(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-551870
(P2022-551870A)
(43)公表日　令和4年12月14日(2022.12.14)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*7/01 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/01	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*35/15 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/15	Ｚ	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*35/768 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/768		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全80頁）　最終頁に続く

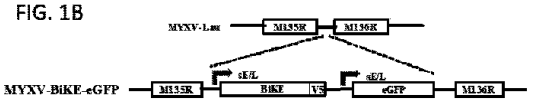
(21)出願番号　特願2022-521271(P2022-521271)
(86)(22)出願日　令和2年10月9日(2020.10.9)
(85)翻訳文提出日　令和4年6月7日(2022.6.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/055073
(87)国際公開番号　WO2021/072264
(87)国際公開日　令和3年4月15日(2021.4.15)
(31)優先権主張番号　62/913,655
(32)優先日　令和1年10月10日(2019.10.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　507243142
アリゾナ・ボード・オブ・リージェンツ・オン・ビハーフ・オブ・アリゾナ・ステイト・ユニバーシティー
Ａｒｉｚｏｎａ Ｂｏａｒｄ ｏｆ Ｒｅｇｅｎｔｓ ｏｎ ｂｅｈａｌｆ ｏｆ Ａｒｉｚｏｎａ Ｓｔａｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ
アメリカ合衆国、アリゾナ州 ８５２５７－３５３８、スコッツデイル、ノース・スコッツデイル・ロード １４７５、スカイ・ソング－スイート ２００
(74)代理人　100082072
弁理士　清原 義博
(72)発明者　マクファデン，ダグラス グラント
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する腫瘍溶解性ウイルス

(57)【要約】
本開示は、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する粘液腫ウイルス、および対象における血液癌を阻害および／または治療する際のその使用を提供する。本開示はまた、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する粘液腫ウイルスを有する白血球、および対象における血液癌を阻害および／または治療するための白血球の使用を提供する。
【選択図】図１Ｂ

FIG. 1B



【特許請求の範囲】
【請求項１】
多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする導入遺伝子を含む粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）。
【請求項２】
前記多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、二重特異性ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー（ＢｉＫＥ）、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、または膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー（ＭｉＴＥ）である、請求項１に記載のＭＹＸＶ。
【請求項３】
前記多重特異性免疫細胞エンゲージャーが、血液癌細胞上に存在する抗原に結合する、請求項１または請求項２に記載のＭＹＸＶ。
【請求項４】
前記血液癌細胞が骨髄腫細胞、白血病細胞、またはリンパ腫細胞である、請求項３に記載のＭＹＸＶ。
【請求項５】
前記ＢｉＫＥがナチュラルキラー細胞または好中球上に存在する抗原に結合する、請求項２に記載のＭＹＸＶ。
【請求項６】
前記ＢｉＴＥがＴ細胞上に存在する抗原に結合する、請求項２に記載のＭＹＸＶ。
【請求項７】
前記ＭｉＴＥがＴ細胞上に存在する抗原に結合する、請求項２に記載のＭＹＸＶ。
【請求項８】
前記ＢｉＫＥがＣＤ１６またはＣＤ１３８に結合する、請求項２－７のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項９】
前記ＢｉＫＥがＣＤ１６およびＣＤ１３８に結合する、請求項２－８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１０】
前記ＢｉＴＥがＣＤ３またはＣＤ１３８に結合する、請求項２－８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１１】
前記ＢｉＴＥがＣＤ３およびＣＤ１３８に結合する、請求項２－８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１２】
前記ＭｉＴＥがＣＤ３またはＣＤ１３８に結合する、請求項２－８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１３】
前記ＭｉＴＥがＣＤ３およびＣＤ１３８に結合する、請求項２－８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１４】
前記多重特異性免疫細胞エンゲージャーが、抗ヒトＣＤ抗体に由来する１つ以上の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、請求項１－１３のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１５】
前記多重特異性免疫細胞エンゲージャーが１つ以上のヒト化単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、請求項１－１３のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１６】
前記ＢｉＫＥが、配列番号４－２１のいずれか１つに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である配列を含む、請

求項２－１５のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１７】
前記ＢｉＴＥが、配列番号６、７、１０－１５、または３２－３９のいずれか１つに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である配列を含む、請求項２－１５のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１８】
前記ＭｉＴＥが、配列番号６、７、１０－１５、または３２－３９のいずれかと少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である配列を含む、請求項２－１５のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項１９】
前記導入遺伝子が、ＭＹＸＶのゲノムのＭ１３５遺伝子とＭ１３６遺伝子との間に位置する、請求項１－１８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２０】
レポーター遺伝子をさらに含む、請求項１－１９のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２１】
前記レポーター遺伝子が蛍光タンパク質をコードする、請求項２０に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２２】
前記レポーター遺伝子が発光基質または酵素をコードする、請求項２０に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２３】
前記ＭＹＸＶのゲノムにおける変異をさらに含む、請求項１－２２のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２４】
前記変異がＭ００１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、Ｍ００５Ｒ、Ｍ００６Ｒ、Ｍ００７Ｒ、Ｍ００８．１Ｒ、Ｍ００８Ｒ、Ｍ００９Ｌ、Ｍ０１３、Ｍ０３６Ｌ、Ｍ０６３Ｌ、Ｍ１１Ｌ、Ｍ１２８Ｌ、Ｍ１３１Ｒ、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ１４１Ｒ、Ｍ１４８Ｒ、Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、およびＳＯＤからなる群より選択される１つ以上の遺伝子に存在する、請求項２３に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２５】
前記変異が欠失である、請求項２３または請求項２４に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２６】
前記欠失がＭ１３５Ｒの少なくとも一部を削除する、請求項２５に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２７】
前記ＭＹＸＶが、インビトロフローサイトメトリーアッセイによって決定されるように、前記導入遺伝子を欠くＭＹＸＶと比較して、感染した癌細胞の殺傷を少なくとも５％増加させる、請求項１－２６のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２８】
前記ＭＹＸＶが、インビトロフローサイトメトリーアッセイによって決定されるように、前記導入遺伝子を欠くＭＹＸＶと比較して、感染していない癌細胞の殺傷を少なくとも５％増加させる、請求項１－２７のいずれか一項に記載のＭＹＸＶ。
【請求項２９】
請求項１－２８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶおよび薬学的に許容される担体を含む組成物。
【請求項３０】
請求項１－２８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶまたは請求項２９に記載の組成物を対象に投与する工程を含む、治療を必要とする対象の血液癌を治療する方法。
【請求項３１】

前記対象がヒトである、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＭＹＸＶが、不十分な生来の抗ウイルス応答を有する細胞に感染することができる、請求項３０または請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ＭＹＸＶが癌細胞に感染することができる、請求項３０－３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記血液癌が、骨髄腫、多発性骨髄腫、白血病、またはリンパ腫である、請求項３０－３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
請求項１－２８のいずれか一項に記載のＭＹＸＶを含むか、またはそれに結合している白血球を対象に投与する工程を含む、治療を必要とする対象の血液癌を治療する方法。
【請求項３６】
前記ＭＹＸＶをエキソビボで前記白血球の表面上に吸着させる工程をさらに含む、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記白血球の表面上へ前記ＭＹＸＶの吸着が、前記ＭＹＸＶの前記白血球の表面上への結合を可能にする条件下で、前記白血球を前記ＭＹＸＶに曝露することを含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記吸着させる工程が、前記白血球を前記ＭＹＸＶに少なくとも５分間曝露することを含む、請求項３６または請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記吸着させる工程が、前記白血球を前記ＭＹＸＶに約１時間曝露することを含む、請求項３６または請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記吸着する工程が、約０．００１から１０００の間の感染多重度（ＭＯＩ）で前記白血球を前記ＭＹＸＶに曝露する工程を含む、請求項３６－３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
前記吸着する工程が、約０．１から１０の間の感染多重度（ＭＯＩ）で前記白血球を前記ＭＹＸＶに曝露することを含む、請求項３６－３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
前記白血球が末梢血から得られる、請求項３６－４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記白血球が骨髄から得られる、請求項３６－４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記白血球が末梢血単核細胞である、請求項３６－４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記白血球が前記対象の組織から得られる、請求項３６－４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記白血球が、前記対象に対してＨＬＡ一致、ＨＬＡ不一致、ハプロタイプ一致、またはそれらの組み合わせであるドナーの組織から得られる、請求項３６－４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記白血球が医薬組成物に製剤化される、請求項３６－４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】

前記白血球が全身投与される、請求項３６－４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記白血球が非経口的に投与される、請求項３６－４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
前記白血球が静脈内投与される、請求項３６－４７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０１９年１０月１０日に出願された米国仮特許出願第６２／９１３，６５５号の利益を主張し、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
技術分野
本開示は、粘液腫ウイルスおよび癌の治療、例えば、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する粘液腫ウイルスを用いる血液癌の治療のためのそれらの使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
様々なタイプの癌を治療するために使用される現在の治療は、癌性細胞に毒を与えるかまたはこれを殺傷することによって機能する傾向がある。不運にも、癌細胞に毒性のある治療は、通常、健康な細胞にも毒性がある傾向がある。さらに、癌の効果的な治療はとらえどころのないままである。化学療法や放射線療法などの現在の主流の治療法は、治療ウィンドウ（例えば、有効性を達成するのに十分高いが、毒性を回避するのに十分低い濃度）が狭い可能性がある。これらのタイプの治療法は、様々なタイプの腫瘍、およびこれらの治療を投与できる限られたウィンドウに起因して、適用範囲が限られている鈍いツールと見なされる。
【発明の概要】
【０００４】
本明細書に開示されるのは、いくつかの態様において、多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする導入遺伝子を含む粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）である。
【０００５】
いくつかの実施形態において、多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、二重特異性ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー（ＢｉＫＥ）、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、または膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー（ＭｉＴＥ）を含む。いくつかの実施形態において、多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、血液癌細胞上に存在する抗原に結合する。いくつかの実施形態において、血液癌細胞は、骨髄腫細胞、白血病細胞、またはリンパ腫細胞である。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥは、ナチュラルキラー細胞または好中球上に存在する抗原に結合する。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥは、Ｔ細胞上に存在する抗原に結合する。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥは、Ｔ細胞上に存在する抗原に結合する。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥは、ＣＤ１６またはＣＤ１３８に結合する。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥは、ＣＤ１６およびＣＤ１３８に結合する。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥは、ＣＤ３またはＣＤ１３８に結合する。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥは、ＣＤ３およびＣＤ１３８に結合する。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥは、ＣＤ３またはＣＤ１３８に結合する。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥは、ＣＤ３およびＣＤ１３８に結合する。いくつかの実施形態において、多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、抗ヒトＣＤ抗体に由来する１つ以上の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態において、多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、１つ以上のヒト化単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥは、配列番号４－２１のいずれか１つに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくと

も９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥは、配列番号６、７、１０－１５、または３２－３９のいずれか１つに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥは、配列番号６、７、１０－１５、または３２－３９のいずれか１つに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、ＭＹＸＶのゲノムのＭ１３５遺伝子とＭ１３６遺伝子との間に位置する。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、レポーター遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、蛍光タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、発光基質または酵素をコードする。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶのゲノムにおける変異をさらに含む。いくつかの実施形態において、変異は、Ｍ００１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、Ｍ００５Ｒ、Ｍ００６Ｒ、Ｍ００７Ｒ、Ｍ００８．１Ｒ、Ｍ００８Ｒ、Ｍ００９Ｌ、Ｍ０１３、Ｍ０３６Ｌ、Ｍ０６３Ｌ、Ｍ１１Ｌ、Ｍ１２８Ｌ、Ｍ１３１Ｒ、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ１４１Ｒ、Ｍ１４８Ｒ、Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、およびＳＯＤからなる群より選択される１つ以上の遺伝子に存在する。いくつかの実施形態において、変異は欠失である。いくつかの実施形態において、欠失は、Ｍ１３５Ｒの少なくとも一部を削除する。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶおよび薬学的に許容される担体を含む組成物中に存在する。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶまたは組成物は、血液癌を治療する方法において、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、欠損した生来の抗ウイルス応答を有する細胞に感染することができる。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、癌細胞に感染することができる。いくつかの実施形態において、血液癌は、骨髄腫、多発性骨髄腫、白血病、またはリンパ腫である。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、癌を治療するための方法において、白血球と共に対象に投与され、ここで、白血球は、ＭＹＸＶを含むか、またはそれに関連する。いくつかの実施形態において、この方法は、ＭＹＸＶをエキソビボで白血球の表面上に吸着させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶを白血球の表面上に吸着させる工程は、白血球の表面への粘液腫ウイルスの結合を可能にする条件下で、白血球を粘液腫ウイルスに曝露することを含む。いくつかの実施形態において、吸着は、白血球を少なくとも５分間ＭＹＸＶに曝露することを含む。いくつかの実施形態において、吸着させる工程は、白血球をＭＹＸＶに約１時間曝露することを含む。いくつかの実施形態では、吸着させる工程は、約０．００１から１０００の間の感染多重度（ＭＯＩ）で白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。いくつかの実施形態では、吸着させる工程は、約０．１から１０の間の感染多重度（ＭＯＩ）で白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。いくつかの実施形態では、白血球は末梢血から得られる。いくつかの実施形態において、白血球は骨髄から得られる。いくつかの実施形態において、白血球は、末梢血単核細胞である。いくつかの実施形態において、白血球は、対象の組織から得られる。いくつかの実施形態において、白血球は、対象に対してＨＬＡ一致、ＨＬＡ不一致、ハプロタイプ一致、またはそれらの組み合わせであるドナーの組織から得られる。いくつかの実施形態において、白血球は、医薬組成物に製剤化される。いくつかの実施形態において、白血球は全身投与される。いくつかの実施形態において、白血球は非経口的に投与される。いくつかの実施形態において、白血球は静脈内投与される。

【０００６】

いくつかの実施形態は、多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする導入遺伝子を含む粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）に関する。

【０００７】
いくつかの実施形態は、本明細書に記載の粘液腫ウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む組成物に関する。
【０００８】
いくつかの実施形態は、本明細書に記載の粘液腫ウイルスを対象に投与することを含む、治療を必要とする対象の血液癌を治療する方法に関する。
【０００９】
いくつかの実施形態は、白血球を対象に投与することを含む、治療を必要とする対象の血液癌を治療する方法に関し、ここで、白血球は、本明細書に記載の粘液腫ウイルスを含む。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
本開示の特定の実施形態の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲に具体的に示されている。本開示の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を説明する以下の詳細な説明、およびその添付の図面を参照することによって得られる。
【図１Ａ】図１Ａ－１Ｆは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの構造を示す。図１Ａは、ヒトＣＤ１３８を標的とするＢｉＫＥの構造のスキームを示す。
【図１Ｂ】図１Ａ－１Ｆは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの構造を示す。図１Ｂは、ＭＹＸＶゲノムと、ポックスウイルス合成初期／後期プロモーター（ｓＥ／Ｌ）の下で発現される両方とも導入遺伝子であるＢｉＫＥおよびｅＧＦＰを発現するカセットの挿入部位の概略図である。
【図１Ｃ】図１Ａ－１Ｆは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの構造を示す。図１Ｃは、オリゴヌクレオチドプライマーを使用したＭＹＸＶ－ＢｉＫＥクローンからのゲノムウイルスＤＮＡのＰＣＲ分析を示し、ＢｉＫＥカセット（パネル１－４）の存在を確認し、図１Ｄは適切な挿入（遺伝子間領域Ｍ１３５－Ｍ１３６）の存在を確認する。レーン１はＭＹＸＶ－ＬａｕからのＤＮＡ、レーン２－４はＭＹＸＶ－ＢｉＫＥクローン、Ｍは既知のサイズのＤＮＡラダーを表す。
【図１Ｄ】図１Ａ－１Ｆは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの構造を示す。図１Ｃは、オリゴヌクレオチドプライマーを使用したＭＹＸＶ－ＢｉＫＥクローンからのゲノムウイルスＤＮＡのＰＣＲ分析を示し、ＢｉＫＥカセット（パネル１－４）の存在を確認し、図１Ｄは適切な挿入（遺伝子間領域Ｍ１３５－Ｍ１３６）の存在を確認する。レーン１はＭＹＸＶ－ＬａｕからのＤＮＡ、レーン２－４はＭＹＸＶ－ＢｉＫＥクローン、Ｍは既知のサイズのＤＮＡラダーを表す。
【図１Ｅ】図１Ａ－１Ｆは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの構造を示す。図１Ｅは、感染２４時間後のＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ感染ＲＫ１３細胞からの細胞溶解物および上清のウエスタンブロット分析を示す。
【図１Ｆ】図１Ａ－１Ｆは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの構造を示す。図１Ｆは、組換えＭＹＸＶ－ＢＩＫＥ対ＭＹＸＶ－ＧＦＰのシングルステップ成長分析を示す。
【図２】図２Ａ－２Ｃは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰが多発性骨髄腫患者から採取された血液サンプル中の癌細胞に生産的に感染し、癌細胞の殺傷を誘導することを示す。図２Ａは、モック処理（すなわち、ＭＹＸＶを追加しない）サンプルの多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞（ＣＤ１３８$^{+}$）の感染（ＧＦＰ＋）、生存率（近ＩＲ－）、アポトーシス（アネキシン　Ｖ＋）、および細胞殺傷（近ＩＲ＋）を示す。図２Ｂは、３つの異なるＭＯＩでのＣＤ１３８$^{+}$のＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰ感染を示す。図２Ｃは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰによって誘導されたＣＤ１３８$^{+}$細胞のアポトーシスおよび細胞死を示す。
【図３】図３Ａおよび３Ｂは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰを用いる治療後の患者＃３からの初代ヒトサンプルからの非感染多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞（すなわち、ＧＦＰ$^{-}$）の殺傷を示す。図３Ａは、２４時間後のモック処理（すなわち、ＭＹＸＶを追加しない

）サンプルにおける非感染ＭＭ細胞（すなわち、ＣＤ１３８$^{+}$ＧＦＰ$^{-}$）の生存率（近ＩＲ－）、アポトーシス（アネキシンＶ＋）、および細胞殺傷（近ＩＲ＋）を示す。矢印はＧＦＰ－細胞のゲーティングを示す。図３Ｂは、感染２４時間後のＣＤ１３８$^{+}$ＧＦＰ$^{-}$である非感染ＭＭ細胞のアポトーシスと細胞死のパーセンテージを示す。

【図４Ａ】図４Ａ－４Ｄは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰが患者＃４の初代ヒトサンプルからの多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞に生産的に感染し、これを殺傷することを誘導することを示す。図４Ａは、２４時間のモック処理（すなわち、ＭＹＸＶを追加しない場合）後のＭＭ細胞（ＣＤ１３８$^{+}$）の生存率（近ＩＲ－）、感染（ＧＦＰ＋）、アポトーシス（アネキシンＶ＋）、および細胞殺傷（近ＩＲ＋）を示す。

【図４Ｂ】図４Ａ－４Ｄは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰが患者＃４の初代ヒトサンプルからの多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞に生産的に感染し、これを殺傷することを誘導することを示す。図４Ｂは、３つの異なるＭＯＩでのＣＤ１３８$^{+}$のＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰ感染を示す。

【図４Ｃ】図４Ａ－４Ｄは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰが患者＃４の初代ヒトサンプルからの多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞に生産的に感染し、これを殺傷することを誘導することを示す。図４Ｃは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰによって誘導されたＣＤ１３８$^{+}$細胞のアポトーシスおよび細胞死を示す。

【図４Ｄ】図４Ａ－４Ｄは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰが患者＃４の初代ヒトサンプルからの多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞に生産的に感染し、これを殺傷することを誘導することを示す。図４Ｄは、感染２４時間後の蛍光顕微鏡写真を示す。

【図５】図５Ａおよび５Ｂは、ＭＹＸＶ－ｈｕＢｉＫＥ－ＧＦＰを用いる治療後の患者＃４からの初代ヒトサンプルからの非感染多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞（すなわち、ＧＦＰ$^{-}$）の殺傷を示す。図５Ａは、２４時間後のモック処理（すなわち、ＭＹＸＶを追加しない）サンプルにおける非感染ＭＭ細胞（すなわち、ＣＤ１３８$^{+}$ＧＦＰ$^{-}$）の生存率（近ＩＲ－）、アポトーシス（アネキシンＶ＋）、および細胞殺傷（近ＩＲ＋）を示す。矢印は、ＧＦＰ－（非感染）でのゲーティングを示す。図５Ｂは、ウイルス処理後２４時間での非感染ＣＤ１３８$^{+}$ＧＦＰ$^{-}$細胞のアポトーシスと細胞死のパーセンテージを示す。

【図６】ＢｉＫＥがヒトＭＭおよびＮＫ細胞に結合したが、対照ＭＭ細胞またはＮＫ細胞（モック感染細胞から採取した上清、またはＢｉＫＥを欠くＭＹＸＶに感染した細胞とインキュベートした）では結合が検出されなかったことを実証する。

【図７】ＢｉＫＥ抗体がＭＭ細胞のＮＫ細胞媒介性殺傷を誘導することができ、殺傷がソース上清培養物のＭＯＩに依存していたことを実証する。

【図８Ａ】図８Ａ－Ｄは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ感染に対するヒト血液癌細胞の感受性が、蛍光顕微鏡法によって２４および４８ｈｐｉで評価されたことを実証する。図８Ａおよび図８Ｂは、それぞれ感染後２４時間および４８時間でのＴＨＰ－１細胞の感染を実証する。

【図８Ｂ】図８Ａ－Ｄは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ感染に対するヒト血液癌細胞の感受性が、蛍光顕微鏡法によって２４および４８ｈｐｉで評価されたことを実証する。図８Ａおよび図８Ｂは、それぞれ感染後２４時間および４８時間でのＴＨＰ－１細胞の感染を実証する。

【図８Ｃ】図８Ａ－Ｄは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ感染に対するヒト血液癌細胞の感受性が、蛍光顕微鏡法によって２４および４８ｈｐｉで評価されたことを実証する。図８Ｃおよび図８Ｄは、それぞれ感染後２４時間および４８時間でのＵ２６６細胞の感染を実証する。

【図８Ｄ】図８Ａ－Ｄは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ感染に対するヒト血液癌細胞の感受性が、蛍光顕微鏡法によって２４および４８ｈｐｉで評価されたことを実証する。図８Ｃおよび図８Ｄは、それぞれ感染後２４時間および４８時間でのＵ２６６細胞の感染を実証する。

【図９】フローサイトメトリーによって評価された、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥによるＴＨＰ－１細胞の殺傷を実証する。

【図１０】フローサイトメトリーによって評価された、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥによるＵ２６６細胞の殺傷を実証する。

【図１１】フローサイトメトリーによって評価された、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥによる初代ヒト多発性骨髄腫細胞の殺傷を実証する。
【図１２】多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する本開示のＭＹＸＶを生成するために使用することができるプラスミドのマップを提供する。
【図１３】多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現し、ＭＹＸＶゲノムにおける遺伝子破壊を含む、本開示のＭＹＸＶを生成するために使用することができるプラスミドのマップを提供する。
【図１４Ａ】図１４Ａ－１４Ｃは、ＢＯＲ耐性ＶＫ１２５９８細胞株がＭＹＸＶに対して感受性であることを示す。図１４Ａは、Ｖｅｎｕｓ＋ＭＹＸＶのＶＫ１２５９８細胞株への結合を示す。
【図１４Ｂ】図１４Ａ－１４Ｃは、ＢＯＲ耐性ＶＫ１２５９８細胞株がＭＹＸＶに対して感受性であることを示す。図１４Ｂは、蛍光顕微鏡を介してＶＫ１２５９８細胞株の生産的感染を示す。
【図１４Ｃ】図１４Ａ－１４Ｃは、ＢＯＲ耐性ＶＫ１２５９８細胞株がＭＹＸＶに対して感受性であることを示す。図１４Ｃは、フローサイトメトリーを介してＶＫ１２５９８細胞株の生産的感染を示す。
【図１５Ａ】図１５Ａおよび１５Ｂは、多剤耐性ＶＫ１２６５３細胞株のＭＹＸＶ結合および感染を示す。図１５Ａは、Ｖｅｎｕｓ＋ＭＹＸＶのＶＫ１２６５３細胞株への結合を示す。
【図１５Ｂ】図１５Ａおよび１５Ｂは、多剤耐性ＶＫ１２６５３細胞株のＭＹＸＶ結合および感染を示す。図１５Ｂは、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを介するＶＫ１２６５３細胞株の生産的感染を示す。
【図１６Ａ】図１６Ａ－１６Ｃは、自己移植レシピエントにおける既存の多発性骨髄腫癌を治療するための粘液腫ウイルスを用いるエキソビボ療法を示す。図１６Ａは、ＶＫ１２５９８細胞（上のパネル）と４つの実験コホート（下のパネル）を移植してから４週間後にマウスのＭスパイクを提供するウエスタンブロットを示す。
【図１６Ｂ】図１６Ａ－１６Ｃは、自己移植レシピエントにおける既存の多発性骨髄腫癌を治療するための粘液腫ウイルスを用いるエキソビボ療法を示す。図１６Ｂは、低Ｍスパイク（０．１）を有する代表的なモック処置マウスにおけるＭＭ細胞（ＣＤ１３８$^{+}$Ｂ２２０$^{-}$）のパーセンテージおよび高Ｍスパイク（０．６）を有する代表的な骨髄レシピエントマウスにおけるＭＭ細胞（ＣＤ１３８$^{+}$Ｂ２２０$^{-}$）のパーセンテージを示す。
【図１６Ｃ】図１６Ａ－１６Ｃは、自己移植レシピエントにおける既存の多発性骨髄腫癌を治療するための粘液腫ウイルスを用いるエキソビボ療法を示す。図１６Ｃは、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰを用いてエキソビボで処理された骨髄で処理されたマウスのＭスパイクを示す。移植後８日目、２９日目、および３７日目にＭスパイクバンドは検出されなかった。
【図１７Ａ】ＭＹＸＶ－ＷＴ－ＧＦＰ、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰ、およびＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰを用いる感染２４時間後および４８時間でＧＦＰ陽性であったＴＨＰ－１細胞のパーセントを示す。
【図１７Ｂ】ＭＹＸＶ－ＷＴ－ＧＦＰ、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰ、およびＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰを用いる感染後２４時間および４８時間でＧＦＰ陽性であったＵ２６６細胞のパーセントを示す。
【図１８Ａ】ＭＹＸＶ－ＷＴ－ＧＦＰおよびＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰによって２４時間および４８時間で殺傷された感染Ｕ２６６細胞のパーセントを図示する。
【図１８Ｂ】ＭＹＸＶ－ＷＴ－ＧＦＰおよびＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰによって２４時間および４８時間で殺傷された非感染Ｕ２６６細胞のパーセントを図示する。
【図１９】ＭＹＸＶ－ＷＴ－ＧＦＰまたはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰに感染した培養物について、感染したＵ２６６細胞に対する死滅したＵ２６６細胞の比率を提供する。
【図２０】示されたＭＯＩでＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰ、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰ、または野生型ＭＹＸＶ－ＧＦＰに感染した初代ＣＤ１３８＋ＭＭ細胞の割合を図示

する。
【図２１】ＭＯＩ　１０でのＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰまたは野生型ＭＹＸＶ－ＧＦＰを用いるモック感染または感染の後にＣＤ１３８＋であったＭＭ患者からの初代ヒトＢＭサンプル中の無傷の細胞の割合を定量化する。
【図２２】（ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰに感染したＶｅｒｏ細胞の上清からの）ＢｉＫＥの存在下で、またはＢｉＫＥの非存在下で（ｃＲＰＭＩ、完全培地、または野生型ＭＹＸＶ－ＧＦＰに感染したＶｅｒｏ細胞の上清）、ＮＫ細胞またはＰＢＭＣとの４８時間の共インキュベーション後に死滅したＣＤ１３８＋　ＭＭ細胞のパーセントを示す。共培養は３連で行い、近ＩＲ　生／死　染色に従って、死滅したＵ２６６細胞集団の割合のフローサイトメトリー分析に基づいて、各感染についてｐ値を取得した。有意性（＊＝ｐ＜０．０５；＊＊＝ｐ＜０．０１；＊＊＊＝ｐ＜０．００１）は、多重比較のためのＨｏｌｍ－Ｓｉｄａｋのｔ検定を使用して決定された。
【図２３Ａ】ＭＹＸＶ－ＧＦＰまたはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥが吸着されたＮＫ細胞（上段）またはＮＫ枯渇ＰＢＭＣ（－ＮＫ、下段）との共インキュベーション後のＣＤ１３８＋ＭＭ細胞の感染を実証するドットプロットを提供する。
【図２３Ｂ】ＭＹＸＶ－ＧＦＰまたはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥが吸着されたＮＫ細胞（上段）またはＮＫ枯渇ＰＢＭＣ（－ＮＫ、下段）との共インキュベーション後のＣＤ１３８＋ＭＭ細胞の殺傷を実証するドットプロットを提供する。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
本開示の態様は、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する腫瘍溶解性ウイルス組換え構築物、および血液癌などの癌を治療するためのそれらの使用に関する。腫瘍溶解性ウイルスは、粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶまたはｖＭｙｘ、本明細書で交換可能に使用される）であり得、構築物中で使用される多重特異性免疫細胞エンゲージャーには、ＢｉＫＥ（二重特異的ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー）導入遺伝子、ＢｉＴＥ（二重特異的Ｔ細胞エンゲージャー）、および膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー（ＭｉＴＥ）が含まれ得る。本明細書に記載のＭＹＸＶは、微小残存病変（ＭＲＤ）および薬剤耐性ＭＲＤを含む血液癌を治療するために使用できる。
【００１２】
本明細書に記載のＭＹＸＶは、再発性多発性骨髄腫疾患などの血液癌を治療し、難治性および薬剤耐性のＭＲＤを低減し、本質的に低減し、または排除するためのより効果的な治療法であり得る。多発性骨髄腫（ＭＭ）は、溶解性骨病変、貧血、腎不全、高カルシウム血症を含む末端器官損傷を引き起こす悪性血漿細胞のクローン性増殖を特徴とする血液悪性腫瘍である（Ｈａｒｉ　Ｐ．Ｒｅｃｅｎｔ　ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　ｕｎｄｅｒｓｔａｎｄｉｎｇ　ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｍｙｅｌｏｍａ．Ｈｅｍａｔｏｌ　Ｏｎｃｏｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｈｅｒ．２０１７；印刷中）。ＭＭの骨髄（ＢＭ）腫瘍微小環境は、悪性ＭＭ細胞の分化、移動、増殖、生存、および薬剤耐性をサポートおよび維持する重要な役割を果たす（Ｋａｗａｎｏ　Ｙ，Ｍｏｓｃｈｅｔｔａ　Ｍ，Ｍａｎｉｅｒ　Ｓ，Ｇｌａｖｅｙ　Ｓ，Ｇｏｅｒｇｕｅｎ　ＧＴ，Ｒｏｃｃａｒｏ　ＡＭ，ｅｔ　ａｌ．Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｔｈｅ　ｂｏｎｅ　ｍａｒｒｏｗ　ｍｉｃｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ　ｉｎ　ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｍｙｅｌｏｍａ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｖ．２０１５；２６３（１））。移植適格患者のための自己幹細胞移植は、化学療法とともに、ＭＭの標準治療である（Ｌａｎｄｇｒｅｎ　Ｏ，Ｌｕ　ＳＸ，ａｎｄ　Ｈｕｌｔｃｒａｎｔｚ　Ｍ．ＭＲＤ　Ｔｅｓｔｉｎｇ　ｉｎ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｍｙｅｌｏｍａ：Ｔｈｅ　Ｍａｉｎ　Ｆｕｔｕｒｅ　Ｄｒｉｖｅｒ　ｆｏｒ　Ｍｏｄｅｒｎ　Ｔａｉｌｏｒｅｄ　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ．Ｓｅｍｉｎ　Ｈｅｍａｔｏｌ．２０１８；５５（１）：４４－５０；Ｈｏｙｏｓ　Ｖ，ａｎｄ　Ｉ．Ｂ．Ｔｈｅ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ　ｅｒａ　ｏｆ　ｍｙｅｌｏｍａ：ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖａｃｃｉｎｅｓ，ａｎｄ　ａｄｏｐｔｉｖｅ　Ｔ－ｃｅｌｌ　ｔｈｅｒａｐｉｅｓ．Ｂｌｏｏｄ．２０１６；１２８（１３）：１６７９－８７）。しかし、これらの治療法の主なハードルは、治療抵抗性のＭＭ

細胞の貯蔵庫として機能することができ、微小残存病変（ＭＲＤ）をもたらす腫瘍性クローンに起因する疾患の再発である。

【００１３】

転帰の改善にもかかわらず、ＭＭは依然としてほとんどの患者にとって不治であると見なされており、リスクの高い特徴を有する患者では低い生存率が観察される（Ｂｕｓｔｏｒｏｓ Ｍ，Ｍｏｕｈｉｅｄｄｉｎｅ ＴＨ，Ｄｅｔａｐｐｅ Ａ，ａｎｄ ＩＭ．Ｇ．Ｅｓｔａｂｌｉｓｈｅｄ ａｎｄ Ｎｏｖｅｌ Ｐｒｏｇｎｏｓｔｉｃ Ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ ｉｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｍｙｅｌｏｍａ．Ａｍ Ｓｏｃ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ Ｅｄｕｃ Ｂｏｏｋ．２０１７；３７：５４８－６０）。ＭＹＸＶなどの腫瘍溶解性ウイルスは、形質転換された癌細胞に選択的に感染してこれを殺傷する能力、および宿主の免疫系を活性化するそれらの能力のために設計および／または選択できる哺乳動物ウイルスである。本明細書に記載のＭＹＸＶは、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを利用し、宿主免疫系と組み合わせて働き、癌細胞を標的にすることができる。したがって、本明細書に記載の粘液腫ウイルスは、難治性および薬剤耐性の微小残存病変を軽減または排除するために役立つことができ、再発したＭＭ疾患を治療するためにより効果的であり得る。

