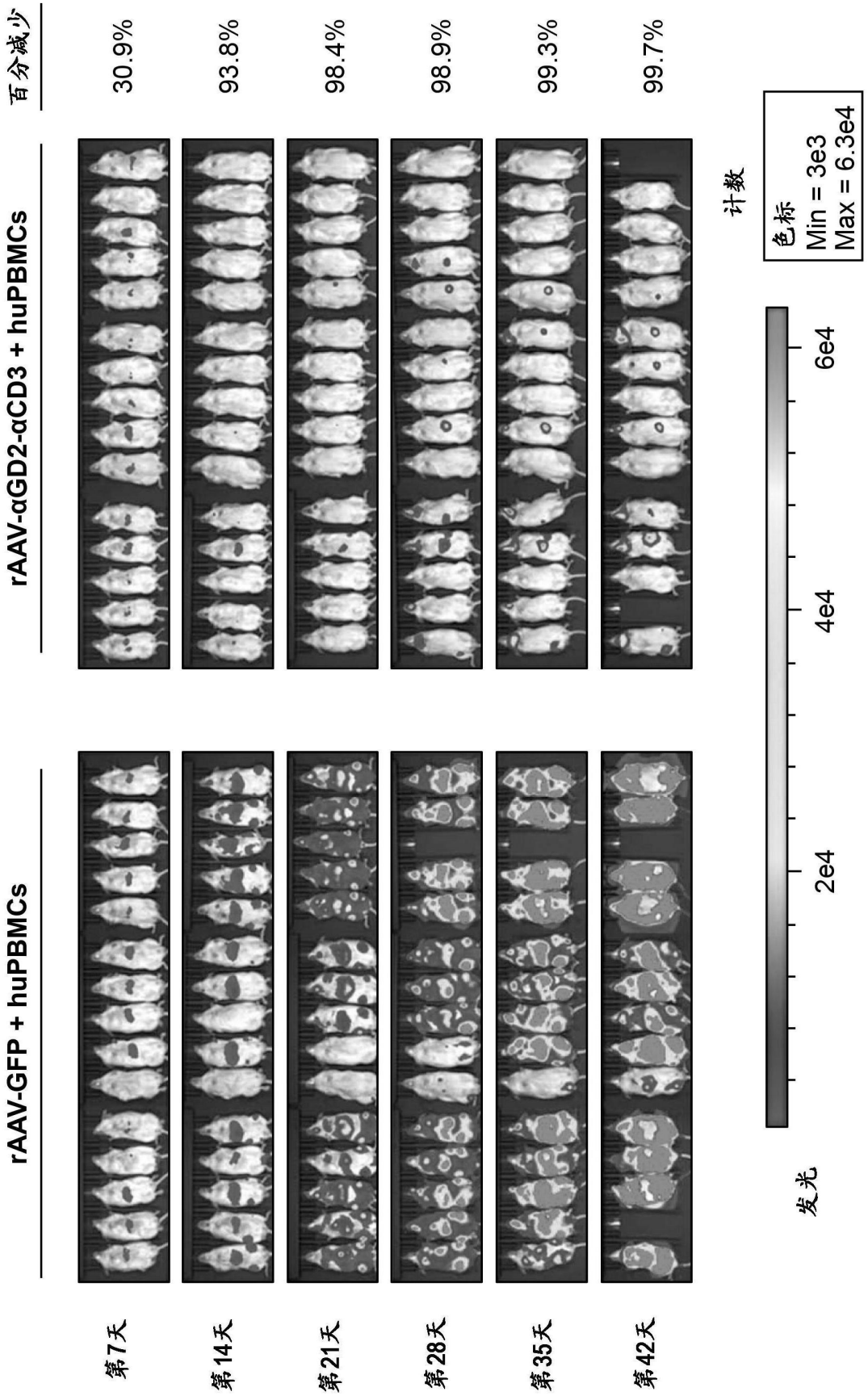

百分减少
30.9%
93.8%
98.4%
98.9%
99.3%
99.7%
rAAV-αGD2-αCD3 + huPBMCs
rAAV-GFP + huPBMCs
计数
色标
Min = 3e3
Max = 6.3e4
6e4
4e4
2e4
发光
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天

图18B

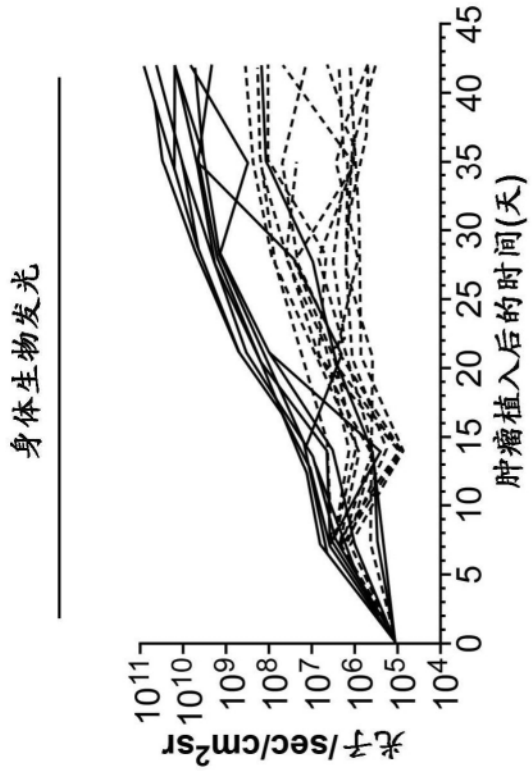


图18C

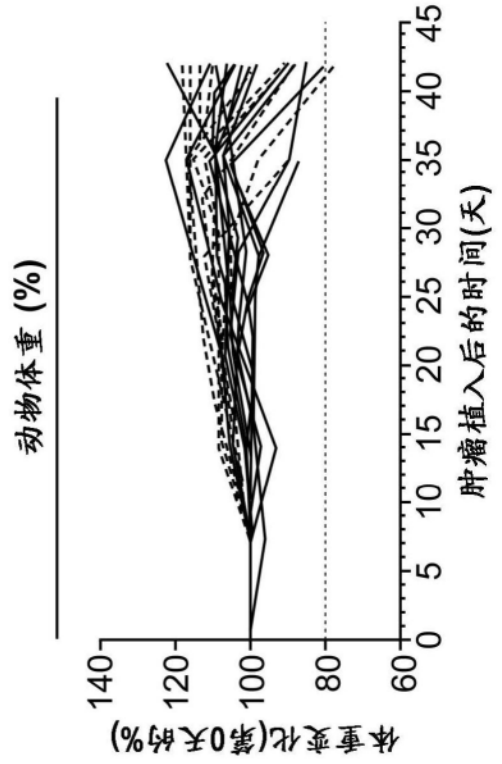


图18D

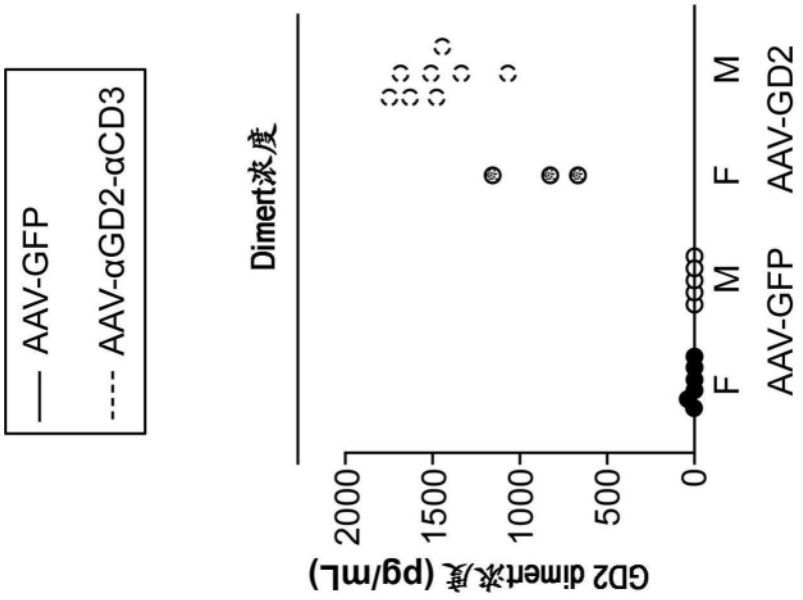

AAV-GFP
AAV-αGD2-αCD3
Dimer浓度
GD2 dimer浓度 (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
F
M
F
M
AAV-GFP
AAV-GD2

