

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7324193号

(P7324193)

(45)発行日 令和5年8月9日(2023.8.9)

(24)登録日 令和5年8月1日(2023.8.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

Z N A

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 28 (全123頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-517556(P2020-517556)

(86)(22)出願日 平成30年9月17日(2018.9.17)

(65)公表番号 特表2021-500010(P2021-500010  
A)

(43)公表日 令和3年1月7日(2021.1.7)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/051285

(87)国際公開番号 WO2019/067243

(87)国際公開日 平成31年4月4日(2019.4.4)

審査請求日 令和3年9月17日(2021.9.17)

(31)優先権主張番号 62/565,383

(32)優先日 平成29年9月29日(2017.9.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 510002280

アメリカ合衆国

アメリカ合衆国、2 0 8 9 2 - 7 7 8 8

メリーランド州、ベセスダ、エムエス

シー 7 7 8 8、ロックレッジ ドライヴ

6 7 0 1、スイート 7 0 0、ナショナル

インスティテュート オブ ヘルス、オ

フィス オブ テクノロジー トランスフ

アー

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異型 P 5 3 を認識する T 細胞受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R 1 7 5 H 変異を有するヒト p 5 3 に対して抗原特異性を有する、単離又は精製された T 細胞受容体 (T C R) であって、

(1) 配列番号 6 7 の α 鎖相補性決定領域 (C D R) 1 アミノ酸配列、配列番号 6 8 の α 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 6 9 の α 鎖 C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 7 0 の β 鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 7 1 の β 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 7 2 の β 鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

(2) 配列番号 7 7 の α 鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 7 8 の α 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 7 9 の α 鎖 C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 8 0 の β 鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 8 1 の β 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 8 2 の β 鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

(3) 配列番号 8 7 の α 鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 8 8 の α 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 8 9 の α 鎖 C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 9 0 の β 鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 9 1 の β 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 9 2 の β 鎖 C D R 3 アミノ酸配列；又は

(4) 配列番号 4 8 7 の α 鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 8 8 の α 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 4 8 9 の α 鎖 C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 4 9 0 の β 鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 9 1 の β 鎖 C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 4 9 2 の β 鎖 C D R 3 アミノ酸配列

を含む、TCR。

【請求項2】

(1) 配列番号73のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(2) 配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号84のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(3) 配列番号93のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号94のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；又は

(4) 配列番号493のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号494のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(5) 配列番号73のアミノ酸21～131に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号74のアミノ酸22～134に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(6) 配列番号83のアミノ酸22～137に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号84のアミノ酸22～133に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(7) 配列番号93のアミノ酸22～131に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号94のアミノ酸22～134に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；又は

(8) 配列番号493のアミノ酸23～134に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号494のアミノ酸22～132に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列

を含む、請求項1に記載のTCR。

【請求項3】

(1) 配列番号73～74の両方；

(2) 配列番号83～84の両方；

(3) 配列番号93～94の両方；

(4) 配列番号493～494の両方；

(5) 配列番号73のアミノ酸21～131及び配列番号74のアミノ酸22～134の両方；

(6) 配列番号83のアミノ酸22～137及び配列番号84のアミノ酸22～133の両方；

(7) 配列番号93のアミノ酸22～131及び配列番号94のアミノ酸22～134の両方；又は

(8) 配列番号493のアミノ酸23～134及び配列番号494のアミノ酸22～132の両方

のアミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載のTCR。

【請求項4】

(1) 配列番号75のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号76のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(2) 配列番号85のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号86のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(3) 配列番号95のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号96のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(4) 配列番号495のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号496のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(5) 配列番号75のアミノ酸21～268に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列、及び配列番号76のアミノ酸22～307に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列；

(6) 配列番号85のアミノ酸22～274に対して少なくとも95%同一のアミノ酸

配列、及び配列番号 86 のアミノ酸 22～306 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(7) 配列番号 95 のアミノ酸 22～268 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 96 のアミノ酸 22～307 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；又は

(8) 配列番号 495 のアミノ酸 23～271 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 496 のアミノ酸 22～305 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列

を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の TCR。

【請求項 5】

(1) 配列番号 75～76 の両方；

(2) 配列番号 85～86 の両方；

(3) 配列番号 95～96 の両方；

(4) 配列番号 495～496 の両方；

(5) 配列番号 75 のアミノ酸 21～268 及び配列番号 76 のアミノ酸 22～307 の両方；

(6) 配列番号 85 のアミノ酸 22～274 及び配列番号 86 のアミノ酸 22～306 の両方；

(7) 配列番号 95 のアミノ酸 22～268 及び配列番号 96 のアミノ酸 22～307 の両方；又は

(8) 配列番号 495 のアミノ酸 23～271 及び配列番号 496 のアミノ酸 22～305 の両方

のアミノ酸配列を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の TCR。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の TCR の機能的部分を含む、単離又は精製されたポリペプチドであって、機能的部分が：

(1) 配列番号 67 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 68 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 69 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列、配列番号 70 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 71 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 72 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列；

(2) 配列番号 77 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 78 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 79 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列、配列番号 80 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 81 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 82 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列；

(3) 配列番号 87 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 88 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 89 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列、配列番号 90 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 91 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 92 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列；又は

(4) 配列番号 487 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 488 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 489 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列、配列番号 490 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 491 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 492 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列

を含む、ポリペプチド。

【請求項 7】

(1) 配列番号 73 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(2) 配列番号 83 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 84 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(3) 配列番号 93 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 94 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

10

20

30

40

50

(4) 配列番号 493 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 494 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(5) 配列番号 73 のアミノ酸 21～131 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 74 のアミノ酸 22～134 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(6) 配列番号 83 のアミノ酸 22～137 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 84 のアミノ酸 22～133 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(7) 配列番号 93 のアミノ酸 22～131 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 94 のアミノ酸 22～134 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；又は

(8) 配列番号 493 のアミノ酸 23～134 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 494 のアミノ酸 22～132 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列

を含む、請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

(1) 配列番号 73～74 の両方；

(2) 配列番号 83～84 の両方；

(3) 配列番号 93～94 の両方；

(4) 配列番号 493～494 の両方；

(5) 配列番号 73 のアミノ酸 21～131 及び配列番号 74 のアミノ酸 22～134 の両方；

(6) 配列番号 83 のアミノ酸 22～137 及び配列番号 84 のアミノ酸 22～133 の両方；

(7) 配列番号 93 のアミノ酸 22～131 及び配列番号 94 のアミノ酸 22～134 の両方；又は

(8) 配列番号 493 のアミノ酸 23～134 及び配列番号 494 のアミノ酸 22～132 の両方

のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

(1) 配列番号 75 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 76 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(2) 配列番号 85 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 86 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(3) 配列番号 95 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 96 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(4) 配列番号 495 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 496 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(5) 配列番号 75 のアミノ酸 21～268 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 76 のアミノ酸 22～307 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(6) 配列番号 85 のアミノ酸 22～274 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 86 のアミノ酸 22～306 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；

(7) 配列番号 95 のアミノ酸 22～268 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 96 のアミノ酸 22～307 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；又は

(8) 配列番号 495 のアミノ酸 23～271 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列、及び配列番号 496 のアミノ酸 22～305 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を含む、請求項 6～8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

- (1) 配列番号 75～76 の両方；
- (2) 配列番号 85～86 の両方；
- (3) 配列番号 95～96 の両方；
- (4) 配列番号 495～496 の両方；
- (5) 配列番号 75 のアミノ酸 21～268 及び配列番号 76 のアミノ酸 22～307 の両方；
- (6) 配列番号 85 のアミノ酸 22～274 及び配列番号 86 のアミノ酸 22～306 の両方；
- (7) 配列番号 95 のアミノ酸 22～268 及び配列番号 96 のアミノ酸 22～307 の両方；又は
- (8) 配列番号 495 のアミノ酸 23～271 及び配列番号 496 のアミノ酸 22～305 の両方

のアミノ酸配列を含む、請求項 6～8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

R175H 変異を有するヒト p53 に対して抗原特異性を有する、TCR の機能的部分を含む、単離又は精製されたタンパク質であって、機能的部分が：

- (1) 配列番号 67 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 68 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 69 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖並びに配列番号 70 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 71 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 72 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；
- (2) 配列番号 77 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 78 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 79 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖並びに配列番号 80 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 81 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 82 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；
- (3) 配列番号 87 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 88 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 89 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖並びに配列番号 90 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 91 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 92 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；又は
- (4) 配列番号 487 の  $\alpha$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 488 の  $\alpha$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 489 の  $\alpha$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖並びに配列番号 490 の  $\beta$  鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 491 の  $\beta$  鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 492 の  $\beta$  鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含む、単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 12】

- (1) 配列番号 73 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；
- (2) 配列番号 83 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 84 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；
- (3) 配列番号 93 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 94 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；
- (4) 配列番号 493 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 494 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；
- (5) 配列番号 73 のアミノ酸 21～131 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 74 のアミノ酸 22～134 に対して少

なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(6) 配列番号83のアミノ酸22～137に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号84のアミノ酸22～133に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(7) 配列番号93のアミノ酸22～131に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号94のアミノ酸22～134に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；又は

(8) 配列番号493のアミノ酸23～134に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号494のアミノ酸22～132に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖を含む、請求項11に記載のタンパク質。

10

【請求項13】

(1) 配列番号73のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号74のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(2) 配列番号83のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号84のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(3) 配列番号93のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号94のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(4) 配列番号493のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号494のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

20

(5) 配列番号73のアミノ酸21～131を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号74のアミノ酸22～134を含む第2のポリペプチド鎖；

(6) 配列番号83のアミノ酸22～137を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号84のアミノ酸22～133を含む第2のポリペプチド鎖；

(7) 配列番号93のアミノ酸22～131を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号94のアミノ酸22～134を含む第2のポリペプチド鎖；又は

(8) 配列番号493のアミノ酸23～134を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号494のアミノ酸22～132を含む第2のポリペプチド鎖を含む、請求項11に記載のタンパク質。

【請求項14】

30

(1) 配列番号75のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号76のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(2) 配列番号85のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号86のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(3) 配列番号95のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号96のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(4) 配列番号495のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号496のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

40

(5) 配列番号75のアミノ酸21～268に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号76のアミノ酸22～307に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(6) 配列番号85のアミノ酸22～274に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号86のアミノ酸22～306に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(7) 配列番号95のアミノ酸22～268に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号96のアミノ酸22～307に対して少

50

なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；又は

(8) 配列番号 495 のアミノ酸 23～271 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 496 のアミノ酸 22～305 に対して少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含む、請求項 11～13 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 15】

(1) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 76 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(2) 配列番号 85 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 86 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(3) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 96 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(4) 配列番号 495 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 496 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(5) 配列番号 75 のアミノ酸 21～268 を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 76 のアミノ酸 22～307 を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(6) 配列番号 85 のアミノ酸 22～274 を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 86 のアミノ酸 22～306 を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(7) 配列番号 95 のアミノ酸 22～268 を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 96 のアミノ酸 22～307 を含む第 2 のポリペプチド鎖；又は

(8) 配列番号 495 のアミノ酸 23～271 を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 496 のアミノ酸 22～305 を含む第 2 のポリペプチド鎖を含む、請求項 11～13 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 16】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 6～10 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 11～15 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の核酸を含む、組み換え発現ベクター。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の組み換え発現ベクターを含む、単離又は精製された宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の宿主細胞を含む、単離又は精製された細胞の集団。

【請求項 20】

(a) 請求項 1～5 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 6～10 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 11～15 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 16 に記載の核酸、請求項 17 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 18 に記載の宿主細胞、又は請求項 19 に記載の細胞の集団と、(b) 薬学的に許容し得る担体と、を含む医薬組成物。

【請求項 21】

哺乳類におけるがんの存在を検出する方法であって、

(a) 前記がんの細胞を含むサンプルを、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 6～10 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 11～15 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 16 に記載の核酸、請求項 17 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 18 に記載の宿主細胞、請求項 19 に記載の細胞の集団、又は請求項 20 に記載の医薬組成物と接触させ、それによって、複合体を形成させることと；

(b) 前記複合体を検出することと、  
を含み、

前記複合体の検出が、前記哺乳類におけるがんの存在を示す方法。

【請求項 22】

哺乳類におけるがんの治療又は予防のための、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 6～10 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 11～15 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 16 に記載の核酸、請求項 17 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 18 に記載の宿主細胞、請求項 19 に記載の細胞の集団を含む医薬組成物。

【請求項 23】

細胞の集団が前記哺乳類にとって自己である、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

細胞の集団が前記哺乳類にとって同種である、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記がんが、上皮がんである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

前記がんが、胆管がん、黒色腫、結腸がん、直腸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、神経膠芽腫、子宮頸がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、又は膀胱がんである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

前記がんが、上皮がんである、請求項 22～24 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記がんが、胆管がん、黒色腫、結腸がん、直腸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、神経膠芽腫、子宮頸がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、又は膀胱がんである、請求項 22～24 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この特許出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2017年9月29日出願の米国仮出願第62／565，383号の利益を主張する。

【0002】

連邦支援の研究又は開発に関する記述

本発明は、米国国立衛生研究所、国立がん研究所によって、プロジェクト番号BC010985の下、政府の支援を受けて成された。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

電子的に提出された文献の参照による援用

本明細書と同時に提出され、以下の通り特定されるコンピュータ可読ヌクレオチド／アミノ酸配列表は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる：2018年9月7日付の「739980\_ST25.txt」という名称の687，555バイトのASCII（テキスト）ファイル。

【背景技術】

【0004】

幾つかのがんは、特に該がんが転移性かつ切除不能になったとき、非常に限られた治療法の選択肢しか有しない場合がある。例えば、外科手術、化学療法、及び放射線療法等の治療法の進歩にもかかわらず、多くのがん、例えば、膵臓、結腸直腸、肺、子宮内膜、卵巣、及び前立腺のがんの予後は不良である場合がある。従って、がんの更なる治療法に対するアンメットニーズが存在する。

【発明の概要】

【0005】

本発明の実施形態は、変異型ヒトp53に対して抗原特異性を有する単離又は精製されたT細胞受容体（TCR）を提供する。

【0006】

本発明の更なる実施形態は、関連するポリペプチド及びタンパク質、並びに本発明の TCR に関連する核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、及び医薬組成物を提供する。

【0007】

本発明の更なる実施形態は、哺乳類におけるがんの存在を検出する方法及び哺乳類におけるがんを治療又は予防する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】指定の漸減ペプチド濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の WT p53-G245 ペプチド (wt) (網掛け無しの棒) 又は変異型 p53-G245S ペプチド (mut) (網掛け棒) のいずれかをパルスした自己樹状細胞 (DC) と共培養した後、患者 4127 由来の指定の TCR のうちの 1 つを形質導入した自己 PBL の共培養後に測定された、IFN- $\gamma$  の濃度 ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) を示すグラフである。

10

【図2】指定の漸減ペプチド濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の WT p53-G245 ペプチド (wt) (網掛け無しの棒) 又は変異型 p53-G245S ペプチド (mut) (網掛け棒) のいずれかをパルスした自己 DC と、患者 4127 由来の指定の TCR のうちの 1 つを形質導入した自己 PBL とを共培養した後に検出された、4-1BB 陽性細胞の百分率 (CD4+mTCR $\beta$ +の%) を示すグラフである。

【図3】表 A に示すペプチドのうちの 1 つをパルスした自己 DC と、患者 4127 由来の指定の TCR のうちの 1 つを形質導入した自己 PBL とを共培養した後に検出された、4-1BB 陽性細胞の百分率 (CD4+mTCR $\beta$ +の%) を示すグラフである。

20

【図4】指定の HLA アリルのうちの 1 つを形質導入し、DMSO 又は指定のペプチドのうちの 1 つをパルスした COS7 細胞と、患者 4127 由来の TIL 又は指定の TCR のうちの 1 つを形質導入した T 細胞とを共培養した後に測定された、IFN- $\gamma$  の濃度 ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) を示すグラフである。

【図5】指定の HLA アリルのうちの 1 つを形質導入し、DMSO 又は指定のペプチドのうちの 1 つをパルスした COS7 細胞と、患者 4127 由来の TIL 又は指定の TCR のうちの 1 つを形質導入した T 細胞とを共培養した後に検出された、4-1BB 陽性細胞の百分率 (CD4+mTCR $\beta$ +の%) を示すグラフである。

【図6】(1) 無関係 (IRR; 左の斜線付きの白色の棒)、WT p53 (p53-WT; 左の斜線付きの灰色の棒)、又は変異型 p53 (p53-MUT; 灰色の棒) の配列から構成された TMG をエレクトロポレーションした、あるいは (2) ペプチドビヒクル (DMSO; 右の斜線付きの白色の棒)、又は WT p53-G245 配列 (LP-p53-wt-G245; 右の斜線付きの灰色の棒) 若しくは変異型 p53-G245S (LP-p53-mut-G245S; 黒色の棒) 配列から構成された精製 (HPLC によって >95%) された 25 アミノ酸ペプチドをパルスした、同種 (DRB3\*01:01:01 又は DRB3\*02:02:01) APC と、患者 4127 由来の TIL とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$  個のエフェクタ細胞あたりのスポット数を示すグラフである。