【００１４】

定義

特に断りのない限り、専門用語は従来の使用法に従って使用される。 分子生物学の一般的な用語の定義は、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９４（ＩＳＢＮ ０－１９－８５４２８７－９）によって発行されたＢｅｎｊａｍｉｎ Ｌｅｗｉｎ、Ｇｅｎｅｓ Ｖ（ＩＳＢＮ ０－１９－８５４２８７－９）、Ｋｅｎｄｒｅｗ ｅｔａｌ．（編），Ｔｈｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．，１９９４（ＩＳＢＮ ０－６３２－０２１８２－９）、およびＲｏｂｅｒｔ Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（編），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ ＶＣＲ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，１９９５（ＩＳＢＮ １－５６０８１－５６９－８）に記載されている。

【００１５】

別段の説明がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似または同等の方法および材料を本開示の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。さらに、材料、方法、および実施例は例示にすぎず、限定することを意図するものではない。

【００１６】

以下の用語および方法の説明は、本発明の化合物、組成物、および方法をよりよく説明し、本開示の実施において当業者を導くために提供される。また、本開示で使用される用語は、特定の実施形態および例を説明することのみを目的としており、限定されることを意図するものではないことも理解されるべきである。

【００１７】

本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数形も含むことを意図している。

【００１８】

本明細書で使用される場合、「および／または」という用語は、関連するリストされた項目の１つ以上のありとあらゆる可能な組み合わせ、ならびに代替（「または」）で解釈される場合の組み合わせの欠如を指し、包含する。

【００１９】

本明細書で使用される場合、「１（つ）以上」または少なくとも１つは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上、任意の数までを意味し得る。

【００２０】

本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」または「含むこと」という用語は、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」を意味する。したがって、「ＡまたはＢを含むこと」は、Ａ、Ｂ、またはＡおよびＢを含むことを意味する。「含む」および「含むこと」、「含み」、および「含んだ」などのこの用語のバリエーションは、本明細書で使用される場合、様々な付加的な構成要素または工程が共同して利用され得ることを意味する。

【００２１】

「有効量」または「治療有効量」は、治療的および／または有益な効果であり得る所望の効果を生み出すのに十分である、本開示の化合物または組成物の量を指す。この例では、有効量は、対象の年齢、一般的な状態、治療される状態の重症度、投与される特定の薬剤、治療の期間、任意の同時治療の性質、使用される薬学的に許容される担体、および熟練作業者の知識と技能内にある同様の要因によって変動し得る。適切である場合、任意の個々の場合における有効量または治療有効量は、関連するテキストおよび文献を参照することによって、および／または実験によって決定することができる。（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ、Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ（最新版）を参照のこと）。

【００２２】

本明細書で使用される場合、「対象」および「患者」という用語は交換可能に使用され、ヒトと非ヒト動物の両方を指す。本開示の「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、齧歯動物（例えば、マウス、ラットなど）などの哺乳動物、および非哺乳動物を含む。対象はヒトである可能性がある。対象はヒトの患者である可能性がある。いくつかの実施形態において、本開示の対象は、ヒトの対象である。

【００２３】

本明細書で使用される「細胞」という用語は、単一の細胞ならびに複数の細胞または細胞の集団を含む。薬剤を細胞に投与または曝露することには、インビトロ、エキソビボ、およびインビボでの投与または曝露が含まれ得る。

【００２４】

「それを必要とする対象」または「必要とする対象」は、血液癌などの癌を有することが知られているか、または有することが疑われる対象である。

【００２５】

本明細書で使用される場合、「癌」という用語は、悪性新生物、例えば、分化の喪失、成長速度の増加、周囲組織への浸潤を伴う特徴的な退形成を受け、転移することができる新生物を指す。

【００２６】

残存癌は、癌を減少または根絶するために対象に与えられた何らかの型の治療の後に対象に残る癌である。転移性癌は、転移性癌が由来する元の（原発性）癌の起源の部位以外の、体内の１つ以上の部位、例えば、第２の部位にある癌である。局所再発は、元の癌と同じ部位（同じ組織内など）またはその近くでの癌の再発である。血液癌は、血液、骨髄、および／またはリンパ系に影響を与える癌である。

【００２７】

血液癌の非限定的な例には、白血病、リンパ腫、および骨髄腫が含まれ、これには、例えば、以下が含まれる：多発性骨髄腫（ＭＭ）；活動性多発性骨髄腫；くすぶり型骨髄腫；形質細胞腫；骨の孤立性形質細胞腫；髄外形質細胞腫；軽鎖骨髄腫；非分泌性骨髄腫；免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）骨髄腫；免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）骨髄腫；免疫グロブリンＭ（ＩｇＭ）骨髄腫；免疫グロブリンＤ（ＩｇＤ）骨髄腫；免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）骨髄腫；高二倍体多発性骨髄腫；非高二倍体多発性骨髄腫；ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫；急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；本態性血小板血症；真性赤血球増加症；原発性骨髄線維症；全身性肥満細胞症；慢性骨髄性白血病；慢性好中球性白血病；慢性好酸球性白血病；環状鉄芽球を伴う難治性貧血；多系統異形成を伴う難治性細胞減少症；過剰芽球１型を伴う難治性貧血；過剰芽球２型を伴う難治性貧血；孤立した欠

失（ｄｅｌ）（５ｑ）を伴う骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）；分類不可能なＭＤＳ；慢性骨髄単球性白血病（ＣＭＬ）；非定型慢性骨髄性白血病；若年性骨髄単球性白血病；骨髄増殖性／骨髄異形成症候群－分類不能；Ｂリンパ芽球性白血病／リンパ腫；Ｔリンパ芽球性白血病／リンパ腫；びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；原発性縦隔Ｂ細胞リンパ腫；バーキットリンパ腫／白血病；濾胞性リンパ腫；慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫；Ｂ細胞前リンパ球性白血病；リンパ形質細胞性リンパ腫／ワルデンストロームマクログロブリン血症；マントル細胞リンパ腫；辺縁帯リンパ腫；移植後リンパ増殖性疾患；ＨＩＶ関連リンパ腫；原発性滲出液リンパ腫；血管内大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；原発性皮膚Ｂ細胞リンパ腫；有毛細胞白血病；重要性が不明な単クローン性免疫グロブリン血症；未分化大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性Ｔ細胞リンパ腫、肝脾Ｔ細胞リンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、細網内皮症、細網症、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病、ワルデンストロームマクログロブリン血症、リンパ腫様肉芽腫症、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、形質細胞白血病、急性赤芽球血症および赤白血病、急性赤芽球性骨髄症、急性赤白血病、Ｈｅｉｌｍｅｙｅｒ－Ｓｃｈｏｅｎｅｒ病、急性巨核芽球性白血病、マスト細胞白血病、汎骨髄症、骨髄線維症を伴う急性汎骨髄症、リンパ肉腫細胞白血病、幹細胞白血病、不特定の細胞型の慢性白血病、不特定の細胞型の亜急性白血病、加速期慢性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性好塩基性白血病、急性好酸球性白血病、急性単球性白血病、成熟を伴う急性骨髄芽球性白血病、急性骨髄性樹状細胞白血病、成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫、侵攻性ＮＫ細胞白血病、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病、Ｂ細胞白血病、慢性骨髄性白血病、慢性特発性骨髄線維症、Ｋａｈｌｅｒ病、骨髄腫症、孤立性骨髄腫、形質細胞白血病、血管中心性免疫増殖性病変、リンパ性肉芽腫症、血管免疫芽球性リンパ節腫脹症、Ｔ－ガンマリンパ増殖性疾患、ワルデンストロームマクログロブリン血症、アルファ重鎖疾患、ガンマ重鎖疾患、およびフランクリン病。いくつかの実施形態において、血液癌は多発性骨髄腫である。

【００２８】

本明細書で使用される場合、「化学療法剤」という用語は、異常な細胞増殖を特徴とする疾患の治療において治療的有用性を有する任意の化学剤を指す。このような疾患には、腫瘍、新生物、および癌、ならびに乾癬などの過形成性増殖を特徴とする疾患が含まれ得る。いくつかの実施形態において、化学療法剤は、抗新生物剤などの、癌の治療に使用される薬剤である。いくつかの実施形態において、化学療法剤は放射性化合物である。当業者の１人は、使用する化学療法剤を容易に特定することができる（例えば、Ｓｌａｐａｋ ａｎｄ Ｋｕｆｅ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｃｈａｐｔｅｒ ８６ ｉｎ Ｈａｒｒｉｓｏｎ’ｓ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ；Ｐｅｒｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ，Ｃｈ．１７ ｉｎ Ａｂｅｌｏｆｆ，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，２０００ Ｃｈｕｒｃｈｉｌｌ Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ，Ｉｎｃ；Ｂａｌｔｚｅｒ ａｎｄ Ｂｅｒｋｅｒｙ．（ｅｄｓ）：Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｐｏｃｋｅｔ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ，２ｎｄ ｅｄ．Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏｓｂｙ－Ｙｅａｒ Ｂｏｏｋ，１９９５；Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｋｎｏｂｆ，ａｎｄ Ｄｕｒｉｖａｇｅ （ｅｄｓ）：Ｔｈｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，４ｔｈ ｅｄ．Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏｓｂｙ－Ｙｅａｒ Ｂｏｏｋ，１９９３）

【００２９】

本明細書で使用される「治療する」、「治療」、または「治療すること」は、疾患または状態に苦しむ患者に医薬組成物を投与することを指す。本明細書で使用される場合、癌などの「疾患を阻害または治療する」という用語は、疾患または状態の発症または進行を遅延または阻害することを指す。「治療」とは、疾患または病的状態が発症し始めた後、その兆候または症状を改善する治療的介入を指す。疾患または病的状態に関連する「改善すること」という用語は、いかなる治療の観察可能な有益な効果も指す。有益な効果は、例えば、感受性のある対象における疾患の臨床症状の発症の遅延、疾患の一部もしくはす

べての臨床症状の重症度の低下、転移などの疾患の進行の遅延、対象の全体的な健康もしくは幸福の改善、または特定の疾患に特有である当該技術分野でよく知られている他のパラメーターによって証明することができる。「予防的」治療は、例えば、転移性癌などの病状を発症するリスクを低減する目的で、疾患の兆候を示さないか、または初期の兆候のみを示す対象に投与される治療である。

【００３０】

本明細書で使用される場合、本明細書に開示される治療用化合物と併せて有用な「薬学的に許容される担体」は、従来のものであり得る。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ｂｙ Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９９５）は、治療薬の薬剤送達に適した組成物および製剤を説明している。

【００３１】

一般に、担体の性質は、使用される特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、デキストロース水溶液、グリセロールなどの薬学的および生理学的に許容される流体を含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、粉末、丸薬、錠剤、またはカプセルの型）の場合、従来の非毒性固体担体には、例えば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが含まれ得る。生物学的に中性の担体に加えて、投与される医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、保存料、およびｐＨ緩衝剤など、例えば酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンなどの少量の非毒性補助物質を含むことができる。

【００３２】

本明細書で使用される場合、「医薬品」および「治療薬」という用語は、対象または細胞に適切に投与されたときに所望の治療的または予防的効果を誘導することができる化合物または組成物を指す。

【００３３】

「複製コンピテント」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト血液細胞（例えば、血液癌細胞、多発性骨髄腫細胞、または末梢血単核細胞）などの特定の宿主細胞内で感染および複製することができる粘液腫ウイルスなどのウイルスを指す。

【００３４】

「免疫調節性導入遺伝子」という用語は、ウイルスゲノムに導入することができ、免疫系の機能に影響を及ぼし得る、例えば、炎症、先天性または適応性免疫シグナル伝達、先天性または適応免疫細胞活性化（例えば、標的細胞の殺傷、サイトカイン、ケモカイン、または他の炎症性メディエーターの産生）、先天性または適応性免疫細胞ホーミング（例えば、走化性、血管外遊出、および／または部位での蓄積）、先天性または適応性免疫細胞増殖、先天性または適応性免疫細胞分化、抗体産生、あるいはそれらの組み合わせに影響を与える産物をコードする遺伝子配列を指す。免疫調節導入遺伝子の例には、ＢｉＴＥ、ＢｉＫＥ、およびＭｉＴＥが含まれるが、これらに限定されない。

【００３５】

粘液腫ウイルス

粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）は、その独特の生物学のために、多発性骨髄腫（ＭＭ）のような血液癌に対する治療用ウイルスとして潜在的によく適している。ＭＹＸＶは、ポックスウイルス科およびレポリポックスウイルス属のメンバーである（Ｃｈａｎ ＷＭ，Ｒａｈｍａｎ ＭＭ，ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ Ｇ．Ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ：ｔｈｅ ｐａｔｈ ｔｏ ｃｌｉｎｉｃ．Ｖａｃｃｉｎｅ．２０１３；３１（３９）：４２５２－８，Ｃｈａｎ ＷＭ，ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ Ｇ．Ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ Ｐｏｘｖｉｒｕｓｅｓ．Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｖｉｒｏｌ．２０１４；１（１）：１１９－４１）。ＭＹＸＶとｖＭｙｘは両方とも、本明細書に記載されている粘液腫ウイルスを指す。

【００３６】

ＭＹＸＶは、様々なヒトおよびマウスの癌、例えば、原発性癌と確立された細胞株の両

方を標的とすることができる新規の腫瘍溶解性ウイルスである（Ｓｔａｎｆｏｒｄ ＭＭ，ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ Ｇ．Ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ ａｎｄ ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ ｖｉｒｏｔｈｅｒａｐｙ：ａ ｎｅｗ ｂｉｏｌｏｇｉｃ ｗｅａｐｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｗａｒ ａｇａｉｎｓｔ ｃａｎｃｅｒ．Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．２００７；７（９）：１４１５－１１４２５；Ｗａｎｇ Ｇ，Ｂａｒｒｅｔｔ ＪＷ，Ｓｔａｎｆｏｒｄ Ｍ，Ｗｅｒｄｅｎ ＳＪ，Ｊｏｈｎｓｔｏｎ ＪＢ，Ｇａｏ Ｘ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃａｎｃｅｒ ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈ ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ ｒｅｑｕｉｒｅｓ Ａｋｔ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｖｉａ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ａ ｖｉｒａｌ ａｎｋｙｒｉｎ－ｒｅｐｅａｔ ｈｏｓｔ ｒａｎｇｅ ｆａｃｔｏｒ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００６；１０３（１２）：４６４０－５；Ｂａｒｔｅｅ Ｅ，Ｃｈａｎ ＷＭ，Ｍｏｒｅｂ ＪＳ，Ｃｏｇｌｅ ＣＲ，ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ Ｇ．Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｐｕｒｇｉｎｇ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｍｙｅｌｏｍａ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ａｕｔｏｌｏｇｏｕｓ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ｇｒａｆｔｓ ｕｓｉｎｇ ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ．Ｂｉｏｌ Ｂｌｏｏｄ Ｍａｒｒｏｗ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．２０１２；１８（１０）：１５４０－５１；Ｃｈａｎ ＷＭ，Ｒａｈｍａｎ ＭＭ，ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ Ｇ．Ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ：ｔｈｅ ｐａｔｈ ｔｏ ｃｌｉｎｉｃ．Ｖａｃｃｉｎｅ．２０１３；３１（３９）：４２５２－８；Ｋｉｍ Ｍ，Ｍａｄｌａｍｂａｙａｎ ＧＪ，Ｒａｈｍａｎ ＭＭ，Ｓｍａｌｌｗｏｏｄ ＳＥ，Ｍｅａｃｈａｍ ＡＭ，Ｈｏｓａｋａ Ｋ，ｅｔ ａｌ．Ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ ｔａｒｇｅｔｓ ｐｒｉｍａｒｙ ｈｕｍａｎ ｌｅｕｋｅｍｉｃ ｓｔｅｍ ａｎｄ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｃｅｌｌｓ ｗｈｉｌｅ ｓｐａｒｉｎｇ ｎｏｒｍａｌ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｔｉｃ ｓｔｅｍ ａｎｄ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｃｅｌｌｓ．Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２００９；３２：２３１３－７；Ｖｉｌｌａ ＮＹ，Ｗａｓｓｅｒｆａｌｌ ＣＨ，Ｍｅａｃｈａｍ ＡＭ，Ｗｉｓｅ Ｅ，Ｃｈａｎ Ｗ，Ｗｉｎｇａｒｄ ＪＲ，ｅｔ ａｌ．Ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｔ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ｙｅｔ ｐｅｒｍｉｔｓ ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ ｖｉｒｕｓ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｔｏ ｃａｎｃｅｒ ｃｅｌｌｓ．Ｂｌｏｏｄ．２０１５；１２５（２４）：３７７８－８８）

【００３７】

本来は、ＭＹＸＶはウサギ特異的であり、一般に、ヒト、マウス、または他の家畜において感染または疾患を引き起こさない。しかし、発癌に関連する癌経路の変異の性質により、マウスとヒトの両方の癌細胞は、ＭＹＸＶを含む一部のウイルスによる感染に抵抗する能力が低下する可能性がある（例えば、損なわれた先天性免疫経路）（Ｃｈａｎ ＷＭ，ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ Ｇ．Ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ Ｐｏｘｖｉｒｕｓｅｓ．Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｖｉｒｏｌ．２０１４；１（１）：１１９－４１，Ｓｙｐｕｌａ Ｊ，’Ｗａｎｇ Ｆ，Ｍａ Ｙ，Ｂｅｌｌ Ｊ，ａｎｄ ＭｃＦａｄｄｅｎ Ｇ．Ｍｙｘｏｍａ ｖｉｒｕｓ ｔｒｏｐｉｓｍ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｔｕｍｏｒｓ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ａｎｄ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２００４；８：１０３－１４）。

【００３８】

本明細書で提供されるのは、いくつかの実施形態において、改変粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）である。ＭＹＸＶは、複製コンピテントであるポックスウイルスのＬｅｐｏｒｉｐｏｘｖｉｒｕｓ種に属する任意のウイルスであり得る。ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶの野生型株である場合もあれば、ＭＹＸＶの遺伝子組み換え株である場合もある。いくつかの場合において、ＭＹＸＶはＬａｕｓａｎｎｅ株である。いくつかの場合において、ＭＹＸＶは南米のＭＹＸＶ株であり、Ｓｙｌｖｉｌａｇｕｓ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓにおいて循環する。いくつかの場合において、ＭＹＸＶはＳｙｌｖｉｌａｇｕｓ ｂａｃｈｍａｎｉにおいて循環するカリフォルニアのＭＹＸＶ株である。いくつかの場合において、ＭＹＸＶは、６９１８であり、遺伝子Ｍ００９Ｌ、Ｍ０３６Ｌ、Ｍ１３５Ｒ、およびＭ１４８Ｒ（

２０１９年８月２７日にＧｅｎＢａｎｋによって提供されたような、参照により本明細書に組み込まれるＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＥＵ５５２５３０）の改変を含む弱毒化スペイン野外株である。いくつかの場合において、ＭＹＸＶは６９１８ＶＰ６０－Ｔ２（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＥＵ５５２５３１、これは、２０１９年８月２７日にＧｅｎＢａｎｋによって提供された参照により本明細書に組み込まれる）である。いくつかの場合において、ＭＹＸＶはＳＧ３３であり、これは、遺伝子Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ００８．１Ｒ、Ｍ００８Ｒ、Ｍ００７Ｒ、Ｍ００６Ｒ、Ｍ００５Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、およびＭ００１Ｒに影響を与えるゲノム欠失を含む株である（Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ｎａｔｉｏｎａｌｅ ｄｅ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｄｅ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｓ（ＣＮＣＭ）アクセッション番号１－１５９４）。いくつかの場合において、ＭＹＸＶは標準実験室株（ＳＬＳ）と呼ばれる株である。

【００３９】

いくつかの場合において、ＭＹＸＶゲノムは、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｃａｍｅｒｏｎ，ｅｔ ａｌ．，「Ｔｈｅ ｃｏｍｐｌｅｔｅ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｍｙｘｏｍａ Ｖｉｒｕｓ，」Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ２６４：２９８－３１８（１９９９）に開示されている配列に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％を含む。、少なくとも９８％、または少なくとも９９％、例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を含む、９５％から９８％の間、９５％から９９％の間の核酸配列同一性を含む。いくつかの場合において、ＭＹＸＶは、Ｃａｍｅｒｏｎ，ｅｔ ａｌ．，「Ｔｈｅ ｃｏｍｐｌｅｔｅ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｍｙｘｏｍａ Ｖｉｒｕｓ，」Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ２６４：２９８－３１８（１９９９）に開示された配列を含む。

【００４０】

大きくて遺伝的に安定なポックスウイルスゲノムは、遺伝子操作、例えば、１つ以上の欠失および／または１つ以上の免疫調節導入遺伝子、例えば、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーの導入を伴うウイルスの生成を可能にする（Ｎａｙｅｒｏｓｓａｄａｔ Ｎ，Ｍａｅｄｅｈ Ｔ，ａｎｄ Ａｌｉ ＰＡ．Ｖｉｒａｌ ａｎｄ ｎｏｎｖｉｒａｌ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ａｄｖ Ｂｉｏｍｅｄ Ｒｅｓ．２０１２；１：２７）。

【００４１】

本明細書で提供されるのは、いくつかの実施形態において、粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）および改変されたＭＹＸＶである。ＭＹＸＶは、複製コンピテントであるポックスウイルスのＬｅｐｏｒｉｐｏｘｖｉｒｕｓ種に属する任意のウイルスであり得る。ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶの野生型株である場合もあれば、ＭＹＸＶの遺伝子組み換え株である場合もある。

【００４２】

粘液腫ウイルスゲノムは、本明細書に記載され、および／または当業者に知られており、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（（２００１） Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）に記載されている分子生物学技術を使用して、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、および／またはＭｉＴＥ）を発現するように改変することができる。当業者は、粘液腫ウイルスゲノムのどの部分を削除して、ウイルスが依然として生産的感染を可能にし、例えば、複製コンピテントウイルスを提供することができるかを決定することができる。例えば、削除できるウイルスゲノムの非必須領域は、公開されているウイルスゲノム配列を他のよく特徴付けられたウイルスのゲノムと比較することから推測できる（例えば、Ｃ．Ｃａｍｅｒｏｎ，Ｓ．Ｈｏｔａ－Ｍｉｔｃｈｅｌｌ，Ｌ．Ｃｈｅｎ，Ｊ．Ｂａｒｒｅｔｔ，Ｊ．－Ｘ．Ｃａｏ，Ｃ．Ｍａｃａｕｌａｙ，Ｄ．Ｗｉｌｌｅｒ，Ｄ．Ｅ

ｖａｎｓ，ａｎｄ　Ｇ．ＭｃＦａｄｄｅｎ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　（１９９９）　２６４：２９８－３１８）を参照のこと）。

【００４３】

いくつかの実施形態において、開示されるＭＹＸＶ組換え構築物は、多発性骨髄腫（ＭＭ）などの再発性／難治性の原発性ヒト血液悪性腫瘍を治療し、そして微小残存病変（ＭＲＤ）を標的とし、かつ低減または排除する腫瘍溶解性ウイルス候補である。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、１つ以上の導入遺伝子を含む。

【００４４】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＭＹＸＶゲノムにおける１つ以上の遺伝子改変、欠失、および／または破壊を含む。例えば、本開示のＭＹＸＶは、ゲノム内の１つ以上の遺伝子内、またはこれらの遺伝子に隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含むことができる。挿入、欠失または改変は、遺伝子ノックアウト（例えば、遺伝子によってコードされる産物の機能性をそれによって低下または排除する１つ以上のヌクレオチドの欠失、または遺伝子によってコードされる産物の発現および／または機能をそれによって破壊する１つ以上のヌクレオチドの挿入）を含み得る。いくつかの実施形態において、挿入、欠失、または改変は、遺伝子ノックアウトを含まない（例えば、配列は、２つの遺伝子の発現を破壊することなく、２つの遺伝子間の遺伝子間遺伝子座に挿入され得る）。改変は、例えば、本明細書に開示される遺伝子の一部を置き換える導入遺伝子であり得る。

【００４５】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、宿主動物において疾患を引き起こすウイルスの能力に関連する１つ以上の遺伝子内またはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、宿主細胞向性に関連する１つ以上の遺伝子内またはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、自然免疫応答を回避するウイルスの能力に関連する１つ以上の遺伝子内またはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、感染細胞における免疫シグナル伝達（例えば、サイトカイン受容体シグナル伝達）を調節する１つ以上の遺伝子内またはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、感染細胞における細胞死経路を調節する１つ以上の遺伝子（例えば、Ｍ０１１Ｌ遺伝子アクセッション番号ＧＱ３９８５３５などのアポトーシスを促進または阻害する産物をコードする遺伝子）内またはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、癌細胞におけるウイルス複製を調節する（例えば、癌細胞におけるウイルス複製の速度を増加または減少させる）１つ以上の遺伝子内またはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。

【００４６】

いくつかの実施形態において、宿主動物において疾患を引き起こすウイルスの能力に関連し、宿主細胞向性に関連し、自然免疫応答を回避するウイルスの能力に関連し、感染細胞における免疫シグナル伝達を調整でき、感染細胞における細胞死経路を調節することができる、癌細胞におけるウイルス複製を調節することができ、またはそれらの組み合わせである、１つ以上の遺伝子は、Ｍ００１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、Ｍ００５Ｒ、Ｍ００６Ｒ、Ｍ００７Ｒ、Ｍ００８．１Ｒ、Ｍ００８Ｒ、Ｍ００９Ｌ、Ｍ０１３、Ｍ０３６Ｌ、Ｍ０６３Ｌ、Ｍ０１１Ｌ、Ｍ１２８Ｌ、Ｍ１３１Ｒ、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ１４１Ｒ、Ｍ１４８Ｒ、Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、およびＳＯＤのいずれか１つ以上を含む。

【００４７】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＭＹＸＶ遺伝子の改変を含む。いくつかの場合において、改変は、ＭＹＸＶ遺伝子によってコードされるタンパク質の機能

を損なう欠失である。いくつかの場合において、改変は部分的な欠失である。例えば、部分的欠失は、ＭＹＸＶ遺伝子の少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の欠失であり得る。いくつかの実施形態において、部分的欠失は、ＭＹＸＶ遺伝子の最大で１０％、最大で２０％、最大で３０％、最大で４０％、最大で５０％、最大で６０％、最大で７０％、最大で８０％、最大で９０％、または最大で９５％の欠失であり得る。他の場合、改変は、ＭＹＸＶ遺伝子の完全な欠失である（例えば、コード領域全体の欠失、遺伝子全体の欠失など）。いくつかの実施形態において、改変は、ＭＹＸＶ遺伝子を本開示の１つ以上の導入遺伝子（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、および／またはＭｉＴＥなどの多重特異性免疫細胞エンゲージャー）で置き換えることである。

【００４８】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、宿主細胞向性（例えば、ウサギ細胞向性）に関連する１つ以上の遺伝子内またはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態において、ウサギ細胞向性に関連する１つ以上の遺伝子は、Ｍ１１Ｌ、Ｍ０６３、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの場合において、ウサギ細胞向性に関連する１つ以上の遺伝子は、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、またはそれらの組み合わせを含む。

【００４９】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、Ｍ１３５Ｒ遺伝子の改変を含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、Ｍ１３５Ｒ遺伝子の部分的欠失または完全な欠失を含む。Ｍ１３５Ｒ遺伝子の欠失または破壊は、例えば、ＭＹＸＶが抗癌効果を示す（例えば、癌細胞に感染し、これを殺傷する）能力を損なうことなく、本開示のＭＹＸＶが宿主動物に疾患を引き起こす能力を弱めることができる。

【００５０】

いくつかの場合において、改変は、Ｍ１３５Ｒ遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を損なう欠失である。いくつかの場合において、改変は部分的欠失である（例えば、Ｍ１３５Ｒ遺伝子の、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の欠失、最大１０％、最大２０％、最大３０％、最大４０％、最大５０％、最大６０％、最大７０％、最大８０％、最大９０％、最大９５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％の欠失）。他の場合、改変は、Ｍ１３５Ｒ遺伝子の完全な欠失である（例えば、Ｍ１３５遺伝子の全コード領域の欠失、Ｍ１３５遺伝子全体の欠失など）。いくつかの実施形態において、欠失は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも７、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも１００、少なくとも２００、または少なくとも３００の核酸の欠失である。いくつかの実施形態において、欠失は、プロモーター（例えば、野生型ＭＹＸＶにおけるＭ１３５Ｒの発現を駆動するプロモーター）を破壊する。いくつかの実施形態において、欠失は、終止コドン、例えば、完全長のＭ１３５Ｒ転写物および／またはタンパク質の発現を妨げる時期尚早の終止コドンをＭ１３５Ｒ遺伝子配列に導入する。

【００５１】

いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、Ｍ１３５Ｒ遺伝子の機能を損なうＭ１３５Ｒ遺伝子の改変（例えば、Ｍ１３５Ｒ遺伝子の発現および／または機能を破壊する配列の挿入）を含む。いくつかの実施形態において、挿入は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも７、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少

なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１０００、少なくとも１５００、または少なくとも２０００の核酸の挿入である。いくつかの実施形態において、挿入は、Ｍ１３５Ｒ遺伝子配列のリーディングフレームを変更し、それにより、Ｍ１３５Ｒ転写物および／またはタンパク質の発現を破壊する。

【００５２】

いくつかの場合において、変異は、置換、例えば、Ｍ１３５Ｒ遺伝子によってコードされるタンパク質の活性または発現レベルを弱める置換である。いくつかの実施形態において、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも７、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０の核酸が置換される。いくつかの実施形態において、置換は、終止コドン、例えば、完全長のＭ１３５Ｒ転写物および／またはタンパク質の発現を妨げる時期尚早の終止コドンをＭ１３５Ｒ遺伝子配列に導入する。いくつかの実施形態において、置換は、プロモーター（例えば、野生型ＭＹＸＶにおいてＭ１３５Ｒの発現を駆動するプロモーター）を破壊する。

【００５３】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される改変または変異は、Ｍ１３５Ｒ遺伝子および／またはタンパク質の活性レベルを、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１３５ＲをエンコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱める。

【００５４】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される改変または変異は、Ｍ１３５Ｒ遺伝子および／またはタンパク質の発現レベルを、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１３５ＲをコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱める。

【００５５】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＭＹＸＶは、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１３５ＲをコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱められたＭ１３５Ｒタンパク質の活性レベルを有する。

【００５６】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＭＹＸＶは、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１３５ＲをコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱められたＭ１３５Ｒ遺伝子および／またはタンパク質の発現レベルを有する。

【００５７】

いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子は、ＭＹＸＶゲノム内のＭ１３５Ｒ遺伝子を置換し、例えば、Ｍ１３５Ｒ遺伝子を破壊し、これを本開示の１つ以上の導入遺伝子（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、および／またはＭｉＴＥとして）で置き換える。いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子は、ＭＹＸＶゲノム内のＭ１３５Ｒ遺伝子の一部を置き換える。いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子は、ＭＹＸＶゲノム内のＭ１３５Ｒ遺伝子とＭ１３６Ｒ遺伝子との間に挿入される。いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子は、Ｍ１３５－１３６遺伝子座に挿入される。ＭＹＸＶ

の場合、本明細書で使用される１３６は、ＭＹＸＶのＭ１３６遺伝子座を指すことができる。いくつかの実施形態において、Ｍ１３６とは、ＭＹＸＶのＭ１３６Ｒを指す。

【００５８】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、Ｍ１５３遺伝子の改変を含む。Ｍ１５３遺伝子産物はＥ３－ユビキチンリガーゼであり、これは、多様な細胞受容体およびタンパク質のダウンレギュレーション、例えば、ヒト細胞におけるＭＨＣクラスＩおよびＣＤ４の分解に関与している可能性がある。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、弱められたＭ１５３タンパク質の活性および／または発現レベルを有する。いくつかの実施形態において、Ｍ１５３タンパク質の弱められた活性および／または発現レベルは、免疫エピトープの提示、例えば、ウイルスおよび／または癌免疫ペプチドのＭＨＣ依存性提示を増強することができる。感染した癌細胞による免疫エピトープの提示の増強は、抗癌ＣＤ８＋Ｔ細胞応答などの抗癌Ｔ細胞応答を含むより強い免疫応答を誘発し得る。いくつかの実施形態において、Ｍ１５３タンパク質の弱められた活性および／または発現レベルは、ＭＨＣ－１によるＭ１５３ＫＯウイルス感染腫瘍細胞からの直接抗原提示を増加させ、ＭＹＸＶによって媒介される免疫活性化を増強する。

【００５９】

いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、Ｍ１５３遺伝子の部分的欠失または完全な欠失を含む。いくつかの場合において、改変は、Ｍ１５３遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を損なう欠失である。いくつかの場合において、改変は部分的欠失である（例えば、Ｍ１５３遺伝子の少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の欠失、最大１０％、最大２０％、最大３０％、最大４０％、最大５０％、最大６０％、最大７０％、最大８０％、最大９０％、最大９５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％の欠失）。いくつかの実施形態において、欠失は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも７、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも１００、少なくとも２００、または少なくとも３００の核酸の欠失である。いくつかの実施形態において、欠失は、プロモーター（例えば、野生型ＭＹＸＶにおいてＭ１５３の発現を駆動するプロモーター）を破壊する。いくつかの実施形態において、欠失は、終止コドン、例えば、完全長のＭ１５３転写物および／またはタンパク質の発現を妨げる時期尚早の終止コドンをＭ１５３遺伝子配列に導入する。

【００６０】

他の場合において、改変は、Ｍ１５３遺伝子の完全な欠失である（例えば、Ｍ１５３遺伝子の全コード領域の欠失、Ｍ１５３遺伝子全体の欠失など）。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、Ｍ１５３遺伝子の機能を損なうＭ１５３遺伝子の改変（例えば、Ｍ１５３遺伝子の発現および／または機能を破壊する配列の挿入）を含む。いくつかの実施形態において、挿入は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも７、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１０００、少なくとも１５００、または少なくとも２０００の核酸の挿入である。いくつかの実施形態において、挿入は、Ｍ１５３遺伝子配列のリーディングフレームを変更し、それにより、Ｍ１５３転写物および／またはタンパク質の発現を破壊する。

【００６１】

いくつかの場合において、変異は、置換、例えば、Ｍ１５３遺伝子によってコードされるタンパク質の活性または発現レベルを弱める置換である。いくつかの実施形態において、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくと

も７、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０の核酸が置換される。いくつかの実施形態において、置換は、終止コドン、例えば、完全長のＭ１５３転写物および／またはタンパク質の発現を妨げる時期尚早の終止コドンをＭ１５３遺伝子配列に導入する。いくつかの実施形態において、置換は、プロモーター（例えば、野生型ＭＹＸＶにおいてＭ１５３の発現を駆動するプロモーター）を破壊する。

【００６２】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される改変または変異は、Ｍ１５３遺伝子および／またはタンパク質の活性レベルを、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１５３をコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱める。

【００６３】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される改変または変異は、Ｍ１５３遺伝子および／またはタンパク質の発現レベルを、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１５３をコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱める。

【００６４】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＭＹＸＶは、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１５３をコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱められたＭ１５３タンパク質の活性レベルを有する。

【００６５】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＭＹＸＶは、野生型ＭＹＸＶ、または機能的な野生型Ｍ１５３をコードするＭＹＸＶと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％弱められたＭ１５３遺伝子および／またはタンパク質の発現レベルを有する。

【００６６】

いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子は、ＭＹＸＶゲノム内のＭ１５３遺伝子を置換し、例えば、Ｍ１５３遺伝子を破壊し、またはそれをＢｉＫＥ、ＭｉＴＥ、および／またはＢｉＴＥなどの１つ以上の本開示の特異的免疫細胞エンゲージャーで置き換える。いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子は、ＭＹＸＶゲノム内のＭ１５３遺伝子の一部を置き換える（例えば、Ｍ１５３遺伝子の一部をＢｉＫＥ、ＭｉＴＥ、および／またはＢｉＴＥで置き換える）。

【００６７】

導入遺伝子

本明細書で提供されるのは、いくつかの実施形態において、導入遺伝子を含む粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）組換え構築物である。癌と腫瘍の微小環境の状況では、さまざまな免疫調節因子が癌細胞と免疫系の間の相互作用に影響を与える可能性がある。１つ以上の免疫調節導入遺伝子をＭＹＸＶゲノムに導入して、例えば、癌をより効果的に治療または低減する免疫応答を促進することができる。いくつかの実施形態において、１つ以上のＭＹＸＶ内因性遺伝子が除去され、１つ以上の免疫調節導入遺伝子がウイルスゲノムに導入される。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、および／またはＭｉＴＥなどの多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする。

【００６８】
多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、少なくとも１つの抗原またはエピトープに特異的に結合する能力を含むことができる。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の標的抗原またはエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、またはそれより多くの標的抗原またはエピトープに結合することができる。
【００６９】
いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥなどの膜内在性免疫細胞エンゲージャーは、１つの標的抗原またはエピトープに結合する。例えば、本開示の膜内在性免疫細胞エンゲージャーは、本開示のＭＹＸＶによる感染を受けやすい癌細胞の表面上に発現させることができ、膜内在性免疫細胞エンゲージャーは、Ｔ細胞、好中球、またはＮＫ細胞などの免疫細胞に結合することができる。
【００７０】
いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、癌細胞（例えば、本明細書に開示されるような血液癌の細胞）によって発現される抗原またはエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、癌細胞の表面に発現される抗原またはエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態において、抗原またはエピトープは、野生型抗原またはエピトープである（例えば、変異していない）。いくつかの実施形態において、抗原またはエピトープは、野生型抗原またはエピトープではない（例えば、癌性変異の間に生じるネオエピトープ）。いくつかの実施形態において、抗原またはエピトープは癌遺伝子である。いくつかの実施形態において、抗原またはエピトープは、変異した腫瘍抑制遺伝子である。本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーによって結合され得る癌細胞によって発現される抗原またはエピトープの非限定的な例には、ＣＤ１３８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ７０、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＥｐＣＡＭ、Ｈｅｒ２、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、ＥＧＦＲ、ＣＥＡ、ＣＤ３３、およびＭＣＳＰが含まれる。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、ＣＤ１３８に結合する。
【００７１】
いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞によって発現される抗原またはエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞の表面に発現される抗原またはエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態において、免疫細胞によって発現される抗原またはエピトープに結合する本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞におけるシグナル伝達経路の活性化を促進することができる。いくつかの実施形態において、免疫細胞によって発現される抗原またはエピトープに結合する本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞の活性化を促進することができる。いくつかの実施形態において、免疫細胞によって発現される抗原またはエピトープに結合する本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞による細胞溶解性殺傷（例えば、癌細胞の殺傷）を促進することができる。いくつかの実施形態において、免疫細胞によって発現される抗原またはエピトープに結合する本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞による炎症誘発性サイトカインの産生を促進することができる。いくつかの実施形態において、免疫細胞によって発現される抗原またはエピトープに結合する本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、ＣＤ３を介したシグナル伝達を促進することができる。
【００７２】
本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーによって結合され得る免疫細胞サブセットの非限定的な例には、リンパ球、Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、アルファ－ベータＴ細胞、ガンマ－デルタＴ細胞、Ｔ調節細胞（Ｔｒｅｇ）、細胞毒性Ｔリンパ球、

Ｔｈ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ９細胞、ナイーブＴ細胞、メモリーＴ細胞、エフェクターＴ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞（ＴＥＭ）、セントラルメモリーＴ細胞（ＴＣＭ）、レジデントメモリーＴ細胞（ＴＲＭ）、濾胞ヘルパーＴ細胞（ＴＦＨ）、ナイーブＴ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ）、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）、先天性リンパ球（ＩＬＣ）、ＩＬＣ１細胞、ＩＬＣ２細胞、ＩＬＣ３細胞、リンパ組織インデューサー（ＬＴｉ）細胞、Ｂ細胞、Ｂ１細胞、Ｂ１ａ細胞、Ｂ１ｂ細胞、Ｂ２細胞、血漿細胞、Ｂ調節細胞、メモリーＢ細胞、辺縁帯Ｂ細胞、濾胞性Ｂ細胞、胚中心Ｂ細胞、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、単球、マクロファージ、Ｍ１マクロファージ、Ｍ２マクロファージ、組織関連マクロファージｓ、樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、好中球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、およびそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、Ｔ細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、ＮＫ細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、好中球に結合する。

【００７３】

本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーによって結合され得る免疫細胞によって発現される抗原の非限定的な例には、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ８、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１３、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ２５、 ＣＤ３２、ＣＤ３３、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ４０、ＣＤ５６、ＣＤ６９、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６、ＣＤ９４、ＣＤ１２２、ＣＤ１２７、ＣＤ１３４、ＭＨＣ－ＩＩ、ＣＤ１９５、ＣＤ２８２、ＣＤ２８４、ＣＤ３１４、ＣＤ３３６、ＣＤ３３７、ＫＬＲＧ１、およびＴＩＧＩＴが含まれる。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、ＣＤ３に結合する。いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、ＣＤ１６に結合する。

【００７４】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＢｉＫＥ（二重特異的ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー）導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ導入遺伝子は、１つ以上の抗体（例えば、１つ以上の重鎖可変ドメイン、１つ以上の軽鎖可変ドメイン、１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）、またはそれらの組み合わせ）に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ導入遺伝子は、１つ以上の哺乳動物抗体に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ導入遺伝子は、１つ以上のマウス抗体に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ導入遺伝子は、完全ヒト抗体などの１つ以上のヒト化抗体（ｈｕＢｉＫＥ）に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ導入遺伝子は、分泌される産物をコードする。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ導入遺伝子は、細胞表面に局在する（例えば、膜貫通ドメインを含む）生成物をコードする。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ遺伝子は、表１に提供されるように、配列番号６－２１のいずれか１つ以上からの配列を含むかまたはコードする。配列番号６－７は、ＣＤ１３８に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号８－９は、ＣＤ１６に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号１０－１５は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ１３８に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。配列番号１６－２１は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ１６に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。

【００７５】

いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥは、配列番号６－２１のいずれか１つに対して、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、配列番号６－２１のいずれか１つであるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるＢｉＫＥをコードする。

【００７６】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＢｉＴＥ（二重特異的Ｔ細胞エンゲージャー）導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥ導入遺伝子は、１つ以上の抗体（例えば、１つ以上の重鎖可変ドメイン、１つ以上の軽鎖可変ドメイン、１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）、またはそれらの組み合わせ）に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥ導入遺伝子は、１つ以上の哺乳動物抗体に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥ導入遺伝子は、１つ以上のマウス抗体に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥ導入遺伝子は、完全ヒト抗体などの１つ以上のヒト化抗体（ｈｕＢｉＴＥ）に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥ導入遺伝子は、分泌される産物をコードする。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥ導入遺伝子は、細胞表面に局在する（例えば、膜貫通ドメインを含む）生成物をコードする。

【００７７】
いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥ遺伝子は、表１に提供されるように、配列番号６、７、１０－１５、３２、３３、または３４－６３のうちの任意の１つ以上からの配列を含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＴＥは、配列番号６、７、１０－１５、３２、３３、または３４－６３のいずれか１つに対して、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、配列番号６、７、１０－１５、３２、３３、または３４－６３のいずれか１つであるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるＢｉＴＥをコードする。

【００７８】
配列番号６－７は、ＣＤ１３８に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号１０－１５は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ１３８に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。配列番号３２－３３は、ＣＤ３に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号３４－３９は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ３に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。配列番号４０－４５は、ＣＤ８０に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号４６－６３は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ８０に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。

【００７９】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＭｉＴＥ（膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー）導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥ導入遺伝子は、細胞表面に局在する（例えば、膜貫通ドメインを含む）生成物をコードする。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥ導入遺伝子は、１つ以上の抗体（例えば、１つ以上の重鎖可変ドメイン、１つ以上の軽鎖可変ドメイン、１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）、またはそれらの組み合わせ）に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥ導入遺伝子は、１つ以上の哺乳動物抗体に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥ導入遺伝子は、１つ以上のマウス抗体に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥ導入遺伝子は、１つ以上のヒト化抗体（ｈｕＭｉＴＥ）、例えば、完全ヒト抗体に由来する配列を含む。

【００８０】
いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥ遺伝子は、表１に提供されるように、配列番号６、７、１０－１５、３２、３３、または３４－６３のうちの任意の１つ以上からの配列を含む。いくつかの実施形態において、ＭｉＴＥは、配列番号６、７、１０－１５、３２、３３、または３４－６３のいずれか１つに対して、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、配列番号６、７、１０－１５、３２、３３、または３４－６３のいずれか１つであるアミノ酸

配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるＭｉＴＥをコードする。

【００８１】

配列番号６－７は、ＣＤ１３８に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号１０－１５は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ１３８に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。配列番号３２－３３は、ＣＤ３に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号３４－３９は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ３に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。配列番号４０－４５は、ＣＤ８０に特異的な抗体からの可変領域の配列を提供する。配列番号４６－６３は、Ｋａｂａｔの方法によって同定された、ＣＤ８０に特異的な抗体からのＣＤＲの配列を提供する。

【００８２】

【表１】

表 1

配列番号	説明	配列
6	抗 CD138 VH	SQVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWVKQRP GHGLEWIGEILPGTGRTIYNEKFKGKATFTADISSNTVQMQLSS LTSEDSAVYYCARRDYYGNFYYAMDYWGQGTSVTVSS
7	抗 CD138 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQGINNYLNWYQQKPDGTV ELLIYYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIGTYYCQQ YSKLPRTFGGGTKLEIK
8	抗 CD16 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLRTSGMGVGWIRQPSGK GLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVD TADTATYYCAQINPAWFAYWGQGTLVTVSA
9	抗 CD16 VL	DTVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSFMNWYQQK PGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTAT YYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK
32	抗 CD3 VH	MQVQLLESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCAGYYDDHYCLDYWGQGTLVTVSS
33	抗 CD3 VL	DIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSP KRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYY CQQWSSNPFTFGSGTKLEIKR
40	抗 CD80 VH-A	QVKLQQWGEGLLQPSETLSRTCVVSGGSISGYYYWTWIRQTPG RGLEWIGHIYGNGATTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQFFLNLNSV TDADTAVYYCARGPRPDCTTICYGGWVDVWGPGDLVTVSS

（表１の続き）

41	抗CD80 VL-A	AYELTQPPSVSVSPGQTARITCGGDNSRNEYVHWYQQKPARAP ILVIYDDSDRPSGIPERFSGSKSGNTATLTINGVEAGDEADYYCQ VWDRASDHPVFGGGTRVTVL
42	抗CD80 VH-B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAVSGFTFSDHYMYWFRQAPG KGPEWVGFIRNKPNGGTTEYAASVKDRFTISRDDSKSIAYLQMS SLKIEDTAVYYCTTSYISHCRGGVCYGGYFEFWGQGALVTVSS
43	抗CD80 VL-B	EVVMTQSPLSLPITPGEPASISCRSSQSLKHSNGDTFLSWYQQKP GQPPRLLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISAVEAEDVG VYFCGQGTRTPPTFGGGTKVEIK
44	抗CD80 VH-C	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGGSISGGYGWGWIRQPPG KGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQVTISTDTSKNQFSLKLNSM TAADTAVYYCVRDRLFSVVGMVYNNWFDVWGPGVLVTVSS
45	抗CD80 VL-C	ESVLTQPPSVSGAPGQKVTISCTGSTSNIGGYDLHWYQQLPGTA PKLLIYDINKRPSGISDRFSGSKSGTAASLAITGLQTEDEADYYC QSYDSSLNAQVFGGGTRLTVL
10	抗CD138 HCDR1	NYWIE
11	抗CD138 HCDR2	EILPGTGRTIYNEKFKG
12	抗CD138 HCDR3	RDYYGNFYYAMDY
13	抗CD138 LCDR1	SASQGINNYLN
14	抗CD138 LCDR2	YTSTLQS
15	抗CD138 LCDR3	QQYSKLPRT
16	抗CD16 HCDR1	TSGMGVG
17	抗CD16 HCDR2	HIWWDDDKRYNPALKS
18	抗CD16 HCDR3	INPAWFAY
19	抗CD16 LCDR1	KASQSVDFDGDSFMN
20	抗CD16 LCDR2	TTSNLES
21	抗CD16 LCDR3	QQSNEDPYT
34	抗CD3 HCDR1	RYTMH
35	抗CD3 HCDR2	YINPSRGYTNYNQKFKD
36	抗CD3 HCDR3	YYDDHYCLDY
37	抗CD3 LCDR1	SASSSVSYMN
38	抗CD3 LCDR2	DTSKLAS
39	抗CD3 LCDR3	QQWSSNPFT

（表１の続き）

46	抗CD80 HCDR1-A	GYYYWT
47	抗CD80 HCDR2-A	HIYGNGATTNYNPSLKS
48	抗CD80 HCDR3-A	GPRPDCTTICYGGWVDVWGPGDLVTVSS
49	抗CD80 LCDR1-A	GGDNSRNEYVH
50	抗CD80 LCDR2-A	DDSDRPS
51	抗CD80 LCDR3-A	QVWDRASDHPV
52	抗CD80 HCDR1-B	DHYMY
53	抗CD80 HCDR2-B	FIRNKPNGGTTEYAASVKD
54	抗CD80 HCDR3-B	SYISHCRGGVCYGGYFEF
55	抗CD80 LCDR1-B	RSSQSLKHSNGDTFLS
56	抗CD80 LCDR2-B	KVSNRDS
57	抗CD80 LCDR3-B	GQGTRTPPT
58	抗CD80 HCDR1-C	GGYGWG
59	抗CD80 HCDR2-C	SFYSSSGNTYYNPSLKS
60	抗CD80 HCDR3-C	DRLFSVVGMVYNNWFDV
61	抗CD80 LCDR1-C	TGSTSNIGGYDLH
62	抗CD80 LCDR2-C	DINKRPS
63	抗CD80 LCDR3-C	QSYDSSLNAQV

【００８３】

重鎖可変ドメイン配列、軽鎖可変ドメイン配列、またはＣＤＲ配列を含む、抗体またはその抗原結合フラグメントの配列は、本明細書に（例えば、表１に）開示されるアミノ酸または核酸配列に対して、少なくとも７０％の相同性、少なくとも７１％の相同性、少なくとも７２％の相同性、少なくとも７３％の相同性、少なくとも７４％の相同性、少なくとも７５％の相同性、少なくとも７６％の相同性、少なくとも７７％の相同性、少なくとも７８％の相同性、少なくとも７９％の相同性、少なくとも８０％の相同性、少なくとも８１％の相同性、少なくとも８２％の相同性、少なくとも８３％の相同性、少なくとも８４％の相同性、少なくとも８５％の相同性、少なくとも８６％の相同性、少なくとも８７％の相同性、少なくとも８８％の相同性、少なくとも８９％の相同性、少なくとも９０％の相同性、少なくとも９１％の相同性、少なくとも９２％の相同性、少なくとも９３％の相同性、少なくとも９４％の相同性、少なくとも９５％の相同性、少なくとも９６％の相同性、少なくとも９７％相同性、少なくとも９８％の相同性、少なくとも９９％の相同性

、少なくとも９９．１％の相同性、少なくとも９９．２％の相同性、少なくとも９９．３％の相同性、少なくとも９９．４％の相同性、少なくとも９９．５％の相同性、少なくとも９９．６％の相同性、少なくとも９９．７％の相同性、少なくとも９９．８％の相同性、少なくとも９９．９％の相同性、少なくとも９９．９１％の相同性、少なくとも９９．９２％の相同性、少なくとも９９．９３％の相同性、少なくとも９９．９４％の相同性、少なくとも９９．９５％の相同性、少なくとも９９．９６％の相同性、少なくとも９９．９７％の相同性、少なくとも９９．９８％の相同性、または少なくとも９９．９９％の相同性を有することができる。

【００８４】

二重特異性ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー（ＢｉＫＥ、例えば、ＣＤ１３８－ＣＤ１６　ＢｉＫＥ）は、ＭＹＸＶゲノムに導入することができる免疫調節導入遺伝子の例である。ＢｉＫＥ（ＣＤ１３８－ＣＤ１６）は、例えば、ＮＫ細胞と好中球の表面にＣＤ１６を結合すること、および多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞の表面にＣＤ１３８を結合することによって、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞と好中球に腫瘍標的を攻撃するように指示することができる。これは、ＮＫ／好中球の活性化、標的癌細胞のアポトーシスの誘導、ならびに悪性標的に応答したサイトカインおよびケモカインの産生をもたらし得る（Ｇｌｅａｓｏｎ　ＭＫ，Ｖｅｒｎｅｒｉｓ　ＭＲ，Ｔｏｄｈｕｎｔｅｒ　ＤＡ，Ｚｈａｎｇ　Ｂ，ＭｃＣｕｌｌａｒ　Ｖ，Ｚｈｏｕ　ＳＸ，ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｄ　ｔｒｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｋｉｌｌｅｒ　ｃｅｌｌ　ｅｎｇａｇｅｒｓ　ｄｉｒｅｃｔｌｙ　ａｃｔｉｖａｔｅ　ｈｕｍａｎ　ＮＫ　ｃｅｌｌｓ　ｔｈｒｏｕｇｈ　ＣＤ１６　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　ａｎｄ　ｉｎｄｕｃｅ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　ａｎｄ　ｃｙｔｏｋｉｎｅ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ．Ｍｏｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ　２０１２；１１（１２）：２６７４－８４）。

【００８５】

二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ、例えば、ＣＤ１３８－ＣＤ３　ＢｉＴＥ）は、ＭＹＸＶゲノムに導入できる免疫調節導入遺伝子の例である。ＢｉＴＥ（ＣＤ１３８－ＣＤ３）は、例えば、Ｔ細胞の表面にＣＤ３を結合すること、およびＭＭ細胞の表面にＣＤ１３８を結合することによって、Ｔ細胞に腫瘍標的を攻撃するように指示することができる。これは、Ｔ細胞の活性化、標的癌細胞のアポトーシスまたは溶解の誘導、ならびに悪性標的に応答したサイトカインおよびケモカインの産生をもたらし得る。

【００８６】

膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー（ＭｉＴＥ、例えば、抗ＣＤ３　ＭｉＴＥ）は、ＭＹＸＶゲノムに導入することができる免疫調節導入遺伝子の例である。ＭｉＴＥは、例えば、本開示のＭＹＸＶに感受性である癌細胞上でのＭｉＴＥの選択的発現、およびＴ細胞の表面でＣＤ３を結合することによって、Ｔ細胞に腫瘍標的を攻撃するように指示することができる。これは、Ｔ細胞の活性化、標的癌細胞のアポトーシスまたは溶解の誘導、ならびに悪性標的に応答したサイトカインおよびケモカインの産生をもたらし得る。ＭｉＴＥは膜貫通配列を含むことができる。ＭｉＴＥは、本開示の時点で知られている膜貫通配列を含むことができる。膜貫通配列の例には、表２に提供されるものが含まれるが、これらに限定されない。

【００８７】

【表２】

膜貫通配列の例

配列番号	説明	配列
64	CD8ヒンジおよび膜貫通ドメイン	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
65	4-1BBヒンジおよび膜貫通ドメイン	PSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV
66	4-1BBヒンジおよび膜貫通ドメイン	PSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV

【００８８】

本明細書に開示されるのは、いくつかの実施形態において、ＭＭを含む血液癌を標的とするために１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーで武装する組換えＭＹＸＶ構築物である。本開示において、導入遺伝子ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥを発現するＭＹＸＶは、例えば、標準的な治療法に耐性のある難治性疾患を有する患者からの癌細胞を含む癌細胞に選択的に感染および殺傷する。さらに、これらのウイルス構築物は、免疫細胞による癌細胞の殺傷を促進することにより、ＭＭ細胞の生存率を損なう可能性があることが実証されている。特に、２種類のＭＭ細胞の殺傷が観察され、これらは、ウイルスに感染したＭＭ細胞の直接的な細胞毒性殺傷と、感染していないＭＭ細胞の「オフターゲット」殺傷である。理論に拘束されることを望まないが、感染していないＭＭ細胞の殺傷は、患者サンプルに存在するＭＹＸＶ活性化免疫細胞によって、および／または免疫細胞（例えば、ＢｉＴＥおよびＭｉＴＥの場合はＴ細胞、ＢｉＫＥの場合は好中球およびナチュラルキラー細胞）に癌細胞を攻撃するよう指示することによって媒介される可能性がある。

【００８９】

本開示の配列は、本明細書に開示されるアミノ酸配列または核酸配列に対して、少なくとも７０％の相同性、少なくとも７１％の相同性、少なくとも７２％の相同性、少なくとも７３％の相同性、少なくとも７４％の相同性、少なくとも７５％の相同性、少なくとも７６％の相同性、少なくとも７７％の相同性、少なくとも７８％の相同性、少なくとも７９％の相同性、少なくとも８０％の相同性、少なくとも８１％の相同性、少なくとも８２％の相同性、少なくとも８３％の相同性、少なくとも８４％の相同性、少なくとも８５％の相同性、少なくとも８６％の相同性、少なくとも８７％の相同性、少なくとも８８％の相同性、少なくとも８９％の相同性、少なくとも９０％の相同性、少なくとも９１％の相同性、少なくとも９２％の相同性、少なくとも９３％の相同性、少なくとも９４％の相同性、少なくとも９５％の相同性、少なくとも９６％の相同性、少なくとも９７％の相同性、少なくとも９８％の相同性、少なくとも９９％の相同性、少なくとも９９．１％の相同性、少なくとも９９．２％相同性、少なくとも９９．３％の相同性、少なくとも９９．４％の相同性、少なくとも９９．５％の相同性、少なくとも９９．６％の相同性、少なくとも９９．７％の相同性、少なくとも９９．８％の相同性、少なくとも９９．９％の相同性、少なくとも９９．９１％の相同性、少なくとも９９．９２％の相同性、少なくとも９９．９３％の相同性、少なくとも９９．９４％の相同性、少なくとも９９．９５％の相同性、少なくとも９９．９６％の相同性、少なくとも９９．９７％の相同性、少なくとも９９．９８％の相同性、または少なくとも９９．９９％の相同性を有することができる。

【００９０】

本開示の導入遺伝子（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥ導入遺伝子）は、抗原結合タンパク質、例えば、抗体からの１つ以上の可変領域または相補性決定領域（ＣＤＲ）をコードすることができる。いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子（

例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥ）は、１つ以上の抗体に由来する１つ以上の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む。ｓｃＦｖ（単鎖可変フラグメント）は、ペプチドリンカーによって接続された抗体のＶＨドメインとＶＬドメインを含むことができる融合タンパク質である。例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥ導入遺伝子は、２つの標的の結合を可能にする２つのｓｃＦｖを含むことができる。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥは、３、４、５、またはそれ以上のｓｃＦｖを含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥは、１つのｓｃＦｖを含む。

【００９１】

いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥまたはＭｉＴＥは、抗原結合タンパク質の１つのコピーを含む。いくつかの実施形態において、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥまたはＭｉＴＥは、抗原結合タンパク質の２、３、４、５、またはそれ以上のコピーを含む。

【００９２】

抗原結合タンパク質は、抗体可変領域またはＣＤＲに基づいて操作することができる。抗体の可変（Ｖ）領域は、抗原結合を仲介し、抗原に対する特定の抗体の特異性を規定する。可変領域は、フレームワーク領域と呼ばれる比較的不変の配列、および異なる結合特異性の抗体間で配列がかなり異なる超可変領域を含む。超可変領域内には、主に抗体の結合特異性を決定するアミノ酸残基がある。これらの残基を含む配列は、相補性決定領域（ＣＤＲ）として知られている。抗体の１つの抗原結合部位は６つのＣＤＲを含み、３つは軽鎖の超可変領域にあり、３つは重鎖の超可変領域にある。軽鎖のＣＤＲはＬ１、Ｌ２、およびＬ３と呼ばれ、重鎖のＣＤＲはＨ１、Ｈ２、およびＨ３と呼ばれる。ＣＤＲは、それぞれＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３と指定することもできる。抗原結合に対する各ＣＤＲの寄与は、抗体によって異なる。ＣＤＲの長さはさまざまであり得る。例えば、ＣＤＲの長さはしばしば５－１４残基であるが、０残基まで短く、または２５残基以上まで長いＣＤＲが存在する。ＣＤＲ配列を予測または指定するために、いくつかの方法、例えば、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＩＭＧＴ、ｐａｒａｔｏｍｅ、Ｍａｒｔｉｎ、およびＡＨｏの方法を使用できる。これらのＣＤＲ予測方法では、例えば、配列の挿入と欠失の番号が異なるため、異なる番号付けシステムを使用できる。

【００９３】

抗原結合タンパク質は、抗体の一部またはその抗原結合フラグメント、例えば、インタクトな抗体の抗原結合または可変領域を含むことができる。抗体フラグメントの非限定的な例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂコンジュゲートの二量体および三量体、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディ、ならびに線状抗体が含まれる。ＦａｂおよびＦａｂ’は、ジスルフィド結合を介して軽鎖のＶＬおよびＣＬドメインに連結されたした重鎖のＶＨおよびＣＨドメインを含むことができる抗原結合フラグメントである。Ｆ（ａｂ’）２は、ジスルフィド結合によって結合された２つのＦａｂまたはＦａｂ’を含むことができる。Ｆｖは、非共有結合性相互作用によって一緒に保持されたＶＨドメインとＶＬドメインを含む。ｓｃＦｖ（単鎖可変フラグメント）は、ペプチドリンカーによって接続されたＶＨドメインとＶＬドメインを含むことができる融合タンパク質である。ＶＨドメインおよびＶＬドメインの配向と、リンカーの長さの操作を使用して、単量体、二量体（ダイアボディ）、三量体（トリアボディ）、または四量体（テトラボディ）であり得る、さまざまな形態の分子を作成できる。抗原結合タンパク質は、非抗体ベースのタンパク質、またはその抗原結合フラグメント、例えば、ＤＡＲＰｉｎを含むことができる。

【００９４】

いくつかの実施形態において、本開示の導入遺伝子は、リンカー配列（例えば、導入遺伝子によってコードされるタンパク質の異なるドメイン間のリンカー配列）をコードすることができる。いくつかの実施形態において、リンカーは、抗体可変領域を結合して、ｓｃＦｖを形成するために使用される。いくつかの実施形態において、リンカーは、２つの

ｓｃＦｖを結合して、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥを形成するために使用される。リンカー配列は、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０アミノ酸残基の長さであり得る。いくつかの実施形態において、リンカーは、少なくとも１、少なくとも３、少なくとも５、少なくとも７、少なくとも９、少なくとも１１、または少なくとも１５アミノ酸の長さである。いくつかの実施形態において、リンカーは、最大で５、最大で７、最大で９、最大で１１、最大で１５、最大で２０、最大で２５、または最大で５０アミノ酸の長さである。

【００９５】

柔軟なリンカーは、グリシンおよびセリン残基のストレッチを含む配列を有することができる。グリシンおよびセリン残基のサイズが小さいことは、柔軟性を提供し、接続された機能ドメインの移動を可能にする。セリンまたはスレオニンの取り込みは、水分子と水素結合を形成することによって水溶液中のリンカーの安定性を維持し、それによってリンカーとタンパク質部分の間の好ましくない相互作用を減らすことができる。柔軟なリンカーにはまた、柔軟性を維持するためのスレオニンやアラニンなどの追加のアミノ酸や、溶解性を向上させるためのリジンやグルタミンなどの極性アミノ酸を含めることもできる。リジッドなリンカーは、例えば、アルファヘリックス構造を有することができる。アルファヘリックスリジッドリンカーは、タンパク質ドメイン間のスペーサーとして機能し得る。リンカーは、表３の配列のいずれか、またはその反復（例えば、配列番号２２－３１のいずれかの２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の反復）を含むことができる。配列番号２２－２７は柔軟なリンカーを提供する。配列番号２８－３１はリジッドなリンカーを提供する。

【００９６】

【表３】

表 3

配列番号	配列
22	GGGGS
23	GGGS
24	GG
25	KESGSVSSEQLAQFRSLD
26	EGKSSGSGSESKST
27	GSAGSAAGSGEF
28	EAAAK
29	EAAAR
30	PAPAP
31	AEAAAKEAAAKA

【００９７】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、１つの多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、２つの多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、３つの多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、４つの多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、５つの多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする。

【００９８】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、１つ以上の追加の導入遺伝子（例えば、多重特異性免疫細胞エンゲージャーではない１つ以上の導入遺伝子）を含むことができる。

【００９９】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、１つ以上のレポーター導入遺伝子（例えば、１つ以上のＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、およびＢｉＴＥに加えて１つ以上のレポーター導入遺伝子）を含むことができる。レポーター導入遺伝子（またはレポーター遺伝子）を使用して、ＭＹＸＶをインビトロ、エキソビボ、またはインビボでモニターまたは定量化できる。いくつかの実施形態において、レポーター導入遺伝子は、本開示のＭＹＸＶによって感染された細胞を同定するために使用され得る。例えば、本開示のＭＹＸＶは、蛍光導入遺伝子を発現することができ、感染細胞は、蛍光（例えば、蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリー）を介して同定することができる。いくつかの実施形態において、レポーター導入遺伝子は、本開示のＭＹＸＶによって感染された細胞を定量するために使用され得る。例えば、本開示のＭＹＸＶは、蛍光導入遺伝子を発現することができ、感染細胞は、蛍光を介して定量することができる（例えば、蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリーを介する感染細胞の数または割合の定量）。いくつかの実施形態において、レポーター導入遺伝子は、本開示のＭＹＸＶによって感染された細胞におけるウイルス複製またはウイルス量を定量するために使用され得る。例えば、本開示のＭＹＸＶは、蛍光導入遺伝子を発現することができ、感染細胞は、蛍光を介して定量することができる（例えば、蛍光顕微鏡のフローサイトメトリーを介する細胞の平均蛍光強度の定量）。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、インビボでのウイルス負荷またはウイルス複製を定量するために使用され得るレポーター遺伝子を発現することができる（例えば、インビボイメージングシステム（ＩＶＩＳ）を使用するイメージング）。

【０１００】

本開示のレポーター導入遺伝子は、構成的に発現させることができる（例えば、構成的プロモーターの制御下で）。本開示のレポーター導入遺伝子は、条件付きで発現させることができる（例えば、条件付きプロモーター、例えば、複製サイクルの特定の段階でのみ活性であるか、またはより活性であるプロモーターの制御下で発現される）。

【０１０１】

レポーター導入遺伝子の非限定的な例には、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＴｄＴｏｍａｔｏ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、Ｖｅｒｄｅ蛍光タンパク質（ＶＦＰ）、ｋｉｎｄｌｉｎｇ蛍光タンパク質（ＫＦＰ）、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄなど）、ならびに発光に関与する酵素および基質（例えば、ルシフェリンおよび／またはルシフェラーゼ）が含まれる。

【０１０２】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、レポーター導入遺伝子を含まないか、またはコードしない（例えば、いかなる蛍光または発光タンパク質もコードしない）。

【０１０３】

１つ以上の多重特異的免疫細胞エンゲージャーの発現に加えて、本開示のＭＹＸＶは、ＭＹＸＶ治療の抗癌効果を増強することができる１つ以上の他の遺伝子を運ぶように改変され得る。このような遺伝子は、アポトーシスの誘発に関与するか、または感染細胞を免疫破壊の標的にすることに関与する遺伝子、例えば、インターフェロンに対する細胞の応答性を回復する遺伝子、または細菌の細胞表面抗原などの免疫応答を刺激する、細胞表面マーカーの発現をもたらす遺伝子であり得る。本開示のＭＹＸＶは、新生物または癌細胞の増殖および成長を遮断することに関与する１つ以上の遺伝子を発現するように改変することができ、それによって、癌細胞の分裂を防止または低減する。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、化学療法剤の合成に関与する遺伝子などの治療遺伝子を含むように改変され得る。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、特定の種の

細胞におけるウイルス複製を増加させる導入遺伝子を含むことができる（例えば、ヒト癌細胞の殺傷および阻害の増加のためのヒト癌細胞における複製の増加）。

【０１０４】

治療の方法

本明細書で提供されるのは、いくつかの実施形態において、本開示の粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）を利用する対象における血液癌を治療する方法である。血液癌は、微小残存病変（ＭＲＤ）および／または薬剤耐性ＭＲＤを含む血液癌であり得る。