图18E

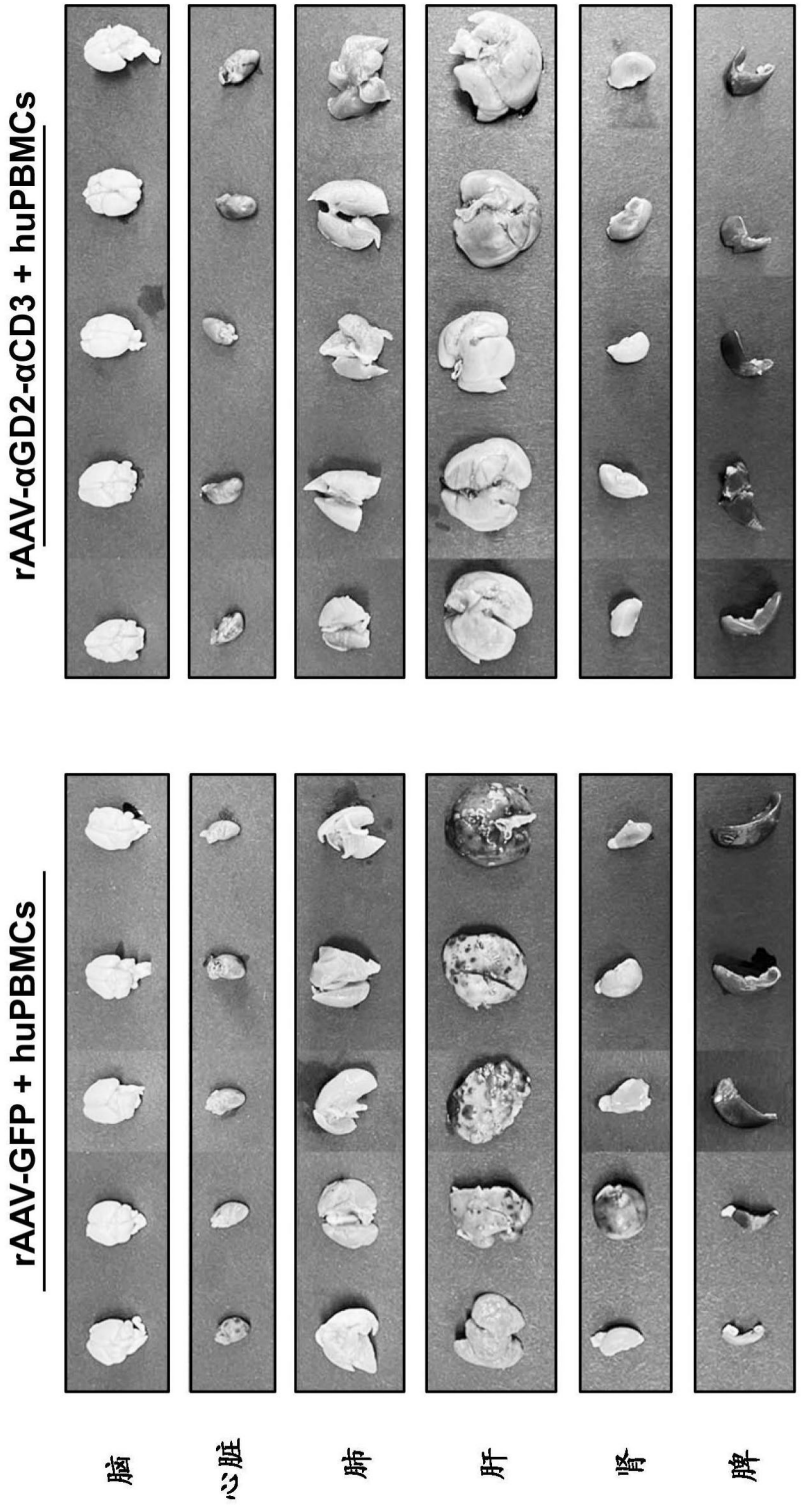


图18F

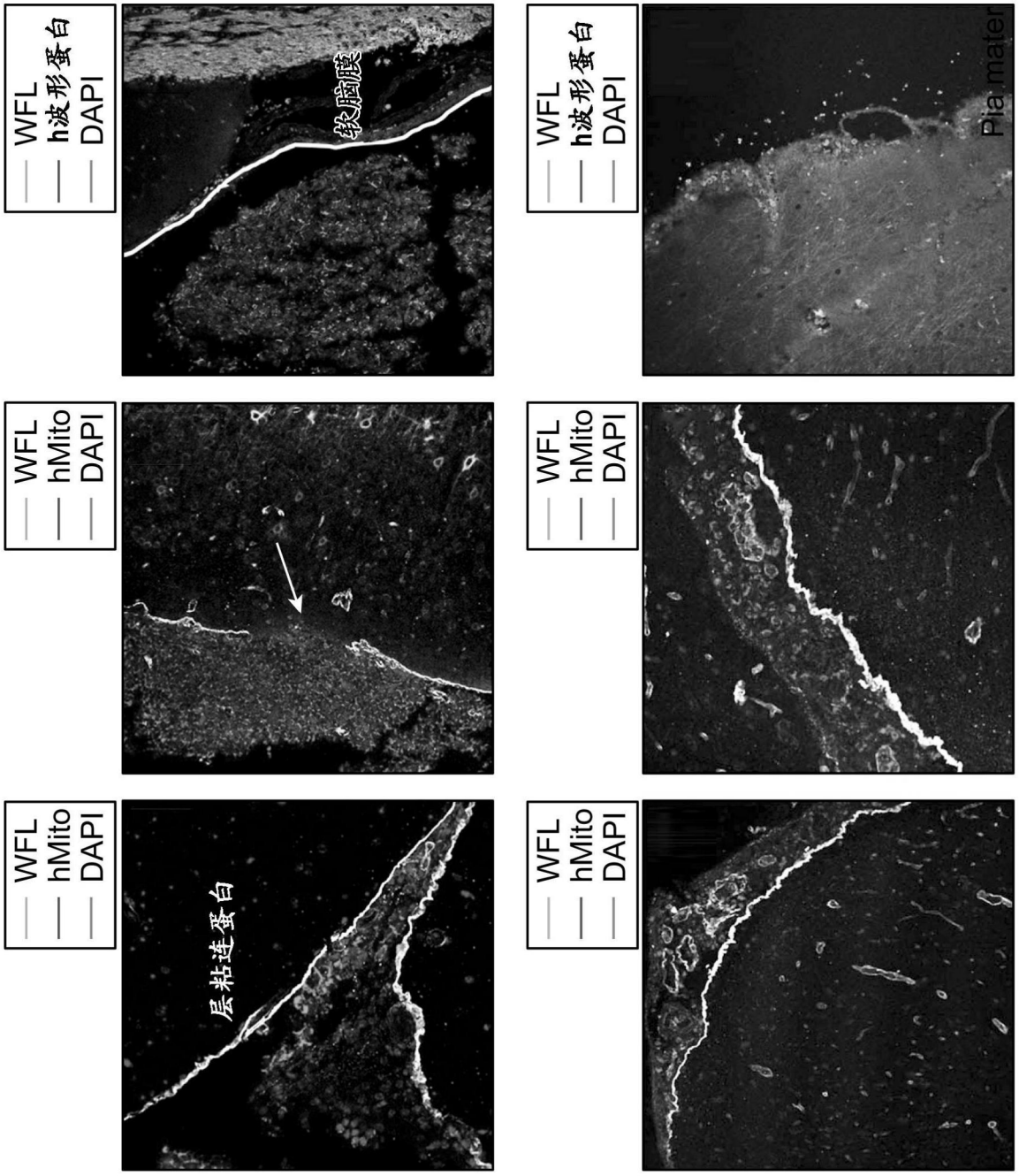

WFL
h波形蛋白
DAPI
软脑膜
Pia mater
WFL
hMito
DAPI
层粘连蛋白
rAAV8-αGD2-αCD3
rAAV8-GFP

图18G

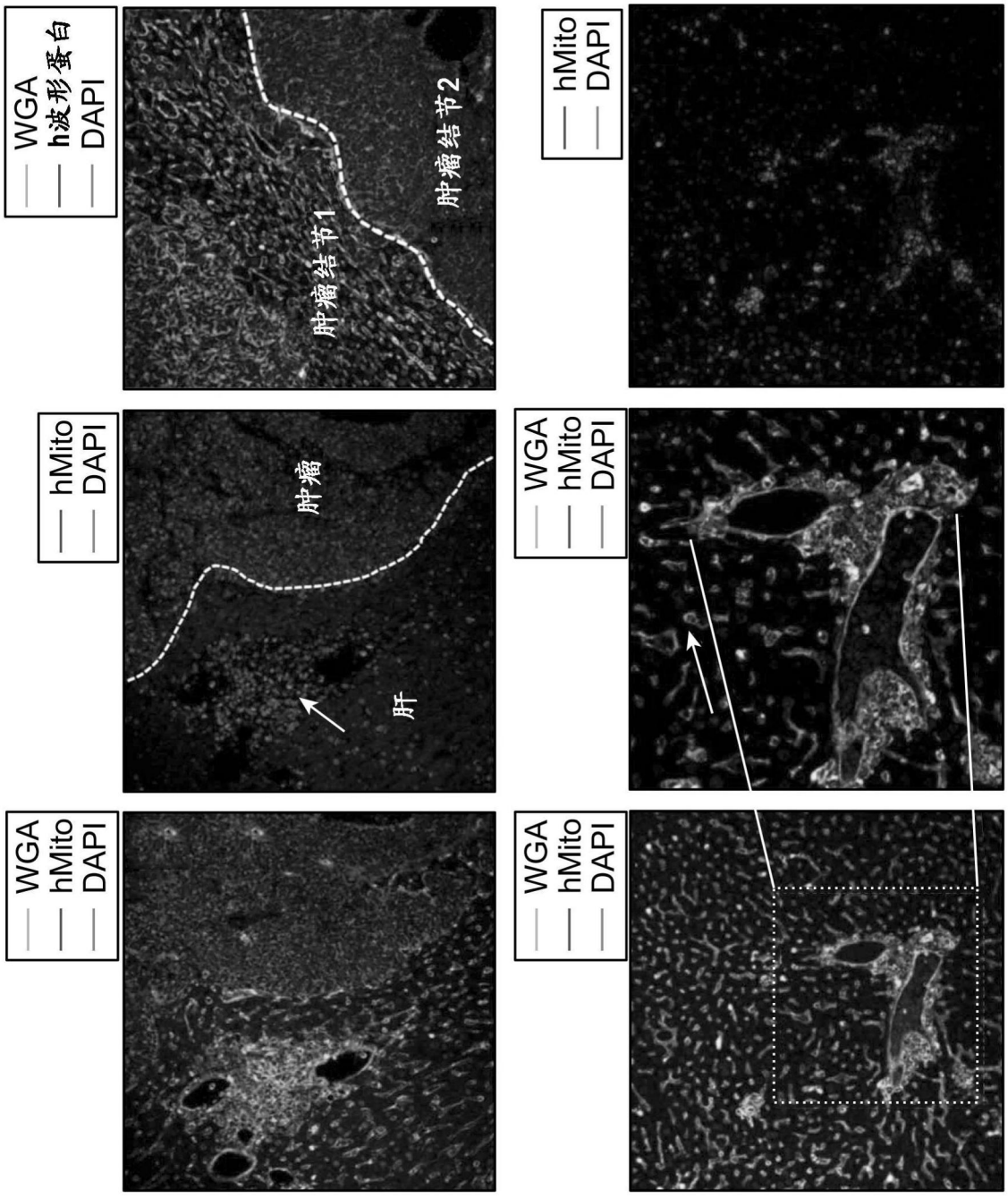

WGA
h波形蛋白
DAPI
肿瘤结节1
肿瘤结节2
hMito
DAPI
肿瘤
肝
WGA
hMito
DAPI
rAAV8-GFP
hMito
DAPI
WGA
hMito
DAPI
rAAV8-αGD2-αCD3