30

【図7】(1) 無関係 (IRR; 左の斜線付きの白色の棒)、WT p53 (p53-WT; 左の斜線付きの灰色の棒)、又は変異型 p53 (p53-MUT; 灰色の棒) の配列から構成された TMG をエレクトロポレーションした、あるいは (2) ペプチドビヒクル (DMSO; 右の斜線付きの白色の棒)、又は WT p53-G245 配列 (LP-p53-wt-G245; 右の斜線付きの灰色の棒) 若しくは変異型 p53-G245S (LP-p53-mut-G245S; 黒色の棒) 配列から構成された精製 (HPLC によって >95%) された 25 アミノ酸ペプチドをパルスした、同種 (DRB3\*01:01:01 又は DRB3\*02:02:01) APC と、4127-TCR1 を発現している T 細胞とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$  個のエフェクタ細胞あたりのスポット数を示すグラフである。

40

【図8】図 8A は TMG1 及び指定の HLA アリルのプラスミドをトランスフェクトした Cos7 細胞と、患者 4196 を治療するために使用した輸液バッグからの TIL とを共

50

培養した後に測定されたIFN- $\gamma$ 分泌（スポット／ $2 \times 10^4$ 個の細胞）を示すグラフである。図8Bは候補最小エピトープ（HMTENVVRHC（配列番号530）又は（SQHMTENVVRH（配列番号531））をパルスした自己DCと、患者4196を治療するために使用した輸液バッグからのTILとを共培養した後に測定されたIFN- $\gamma$ 分泌（スポット／ $2 \times 10^4$ 個の細胞）を示すグラフである。単独で培養したT細胞が対照の役割を果たした。

【図9】図9A～9Dは以下のTCR：AV12／BV6-1（A）、AV2／BV6-1（B）、AV6／BV11（C）、又はAV38／BV10-3（D）のうちの1つを形質導入した細胞と、指定の濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の最小WT（丸）又は変異型（mut）（四角）のエピトープをパルスしたDCとを共培養した後に検出されたmTCR $\beta$ +CD8+41BB+細胞の百分率を示すグラフである。パルスされたDCと形質導入されていない（UT）細胞との共培養（三角）が対照の役割を果たした。示す結果は、2回の実験の代表例である。

10

【図10】図10A～10Bは以下のTCR：AV12／BV6-1（黒色の三角）、AV6／BV11（丸）、又はAV38／BV10-3（四角）のうちの1つを形質導入した細胞と、指定の濃度の最小変異型エピトープをパルスしたT2細胞とを共培養した後に測定された、IFN- $\gamma$ 分泌（ $\text{pg}/\text{mL}$ ）（A）及び4-1BB陽性細胞の百分率（%、mTCR $\beta$ +）（B）を示すグラフである。パルスされたT2細胞と形質導入されていない（UT）細胞との共培養（白色の三角）が対照の役割を果たした。

【図11】TCR形質導入細胞と指定の標的細胞株との共培養後に検出された $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。エフェクタ細胞に、AV12／BV6-1（黒色の棒）、AV6／BV11（縞模様の棒）、又はAV38／BV10-3（灰色の棒）を形質導入した。HLA-A\*02：01が形質導入された標的細胞を、LS123-A2、CCRFC-CEM-A2、及びAU-565-A2によって示す。ペプチドをパルスした標的細胞を（+）によって示す。ペプチドをパルスしていない標的細胞を（-）によって示す。標的細胞株と共培養した形質導入されていないエフェクタ細胞（網掛け無しの棒）を対照として使用した。

20

【図12】無関係（IRR；白色の棒）又は変異型p53（p53-MUT；黒色の棒）の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4238のTIL断片F1～F24（ $n=24$ ）とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

30

【図13】ペプチドビヒクル（DMSO；白色の棒）又は変異型p53-R248Q（LP-p53-R248Q-MUT；黒色の棒）配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4238のTIL断片F1～F24（ $n=24$ ）とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図14】無関係（IRR；白色の棒）又は変異型p53（p53-MUT；黒色の棒）の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4238のTIL断片F1～F24（ $n=24$ ）とを共培養した後に検出された、CD8+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

40

【図15】ペプチドビヒクル（DMSO；白色の棒）又は変異型p53-R248Q（LP-p53-R248Q-MUT；黒色の棒）配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4238のTIL断片F1～F24（ $n=24$ ）とを共培養した後に検出された、CD8+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図16】（1）ペプチドビヒクル（DMSO；白色の棒）をパルスした、（2）変異型p53-R248W（LP-p53-R248W-MUT；黒色の棒）配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした、（3）無関係のTMG（TMG-IRR；灰色の斜線付き棒）をエレクトロポレーションした、又は（4）変異型p53-R248W配列を含有するp53-mut-TMGをエレクト

50

ロポレーションした自己APCと、患者4253由来のTIL断片(F1~F24; n=24)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図17】無関係(IRR; 白色の棒)、WTp53(p53-WT; 灰色の棒)、又は変異型p53(p53-MUT; 黒色の棒)の配列から構成されたTMG(TM)をエレクトロポレーションした自己APCと、患者4273由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図18】無関係(IRR; 白色の棒)、WTp53(p53-WT; 灰色の棒)、又は変異型p53(p53-MUT; 黒色の棒)の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4273のTIL断片F1~F24(n=24)とを共培養した後に検出された、CD4+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図19】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-R248配列(LP-p53-R248-WT; 灰色の棒)若しくは変異型p53-R248W(LP-p53-R248W-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4273由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図20】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-R248配列(LP-p53-R248-WT; 灰色の棒)若しくは変異型p53-R248W(LP-p53-R248W-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4273由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に検出された、CD4+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図21】(1) 無関係(IRR; 右の斜線付きの黒色の棒)、WTp53(p53-wt-TMG; 左の斜線付きの黒色の棒)、又は変異型p53(p53-mut-TMG; 灰色の棒)の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした、あるいは(2) ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-Y220配列(LP-p53-Y220-WT; 横線付きの黒色の棒)若しくは変異型p53-Y220C(LP-p53-Y220C-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4149由来の自己PBL(4149-TCRa2b1又は4149-TCRa2b2を転移)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。ホルボール12-ミリスター13-アセター(PMA)及びイオノマイシン(Iono)がポジティブコントロールであった(灰色の棒)。

【図22】(1) 無関係(IRR; 右の斜線付きの黒色の棒)、WTp53(p53-wt-TMG; 左の斜線付きの黒色の棒)、又は変異型p53(p53-mut-TMG; 灰色の棒)の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした、あるいは(2) ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-Y220配列(LP-p53-Y220-WT; 横線付きの黒色の棒)若しくは変異型p53-Y220C(LP-p53-Y220C-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、TCR(4149-TCRa2b1又は4149-TCRa2b2)を転移させた患者4149由来の自己PBLとを共培養した後に検出された、CD4+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。PMA及びIonoがポジティブコントロールであった(灰色の棒)。

【図23】表Fのペプチドのうちの1つをパルスした自己DCと、患者4149由来のTILとを共培養した後に検出された4-1BB+細胞の百分率(CD4+T細胞の%)を示すグラフである。

【図24】個々のHLAアレル+/-TMGをコトランスフェクトしたCos7細胞と、4149-TCRa2b2転移T細胞とを共培養した後のIFN- $\gamma$ 分泌(pg/mL)

10

20

30

40

50

を示すグラフである。TMGをトランスフェクトしていない細胞に、p53Y220C15merペプチドをパルスした。パルスした標的細胞を網掛け棒によって示す。TMGをトランスフェクトした標的細胞を、網掛け無しの棒によって示す。

【図25】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又は変異型p53-R248Q(LP-p53-R248Q-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4213由来のTIL断片(F2及びF24)とを共培養した後に検出された、CD8+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図26】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又は変異型p53-R248Q(LP-p53-R248Q-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4213由来のCD4+T細胞とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。IFN- $\gamma$ の分泌を白色の棒によって示す。4-1BBの発現を黒色の棒によって示す。

10

【図27】無関係(IRR; 白色の棒)、WTp53(p53-WT; 灰色の棒)、又は変異型p53(p53-MUT; 黒色の棒)の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4268由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図28】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-R248配列(LP-p53-R248-WT; 灰色の棒)若しくは変異型p53-R248Q(LP-p53-R248Q-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4268由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

20

【図29】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-R248配列(LP-p53-R248-WT; 灰色の棒)若しくは変異型p53-R248Q(LP-p53-R248Q-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4268由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に検出された、CD4+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

30

【図30】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-R248配列(LP-p53-R248-WT; 灰色の棒)若しくは変異型p53-R248Q(LP-p53-R248Q-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4268由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に検出された、CD8+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図31】無関係(IRR; 白色の棒)、WTp53(p53-WT; 灰色の棒)、又は変異型p53(p53-MUT; 黒色の棒)の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4266由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

40

【図32】無関係(IRR; 白色の棒)、WTp53(p53-WT; 灰色の棒)、又は変異型p53(p53-MUT; 黒色の棒)の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4266由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に検出された、CD8+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図33】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWTp53-R248配列(LP-p53-R248-WT; 灰色の棒)若しくは変異型p53-R248W(LP-p53-R248W-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>

50

95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4266由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図34】ペプチドビヒクル(DMSO; 白色の棒)、又はWT p53-R248配列(LP-p53-R248-WT; 灰色の棒)若しくは変異型p53-R248W(LP-p53-R248W-MUT; 黒色の棒)配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4266由来のTIL断片(F1~F24、n=24)とを共培養した後に検出された、CD8+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図35】9種のp53スプライスバリエーションのアミノ酸配列のアラインメントを示す。  
 SP | P04637 | P53\_\_HUMAN (配列番号1); SP | P04637-2 | P53\_\_HUMAN (配列番号535); SP | P04637-3 | P53\_\_HUMAN (配列番号536); SP | P04637-4 | P53\_\_HUMAN (配列番号537); SP | P04637-5 | P53\_\_HUMAN (配列番号538); SP | P04637-6 | P53\_\_HUMAN (配列番号539); SP | P04637-7 | P53\_\_HUMAN (配列番号540); SP | P04637-8 | P53\_\_HUMAN (配列番号541); 及び SP | P04637-9 | P53\_\_HUMAN (配列番号542)。

【図36】漸減濃度の、WT (白色の丸) 又は変異型 (黒色の四角) p53-G245Sの配列に対応する25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、4127-O37-TCRを形質導入したT細胞とを共培養した後に検出された4-1BB陽性細胞の百分率(mTCR $\beta$ +)の%)を示すグラフである。

【図37】図37A~37Cは指定のHLAアレルのうちの1つをコトランスフェクトし、25アミノ酸のp53-G245SペプチドをパルスしたCOS7細胞と、4127-O37-TCR (A)、4127-TP53-G245S-TCR1 (B)、又は4127-O102-TCR (C)を形質導入したT細胞とを共培養した後に測定された、4-1BB陽性細胞の百分率(mTCR $\beta$ +)の%) (左のy軸; 斜線付きの棒) 及びIFN- $\gamma$  (pg/mL) (右のy軸; 黒色の棒)を示すグラフである。

【図38】無関係の変異(TM-G-IRR)、WT p53配列(TP53-wt-TMG)、又はR175Hを含む変異型p53配列(TP53-mut-TMG)をコードしているTMGをトランスフェクトした自己APCと、患者4141由来のTIL (断片培養物12)とを共培養した後に測定された、4-1BB陽性細胞の百分率(CD8+)の%) (右のy軸; 黒色の棒) 及びIFN- $\gamma$  ( $2 \times 10^4$ 個の細胞あたりのスポット) (左のy軸; 斜線付きの棒)を示すグラフである。培地のみ、並びにPMA及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。

【図39】指定のHLAアレル及び追加の遺伝子無し(HLAのみ; 白色の棒)、WT TP53 TMG (灰色の斜線付きの棒)、又はp53-R175H配列を含有する変異型 (黒色の棒) TP53 TMGをコトランスフェクトしたCos7細胞と、患者4141由来のTIL (断片培養物12)とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図40】モック(TCR無し)又は4141-TCR1a2を発現しているT細胞をT2腫瘍細胞(HLA-A\*02:01を発現)と共培養した後に測定された、IFN- $\gamma$ の濃度(pg/mL)を示すグラフである。ペプチドビヒクル(DMSO; 灰色の棒)、又はWT p53-R175ペプチド(斜線付きの灰色の棒)若しくは変異型p53-R175Hペプチド(黒色の棒)から構成された精製(HPLCによって>95%)されたペプチドを、T2細胞にパルスした。培地のみ(白色の棒)並びにPMA及びイオノマイシン(格子模様の棒)が、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。データは、平均 $\pm$ SEM (n=3)である。

【図41】操作されていない(網掛け無しの棒)又は完全長p53-R175Hタンパク質を過剰発現するようにされた(網掛け棒)Saos2細胞(p53-NUL及びHLA-A\*02:01+)と、4141-TCR1a2を発現しているT細胞とを共培養し

10

20

30

40

50

た後の、指定のマーカーのうちの1つの発現について陽性である細胞の百分率を示すグラフである。データは、平均±SEM (n=3) である。統計解析のために2つの細胞株間で各サイトカインについてスチューデントの両側t検定を実施した (\*\*\*)  $p < 0.001$  )。

【図42】 (1) 無関係 (TMG-IRR)、WT p53 (TMG-p53-WT)、又は変異型 p53 (TMG-p53-MUT) の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした、あるいは (2) ペプチドビヒクル (DMSO) 又はWT p53-Y220配列 (LP-p53-Y220-WT) 若しくは変異型 p53-Y220C (LP-p53-Y220C-MUT) 配列から構成された精製 (HPLCによって>95%) された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、TIL (患者4259由来の断片培養物6) とを共培養した後に検出された、CD4+4-1BB陽性細胞の百分率を示すグラフである。

10

【図43】漸減濃度の、WT p53配列 (白色の丸) 又は変異型 p53-Y220C (黒色の四角) に対応する25アミノ酸ペプチドを37℃で2時間パルスした自己APCと、患者4259由来のTIL断片培養物 (6番) とを共培養した後に検出されたCD4+4-1BB陽性細胞の百分率を示すグラフである。

【図44】DMSO、WT p53-Y220ペプチド、又は変異型 p53-Y220Cペプチドをパルスした自己APCと、患者4259由来のTILとを共培養した後に検出されたCD4+4-1BB陽性細胞の百分率を示すグラフである。

【図45】患者4259由来の指定のHLAアリルをコトランスフェクトし、DMSO (白色の棒) 又は p53-Y220Cペプチド (黒色の棒) をパルスしたCos7細胞と、患者4259由来のTIL断片培養物6番とを共培養した後に検出された、4-1BB陽性細胞の百分率 (CD4+の%) を示すグラフである。

20

【図46】モック (TCR無し; 白色の棒) 又は p53-Y220C特異的TCR (4259-F6-TCR; 黒色の棒) を発現しているエフェクタT細胞 ( $10^5$ 個) と、TC#4259標的細胞 (p53-Y220C及びHLA-DRB1\*04:01:01を内因的に発現している) とを共培養した後に検出された4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。TC#4259細胞を、何も無しで、W6/32汎HLAクラスI特異的遮断抗体、IVA12汎HLAクラスII特異的遮断抗体、又は変異型 p53-Y220Cペプチドと共にインキュベートした。培地のみ (TC無し) 並びにPMA及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。データは、平均±SEM (n=3) である。統計解析のために指定の通りの群間でスチューデントの両側t検定を実施した (\*\*  $p < 0.01$  及び\*\*\*  $p < 0.001$ ) 。

30

【図47】無関係 (IRR; 白色の棒)、WT p53 (p53-WT; 灰色の棒)、又は変異型 p53 (p53-MUT; 黒色の棒) の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4285由来のTIL断片 (F1~F22及びF24、n=23) とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

【図48】ペプチドビヒクル (DMSO; 白色の棒)、又はWT p53-R175配列 (LP-p53-R175-WT; 灰色の棒) 若しくは変異型 p53-R175H (LP-p53-R175H-MUT; 黒色の棒) 配列から構成された精製 (HPLCによって>95%) された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと、患者4285のTIL断片 (F1~F22及びF24、n=23) とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$ 個のエフェクタ細胞あたりのIFN- $\gamma$ 陽性スポット数を示すグラフである。

40

【図49】無関係 (IRR; 白色の棒)、WT型 p53 (p53-WT; 灰色の棒)、又は変異型 p53 (p53-MUT; 黒色の棒) の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと、患者4285由来のTIL断片 (F1~F22及びF24、n=23) とを共培養した後に検出された、CD4+4-1BB+細胞の百分率を示すグラフである。

【図50】ペプチドビヒクル (DMSO; 白色の棒)、又はWT p53-R175配列 (

50

L P - p 5 3 - R 1 7 5 - W T ; 灰色の棒) 若しくは変異型 p 5 3 - R 1 7 5 H ( L P - p 5 3 - R 1 7 5 H - M U T ; 黒色の棒) 配列から構成された精製 ( H P L C によって > 9 5 % ) された 2 5 アミノ酸ペプチドをパルスした自己 A P C と、患者 4 2 8 5 由来の T I L 断片 ( F 1 ~ F 2 2 及び F 2 4 , n = 2 3 ) とを共培養した後に検出された、C D 4 + 4 - 1 B B + 細胞の百分率を示すグラフである。