【０１０５】

以下の実施例に開示されるように、インビトロ研究は、標準的な治療に失敗した患者から難治性の原発性ヒト多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞を有意に排除する本開示のＭＹＸＶ構築物の能力を実証した。ＭＹＸＶを使用して実施された研究では、ＭＹＸＶは、ヒトおよびマウスの多くのタイプの癌に対して向性を有する非常に特異的な抗癌剤であり得ることが示されている。

【０１０６】

本開示の治療（例えば、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ、ＭＹＸＶ－ＢｉＴＥ、またはＭＹＸＶ－ＭｉＴＥを利用する治療）は、多くの新規かつ有利な態様を含むことができる。例えば、これらのウイルス構築物は、各ウイルスに直接感染した薬剤耐性の初代ヒトＭＭ細胞（例えば、ＧＦＰ＋またはＴｄＴｏｍａｔｏ＋などのウイルスレポーター遺伝子を発現するＣＤ１３８＋細胞）を選択的に標的にして直接排除する。いくつかの実施形態において、導入遺伝子を含む本開示のＭＹＸＶは、ウイルス感染細胞の直接殺傷によって汚染血液癌細胞を排除することができるだけでなく、非感染癌細胞の「オフターゲット」殺傷を強化することによって（例えば、ＢｉＴＥ、ＭｉＴＥまたはＢｉＫＥを介して癌細胞に関与するように指示された免疫細胞を介して）疾患を排除することもできる。いくつかの実施形態において、導入遺伝子を含む本開示のＭＹＸＶは、他のウイルス（例えば、非武装ウイルスまたは多重特異性免疫細胞エンゲージャー導入遺伝子を欠くウイルス）と比較して、非感染癌細胞の殺傷の増加を誘発することができる。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、感染していないＭＭ細胞（例えば、ＧＦＰ－またはＴｄＴｏｍｏｔｏ－などのウイルスレポーター遺伝子について陰性であるＣＤ１３８＋細胞）の増強された「オフターゲット」殺傷を示し得る。特定の理論に拘束されることを望まないが、感染していない細胞のウイルス増強殺傷は、多重特異性免疫細胞エンゲージャーによって癌細胞に関与するように指示された免疫細胞によって媒介され得る。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＢｉＫＥ、ＭｉＴＥ、またはＢｉＴＥ）を発現する本開示のＭＹＸＶは、感染した癌細胞の殺傷（例えば、「標的」殺傷）を増加させることができる。感染した癌細胞の殺傷は、例えば、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現しないＭＹＸＶと比較して、または非感染癌細胞と比較して、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する操作されたＭＹＸＶによって増加させることができる。本開示のＭＹＸＶは、例えば、生／死染色アッセイによって決定されるように、感染した癌細胞の殺傷を、例えば、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも５倍、または少なくとも１０倍、増加させることができる。ＭＹＸＶは、非癌細胞よりも癌細胞に優先的に感染し、これを優先的に殺傷することができる。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＢｉＫＥ、ＭｉＴＥ、またはＢｉＴＥ）を発現する本開示のＭＹＸＶは、感染していない癌細胞（非感染癌細胞）の殺傷（例えば、「オフターゲット」殺傷）を増加させることができる。）。感染していない癌細胞の殺傷は、例えば、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現しないＭＹＸＶと比較して、または非感染癌細胞と比較して、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶによって増加させることができる。本開示のＭＹＸ

Ｖは、生／死染色アッセイによって決定されるように、例えば、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも５倍、または少なくとも１０倍、非感染癌細胞の殺傷を増加させることができる。感染していない癌細胞の殺傷の増加は、例えば、癌細胞に向けられた免疫細胞（例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、好中球、または本明細書に開示される他の免疫細胞）によって媒介され得る。

【０１０９】

血液悪性腫瘍（例えば、血液悪性腫瘍の難治性および／または微小残存病変（ＭＲＤ））を治療するための、多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥ）を発現するＭＹＸＶの使用は、化学療法や幹細胞移植を含む現在の治療法、および他の候補腫瘍溶解性ウイルスを超えた、複数の利点を含み得る。ＭＹＸＶは、例えば、ウイルスがヒトの癌細胞に感染することを可能にするが、ウイルスが非癌性のヒト細胞に感染することを可能にしない、限定された向性を含む。ヒトの病原体から適応したほとんどのウイルスとは異なり、ＭＹＸＶはヒトに病気を引き起こさないため、このことは免疫システムが低下している患者にさえも安全にする。ヒト集団における既存の抗ＭＹＸＶ適応免疫の欠如は有利であり得、例えば、ヒト病原体から適応したウイルスのように迅速に除去されることなく、ウイルスが癌細胞に感染して殺傷することを可能にする。

【０１１０】

本明細書に開示されるエキソビボ治療アプローチにおいて、細胞（例えば、骨髄（ＢＭ）細胞および／または末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ））とのＭＹＸＶのインキュベーションは、高速であり得、例えば、エキソビボで１時間のウイルスインキュベーションのみを必要とし、その後、癌患者に細胞を再注入する。

【０１１１】

したがって、本開示の態様は、治療を必要とする対象における血液癌を阻害および／または治療するための方法を提供する。特定の実施形態では、この方法は、ヒト対象などの対象に、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する本開示のＭＹＸＶを投与し、それによって必要としている対象の血液癌を治療および／または阻害する工程を含む。対象は哺乳動物であり得る。対象はヒトであり得る。

【０１１２】

いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶ－ＢｉＴＥを含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶ－ＭｉＴＥを含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥを含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＢｉＴＥおよびＭｉＴＥを含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＢｉＴＥおよびＢｉＫＥを含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＭｉＴＥおよびＢｉＫＥを含む。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、ＭｉＴＥ、ＢｉＴＥ、およびＢｉＫＥを含む。ＭｉＴＥ、ＢｉＴＥ、またはＢｉＫＥは、ヒト、マウス、哺乳動物、またはそれらの組み合わせからの配列を含むことができ、本明細書に開示される配列のいずれかを含むことができる。

【０１１３】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、レポーター導入遺伝子（例えば、蛍光タンパク質または発光基質または酵素）を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、およびＭｉＴＥの１つ以上を含み、さらにレポーター導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、およびＭｉＴＥの１つ以上を含み、レポーター導入遺伝子を含まない。

【０１１４】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ウイルスゲノム中の１つ以上の遺伝子における改変、挿入、欠失、または破壊を含む。例えば、本開示のＭＹＸＶは、Ｍ００１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、

ＭＯＯ５Ｒ、ＭＯＯ６Ｒ、ＭＯＯ７Ｒ、ＭＯＯ８．１Ｒ、ＭＯＯ８Ｒ、ＭＯＯ９Ｌ、ＭＯ１３、ＭＯ３６Ｌ、ＭＯ６３Ｌ、Ｍ１１Ｌ、Ｍ１２８Ｌ、Ｍ１３１Ｒ、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ１４１Ｒ、Ｍ１４８Ｒ、Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、およびＳＯＤ遺伝子のいずれか１つ以上の中またはそれに隣接する改変、挿入、欠失、または破壊を含むことができる。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶにおけるウイルス遺伝子の欠失または破壊は、宿主動物に疾患を引き起こし、宿主細胞の向性を調節し、非癌細胞における自然免疫回避を減少させ、感染細胞における免疫シグナル伝達を調節し、感染細胞における細胞死経路を調節し、癌細胞におけるウイルス複製を増加させ、またはそれらの組み合わせであるウイルスの能力を低下させることができる。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、Ｍ１５３遺伝子における改変、挿入、欠失、または破壊を含む。

【０１１５】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＳＯＤ遺伝子における改変、挿入、欠失、または破壊を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、ＳＯＤ遺伝子の欠失または破壊を含む。

【０１１６】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、宿主細胞向性（例えば、ウサギ細胞向性）に関連する１つ以上の遺伝子内のまたはそれに隣接する１つ以上の挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態において、ウサギ細胞向性に関連する１つ以上の遺伝子は、ＭＯ１１Ｌ、ＭＯ６３、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの場合において、ウサギ細胞向性に関連する１つ以上の遺伝子は、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、またはそれらの組み合わせを含む。

【０１１７】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、Ｍ１３５Ｒ遺伝子における改変、挿入、欠失、または破壊を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、Ｍ１３５Ｒ遺伝子の欠失または破壊を含む。Ｍ１３５Ｒ遺伝子の欠失または破壊は、例えば、ＭＹＸＶが抗癌効果を示す（例えば、癌細胞に感染しおよびこれを殺傷し、抗腫瘍免疫応答を誘発し、またはそれらの組み合わせである）能力を損なうことなく、本開示のＭＹＸＶが宿主動物において疾患を引き起こす能力を弱めることができる。

【０１１８】

ＭＹＸＶは、欠損した生来の抗ウイルス応答を有する細胞（例えば、ヒト細胞）に感染し得る。「欠損した生来の抗ウイルス応答」を有することは、本明細書で使用される場合、ウイルスに曝露されたとき、またはウイルスに侵入されたときに、１つ以上の抗ウイルス防御機構を誘導することに失敗する細胞を指し得る。例えば、欠損した生来の抗ウイルス応答は、ウイルス複製を阻害することの失敗、抗ウイルス性サイトカイン（例えば、インターフェロン）を産生することの失敗、抗ウイルス性サイトカインに応答することの失敗（例えば、インターフェロン応答経路を誘導すること）、アポトーシスの誘導の失敗、生来の免疫受容体（例えば、パターン認識受容体）を介した認識の誘発の失敗、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【０１１９】

欠損した生来の抗ウイルス応答は、様々な要因、例えば、悪性形質転換、変異、感染、遺伝的欠陥、または環境ストレスによって引き起こされ得る。

【０１２０】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、遺伝的欠陥、環境ストレス、または感染症（例えば、異なる病原体による既存の感染症）によって引き起こされる欠損した生来の抗ウイルス応答を含む対象には投与されない。

【０１２１】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、悪性形質転換（例えば、癌）によって引き起こされる欠損した生来の抗ウイルス応答を含む対象に投与される。欠損した生

来の抗ウイルス応答を含む細胞は、癌細胞、例えば、正常細胞、例えば、非癌細胞と比較して、ウイルスへの曝露またはウイルスによる感染の際に減少したかまたは欠陥のある生来の抗ウイルス応答を有する、癌細胞であり得る。これには、例えば、インターフェロン（例えば、Ｉ型インターフェロン）に反応しない癌細胞、および／またはアポトーシス応答もしくはアポトーシス経路の誘導の低下もしくは欠陥を有する癌細胞が含まれ得る。この方法のいくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、欠損した生来の抗ウイルス応答を有する細胞に感染することができる。いくつかの実施形態において、細胞は哺乳動物の癌細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒト癌細胞、例えば、ヒト血液癌細胞である。

【０１２２】

いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、癌を治療するために使用される。多発性骨髄腫について本明細書で提供される実施例は、拡張して考えると、他の血液癌に適用可能である。開示された方法に従って治療することができる癌の種類には、白血病、リンパ腫、および骨髄腫などの血液癌、例えば、以下が含まれるがこれらに限定されない：多発性骨髄腫（ＭＭ）；活動性多発性骨髄腫；くすぶり型骨髄腫；形質細胞腫；骨の孤立性形質細胞腫；髄外形質細胞腫；軽鎖骨髄腫；非分泌性骨髄腫；免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）骨髄腫；免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）骨髄腫；免疫グロブリンＭ（ＩｇＭ）骨髄腫；免疫グロブリンＤ（ＩｇＤ）骨髄腫；免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）骨髄腫；高二倍体多発性骨髄腫；非高二倍体多発性骨髄腫；ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫；急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；本態性血小板血症；真性赤血球増加症；原発性骨髄線維症；全身性肥満細胞症；慢性骨髄性白血病；慢性好中球性白血病；慢性好酸球性白血病；環状鉄芽球を伴う難治性貧血；多系統異形成を伴う難治性細胞減少症；過剰芽球１型を伴う難治性貧血；過剰芽球２型を伴う難治性貧血；孤立した欠失（ｄｅｌ）（５ｑ）を伴う骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）；分類不可能なＭＤＳ；慢性骨髄単球性白血病（ＣＭＬ）；非定型慢性骨髄性白血病；若年性骨髄単球性白血病；骨髄増殖性／骨髄異形成症候群－分類不能；Ｂリンパ芽球性白血病／リンパ腫；Ｔリンパ芽球性白血病／リンパ腫；びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；原発性縦隔Ｂ細胞リンパ腫；バーキットリンパ腫／白血病；濾胞性リンパ腫；慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫；Ｂ細胞前リンパ球性白血病；リンパ形質細胞性リンパ腫／ワルデンストロームマクログロブリン血症；マントル細胞リンパ腫；辺縁帯リンパ腫；移植後リンパ増殖性疾患；ＨＩＶ関連リンパ腫；原発性滲出液リンパ腫；血管内大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；原発性皮膚Ｂ細胞リンパ腫；有毛細胞白血病；重要性が不明な単クローン性免疫グロブリン血症；未分化大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性Ｔ細胞リンパ腫、肝脾Ｔ細胞リンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、細網内皮症、細網症、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病、ワルデンストロームマクログロブリン血症、リンパ腫様肉芽腫症、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、形質細胞白血病、急性赤芽球血症および赤白血病、急性赤芽球性骨髄症、急性赤白血病、Ｈｅｉｌｍｅｙｅｒ－Ｓｃｈｏｅｎｅｒ病、急性巨核芽球性白血病、マスト細胞白血病、汎骨髄症、骨髄線維症を伴う急性汎骨髄症、リンパ肉腫細胞白血病、幹細胞白血病、不特定の細胞型の慢性白血病、不特定の細胞型の亜急性白血病、加速期慢性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性好塩基性白血病、急性好酸球性白血病、急性単球性白血病、成熟を伴う急性骨髄芽球性白血病、急性骨髄性樹状細胞白血病、成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫、侵攻性ＮＫ細胞白血病、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病、Ｂ細胞白血病、慢性骨髄性白血病、慢性特発性骨髄線維症、Ｋａｈｌｅｒ病、骨髄腫症、孤立性骨髄腫、形質細胞白血病、血管中心性免疫増殖性病変、リンパ性肉芽腫症、血管免疫芽球性リンパ節腫脹症、Ｔ－ガンマリンパ増殖性疾患、ワルデンストロームマクログロブリン血症、アルファ重鎖疾患、ガンマ重鎖疾患、およびフランクリン病。いくつかの実施形態において、血液癌は多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態において、癌は血液癌である。特定の実施形態では、癌は多発性骨髄腫を含む。

【０１２３】

本明細書で提供されるのは、いくつかの実施形態において、血液癌を治療する（例えば

、血液癌の進行を阻害、軽減、安定化、低減、または遅延させる）方法である。いくつかの実施形態において、方法は、血液癌を治療するために必要とする対象に本開示のＭＹＸＶを投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、この方法は、血液癌を有するかまたは有することが疑われる、ヒト対象などの対象を選択する工程をさらに含む。

【０１２４】

本開示のＭＹＸＶは、血液癌を治療するための有効量で投与することができる。この量は、対象の癌細胞の数（例えば、対象の血液中の癌細胞の濃度）を減らすために十分であり得る。

【０１２５】

対象に投与される有効量は、ＭＹＸＶの薬力学的特性、投与様式、対象の年齢、健康および体重、病状の性質および程度、治療の頻度と同時治療の種類（ある場合）、ならびにウイルスの毒性および力価などの多くの要因に応じて変動し得る。

【０１２６】

ＭＹＸＶは、対象の臨床反応に依存して、必要に応じて調整され得る適切な量で最初に投与され得る。ウイルスの有効量は経験的に決定することができ、安全に投与できるＭＹＸＶの最大量と、望ましい結果を生み出すウイルスの最小量に依存する。

【０１２７】

ウイルスを全身投与するときに、疾患部位にウイルスを注射することによって達成されるのと同じ臨床効果を生み出すために、著しく大量のウイルスの投与が必要とされ得る。しかし、適切な用量レベルは、望ましい結果を達成する最小量であるべきである。

【０１２８】

投与されるウイルスの濃度は、投与されるＭＹＸＶの特定の株の毒性、および標的とされる細胞の性質に応じて変動する。一実施形態では、「感染単位」とも呼ばれる、約３×１０＾１０未満のフォーカス形成単位（「ｆｆｕ」）またはプラーク形成単位（「ｐｆｕ」）の用量が、ヒト対象に投与される。様々な実施形態において、約１０＾２から約１０＾９　ｐｆｕの間、約１０＾２から約１０＾７　ｐｆｕの間、約１０＾３から約１０＾６ｐｆｕの間、または約１０＾４から約１０＾５ｐｆｕの間が、単回投与で投与され得る。

【０１２９】

いくつかの実施形態において、対象は、本開示のＭＹＸＶの特定の用量のフォーカス形成単位（ＦＦＵ）またはプラーク形成単位（ＰＦＵ）を投与される。

【０１３０】

いくつかの実施形態において、対象に投与されるＭＹＸＶの用量は、少なくとも１ｘ１０＾２、２ｘ１０＾２、３ｘ１０＾２、４ｘ１０＾２、５ｘ１０＾２、６ｘ１０＾２、７ｘ１０＾２、８ｘ１０＾２、９ｘ１０＾２、１ｘ１０＾３、２ｘ１０＾３、３ｘ１０＾３、４ｘ１０＾３、５ｘ１０＾３、６ｘ１０＾３、７ｘ１０＾３、８ｘ１０＾３、９ｘ１０＾３、１ｘ１０＾４、２ｘ１０＾４、３ｘ１０＾４、４ｘ１０＾４、５ｘ１０＾４、６ｘ１０＾４、７ｘ１０＾４、８ｘ１０＾４、９ｘ１０＾４、１ｘ１０＾５、２ｘ１０＾５、３ｘ１０＾５、４ｘ１０＾５、５ｘ１０＾５、６ｘ１０＾５、７ｘ１０＾５、８ｘ１０＾５、９ｘ１０＾５、１ｘ１０＾６、２ｘ１０＾６、３ｘ１０＾６、４ｘ１０＾６、５ｘ１０＾６、６ｘ１０＾６、７ｘ１０＾６、８ｘ１０＾６、９ｘ１０＾６、１ｘ１０＾７、２ｘ１０＾７、３ｘ１０＾７、４ｘ１０＾７、５ｘ１０＾７、６ｘ１０＾７、７ｘ１０＾７、８ｘ１０＾７、９ｘ１０＾７、１ｘ１０＾８、２ｘ１０＾８、３ｘ１０＾８、４ｘ１０＾８、５ｘ１０＾８、６ｘ１０＾８、７ｘ１０＾８、８ｘ１０＾８、９ｘ１０＾８、１ｘ１０＾９、２ｘ１０＾９、３ｘ１０＾９、４ｘ１０＾９、５ｘ１０＾９、６ｘ１０＾９、７ｘ１０＾９、８ｘ１０＾９、９ｘ１０＾９、１ｘ１０＾１０、２ｘ１０＾１０、３ｘ１０＾１０、４ｘ１０＾１０、５ｘ１０＾１０、６ｘ１０＾１０、７ｘ１０＾１０、８ｘ１０＾１０、９ｘ１０＾１０、１ｘ１０＾１１、２ｘ１０＾１１、３ｘ１０＾１１、４ｘ１０＾１１、５ｘ１０＾１１、６ｘ１０＾１１、７ｘ１０＾１１、８ｘ１０＾１１、９ｘ１０＾１１、１ｘ１０＾１２、２ｘ１０＾１２、３ｘ１０＾１２、４ｘ１０＾１２、５ｘ１０＾１２、６ｘ１０＾１２、７ｘ１０＾１２、８ｘ１０＾１２、９ｘ１０＾１２、１ｘ１

０＾１３、２ｘ１０＾１３、３ｘ１０＾１３、４ｘ１０＾１３、５ｘ１０＾１３、６ｘ１
０＾１３、７ｘ１０＾１３、８ｘ１０＾１３、９ｘ１０＾１３、１ｘ１０＾１４、２ｘ１
０＾１４、３ｘ１０＾１４、４ｘ１０＾１４、５ｘ１０＾１４、６ｘ１０＾１４、７ｘ１
０＾１４、８ｘ１０＾１４、９ｘ１０＾１４、１ｘ１０＾１５、２ｘ１０＾１５、３ｘ１
０＾１５、４ｘ１０＾１５、５ｘ１０＾１５、６ｘ１０＾１５、７ｘ１０＾１５、８ｘ１
０＾１５、９ｘ１０＾１５、１ｘ１０＾１６、２ｘ１０＾１６、３ｘ１０＾１６、４ｘ１
０＾１６、５ｘ１０＾１６、６ｘ１０＾１６、７ｘ１０＾１６、８ｘ１０＾１６、９ｘ１
０＾１６、１ｘ１０＾１７、２ｘ１０＾１７、３ｘ１０＾１７、４ｘ１０＾１７、５ｘ１
０＾１７、６ｘ１０＾１７、７ｘ１０＾１７、８ｘ１０＾１７、９ｘ１０＾１７、１ｘ１
０＾１８、２ｘ１０＾１８、３ｘ１０＾１８、４ｘ１０＾１８、５ｘ１０＾１８、６ｘ１
０＾１８、７ｘ１０＾１８、８ｘ１０＾１８、９ｘ１０＾１８、１ｘ１０＾１９、２ｘ１
０＾１９、３ｘ１０＾１９、４ｘ１０＾１９、５ｘ１０＾１９、６ｘ１０＾１９、７ｘ１
０＾１９、８ｘ１０＾１９、９ｘ１０＾１９、１ｘ１０＾２０、２ｘ１０＾２０、３ｘ１
０＾２０、４ｘ１０＾２０、５ｘ１０＾２０、６ｘ１０＾２０、７ｘ１０＾２０、８ｘ１
０＾２０、または９ｘ１０＾２０　ＦＦＵまたはＰＦＵの本開示のＭＹＸＶである。

【０１３１】

いくつかの実施形態において、対象に投与されるＭＹＸＶの用量は、最大で１ｘ１０＾
２、２ｘ１０＾２、３ｘ１０＾２、４ｘ１０＾２、５ｘ１０＾２、６ｘ１０＾２、７ｘ１
０＾２、８ｘ１０＾２、９ｘ１０＾２、１ｘ１０＾３、２ｘ１０＾３、３ｘ１０＾３、４
ｘ１０＾３、５ｘ１０＾３、６ｘ１０＾３、７ｘ１０＾３、８ｘ１０＾３、９ｘ１０＾３
、１ｘ１０＾４、２ｘ１０＾４、３ｘ１０＾４、４ｘ１０＾４、５ｘ１０＾４、６ｘ１０
＾４、７ｘ１０＾４、８ｘ１０＾４、９ｘ１０＾４、１ｘ１０＾５、２ｘ１０＾５、３ｘ
１０＾５、４ｘ１０＾５、５ｘ１０＾５、６ｘ１０＾５、７ｘ１０＾５、８ｘ１０＾５、
９ｘ１０＾５、１ｘ１０＾６、２ｘ１０＾６、３ｘ１０＾６、４ｘ１０＾６、５ｘ１０＾
６、６ｘ１０＾６、７ｘ１０＾６、８ｘ１０＾６、９ｘ１０＾６、１ｘ１０＾７、２ｘ１
０＾７、３ｘ１０＾７、４ｘ１０＾７、５ｘ１０＾７、６ｘ１０＾７、７ｘ１０＾７、８
ｘ１０＾７、９ｘ１０＾７、１ｘ１０＾８、２ｘ１０＾８、３ｘ１０＾８、４ｘ１０＾８
、５ｘ１０＾８、６ｘ１０＾８、７ｘ１０＾８、８ｘ１０＾８、９ｘ１０＾８、１ｘ１０
＾９、２ｘ１０＾９、３ｘ１０＾９、４ｘ１０＾９、５ｘ１０＾９、６ｘ１０＾９、７ｘ
１０＾９、８ｘ１０＾９、９ｘ１０＾９、１ｘ１０＾１０、２ｘ１０＾１０、３ｘ１０＾
１０、４ｘ１０＾１０、５ｘ１０＾１０、６ｘ１０＾１０、７ｘ１０＾１０、８ｘ１０＾
１０、９ｘ１０＾１０、１ｘ１０＾１１、２ｘ１０＾１１、３ｘ１０＾１１、４ｘ１０＾
１１、５ｘ１０＾１１、６ｘ１０＾１１、７ｘ１０＾１１、８ｘ１０＾１１、９ｘ１０＾
１１、１ｘ１０＾１２、２ｘ１０＾１２、３ｘ１０＾１２、４ｘ１０＾１２、５ｘ１０＾
１２、６ｘ１０＾１２、７ｘ１０＾１２、８ｘ１０＾１２、９ｘ１０＾１２、１ｘ１０＾
１３、２ｘ１０＾１３、３ｘ１０＾１３、４ｘ１０＾１３、５ｘ１０＾１３、６ｘ１０＾
１３、７ｘ１０＾１３、８ｘ１０＾１３、９ｘ１０＾１３、１ｘ１０＾１４、２ｘ１０＾
１４、３ｘ１０＾１４、４ｘ１０＾１４、５ｘ１０＾１４、６ｘ１０＾１４、７ｘ１０＾
１４、８ｘ１０＾１４、９ｘ１０＾１４、１ｘ１０＾１５、２ｘ１０＾１５、３ｘ１０＾
１５、４ｘ１０＾１５、５ｘ１０＾１５、６ｘ１０＾１５、７ｘ１０＾１５、８ｘ１０＾
１５、９ｘ１０＾１５、１ｘ１０＾１６、２ｘ１０＾１６、３ｘ１０＾１６、４ｘ１０＾
１６、５ｘ１０＾１６、６ｘ１０＾１６、７ｘ１０＾１６、８ｘ１０＾１６、９ｘ１０＾
１６、１ｘ１０＾１７、２ｘ１０＾１７、３ｘ１０＾１７、４ｘ１０＾１７、５ｘ１０＾
１７、６ｘ１０＾１７、７ｘ１０＾１７、８ｘ１０＾１７、９ｘ１０＾１７、１ｘ１０＾
１８、２ｘ１０＾１８、３ｘ１０＾１８、４ｘ１０＾１８、５ｘ１０＾１８、６ｘ１０＾
１８、７ｘ１０＾１８、８ｘ１０＾１８、９ｘ１０＾１８、１ｘ１０＾１９、２ｘ１０＾
１９、３ｘ１０＾１９、４ｘ１０＾１９、５ｘ１０＾１９、６ｘ１０＾１９、７ｘ１０＾
１９、８ｘ１０＾１９、９ｘ１０＾１９、１ｘ１０＾２０、２ｘ１０＾２０、３ｘ１０＾
２０、４ｘ１０＾２０、５ｘ１０＾２０、６ｘ１０＾２０、７ｘ１０＾２０、８ｘ１０＾
２０、または９ｘ１０＾２０　ＦＦＵまたはＰＦＵの本開示のＭＹＸＶである。

【０１３２】
いくつかの実施形態において、対象は、体重１キログラムあたりの本開示のＭＹＸＶの特定の用量のフォーカス形成単位（ＦＦＵ）またはプラーク形成単位（ＰＦＵ）を投与される。
【０１３３】
いくつかの実施形態において、対象に投与されるＭＹＸＶの用量は、対象の体重１キログラムあたり、少なくとも１ｘ１０＾２、２ｘ１０＾２、３ｘ１０＾２、４ｘ１０＾２、５ｘ１０＾２、６ｘ１０＾２、７ｘ１０＾２、８ｘ１０＾２、９ｘ１０＾２、１ｘ１０＾３、２ｘ１０＾３、３ｘ１０＾３、４ｘ１０＾３、５ｘ１０＾３、６ｘ１０＾３、７ｘ１０＾３、８ｘ１０＾３、９ｘ１０＾３、１ｘ１０＾４、２ｘ１０＾４、３ｘ１０＾４、４ｘ１０＾４、５ｘ１０＾４、６ｘ１０＾４、７ｘ１０＾４、８ｘ１０＾４、９ｘ１０＾４、１ｘ１０＾５、２ｘ１０＾５、３ｘ１０＾５、４ｘ１０＾５、５ｘ１０＾５、６ｘ１０＾５、７ｘ１０＾５、８ｘ１０＾５、９ｘ１０＾５、１ｘ１０＾６、２ｘ１０＾６、３ｘ１０＾６、４ｘ１０＾６、５ｘ１０＾６、６ｘ１０＾６、７ｘ１０＾６、８ｘ１０＾６、９ｘ１０＾６、１ｘ１０＾７、２ｘ１０＾７、３ｘ１０＾７、４ｘ１０＾７、５ｘ１０＾７、６ｘ１０＾７、７ｘ１０＾７、８ｘ１０＾７、９ｘ１０＾７、１ｘ１０＾８、２ｘ１０＾８、３ｘ１０＾８、４ｘ１０＾８、５ｘ１０＾８、６ｘ１０＾８、７ｘ１０＾８、８ｘ１０＾８、９ｘ１０＾８、１ｘ１０＾９、２ｘ１０＾９、３ｘ１０＾９、４ｘ１０＾９、５ｘ１０＾９、６ｘ１０＾９、７ｘ１０＾９、８ｘ１０＾９、９ｘ１０＾９、１ｘ１０＾１０、２ｘ１０＾１０、３ｘ１０＾１０、４ｘ１０＾１０、５ｘ１０＾１０、６ｘ１０＾１０、７ｘ１０＾１０、８ｘ１０＾１０、９ｘ１０＾１０、１ｘ１０＾１１、２ｘ１０＾１１、３ｘ１０＾１１、４ｘ１０＾１１、５ｘ１０＾１１、６ｘ１０＾１１、７ｘ１０＾１１、８ｘ１０＾１１、９ｘ１０＾１１、１ｘ１０＾１２、２ｘ１０＾１２、３ｘ１０＾１２、４ｘ１０＾１２、５ｘ１０＾１２、６ｘ１０＾１２、７ｘ１０＾１２、８ｘ１０＾１２、９ｘ１０＾１２、１ｘ１０＾１３、２ｘ１０＾１３、３ｘ１０＾１３、４ｘ１０＾１３、５ｘ１０＾１３、６ｘ１０＾１３、７ｘ１０＾１３、８ｘ１０＾１３、９ｘ１０＾１３、１ｘ１０＾１４、２ｘ１０＾１４、３ｘ１０＾１４、４ｘ１０＾１４、５ｘ１０＾１４、６ｘ１０＾１４、７ｘ１０＾１４、８ｘ１０＾１４、９ｘ１０＾１４、１ｘ１０＾１５、２ｘ１０＾１５、３ｘ１０＾１５、４ｘ１０＾１５、５ｘ１０＾１５、６ｘ１０＾１５、７ｘ１０＾１５、８ｘ１０＾１５、９ｘ１０＾１５、１ｘ１０＾１６、２ｘ１０＾１６、３ｘ１０＾１６、４ｘ１０＾１６、５ｘ１０＾１６、６ｘ１０＾１６、７ｘ１０＾１６、８ｘ１０＾１６、９ｘ１０＾１６、１ｘ１０＾１７、２ｘ１０＾１７、３ｘ１０＾１７、４ｘ１０＾１７、５ｘ１０＾１７、６ｘ１０＾１７、７ｘ１０＾１７、８ｘ１０＾１７、９ｘ１０＾１７、１ｘ１０＾１８、２ｘ１０＾１８、３ｘ１０＾１８、４ｘ１０＾１８、５ｘ１０＾１８、６ｘ１０＾１８、７ｘ１０＾１８、８ｘ１０＾１８、９ｘ１０＾１８、１ｘ１０＾１９、２ｘ１０＾１９、３ｘ１０＾１９、４ｘ１０＾１９、５ｘ１０＾１９、６ｘ１０＾１９、７ｘ１０＾１９、８ｘ１０＾１９、９ｘ１０＾１９、１ｘ１０＾２０、２ｘ１０＾２０、３ｘ１０＾２０、４ｘ１０＾２０、５ｘ１０＾２０、６ｘ１０＾２０、７ｘ１０＾２０、８ｘ１０＾２０、または９ｘ１０＾２０　ＦＦＵまたはＰＦＵの本開示のＭＹＸＶである。
【０１３４】
いくつかの実施形態において、対象に投与されるＭＹＸＶの用量は、対象の体重１キログラムあたり、最大で１ｘ１０＾２、２ｘ１０＾２、３ｘ１０＾２、４ｘ１０＾２、５ｘ１０＾２、６ｘ１０＾２、７ｘ１０＾２、８ｘ１０＾２、９ｘ１０＾２、１ｘ１０＾３、２ｘ１０＾３、３ｘ１０＾３、４ｘ１０＾３、５ｘ１０＾３、６ｘ１０＾３、７ｘ１０＾３、８ｘ１０＾３、９ｘ１０＾３、１ｘ１０＾４、２ｘ１０＾４、３ｘ１０＾４、４ｘ１０＾４、５ｘ１０＾４、６ｘ１０＾４、７ｘ１０＾４、８ｘ１０＾４、９ｘ１０＾４、１ｘ１０＾５、２ｘ１０＾５、３ｘ１０＾５、４ｘ１０＾５、５ｘ１０＾５、６ｘ１０＾５、７ｘ１０＾５、８ｘ１０＾５、９ｘ１０＾５、１ｘ１０＾６、２ｘ１０＾６、３ｘ１０＾６、４ｘ１０＾６、５ｘ１０＾６、６ｘ１０＾６、７ｘ１０＾６、８ｘ１０＾６、９ｘ