图18H

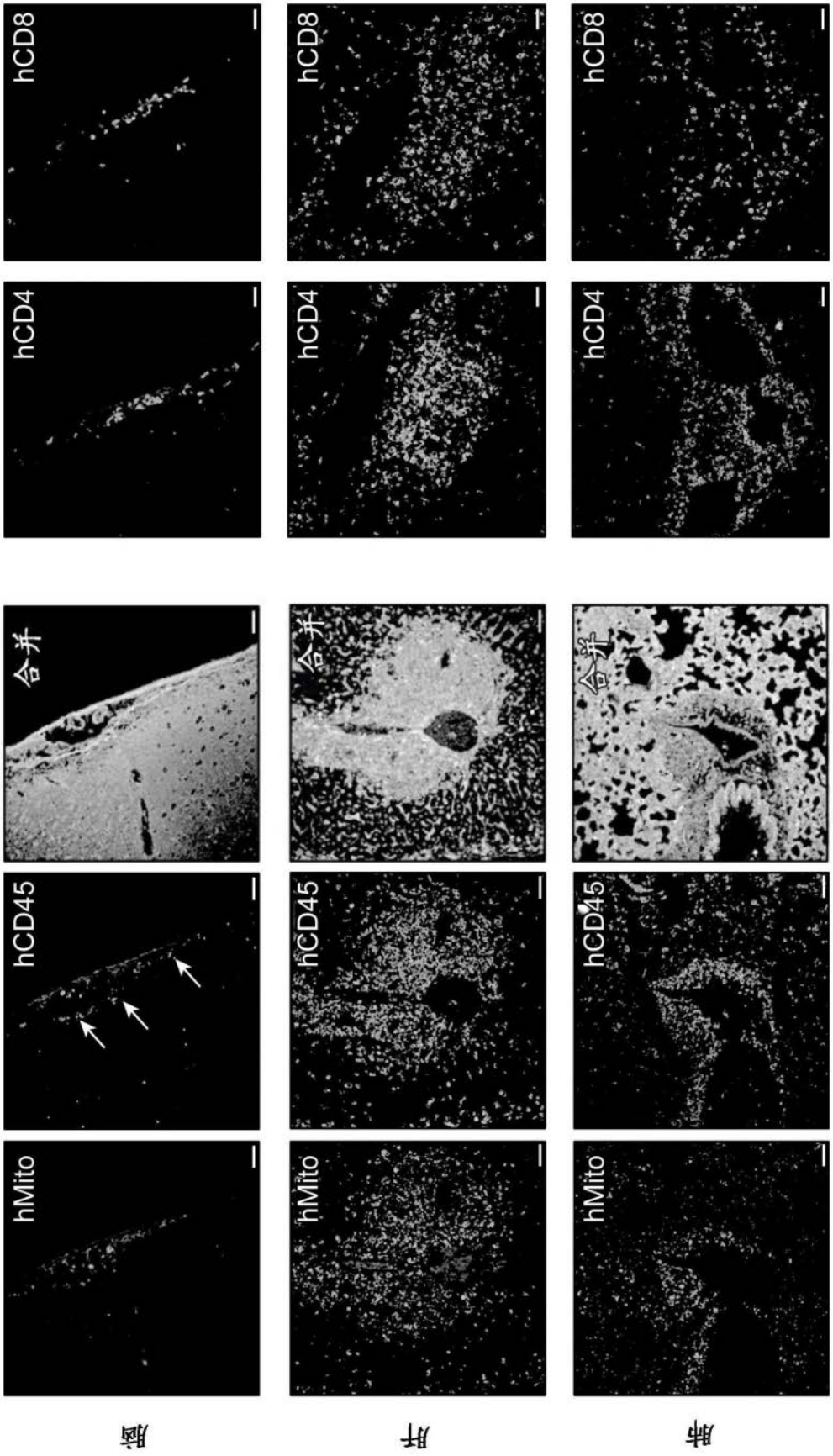


图18I

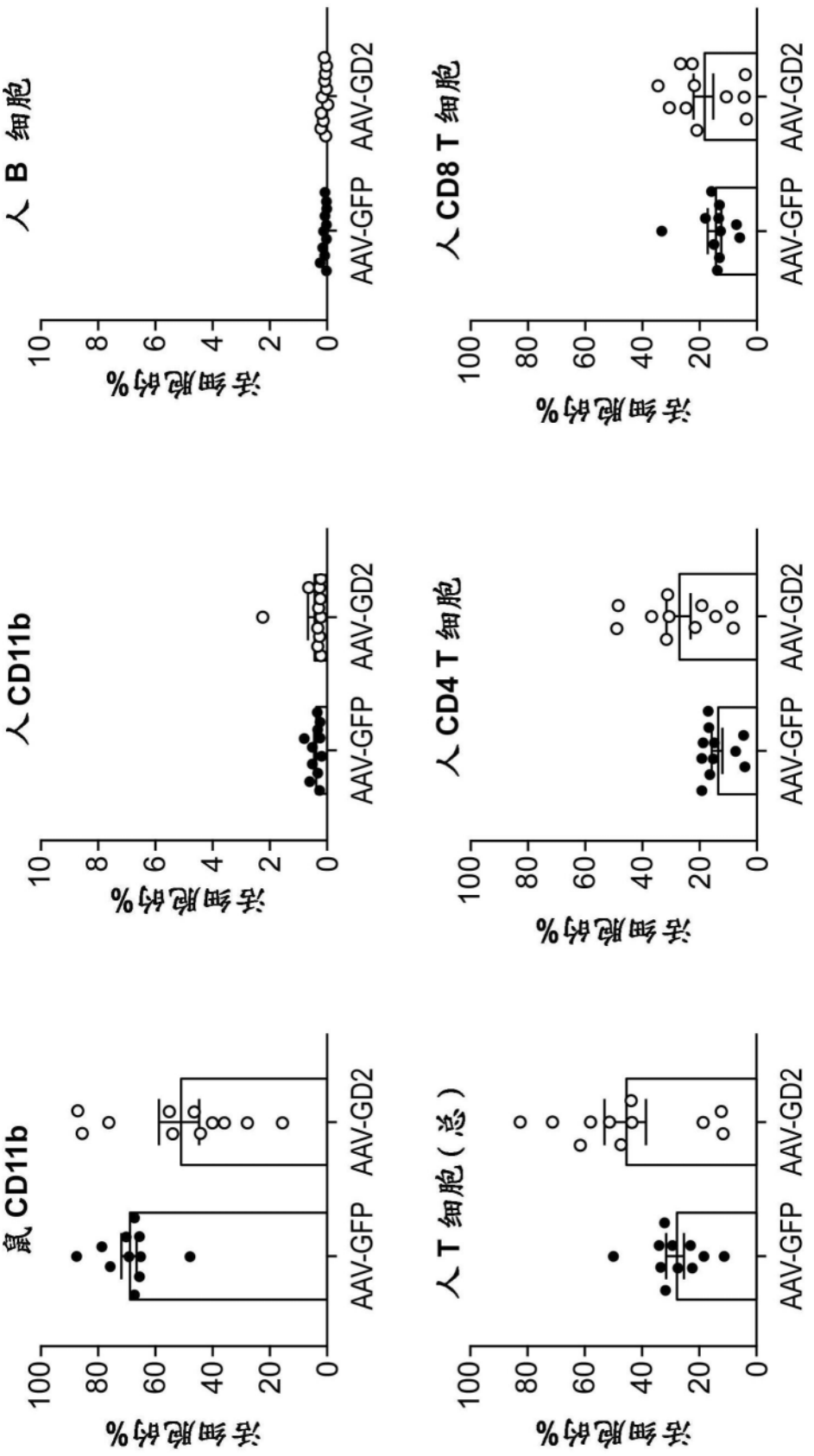

鼠 CD11b
人 CD11b
人 B 细胞
人 T 细胞（总）
人 CD4 T 细胞
人 CD8 T 细胞
活细胞的%
AAV-GFP
AAV-GD2

图18J

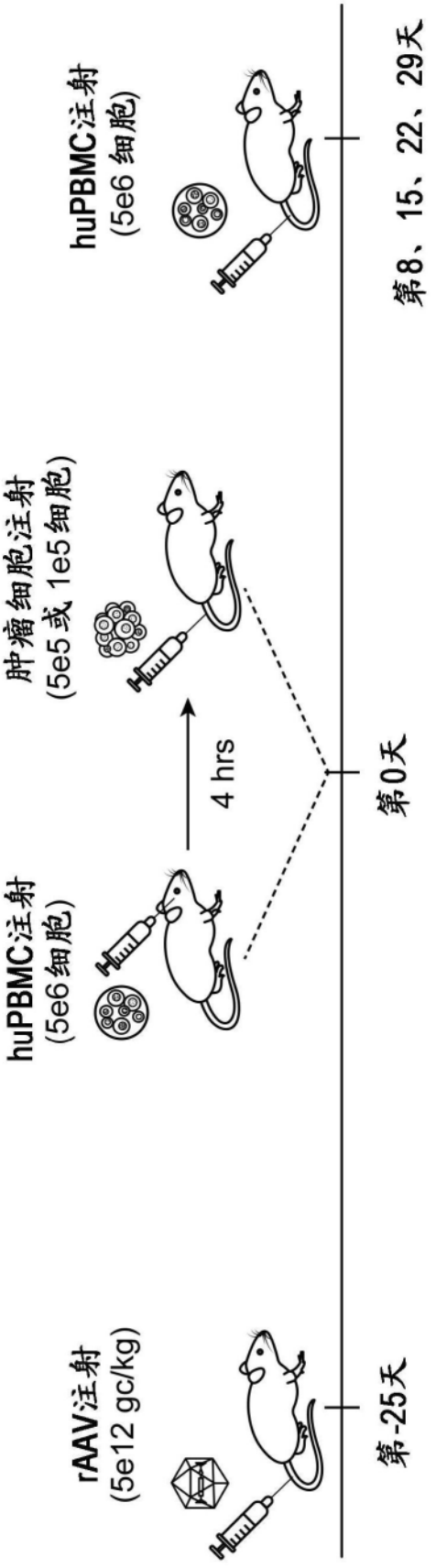

rAAV注射
(5e12 gc/kg)
第-25天
huPBMC注射
(5e6细胞)
肿瘤细胞注射
(5e5或1e5细胞)
4 hrs
第0天
huPBMC注射
(5e6细胞)
第8、15、22、29天