【図 5 1】指定の H L A アリルをトランスフェクトし、D M S O (ペプチドビヒクル; 灰色及び黒色の斜線付きの棒) 又は変異型 p 5 3 - R 1 7 5 H ペプチド (灰色、格子模様付き、及び黒色の棒) をパルスした C o s 7 細胞と、T I L 断片培養物 4 2 8 5 - F 6 、4 2 8 5 - F 9 、及び 4 2 8 5 - F 1 0 とを共培養した後に検出された 4 - 1 B B + 細胞の百分率 ( C D 4 + の % ) を示すグラフである。

10

【図 5 2】漸減濃度の、W T (白色の丸及び四角) 又は変異型 (黒色の丸及び四角) p 5 3 - R 1 7 5 H の配列に対応する 2 5 又は 1 5 アミノ酸ペプチドをパルスした自己 A P C と、4 2 8 5 - T C R 1 を転移させた T 細胞とを共培養した後に検出された 4 - 1 B B + 細胞の百分率 ( C D 4 + の % ) を示すグラフである。

【図 5 3】患者 4 2 6 6 由来の個々の H L A アリルをコトランスフェクトし、ペプチド無し (白色の棒)、D M S O (ペプチドビヒクル; 灰色の棒)、野生型 p 5 3 - R 2 4 8 ペプチド (灰色の斜線付きの棒)、又は変異型 p 5 3 - R 2 4 8 W ペプチド (黒色の棒) をパルスした C o s 7 細胞と、患者 4 2 6 6 由来の T I L とを共培養した後に検出された、4 - 1 B B + 細胞の百分率 ( C D 8 + の % ) を示すグラフである。データは、平均 ± S E M ( n = 3 ) である。

20

【図 5 4】ペプチドビヒクル ( D M S O ; 灰色の棒)、又は W T p 5 3 - R 2 4 8 配列 (斜線付きの灰色の棒) 若しくは変異型 p 5 3 - R 2 4 8 W (黒色の棒) 配列から構成された精製 ( H P L C によって > 9 5 % ) された 2 5 アミノ酸ペプチドをパルスした自己 A P C と、モック ( T C R 無し)、4 2 6 6 - T C R 1 、4 2 6 6 - T C R 2 、4 2 6 6 - T C R 3 、又は 4 2 6 6 - T C R 4 を発現している T 細胞とを共培養した後に検出された、4 - 1 B B + 細胞の百分率 ( C D 8 + の % ) を示すグラフである。培地のみ (白色の棒) 並びに P M A 及びイオノマイシン (格子模様の棒) が、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。

【図 5 5】患者 4 2 6 6 から摘出され、次いで、免疫無防備状態のマウスで連続継代された異種移植腫瘍断片から樹立された腫瘍細胞 ( T C ) 株 ( T C # 4 2 6 6 ) と、モック ( T C R 無し) 又は p 5 3 - R 2 4 8 W 特異的 T C R ( 4 2 6 6 - T C R 2 、4 2 6 6 - T C R 3 、又は 4 2 6 6 - T C R 4 ) を発現している T 細胞とを共培養した後に検出された 4 - 1 B B + 細胞の百分率 ( C D 8 + の % ) を示すグラフである。T C # 4 2 6 6 細胞を、何も無しで (黒色の棒)、W 6 / 3 2 汎 H L A クラス I 特異的遮断抗体 (右の灰色の斜線付き棒)、I V A 1 2 汎 H L A クラス I I 特異的遮断抗体 (灰色の棒)、又は変異型 p 5 3 - R 2 4 8 W ペプチド (左の灰色の斜線付き棒) のいずれかと共にインキュベートした。培地のみ ( T C 無し; 白色の棒) 並びに P M A 及びイオノマイシン (灰色の格子模様の棒) が、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。

30

【図 5 6】無関係の変異 (灰色の棒)、野生型 p 5 3 配列 (灰色の斜線付きの棒)、又は p 5 3 - R 2 4 8 W を含む変異型 p 5 3 配列 (黒色の棒) をコードしている T M G をトランスフェクトした自己 A P C と、患者 4 2 7 3 由来の T I L とを共培養した後に検出された、C D 4 + 4 - 1 B B + 細胞の百分率を示すグラフである。培地のみ (白色の棒)、並びに P M A 及びイオノマイシン (格子模様の棒) が、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。

40

【図 5 7】野生型 (白色の丸) 又は p 5 3 - R 2 4 8 W ネオエピトープ由来の変異型 (黒色の四角) に対応する 2 5 アミノ酸ペプチドをパルスした自己 A P C と、患者 4 2 7 3 由来の T I L とを共培養した後に検出された C D 4 + 4 - 1 B B + 細胞の百分率を示すグラフである。D M S O がペプチドビヒクルであった。

【図 5 8】1 4 アミノ酸が重複している p 5 3 - R 2 4 8 W ネオエピトープ由来の 1 5 アミノ酸ペプチド (太線部がアミノ酸置換) をパルスした自己 A P C と、患者 4 2 7 3 由来

50

の T I L とを共培養した後に検出された C D 4 + 4 - 1 B B + 細胞の百分率を示すグラフである。DMSO がペプチドビヒクルであり、培地のみ (T 細胞のみ) 並びに PMA 及びイオノマイシンが対照であった。25 アミノ酸ペプチド (w t p 5 3 - R 2 4 8 及び変異型 p 5 3 - R 2 4 8 W) が、15 アミノ酸ペプチドに対する更なる対照であった。ペプチドは、Y M C N S S C M G G M N W R P (配列番号 592) ; M C N S S C M G G M N W R P I (配列番号 593) ; C N S S C M G G M N W R P I L (配列番号 594) ; N S S C M G G M N W R P I L T (配列番号 595) ; S S C M G G M N W R P I L T I (配列番号 596) ; S C M G G M N W R P I L T I I (配列番号 597) ; C M G G M N W R P I L T I I T (配列番号 598) ; M G G M N W R P I L T I I T L (配列番号 599) ; G G M N W R P I L T I I T L E (配列番号 600) ; G M N W R P I L T I I T L E D (配列番号 601) ; 及び M N W R P I L T I I T L E D S (配列番号 602) である。

10

【図 59】それぞれ p 5 3 - R 2 4 8 W ネオ抗原の有り無しで、患者 4 2 7 3 由来の個々の H L A アリルと W T (白色の棒) 又は変異型 (黒色の棒) T P 5 3 T M G のいずれかとをコトランスフェクトした C o s 7 細胞を、患者 4 2 7 3 由来の T I L と共培養した後に分泌された I F N -  $\gamma$  の濃度 (p g / m L) を示すグラフである。

【図 60】ペプチドビヒクル (DMSO ; 灰色の棒) 、又は W T p 5 3 - R 2 4 8 配列 (斜線付きの灰色の棒) 若しくは変異型 p 5 3 - R 2 4 8 W (黒色の棒) 配列から構成された精製 (H P L C によって > 95 %) された 25 アミノ酸ペプチドをパルスした自己 A P C と、モック (T C R 無し) 又は 4 2 7 3 - T C R 1 a 2 を発現している T 細胞とを共培養した後に測定された、 $2 \times 10^4$  個の細胞あたりの I F N -  $\gamma$  スポット数を示すグラフである。培地のみ (白色の棒) 並びに PMA 及びイオノマイシン (格子模様の棒) が、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。

20

【発明を実施するための形態】

【0009】

腫瘍タンパク質 P 5 3 (「T P 5 3」又は「p 5 3」とも称される) は、例えば、細胞分裂を制御することによって腫瘍抑制因子として作用する。p 5 3 タンパク質は、細胞の核内に位置し、そこで D N A に直接結合する。D N A が損傷を受けると、p 5 3 タンパク質は、D N A を修復するか又は損傷を受けた細胞をアポトーシスさせるかの決定に関与する。D N A を修復することができる場合、p 5 3 は他の遺伝子を活性化させて損傷を修復する。D N A を修復することができない場合、p 5 3 タンパク質は、細胞が分裂するのを阻止し、該細胞にシグナルを伝達してアポトーシスさせる。変異型の又は損傷を受けた D N A を有する細胞の分裂を停止させることによって、p 5 3 は腫瘍の発達を阻止するのに役立つ。野生型 (W T) (正常) 完全長 p 5 3 は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。

30

【0010】

p 5 3 タンパク質における変異によって、p 5 3 タンパク質の腫瘍抑制因子機能が低下するか又は失われることがある。あるいは又は更に、p 5 3 変異は、ドミナントネガティブ方式で W T p 5 3 に干渉することによる機能獲得型変異であり得る。変異型 p 5 3 タンパク質は、様々なヒトがん、例えば、胆管がん、黒色腫、結腸がん、直腸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、非小細胞肺癌 (N S C L C) 、神経膠芽腫、子宮頸がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、又は膀胱がんのいずれかで発現し得る。

40

【0011】

本発明の実施形態は、変異型ヒト p 5 3 (以後、「変異型 p 5 3」) に対して抗原特異性を有する単離又は精製された T 細胞受容体 (T C R) を提供する。以後、「T C R」に対する言及は、特に規定のない限り、T C R の機能的部分及び機能的バリエーションも指す。p 5 3 の変異は、本明細書では、完全長 W T p 5 3 (配列番号 1) のアミノ酸配列を参照することによって定義される。従って、p 5 3 の変異は、本明細書では、特定の位置に存在するアミノ酸残基、続いて、位置番号、続いて、検討中の特定の位置において該残基に置き換わったアミノ酸を参照することによって記載される。例えば、位置が配列番号 1 によって定義される場合、用語「R 175」とは、配列番号 1 の 175 位に存在するアルギ

50

ニンを指し、「R 1 7 5 H」は、配列番号 1 の 1 7 5 位に存在するアルギニンがヒスチジンに置き換わっていることを示し、一方、「G 2 4 5 S」は、配列番号 1 の 2 4 5 位に存在するグリシンがセリンに置き換わっていることを示す。P 5 3 は、9 種の公知のスプライズバリエーションを有する。本明細書に記載の p 5 3 変異は、9 種の p 5 3 スプライズバリエーションの全てにわたって保存されている。9 種の p 5 3 スプライズバリエーションのアラインメントを図 3 5 に示す。従って、本発明の方法によって単離された T 細胞は、9 種の p 5 3 スプライズバリエーションのいずれかによってコードされている本明細書に記載の任意の変異型 p 5 3 アミノ酸配列に対して抗原特異性を有し得る。位置が配列番号 1 によって定義される場合、p 5 3 の特定のスプライズバリエーションのアミノ酸配列の実際の位置は、配列番号 1 の対応する位置に対して定義され、配列番号 1 によって定義される位置は、特定の

10

#### 【0012】

本発明の実施形態では、T C R は、配列番号 1 の 1 7 5 位、2 2 0 位、2 4 5 位、2 4 8 位、2 4 9 位、2 7 3 位、又は 2 8 2 位に変異を有するヒト p 5 3 に対して抗原特異性を有する。T C R は、配列番号 1 の 1 7 5 位、2 2 0 位、2 4 5 位、又は 2 4 8 位に変異を有するヒト p 5 3 に対して抗原特異性を有し得る。p 5 3 変異は、任意のミスセンス変異であってよい。従って、配列番号 1 の 1 7 5 位、2 2 0 位、2 4 5 位、2 4 8 位、2 4 9 位、2 7 3 位、又は 2 8 2 位における変異は、配列番号 1 の 1 7 5 位、2 2 0 位、2 4 5 位、2 4 8 位、2 4 9 位、2 7 3 位、又は 2 8 2 位に存在するネイティブ (W T) アミノ酸残基の、検討中の特定の位置に存在するネイティブ (W T) アミノ酸残基以外の任意のアミノ酸残基による置換であってよい。本発明の実施形態では、T C R は、以下のヒト p 5 3 変異のうちの 1 つを有するヒト p 5 3 に対して抗原特異性を有する：R 1 7 5 H、Y 2 2 0 C、G 2 4 5 D、G 2 4 5 S、R 2 4 8 L、R 2 4 8 Q、R 2 4 8 W、R 2 4 9 S、R 2 7 3 H、R 2 7 3 C、R 2 7 3 L、又は R 2 8 2 W。T C R は、以下のヒト p 5 3 変異のうちの 1 つを有するヒト p 5 3 に対して抗原特異性を有し得る：R 1 7 5 H、Y 2 2 0 C、G 2 4 5 S、R 2 4 8 Q、又は R 2 4 8 W。例えば、本発明の T C R は、配列番号 2 ~ 1 3 からなる群から選択される変異型 p 5 3 アミノ酸配列に対して抗原特異性を有し得る。

20

30

#### 【0013】

本発明の実施形態では、本発明の T C R は、H L A (ヒト白血球抗原) 分子依存的に変異型 p 5 3 を認識することができ得る。「H L A 分子依存的に」とは、本明細書で使用する

#### 【0014】

養子細胞移入に使用される細胞で発現した場合を含む、本発明の T C R は、多くの利点を提供し得る。変異型 p 5 3 は、がん細胞で発現し、正常非がん細胞では発現しない。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、本発明の T C R は、有利には、例えば毒性を最小化又は排除することによって、正常非がん細胞の破壊を最小化又は排除すると同時に、がん細胞の破壊を標的とし、それによって、低減すると考えられる。更に、本発明の T C R は、有利には、例えば化学療法、外科手術、又は放射線照射等の他の種類の治療には応答しない変異型 p 5 3 陽性がんを成功裏に治療又は予防することができる。更に、本発明の T C R は、変異型 p 5 3 を高い結合活性で (h i g h l y a v i d) 認識することができ、これによって、操作されていない腫瘍細胞 (例えば、インターフェロン (I F N) -  $\gamma$  で処理されていない、変異型 p 5 3 及び適用可能な H L A 分子の一方又は両方をコードしているベクターをトランスフェクトしていない、p 5 3 変異を有する p 5 3 ペプ

40

50

チドをパルスしていない、又はこれらの組み合わせの腫瘍細胞）を認識する能力が付与され得る。全ての腫瘍のおよそ半分はp53に変異を有し、そのうちの約半分はミスセンス変異であり、該ミスセンス変異のうちの約30%は、以下の「ホットスポット」残基に生じる：R175H、Y220C、G245D、G245S、R248L、R248Q、R248W、R249S、R273C、R273L、R273H、及びR282W。更に、血縁関係のないヒトの腫瘍において、p53で同じ「ホットスポット」変異（例えば、R175H、Y220C、G245D、G245S、R248L、R248Q、R248W、R249S、R273H、R273C、R273L、又はR282W）が頻繁に生じる（累積的に、p53ミスセンス変異の約30%）。従って、本発明のTCRは、免疫療法による治療の適格性を有する可能性のある患者の数を増加させることができる。

10

## 【0015】

語句「抗原特異性」とは、本明細書で使用する時、TCRが、高い結合活性で変異型p53に特異的に結合し、免疫学的に認識できることを意味する。例えば、(a) 低濃度の変異型p53ペプチド（例えば、約0.05 ng/mL～約5 ng/mL、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、又は上記値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）をパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞又は(b) 標的細胞が変異型p53を発現するように変異型p53をコードしているヌクレオチド配列を導入した抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共培養した際に、TCRを発現している約 $1 \times 10^4$ ～約 $1 \times 10^5$ 個のT細胞が少なくとも約200 pg/mL以上（例えば、200 pg/mL以上、300 pg/mL以上、400 pg/mL以上、500 pg/mL以上、600 pg/mL以上、700 pg/mL以上、1000 pg/mL以上、5,000 pg/mL以上、7,000 pg/mL以上、10,000 pg/mL以上、20,000 pg/mL以上、又は上記値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）のIFN- $\gamma$ を分泌した場合、該TCRが変異型p53に対して「抗原特異性」を有するとみなしてよい。本発明のTCRを発現している細胞は、より高濃度の変異型p53ペプチドをパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共培養した際にもIFN- $\gamma$ を分泌することができる。

20

## 【0016】

あるいは又は更に、ネガティブコントロールで発現するIFN- $\gamma$ の量と比較して、(a) 低濃度の変異型p53ペプチドをパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞又は(b) 標的細胞が変異型p53を発現するように変異型p53をコードしているヌクレオチド配列を導入した抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共培養した際に、TCRを発現しているT細胞が少なくとも2倍のIFN- $\gamma$ を分泌した場合、該TCRが変異型p53に対して「抗原特異性」を有するとみなしてよい。ネガティブコントロールは、例えば、(i) (a) 同濃度の無関係のペプチド（例えば、変異型p53ペプチドとは異なる配列を有する幾つかの他のペプチド）をパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞若しくは(b) 標的細胞が無関係のペプチドを発現するように該無関係のペプチドをコードしているヌクレオチド配列を導入した抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共培養した、該TCRを発現しているT細胞、又は(ii) (a) 同濃度の変異型p53ペプチドをパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞若しくは(b) 標的細胞が変異型p53を発現するように変異型p53をコードしているヌクレオチド配列を導入した抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共培養した、形質導入されていないT細胞（例えば、該TCRを発現しないPBMC由来）であってよい。IFN- $\gamma$ 分泌は、当技術分野において公知の方法、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)によって測定することができる。