１０＾６、１ｘ１０＾７、２ｘ１０＾７、３ｘ１０＾７、４ｘ１０＾７、５ｘ１０＾７、６ｘ１０＾７、７ｘ１０＾７、８ｘ１０＾７、９ｘ１０＾７、１ｘ１０＾８、２ｘ１０＾８、３ｘ１０＾８、４ｘ１０＾８、５ｘ１０＾８、６ｘ１０＾８、７ｘ１０＾８、８ｘ１０＾８、９ｘ１０＾８、１ｘ１０＾９、２ｘ１０＾９、３ｘ１０＾９、４ｘ１０＾９、５ｘ１０＾９、６ｘ１０＾９、７ｘ１０＾９、８ｘ１０＾９、９ｘ１０＾９、１ｘ１０＾１０、２ｘ１０＾１０、３ｘ１０＾１０、４ｘ１０＾１０、５ｘ１０＾１０、６ｘ１０＾１０、７ｘ１０＾１０、８ｘ１０＾１０、９ｘ１０＾１０、１ｘ１０＾１１、２ｘ１０＾１１、３ｘ１０＾１１、４ｘ１０＾１１、５ｘ１０＾１１、６ｘ１０＾１１、７ｘ１０＾１１、８ｘ１０＾１１、９ｘ１０＾１１、１ｘ１０＾１２、２ｘ１０＾１２、３ｘ１０＾１２、４ｘ１０＾１２、５ｘ１０＾１２、６ｘ１０＾１２、７ｘ１０＾１２、８ｘ１０＾１２、９ｘ１０＾１２、１ｘ１０＾１３、２ｘ１０＾１３、３ｘ１０＾１３、４ｘ１０＾１３、５ｘ１０＾１３、６ｘ１０＾１３、７ｘ１０＾１３、８ｘ１０＾１３、９ｘ１０＾１３、１ｘ１０＾１４、２ｘ１０＾１４、３ｘ１０＾１４、４ｘ１０＾１４、５ｘ１０＾１４、６ｘ１０＾１４、７ｘ１０＾１４、８ｘ１０＾１４、９ｘ１０＾１４、１ｘ１０＾１５、２ｘ１０＾１５、３ｘ１０＾１５、４ｘ１０＾１５、５ｘ１０＾１５、６ｘ１０＾１５、７ｘ１０＾１５、８ｘ１０＾１５、９ｘ１０＾１５、１ｘ１０＾１６、２ｘ１０＾１６、３ｘ１０＾１６、４ｘ１０＾１６、５ｘ１０＾１６、６ｘ１０＾１６、７ｘ１０＾１６、８ｘ１０＾１６、９ｘ１０＾１６、１ｘ１０＾１７、２ｘ１０＾１７、３ｘ１０＾１７、４ｘ１０＾１７、５ｘ１０＾１７、６ｘ１０＾１７、７ｘ１０＾１７、８ｘ１０＾１７、９ｘ１０＾１７、１ｘ１０＾１８、２ｘ１０＾１８、３ｘ１０＾１８、４ｘ１０＾１８、５ｘ１０＾１８、６ｘ１０＾１８、７ｘ１０＾１８、８ｘ１０＾１８、９ｘ１０＾１８、１ｘ１０＾１９、２ｘ１０＾１９、３ｘ１０＾１９、４ｘ１０＾１９、５ｘ１０＾１９、６ｘ１０＾１９、７ｘ１０＾１９、８ｘ１０＾１９、９ｘ１０＾１９、１ｘ１０＾２０、２ｘ１０＾２０、３ｘ１０＾２０、４ｘ１０＾２０、５ｘ１０＾２０、６ｘ１０＾２０、７ｘ１０＾２０、８ｘ１０＾２０、または９ｘ１０＾２０　ＦＦＵまたはＰＦＵの本開示のＭＹＸＶである。

【０１３５】

本開示のＭＹＸＶは、任意の所望の間隔で投与することができる。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは１時間ごとに投与することができる。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３６、４０、４４、または４８時間ごとに投与することができる。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、１日２回、１日１回、週５回、週４回、週３回、週２回、週１回、２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、１か月に１回、５週間に１回、６週間に１回、８週間に１回、２か月に１回、１２週間に１回、３か月に１回、４か月に１回、６か月に１回、　年に１回、またはそれ以下の頻度で投与することができる。

【０１３６】

本開示のＭＹＸＶは、例えば、全身、経口、局所、非経口、静脈内注射、静脈内注入、腫瘍内注射、皮下注射、筋肉内注射、皮膚内注射、腹腔内注射、脳内注射、くも膜下注射、脊髄内注射、胸骨内注射、関節内注射、内皮投与、局所投与、鼻腔内投与、肺内投与、動脈内投与、髄腔内投与、吸入、病巣内投与、皮膚内投与、硬膜外投与、上皮または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜）を介した吸収、被膜内投与、被膜下投与、心臓内投与、経気管投与、皮下投与、くも膜下投与、被膜下投与、脊髄内投与、または胸骨内投与を含む様々な形態および経路によって、治療有効量で対象に投与することができる。

【０１３７】

いくつかの実施形態において、ウイルスは全身投与される。いくつかの実施形態において、ウイルスは、疾患部位への注射によって投与される。いくつかの実施形態において、ウイルスは経口投与される。いくつかの実施形態において、ウイルスは非経口的に投与される。

【０１３８】
本開示のＭＹＸＶ（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する）は、単独の治療として投与することができ、または１つ以上の他の治療法と組み合わせて投与することができる。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、化学療法、免疫療法、細胞療法、放射線療法、幹細胞移植（自己幹細胞移植など）、またはそれらの組み合わせと組み合わせて投与される。例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶは、放射線療法または従来の化学療法薬の投与、および／または、自己幹細胞移植もしくは同種異系幹細胞移植（例えば、ＨＬＡ一致、ＨＬＡ不一致、またはハプロタイプ一致移植）などの幹細胞移植などの別の治療の前または後のいずれかに投与され得る。

【０１３９】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、免疫チェックポイントモジュレーターとの組み合わせであり得る。免疫チェックポイント阻害剤の例には、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａのデュルバルマブ（Ｉｍｆｉｎｚｉ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈのアテゾリズマブ（ＭＰＤＬ３２８０Ａ）、ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ／Ｐｆｉｚｅｒのアベルマブ、ＣｙｔｏｍＸ ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓのＣＸ－０７２、Ｎｏｖａｒｔｉｓ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＦＡＺ０５３、３Ｄ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ／ＡｌｐｈａｍａｂのＫＮ０３５、Ｅｌｉ ＬｉｌｌｙのＬＹ３３００００５４、またはＥＭＤ ＳｅｒｏｎｏのＭ７８２４（抗ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦｂｅｔａトラップ）などのＰＤ－Ｌ１阻害剤；ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅのＡＭＰ－２２４（Ａｍｐｌｉｍｍｕｎｅ）、およびｒＨＩｇＭ１２Ｂ７などのＰＤ－Ｌ２阻害剤；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂのニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ）、Ｍｅｒｃｋのペンブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ）、ＡｇｅｎｕｓのＡＧＥＮ ２０３４、ＢｅｉＧｅｎｅのＢＧＢ－Ａ３１７、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＢｌ－７５４０９１、ＣＢＴ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＣＢＴ－５０１（ｇｅｎｏｌｉｍｚｕｍａｂ）、ＩｎｃｙｔｅのＩＮＣＳＨＲ１２１０、Ｊａｎｓｓｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ＆ＤｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔのＪＮＪ－６３７２３２８３、ＭｅｄＩｍｍｕｎｅのＭＥＤＩ０６８０、ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓのＭＧＡ ０１２、Ｎｏｖａｒｔｉｓ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＰＤＲ００１、ＰｆｉｚｅｒのＰＦ－０６８０１５９１、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ／ＳａｎｏのＲＥＧＮ２８１０（ＳＡＲ４３９６８４）、またはＴＥＳＡＲＯのＴＳＲ－０４２などのＰＤ－１阻害剤；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂのイピリムマブ（Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標）、ＭＤＸ－０１０、ＢＭＳ－７３４０１６、ＭＤＸ－１０１としても知られる）、Ｐｆｉｚｅｒのトレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６、チシリムマブ）、またはＡｇｅｎｕｓのＡＧＥＮ１８８４などのＣＴＬＡ－４阻害剤；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ ＳｑｕｉｂｂのＢＭＳ－９８６０１６、Ｎｏｖａｒｔｉｓ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＩＭＰ７０１、Ｎｏｖａｒｔｉｓ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＬＡＧ５２５、またはＲｅｇｅｎｅｒｏｎＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＲＥＧＮ３７６７などのＬＡＧ３阻害剤；ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓのエノブリツズマブ（ＭＧＡ２７１）などのＢ７－Ｈ３阻害剤；Ｉｎｎａｔｅ ＰｈａｒｍａのＬｉｒｉｌｕｍａｂ（ＩＰＨ２１０１；ＢＭＳ－９８６０１５）などのＫＩＲ阻害剤；ｕｒｅｌｕｍａｂ（ＢＭＳ－６６３５１３、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ＰＦ－０５０８２５６６（抗－４－１ＢＢ、ＰＦ－２５６６、Ｐｆｉｚｅｒ）、またはＸｍＡｂ－５５９２（Ｘｅｎｃｏｒ）などのＣＤ１３７阻害剤；およびバビツキシマブなどのＰＳ阻害剤が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶは、例えば、ＴＩＭ３、ＣＤ５２、ＣＤ３０、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＣＤ２７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＩＣＯＳ、ＢＴＬＡ（ＣＤ２７２）、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＬＡＩＲ１、ＴＩＧＩＴ、ＬＩＧＨＴ、ＤＲ３、ＣＤ２２６、ＣＤ２、またはＳＬＡＭに対して作用するか、またはこれらに特異的である、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、ＲＮＡｉ分子、または小分子と組み合わされる。

【０１４０】
本開示のＭＹＸＶは、標準的な技術を使用して調製することができる。例えば、ウイルスは、培養ウサギ細胞、または不死化許容ヒトまたは霊長類細胞に、使用されるＭＹＸＶ株を感染させ、ウイルスが培養細胞内で複製し、これが、細胞表面を破壊しそれによってウイルス粒子を放出して採取するための標準的な方法によって放出できるように、感染を進行させることによって調製することができる。一旦採取されると、ウイルス力価は、例えば、ウサギ細胞のコンフルエントなローンに感染すること、およびプラークアッセイを実施することによって決定され得る（その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｍｏｓｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ２１５：１７－３０を参照のこと）。

【０１４１】
ＭＹＸＶの細胞送達
本明細書でさらに開示されるのは、いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶが最初に細胞に吸着され、細胞が対象に投与される新規の送達戦略である。この方法は、ウイルスを保有する「キャリア」細胞を介して、本開示のＭＹＸＶを疾患部位に送達することができる。いくつかの実施形態において、ウイルスのこの細胞支援送達は、腫瘍負荷を低減または排除し、そして対象の生存を増加させる能力を有する。

【０１４２】
キャリア細胞を介したＭＹＸＶの送達は、血液癌の新しい潜在的な治療レジメンを表す。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、白血球（例えば、骨髄および／または末梢血からの白血球）に吸着され、そして白血球は、対象に注入される。癌を有するレシピエントへの白血球注入の前に、エキソビボで白血球をＭＹＸＶでプレロードすることは、多発性骨髄腫（ＭＭ）および本明細書に開示される他の任意の血液癌に利用することができる。いくつかの実施形態において、癌を有するレシピエントへの白血球注入の前に、エキソビボで白血球をＭＹＸＶでプレロードすることは、離れた腫瘍部位への白血球の局在化および浸潤に適した任意の癌を治療するのに効果的であり得る。

【０１４３】
いくつかの実施形態において、組み合わされた「白血球／ＭＹＸＶ」療法は、腫瘍床における癌細胞死の増加を引き起こし、抗腫瘍免疫原性を増強する。例えば、いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶ（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶ）は、エキソビボでウイルスに事前に吸着または事前に感染した白血球の遊走を介して、微小残存病変（ＭＲＤ）を有する骨髄床などの癌部位に送達される。この全身送達法は、ウイルスが患者に注入される前に最初に白血球に送達されるため、「エキソビボウイルス療法」またはＥＶＶ（例えば、ＥＶ２）と呼ばれることもある。

【０１４４】
いくつかの実施形態において、ＭＹＸＶの細胞媒介性送達は、感染した血液癌細胞の直接殺傷のレベルを増加させ、理論に拘束されるものではないが、宿主免疫系の活性化因子として作用し、これは、癌の長期的な退行をもたらし得る。これは、現在の治療法では困難であることが証明されている、骨および／またはリンパ節の血液癌の新しい治療法を提供することができる。

【０１４５】
したがって、特定の実施形態において、本開示の方法は、本開示の吸着されたＭＹＸＶ（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶ）を含む癌白血球を有する対象に投与し、それによって、対象の癌を治療および／または阻害する工程を含む。本開示のＭＹＸＶは、ＭＹＸＶの白血球の表面への結合を可能にする条件下で、白血球をＭＹＸＶに曝露することによって吸着されることができる。

【０１４６】
いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、白血球（例えば、骨髄および／ま

たは末梢血からの白血球）に吸着され、そして白血球は、対象に注入される。白血球は骨髄由来であり得る（例えば、骨髄吸引液または骨髄生検から）。白血球は、血液（例えば、末梢血単核細胞）に由来し得る。いくつかの実施形態において、白血球は、対象、例えば、癌を有する対象から得られ、ＭＹＸＶで吸着され、そして対象に再注入される（例えば、自己細胞移植として）。いくつかの実施形態において、白血球は、１つ以上の同種異系ドナー（例えば、ＨＬＡ一致、ＨＬＡ不一致、またはハプロタイプ一致のドナー）から得られる。いくつかの実施形態において、白血球は、ＨＬＡ一致兄弟から得られる。

【０１４７】

白血球は、本開示のＭＹＸＶが吸着される前または後の、例えば、赤血球溶解、密度勾配遠心分離（例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ）、白血球アフェレーシス、抗体またはその誘導体を含む技術（例えば、蛍光活性化細胞選別または磁気活性化細胞選別を介したポジティブまたはネガティブ選択）、またはそれらの任意の組み合わせによって分類または精製することができる。いくつかの実施形態において、白血球は、本開示のＭＹＸＶが吸着される前または後に癌細胞を富化するために選別または精製される（例えば、癌に関連するマーカーを発現する細胞、例えば、多発性骨髄腫細胞のＣＤ１３８）。いくつかの実施形態において、白血球は、本開示のＭＹＸＶが吸着される前または後に、非癌細胞を富化するために選別または精製される。いくつかの実施形態において、細胞は、本開示のＭＹＸＶが吸着される前または後に、１つ以上の細胞サブセット細胞（例えば、単球、リンパ球、Ｂ細胞、血漿細胞、Ｔ細胞、好中球、好塩基球、好酸球、巨核球、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マスト細胞、生来のリンパ系細胞、一般的な骨髄前駆細胞、一般的なリンパ系前駆細胞、骨髄芽細胞、単芽球、前単球、リンパ芽球、前リンパ球、血球芽細胞、巨核芽細胞、前巨核球、幹細胞、プロＢ細胞、プレＢ細胞、それらの前駆体、またはそれらの任意の組み合わせ））を富化するために選別または精製される。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶは、白血球に吸着され、そして白血球は、ＭＹＸＶを含む細胞について富化される（例えば、ＭＹＸＶが結合および／または内在化される）。

【０１４８】

白血球は、本開示のＭＹＸＶを吸着する前または後に保存することができる（例えば、凍結保存することができる）。いくつかの実施形態において、白血球は、凍結保存され得、そして後で対象への注入の前に解凍され得る。

【０１４９】

いくつかの実施形態において、この方法は、本開示のＭＹＸＶを白血球（例えば、末梢血単核細胞、骨髄細胞、またはそれらの精製／富化サブセット）の表面に吸着させる工程を含む。いくつかの実施形態において、粘液腫ウイルスを白血球の表面に吸着させる工程は、単核末梢血細胞および／または骨髄細胞の表面へのＭＹＸＶの結合を可能にする条件下で、白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、本開示のＭＹＸＶで白血球を感染させる工程を含む。いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶで白血球を感染させる工程は、ＭＹＸＶを白血球の少なくとも一部に内在化することを可能にする条件下で、白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。白血球をＭＹＸＶに曝露することは、任意の適切な試薬または条件（例えば、滅菌細胞培養培地、培地補充物、ならびに、白血球の吸着および／または感染を可能にし、白血球の生存能力を維持するための適切なインキュベーション条件）を含み得る。

【０１５０】

ＭＹＸＶおよび白血球は、ウイルスが白血球に吸着することを可能にする任意の比率で互いに曝露され得る。いくつかの実施形態において、白血球の表面に白血球ウイルスを吸着させる工程は、約０．０００００１、０．００００１、０．０００１、０．０００１、０．００１、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０

、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１ｘ１０＾４、１ｘ１０＾５、１ｘ１０＾６、１ｘ１０＾９、１ｘ１０＾１０、１ｘ１０＾１１、１ｘ１０＾１２、１ｘ１０＾１３、１ｘ１０＾１４、または１ｘ１０＾１５の白血球あたりのウイルスの感染多重度（ＭＯＩ）で白血球をＭＹＸＶに曝露する工程を含む。

【０１５１】

いくつかの実施形態において、白血球の表面への白血球ウイルスの吸着は、少なくとも０．０００００１、少なくとも０．００００１、少なくとも０．０００１、少なくとも０．０００１、少なくとも０．００１、少なくとも０．０１、少なくとも０．０２、少なくとも０．０３、少なくとも０．０４、少なくとも０．０５、少なくとも０．０６、少なくとも０．０７、少なくとも０．０８、少なくとも０．０９、少なくとも０．１、少なくとも０．２、少なくとも０．３、少なくとも０．４、少なくとも０．５、少なくとも０．６、少なくとも０．７、少なくとも０．８、少なくとも０．９、少なくとも１、少なくとも１．１、少なくとも１．２、少なくとも１．３、少なくとも１．４、少なくとも１．５、少なくとも１．６、少なくとも１．７、少なくとも１．８、少なくとも１．９、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１５０、少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１０００、少なくとも２０００、少なくとも３０００、少なくとも４０００、少なくとも５０００、少なくとも６０００、少なくとも７０００、少なくとも８０００、少なくとも９０００、少なくとも１ｘ１０＾４、少なくとも１ｘ１０＾５、少なくとも１ｘ１０＾６、少なくとも１ｘ１０＾９、少なくとも１ｘ１０＾１０、少なくとも１ｘ１０＾１１、少なくとも１ｘ１０＾１２、少なくとも１ｘ１０＾１３、少なくとも１ｘ１０＾１４、または少なくとも１ｘ１０＾１５の白血球あたりのウイルスの感染多重度（ＭＯＩ）で、白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。

【０１５２】

いくつかの実施形態において、白血球の表面に白血球ウイルスを吸着させる工程は、最大０．０００００１、最大０．００００１、最大０．０００１、最大０．０００１、最大０．００１、最大０．０１、最大０．０２、最大０．０３、最大０．０４、最大０．０５、最大０．０６、最大０．０７、最大０．０８、最大０．０９、最大０．１、最大０．２、最大最大０．３、最大０．４、最大０．５、最大０．６、最大０．７、最大０．８、最大０．９、最大１、最大１．１、最大１．２、最大１．３、最大１．４、最大１．５　、最大１．６、最大１．７、最大１．８、最大１．９、最大２、最大３、最大４、最大５、最大６、最大７、最大８、最大９、最大１０、最大１１、最大１２、最大１３、最大１４、最大１５、最大１６、最大１７、最大１８、最大１９、最大２０、最大２５、最大３０、最大３５、最大４０、最大４５、最大５０、最大６０、最大７０、最大８０、最大９０、最大１００、最大１　５０、最大２００、最大２５０、最大３００、最大４００、最大５００、最大６００、最大７００、最大８００、最大９００、最大１０００、最大２０００、最大３０００、最大４０００、最大５０００、最大６０００、最大７０００、最大８０００、最大９０００、最大１ｘ１０＾４、最大１ｘ１０＾５、最大１ｘ１０＾６、最大１ｘ１０＾９、最大１ｘ１０＾１０、最大１ｘ１０＾１１、最大１ｘ１０＾１２、最大１ｘ１０＾１３、最大１ｘ１０＾１４、または最大１ｘ１０＾１５の白血球あたりのウイルスの感染多重度（ＭＯＩ）で、白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。

【０１５３】

いくつかの実施形態において、白血球の表面への粘液腫ウイルスの吸着は、白血球あたり、約、例えば、０．０００００１－１×１０＾１５、０．０００１－１ｘ１０＾６、０．００１－１ｘ１０＾４、０．００１－１０００、０．００１－１００、０．００１－１０、０．００１－１、０．００１－０．１、０．００１－０．０１、０．０１－１ｘ１０＾４、０．０１－１０００、０．０１－１００、０．０１－１０、０．０１－１、０．０１－０．１、０．１－１ｘ１０＾４、０．１－１０００、０．１－１００、０．１－１０、０．１－１、１－１ｘ１０＾４、１－１０００、１－１００、または１－１０のウイルスの間の感染多重度（ＭＯＩ）で、白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。

【０１５４】

いくつかの実施形態において、白血球の表面に粘液腫ウイルスを吸着する工程は、約０．１から１０の間の感染多重度（ＭＯＩ）で、白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。いくつかの実施形態において、白血球の表面に粘液腫ウイルスを吸着する工程は、約０．０１から１００の間の感染多重度（ＭＯＩ）でＭＹＸＶに白血球を曝露することを含む。いくつかの実施形態において、白血球の表面に粘液腫ウイルスを吸着する工程は、約０．００１から１０００の感染多重度（ＭＯＩ）で、白血球をＭＹＸＶに曝露することを含む。

【０１５５】

いくつかの実施形態において、白血球は、約５分、１０分、１５分、２０分、２５分、３０分、３５分、４０分、４５分、５０分、５５分、６０分、６５分、７０分、７５分、８０分、８５分、９０分、９５分、１００分、１０５分、１１０分、１１５分、１２０分、２．５時間、３時間、３．５時間、４時間、４．５時間、５時間、５．５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１８時間、２０時間、２２時間、または２４時間の期間、本開示のＭＹＸＶと接触または吸着される。

【０１５６】

いくつかの実施形態において、白血球は、少なくとも５分、少なくとも１０分、少なくとも１５分、少なくとも２０分、少なくとも２５分、少なくとも３０分、少なくとも３５分、少なくとも４０分、少なくとも４５分、少なくとも５０分、少なくとも５５分、少なくとも６０分、少なくとも６５分、少なくとも７０分、少なくとも７５分、少なくとも８０分、少なくとも８５分、少なくとも９０分、少なくとも９５分、少なくとも１００分、少なくとも１０５分、少なくとも１１０分、少なくとも１１５分、少なくとも１２０分、少なくとも２．５時間、少なくとも３時間、少なくとも３．５時間、少なくとも４時間、少なくとも４．５時間、少なくとも５時間、少なくとも５．５時間、少なくとも６時間、少なくとも７時間、少なくとも８時間、少なくとも９時間、少なくとも１０時間、少なくとも１１時間、少なくとも１２時間、少なくとも１３時間、少なくとも１４時間、少なくとも１５時間、少なくとも１６時間、少なくとも１８時間、少なくとも２０時間、少なくとも２２時間、少なくとも２４時間、またはそれ以上の期間、本開示のＭＹＸＶと接触または吸着される。

【０１５７】

いくつかの実施形態において、白血球は、最大で５分、最大で１０分、最大で１５分、最大で２０分、最大で２５分、最大で３０分、最大で３５分、最大で４０分、最大で４５分、最大で５０分、最大で５５分、最大で６０分、最大で６５分、最大で７０分、最大で７５分、最大で８０分、最大で８５分、最大で９０分、最大で９５分、最大で１００分、最大で１０５分、最大で１１０分、最大で１１５分、最大で１２０分、最大で２．５時間、最大で３時間、最大で３．５時間、最大で４時間、最大で４．５時間、最大で５時間、最大で５．５時間、最大で６時間、最大で７時間、最大で８時間、最大で９時間、最大で１０時間、最大で１１時間、最大で１２時間、最大で１３時間、最大で１４時間、最大で１５時間、最大で１６時間、最大で１８時間、最大で２０時間、最大で２２時間、最大で２４時間、またはそれ以下の期間、本開示のＭＹＸＶと接触または吸着される。

【０１５８】

いくつかの実施形態において、ＢＭまたはＰＢＭＣ細胞は、エキソビボで約１時間、ＭＹＸＶ構築物と接触または吸着される。

【０１５９】

追加のエキソビボ方法

本明細書に開示される場合、ＭＹＸＶは、欠損した生来の抗ウイルス応答を有する細胞に選択的に感染することができ、細胞におけるそのような欠損の指標として使用することができる。したがって、対象から取り出された細胞は、本開示の方法を使用して、生来の抗ウイルス応答の欠損についてアッセイされ得る。そのような決定は、他の指標と組み合わせると、対象が特定の病状、例えば癌に苦しんでいる可能性があることを示し得る。細胞は、既知の生検方法を使用して、ヒト対象を含む対象から除去し得る。生検の方法は、検査する細胞の場所と種類に依存する。細胞を培養し、例えば、生ＭＹＸＶを培地に添加することによって、ＭＹＸＶに曝露することができる。感染多重度（ＭＯＩ）は、ＭＹＸＶへの曝露時に感染することが知られている陽性対照細胞培養を使用して、所定の細胞タイプ、密度、および培養技術のために最適なＭＯＩを決定するように変動し得る。

【０１６０】

培養細胞に添加されるＭＹＸＶの量は、細胞型、培養方法、およびウイルス株に応じて変動し得る。

【０１６１】

ＭＹＸＶによる培養細胞の感染力は、細胞死を引き起こすＭＹＸＶの能力を含む、当業者に知られている様々な方法によって決定することができる。これにはまた、ウイルス発現産物との酵素反応または化学反応を完了するために、細胞培養への試薬の添加も含まれる。ウイルス発現産物は、ＭＹＸＶゲノムに挿入されたレポーター遺伝子から発現させることができる。

【０１６２】

一実施形態では、ＭＹＸＶは、感染状態の検出の容易さを高めるように改変することができる。例えば、ＭＹＸＶは、位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡、またはラジオイメージングによって容易に検出できるマーカーを発現するように遺伝子改変することができる。マーカーは、比色反応または放射性標識反応に関与し得る、発現された蛍光タンパク質または発現された酵素であり得る。いくつかの実施形態において、マーカーは、試験されている細胞の特定の機能を妨害または阻害する遺伝子産物であり得る。

【０１６３】

医薬組成物

本開示のＭＹＸＶまたは本開示のＭＹＸＶを含む細胞は、医薬組成物の成分として製剤化することができる。したがって、いくつかの実施形態において、本開示は、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する粘液腫ウイルス、および薬学的に許容される希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。組成物は、薬学的に許容される濃度の塩、緩衝剤、保存料、および様々な適合性のある担体を含み得る。

【０１６４】

医薬組成物は、追加の抗癌剤などの追加の治療剤を含み得る。一実施形態では、組成物は化学療法剤を含む。化学療法剤は、例えば、対象の癌細胞または腫瘍性細胞に対して効果を示し、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶの腫瘍殺傷効果を阻害または減少させない実質的に任意の薬剤であり得る。例えば、化学療法剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、アルキルスルホネート、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、抗生物質、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、酵素、ポドフィロトキシン、白金含有剤またはサイトカインであり得るが、これらに限定されない。化学療法剤は、癌性または腫瘍性である特定の細胞型に対して有効であることが知られているものであり得る。

【０１６５】

薬学的に許容される希釈剤の割合および同一性は、例えば、選択された投与経路、生ウ

イルスとの適合性、および標準的な製薬慣行によって決定することができる。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶの生物学的特性を著しく損なうことのない成分で製剤化される。医薬組成物は、有効量の単数または複数の活性物質が薬学的に許容されるビヒクルと混合して組み合わされるように、対象への投与に適した薬学的に許容される組成物の調製のための既知の方法によって調製することができる。適切なビヒクルは、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，ＵＳＡ １９９５）に記載されている。これに基づいて、組成物は、１つ以上の薬学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤とともに、ＭＹＸＶの溶液またはＭＹＸＶを含む細胞を含み得、適切なｐＨであり、および生理学的流体と等浸透圧である緩衝液に含まれ得る。

【０１６６】

医薬組成物は、本明細書に開示されるように、選択された投与経路に依存して様々な形態で対象に投与され得る。本開示の組成物は、経口的または非経口的に投与され得る。非経口投与には、静脈内、腫瘍内、腹腔内、皮下、筋肉内、経上皮、鼻、肺内、髄腔内、直腸および局所の投与様式が含まれる。非経口投与は、選択された期間にわたる継続的な注入（例えば、静脈内注入）によるものであり得る。

【０１６７】

医薬組成物は、例えば、不活性希釈剤または担体と共に経口投与され得るか、またはそれは、ハードシェルまたはソフトシェルゼラチンカプセルに封入され得るか、またはそれは錠剤に圧縮され得る。経口治療投与の場合、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャー（ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなど）を発現するＭＹＸＶが賦形剤とともに取り込まれて、摂取可能な錠剤、頬側錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハースなどの形で使用することができる。

【０１６８】

本開示のＭＹＸＶの溶液または本開示のＭＹＸＶを含む細胞は、生理学的に適切な緩衝液中で調製することができる。通常の保管および使用条件下では、これらの調製物は微生物の増殖を防ぐための保存料を含むことができるが、それは生きているウイルスを不活化することはない。適切な製剤の選択および調製のための従来の手順および成分は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓおよび１９９９年に発行されたＴｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ：Ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ（ＵＳＰ ２４ ＮＦ１９）に記載されている。使用される医薬組成物の用量は、治療される特定の状態、状態の重症度、年齢、体調、サイズと体重を含む個々の対象のパラメーター、治療の期間、併用療法の性質（もしあれば）、投与の特定の経路、医療従事者の知識と専門知識の範囲内にある他の同様の要因に依存する。特定の実施形態において、治療用ウイルスは、室温での保存のために凍結乾燥され得る。

【０１６９】

キット

本開示の態様は、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶ、およびそれらを含むキットに関する。ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶ、またはＭＹＸＶを含む医薬組成物は、例えば、ＭＹＸＶの使用説明書を含むキットとしてパッケージすることができる。キットは、例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャー、１つ以上のレポーター導入遺伝子、１つ以上の非免疫調節導入遺伝子、またはそれらの組み合わせを発現する、本明細書に開示される任意のＭＹＸＶを含み得る。いくつかの実施形態において、キットは、ＭＹＸＶ－ＢｉＴＥ、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ、ＭＹＸＶ－ＭｉＴＥ、またはそれらの組み合わせを含む。キットは、例えば、レシピエント対象への投

与のための剤形にＭＹＸＶを製剤化するための、１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、担体、賦形剤、またはビヒクルを含むことができる。

【０１７０】

本明細書に開示されるのは、いくつかの実施形態において、本開示のＭＹＸＶ（例えば、ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥおよび／またはＭｉＴＥなどの多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶ）、および本明細書に開示されるようなＭＹＸＶの細胞送達用材料を含むキットである。キットは、例えば、骨髄および／または末梢血からの白血球などの複数の細胞を含むことができる。白血球は、ＭＹＸＶおよび細胞のレシピエントとなる対象に対して、自己、同種異系、ハプロタイプ一致、ＨＬＡ一致、またはＨＬＡ不一致であり得る。いくつかの実施形態において、複数の細胞は、本開示のＭＹＸＶに事前に吸着されているか、または曝露されている。キットは、ＭＹＸＶを複数の細胞に吸着させるための、および／またはＭＹＸＶ吸着された細胞をレシピエントに投与するための説明書を含むことができる。キットは、例えば、ＭＹＸＶを複数の細胞に吸着させ、未結合のＭＹＸＶを除去し、ＭＹＸＶ吸着細胞をレシピエント対象への投与用の剤形に製剤化するため、またはそれらの任意の組み合わせのための、１つ以上の薬学的に許容される緩衝液、希釈剤、担体、賦形剤、またはビヒクルを含むことができる。

【０１７１】

いくつかの実施形態において、キットは、本開示のＭＹＸＶおよび複数の細胞を含む。いくつかの実施形態において、キットは、本開示のＭＹＸＶ、ならびに、ＭＹＸＶを複数の細胞に吸着させるための、および／またはＭＹＸＶ吸着細胞をレシピエントに投与するための説明書を含む。いくつかの実施形態において、キットは、本開示のＭＹＸＶおよび２つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、担体、賦形剤、またはビヒクルを含む。いくつかの実施形態において、キットは、本開示のＭＹＸＶ、複数の細胞、ならびに、ＭＹＸＶを複数の細胞に吸着させるための、および／またはＭＹＸＶ吸着細胞をレシピエントに投与するための説明書を含む。いくつかの実施形態において、キットは、本開示のＭＹＸＶ、複数の細胞、および１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、担体、賦形剤、またはビヒクルを含む。いくつかの実施形態において、キットは、本開示のＭＹＸＶ、ＭＹＸＶを複数の細胞に吸着させるための、および／またはＭＹＸＶ吸着細胞をレシピエントに投与するための説明書、ならびに１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、担体、賦形剤、またはビヒクルを含む。いくつかの実施形態において、キットは、複数の細胞、ＭＹＸＶを複数の細胞に吸着させるための、および／またはＭＹＸＶが吸着された細胞をレシピエントに投与するための説明書、ならびに１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、担体、賦形剤、またはビヒクルを含む。いくつかの実施形態において、キットは、本開示のＭＹＸＶ、複数の細胞、ＭＹＸＶを複数の細胞に吸着させるための、および／またはＭＹＸＶ吸着細胞をレシピエントに投与するための説明書、ならびに１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、担体、賦形剤、またはビヒクルを含む。

【実施例】

【０１７２】

実施例１：ＢｉＫＥを発現する組換えＭＹＸＶ構築物の設計および構築

この実施例は、二重特異性ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー（ＢｉＫＥ）を発現する粘液腫ウイルスの設計および構築を実証する。ＢｉＫＥには、ＮＫ細胞および／または好中球の表面に発現する抗原（ＣＤ１６など）に特異的に結合する１つのドメインと、標的細胞に発現する抗原（多発性骨髄腫細胞の場合はＣＤ１３８など）に特異的に結合する１つのドメインを含めることができる。これらの分子は、ＮＫ細胞または好中球と腫瘍細胞の間に抗原特異的免疫シナプスを形成して、ＮＫ／好中球細胞を介した腫瘍標的の殺傷を誘発するように設計される。ＭＹＸＶからのＢｉＫＥ構築物（例えば、分泌構築物）の発現は、腫瘍微小環境でＭＭ細胞を殺傷するＮＫおよび好中球の能力を増強する可能性があり、ウイルス発現ＢｉＫＥ技術は、特異的な細胞表面マーカーが存在する任意の他の癌にも適用できる。