图19A

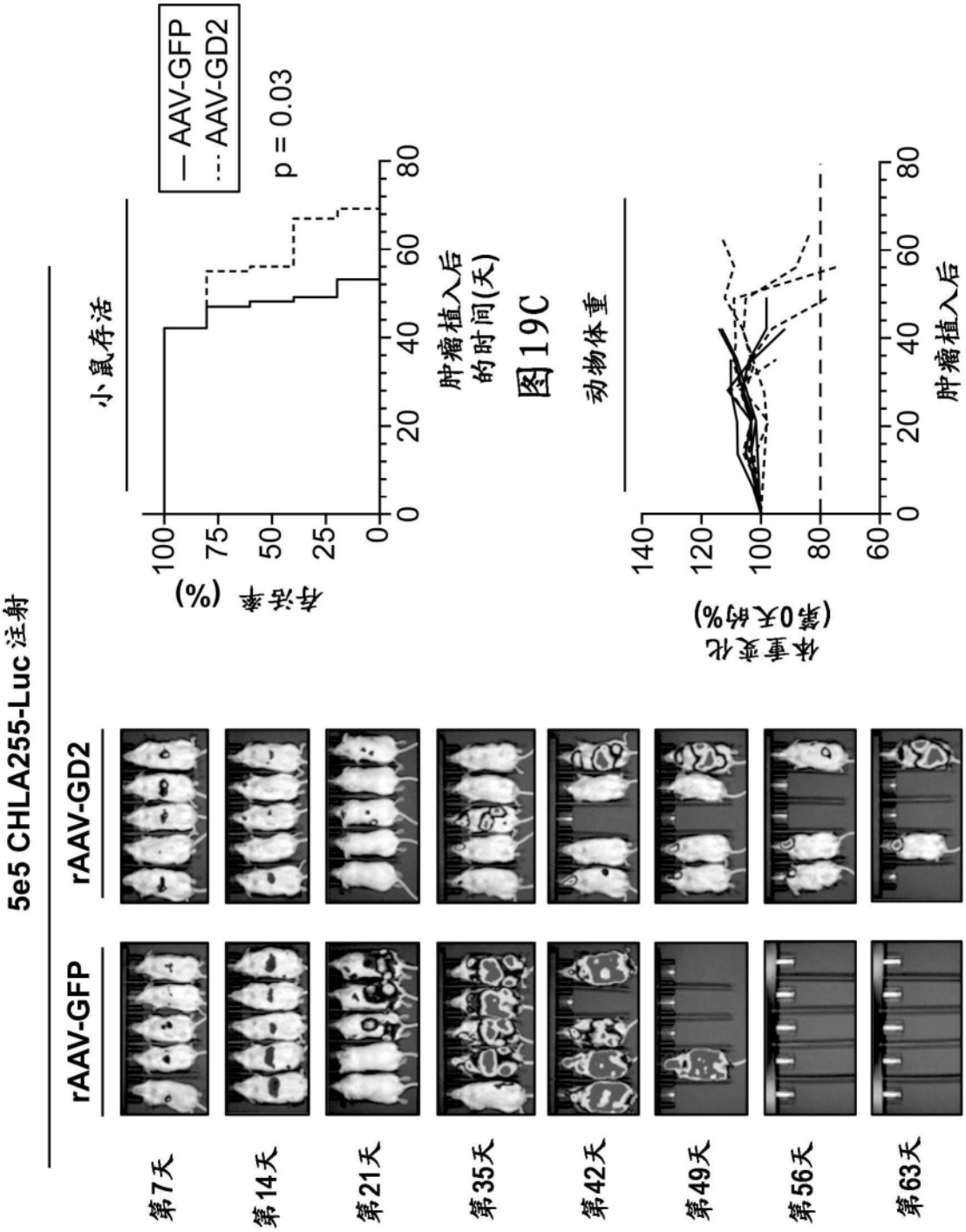


图19B

图19C

图19D

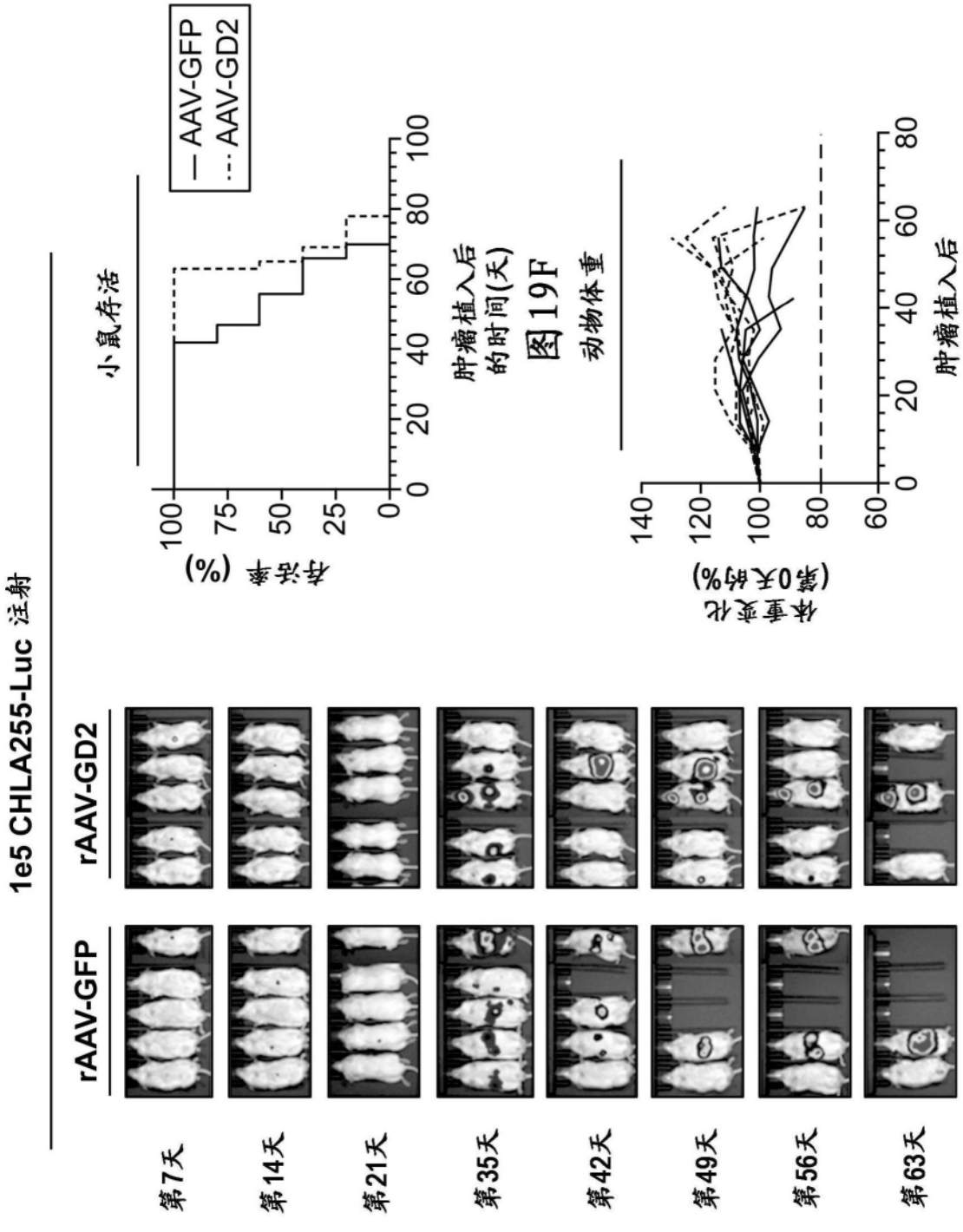


图19E

图19F

图19G

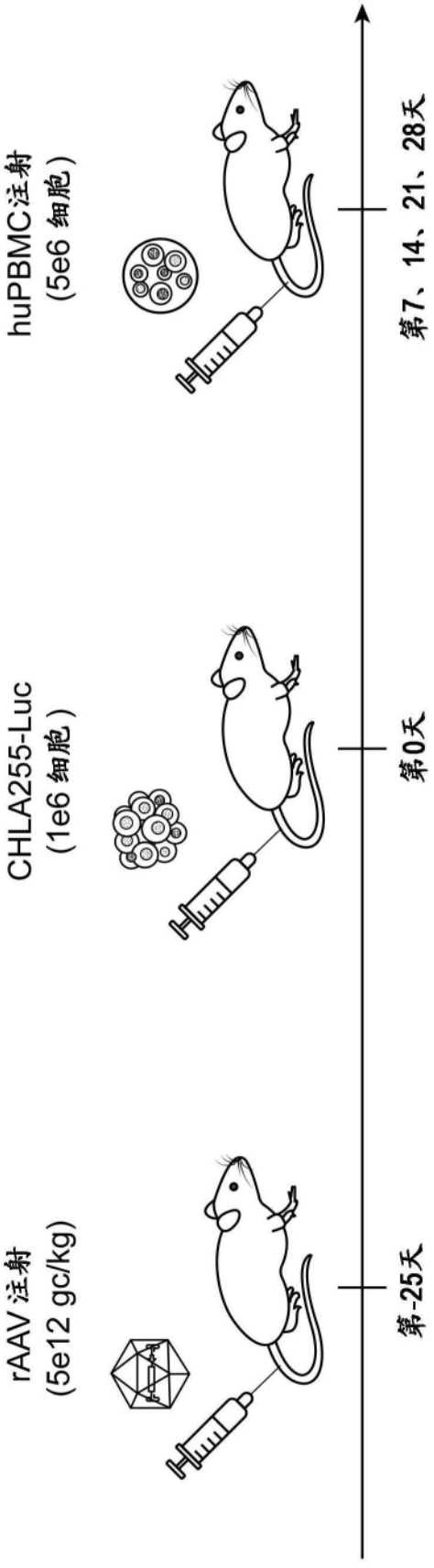

rAAV注射
(5e12 gc/kg)
第-25天
CHLA255-Luc
(1e6 细胞)
第0天
huPBMC注射
(5e6 细胞)
第7、14、21、28天

图20A

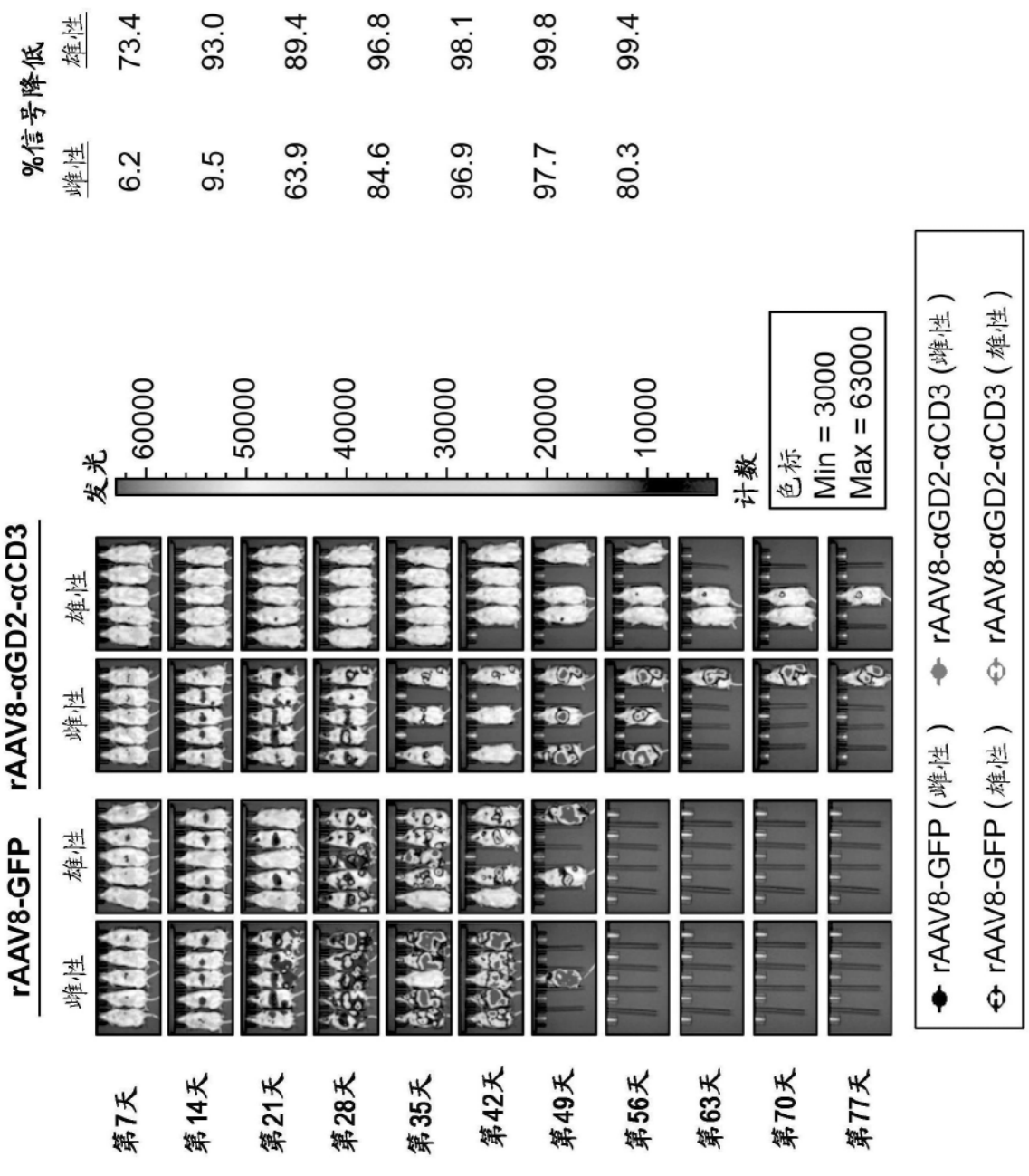

%信号降低
雌性 雄性
6.2 73.4
9.5 93.0
63.9 89.4
84.6 96.8