30

40

## 【0017】

あるいは又は更に、IFN- $\gamma$ を分泌するネガティブコントロールT細胞の数と比較して、(a) 低濃度の変異型p53ペプチドをパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞又は(b) 標的細胞が変異型p53を発現するように変異型p53をコードしているヌクレオチド配列を導入した抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共

50

培養した際に、 $IFN-\gamma$ を分泌するTCRを発現しているT細胞の数が少なくとも2倍であった場合、該TCRが変異型p53に対して「抗原特異性」を有するとみなしてよい。ペプチドの濃度及びネガティブコントロールは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載の通りであってよい。 $IFN-\gamma$ を分泌する細胞の数は、当技術分野において公知の方法、例えば、酵素免疫スポット（ELISPOT）アッセイによって測定することができる。

#### 【0018】

あるいは又は更に、同じ標的細胞と共培養したネガティブコントロールT細胞についてELISPOTによって検出されたスポット数と比較して、（a）低濃度の変異型p53ペプチドをパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞又は（b）標的細胞が変異型p53を発現するように変異型p53をコードしているヌクレオチド配列を導入した抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共培養した際に、TCRを発現しているT細胞についてのELISPOTによって少なくとも2倍のスポットが検出された場合、該TCRが変異型p53に対して「抗原特異性」を有するとみなしてよい。ペプチドの濃度及びネガティブコントロールは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載の通りであってよい。

#### 【0019】

あるいは又は更に、（a）低濃度の変異型p53ペプチドをパルスした抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞又は（b）標的細胞が変異型p53を発現するように変異型p53をコードしているヌクレオチド配列を導入した抗原陰性適用可能なHLA分子陽性の標的細胞と共培養した際に、TCRを発現しているT細胞についてのELISPOTによって約50個を超えるスポットが検出された場合、該TCRが変異型p53に対して「抗原特異性」を有するとみなしてよい。ペプチドの濃度は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載の通りであってよい。

#### 【0020】

あるいは又は更に、変異型p53を発現している標的細胞で刺激した後に例えばフローサイトメトリーによって測定したとき、TCRを発現しているT細胞が4-1BB及びOX40の一方又は両方の発現をアップレギュレートした場合、該TCRが変異型p53に対して「抗原特異性」を有するとみなしてよい。

#### 【0021】

本発明は、例えば、TCRのアルファ（ $\alpha$ ）鎖、TCRのベータ（ $\beta$ ）鎖、TCRのガンマ（ $\gamma$ ）鎖、TCRのデルタ（ $\delta$ ）鎖、又はこれらの組み合わせ等の2本のポリペプチド（すなわち、ポリペプチド鎖）を含むTCRを提供する。本発明のTCRのポリペプチドは、TCRが変異型p53に対して抗原特異性を有する限り、任意のアミノ酸配列を含んでいてよい。

#### 【0022】

本発明の実施形態では、TCRは、TCRの相補性決定領域（CDR）1、CDR2、及びCDR3を含む可変領域をそれぞれ含む、2本のポリペプチド鎖を含む。本発明の実施形態では、TCRは、 $\alpha$ 鎖のCDR1（CDR1 $\alpha$ ）、 $\alpha$ 鎖のCDR2（CDR2 $\alpha$ ）、及び $\alpha$ 鎖のCDR3（CDR3 $\alpha$ ）を含む第1のポリペプチド鎖と、 $\beta$ 鎖のCDR1（CDR1 $\beta$ ）、 $\beta$ 鎖のCDR2（CDR2 $\beta$ ）、及び $\beta$ 鎖のCDR3（CDR3 $\beta$ ）を含む第2のポリペプチド鎖とを含む。本発明の実施形態では、TCRは、（1）配列番号27～32の全て；（2）配列番号37～42の全て；（3）配列番号47～52の全て；（4）配列番号57～62の全て；（5）配列番号67～72の全て；（6）配列番号77～82の全て；（7）配列番号87～92の全て；（8）配列番号97～102の全て；（9）配列番号107～112の全て；（10）配列番号117～122の全て；（11）配列番号127～132の全て；（12）配列番号137～142の全て；（13）配列番号147～152の全て；（14）配列番号157～162の全て；（15）配列番号167～172の全て；（16）配列番号177～182の全て；（17）配列番号187～192の全て；（18）配列番号197～202の全て；（19）配列番号20

7～212の全て；(20) 配列番号217～222の全て；(21) 配列番号227～232の全て；(22) 配列番号237～242の全て；(23) 配列番号247～252の全て；(24) 配列番号257～262の全て；(25) 配列番号267～272の全て；(26) 配列番号277～282の全て；(27) 配列番号287～292の全て；(28) 配列番号297～302の全て；(29) 配列番号307～312の全て；(30) 配列番号317～322の全て；(31) 配列番号327～332の全て；(32) 配列番号337～342の全て；(33) 配列番号347～352の全て；(34) 配列番号357～362の全て；(35) 配列番号367～372の全て；(36) 配列番号377～382の全て；(37) 配列番号387～392の全て；(38) 配列番号397～402の全て；(39) 配列番号407～412の全て；(40) 配列番号417～422の全て；(41) 配列番号427～432の全て；(42) 配列番号437～442の全て；(43) 配列番号447～452の全て；(44) 配列番号457～462の全て；(45) 配列番号467～472の全て；(46) 配列番号477～482の全て；又は(47) 配列番号487～492の全てのアミノ酸配列を含む。この段落における上述の47のアミノ酸配列のコレクションのそれぞれ1つは、変異型ヒトp53に対して抗原特異性を有する47の異なるTCRのそれぞれの6つのCDR領域を示す。各コレクションにおける6つのアミノ酸配列は、それぞれ、CDR1 $\alpha$ 、CDR2 $\alpha$ 、CDR3 $\alpha$ 、CDR1 $\beta$ 、CDR2 $\beta$ 、及びCDR3 $\beta$ に対応する。

#### 【0023】

本発明の実施形態では、TCRは、合わせて上記CDRのコレクションのうちの1つを含む、 $\alpha$ 鎖可変領域のアミノ酸配列及び $\beta$ 鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。これに関して、該TCRは、(1) 配列番号33～34の両方；(2) 配列番号43～44の両方；(3) 配列番号53～54の両方；(4) 配列番号63～64の両方；(5) 配列番号73～74の両方；(6) 配列番号83～84の両方；(7) 配列番号93～94の両方；(8) 配列番号103～104の両方；(9) 配列番号113～114の両方；(10) 配列番号123～124の両方；(11) 配列番号133～134の両方；(12) 配列番号143～144の両方；(13) 配列番号153～154の両方；(14) 配列番号163～164の両方；(15) 配列番号173～174の両方；(16) 配列番号183～184の両方；(17) 配列番号193～194の両方；(18) 配列番号203～204の両方；(19) 配列番号213～214の両方；(20) 配列番号223～224の両方；(21) 配列番号233～234の両方；(22) 配列番号243～244の両方；(23) 配列番号253～254の両方；(24) 配列番号263～264の両方；(25) 配列番号273～274の両方；(26) 配列番号283～284の両方；(27) 配列番号293～294の両方；(28) 配列番号303～304の両方；(29) 配列番号313～314の両方；(30) 配列番号323～324の両方；(31) 配列番号333～334の両方；(32) 配列番号343～344の両方；(33) 配列番号353～354の両方；(34) 配列番号363～364の両方；(35) 配列番号373～374の両方；(36) 配列番号383～384の両方；(37) 配列番号393～394の両方；(38) 配列番号403～404の両方；(39) 配列番号413～414の両方；(40) 配列番号423～424の両方；(41) 配列番号433～434の両方；(42) 配列番号443～444の両方；(43) 配列番号453～454の両方；(44) 配列番号463～464の両方；(45) 配列番号473～474の両方；(46) 配列番号483～484の両方；又は(47) 配列番号493～494の両方のアミノ酸配列を含み得る。この段落における上述の47のアミノ酸配列のコレクションのそれぞれ1つは、変異型ヒトp53に対して抗原特異性を有する47の異なるTCRのそれぞれの2つの可変領域を示す。各コレクションにおける2つのアミノ酸配列は、それぞれ、TCRの $\alpha$ 鎖の可変領域及び $\beta$ 鎖の可変領域に対応する。

#### 【0024】

本発明のTCRは、定常領域を更に含み得る。定常領域は、例えばヒト又はマウス等の任意の好適な種に由来してよい。本発明の実施形態では、TCRは、マウスの定常領

10

20

30

40

50

域を更に含む。本明細書で使用する時、用語「マウス」又は「ヒト」は、本明細書に記載のTCR又はTCRの任意の構成要素（例えば、相補性決定領域（CDR）、可変領域、定常領域、アルファ鎖、及び／又はベータ鎖）に言及するとき、それぞれマウス又はヒト由来のTCR（又はその構成要素）、すなわち、それぞれマウスT細胞又はヒトT細胞を起源とするか又は該細胞によってかつて発現されたTCR（又はその構成要素）を意味する。本発明の実施形態では、TCRは、マウスα鎖定常領域及びマウスβ鎖定常領域を含み得る。マウスα鎖定常領域は、修飾されていてもよく、修飾されていなくてもよい。修飾マウスα鎖定常領域は、例えば米国特許出願公開第2017/0145070号に記載の通り、例えば、システイン置換されていてもよく、LVL修飾されていてもよく、又はシステイン置換及びLVL修飾の両方が行われていてもよい。マウスβ鎖定常領域は、修飾されていてもよく、修飾されていなくてもよい。修飾マウスβ鎖定常領域は、例えば米国特許出願公開第2017/0145070号に記載の通り、例えば、システイン置換されていてもよい。本発明の実施形態では、TCRは、配列番号23又は24のアミノ酸配列を含むシステイン置換LVL修飾マウスα鎖定常領域を含む。本発明の実施形態では、TCRは、配列番号25のアミノ酸配列を含むシステイン置換マウスβ鎖定常領域を含む。【0025】

本発明の実施形態では、本発明のTCRは、TCRのα鎖及びTCRのβ鎖を含み得る。TCRのα鎖は、α鎖の可変領域及びα鎖の定常領域を含み得る。この種のα鎖は、TCRの任意のβ鎖と対合し得る。β鎖は、β鎖の可変領域及びβ鎖の定常領域を含み得る。本発明の実施形態では、TCRは、（1）配列番号35～36の両方；（2）配列番号45～46の両方；（3）配列番号55～56の両方；（4）配列番号65～66の両方；（5）配列番号75～76の両方；（6）配列番号85～86の両方；（7）配列番号95～96の両方；（8）配列番号105～106の両方；（9）配列番号115～116の両方；（10）配列番号125～126の両方；（11）配列番号135～136の両方；（12）配列番号145～146の両方；（13）配列番号155～156の両方；（14）配列番号165～166の両方；（15）配列番号175～176の両方；（16）配列番号185～186の両方；（17）配列番号195～196の両方；（18）配列番号205～206の両方；（19）配列番号215～216の両方；（20）配列番号225～226の両方；（21）配列番号235～236の両方；（22）配列番号245～246の両方；（23）配列番号255～256の両方；（24）配列番号265～266の両方；（25）配列番号275～276の両方；（26）配列番号285～286の両方；（27）配列番号295～296の両方；（28）配列番号305～306の両方；（29）配列番号315～316の両方；（30）配列番号325～326の両方；（31）配列番号335～336の両方；（32）配列番号345～346の両方；（33）配列番号355～356の両方；（34）配列番号365～366の両方；（35）配列番号375～376の両方；（36）配列番号385～386の両方；（37）配列番号395～396の両方；（38）配列番号405～406の両方；（39）配列番号415～416の両方；（40）配列番号425～426の両方；（41）配列番号435～436の両方；（42）配列番号445～446の両方；（43）配列番号455～456の両方；（44）配列番号465～466の両方；（45）配列番号475～476の両方；（46）配列番号485～486の両方；又は（47）配列番号495～496の両方のアミノ酸配列を含む。この段落における上述の47のアミノ酸配列のコレクションのそれぞれ1つは、変異型ヒトp53に対して抗原特異性を有する47の異なるTCRのそれぞれのα鎖及びβ鎖を示す。各コレクションにおける2つのアミノ酸配列は、それぞれ、TCRのα鎖及びβ鎖に対応する。【0026】

本明細書に記載の本発明のTCRの機能的バリエーションは、本発明の範囲に含まれる。用語「機能的バリエーション」とは、本明細書で使用する時、親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質に対して実質的な又は著しい配列の同一性又は類似性を有するTCR、ポリペプチド、又はタンパク質を指し、該機能的バリエーションは、該バリエーションがそのバリエーション

10

20

30

40

50

トであるTCR、ポリペプチド、又はタンパク質の生物活性を保持している。機能的バリエーションは、例えば、親のTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質と同様の程度、同一程度、又はより高程度、親TCRが抗原特異性を有するか又は親のポリペプチド若しくはタンパク質が特異的に結合する変異型p53に特異的に結合する能力を保持している、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質（親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質）のバリエーションを包含する。親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質に関連して、機能的バリエーションは、例えば、それぞれ親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質に対してアミノ酸配列が少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、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96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又はそれ以上同一であってよい。

10

#### 【0027】

機能的バリエーションは、例えば、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。保存的アミノ酸置換は、当技術分野において公知であり、特定の物理的及び／又は化学的特性を有するあるアミノ酸が、同じ化学的又は物理的特性を有する別のアミノ酸に交換されるアミノ酸置換を含む。例えば、保存的アミノ酸置換は、酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸（例えば、Asp又はGlu）による置換、非極性側鎖を有するアミノ酸の、別の非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等）による置換、塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸（Lys、Arg等）による置換、極性側鎖を有するアミノ酸の、別の極性側鎖を有するアミノ酸（Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等）による置換等であってよい。

20

#### 【0028】

あるいは又は更に、機能的バリエーションは、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を有する親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。この場合、非保存的アミノ酸置換が、機能的バリエーションの生物活性に干渉もせず、阻害もしないことが好ましい。好ましくは、非保存的アミノ酸置換は機能的バリエーションの生物活性を増強し、その結果、機能的バリエーションの生物活性が、親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質と比べて増大する。

#### 【0029】

TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、本明細書に記載の指定のアミノ酸配列（複数可）から本質的になっていてよく、その結果、該TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の他の構成要素、例えば、他のアミノ酸が、該TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の生物活性を実質的に変化させることはない。

30

#### 【0030】

また、本明細書に記載のTCRのいずれかの機能的部分を含むポリペプチドが本発明によって提供される。用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する時、オリゴペプチドを含み、そして、1つ以上のペプチド結合によって連結された一本鎖のアミノ酸を指す。

#### 【0031】

本発明のポリペプチドに関して、機能的部分は、変異型p53に特異的に結合する限り、該機能的部分がその一部であるTCRの連続アミノ酸を含む任意の部分であってよい。用語「機能的部分」は、TCRに関連して使用される時、本発明のTCRの任意の部分又は断片であって、該部分又は断片がその一部であるTCR（親TCR）の生物活性を保持している部分又は断片を指す。機能的部分は、例えば、親TCRと同様の程度、同一程度、又はより高程度、（例えば、適用可能なHLA分子依存的に）変異型p53に特異的に結合するか又はがんを検出、治療、若しくは予防する能力を保持しているTCRの部分を含む。親TCRに関連して、機能的部分は、例えば、親TCRの約10%、約25%、約30%、約50%、約68%、約80%、約90%、約95%、又はそれ以上を構成し得る。

40

#### 【0032】

50

機能的部分は、該部分のアミノ若しくはカルボキシ末端又は両末端に、親TCRのアミノ酸配列にはみられない追加のアミノ酸を含んでいてもよい。望ましくは、追加のアミノ酸は、例えば、変異型p53に特異的に結合する、及び／又はがんを検出する、がんを治療若しくは予防する能力を有する等の機能的部分の生物学的機能に干渉しない。より望ましくは、追加のアミノ酸は、親TCRの生物活性と比較して生物活性を増強する。

#### 【0033】

ポリペプチドは、本発明のTCRのα鎖及びβ鎖のいずれか又は両方の機能的部分、例えば、本発明のTCRのα鎖及び／又はβ鎖の変換領域（複数可）のCDR1、CDR2、及びCDR3のうちの1つ以上を含む機能的部分を含み得る。本発明の実施形態では、該ポリペプチドは、（1）配列番号27～32の全て；（2）配列番号37～42の全て；（3）配列番号47～52の全て；（4）配列番号57～62の全て；（5）配列番号67～72の全て；（6）配列番号77～82の全て；（7）配列番号87～92の全て；（8）配列番号97～102の全て；（9）配列番号107～112の全て；（10）配列番号117～122の全て；（11）配列番号127～132の全て；（12）配列番号137～142の全て；（13）配列番号147～152の全て；（14）配列番号157～162の全て；（15）配列番号167～172の全て；（16）配列番号177～182の全て；（17）配列番号187～192の全て；（18）配列番号197～202の全て；（19）配列番号207～212の全て；（20）配列番号217～222の全て；（21）配列番号227～232の全て；（22）配列番号237～242の全て；（23）配列番号247～252の全て；（24）配列番号257～262の全て；（25）配列番号267～272の全て；（26）配列番号277～282の全て；（27）配列番号287～292の全て；（28）配列番号297～302の全て；（29）配列番号307～312の全て；（30）配列番号317～322の全て；（31）配列番号327～332の全て；（32）配列番号337～342の全て；（33）配列番号347～352の全て；（34）配列番号357～362の全て；（35）配列番号367～372の全て；（36）配列番号377～382の全て；（37）配列番号387～392の全て；（38）配列番号397～402の全て；（39）配列番号407～412の全て；（40）配列番号417～422の全て；（41）配列番号427～432の全て；（42）配列番号437～442の全て；（43）配列番号447～452の全て；（44）配列番号457～462の全て；（45）配列番号467～472の全て；（46）配列番号477～482の全て；又は（47）配列番号487～492の全てのアミノ酸配列を含む機能的部分を含み得る。