【０１７３】

ＢｉＫＥは、短いペプチドリンカーによって結合された、抗体に由来する２つの単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含むように設計した。一方のｓｃＦｖアームはＮＫ細胞と好中球の表面のＣＤ１６に結合し、もう一方のアームは選択した標的抗原（この場合は多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞の特徴であるＣＤ１３８）に結合する。

【０１７４】

抗ＣＤ１６　ｓｃＦｖヒトＡｂ配列（重鎖および軽鎖可変ドメイン）は、公的に入手可能な供給源（ＡＹ３４５１６０．１およびＡＹ３４５１６１．２；Ｇｅｎｂａｎｋ）から入手した。抗ＣＤ１３８　ｓｃＦｖ配列は、公的に入手可能な供給源（Ｇｅｎｂａｎｋ）から入手した。ｓｃＦｖを形成するために、抗ＣＤ１６可変領域は（Ｇ４Ｓ１）３リンカーによって接続され、抗ＣＤ１３８可変領域は（Ｇ４Ｓ１）３リンカーによって接続された。抗ＣＤ１６および抗ＣＤ１３８　ｓｃＦｖは、（Ｇ４Ｓ１）２フレキシブルリンカーによって相互に接続された。ＢｉＫＥは、Ｎ末端からＣ末端に向かってＶＬ（ＣＤ１３８）－ＶＨ（ＣＤ１３８）－ＶＨ（ＣＤ１６）－ＶＬ（ＣＤ１６）に配置され、Ｎ末端にマウスＩｇ重鎖からのシグナルペプチドが、Ｃ末端にＶ５タグが含まれていた。（図１Ａおよび配列番号６）。ＢｉＫＥ構築物は、ヒトのコドン使用に最適化され、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔによって合成された。

【０１７５】

ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰは、Ｃ末端Ｖ５タグを有するＢｉＫＥコード配列（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）を含み、ポックスウイルス合成初期／後期プロモーター（ｓＥ／Ｌ）の制御下にあるＢｉＫＥ発現カセットを、野生型（ｗｔ）ＭＹＸＶ株Ｌａｕｓｓａｎｅ（ＭＹＸＶ－Ｌａｕ）ゲノムのＭ１３５遺伝子とＭ１３６遺伝子の間の遺伝子間位置に挿入することによって構築された。強化緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ）の発現カセットは、ＢｉＫＥ発現カセットのすぐ下流に挿入され、その発現もまたポックスウイルス合成初期／後期プロモーターによって駆動された（図１Ｂ）。ＭＹＸＶ感染はＧＦＰ発現のライブイメージングによって監視できるため、ｅＧＦＰはインビトロおよびインビボでのＭＹＸＶ複製の蛍光マーカーとして機能し得る。

【０１７６】

ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ構築物を作製するために、組換えプラスミドは、Ｇａｔｅｗａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）ゲートウェイシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して最初に構築された。上流および下流のハイブリダイズする配列をＰＣＲによって増幅し、適切なｐＤＯＮＲベクターを用いたＧａｔｅｗａｙＢＰ組換えによってエントリークローンを生成した。最終的な組換えプラスミドは、３つのエントリークローンをデスティネーションベクターと順次様式で再結合することによって構築した。ＢｉＫＥおよびｅＧＦＰ発現カセットは、ＲＫ１３細胞にＭＹＸＶ－Ｌａｕを感染させ、適切な組換えプラスミドをトランスフェクトすることにより、ＭＹＸＶゲノムに挿入された。組換えウイルスの純粋なストックを得るために、複数ラウンドの病巣（ｆｏｃｉ）精製を実施し、適切なプライマーセットを使用したＰＣＲによって特異性を確認した。

【０１７７】

BiKE_CD16_F TCAGCAAGGACACATCCTCTAA (配列番号 1)

BiKE_CD16_R TAAGGATCCTCATTGGACTGC (配列番号 2)

【０１７８】

純度もまた、適切なプライマーセットを使用するＰＣＲによって確認された（図１Ｃ－Ｄ）。

【０１７９】

ＢｉＫＥ発現は、細胞溶解物および上清の両方において、Ｖ５タグ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に特異的なマウスモノクローナル抗体を使用することにより、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ

感染ＲＫ１３細胞からの溶解物中の５６ｋＤａのバンドの存在を検出することによって、ウエスタンブロットによって確認された（図１Ｅ）。ＲＫ１３細胞における新しい構築物ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの複製能力は、親ウイルスＭＹＸＶ－ＧＦＰと同様であった（図１Ｆ）。

【０１８０】

配列番号３は、ＢｉＫＥをコードする導入遺伝子のヌクレオチド配列を提供する。配列番号４はＢｉＫＥをコードする導入遺伝子のアミノ酸配列を提供する。配列番号４において、Ｎ末端シグナル配列に下線を付し、リンカーは太字であり、Ｃ末端Ｖ５タグはイタリック体で示されている。いくつかの実施形態において、成熟型のＢｉＫＥは、シグナル配列および／またはＶ５タグを含まない。例えば、いくつかの実施形態では、本開示の成熟ＢｉＫＥは、配列番号５の配列を含む。

【０１８１】

DNA BiKE 配列:

ATGAAGAGCCAGACCCAGGTGTTCATCTTCCTGCTGCTGTGCGTGAGCGGCGCCCA
CGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
AGGGTGACCATCAGCTGCAGCGCCAGCCAGGGCATCAACAACTACCTGAACTGGTA
CCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGGAGCTGCTGATCTACTACACCAGCACCCTGC
AGAGCGGCGTGCCCAGCAGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCT
GACCATCAGCAACCTGGAGCCCGAGGACATCGGCACCTACTACTGCCAGCAGTACA
GCAAGCTGCCCAGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGTGGCGGT
GGCTCCGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCA
GAGCGGCAGCGAGCTGATGATGCCCGGCGCCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCC
ACCGGCTACACCTTCAGCAACTACTGGATCGAGTGGGTGAAGCAGAGGCCCGGCCA
CGGCCTGGAGTGGATCGGCGAGATCCTGCCCGGCACCGGCAGGACCATCTACAACG
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCTTCACCGCCGACATCAGCAGCAACACCGTGCAG
ATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAG
GGACTACTACGGCAACTTCTACTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCG
TGACCGTGAGCAGCGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGTGGGTCGCAGGTTACTCTG
AAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCT
TTCTCTGGGTTTTCACTGAGGACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTCGTCAGCCT
TCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGACAAGCGCTA

TAATCCAGCCCTGAAGAGCCGACTGACAATCTCCAAGGATACCTCCAGCAACCAGG
TATTCCTCAAAATCGCCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTC
AAATAAACCCCGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTG
CCGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGACACTGTG
CTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCC
TGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTTTGATGGTGATAGTTTTATGAACTGGTACCAA
CAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATACTACATCCAATCTAGAATC
TGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGCCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACA
TCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATACTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAG
GATCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGGTAAGCCTATCCC
TAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGTAA (**配列番号** 3).

【０１８２】

タンパク質 BiKE **配列** :

MKSQTQVFIFLLLCVSGAHGDIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQGINNYLNW
YQQKPDGTVELLIYYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIGTYYCQQYSKLPR
TFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGYTFSN
YWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGTGRTIYNEKFKGKATFTADISSNTVQMQLSSLTSEDS
AVYYCARRDYYGNFYYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSQVTLKESGPGILQPSQ
TLSLTCSFSGFSLRTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDT
SSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQINPAWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGG
SDTVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSFMNWYQQKPGQPPKLLIYTTSNL
ESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK*GKPIPNPL*
LGLDST (**配列番号** 4).

【０１８３】

シグナルペプチドおよびＶ５タグを欠くタンパク質 BiKE 配列

DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQGINNYLNWYQQKPDGTVELLIYYTSTLQ
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIGTYYCQQYSKLPRTFGGGTKLEIKGGGGSGGG
GSGGGGSSQVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWVKQRPGHGLEWIGE
ILPGTGRTIYNEKFKGKATFTADISSNTVQMQLSSLTSEDSAVYYCARRDYYGNFYYAM
DYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLRTSGMGV
GWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTAT
YYCAQINPAWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDTVLTQSPASLAVSLGQR
ATISCKASQSVDFDGDSFMNWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLN
IHPVEEEDTATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK (配列番号 5).

【０１８４】

実施例２：多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞で汚染されたヒトの初代患者サンプルを使用するインビトロ研究

薬剤抵抗性患者からの多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞で汚染された初代患者サンプルのＭＹＸＶ感染に対する感受性を評価するために、異なるレベルのＭＭ細胞を有する患者３人の患者からの初代非操作末梢血（ＰＢ）（ＣＤ１３８＋）は、Ｆｉｃｏｌｌ－ｐａｑｕｅ ｐｌｕｓ勾配を使用する精製に供し、単核細胞を単離し、赤血球（ＲＢＣ）の大部分を除去した。患者は患者番号２、３、および４と称する。

【０１８５】

【表４】

初代 MM 細胞 (CD138+) のパーセンテージ

患者 #	% MM 細胞
2	<1.0
3	2.3
4	15.0

【０１８６】

次に、懸濁液中のこれらの初代細胞をモック処理するか（すなわち、ウイルスを加えない）、またはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰとともに３７℃で１時間インキュベートして、ウイルスを吸着させた。実験は、図２－５および表４－５に示すように、ＭＯＩ＝１０、１、および０．１を含むさまざまな感染多重度（ＭＯＩ）で実施された。この後、モック処理またはＭＹＸＶ処理した細胞を３７℃で一晩（約２４時間）インキュベートして、ウイルス感染を可能にした。患者＃３の場合、ＭＯＩ＝１０、１．０、０．１でのウイルス感染（ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥを使用）の割合、およびＭＭ細胞の生存率、アポトーシス、細胞死の割合についてフローサイトメトリーを使用して決定した（図２Ａ－Ｃ）。これに加えて、ウイルスに曝露された患者サンプル中の非感染ＭＭ細胞の生存率、アポトーシス、および細胞死のパーセンテージを、フローサイトメトリーを使用して評価した（図３Ａ－Ｂ）。これにより、ウイルスに直接感染していなかった（例えば、ウイルス特異的蛍光タンパク質を発現していない）が、「オフターゲット」方式で、例えば、ＭＹＸＶ活性化または同じ患者サンプルからのＢｉＫＥ活性化白血球によって殺傷された細胞のＭＭ細胞死の測定が可能になる。

【０１８７】
患者＃４からの細胞におけるＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰを使用する感染のレベルは、最初に、蛍光顕微鏡を使用して評価された（図４Ｄ）。感染、生存、およびアポトーシスのＭＭ細胞のパーセンテージは、フローサイトメトリーを使用して決定された（図４Ａ－Ｃ）。さらに、ウイルスに曝露されたが感染していない骨髄腫細胞の生存率、アポトーシス、および細胞死のパーセンテージを、フローサイトメトリーを使用して評価した（図５Ａ－Ｂ）。

【０１８８】
ＣＤ１３８を多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞のマーカーとして使用した。ＧＦＰはＭＹＸＶ感染細胞のマーカーとして使用した。アネキシンＶはアポトーシス細胞のマーカーとして使用された。近ＩＲ染色は、死細胞のマーカーとして使用した。

【０１８９】
表４および５は、患者＃３および＃４からのデータを要約する。患者２のＣＤ１３８＋ＭＭ細胞の量は１％未満であったため、その患者のＭＭ細胞感染と細胞死の割合を決定することはできなかった。表５に示すアポトーシスおよびＭＭ細胞殺傷データは、ＣＤ１３８＋（ＭＭ）細胞をゲーティングすることによって生成されたものであり、データは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥが薬剤抵抗性患者に由来する初代ヒト末梢血サンプル中のＭＭ細胞に効率的に感染して殺傷できることを示す。患者＃３の場合、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥは、テストされたすべての異なるＭＯＩでＭＭ細胞の殺傷を増加させた（図２Ａ－Ｃ、および表５）。例えば、１０のＭＯＩでｈｕＢｉＫＥを発現するＭＹＸＶに感染した細胞の５０．１％が殺傷され、モック処理された細胞の６．５１％が殺傷された。患者＃４の場合、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥはウイルス感染後に感染したＭＭ細胞も殺傷した（図４Ａ－Ｃおよび表５）。例えば、ＭＯＩが１０のＭＹＸＶを発現するＢｉＫＥに感染した細胞の３５．９％が殺傷され、モック処理された細胞の４．８５％が殺傷された。

【０１９０】
表５．ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥへの曝露の２４時間後のｈｕ初代ＭＭ細胞（ＣＤ１３８＋）の感染、アポトーシス、および細胞死のパーセンテージ。ＭＯＩ＝感染の多重度。モック＝モック感染。感染率、ＧＦＰ陽性によって決定された。アネキシンＶ＋は、アネキシンＶ陽性（アポトーシスまたは死滅）を示す。アネキシンＶ－は、アネキシンＶ陰性（アポトーシスまたは死滅ではない）を示す。Ｎｅａｒ－ＩＲ＋は、Ｎｅａｒ　ＩＲ＋（死滅）を示す。

【０１９１】
【表５】

	患者 #3				患者 #4			
	モック	MOI =10	MOI =1	MOI =0.1	モック	MOI =10	MOI =1	MOI =0.1
% 感染	0.83	48.1	33.2	5.9	0.86	22.1	5.23	1.84
%アネキシンV- 近 IR+	0.91	0	0.087	0.26	1.07	6.29	14.2	3
%アネキシンV+ 近 IR+	5.6	50.1	32.8	14.3	3.78	29.6	12.1	5.53
% 近 IR+	6.51	50.1	32.9	14.56	4.85	35.9	26.3	8.53

【０１９２】
表６に示されるデータは、感染していないＭＭ細胞（すなわち、ＣＤ１３８$^{+}$ＧＦＰ$^{-}$）の殺傷をゲーティングすることによって生成した。感染していないＭＭ細胞のこの「オフターゲット」殺傷は、モック処理細胞と比較して、すべてのＭＯＩでＭＹＸＶ－ＢｉＫＥの方が高かった（患者＃３の場合は図３Ａ－Ｂと表６、患者＃４の場合は図５Ａ－Ｂと表６）。例えば、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥをＭＯＩ　１０で培養物に添加した実験では、モッ

ク処理した細胞の５．４１％と比較して、患者４の非感染細胞の９６．１２％が殺傷した。

【０１９３】

表６．ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥへの培養曝露から２４時間後の、感染していない（ＧＦＰ陰性）ｈｕ－初代ＭＭ細胞（ＣＤ１３８＋）の生存率、アポトーシス、および細胞死のパーセンテージ。ＭＯＩ＝感染の多重度。モック＝モック感染。アネキシンＶ＋は、アネキシンＶ陽性（アポトーシスまたは死滅）を示す。アネキシンＶ－は、アネキシンＶが陰性（アポトーシスまたは死滅ではない）ことを示す。近－ＩＲ＋は、近ＩＲ＋（死滅）を示す。

【０１９４】

【表６】

	患者#3					患者 #4				
	モック	MOI =10	MOI =1	MOI =0.1		モック	MOI =10	MOI =1	MOI =0.1	
% アネキシンV- IR+		7.79		16.6	14.5	11.9	1.11	9.32	24.7	26.1
% アネキシンV+ 近 IR+			11.4	20.6	19.7	17.1	4.3	86.8	60.1	31.9
% 近 IR+		19.2		37.2		34.3	29	5.41	96.12	84.8	58

【０１９５】

実施例３：ＢｉＫＥはヒト多発性骨髄腫細胞およびヒトナチュラルキラー細胞に特異的に結合する

この実施例は、本開示のＢｉＫＥが、ヒト多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞およびヒトナチュラルキラー（ＮＫ）細胞に特異的に結合することを実証する。

【０１９６】

実施例１に記載のＭＹＸＶ－ＢｉＫＥは、ＲＫ１３細胞において増殖された。分泌されたＢｉＫＥを含む、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに感染したＲＫ１３細胞からの上清を採取した。として、モック感染したか、または野生型ＭＹＸＶに感染したＲＫ１３細胞からも上清を回収した。

【０１９７】

採取した上清を、ヒトＮＫ細胞またはヒトＭＭ（Ｕ２６６）細胞の培養物に加えた。細胞に結合したＢｉＫＥを検出するために、細胞をＢｉＫＥのＣ末端にあるＶ５タグに特異的なＰＥ結合体化モノクローナル抗体で染色し、洗浄し、そしてフローサイトメトリーで分析した。

【０１９８】

図６は、ＢｉＫＥがヒトＭＭ細胞およびＮＫ細胞に結合したが、対照ＭＭ細胞またはＮＫ細胞（モック感染または野生型ＭＹＸＶ感染細胞から採取した上清とインキュベートした）では結合が検出されなかったことを実証する。

【０１９９】

実施例４：ＢｉＫＥは、ヒトナチュラルキラー細胞と共培養されたヒト多発性骨髄腫細胞の殺傷を増加させる

この実施例は、本開示のＢｉＫＥが、ヒトナチュラルキラー（ＮＫ）細胞と共培養されたヒト多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞の殺傷を増加させることを実証する。

【０２００】

ＲＫ１３細胞は、１、５、または１０の感染多重度（ＭＯＩ）で実施例１に記載のＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに感染された。分泌されたＢｉＫＥを含む、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ感染ＲＫ１３細胞からの上清を採取した。対照として、モック感染したＲＫ１３細胞から上清も採取した。

【０２０１】
採取した上清を、初代ヒトＮＫ細胞およびヒトＭＭ（Ｕ２６６）細胞を含む共培養物に加えた。２４時間のインキュベーション後、細胞を染色してＭＭ細胞（ＣＤ１３８＋）と死細胞（近ＩＲ染色）を特定し、フローサイトメトリーで分析した。
【０２０２】
図７は、ＢｉＫＥ抗体がＮＫ細胞媒介性のＭＭ細胞の殺傷を誘導することができ、そして殺傷がソース上清培養物のＭＯＩに依存していたことを実証する。
【０２０３】
モック感染細胞からの上清中でインキュベートされた共培養について、細胞の１０．６％は、ＣＤ１３８＋近ＩＲ－であり、そして細胞の０．７４％は、ＣＤ１３８＋、近ＩＲ＋であった。ＭＹＸＶ－ＢＩＫＥに１のＭＯＩで感染した細胞の上清でインキュベートした共培養では、５．１７％の細胞がＣＤ１３８＋近ＩＲ－であり、１．７１％の細胞がＣＤ１３８＋、近ＩＲ＋であった。ＭＹＸＶ－ＢＩＫＥに５のＭＯＩで感染した細胞の上清でインキュベートした共培養では、２．９９％の細胞がＣＤ１３８＋近ＩＲ－であり、そして４．４２％の細胞がＣＤ１３８＋、近ＩＲ＋であった。ＭＹＸＶ－ＢＩＫＥに１０のＭＯＩで感染した細胞の上清でインキュベートした共培養では、０．０２４％の細胞がＣＤ１３８＋近ＩＲ－であり、７．０９％の細胞がＣＤ１３８＋、近ＩＲ＋であった。
【０２０４】
Ｖｅｒｏ細胞から採取したＢｉＫＥを使用して、ＮＫエフェクター細胞をＮＫ枯渇ＰＢＭＣエフェクター細胞と比較し、ＢｉＫＥとの４８時間のインキュベーションを用いて、より大規模な共培養実験を実施した。
【０２０５】
健康な患者からの初代ヒト末梢血からのＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳ勾配を使用して最初に単離された。ＮＫ細胞は、ＭＡＣＳヒトＮＫ細胞分離キットとＬＳ磁気カラムを使用してこれらのＰＢＭＣから単離し、磁気標識された細胞を枯渇させた。次に、ＮＫ細胞またはＰＢＭＣを、ＢｉＫＥの存在下または非存在下で、ヒトＭＭ標的細胞（Ｕ２６６細胞）と共培養し、生存率に対するＢｉＫＥの影響を決定した。１ｘ１０＾６　ＮＫ細胞またはＰＢＭＣを、２ｘ１０＾５　Ｕ２６６細胞とともに、完全培地、０．５×ＭＹＸＶ－ＧＦＰ上清（２５０μＬ完全培地＋ＭＯＩ　５で４８時間、ＭＹＸＶ－ＧＦＰに感染させたＶｅｒｏ細胞からの２５０μＬ無血清ＲＰＭＩ上清）、０．２５×ＭＹＸＶ－ＢＩＫＥ－ＧＦＰ上清（３７５μＬの完全培地＋ＭＯＩ　５で４８時間、ＭＹＸＶ－ＢＩＫＥ－ＧＦＰに感染させたＶｅｒｏ細胞からの１２５μＬの無血清ＲＰＭＩ上清）、または０．５×ＭＹＸＶ－ＢＩＫＥ－ＧＦＰ上清（同様に調製）の存在下でインキュベートした。すべてのサンプルを２４ウェルプレートにて３７℃でインキュベートした。次いで、処理４８時間後に、細胞を近ＩＲ　生／死染色で標識した。続いて、細胞を、条件ごとに１００μＬの染色バッファー中の１μＬ　ヒト抗ＣＤ１３８抗体（ＭＭ細胞を同定するため）および１μＬ　抗Ｖ５抗体（ＢＩＫＥ構築物上のＶ５タグを検出するため）で、光から保護して標識し、４℃にて１５分間インキュベートした。次に、１００μＬのＣｙｔｏｆｉｘを使用してすべてのサンプルを固定し、次いで４℃にて１５分間インキュベートし（光から保護する）、その後フローサイトメトリー分析のために２７０μＬの染色バッファーに再懸濁した。
【０２０６】
図２２は、処理後４８時間で死滅したＣＤ１３８＋細胞のパーセントを示す。共培養は３連で行い、近ＩＲ　生／死染色による死滅したＵ２６６細胞集団の割合のフローサイトメトリー分析に基づいて、感染ごとにｐ値を取得した。有意性（＊＝ｐ＜０．０５；＊＊＝ｐ＜０．０１；＊＊＊＝ｐ＜０．００１）は、多重比較のＨｏｌｍ－Ｓｉｄａｋのｔ検定を使用して決定された。データは、ＢｉＫＥがＮＫ細胞によるＭＭ細胞の殺傷を増強できることを示す。例えば、ＮＫ細胞との共培養におけるＭＭ細胞の殺傷は、０．５ＸＭＹＸＶ－ＧＦＰ上清とインキュベートした培養物よりも、０．５ＸＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ上清とインキュベートしたサンプルの方が有意に高かった。

【０２０７】
実施例５：ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥはインビトロでヒト血液癌細胞に感染して殺傷させる
ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに対するヒト血液癌細胞の感受性を評価するために、ヒト急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）および多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞株をＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに感染させた。ＡＭＬ細胞の例としてＴＨＰ－１細胞を使用した。ＭＭ細胞の例としてＵ２６６細胞を使用した。Ｕ２６６細胞は、２０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、および１００Ｕ／ｍｌのペニシリン－ストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ１６４０で維持された。ＴＨＰ－１細胞は、１０％ＦＢＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、および１００Ｕ／ｍｌのペニシリン－ストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ１６４０で維持された。

【０２０８】
細胞をモック感染させるか、または０．１、１、または１０の感染多重度（ＭＯＩ）でＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰ、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰ、または野生型（ＷＴ）ＭＹＸＶ－ＧＦＰに感染させた。細胞は、ウイルスを吸着させるために３７℃で１時間感染させ、感染後２４時間または４８時間（ｈｐｉ）までインキュベートした。

【０２０９】
感染は、蛍光顕微鏡法によって２４および４８ｈｐｉで評価された。画像は５倍の倍率で、３３８．００ミリ秒の露出、２．５のゲインで撮影された。図８Ａおよび図８Ｂは、それぞれ感染後２４時間および４８時間でのＴＨＰ－１細胞の感染を示す。図８Ｃおよび図８Ｄは、それぞれ感染後２４時間および４８時間でのＵ２６６細胞の感染を実証する。

【０２１０】
感染率はまた、フローサイトメトリーによって定量化され、感染細胞の集団がＧＦＰ発現について評価された。図１７Ａは、感染後２４時間および４８時間でＧＦＰ陽性であったＴＨＰ－１細胞のパーセントを示す。図１７Ｂは、感染後２４時間および４８時間でＧＦＰ陽性であったＵ２６６細胞のパーセントを示す。

【０２１１】
細胞殺傷は、近ＩＲ生／死染色を使用するフローサイトメトリーによって、感染後２４時間および４８時間で評価された。図９はＴＨＰ－１細胞の殺傷を実証する。図１０は、Ｕ２６６細胞の殺傷を実証する。

【０２１２】
細胞殺傷は、ＧＦＰ＋細胞（感染細胞の直接殺傷または標的上殺傷のため）およびＧＦＰ陰性細胞（非感染細胞の間接殺傷または標的外殺傷のため）をゲーティングすることによってさらに特徴づけられた。図１８Ａは、２４時間および４８時間で殺傷された感染Ｕ２６６細胞のパーセントを示す。図１８Ｂは、２４時間および４８時間で殺傷された非感染Ｕ２６６細胞のパーセントを示す。図１９は、感染したＵ２６６細胞に対する死滅したＵ２６６細胞の比率を提供する。

【０２１３】
これらのデータは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥがヒト血液癌細胞に感染し、その中で複製し、そしてそれを殺傷することができ、いくつかの場合において、ＢｉＫＥを欠くＭＹＸＶと比較して殺傷の増強を誘発できることを示す。理論に拘束されることを望まないが、例えば、実施例４に実証されるように、ＢｉＫＥ構築物が関与することができるエフェクター免疫細胞が存在する条件において、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥによって誘導される殺傷はさらに増強され得る。

【０２１４】
実施例６：ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥは骨髄から初代ヒト多発性骨髄腫細胞を殺傷する
この実施例は、ヒト患者からの骨髄サンプル中の多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞のＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ殺傷を実証する。

【０２１５】
一次骨髄サンプルは、骨髄生検を介して多発性骨髄腫患者から得られ、単核細胞を単離するためにＦｉｃｏｌｌ－ｐａｑｕｅ　ｐｌｕｓ勾配を使用する精製に供された。次に、

単核細胞を条件ごとに３８０μＬの完全培地に再懸濁して２４ウェルプレートに入れた。
【０２１６】
次に、懸濁液中のこれらの初代細胞をモック処理するか（すなわち、ウイルスを添加しない）、またはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰ、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰ、または野生型ＭＹＸＶ－ＧＦＰとともに３７℃で１時間インキュベートして、ウイルスの吸着を可能にした。実験は、ＭＯＩ＝１０、１、および０．１を含むさまざまな感染多重度（ＭＯＩ）で実施された。１時間のインキュベーション後、１２０μＬの完全培地を各ウェルに添加し、プレートを３７℃で一晩（約２４時間）インキュベートして、ウイルス感染を進行させた。
【０２１７】
次に、感染２４時間後に、細胞を近ＩＲ　生／死染色で標識した。続いて、初代細胞を、条件ごとに１００μＬの染色バッファー中の１μＬのヒト抗ＣＤ１３８抗体で標識し、遮光して４℃で１５分間インキュベートした。次に、１００μＬのＣｙｔｏｆｉｘを使用してすべてのサンプルを固定し、遮光して４℃で１５分間インキュベートし、その後、フローサイトメトリー分析のために２７０μＬの染色バッファーに再懸濁した。
【０２１８】
殺傷されたＭＭ細胞のパーセントは、フローサイトメトリーによって評価された。ＣＤ１３８は多発性骨髄腫（ＭＭ）細胞のマーカーとして使用された。図２０は、示されたＭＯＩでＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰ、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰ、または野生型ＭＹＸＶ－ＧＦＰに感染したＣＤ１３８＋ＭＭ細胞の割合を示す。図１１は、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥによるＭＭ細胞の殺傷を実証する。図２１は、４人の対照から得られたサンプルについて、モック感染またはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ－ＧＦＰまたは野生型ＭＹＸＶ－ＧＦＰの１０のＭＯＩでの感染後にＣＤ１３８＋であった無傷の細胞の割合を定量化する。
【０２１９】
これらのデータは、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥが原発性ヒト血液癌細胞に感染および殺傷することができることを実証する。いくつかの場合において、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥは、ＢｉＫＥを発現しないＭＹＸＶと比較して、強化された殺傷を誘発することが観察されている。
【０２２０】
実施例７：二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、二重特異性ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー（ＢｉＫＥ）、および／または膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー（ＭｉＴＥ）を発現する組換えＭＹＸＶ構築物の設計および構築。
この実施例は、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、二重特異性ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー（ＢｉＫＥ）または膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー（ＭｉＴＥ））を発現する組換えＭＹＸＶ構築物の設計および構築を実証する。
【０２２１】
免疫細胞に対する結合特異性、および標的抗原に対する結合特異性を有する多重特異性タンパク質をコードするＤＮＡ配列が生成される。例えば、ＣＤ１３８またはＣＤ３に結合する抗体からの軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を使用して、免疫細胞に結合特異性を付与することができる。ＣＤ１３８、ＣＤ１９、ＥｐＣＡＭ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、ＥＧＦＲ、ＣＥＡ、ＥｐＨＡ２、ＣＤ３３、またはＭＣＳＰに結合する抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含むｓｃＦｖを使用して、標的抗原、例えば、目的の癌細胞によって発現される標的抗原に結合特異性を付与することができる。ペプチドリンカーは、任意選択で、各ｓｃＦｖの重鎖および軽鎖可変フラグメントを連結し、ｓｃＦｖを一緒に連結して多重特異性タンパク質を形成するために使用することができる。いくつかの場合において、タンパク質は、多重特異性免疫細胞エンゲージャーの分泌を促進するためのシグナル配列を含むことができる。いくつかの場合において、タンパク質は、原形質膜に固定するための膜貫通ドメインを含むことができる。いくつかの場合において、タンパク質は、タンパク質の検出および／または精製のためのエピトープタグ（例えば、Ｖ５タグ）を含むことができる。

【０２２２】
プラスミドは、粘液腫ウイルスゲノムへの多重特異性免疫細胞エンゲージャーの組み込みのために生成される。多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＢｉＴＥ、ＢｉＫＥ、および／またはＭｉＴＥ）は、ウイルス感染細胞でのみ発現を可能にするポックスウイルス合成初期／後期プロモーター（ｓＥ／Ｌ）の下で発現させることができる。多重特異性免疫細胞エンゲージャー導入遺伝子に加えて、レポーター遺伝子、例えば緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはＴｄＴｏｍａｔｏも、導入遺伝子を発現する組換えウイルスの迅速な選択および精製のために、ポックスウイルス　プロモーターの下で任意選択にて発現させることができる。追加のレポーター遺伝子、例えば、ホタルルシフェラーゼ（Ｆ－Ｌｕｃは、生きている動物におけるウイルス複製をリアルタイムで監視することを可能にし得る。導入遺伝子およびレポーター遺伝子は、粘液腫ウイルスゲノムのＯＲＦ　Ｍ１３５とＭ１３６の間に挿入されて、親の野生型ＭＹＸＶバックボーンを維持することができる。導入遺伝子は、遺伝子ノックアウトウイルスのバックグラウンドに挿入することもできる。この場合、Ｍ１３５遺伝子座は、Ｍ１３５ノックアウトを備えた導入遺伝子発現カセットの構築のために選択される。最終的な組換えプラスミドカセットには、導入遺伝子、レポーター遺伝子、および組換えが行われるＭＹＸＶの遺伝子配列が含まれている。

【０２２３】
組換えプラスミドの構築は、細菌における組換えによる複数のＤＮＡ断片からの単一のプラスミドの構築を可能にするゲートウェイ（Ｇａｔｅｗａｙ）技術（ｕｌｔｉｓｉｔｅ　Ｇａｔｅｗａｙ　Ｐｒｏ）によって行われる。最終的な組換えカセットを作成するために、異なる構成要素を含む４つのエントリークローンが生成される。それらは次のとおりである：ａ）要素１、粘液腫ウイルスＭ１３５領域、ｂ）要素２、ポックスウイルスＳｙｎＥ／Ｌプロモーター配列およびＶ５タグを備えた多重特異性免疫細胞エンゲージャー、ｃ）要素３、ポックスウイルス後期ｐ１１プロモーター下のレポーター遺伝子ＴｄＴｏｍａｔｏ、ｄ）要素４、ポックスウイルスＳｙｎ　Ｅ／Ｌプロモーター下のホタルルシフェラーゼ、および粘液腫ウイルスＭ１３６遺伝子配列。Ｍ１３５ＫＯウイルスバックボーンを作製するために、要素１はＭ１３４ＯＲＦからの部分配列、およびＭ１３５　ＯＲＦからの５０ｎｔに置き換えられる。最終的な組換えプラスミドカセットを構築するために、これらの４つの要素はすべて、標準プロトコルを使用したＬＲ組換え反応によってゲートウェイデスティネーションベクターを用いて組換えられる。最終的な組換えプラスミドは、（ｉ）ｐＤＥＳＴ　Ｍ１３５－１３６－ＦＬｕｃ－ＥＮＧＡＧＥＲ－ＴｄＴｏｍａｔｏ、および（ｉｉ）ｐＤＥＳＴ　Ｍ１３５ＫＯ－Ｆｌｕｃ－ＥＮＧＡＧＥＲ－ＴｄＴｏｍａｔｏであり、それぞれ図１２および図１３に示されている。

【０２２４】
組換えウイルスを作製する前のこの段階で、プラスミドのＲＫ１３細胞へのトランスフェクション後、多重特異性免疫細胞エンゲージャーの発現をウエスタンブロット分析（例えば、Ｖ５エピトープタグについて）によって確認することができる。

【０２２５】
導入遺伝子および選択マーカーを隣接配列と共にコードする最終的な組換えプラスミドを、野生型ＭＹＸＶ　Ｌａｕｓａｎｎｅに感染したＲＫ１３細胞にトランスフェクトする。組換えウイルスは、選択マーカーの発現に基づいて単離され、連続的に精製される。多重特異性免疫細胞エンゲージャーの発現は、ウエスタンブロット分析および機能アッセイによって再び確認される。ウイルスは、野生型ウイルスのバックグラウンドとノックアウトバックグラウンド（この例では、Ｍ１３５のノックアウト）に対する多重特異性免疫細胞エンゲージャーを含むように生成される。

【０２２６】
多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶ構築物の複製能力は、例えば、ＲＫ１３細胞に感染させることによって、試験し、および野生型ＭＹＸＶと比較することができる。