96.9 98.1
97.7 99.8
80.3 99.4
rAAV8-GFP
rAAV8-αGD2-αCD3
雌性 雄性 雌性 雄性
发光
60000
50000
40000
30000
20000
10000
计数
色标
Min = 3000
Max = 63000
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天
第63天
第70天
第77天
rAAV8-GFP (雌性)
rAAV8-GFP (雄性)
rAAV8-αGD2-αCD3 (雌性)
rAAV8-αGD2-αCD3 (雄性)

图20B

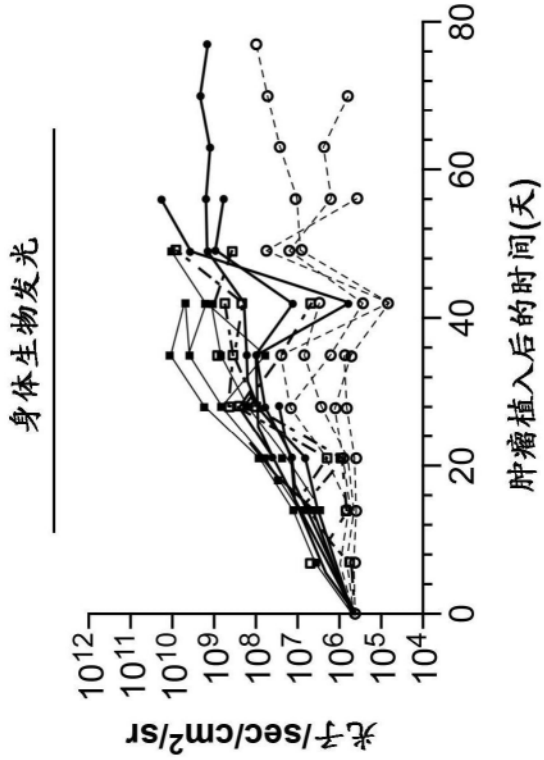

身体生物发光
光子/sec/cm²/sr
肿瘤植入后的时间(天)