#### 【0034】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば、上記CDR領域の組み合わせを含む本発明のTCRの変換領域を含み得る。これに関して、該ポリペプチドは、（1）配列番号33～34の両方；（2）配列番号43～44の両方；（3）配列番号53～54の両方；（4）配列番号63～64の両方；（5）配列番号73～74の両方；（6）配列番号83～84の両方；（7）配列番号93～94の両方；（8）配列番号103～104の両方；（9）配列番号113～114の両方；（10）配列番号123～124の両方；（11）配列番号133～134の両方；（12）配列番号143～144の両方；（13）配列番号153～154の両方；（14）配列番号163～164の両方；（15）配列番号173～174の両方；（16）配列番号183～184の両方；（17）配列番号193～194の両方；（18）配列番号203～204の両方；（19）配列番号213～214の両方；（20）配列番号223～224の両方；（21）配列番号233～234の両方；（22）配列番号243～244の両方；（23）配列番号253～254の両方；（24）配列番号263～264の両方；（25）配列番号273～274の両方；（26）配列番号283～284の両方；（27）配列番号293～294の両方；（28）配列番号303～304の両方；（29）配列番号313～314の両方；（30）配列番号323～324の両方；（31）配列番号333～334の両方；（32）配列番号343～344の両方；（33）配列番号353～354の両方；

方；（３４）配列番号３６３～３６４の両方；（３５）配列番号３７３～３７４の両方；（３６）配列番号３８３～３８４の両方；（３７）配列番号３９３～３９４の両方；（３８）配列番号４０３～４０４の両方；（３９）配列番号４１３～４１４の両方；（４０）配列番号４２３～４２４の両方；（４１）配列番号４３３～４３４の両方；（４２）配列番号４４３～４４４の両方；（４３）配列番号４５３～４５４の両方；（４４）配列番号４６３～４６４の両方；（４５）配列番号４７３～４７４の両方；（４６）配列番号４８３～４８４の両方；又は（４７）配列番号４９３～４９４の両方のアミノ酸配列を含み得る。

#### 【００３５】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、上記本発明のＴＣＲの定常領域を更に含み得る。これに関して、該ポリペプチドは、（ｉ）配列番号２３～２５のうちの１つ又は（ｉｉ）配列番号２５及び配列番号２３～２４のうちの１つのアミノ酸配列を含み得る。

#### 【００３６】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、本発明のＴＣＲのα鎖及びβ鎖を含み得る。これに関して、該ポリペプチドは、（１）配列番号３５～３６の両方；（２）配列番号４５～４６の両方；（３）配列番号５５～５６の両方；（４）配列番号６５～６６の両方；（５）配列番号７５～７６の両方；（６）配列番号８５～８６の両方；（７）配列番号９５～９６の両方；（８）配列番号１０５～１０６の両方；（９）配列番号１１５～１１６の両方；（１０）配列番号１２５～１２６の両方；（１１）配列番号１３５～１３６の両方；（１２）配列番号１４５～１４６の両方；（１３）配列番号１５５～１５６の両方；（１４）配列番号１６５～１６６の両方；（１５）配列番号１７５～１７６の両方；（１６）配列番号１８５～１８６の両方；（１７）配列番号１９５～１９６の両方；（１８）配列番号２０５～２０６の両方；（１９）配列番号２１５～２１６の両方；（２０）配列番号２２５～２２６の両方；（２１）配列番号２３５～２３６の両方；（２２）配列番号２４５～２４６の両方；（２３）配列番号２５５～２５６の両方；（２４）配列番号２６５～２６６の両方；（２５）配列番号２７５～２７６の両方；（２６）配列番号２８５～２８６の両方；（２７）配列番号２９５～２９６の両方；（２８）配列番号３０５～３０６の両方；（２９）配列番号３１５～３１６の両方；（３０）配列番号３２５～３２６の両方；（３１）配列番号３３５～３３６の両方；（３２）配列番号３４５～３４６の両方；（３３）配列番号３５５～３５６の両方；（３４）配列番号３６５～３６６の両方；（３５）配列番号３７５～３７６の両方；（３６）配列番号３８５～３８６の両方；（３７）配列番号３９５～３９６の両方；（３８）配列番号４０５～４０６の両方；（３９）配列番号４１５～４１６の両方；（４０）配列番号４２５～４２６の両方；（４１）配列番号４３５～４３６の両方；（４２）配列番号４４５～４４６の両方；（４３）配列番号４５５～４５６の両方；（４４）配列番号４６５～４６６の両方；（４５）配列番号４７５～４７６の両方；（４６）配列番号４８５～４８６の両方；又は（４７）配列番号４９５～４９６の両方のアミノ酸配列を含み得る。

#### 【００３７】

本発明は、更に、本明細書に記載のポリペプチドのうちの少なくとも１つを含むタンパク質を提供する。「タンパク質」とは、１本以上のポリペプチド鎖を含む分子を意味する。実施形態では、本発明のタンパク質は、（１）配列番号２７～２９の全てのアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号３０～３２の全てのアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（２）配列番号３７～３９の全てのアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４０～４２の全てのアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３）配列番号４７～４９の全てのアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号５０～５２の全てのアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４）配列番号５７～５９の全てのアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号６０～６２の全てのアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（５）配列番号６７～６９の全てのアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号７０～７２の全てのアミノ酸配列を含む第２

10

20

30

40

50

50

アミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(33) 配列番号347～349の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号350～352の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(34) 配列番号357～359の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号360～362の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(35) 配列番号367～369の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号370～372の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(36) 配列番号377～379の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号380～382の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(37) 配列番号387～389の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号390～392の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(38) 配列番号397～399の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号400～402の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(39) 配列番号407～409の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号410～412の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(40) 配列番号417～419の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号420～422の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(41) 配列番号427～429の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号430～432の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(42) 配列番号437～439の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号440～442の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(43) 配列番号447～449の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号450～452の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(44) 配列番号457～459の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号460～462の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(45) 配列番号467～469の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号470～472の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(46) 配列番号477～479の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号480～482の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；又は(47) 配列番号487～489の全てのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号490～492の全てのアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖を含み得る。

【0038】

本発明の実施形態では、該タンパク質は、(1) 配列番号33のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号34のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(2) 配列番号43のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号44のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(3) 配列番号53のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号54のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(4) 配列番号63のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号64のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(5) 配列番号73のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号74のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(6) 配列番号83のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号84のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(7) 配列番号93のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号94のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(8) 配列番号103のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号104のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(9) 配列番号113のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号114のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(10) 配列番号123のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号124のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(11) 配列番号133のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号134のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(12) 配列番号143のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号144のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(13) 配列番号153のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖及び配列番号154のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(14) 配列番号16

10

20

30

40

50

50

【 0 0 3 9 】

50

ポリペプチド鎖；（３２）配列番号３４５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号３４６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３３）配列番号３５５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号３５６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３４）配列番号３６５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号３６６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３５）配列番号３７５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号３７６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３６）配列番号３８５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号３８６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３７）配列番号３９５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号３９６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３８）配列番号４０５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４０６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（３９）配列番号４１５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４１６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４０）配列番号４２５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４２６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４１）配列番号４３５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４３６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４２）配列番号４４５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４４６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４３）配列番号４５５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４５６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４４）配列番号４６５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４６６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４５）配列番号４７５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４７６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；（４６）配列番号４８５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４８６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖；又は（４７）配列番号４９５のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチド鎖及び配列番号４９６のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチド鎖を含む。

#### 【００４０】

本発明のタンパク質は、ＴＣＲであってよい。あるいは、該タンパク質の第１の及び／又は第２のポリペプチド鎖（複数可）が、他のアミノ酸配列、例えば免疫グロブリン又はその一部をコードしているアミノ酸配列を更に含む場合、本発明のタンパク質は、融合タンパク質であってもよい。これに関して、本発明は、また、少なくとも１つの他のポリペプチドと共に、本明細書に記載の本発明のポリペプチドのうちの少なくとも１つを含む融合タンパク質を提供する。他のポリペプチドは、融合タンパク質の別々のタンパク質として存在してもよく、又は本明細書に記載の本発明のポリペプチドのうちの１つとインフレームで（タンデムに）発現するポリペプチドとして存在してもよい。他のポリペプチドは、免疫グロブリン、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＭＨＣ分子、ＣＤ１分子、例えば、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ等が挙げられるがこれらに限定されない、任意のペプチド性若しくはタンパク質性の分子、又はこれらの一部をコードしてよい。

#### 【００４１】

融合タンパク質は、１コピー以上の本発明のポリペプチド及び／又は１コピー以上の他のポリペプチドを含み得る。例えば、融合タンパク質は、１、２、３、４、５、又はそれ以上のコピーの本発明のポリペプチド及び／又は他のポリペプチドを含み得る。融合タンパク質を作製する好適な方法は、当技術分野において公知であり、例えば、組み換え法が挙げられる。

#### 【００４２】

本発明の幾つかの実施形態では、本発明のＴＣＲ、ポリペプチド、及びタンパク質は、 $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖を連結するリンカーペプチドを含む単一のタンパク質として発現し得る。これに関して、本発明のＴＣＲ、ポリペプチド、及びタンパク質は、リンカーペプチドを更に含む得る。リンカーペプチドは、有利には、宿主細胞における組み換え体のＴＣＲ、ポリペプチド、及び／又はタンパク質の発現を促進し得る。リンカーペプチドは、任意の好適なアミノ酸配列を含み得る。例えば、リンカーペプチドは、配列番号２６のアミノ酸配

列を含み得る。リンカーペプチドを含むコンストラクトが宿主細胞によって発現されたら、リンカーペプチドを切断してもよく、その結果、分離された $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖が得られる。本発明の実施形態では、TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、完全長 $\alpha$ 鎖、完全長 $\beta$ 鎖、及び $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖との間に位置するリンカーペプチドを含むアミノ酸配列を含み得る。【0043】

本発明のタンパク質は、本明細書に記載の本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む、組み換え抗体又はその抗原結合部分であってよい。本明細書で使用する時、「組み換え抗体」とは、本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つ、及び抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分を含む組み換え（例えば、遺伝的に操作された）タンパク質を指す。抗体のポリペプチド又はその抗原結合部分は、抗体の重鎖、軽鎖、重鎖若しくは軽鎖の可変領域若しくは定常領域、単鎖可変領域（scFv）、又はFc、Fab、若しくはF(ab)<sub>2</sub>'の断片であってよい。抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分は、組み換え抗体の別々のポリペプチドとして存在してよい。あるいは、抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分は、本発明のポリペプチドとインフレームで（タンデムに）発現するポリペプチドとして存在してもよい。抗体のポリペプチド又はその抗原結合部分は、本明細書に記載の抗体及び抗体断片のいずれかを含む、任意の抗体又は任意の抗体断片のポリペプチドであってよい。

【0044】

本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、その生物活性、例えば、変異型p53に特異的に結合する能力、哺乳類におけるがんを検出する能力、又は哺乳類におけるがんを治療若しくは予防する能力等を保持している限り、任意の長さであってよい、すなわち、任意の数のアミノ酸を含み得る。例えば、ポリペプチドは、約50～約5000アミノ酸長の範囲、例えば、50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000又はそれ以上のアミノ酸長であってよい。これに関して、本発明のポリペプチドは、オリゴペプチドも含む。

【0045】

本発明の本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、1つ以上の天然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含んでもよい。このような合成アミノ酸は、当技術分野において公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノロイシン、 $\alpha$ -アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、トランス-3-及びトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 $\beta$ -フェニルセリン $\beta$ -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 $\alpha$ -ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リジン、N', N'-ジベンジル-リジン、6-ヒドロキシリジン、オルニチン、 $\alpha$ -アミノシクロペンタンカルボン酸、 $\alpha$ -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 $\alpha$ -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 $\alpha$ -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 $\alpha$ ,  $\gamma$ -ジアミノ酪酸、 $\alpha$ ,  $\beta$ -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、及び $\alpha$ -tert-ブチルグリシンが挙げられる。

【0046】

本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質を、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、N-アシル化、例えばジスルフィド架橋を介して環化、又は酸付加塩に変換、及び／又は任意で二量体化若しくは多量体化、又はコンジュゲートしてもよい。

【0047】

本発明のTCR、ポリペプチド、及び／又はタンパク質は、当技術分野において公知の方法、例えば、デノボ合成によって得ることができる。また、ポリペプチド及びタンパク

10

20

30

40

50

質は、標準的な組み換え法を使用し、本明細書に記載の核酸を使用して組み換え的に生成することができる。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)を参照。あるいは、例えば、Synpep (Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD)、及びMultiple Peptide Systems (San Diego, CA)等の企業が、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、及び／又はタンパク質を商業的に合成することもできる。これに関して、本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、合成であってもよく、組み換え体であってもよく、単離されていてもよく、及び／又は精製されていてもよい。

10

#### 【0048】

本発明の実施形態は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。「核酸」は、本明細書で使用する時、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸分子」を含み、一般的に、DNA又はRNAのポリマーを意味し、これらは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチドを含有していてもよく、そして、改変されていないオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間にみられるホスホジエステルの代わりに、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロアミデート結合又はホスホロチオエート結合を含有していてもよい。実施形態では、核酸は、相補的DNA (cDNA)を含む。核酸は、任意の挿入、欠失、逆位、及び／又は置換を含まないことが一般に好ましい。しかし、幾つかの例では、本明細書で論じた通り、核酸が1つ以上の挿入、欠失、逆位、及び／又は置換を含むことが好適である場合もある。

20

#### 【0049】

好ましくは、本発明の核酸は、組み換え体である。本明細書で使用する時、用語「組み換え体」とは、(i)天然若しくは合成の核酸セグメントを生細胞で複製可能な核酸分子に連結させることによって生細胞の外部で構築される分子、又は(ii)上記(i)に記載されているものの複製によって得られる分子を指す。本明細書における目的のために、複製は、インビトロ複製であってもインビボ複製であってもよい。

30

#### 【0050】

核酸は、当技術分野において公知の手順を使用して、化学合成及び／又は酵素ライゲーション反応に基づいて構築され得る。例えば、Green及びSambrookら、前記を参照。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチド、又は分子の生物学的安定性を増大させるか若しくはハイブリダイゼーションの際に形成される二本鎖の物理的安定性を増大させるために設計された様々な修飾されたヌクレオチド(例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド)を使用して、化学的に合成することができる。核酸を作製するために使用することができる修飾ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-ブromoウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルキューエオシン、イノシン、N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N<sup>6</sup>-置換アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキューエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キューエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-

40

50

オキシ酢酸メチルエステル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、及び2,6-ジアミノプリンが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、本発明の核酸のうちの1つ以上は、Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) 及びSynthegen (Houston, TX) 等の企業から購入することができる。

#### 【0051】

本発明の実施形態では、核酸は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のいずれかをコードしている、コドン最適化されたヌクレオチド配列を含む。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、ヌクレオチド配列のコドン最適化は、mRNA転写物の翻訳効率を増大させると考えられる。ヌクレオチド配列のコドン最適化は、ネイティブなコドンを、同じアミノ酸をコードしているが細胞内でより容易に利用可能なtRNAによって翻訳され得る別のコドンで置換し、それによって、翻訳効率を増大させることを伴い得る。また、ヌクレオチド配列の最適化は、翻訳に干渉するmRNAの二次構造を低減し、それによって、翻訳効率を増大させることもできる。

#### 【0052】

また、本発明は、本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列、又は本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

#### 【0053】

ストリンジントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、好ましくは、高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする。「高ストリンジエンシー条件」とは、ヌクレオチド配列が、非特異的ハイブリダイゼーションよりも検出可能に多い量で、標的配列（本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列）に特異的にハイブリダイズすることを意味する。高ストリンジエンシー条件は、正確な相補的配列を有するポリヌクレオチド又は幾つかの散在している不一致しか含有していないものを、該ヌクレオチド配列に一致している幾つかの小さな領域（例えば、3～10塩基）を偶然有するランダム配列と識別する条件を含む。このような相補的な小さな領域は、14～17又はそれ以上の塩基の完全長相補体よりも容易に融解するので、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーションによって容易に識別可能になる。比較的高ストリンジエンシー条件は、例えば、約0.02～0.1M NaCl又は等価物、約50～70℃の温度によって提供されるものの等の低塩及び／又は高温条件を含む。このような高ストリンジエンシー条件は、ヌクレオチド配列とテンプレート又は標的鎖との間の（もし存在するとしても）わずかな不一致しか許容せず、本発明のTCRのいずれかの発現を検出するのに特に好適である。一般的に、漸増量のホルムアミドを添加することによって、条件をよりストリンジントにすることができると理解される。