【０２２７】

この技術は、代替の隣接配列を使用することにより、本明細書に開示される他の遺伝子座でノックアウトおよび／またはノックインを生成するように適合させることができる。例えば、Ｍ１３５ではなくＭ１５３における欠失または破壊を含み、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶは、例えば、Ｍ１５３遺伝子への挿入のための適切な隣接配列を使用することによって生成することができる。

【０２２８】

実施例８：ＭＹＸＶを発現する多重特異性免疫細胞エンゲージャーは血液癌細胞の殺傷を増強する

この実施例は、原発性ヒト血液癌細胞を殺傷する能力について、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する本開示のＭＹＸＶを評価することを実証する。初代血液および骨髄サンプルは、血液癌の患者から入手される。サンプルは、Ｆｉｃｏｌｌ－ｐａｑｕｅ ｐｌｕｓ勾配を使用する精製に供され、単核細胞が単離され、赤血球（ＲＢＣ）の大部分が除去される。

【０２２９】

次に、懸濁液中のこれらの初代細胞をモック処理するか（すなわち、ウイルスを添加しない）、または本開示のＭＹＸＶと共に３７℃で１時間インキュベートして、ウイルスを吸着させる。実験は、ＭＯＩ＝１０、１、および０．１を含むさまざまな感染多重度（ＭＯＩ）で実施される。この後、モック処理またはＭＹＸＶ処理した細胞を３７℃で一晩（約２４時間）インキュベートして、ウイルス感染を可能にする。

【０２３０】

ウイルス感染のパーセンテージならびに癌細胞の生存率、アポトーシス、および細胞死のパーセンテージは、フローサイトメトリーを使用して決定される。パーセンテージは、ウイルスに曝露された患者サンプル中の非感染癌細胞についても決定され、ウイルスに直接感染していないが（すなわち、いかなるウイルス特異的蛍光タンパク質も発現していない）、例えば、多重特異的な免疫細胞エンゲージャーによって癌細胞に向けられる同じ患者サンプルからの白血球によって、細胞における癌細胞死の測定を可能にする。「オフターゲット」方式で殺傷される。

【０２３１】

多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＭＹＸＶ－ＢｉＴＥ、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ、ＭＹＸＶ－ＭｉＴＥ）を発現する本開示のＭＹＸＶは、癌細胞に生産的に感染する。多重特異性免疫細胞エンゲージャー（例えば、ＭＹＸＶ－ＢｉＴＥ、ＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ、ＭＹＸＶ－ＭｉＴＥ）を発現する本開示のＭＹＸＶは、それらが感染する癌細胞を直接殺傷し、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを介して非感染癌細胞の殺傷を促進する。

【０２３２】

実施例９：多重特異性免疫細胞エンゲージャーはヒト癌細胞およびヒト免疫細胞に特異的に結合する

この実施例は、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーが、ヒト癌細胞およびヒト免疫細胞に特異的に結合することを実証する。

【０２３３】

実施例７に記載のＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ、ＭＹＸＶ－ＢｉＴＥ、および／またはＭＹＸＶ－ＭｉＴＥは、ＲＫ１３細胞において増殖される。ＢｉＫＥはＣＤ１６とＣＤ１３８に特異的に結合する。ＢｉＴＥはＣＤ３とＣＤ１３８に特異的に結合する。ＭｉＴＥはＣＤ３とＣＤ１３８に特異的に結合する。本明細書に開示される他の適切な標的にも結合する構築物もまた生成され得る。分泌されたＢｉＫＥを含むＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに感染したＲＫ１３細胞からの上清を採取する。分泌されたＢｉＴＥを含むＭＹＸＶ－ＢｉＴＥに感染したＲＫ１３細胞からの上清を採取する。分泌されたＭｉＴＥを含むＭＹＸＶ－ＢｉＴＥに感染したＲＫ１３細胞からの上清を採取する。対照として、モック感染または野生型ＭＹＸＶに感染したＲＫ１３細胞からも上清を採取する。

【０２３４】

採取した上清を、ヒト免疫細胞、例えば、ヒトＴ細胞、ヒトＮＫ細胞、またはヒト多発

性骨髄腫（例えば、Ｕ２６６）細胞の培養物に添加する。
【０２３５】
細胞に結合したＢｉＫＥ　ＢｉＴＥまたはＭｉＴＥを検出するために、細胞を、ＢｉＫＥ／ＢｉＴＥ／ＭｉＴＥのＣ末端にあるＶ５タグに特異的なＰＥ結合体化モノクローナル抗体で染色し、洗浄し、そしてフローサイトメトリーによって分析する。
【０２３６】
ＣＤ１６に対する結合特異性およびＣＤ１３８に対する結合特異性を有するＢｉＫＥは、ＮＫ細胞および多発性骨髄腫細胞への結合を示す。
【０２３７】
ＣＤ３に対する結合特異性およびＣＤ１３８に対する結合特異性を有するＢｉＴＥは、Ｔ細胞および多発性骨髄腫細胞への結合を示す。
【０２３８】
ＣＤ３に対する結合特異性およびＣＤ１３８に対する結合特異性を有するＭｉＴＥは、Ｔ細胞および多発性骨髄腫細胞への結合を示す。
【０２３９】
実施例１０：多重特異性免疫細胞エンゲージャーは、ヒト免疫細胞と共培養されたヒト癌細胞の殺傷を増加させる
この実施例は、本開示の多重特異性免疫細胞エンゲージャーが、ヒト免疫細胞と共培養されたヒト癌細胞の殺傷を増加させることができることを実証する。
【０２４０】
ＲＫ１３細胞は、１、５、または１０の感染多重度（ＭＯＩ）で、実施例７に記載のＭＹＸＶ－ＢｉＫＥ、ＭＹＸＶ－ＢｉＴＥ、またはＭＹＸＶ－ＭｉＴＥに感染している。ＢｉＫＥは、ＣＤ１６とＣＤ１３８に特異的に結合する。ＢｉＴＥはＣＤ３とＣＤ１３８に特異的に結合する。ＭｉＴＥはＣＤ３とＣＤ１３８に特異的に結合する。分泌されたＢｉＫＥを含むＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに感染したＲＫ１３細胞からの上清、分泌されたＢｉＴＥを含むＭＹＸＶ－ＢｉＴＥに感染したＲＫ１３細胞からの上清、および分泌されたＭｉＴＥを含むＭＹＸＶ－ＭｉＴＥに感染したＲＫ１３細胞からの上清を採取する。対照として、モック感染したＲＫ１３細胞から上清も回収する。
【０２４１】
採取した上清を、（ｉ）初代ヒトＮＫ細胞およびヒト多発性骨髄腫ＭＭ（Ｕ２６６）細胞、または（ｉｉ）初代ヒトＴ細胞およびＭＭ（Ｕ２６６）細胞を含む共培養物に添加する。２４時間のインキュベーション後、細胞を染色してＭＭ細胞（ＣＤ１３８＋）と死細胞（近ＩＲ染色）を特定し、フローサイトメトリーで分析する。
【０２４２】
ＢｉＫＥ、ＢｉＴＥ、およびＭｉＴＥは、ＮＫ細胞およびＴ細胞を動員することにより、ＭＭ細胞の殺傷を増加させる。
【０２４３】
実施例１１：多発性骨髄腫（ＭＭ）に対する粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）を用いる腫瘍溶解性ウイルス療法（ＭＹＸＶ）：初代ヒトサンプルから汚染癌細胞を排除するために適したＭＹＸＶ構築物の同定。
実験は、初代ヒト細胞サンプルから汚染された難治性癌細胞を排除するために適したＭＹＸＶ構築物および実験条件を同定するために実施される。骨髄または末梢血のサンプルは、血液癌（骨髄腫、白血病、またはリンパ腫）を有する対象から採取される。単核細胞が単離される（例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅを介して）。癌細胞を含む単核細胞のサンプルは、様々な条件下（例えば、ＭＯＩ、インキュベーション時間）の下で、本開示のＭＹＸＶ構築物（例えば、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現し、および／または１つ以上の欠失を含む）で処理され、癌細胞を殺傷するＭＹＸＶ構築物の能力は、本明細書に開示されるように（例えば、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡法、および／または細胞毒性アッセイを介して）決定される。
【０２４４】

同定された構築物および／または実験条件は、対象を治療するために使用することができる。例えば、適切であると特定されたＭＹＸＶ構築物は、対象に直接投与することができ（例えば、注射または静脈内注入を介して）、またはＭＹＸＶに吸着した白血球を介して投与することができる。

【０２４５】

実施例１２：粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）による腫瘍溶解性ウイルス療法

対象は、血液癌（例えば、骨髄腫、白血病、またはリンパ腫）を有すると特定される。血液癌は、任意選択で、微小残存病変（ＭＲＤ）および／または薬剤耐性ＭＲＤを含む血液癌である可能性がある。

【０２４６】

必要に応じて、対象から採取されたサンプル（例えば、末梢血または骨髄サンプル）から癌細胞を排除する本開示のＭＹＸＶ構築物（例えば、１つ以上の多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現する、および／または１つ以上の欠失を含む）を同定するために研究が行われる。

【０２４７】

ＭＹＸＶは、対象に投与される（例えば、注射または注入を介して投与される）。ＭＹＸＶは、対象の癌細胞に感染し、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現し、癌細胞の殺傷と抗癌免疫応答をもたらす。

【０２４８】

実施例１３：ＭＹＸＶに吸着された白血球の自己移植を介した粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）を用いる腫瘍溶解性ウイルス療法。

ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶに吸着された白血球の自己移植を介して、血液癌を有する対象に投与される。

【０２４９】

骨髄または末梢血サンプルは、血液癌（例えば、骨髄腫、白血病、またはリンパ腫）を有する対象から得られ、単核細胞が（例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－ｐａｑｕｅを介して）単離される。癌細胞は、非癌細胞から分離することができる（例えば、ＦＡＣＳまたはＭＡＣＳを介して）。本開示のＭＹＸＶは、白血球に吸着される（例えば、約０．１から１０のＭＯＩで約１時間吸着される）。ＭＹＸＶに吸着された白血球は、静脈内注入を介して対象に戻して投与される。ＭＹＸＶは、対象の癌細胞に感染し、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現し、癌細胞の殺傷と抗癌免疫応答をもたらす。

【０２５０】

実施例１４：ＭＹＸＶに吸着された白血球の同種異系移植を介した粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）を用いる腫瘍溶解性ウイルス療法。

ＭＹＸＶは、ＭＹＸＶに吸着された白血球の同種異系移植を介して、血液癌（例えば、骨髄腫、白血病、またはリンパ腫）を有する対象に投与される。骨髄または末梢血サンプルは、ドナー（例えば、ＨＬＡ一致、ＨＬＡ不一致、ハプロタイプ一致、または兄弟ドナー、あるいはそれらの組み合わせ）から得られる。単核細胞が単離される（例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅを介して）。任意選択で、細胞は特定の白血球サブセットについて精製または濃縮される（例えば、ＦＡＣＳまたはＭＡＣＳを介して）。本開示のＭＹＸＶは、白血球に吸着される（例えば、約０．１から１０のＭＯＩで約１時間吸着される）。ＭＹＸＶに吸着された白血球は、静脈内注入を介して対象に戻して投与される。ＭＹＸＶは、対象の癌細胞に感染し、多重特異性免疫細胞エンゲージャーを発現し、癌細胞の殺傷と抗癌免疫応答をもたらす。

【０２５１】

実施例１５：ＭＹＸＶに吸着された初代ヒトＰＢＭＣはＭＹＸＶを感受性ＭＭ細胞に移す

健康な患者からの初代ヒト末梢血からのＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　Ｐｌｕｓ勾配を使用して最初に単離された。ＮＫ細胞は、ＭＡＣＳヒトＮＫ細胞単離キットとＬＳ磁気カラムを使用してこれらのＰＢＭＣから単離し、磁気標識された細胞を枯渇させた。ＮＫ細胞枯渇画分は保持され、別々に使用された。１ｘ１０＾６　ＮＫ細胞またはＮ

Ｋ細胞が枯渇したＰＢＭＣを、ＭＹＸＶ（ＭＹＸＶ－ＧＦＰまたはＭＹＸＶ－ＢＩＫＥ－ＧＦＰ）とともに、条件ごとに３８０μＬの完全培地で２４ウェルプレート内で３７℃で１時間インキュベートし、ウイルスを吸着させた。１時間のインキュベーション後、５００μＬの１×ＰＢＳ＋１０％ＦＢＳを使用して初代細胞を３回洗浄し、未結合のウイルスを除去した。

【０２５２】

次に、初代細胞を、２ｘ１０＾５　Ｕ２６６細胞（ＣＤ１３８＋ＭＭ細胞）を含む５００μＬの完全培地に再懸濁した。２４時間共培養した後、細胞を近ＩＲ　生／死で標識した。続いて、細胞を条件ごとに１００μＬの染色バッファー中の１μＬのヒト抗ＣＤ１３８抗体で標識し、光から保護して４℃で１５分間インキュベートした。次に、１００μＬのＣｙｔｏｆｉｘを使用してすべてのサンプルを固定し、光保護を使用して４℃で１５分間インキュベートした後、フローサイトメトリー分析のために２７０μＬの染色バッファーに再懸濁した。

【０２５３】

図２３Ａは、ＭＹＸＶ－ＧＦＰまたはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに吸着されたＮＫ細胞（上段）またはＮＫ枯渇ＰＢＭＣ（－ＮＫ、下段）との共インキュベーション後のＣＤ１３８＋ＭＭ細胞の感染を実証するドットプロットを提供する。これらのデータは、ウイルスに吸着されたＮＫ細胞またはＰＢＭＣが、本開示のＭＹＸＶをヒト血液癌細胞に送達することができ、その後、ＭＹＸＶが感染することができることを実証する。

【０２５４】

図２３Ｂは、ＭＹＸＶ－ＧＦＰまたはＭＹＸＶ－ＢｉＫＥに吸着されたＮＫ細胞（上段）またはＮＫ枯渇ＰＢＭＣ（－ＮＫ、下段）との共インキュベーション後のＣＤ１３８＋ＭＭ細胞の殺傷を実証するドットプロットを提供する。これらのデータは、ウイルスに吸着されたＮＫ細胞またはＰＢＭＣが、本開示のＭＹＸＶをヒト血液癌細胞に送達し、ＭＹＸＶが感染および殺傷することができることを実証する。

【０２５５】

実施例１６：インビボで薬剤耐性の播種性ＭＭを標的および排除するための、微小残存病変（ＭＲＤ）のＶｋ＊ＭＹＣ免疫コンピテントマウスモデルにおける自己移植と組み合わせたエキソビボＭＹＸＶウイルス療法。

２つのＣ５７ＢＬ／６由来のＶＫ＊ＭＹＣ細胞株をインビボ実験のために使用した：ボルテゾミブ耐性（ＢＯＲ耐性）であるＶＫ１２５９８、および多剤耐性株ＶＫ１２６５３。最初に、これら２つのＶＫ＊ＭＹＣ細胞株のＭＹＸＶ結合および感染に対する感受性を評価した。

【０２５６】

ＶＫ１２５９８およびＶＫ１２６５３へのＭＹＸＶ結合、インビトロ研究：結合実験のために、ＭＹＸＶ－Ｍ０９３Ｌ－Ｖｅｎｕｓウイルス（Ｍ０９３Ｌのアミノ末端にある蛍光タンパク質Ｖｅｎｕｓの融合物を含む）を１０の感染多重度（ＭＯＩ）で使用した。簡単に説明すると、ＶＫ１２５９８またはＶＫ１２６５３のいずれかをＢＭ（または解凍したばかりのＢＭ）から新たに単離し、ＭＹＸＶ－Ｍ０９３Ｌ－Ｖｅｎｕｓと４℃で１時間インキュベートして、ウイルスを可能にした。未結合のウイルスは、ウイルス吸着細胞を２回洗浄することによって除去した。ビリオン結合のレベルは、フローサイトメトリーを使用して定量化した。ウイルス感染の分析のために、細胞をレポーターＭＹＸＶ－ＧＦＰ（Ｅ／Ｌ）／ＴｄＴｏｍａｔｏ（Ｌ）とＭＯＩ＝１０にて３７℃で１時間インキュベートし、ウイルスを吸着させた。ウイルス感染を可能にするために、細胞を３７℃で一晩インキュベートした。ＭＹＸＶは両方の細胞株に効率的に結合した（図１４Ａおよび１５Ａ）。これに加えて、ＭＹＸＶは両方の細胞株に生産的に感染する（図１４Ｂ－Ｃおよび１５Ｂ）。

【０２５７】

ＶＫ１２５９８細胞株を使用するインビボ研究：最初のインビボ実験において、Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、ＶＫ１２５９８細胞（例えば、マウスあたり１×１０^{6}細胞）を事前

に播種した。ＭＭ細胞移植の４週間後、マウスを出血させ、Ｍスパイクを測定した。Ｍ－スパイクのレベル（例えば、０、低＝０．１、中＝０．２、高＝０．６）に従ってマウスを分離した（図１６Ａ、上部パネル）。次に、マウスを次のように処理した：Ｃ５７ＢＬ／６　ＢＭ移植なし（コホートＩ）、Ｃ５７ＢＬ／６　ＢＭ細胞のみ（コホートＩＩ）、ＭＹＸＶ－Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰのみ（コホートＩＩＩ）、ＭＹＸＶ－でｅｘｖｉｖｏ処理したＣ５７ＢＬ／６　ＢＭ　Ｍ１３５ＫＯ－ＧＦＰ（コホートＩＶ）（図１６Ａ、下のパネル）。図１６Ｂは、Ｍスパイクが低い（０．１）コホートＩの代表的なマウスのＭＭ（ＣＤ１３８＋　Ｂ２２０－）のパーセンテージと、Ｍ－スパイクが高い（０．６）コホートＩＩの代表的なマウスのＭＭ（ＣＤ１３８＋　Ｂ２２０－）のパーセンテージを示す。図１６Ｃは、コホートＩＶからの唯一の生存者のＭスパイクを示し、これは、ＭＭの完全な退行を示し、移植後８日目、２９日目、および３７日目にＭスパイクバンドは検出されなかった。これらのデータは、エキソビボにてＭＹＸＶで処理された骨髄の移植がＭＭの退行を誘発する可能性があることを示す。まとめると、これらのデータは、この最初の実験のコホート治療が疾患の進行の遅すぎることを示唆している可能性があり、代わりにウイルス療法はこのモデルのはるかに早い段階で開始するべきである（例えば、ＭＭ移植後４週間ではなくＭＭ移植後１週間未満）。ＭＭの退行は、この遅い介入時間でも発生し得るが、ウイルス療法を早期に開始すると（例えば、死亡またはエンドポイントにそれほど近くないマウスコホートで）、ウイルス技術の評価を改善できる可能性がある。

【０２５８】

追加の試験において、ＭＹＸＶは、他の治療法（ＳＭＡＣ模倣物ＬＣ１６１など）と組み合わせて試験される。ＶＫ１２５９８癌細胞が移植され、Ｍ－Ｓｐｉｋｅが１－４週間で定量化され、マウスがシクロホスファミドで処理されて、１か月続く可能性のある一過性の完全応答（ＣＲ）が誘導される。シクロホスファミドの１週間後または２週間後の」いずれかで、ウイルス療法が、

シクロホスファミドによって開始された部分的退行を延長または完了することができるかどうかをテストするために、マウスにＢＭ＋ＭＹＸＶまたはＰＢＭＣ＋ＭＹＸＶ（例えば、本明細書に開示される免疫細胞エンゲージャーを発現するＭＹＸＶ）を移植する。この設定では、この化学療法に機能的に抵抗する疾患によって定義されるＭＭ微小残存病変（ＭＲＤ）を排除するＭＹＸＶの能力が調べられる。単剤療法または併用療法のいずれかとして、多剤耐性ＶＫ１２６５３細胞株を排除するＭＹＸＶの能力も調べられる。

【０２５９】

本開示は、特定の実施形態に重点を置いて説明されてきたが、特定の実施形態のバリエーションが使用され得ることは当業者には明らかであり、本開示は、本明細書に具体的に記載されている以外の方法で実施され得ることが意図される。本発明の特定の態様、実施形態、または実施例に関連して説明される特徴、特性、化合物、または例は、本発明の他の任意の態様、実施形態、または実施例に適用可能であると理解されるべきである。したがって、この開示には、以下の請求項によって定義される開示の精神および範囲に含まれるすべての改変が含まれる。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲と精神に含まれるすべてのものを本発明者らの発明として特許請求する。

【０２６０】

実施形態１．多重特異性免疫細胞エンゲージャーをコードする導入遺伝子を含む粘液腫ウイルス（ＭＹＸＶ）。

【０２６１】

実施形態２．多重特異性免疫細胞エンゲージャーが、二重特異性ナチュラルキラーおよび好中球エンゲージャー（ＢｉＫＥ）である、実施形態１に記載の粘液腫ウイルス。

【０２６２】

実施形態３．ＢｉＫＥがナチュラルキラー細胞、好中球、またはそれらの組み合わせに存在する抗原に結合する、実施形態２に記載の粘液腫ウイルス。

【０２６３】

実施形態４．ＢｉＫＥが血液癌細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２または実

施形態３に記載の粘液腫ウイルス。
【０２６４】
実施形態５．ＢｉＫＥが骨髄腫細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２－４のいずれか１つに記載の骨髄腫ウイルス。
【０２６５】
実施形態６．ＢｉＫＥが白血病細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２－５のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２６６】
実施形態７．ＢｉＫＥがリンパ腫細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２－６のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２６７】
実施形態８．ＢｉＫＥがＣＤ１６に結合する、実施形態２－７のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２６８】
実施形態９．ＢｉＫＥがＣＤ１３８に結合する、実施形態２－８のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２６９】
実施形態１０．ＢｉＫＥが１つ以上の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、実施形態２－９のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２７０】
実施形態１１．ＢｉＫＥが１つ以上のヒト化単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、実施形態２－９のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２７１】
実施形態１２．ＢｉＫＥが、配列番号４－２１のいずれか１つに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるである配列を含む、実施形態２－１１のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２７２】
実施形態１３．ＢｉＫＥが粘液腫ウイルスゲノムのＭ１３５とＭ１３６のオープンリーディングフレームの間にある、実施形態２－１２のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２７３】
実施形態１４．レポーター遺伝子をさらに含む、実施形態１－１３のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２７４】
実施形態１５．レポーター遺伝子が蛍光タンパク質である、実施形態１４の粘液腫ウイルス。
【０２７５】
実施形態１６．レポーター遺伝子が発光基質または酵素である、実施形態１４に記載の粘液腫ウイルス。
【０２７６】
実施形態１７．粘液腫ウイルスゲノムにおける欠失をさらに含む、実施形態１－１６のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２７７】
実施形態１８．粘液腫ウイルスが、Ｍ００１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、Ｍ００５Ｒ、Ｍ００６Ｒ、Ｍ００７Ｒ、Ｍ００８．１Ｒ、Ｍ００８Ｒ、Ｍ００９Ｌ、Ｍ０１３、Ｍ０３６Ｌ、Ｍ０６３Ｌ、Ｍ１１Ｌ、Ｍ１２８Ｌ、Ｍ１３１Ｒ、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ１４１Ｒ、Ｍ１４８Ｒ、Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、およびＳＯＤからなる群より選択される１つ以上の遺伝子の欠失または破壊を

含む、実施形態１７に記載の粘液腫ウイルス。
【０２７８】
実施形態１９．粘液腫ウイルスがＭ１３５の欠失を含む、実施形態１７に記載の粘液腫ウイルス。
【０２７９】
実施形態２０．多重特異性免疫細胞エンゲージャーが二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）である、実施形態１に記載の粘液腫ウイルス。
【０２８０】
実施形態２１．ＢｉＴＥがＴ細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２０に記載の粘液腫ウイルス。
【０２８１】
実施形態２２．ＢｉＴＥが血液癌細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２０または実施形態２１に記載の粘液腫ウイルス。
【０２８２】
実施形態２３．ＢｉＴＥが骨髄腫細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２０－２２のいずれか１つに記載の骨髄腫ウイルス。
【０２８３】
実施形態２４．ＢｉＴＥが白血病細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２０－２３のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２８４】
実施形態２５．ＢｉＴＥがリンパ腫細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態２０－２４のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２８５】
実施形態２６．ＢｉＴＥがＣＤ３に結合する、実施形態２０－２５のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２８６】
実施形態２７．ＢｉＴＥがＣＤ１３８に結合する、実施形態２０－２６のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２８７】
実施形態２８．ＢｉＴＥが１つ以上の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、実施形態２０－２７のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２８８】
実施形態２９．ＢｉＴＥが１つ以上のヒト化単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、実施形態２０－２８のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２８９】
実施形態３０．ＢｉＴＥが、配列番号６、７、１０－１５、または３２－３９のいずれかに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一ある配列を含む、実施形態２０－２９のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２９０】
実施形態３１．ＢｉＴＥが粘液腫ウイルスゲノムのＭ１３５とＭ１３６のオープンリーディングフレームの間にある、実施形態２０－３０のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２９１】
実施形態３２．レポーター遺伝子をさらに含む、実施形態２０－３１のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。
【０２９２】
実施形態３３．レポーター遺伝子が蛍光タンパク質である、実施形態３２に記載の粘液腫ウイルス。
【０２９３】

実施形態３４．レポーター遺伝子が発光基質または酵素である、実施形態３２に記載の粘液腫ウイルス。

【０２９４】

実施形態３５．粘液腫ウイルスゲノムにおける欠失をさらに含む、実施形態２０－３４のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０２９５】

実施形態３６．粘液腫ウイルスが、Ｍ００１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、Ｍ００５Ｒ、Ｍ００６Ｒ、Ｍ００７Ｒ、Ｍ００８．１Ｒ、Ｍ００８Ｒ、Ｍ００９Ｌ、Ｍ０１３、Ｍ０３６Ｌ、Ｍ０６３Ｌ、Ｍ１１Ｌ、Ｍ１２８Ｌ、Ｍ１３１Ｒ、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ１４１Ｒ、Ｍ１４８Ｒ、Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、およびＳＯＤからなる群より選択される１つ以上の遺伝子の欠失または破壊を含む、実施形態２０－３４のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０２９６】

実施形態３７．粘液腫ウイルスがＭ１３５の欠失を含む、実施形態２０－３４のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０２９７】

実施形態３８．多重特異性免疫細胞エンゲージャーが膜内在性Ｔ細胞エンゲージャー（ＭｉＴＥ）である、実施形態１に記載の粘液腫ウイルス。

【０２９８】

実施形態３９．ＭｉＴＥがＴ細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態３８に記載の粘液腫ウイルス。

【０２９９】

実施形態４０。ＭｉＴＥが血液癌細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態３８または実施形態３９に記載の粘液腫ウイルス。

【０３００】

実施形態４１．ＭｉＴＥが骨髄腫細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態３８－４０のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０１】

実施形態４２．ＭｉＴＥが白血病細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態３８－４１のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０２】

実施形態４３．ＭｉＴＥがリンパ腫細胞上に存在する抗原に結合する、実施形態３８－４２のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０３】

実施形態４４．ＭｉＴＥがＣＤ３に結合する、実施形態３８－４３のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０４】

実施形態４５．ＭｉＴＥがＣＤ１３８に結合する、実施形態３８－４４のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０５】

実施形態４６．ＭｉＴＥが１つ以上の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、実施形態３８－４５のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０６】

実施形態４７．ＭｉＴＥが１つ以上のヒト化単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、実施形態３８－４５のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０７】

実施形態４８．ＭｉＴＥが、配列番号６、７、１０－１５、または３２－３９のいずれかに対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であ

る配列を含む、実施形態３８－４７のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。。

【０３０８】

実施形態４９．ＭｉＴＥが、粘液腫ウイルスゲノムのＭ１３５とＭ１３６のオープンリーディングフレームの間にある、実施形態３８－４８のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３０９】

実施形態５０．レポーター遺伝子をさらに含む、実施形態３８－４９のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３１０】

実施形態５１．レポーター遺伝子が蛍光タンパク質である、実施形態５０に記載の粘液腫ウイルス。

【０３１１】

実施形態５２．レポーター遺伝子が発光基質または酵素である、実施形態５０に記載の粘液腫ウイルス。

【０３１２】

実施形態５３．粘液腫ウイルスゲノムにおける欠失をさらに含む、実施形態３８－５２のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３１３】

実施形態５４．粘液腫ウイルスが、Ｍ００１Ｒ、Ｍ００２Ｒ、Ｍ００３．１Ｒ、Ｍ００３．２Ｒ、Ｍ００４．１Ｒ、Ｍ００４Ｒ、Ｍ００５Ｒ、Ｍ００６Ｒ、Ｍ００７Ｒ、Ｍ００８．１Ｒ、Ｍ００８Ｒ、Ｍ００９Ｌ、Ｍ０１３、Ｍ０３６Ｌ、Ｍ０６３Ｌ、Ｍ１１Ｌ、Ｍ１２８Ｌ、Ｍ１３１Ｒ、Ｍ１３５Ｒ、Ｍ１３６Ｒ、Ｍ１４１Ｒ、Ｍ１４８Ｒ、Ｍ１５１Ｒ、Ｍ１５２Ｒ、Ｍ１５３Ｒ、Ｍ１５４Ｌ、Ｍ１５６Ｒ、Ｍ－Ｔ２、Ｍ－Ｔ４、Ｍ－Ｔ５、Ｍ－Ｔ７、およびＳＯＤからなる群より選択される１つ以上の遺伝子の欠失または破壊を含む、実施形態３８－５３のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。。

【０３１４】

実施形態５５。粘液腫ウイルスがＭ１３５の欠失を含む、実施形態３８－５３のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルス。

【０３１５】

実施形態５６。実施形態１－５５のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む組成物。

【０３１６】

実施形態５７．実施形態１－５６のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルスを対象に投与することを含む、それを必要とする対象における血液癌を治療する方法。

【０３１７】

実施形態５８．対象がヒトである、実施形態５７の方法。

【０３１８】

実施形態５９．粘液腫ウイルスが、欠損した生来の抗ウイルス応答を有する細胞に感染することができる、実施形態５７または実施形態５８の方法。

【０３１９】

実施形態６０．粘液腫ウイルスが癌細胞に感染することができる、実施形態５７－５９のいずれか１つに記載の方法。

【０３２０】

実施形態６１．血液癌が骨髄腫、白血病、またはリンパ腫である、実施形態５７－６０のいずれか１つに記載の方法。

【０３２１】

実施形態６２．血液癌が多発性骨髄腫である、実施形態５７－６０のいずれか１つに記載の方法。

【０３２２】

実施形態６３．白血球が実施形態１－５６のいずれか１つに記載の粘液腫ウイルスを含

む、対象に白血球を投与することを含む、それを必要とする対象における血液癌を治療する方法。

【０３２３】

実施形態６４．白血球の表面にエキソビボで粘液腫ウイルスを吸着させることをさらに含む、実施形態６３の方法。

【０３２４】

実施形態６５．白血球の表面への粘液腫ウイルスの吸着が、白血球の表面への粘液腫ウイルスの結合を可能にする条件下で、白血球を粘液腫ウイルスに曝露することを含む、実施形態６４の方法。

【０３２５】

実施形態６６．粘液腫ウイルスが少なくとも５分間白血球に曝露される、実施形態６４または実施形態６５の方法。

【０３２６】

実施形態６７．粘液腫ウイルスが約１時間白血球に曝露される、実施形態６４または実施形態６５の方法。

【０３２７】

実施形態６８．粘液腫ウイルスが、約０．００１から１０００の間の感染多重度（ＭＯＩ）で白血球に曝露される、実施形態６４－６７のいずれか１つに記載の方法。

【０３２８】

実施形態６９．粘液腫ウイルスが、約０．１から１０の間の感染多重度（ＭＯＩ）で白血球に曝露される、実施形態６４－６７のいずれか１つに記載の方法。

【０３２９】

実施形態７０．白血球が末梢血から得られる、実施形態６３－６９のいずれか１つに記載の方法。

【０３３０】

実施形態７１．白血球が骨髄から得られる、実施形態６３－６９のいずれか１つに記載の方法。

【０３３１】

実施形態７２．白血球が末梢血単核細胞である、実施形態６３－６９のいずれか１つに記載の方法。

【０３３２】

実施形態７３．白血球が対象から得られる、実施形態６３－７２のいずれか１つに記載の方法。

【０３３３】

実施形態７４．白血球が、対象に対してＨＬＡ一致、ＨＬＡ不一致、ハプロタイプ一致、またはそれらの組み合わせであるドナーから得られる、実施形態６３－７３のいずれか１つに記載の方法。

【０３３４】

実施形態７５．白血球が医薬組成物中で投与される、実施形態６３－７４のいずれか１つに記載の方法。

【０３３５】

実施形態７６．白血球が全身投与される、実施形態６３－７５のいずれか１つに記載の方法。

【０３３６】

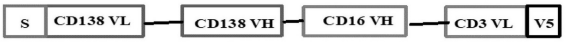
実施形態７７．白血球が非経口的に投与される、実施形態６３－７６のいずれか１つに記載の方法。

【０３３７】

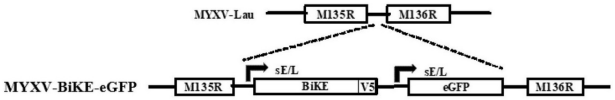
実施形態７８．白血球が注入によって投与される、実施形態６３－７７のいずれか１つに記載の方法。