图20C

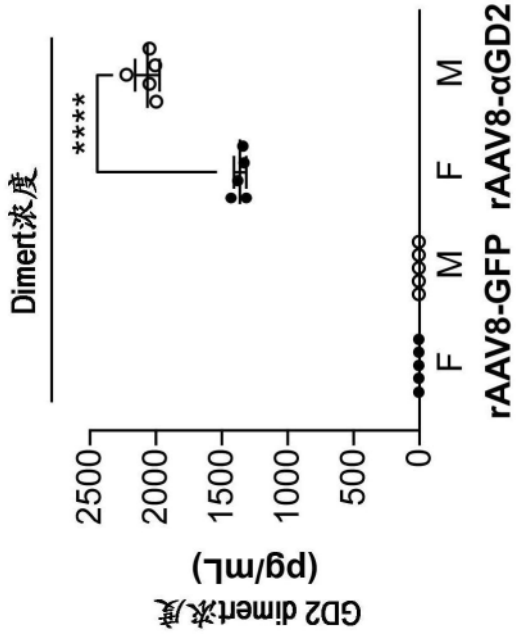

Dimer浓度
****
GD2 dimer浓度
(pg/mL)
rAAV8-GFP
rAAV8-αGD2
F
M
F
M

图20D

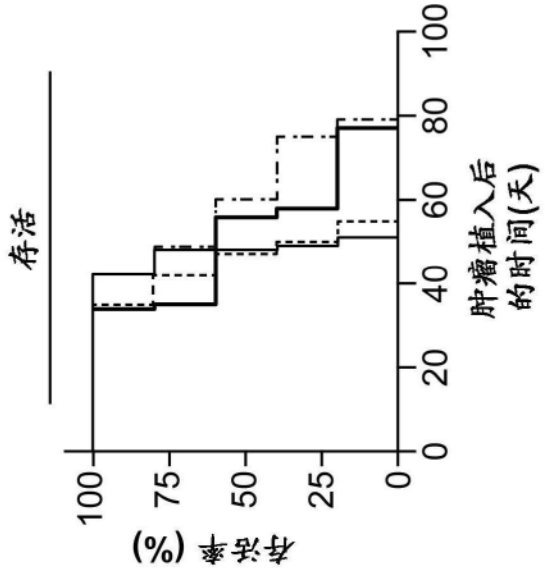

存活
存活率 (%)
100
75
50
25
0
0
20
40
60
80
100
肿瘤植入后
的时间(天)

图20E

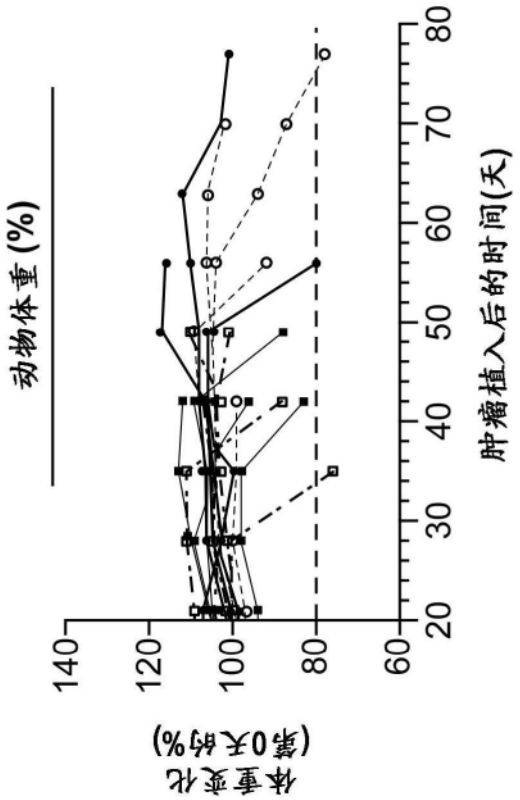

动物体重 (%)
体重变化
(第0天的%)
140
120
100
80
60
20
30
40
50
60
70
80
肿瘤植入后的时间(天)

图20F

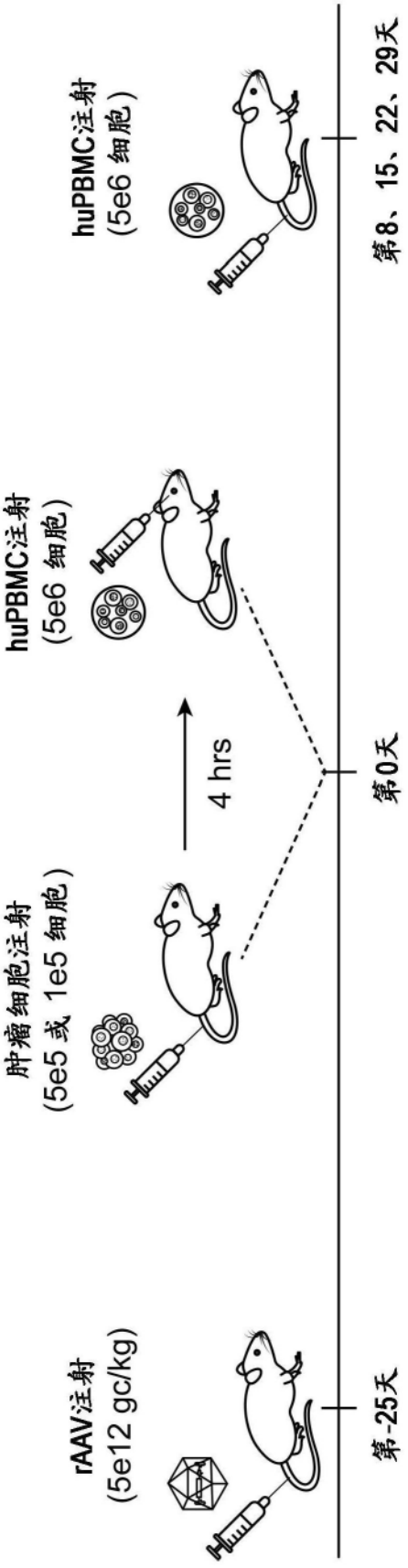

rAAV注射
(5e12 gc/kg)
第-25天
肿瘤细胞注射
(5e5 或 1e5 细胞)
4 hrs
第0天
huPBMC注射
(5e6 细胞)
huPBMC注射
(5e6 细胞)
第8、15、22、29天

图21A

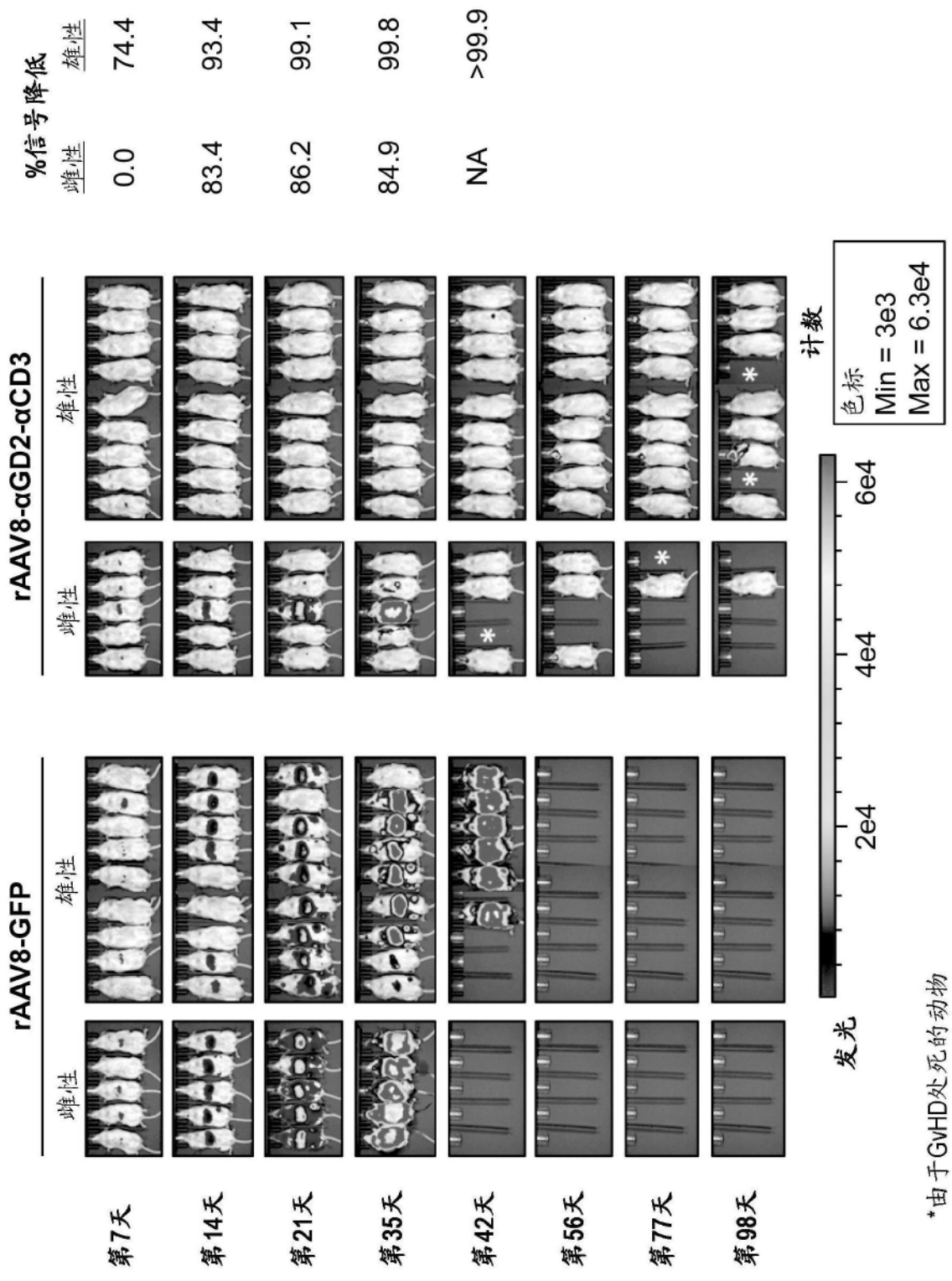

%信号降低
雌性 雄性
0.0 74.4
83.4 93.4
86.2 99.1
84.9 99.8
NA >99.9
rAAV8-GFP
雌性 雄性
rAAV8-αGD2-αCD3
雌性 雄性
第7天
第14天
第21天
第35天
第42天
第56天
第77天
第98天
发光
2e4
4e4
6e4
计数
色标
Min = 3e3
Max = 6.3e4
*由于GvHD处死的动物