#### 【0054】

また、本発明は、本明細書に記載の核酸のいずれかと少なくとも約70%以上、例えば、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して、核酸は、本明細書に記載のヌクレオチド配列のいずれかから本質的になってよい。

#### 【0055】

本発明の核酸は、組み換え発現ベクターに組み込むことができる。これに関して、本発明は、本発明の核酸のいずれかを含む組み換え発現ベクターを提供する。本発明の実施形態では、組み換え発現ベクターは、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、及びリンカーペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む。

#### 【0056】

本明細書における目的のために、用語「組み換え発現ベクター」は、コンストラクトがmRNA、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含み、宿主細胞内で該mRNA、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドを発現させ

10

20

30

40

50

るのに十分な条件下でベクターを該細胞と接触させたときに、該細胞に該mRNA、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドを発現させる、遺伝的に改変されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのコンストラクトを意味する。本発明のベクターは、全体としては天然に存在しない。しかし、ベクターの一部が天然に存在していてもよい。本発明の組み換え発現ベクターは、DNA及びRNAが挙げられるがこれらに限定されない任意の種類のヌクレオチドを含んでいてよく、該DNA及びRNAは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、合成されても天然源から部分的に入手されてもよく、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチドを含有していてもよい。組み換え発現ベクターは、天然に存在するヌクレオチド間結合、天然には存在しないヌクレオチド間結合、又は両方の種類の結合を含んでいてよい。好ましくは、天然には存在しないか又は改変されたヌクレオチド又はヌクレオチド間結合は、ベクターの転写も複製も妨げない。

10

#### 【0057】

本発明の組み換え発現ベクターは、任意の好適な組み換え発現ベクターであってよく、任意の好適な宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために使用することができる。好適なベクターとしては、プラスミド及びウイルス等、伝播及び増殖用、若しくは発現用、又は両方のために設計されたものが挙げられる。ベクターは、トランスポゾン／トランスポゼースシリーズ、pUCシリーズ (Fermentas Life Sciences)、pBluescriptシリーズ (Stratagene, La Jolla, CA)、pETシリーズ (Novagen, Madison, WI)、pGEXシリーズ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、及びpEXシリーズ (Clontech, Palo Alto, CA) からなる群から選択され得る。λGT10、λGT11、λZapII (Stratagene)、λEMBL4、及びλNM1149等のバクテリオファージベクターを使用してもよい。植物発現ベクターの例としては、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121、及びpBIN19 (Clontech) が挙げられる。動物発現ベクターの例としては、pEUK-Cl、pMAM、及びpMAMneo (Clontech) が挙げられる。好ましくは、組み換え発現ベクターは、トランスポゾンベクター又はウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターである。

20

#### 【0058】

本発明の組み換え発現ベクターは、例えば、Green及びSambrookら、前記に記載されている標準的な組み換えDNA技術を使用して調製することができる。円形又は線形である発現ベクターのコンストラクトは、原核又は真核の宿主細胞において機能する複製系を含有するように調製することができる。複製系は、例えば、ColEI、2µプラスミド、λ、SV40、ウシパピローマウイルス等に由来してよい。

30

#### 【0059】

望ましくは、組み換え発現ベクターは、制御配列、例えば、必要に応じて、そして、ベクターがDNAベースであるかRNAベースであるかを考慮して、ベクターが導入される宿主細胞の種類 (例えば、細菌、真菌、植物、又は動物) に特異的な転写及び翻訳の開始及び終止のコドンを含む。

#### 【0060】

組み換え発現ベクターは、形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞の選別を可能にする1つ以上のマーカー遺伝子を含んでいてよい。マーカー遺伝子は、殺生物剤耐性、例えば、抗生物質、重金属等に対する耐性、原栄養性を与えるための栄養要求性宿主における補完等を含む。本発明の発現ベクターに好適なマーカー遺伝子は、例えば、ネオマイシン/G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、及びアンピシリン耐性遺伝子を含む。

40

#### 【0061】

組み換え発現ベクターは、TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質をコードしているヌクレオチド配列に、又はTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質をコードしているヌクレオチド配列に相補的であるか若しくはハイブリダイズするヌクレオチド配列に動

50

作可能に連結しているネイティブ又は非ネイティブのプロモータを含んでいてよい。例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的、及び発生段階特異的なプロモータの選択は、当業者の技能の範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモータとの組み合わせも当業者の技能の範囲内である。プロモータは、非ウイルスプロモータ、例えば、ヒト伸長因子-1 $\alpha$ プロモータであってもよく、ウイルスプロモータ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモータ、SV40プロモータ、RSVプロモータ、及びマウス幹細胞ウイルスの末端反復配列にみられるプロモータであってもよい。

#### 【0062】

本発明の組み換え発現ベクターは、一過的発現用、安定的発現用、又は両方のために設計することができる。また、組み換え発現ベクターは、構成的発現用又は誘導性発現用に作製することができる。

10

#### 【0063】

更に、組み換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように作製してもよい。本明細書で使用する時、用語「自殺遺伝子」とは、自殺遺伝子を発現している細胞を死に至らしめる遺伝子を指す。自殺遺伝子は、該遺伝子が発現する細胞に対して剤、例えば薬物に対する感受性を付与し、そして、該細胞が該剤と接触したとき又は該剤に曝露されたときに該細胞を死に至らしめる遺伝子であってよい。自殺遺伝子は、当技術分野において公知であり、例えば、単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びニトロレダクターゼを含む。

#### 【0064】

20

本発明の別の実施形態は、更に、本明細書に記載の組み換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。本明細書で使用する時、用語「宿主細胞」とは、本発明の組み換え発現ベクターを含有し得る任意の種類の細胞を指す。宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、真菌、又は藻類であってもよく、原核細胞、例えば、細菌又は原生動物であってもよい。宿主細胞は、培養細胞又は初代細胞、すなわち、生物、例えばヒトから直接単離された細胞であってよい。宿主細胞は、接着細胞又は懸濁細胞、すなわち、懸濁液中で成長する細胞であってよい。好適な宿主細胞は、当技術分野において公知であり、例えば、DH5 $\alpha$ 大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞等が挙げられる。組み換え発現ベクターを増幅又は複製する目的の場合、宿主細胞は、好ましくは、原核細胞、例えばDH5 $\alpha$ 細胞である。組み換え体のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質を生成する目的の場合、宿主細胞は、好ましくは、哺乳類細胞である。最も好ましくは、宿主細胞は、ヒト細胞である。宿主細胞は、任意の細胞型であってよく、任意の種類の組織に由来してよく、任意の発生段階であってよいが、宿主細胞は、好ましくは、末梢血リンパ球(PBL)又は末梢血単核細胞(PBMC)である。より好ましくは、宿主細胞は、T細胞である。

30

#### 【0065】

本明細書における目的のために、T細胞は、任意のT細胞、例えば、培養T細胞、例えば初代T細胞、又は培養T細胞株由来のT細胞、例えばJurkat、SupT1等、又は哺乳類から得られたT細胞であってよい。哺乳類から得られる場合、T細胞は、血液、骨髓、リンパ節、胸腺、又は他の組織若しくは流体を含むがこれらに限定されない多数の供給源から得ることができる。また、T細胞は、濃縮又は精製されていてもよい。好ましくは、T細胞は、ヒトT細胞である。T細胞は、任意の種類のT細胞であってよく、任意の発生段階であってよく、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>二重陽性T細胞、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞、例えば、Th<sub>1</sub>及びTh<sub>2</sub>細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、メモリT細胞(例えば、セントラルメモリT細胞及びエフェクタメモリT細胞)、ナイーブT細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0066】

また、本明細書に記載の少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞の集団が本発明によって提供される。細胞の集団は、組み換え発現ベクターのいずれも含まない少なくとも1つの

50

他の細胞、例えば宿主細胞（例えば、T細胞）、又はT細胞以外の細胞、例えばB細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋肉細胞、脳細胞等に加えて、記載される組み換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を含む不均質な集団であってよい。あるいは、細胞の集団は、組み換え発現ベクターを含む（例えば、から本質的になる）宿主細胞を主に含む、実質的に均質な集団であってよい。また、集団は、該集団の全ての細胞が、組み換え発現ベクターを含む1つの宿主細胞のクローンであり、その結果、該集団の全ての細胞が組み換え発現ベクターを含む、細胞のクローン集団であってよい。本発明の一実施形態では、細胞の集団は、本明細書に記載の組み換え発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローン集団である。

【0067】

本発明の実施形態では、集団内の細胞数を、急速に拡大させることができる。T細胞数の拡大は、例えば、米国特許第8,034,334号、同第8,383,099号、米国特許出願公開第2012/0244133号、Dudley et al., J. Immunother., 26:332-42 (2003)、及びRiddell et al., J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990)に記載されている通り、当技術分野において公知の多数の方法のいずれかによって実現することができる。実施態様では、T細胞数の拡大は、該T細胞をOKT3抗体、IL-2、及びフィーダーPBMC（例えば、放射線照射された同種PBMC）と共に培養することによって実行される。

【0068】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、及び宿主細胞（その集団を含む）は、単離及び／又は精製されてもよい。用語「単離された」は、本明細書で使用する時、その天然環境から取り出されていることを意味する。用語「精製された」は、本明細書で使用する時、純度が増大したことを意味し、「純度」は相対的な用語であり、必ずしも絶対純度と解釈される訳ではない。例えば、純度は、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%であってもよく、約100%であってもよい。

【0069】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、及び宿主細胞（その集団を含む）（以後、これらの全てをまとめて「本発明のTCR材料」と称する）は、医薬組成物等の組成物に製剤化してもよい。これに関して、本発明は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、発現ベクター、及び宿主細胞（その集団を含む）のいずれかと、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物を提供する。本発明のTCR材料のいずれかを含有する本発明の医薬組成物は、1つを超える本発明のTCR材料、例えばポリペプチド及び核酸、又は2つ以上の異なるTCRを含んでもよい。あるいは、医薬組成物は、別の薬学的活性剤（複数可）又は薬物（複数可）、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、ビンクリスチン等の化学療法剤と組み合わせて、本発明のTCR材料を含んでもよい。

【0070】

好ましくは、担体は、薬学的に許容し得る担体である。医薬組成物に関して、担体は、検討中の具体的な本発明のTCR材料に従来使用されているもののいずれかであってよい。投与可能な組成物を調製する方法は、当業者に公知であるか又は明らかであり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> Ed., Pharmaceutical Press (2012)により詳細に記載されている。薬学的に許容し得る担体は、使用条件下で有害な副作用も毒性も有しないものであることが好ましい。

【0071】

担体の選択は、具体的な本発明のTCR材料によって、並びに本発明のTCR材料を投

10

20

30

40

50

与するために使用される具体的な方法によって部分的に決定される。従って、本発明の医薬組成物の様々な好適な製剤が存在する。好適な製剤は、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、腫瘍内、又は腹腔内に投与するためのもののいずれかを含み得る。1つを超える経路を使用して本発明のTCR材料を投与してよく、特定の例では、特定の経路が別の経路よりも即時かつより有効な応答を提供し得る。

#### 【0072】

好ましくは、本発明のTCR材料は、例えば静脈内に注射することによって投与される。本発明のTCR材料が、本発明のTCRを発現している宿主細胞であるとき、注射用の細胞のための薬学的に許容し得る担体としては、任意の等張担体、例えば、通常生理食塩水（水中約0.90%w/v NaCl、水中約300mOsm/L NaCl、又は水1リットルあたり約9.0g NaCl）、NORMOSOL R電解質溶液（Abbott, Chicago, IL）、PLASMA-LYTE A（Baxter, Deerfield, IL）、水中約5%デキストロース、又は乳酸リンゲル液を挙げることができる。実施形態では、薬学的に許容し得る担体にヒト血清アルブメン（albumen）を補給する。

#### 【0073】

本発明の目的のために、投与される本発明のTCR材料の量又は用量（例えば、本発明のTCR材料が1つ以上の細胞である場合は細胞数）は、適切な時間枠にわたって被験体又は動物において効果、例えば治療的又は予防的応答をもたらすのに十分でなければならない。例えば、本発明のTCR材料の用量は、投与時点から約2時間以上、例えば、12～24時間又はそれ以上の期間、がん抗原（例えば、変異型p53）に結合するか又はがんを検出、治療、若しくは予防するのに十分でなければならない。特定の実施形態では、期間は更に長くてもよい。用量は、具体的な本発明のTCR材料の有効性及び動物（例えば、ヒト）の状態、並びに治療される動物（例えば、ヒト）の体重によって決定される。

#### 【0074】

投与される用量を決定するための多くのアッセイが、当技術分野において公知である。本発明の目的のために、それぞれ異なる用量のT細胞を与えた哺乳類のセット間で、所与の用量の本発明のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質を発現しているT細胞を哺乳類に投与した際に標的細胞が溶解するか又はこのようなT細胞によってIFN- $\gamma$ が分泌される程度を比較することを含むアッセイを使用して、哺乳類に投与する開始用量を決定することができる。特定の用量を投与した際に標的細胞が溶解する又はIFN- $\gamma$ が分泌される程度は、当技術分野において公知の方法によってアッセイすることができる。

#### 【0075】

本発明のTCR材料の用量は、具体的な本発明のTCR材料の投与に付随する可能性のある任意の有害な副作用の存在、性質、及び程度によっても決定される。典型的には、主治医が、様々な要因、例えば、年齢、体重、全体的な健康状態、食生活、性別、投与される本発明のTCR材料、投与経路、及び治療されるがんの重篤度を考慮して、各個々の患者を治療するための本発明のTCR材料の投与量を決定する。本発明のTCR材料が細胞の集団である実施形態では、注入1回あたりに投与される細胞数は、例えば、約 $1 \times 10^6$ ～約 $1 \times 10^{12}$ 細胞又はそれ以上で変動し得る。特定の実施形態では、 $1 \times 10^6$ 細胞未満を投与してもよい。

#### 【0076】

当業者は、本発明のTCR材料を任意の数の方法で修飾してよく、その結果、該修飾を通して本発明のTCR材料の治療又は予防の有効性が増大することを容易に理解するであろう。例えば、本発明のTCR材料を、直接又は架橋を介して間接的に化学療法剤にコンジュゲートしてもよい。化合物の化学療法剤へのコンジュゲートの実施は、当技術分野において公知である。当業者は、架橋及び／又は化学療法剤が本発明のTCR材料に結合した時点で本発明のTCR材料の機能、すなわち、変異型p53に結合するか又はがんを検出、治療、若しくは予防する能力には干渉しない限り、本発明のTCR材料の機能に必須ではない本発明のTCR材料の部位が、架橋及び／又は化学療法剤を結合させるのに理想

的な部位であることを認識する。

【0077】

本発明の医薬組成物、TCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、又は細胞の集団は、がんを治療又は予防する方法において使用できることが企図される。特定の理論に縛られるものではないが、本発明のTCRは変異型p53に特異的に結合し、その結果、TCR（又は関連する本発明のポリペプチド若しくはタンパク質）は、細胞によって発現されたとき、変異型p53を発現している標的細胞に対する免疫応答を媒介することができると考えられる。これに関して、本発明の実施形態は、哺乳類におけるがんを治療又は予防する方法であって、本明細書に記載の医薬組成物、TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれか、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質のいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含む任意の核酸若しくは組み換え発現ベクター、又は本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードしている組み換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは細胞の集団を、哺乳類におけるがんを治療又は予防するのに有効な量、該哺乳類に投与することを含む方法を提供する。

10

【0078】

本発明の実施形態は、哺乳類におけるがんの治療又は予防において使用するための、本明細書に記載の医薬組成物、TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれか、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質のいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含む任意の核酸若しくは組み換え発現ベクター、又は本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードしている組み換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは細胞の集団を提供する。

20

【0079】

用語「治療する」及び「予防する」、並びにそれから派生する語は、本明細書で使用するとき、必ずしも100%、すなわち、完全な治療又は予防を意味するものではない。どちらかといえば、当業者が潜在的な利点又は治療効果を有すると認識する、様々な程度の治療又は予防が存在する。これに関して、本発明の方法は、哺乳類における任意の量の任意のレベルのがんの治療又は予防を提供することができる。更に、本発明の方法によって提供される治療又は予防は、治療又は予防されるがんの1つ以上の病態又は症状の治療又は予防を含み得る。例えば、治療又は予防は、腫瘍の退縮を促進することを含み得る。また、本明細書における目的のために、「予防」は、がん又はその症状若しくは病態の発生を遅らせることを包含し得る。あるいは又は更に、「予防」は、がん又はその症状若しくは病態の再発を防ぐ又は遅らせることを包含し得る。

30

【0080】

また、哺乳類におけるがんの存在を検出する方法も本発明の実施形態によって提供される。該方法は、(i) 本明細書に記載の本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、又は医薬組成物のいずれかを、哺乳類由来の1つ以上の細胞を含むサンプルと接触させ、それによって、複合体を形成させることと、該複合体を検出することとを含み、該複合体の検出が、該哺乳類におけるがんの存在を示す。