【図面】

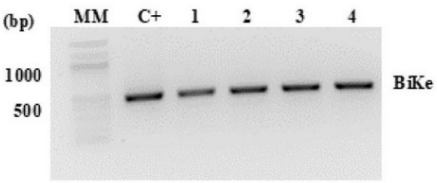
【図１Ａ】



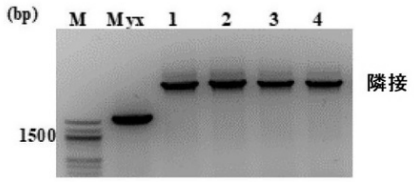
【図１Ｂ】



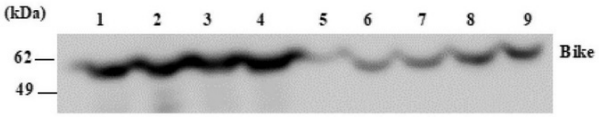
【図１Ｃ】



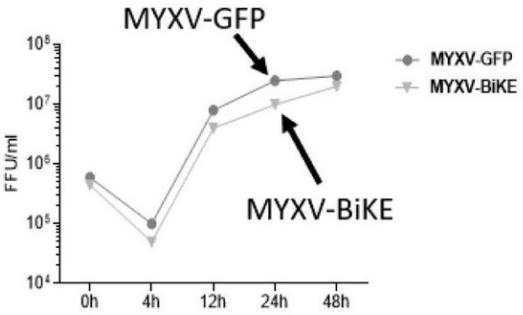
【図１Ｄ】



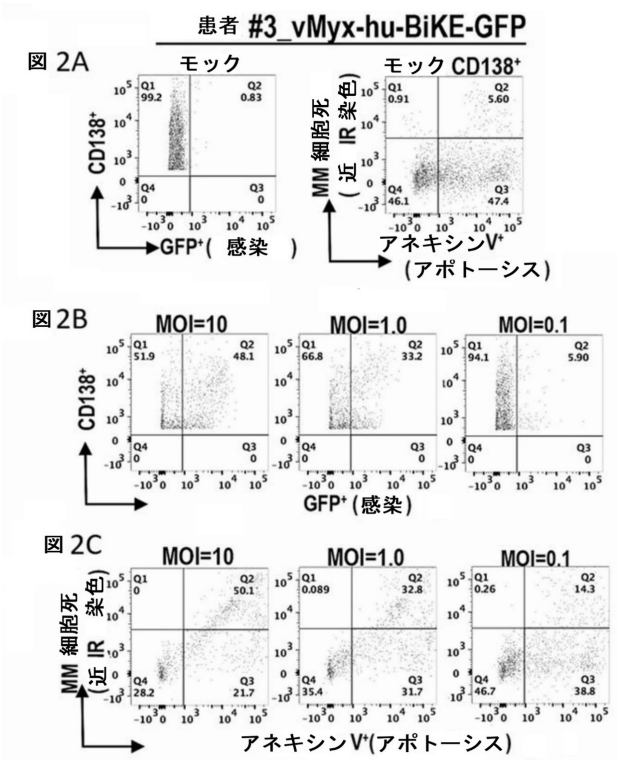
【図１Ｅ】



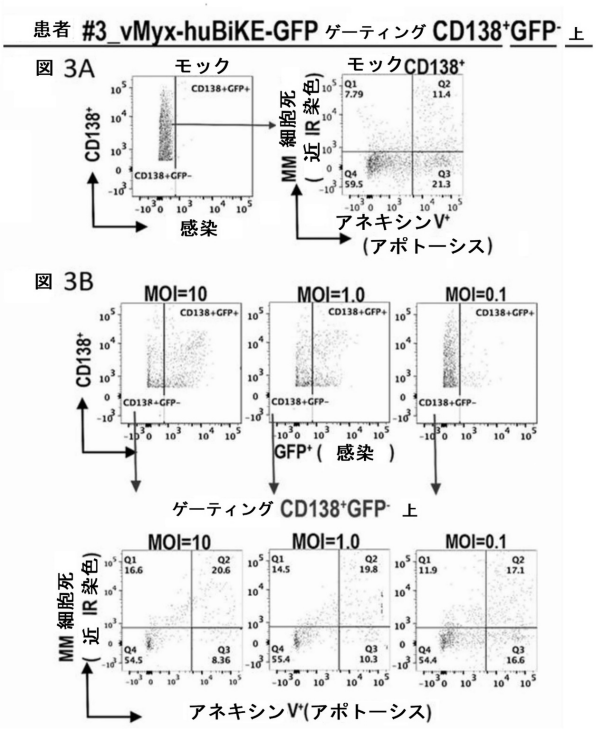
【図１Ｆ】



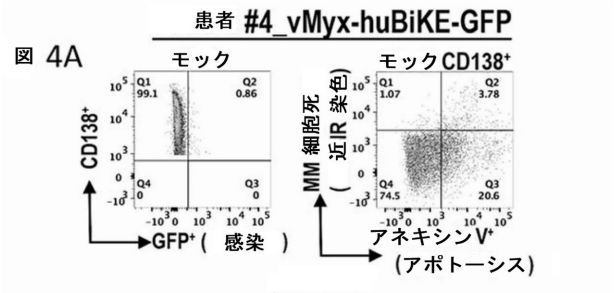
【図２】


患者 #3_vMyx-hu-BiKE-GFP
図 2A
モック
モック CD138+
CD138+
GFP+(感染)
MM 細胞死 (近 IR 染色)
アネキシンV+ (アポトーシス)
図 2B
MOI=10
MOI=1.0
MOI=0.1
CD138+
GFP+ (感染)
図 2C
MOI=10
MOI=1.0
MOI=0.1
MM 細胞死 (近 IR 染色)
アネキシンV+(アポトーシス)

【図３】


患者 #3_vMyx-huBiKE-GFP ゲーティング CD138+GFP- 上
図 3A
モック
モックCD138+
CD138+
感染
MM 細胞死 (近 IR 染色)
アネキシンV+ (アポトーシス)
図 3B
MOI=10
MOI=1.0
MOI=0.1
GFP+(感染)
ゲーティング CD138+GFP- 上
MM 細胞死 (近 IR 染色)
アネキシンV+(アポトーシス)

【図４Ａ】


患者 #4_vMyx-huBiKE-GFP
図 4A
モック
モック CD138+
CD138+
GFP+(感染)
MM 細胞死 (近IR 染色)
アネキシンV+ (アポトーシス)

【図４Ｂ】

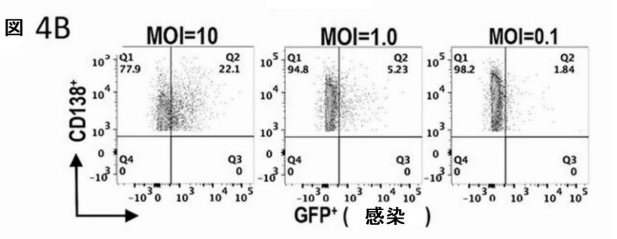


図 4B
MOI=10
MOI=1.0
MOI=0.1
CD138+
GFP+(感染)

【図４Ｃ】

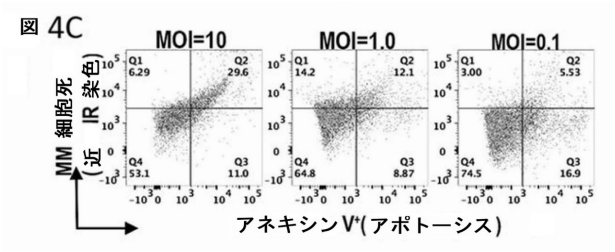
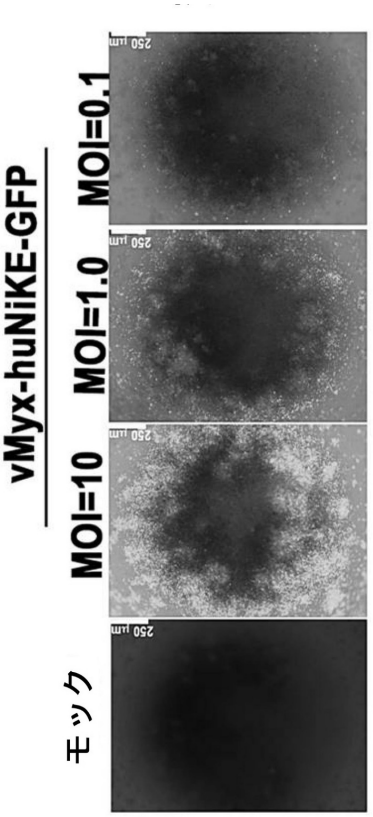
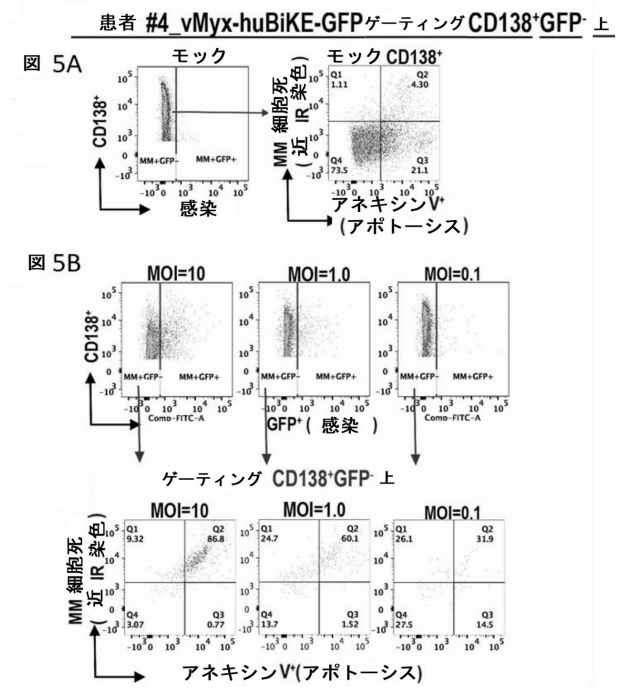


図 4C
MOI=10
MOI=1.0
MOI=0.1
MM 細胞死（近 IR 染色）
アネキシン V+(アポトーシス)

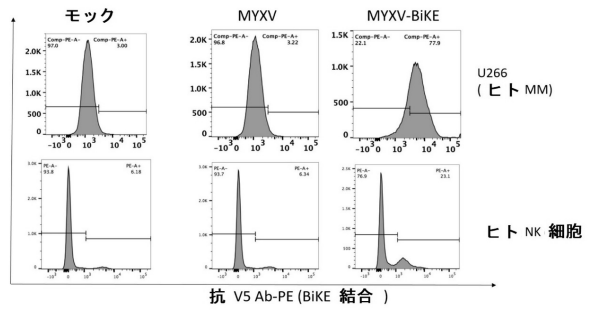
【図４Ｄ】


vMyx-huNiKE-GFP
MOI=0.1
MOI=1.0
MOI=10
モック

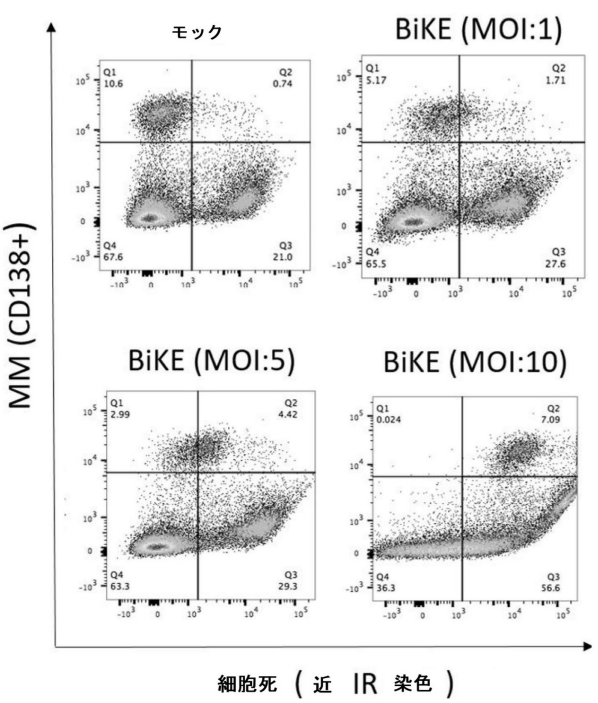
【図５】


患者 #4_vMyx-huBiKE-GFP ゲーティング CD138+GFP- 上
図 5A
モック
モック CD138+
CD138+
感染
MM 細胞死（近 IR 染色）
アネキシン V+（アポトーシス）
図 5B
MOI=10
MOI=1.0
MOI=0.1
GFP+（感染）
ゲーティング CD138+GFP- 上
MM 細胞死（近 IR 染色）
アネキシン V+(アポトーシス)

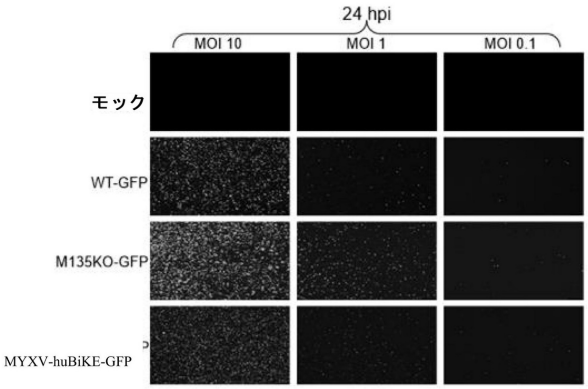
【図６】


モック
MYXV
MYXV-BiKE
細胞の計数
U266（ヒト MM）
ヒト NK 細胞
抗 V5 Ab-PE (BiKE 結合)

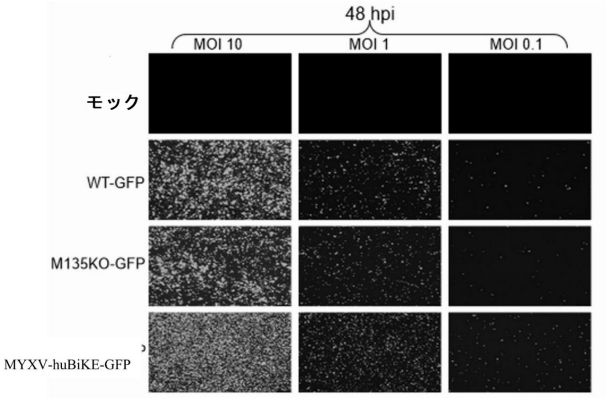
【図７】



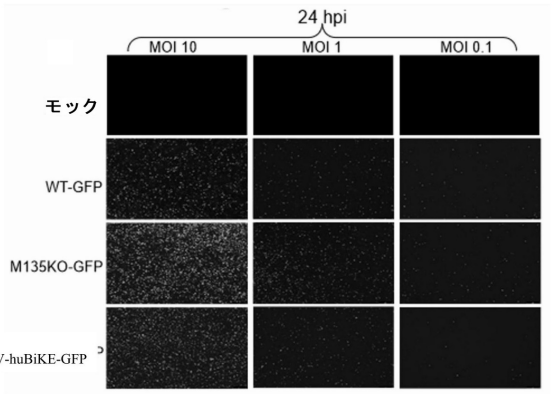
【図８Ａ】



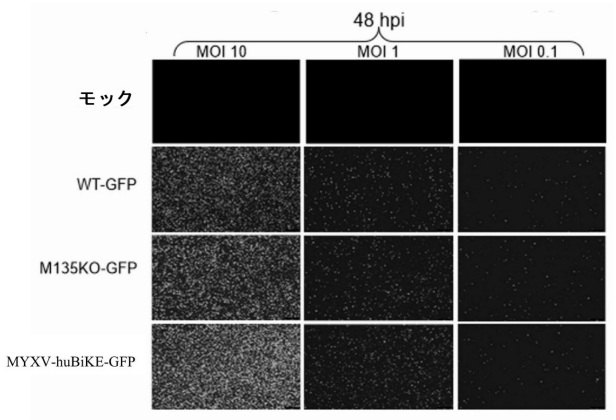
【図８Ｂ】



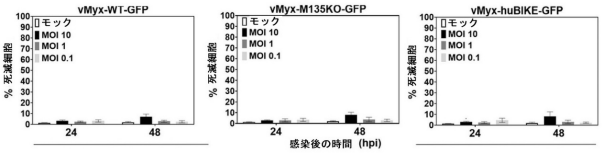
【図８Ｃ】



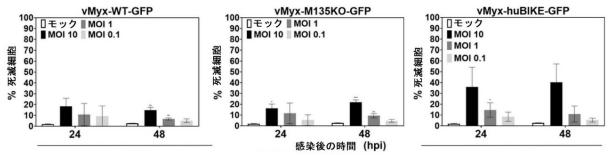
【図８Ｄ】



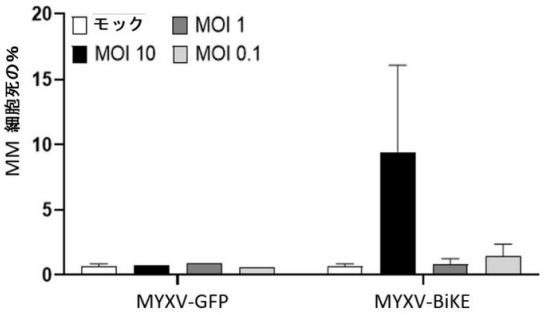
【図９】



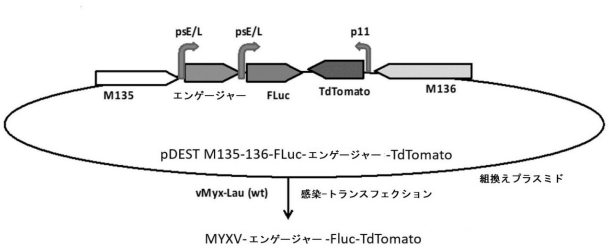
【図１０】



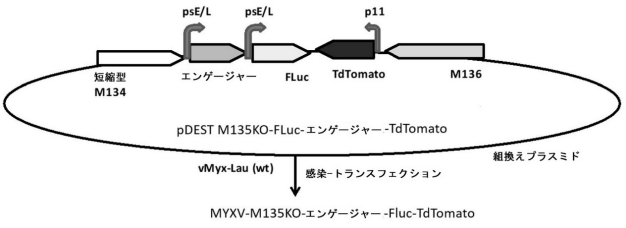
【図１１】



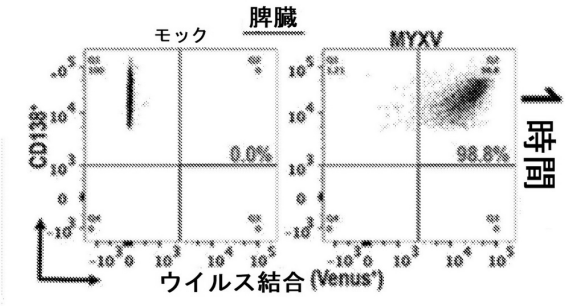
【図１２】



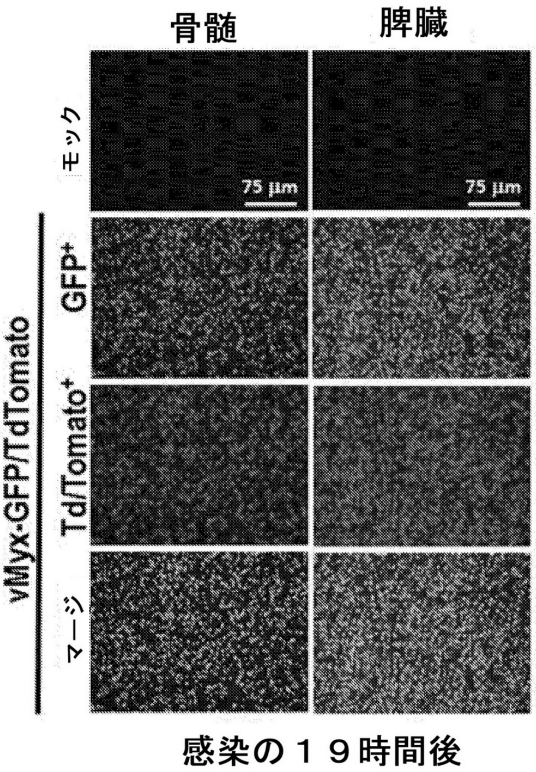
【図１３】



【図１４Ａ】

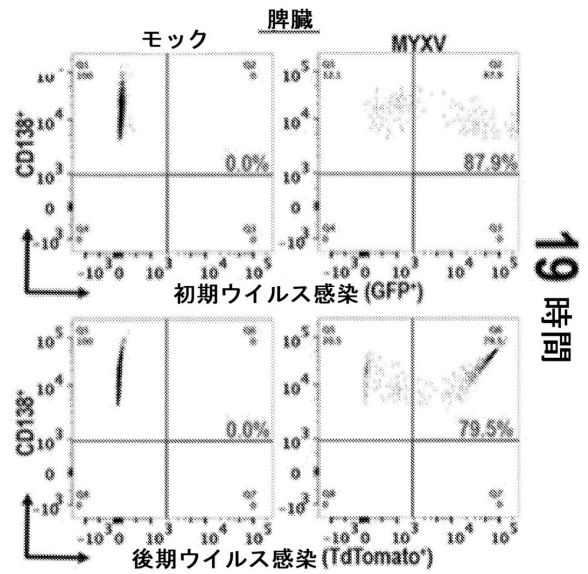


【図１４Ｂ】

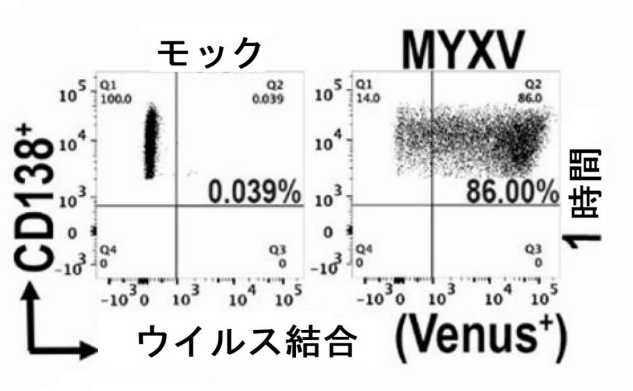


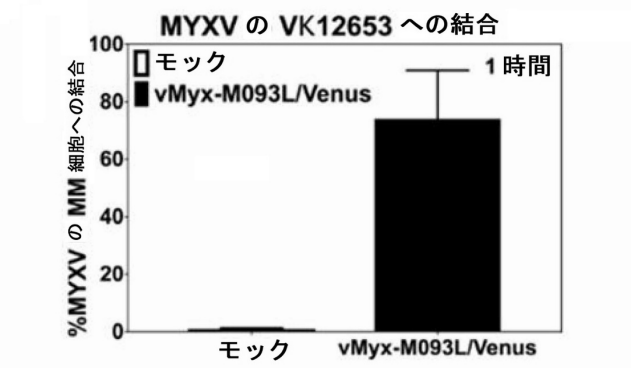
感染の１９時間後

【図１４Ｃ】

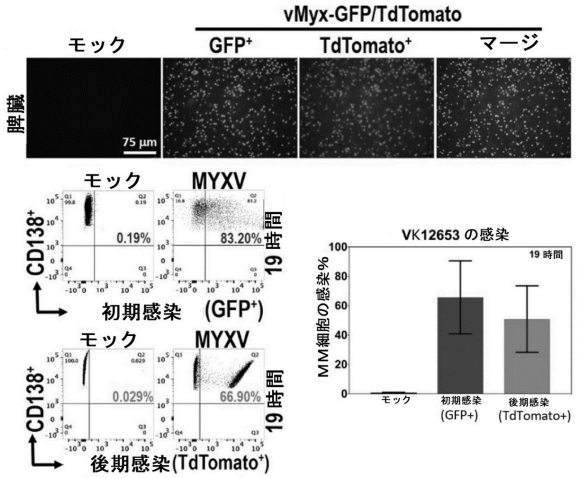


【図１５Ａ】

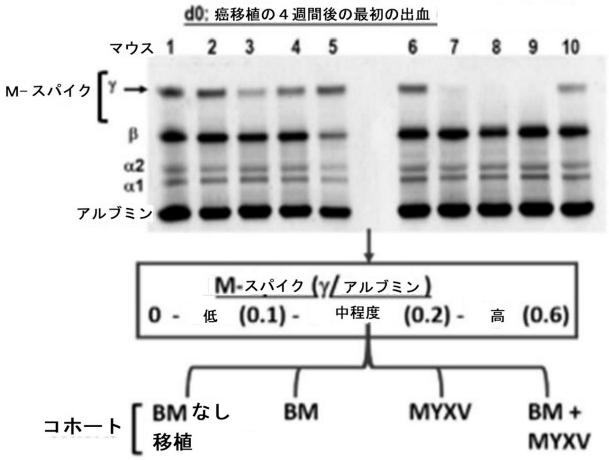




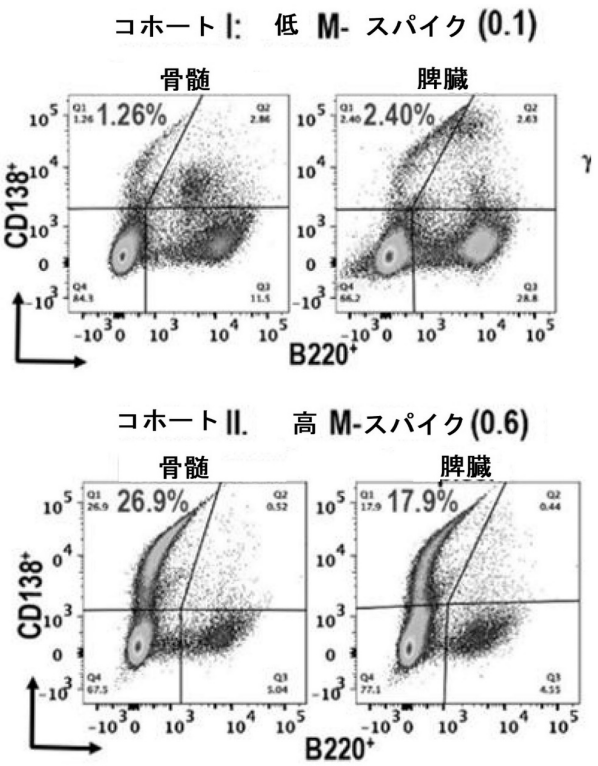
【図１５Ｂ】



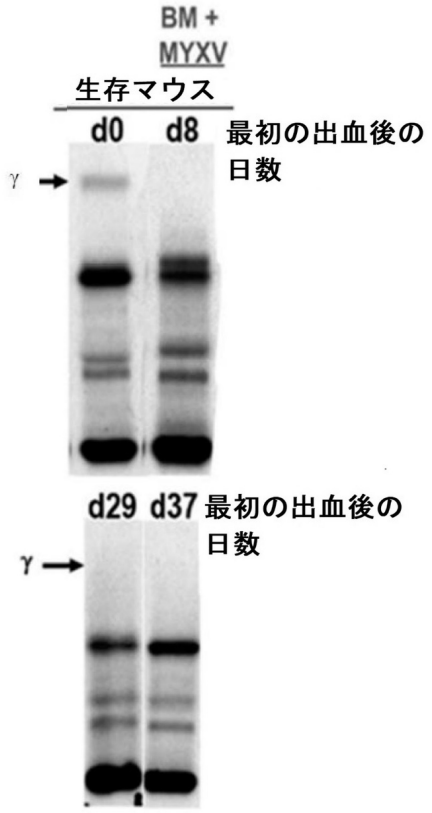
【図１６Ａ】



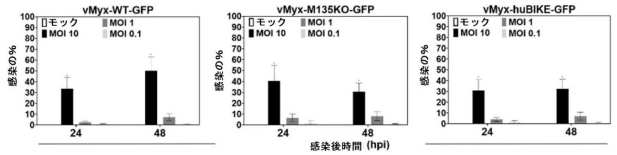
【図１６Ｂ】



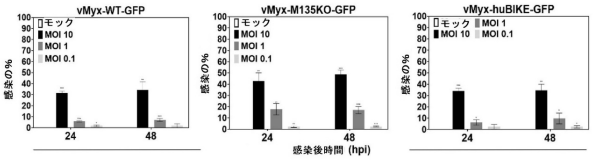
【図１６Ｃ】



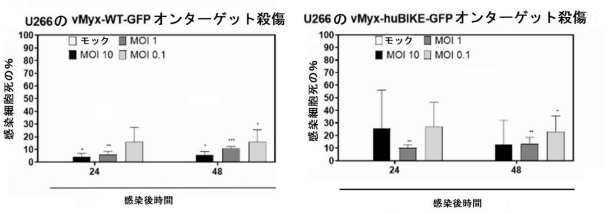
【図１７Ａ】



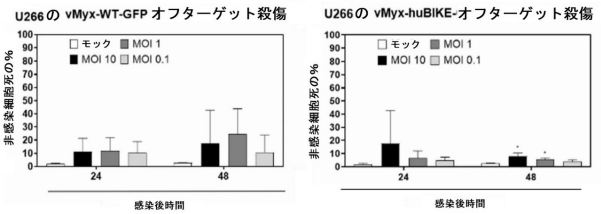
【図１７Ｂ】



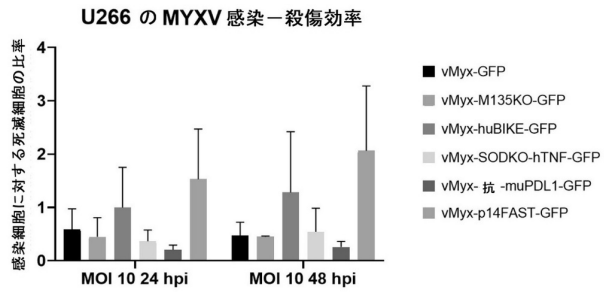
【図１８Ａ】



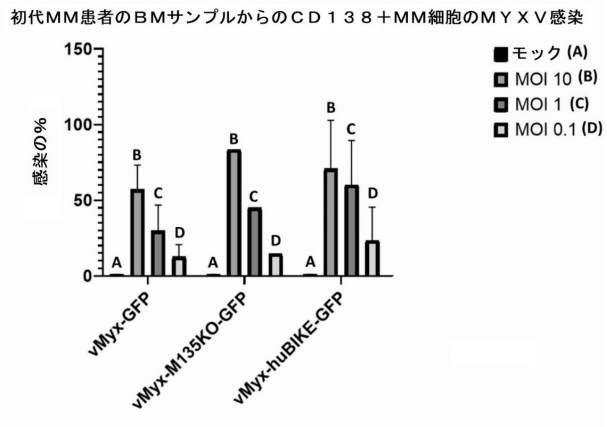
【図１８Ｂ】



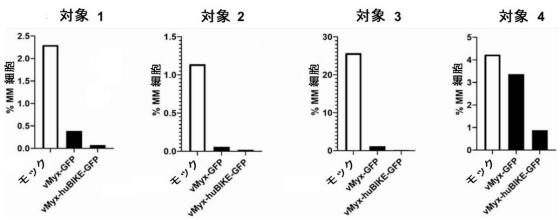
【図１９】



【図２０】

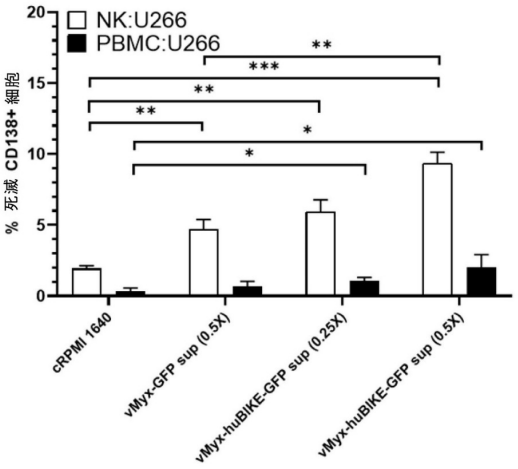


【図２１】

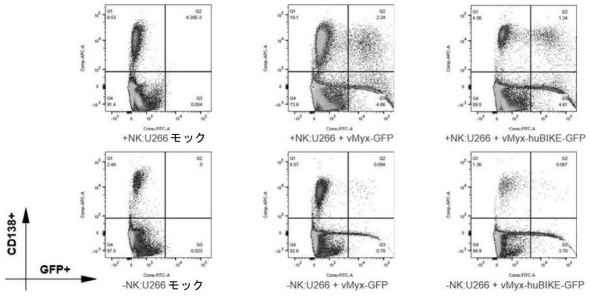


【図２２】

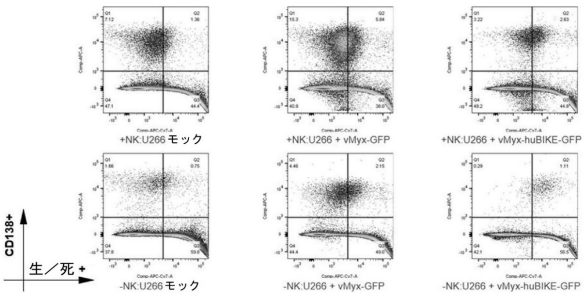
エフェクター標的化ＭＭに対するｈｕＢＩＫＥの効果



【図２３Ａ】



【図２３Ｂ】



【配列表】

20225518700000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/55073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 35/15, A61K 35/768, C12N 15/09 (2020.01)
CPC - A61K 35/15, A61K 35/768, C07K 14/4725, C07K 14/7051

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/049248 A1 (ICELLHEALTH CONSULTING LLC) 15 March 2018 (15.03.2018) Abstract, para [0074], [0087], [0104], [0144], [0167]-0168], [0241], [0263], [0318], [0485]-[0486]	1-7
A	TWUMASI-BOATENG et al., Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy. Nature Reviews Cancer, July 2018, Vol 19, No 7, pp 419-432. Especially pg 426, col 3, para 3; pg 427, col 1, para 1; pg 428, col 3, para 1; pg 428, Fig 2.	1, 2, 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 December 2020	29 JAN 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/55073

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1 ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 8-50
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28		
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12		
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		
C12N	*15/52*	*(2006.01)*	C12N	15/52	Z	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 ８５２５７ アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード １４７５ スイート ２００

(72)発明者 トーレス－ドミンゲス，リノ

アメリカ合衆国 ８５２５７ アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード １４７５ スイート ２００

(72)発明者 ヴィラ，ナンシー

アメリカ合衆国 ８５２５７ アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード １４７５ スイート ２００

(72)発明者 ラフマーン，モハメド マスムズール

アメリカ合衆国 ８５２５７ アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード １４７５ スイート ２００

Fターム（参考） 4B065 AA94Y AA95X AB01 AC14 CA24 CA25 CA44
4C087 AA01 AA02 BB63 BC83 CA12 MA66 NA14 ZB26 ZB27
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20 FA74