图21B

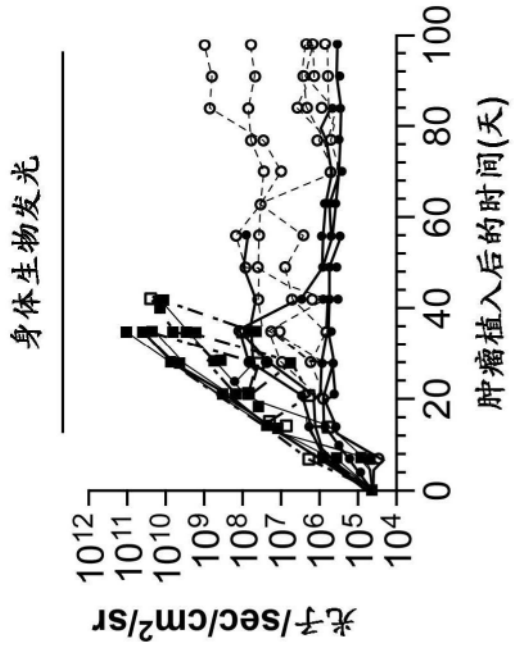

身体生物发光
光子/sec/cm²/sr
10¹²
10¹¹
10¹⁰
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
0
20
40
60
80
100
肿瘤植入后的时间(天)

图21C

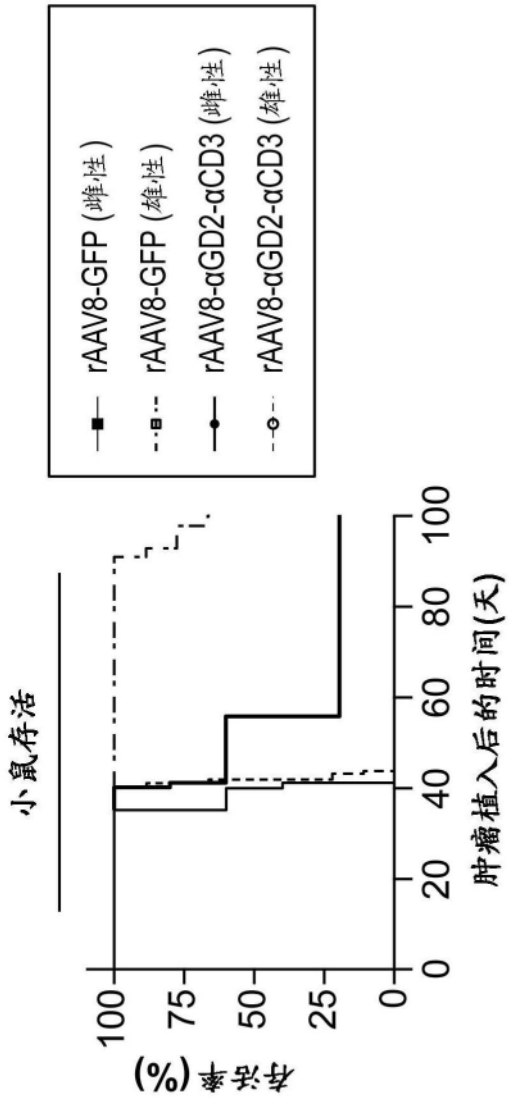

rAAV8-GFP (雌性)
rAAV8-GFP (雄性)
rAAV8-αGD2-αCD3 (雌性)
rAAV8-αGD2-αCD3 (雄性)
小鼠存活
存活率(%)
100
75
50
25
0
0
20
40
60
80
100
肿瘤植入后的时间(天)

图21D

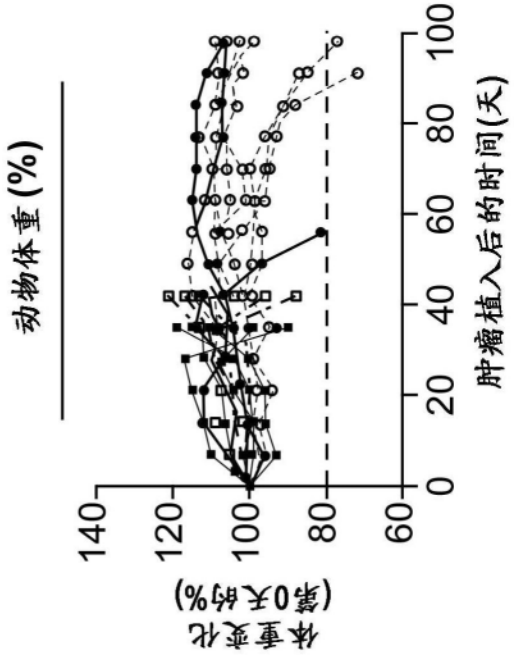

动物体重(%)
体重变化
(第0天的%)
140
120
100
80
60
0
20
40
60
80
100
肿瘤植入后的时间(天)

图21E

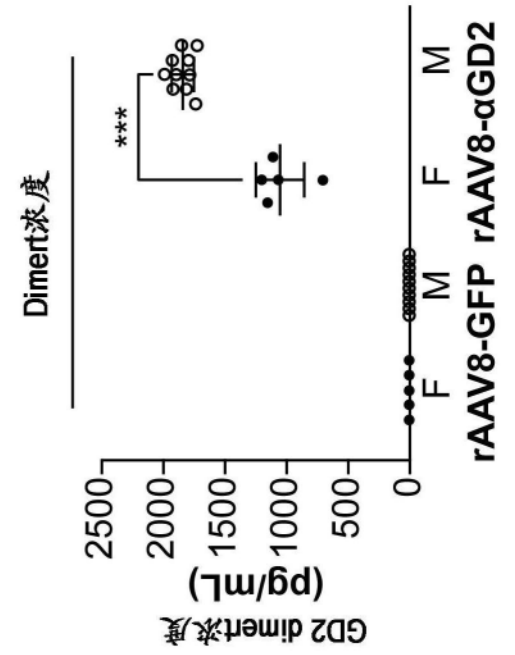

Dimert浓度
GD2 dimert浓度
(pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
***
F
M
F
M
rAAV8-GFP
rAAV8-αGD2

图21F

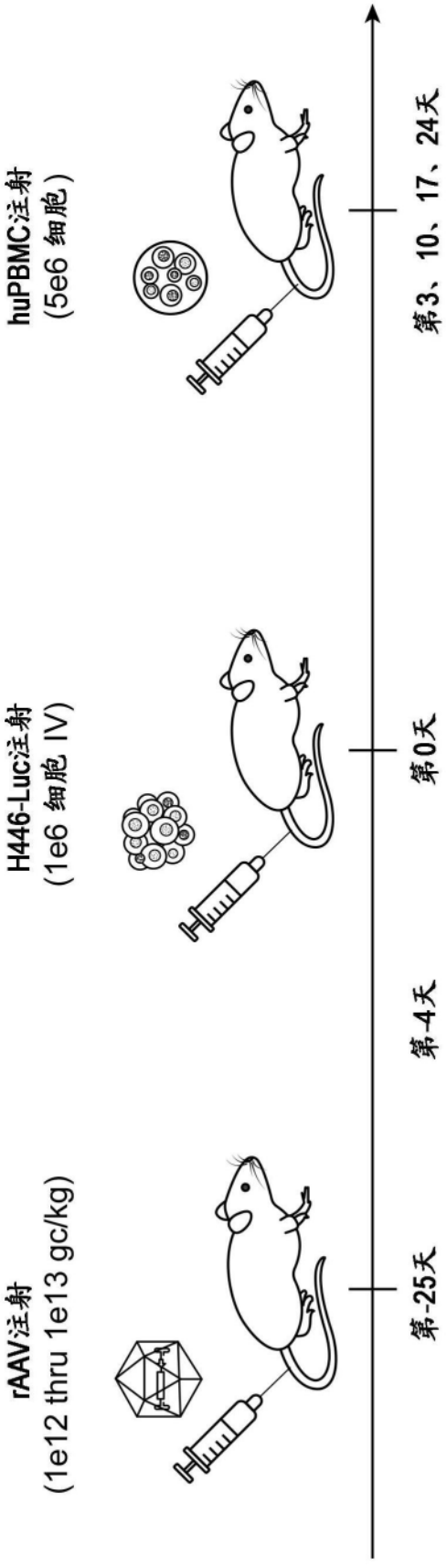

rAAV注射
(1e12 thru 1e13 gc/kg)
H446-Luc注射
(1e6 细胞 IV)
huPBMC注射
(5e6 细胞)
第-25天
第-4天
第0天
第3、10、17、24天