40

【0081】

哺乳類におけるがんを検出する本発明の方法に関して、細胞のサンプルは、全細胞、その溶解物、又は全細胞溶解物の画分、例えば、核若しくは細胞質の画分、全タンパク質画分、又は核酸画分を含むサンプルであってよい。

【0082】

本発明の検出方法の目的のために、接触は、哺乳類に対してインビトロ又はインビボで行ってよい。好ましくは、インビトロで接触させる。

【0083】

また、複合体の検出は、当技術分野において公知の任意の数の方法を通して行うことができる。例えば、本明細書に記載の本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、

50

組み換え発現ベクター、宿主細胞、又は細胞の集団を、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、フルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリトリン（PE））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ）、及び元素粒子（例えば、金粒子）等で標識してよい。

【0084】

宿主細胞又は細胞の集団が投与される本発明の方法の目的のために、細胞は、哺乳類にとって同種又は自己である細胞であってよい。好ましくは、細胞は、哺乳類にとって自己である。

【0085】

本発明の方法に関して、がんは、急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管、又は肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢、又は胸膜のがん、鼻、鼻腔、又は中耳のがん、口腔のがん、膣のがん、外陰部のがん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、中咽頭のがん、卵巣がん、陰茎のがん、膵臓がん、腹膜、網、及び腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮のがん、尿管がん、並びに膀胱がんのいずれかを含む任意のがんであってよい。好ましい実施形態では、がんは、変異型p53を発現するがんである。がんは、配列番号1の175位、220位、245位、248位、249位、273位、及び282位のうちのいずれか1つ以上に変異を有するp53を発現し得る。がんは、以下のヒトp53変異のうちのいずれか1つ以上を有するp53を発現し得る：R175H、Y220C、G245D、G245S、R248L、R248Q、R248W、R249S、R273H、R273C、R273L、及びR282W。好ましくは、該がんは、上皮がん、又は胆管がん、黒色腫、結腸がん、直腸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、神経膠芽腫、子宮頸がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、又は膀胱がんである。

【0086】

本発明の方法において言及される哺乳類は、任意の哺乳類であってよい。本明細書で使用する時、用語「哺乳類」とは、げっ歯目の哺乳類、例えばマウス及びハムスター、並びにウサギ目の哺乳類、例えばウサギを含むがこれらに限定されない任意の哺乳類を指す。哺乳類は、ネコ及びイヌを含む食肉目の哺乳類であることが好ましい。哺乳類は、ウシ及びブタを含む偶蹄目、又はウマを含む奇蹄目の哺乳類であることがより好ましい。哺乳類は、霊長目、サル目（Ceboids又はSimoids）（サル）、又は真猿亜目（ヒト及び類人猿）の哺乳類であることが最も好ましい。特に好ましい哺乳類は、ヒトである。

【実施例】

【0087】

以下の実施例は、本発明を更に説明するが、無論、いかなる方法でもその範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0088】

表1～3に記載のアミノ酸配列を、以下の実施例に記載する実験で使用した。表1～2中、「LP」は「ロングペプチド」を意味する。表3中、「TMG」は「タンデムミニ遺伝子」を意味する。

【0089】

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表 1

| 配列番号 | 名称               | 配列                                              |
|------|------------------|-------------------------------------------------|
| 2    | LP-p53-R175H-MUT | YKQSQHMT <del>E</del> VVR <u>H</u> CPHHERCSDSDG |
| 3    | LP-p53-R273H-MUT | SGNLLGRNSFEV <u>H</u> VACACPGRRRTE              |
| 4    | LP-p53-R248L-MUT | YMCNSSCMGGMN <u>L</u> RPILTIITLEDSS             |
| 5    | LP-p53-R282W-MUT | FEVRVCACPGRD <u>W</u> RTEENLRKKGE               |
| 6    | LP-p53-R273C-MUT | SGNLLGRNSFEV <u>C</u> VACACPGRRRTE              |
| 7    | LP-p53-G245S-MUT | HNYMCNSSCMG <u>S</u> MNRRPILTIITL               |
| 8    | LP-p53-R248Q-MUT | YMCNSSCMGGMN <u>Q</u> RPILTIITLEDSS             |
| 9    | LP-p53-G245D-MUT | HNYMCNSSCMG <u>D</u> MNRRPILTIITL               |
| 10   | LP-p53-R273L-MUT | SGNLLGRNSFEV <u>L</u> VACACPGRRRTE              |
| 11   | LP-p53-R248W-MUT | YMCNSSCMGGMN <u>W</u> RPILTIITLEDSS             |
| 12   | LP-p53-Y220C-MUT | DRNTFRHSVVVP <u>C</u> EPPEVGSDDCTTI             |
| 13   | LP-p53-R249S-MUT | MCNSSCMGGMNR <u>S</u> PILTIITLEDSS              |

10

## 【0090】

表 1 のペプチドの WT バージョンを表 2 に記載する。

20

## 【0091】

## 【表 2】

表 2

| 配列番号 | 名称             | 配列                                              |
|------|----------------|-------------------------------------------------|
| 15   | LP-p53-R175-WT | YKQSQHMT <del>E</del> VVR <u>R</u> CPHHERCSDSDG |
| 16   | LP-p53-R273-WT | SGNLLGRNSFEV <u>R</u> VACACPGRRRTE              |
| 17   | LP-p53-R248-WT | YMCNSSCMGGMN <u>R</u> RPILTIITLEDSS             |
| 18   | LP-p53-R282-WT | FEVRVCACPGRD <u>R</u> RTEENLRKKGE               |
| 19   | LP-p53-G245-WT | HNYMCNSSCMG <u>G</u> MNRRPILTIITL               |
| 20   | LP-p53-Y220-WT | DRNTFRHSVVVP <u>Y</u> EPPEVGSDDCTTI             |
| 21   | LP-p53-R249-WT | MCNSSCMGGMNR <u>R</u> PILTIITLEDSS              |

30

## 【0092】

## 【表 3】

表 3

| 配列番号 | 名称          | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14   | TMG-p53-MUT | YKQSQHMT <del>E</del> VVR <u>H</u> CPHHERCSDSDGSGNLLGRNSFEV <u>H</u> VACACPGRRRTEYMCNSSCMGGMN <u>L</u> RPILTIITLEDSSFEVRVCACPGRD <u>W</u> RTEENLRKKGESGNLLGRNSFEV <u>C</u> VACACPGRRRTEHNYMCNSSCMG <u>S</u> MNRRPILTIITLYMCNSSCMGGMN <u>Q</u> RPILTIITLEDSSHNYMCNSSCMG <u>D</u> MNRRPILTIITLSGNLLGRNSFEV <u>L</u> VACACPGRRRTEYMCNSSCMGGMN <u>W</u> RPILTIITLEDSSDRNTFRHSVVVP <u>C</u> EPPEVGSDDCTTI<br>MCNSSCMGGMNR <u>S</u> PILTIITLEDSS |
| 22   | TMG-p53-WT  | YKQSQHMT <del>E</del> VVR <u>R</u> CPHHERCSDSDGSGNLLGRNSFEV <u>R</u> VACACPGRRRTEYMCNSSCMGGMN <u>R</u> RPILTIITLEDSSFEVRVCACPGRD <u>R</u> RTEENLRKKGESGNLLGRNSFEV <u>R</u> VACACPGRRRTEHNYMCNSSCMG <u>G</u> MNRRPILTIITLYMCNSSCMGGMN <u>R</u> RPILTIITLEDSSHNYMCNSSCMG <u>G</u> MNRRPILTIITLSGNLLGRNSFEV <u>R</u> VACACPGRRRTEYMCNSSCMGGMN <u>R</u> RPILTIITLEDSSDRNTFRHSVVVP <u>Y</u> EPPEVGSDDCTTI<br>MCNSSCMGGMNR <u>R</u> PILTIITLEDSS |

40

50

## 【0093】

## 実施例1

この実施例は、患者4127からの4つの抗変異型p53TCRの単離及び特異的反応性を示す。

## 【0094】

患者4127について、図1～7、36、及び37A～37Cに記載の通り実験を実施した。米国特許出願公開第2017/0224800号に記載の方法（「T r a n法」）によって、この患者の変異型p53反応性T細胞を同定した。個々のTCRを単離する方法を以下に記載する。

## 【0095】

自己PBLに、図1に示すTCRのうちの1つを形質導入し、2週間後に試験した。自己DC細胞を $3 \times 10^4$ 細胞／ウェルでプレATINGし、漸減ペプチド濃度のWT p53-G245ペプチド（w t）又は変異型p53-G245Sペプチド（m u t）のいずれかを一晚パルスした。1ウェルあたり $3 \times 10^4$ 個の形質導入T細胞を添加し、37℃で一晩共培養した。IFN- $\gamma$  ELISAのために上清を収集した。IFN- $\gamma$  ELISA結果を図1に示す。FACSゲート：リンパ球\PI（陰性）CD3<sup>+</sup>\CD3<sup>+</sup>mTCR<sup>+</sup>\CD8（陰性）CD4<sup>+</sup>によって4-1BB発現を測定した。FACS結果を図2に示す。

## 【0096】

自己PBLに、図3に示すTCRのうちの1つを形質導入し、DMSO（ペプチドビヒクル）又は表Aに示す14アミノ酸が重複している15merのp53-G245Sペプチドのうちの1つをDCにパルスしたことを除いて図2の実験について記載の通り共培養した。図2に記載の通り4-1BB発現を実行した。結果を図3に示す。

## 【0097】

## 【表4】

表A

| 図3のX軸におけるペプチド番号 | ペプチド             | 配列番号 |
|-----------------|------------------|------|
| 1               | HYNYMCNSSCMGSMN  | 497  |
| 2               | YNYMCNSSCMGSMNR  | 498  |
| 3               | NYMCNSSCMGSMNRR  | 499  |
| 4               | YMCNSSCMGSMNRRP  | 500  |
| 5               | MCNSSCMGSMNRRPI  | 501  |
| 6               | CNSSCMGSMNRRPIL  | 502  |
| 7               | NSSCMGSMNRRPILT  | 503  |
| 8               | SSCMGSMNRRPILTI  | 504  |
| 9               | SCMGSMNRRPILTIIT | 505  |
| 10              | CMGSMNRRPILTIIT  | 506  |
| 11              | MGSMNRRPILTIITL  | 507  |

## 【0098】

Cos7細胞（ $2.5 \times 10^4$ 個／ウェル）を、平底96ウェルプレートのウェルにプレATINGした。20時間後、細胞に個々のHLAアリルをコトランスフェクトした。20時間後、細胞に10 $\mu$ g/mLのp53G245S-15merペプチドを37℃で3時間パルスした。洗浄後、T細胞（ $10^5$ 個）をウェルに添加し、37℃で一晩（20時間）共培養した。ELISAによってIFN- $\gamma$ の分泌を測定した；NetMHCIIpan：cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/によって予測。FACSによって4-1BB発現を測定した。FACSゲート：リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3<sup>+</sup>（T細胞）→CD4<sup>+</sup>（4127-TIL）又はCD4<sup>+</sup>mTCR<sup>+</sup>（TCR形質導入T細胞）。結果を図4～5及び表Bに示す。

【0099】

【表5】

表B

| H L A      | ペプチド                       | 親和性 (nM) | ランク |
|------------|----------------------------|----------|-----|
| DRB3*02:02 | HYNYMCNSSCMGSMN<br>配列番号497 | 533.4    | 21  |

【0100】

DRB3\*02は、NCI HLAデータベースにおいてDRB型患者3719人のうちの1367人(37%)、そして、NCI-SB (National Cancer Institute Surgery Branch)において子宮内膜及び卵巣のがん患者9人のうちの5人(56%)で発現している。報告されているDRB3\*02アリの頻度は、allele frequencies. netウェブサイトによれば非常に高い。例えば、このウェブサイトでは、DRB3\*02アリの頻度が、USA NMDP Middle Eastern or North Coast of Africa populationの0.3447であると報告されている。

【0101】

患者4127由来のTILを、(1)無関係、WT p53、又は変異型p53の配列から構成されたタンデムミニ遺伝子(TMG)をエレクトロポレーションした、あるいは(2)ペプチドビヒクル(DMSO)、又はWT p53-G245S配列若しくは変異型p53-G245S配列から構成された精製(高速液体クロマトグラフィー(HPLC))によって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした、同種(DRB3\*01:01:01又はDRB3\*02:02:01)抗原提示細胞(APC)と共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッセイを使用してIFN-γの分泌を評価した。結果を図6に示す。

【0102】

図6の実験について記載の通り、p53-G245Sに特異的な4127-TCR1を発現しているT細胞を同種APCと共培養した。結果を図7に示す。

【0103】

漸減濃度の、WT p53-G245S又は変異型p53-G245Sの配列に対応する25アミノ酸ペプチドを自己APCにパルスした。患者4127由来の4127-O37-TCRを形質導入したT細胞を、37℃で一晩、ペプチドをパルスしたAPCと共培養した。リンパ球→単一細胞→生細胞→CD3+mTCR+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現をアッセイした。結果を図36に示す。

【0104】

Cos7細胞(2.5×10<sup>4</sup>個/ウェル)を、平底96ウェルプレートのウェルにプレートングした。次の日、患者4127由来の個々のHLAアリルを細胞にコトランスフェクトした。次の日、25アミノ酸p53-G245Sペプチドを、トランスフェクトされたCos7細胞にパルスした。過剰のペプチドを洗い流した。患者4127由来のTCRのうちの1つをT細胞に形質導入した。形質導入されたT細胞を、Cos7細胞との共培養物に添加した(2×10<sup>4</sup>細胞/ウェル)。共培養物を37℃で一晩インキュベートした。ELISAによってIFN-γの分泌を評価した。リンパ球→単一細胞→生細胞→CD3+mTCR+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現をアッセイした。結果を図37A~37Cに示す。

【0105】

患者4127から単離されたTCR4127-TP53-G245S-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1ベータ(配列番号30)であり、2番目の下線領域はCDR2ベータ(配列番号31)であり、3番目の下線領域はCDR3ベータ(配列番号32)であり、4番目の下線領域はCDR1アルファ(配列番号27)であり、5番目の下線領域はCDR2アルファ(配列番号28)であ

り、6番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号29）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）であり、2番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）である。ベータ鎖可変領域（配列番号34）は、アミノ末端から始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。アルファ鎖可変領域（配列番号33）は、リンカーの直後に始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号36）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号35）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0106】

がん反応性T細胞を下記の通り同定した。TCRを下記の通り単離した。

TCRの名称：4127-TP53-G245S-TCR1

p53変異の認識：G245S

方法：Tran法

TCRを同定するための共培養：4127-F10 TIL断片とG245Sロングペプチドとを共培養、CD4+41BB+T細胞をソート（単一細胞RT-PCRのみ）

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR（以下）、Adaptive Pairseq（4127-F10断片）、TILクローンO71からの5'RACE

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：31.3%（16対のうち5回観察）

TCRの配向：ベーターアルファ

発現ベクター：ガンマーレトロウイルス

#### 【0107】

#### 【化1】

MATRLLCWAALCCLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNGVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLVNTEAFFGQGTRLTVVEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKKNRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLIPVLGMIFALRDARAQSVSQHNHHVILSEAASLELGCNYSYGGTVNLFWYVQYPGQHLQLLLKYFSGDPLVKGIKGFEAEFIKSKFSFNLKPSVQWSDTAEYFCAVKGDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCFLTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS（配列番号543）

#### 【0108】

患者4127のTCR4127-TP53-G245S-TCR1についての統計値を以下の表4に記載する。

#### 【0109】

#### 【表6】

表4

| パラメータ                 | 数  | 頻度    |
|-----------------------|----|-------|
| 全ウェル                  | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ              | 6  | 6.3%  |
| CDR3ベータ               | 13 | 13.5% |
| 4127-TP53-G245S-TCR1対 | 5  | 5.2%  |
| 全対合TCR                | 16 | 16.7% |

#### 【0110】

患者4127から単離されたTCR4127-TP53-G245S-TCR4の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号40）であり、2番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号41）であり、3番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号42）であり、4番目の下線領域はCDR1アルファ

α（配列番号 37）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 38）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 39）である。太字領域は、リンカー（配列番号 26）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 25）であり、2 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 23）である。ベータ鎖可変領域（配列番号 44）は、アミノ末端から始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。アルファ鎖可変領域（配列番号 43）は、リンカーの直後に始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 46）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 45）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

10

## 【0111】

がん反応性 T 細胞を下記の通り同定した。T C R を下記の通り単離した。

T C R の名称：4 1 2 7 - T P 5 3 - G 2 4 5 S - T C R 4

p 5 3 変異の認識：G 2 4 5 S

方法：T r a n 法

T C R を同定するための共培養：4 1 2 7 - F 1 0 T I L 断片と G 2 4 5 S ロングペプチドとを共培養、C D 4 + 4 1 B B + T 細胞をソート（単一細胞 R T - P C R のみ）