图22A

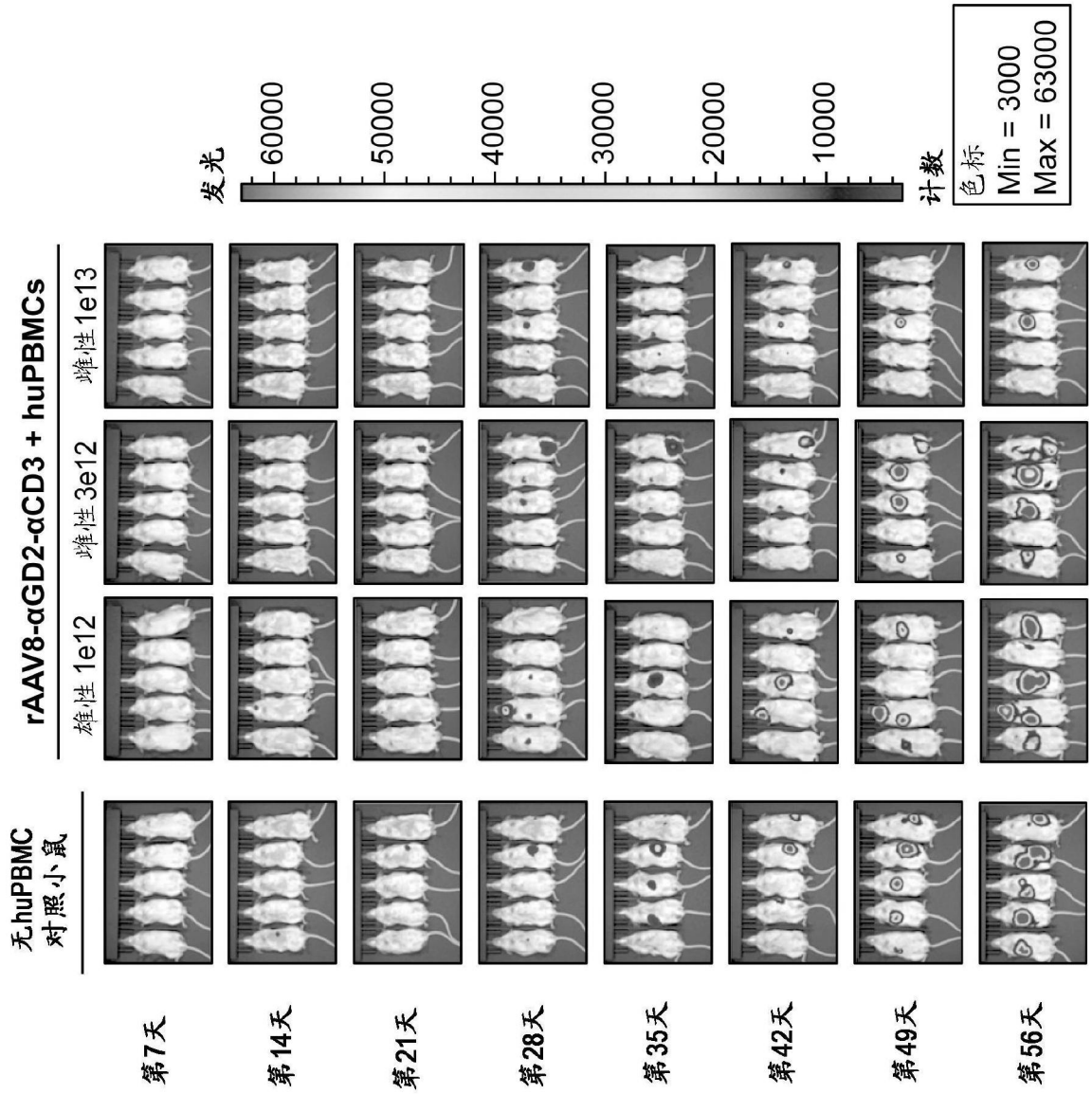
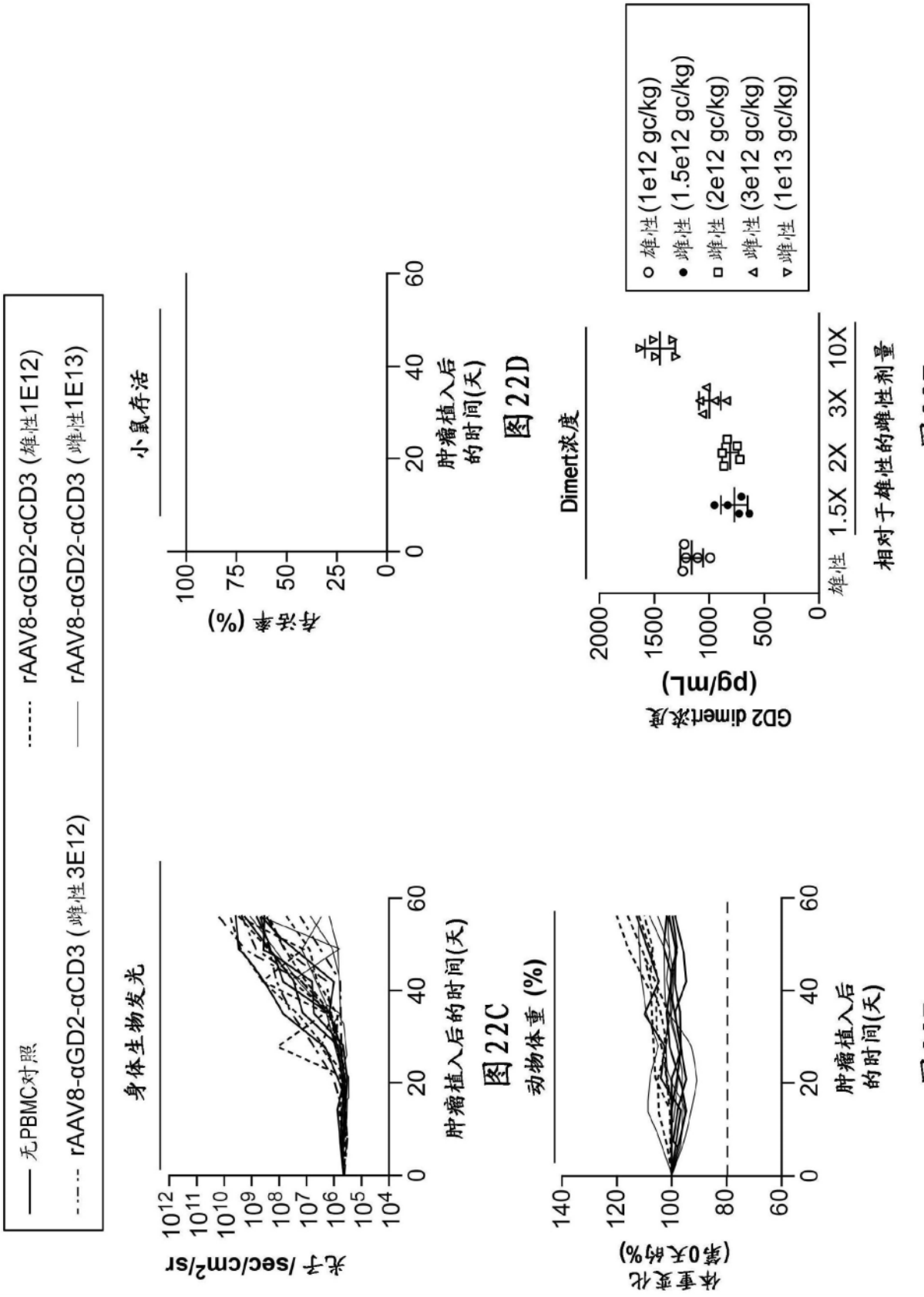

发光
60000
50000
40000
30000
20000
10000
计数
色标
Min = 3000
Max = 63000
rAAV8-αGD2-αCD3 + huPBMCs
雄性 1e12
雌性 3e12
雌性 1e13
无huPBMC
对照小鼠
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天

图22B


无PBMC对照
rAAV8-αGD2-αCD3 (雄性1E12)
rAAV8-αGD2-αCD3 (雌性3E12)
rAAV8-αGD2-αCD3 (雌性1E13)
身体生物发光
光子 /sec/cm²/sr
肿瘤植入后的时间(天)
图 22C
小鼠存活
存活率 (%)
肿瘤植入后的时间(天)
图 22D
动物体重 (%)
体重变化 (第0天的%)
肿瘤植入后的时间(天)
图 22E
Dimer浓度
GD2 dimer浓度 (pg/mL)
雄性 1.5X 2X 3X 10X
相对于雄性的雌性剂量
图 22F
雄性 (1e12 gc/kg)
雌性 (1.5e12 gc/kg)
雌性 (2e12 gc/kg)
雌性 (3e12 gc/kg)
雌性 (1e13 gc/kg)