T C R を同定する方法：単一細胞 R T - P C R（以下）及び A d a p t i v e P a i r s e q（4 1 2 7 - F 1 0 断片）

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：1 2 . 5 %（16 対のうち 2 回観察）

20

T C R の配向：ベーターアルファ

発現ベクター：ガンマーレトロウイルス

## 【0112】

## 【化 2】

MAPGLLHWMALCLLGTHGDAMVIQNPYQVTQFGKPVTLSCSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYDQDFNNEADTP  
DNFQSRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLCATSRELRGNEQFFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKAT  
LVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQVQVFHGLSEEDKWPEG  
SPKPVTQNI**SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKN**SAKRSRSGSGATNFSLL  
**KQAGDVEENPG**MLTASLLRAVIASICVSSMAQKVTAQTEISVVEKEDVTLDCVYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFL  
IRRN**SFDEQNEISGRYSWN**FQKSTSSFNFTITASQVVD**SAVYFCALSEGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNPEPAVYQLK**  
**DP**RSQD**STLCLFTDFDSQINVPK**T**ME**SGTFITDKCVLDMKAMDSK**NGAIAWSNQTSFTCQDIFKET**NATYPSSDVPCDA  
TLTEK**SFETDMN**LN**FQ**NLLVIVLRILLK**VAGFNLLMTLRLWSS**（配列番号 544）

30

## 【0113】

患者 4 1 2 7 の T C R 4 1 2 7 - T P 5 3 - G 2 4 5 S - T C R 4 についての統計値を以下の表 5 に記載する。

## 【0114】

## 【表 7】

表 5

| パラメータ                  | 数  | 頻度    |
|------------------------|----|-------|
| 全ウエル                   | 96 | 100%  |
| CDR3 アルファ              | 2  | 2.1%  |
| CDR3 ベータ               | 39 | 40.6% |
| 4127-TP53-G245S-TCR4 対 | 2  | 2.1%  |
| 全対合 TCR                | 16 | 16.7% |

40

## 【0115】

患者 4 1 2 7 から単離された T C R 4 1 2 7 \_ O 1 0 2 \_ T C R の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 50）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 51）であり、3 番目の下線領域は C D

50

R 3 ベータ（配列番号 5 2）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 4 7）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 4 8）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 4 9）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）であり、2 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）である。ベータ鎖可変領域（配列番号 5 4）は、アミノ末端から始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。アルファ鎖可変領域（配列番号 5 3）は、リンカーの直後に始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 5 6）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 5 5）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

10

#### 【0 1 1 6】

がん反応性 T 細胞を下記の通り同定した。T C R を下記の通り単離した。

T C R の名称：4 1 2 7 \_ O 1 0 2 \_ T C R

p 5 3 変異の認識：G 2 4 5 S

方法：T r a n 法

T C R を同定するための共培養：実施せず。5 ' R A C E を使用して T 細胞クローン（0 1 0 2）の R N A から T C R を直接同定した。O X 4 0 + T 細胞についてソートし、限界希釈によって T 細胞クローンを樹立することによって、クローンを開発した。T r a n 法を使用して T 細胞クローンをスクリーニングした。

20

T C R を同定するための方法：T I L クローン O 1 0 2 からの 5 ' R A C E

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：1 0 0 % の T 細胞クローン（該当なし）

T C R の配向：ベーターアルファ

発現ベクター：ガンマーレトロウイルス

#### 【0 1 1 7】

#### 【化 3】

MAMSIGLLCCAALSLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKQGSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGE  
VPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYRESHYGYTFGSGTRLTVV EDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQK  
ATLVCLARGFFPDHVELS W W V N G K E V H S G V C T D P Q A Y K E S N Y S Y C L S S R L R V S A T F W H N P R N H F R C Q V Q F H G L S E E D K W P  
EGSPKPV T Q N I S A E A W G R A D C G I T S A S Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S T L V M A M V K R K N S R A K R S G S G A T N F S  
LLKQAGDVEENPGPMWGVFLLYVSMKMGTTGQNI D Q P T E M T A T E G A I V Q I N C T Y Q T S G F N G L F W Y Q Q H A G E A P T F L S Y N  
VLDGLEEKGRFSSFLSRSGYSYLLKELQMKDSASYLCAVKWTGGFKTIFGAGTRLFVKANI Q N P E P A V Y Q L K D P R S Q D  
STLC L F T D F D S Q I N V P K T M E S G T F I T D K C V L D M K A M D S K S N G A I A W S N Q T S F T C Q D I F K E T N A T Y P S S D V P C D A T L T E K S  
F E T D M N L N F Q N L L V I V L R I L L L K V A G F N L L M T L R L W S S（配列番号 5 4 5）

30

#### 【0 1 1 8】

患者 4 1 2 7 から単離された T C R 4 1 2 7 - O 3 7 - T C R の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 4 6 0）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 4 6 1）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 4 6 2）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 4 5 7）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 4 5 8）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 4 5 9）である。

40

#### 【0 1 1 9】

太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）であり、2 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）である。ベータ鎖可変領域（配列番号 4 6 4）は、アミノ末端から始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。アルファ鎖可変領域（配列番号 4 6 3）は、リンカーの直後に始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 4 6 6）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 4 6 5）は、

50

リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0120】

がん反応性T細胞を下記の通り同定した。TCRを下記の通り単離した。

TCRの名称：4127-O37-TCR

p53変異の認識：G245S

方法：Tran法

TCRを同定するための共培養：実施せず。Adaptive TCRAD及びTCRBサーベイ（次世代シーケンシング（NGS）プラットフォーム）を使用してT細胞クローン（O37）のゲノムDNAからTCRを直接同定した。OX40+T細胞についてソートし、限界希釈によってT細胞クローンを樹立することによって、O37クローンを開発した。Tran法を使用してT細胞クローンをスクリーニングした。

TCRを同定するための方法：TILクローンO37のAdaptive TCRシーケンシング（NGS）

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：100%のT細胞クローン（n/a）

TCRの配向：ベーターアルファ

発現ベクター：ガンマーレトロウイルス

#### 【0121】

##### 【化4】

MALLLLLLLPGISLLLPGLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFYRQFPKQSLMLMATSNESGSK  
ATYEQGVKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSAAGQANTEAFFGQGTRLTVVEDLRNVTPPKVSLFEPSKAE  
IANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLS  
EEDKWPEGSPKPTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNRAKRSKS  
GATNFSLLKQAGDVEENPGPMHSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSYDRGSQSFFWYRQY  
SGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCVNDAGNMLTFGGGTRLVMKPNIQNPEPAV  
YQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTCQDIFKETNATYPSSDV  
PCDATLTEKSFETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS（配列番号546）

#### 【0122】

##### 実施例2

この実施例は、患者4196からの3つの抗変異型p53TCRの単離及び特異的反応性を示す。

#### 【0123】

患者4196について、図8～11に記載の通り実験を実施した。米国特許出願公開第2017/0224800号に記載のTran方法によって、この患者のp53反応性T細胞を同定した。個々のTCRを単離するためにFluidigm法を使用した。患者4196についての統計値を表Dに示す。

#### 【0124】

p53反応性細胞の特性評価：最小エピトープを同定する試み：変異型アミノ酸p53R175Hを有する最初に予測されたペプチドを表Cに示す。

#### 【0125】

##### 【表8】

表C

|         |                    |
|---------|--------------------|
| HLA     | HLA-A0201          |
| ペプチド    | HMTEVVRHC（配列番号530） |
| コア      | HMTEVVRHC（配列番号530） |
| 親和性（nM） | 7826.06            |
| ランク%    | 13.00              |

#### 【0126】

TMG1対4196-Rx1 TIL：TMG1及びHLAアレルについてのプラスミ

ドをC o s 7細胞に形質導入した。細胞を4 1 9 6 R x 1 T I L 輸液バッグと2 0 時間 (h) 共培養した。結果を図8 Aに示す。

【0 1 2 7】

P 5 3 - R 1 7 5 H 最小ペプチド対4 1 9 6 - R x 1 T I L : 4 日目に、候補最小エピトープ (H M T E V V R H C (配列番号5 3 0) 又は (S Q H M T E V V R H (配列番号5 3 1) ) のいずれかを自己D C に2 時間パルスした。細胞を洗浄し、4 1 9 6 R x 1 T I L 輸液バッグと2 0 時間共培養した。結果を図8 Bに示す。

【0 1 2 8】

A \* 0 2 : 0 1 拘束性T P 5 3 テトラマーを使用して、T I L 輸液バッグからT P 5 3 反応性細胞を単離することができる：T P 5 3 ペプチドと共培養した後に4 - 1 B B + ソートを使用するT P 5 3 反応性細胞の単離は、技術的に制限されていた。T P 5 3 反応性細胞を単離するために、A \* 0 2 : 0 1 - T P 5 3 テトラマーを生成した。無関係のテトラマー (A \* 0 2 : 0 1 - g p 1 0 0) を対照として生成した。生細胞、C D 3 + 細胞、C D 8 + 細胞にゲートをかけて、F A C S 分析を実行した。A \* 0 2 : 0 1 - T P 5 3 テトラマーについては、1 4 . 9 % のp 5 3 テトラマー + 細胞が検出された。A \* 0 2 : 0 1 - g p 1 0 0 テトラマーについては、0 . 7 % のp 5 3 テトラマー + 細胞が検出された。

【0 1 2 9】

T P 5 3 反応性細胞の単離及び特性評価：T P 5 3 反応性細胞を単離及び特性評価するための戦略は、以下の通りであった：(1) 上記の通りF A C S を使用してテトラマー陽性細胞をソートする。(2) 単一細胞P C R を実行する。(3) V β シーブシーケンシング (V β s e e p s e q u e n c i n g) を実行する。

【0 1 3 0】

表Dに示す通り、単一細胞P C R を使用してT P 5 3 T C R について幾つかの候補クローンを同定した。T C R - 1 a 及びT C R - 1 b は別の候補クローンであった。

【0 1 3 1】

【表9】

表D

|        | 候補TCR    | CDR3 (アミノ酸)                    |               |
|--------|----------|--------------------------------|---------------|
| TCR-1a | TRBV6-1  | CASSEGLWQVGDEQYF<br>(配列番号 7 2) | 120対のうちの63.3% |
|        | TRAV12-1 | CVVQPGGYQKVTF<br>(配列番号 6 9)    |               |
| TCR-1b | TRBV6-1  | 機能的ではない                        |               |
|        | TRAV2    |                                |               |
| TCR-2  | TRBV11-2 | CASSLDPGDTGELFF<br>(配列番号 9 2)  | 120対のうちの25.8% |
|        | TRAV6    | CALDIYPHDMRF<br>(配列番号 8 9)     |               |
| TCR-3  | TRBV10-3 | CAISELVTGDSPLHF<br>(配列番号 8 2)  | 120対のうちの9.2%  |
|        | TRAV38-1 | CAFMGYSGAGSYQLTF<br>(配列番号 7 9) |               |

【0 1 3 2】

候補T C R をコードしているプラスミドにM S G V 1 ベクターをクローニングした。レトロウイルス形質導入を使用して、T C R をドナーリンパ球に導入した。

【0 1 3 3】

4 日目に、A \* 0 2 : 0 1 D C をH P L C 等級の最小エピトープに2 時間パルスした。D C をT C R 形質導入細胞と2 0 時間共培養した。結果を図9 A ~ 9 D に示す。3 つの異なるA \* 0 2 : 0 1 拘束性T P 5 3 受容体が同定された。

## 【0134】

T2細胞を解凍し、24時間静置し、次いで、漸減濃度のHPLC最小エпитープを2時間パルスした。次いで、細胞を洗浄し、TP53 TCR形質導入細胞と17時間共培養した。結果を図10A～10Bに示す。

## 【0135】

以下の親腫瘍細胞株にHLA-A\*02:01を形質導入した：結腸株-R175Hを有するが、HLA-A2状態は未知であるLS123(ATCC CCL-255)。白血病株：R175Hを有するが、HLA-A2状態は未知であるCCRF-CEM(ATCC CRM-CCL-119、白血病)。乳株：R175Hを有するが、HLA-A2状態は未知であるAU-565(ATCC CRL-2351、乳腺がん)。黒色腫細胞株：MEL624；HLA-A2の内因性発現及びwt R175。

10

## 【0136】

標的形質導入腫瘍細胞を収集し、共培養の朝にプレーティングした(1×10<sup>5</sup>細胞/ウェル)。R175H最小エпитープを標的細胞(HPLC、5μg/mL)に2時間パルスした。細胞を2回洗浄し、2×10<sup>4</sup>個のTP53 TCR形質導入細胞と20時間共培養した(患者4196)。応答を読み取るためにIFN-γ ELISPOTを使用した。結果を図11に示す。標的細胞のHLA-A2及びTP53の発現、並びにこの実施例のTCRの反応性に関する更なる実験データを実施例15に提供する。

## 【0137】

患者4196から単離されたTCR4196\_\_AV12-1\_\_with\_\_BV6-1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1ベータ(配列番号70)であり、2番目の下線領域はCDR2ベータ(配列番号71)であり、3番目の下線領域はCDR3ベータ(配列番号72)であり、4番目の下線領域はCDR1アルファ(配列番号67)であり、5番目の下線領域はCDR2アルファ(配列番号68)であり、6番目の下線領域はCDR3アルファ(配列番号69)である。太字領域は、リンカー(配列番号26)である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域(配列番号25)であり、2番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域(配列番号24)である。ベータ鎖可変領域(配列番号74)は、アミノ末端から始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。アルファ鎖可変領域(配列番号73)は、リンカーの直後に始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖(配列番号76)は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖(配列番号75)は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

20

30

## 【0138】

がん反応性T細胞を下記の通り同定した。

TCRの名称：4196\_\_AV12-1\_\_with\_\_BV6-1

p53変異の認識：R175H

方法：T<sub>ra</sub>n法

## 【0139】

## 【化5】

40

MAIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHNSMYWYRQDPGMGLRLIYYSASEGTTDKGEVP  
NGYNVSRNLNREFSLRLESAAPSQTSVYFCASSEGLWQVGDEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQK  
ATLVCLARGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDKWP  
EGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMVKKRKSRAKRSKSGATNFS  
LLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPK  
LLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVQPGGYQKVTFGTGTLQVIPDIQNPEPAVYQLKDP  
RSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPDATL  
TEKSFETDMNLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS(配列番号547)

## 【0140】

50

患者4196から単離されたTCR4196\_\_AV38-1\_\_with\_\_BV10-3の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号80）であり、2番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号81）であり、3番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号82）であり、4番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号77）であり、5番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号78）であり、6番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号79）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）であり、2番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号24）である。ベータ鎖可変領域（配列番号84）は、アミノ末端から始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。アルファ鎖可変領域（配列番号83）は、リンカーの直後に始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号86）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号85）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

【0141】

がん反応性T細胞を下記の通り同定した。

TCRの名称：4196\_\_AV38-1\_\_with\_\_BV10-3

p53変異の認識：R175H

方法：T r a n 法

【0142】

【化6】

MATRLFFYVALCCLLTGHMDAGITQSPRHKVTTETGTPVTLRCHQTENHRYMYWYRQDPGHGLRLIHYSYGVKDTDKGEVS  
DGYSVSRSKTEDFLLTLESATSSQTSVYFCAISELVTGDSPLHFGNGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKA  
TLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPРНHFRQVQFHGLSEEDKWPE  
GSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNRAKRSGSGATNFSL  
LKQAGDVEENPGPMTRVSLWAVVSTCLESMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSTCTYDTSENYYLFWYKQPPSRQMIL  
VIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFMGYSYGAGSYQLTFGKGTKLSVIPDIQNPPEAVY  
QLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQSFTCQDIFKETNATYPSSDVP  
CDATLTEKSFETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS（配列番号548）

【0143】

患者4196から単離されたTCR4196\_\_AV6\_\_with\_\_BV11-2の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号90）であり、2番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号91）であり、3番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号92）であり、4番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号87）であり、5番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号88）であり、6番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号89）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）であり、2番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号24）である。ベータ鎖可変領域（配列番号94）は、アミノ末端から始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。アルファ鎖可変領域（配列番号93）は、リンカーの直後に始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号96）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号95）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

【0144】

がん反応性T細胞を下記の通り同定した。

TCRの名称：4196\_\_AV6\_\_with\_\_BV11-2

p53変異の認識：R175H

方法：T r a n 法

【0145】

【化7】

MATRLLCWAALCCLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPI~~SGHATLYWYQQILGQGP~~KLLIQF~~QNNGVDD~~SQLP  
 KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYL~~CASSLDPGDTGELFF~~EGEGSRLTVLE~~DLRNVTPPKVSL~~FEP~~SKAEIANKQK~~  
 ATL~~VCLARGFFPDHVELS~~WWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWP  
 EGSPKPV~~TQNISAEAWGRADCGITS~~ASYQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKN~~SR~~AKRSGSGATNFS  
 LLKQAGDVEENPGPMESFLGGVLLILWLQVDWVKSQKIEQNSEALNIQEGKTATLTCNYT~~NYS~~PAYLQWYRQDPGRGPVF  
 LLLIRENEKEKRERLKVTFD~~TTLKQSLFHITASQ~~PADSATYLCALDIYPHDMRFGAGTRLTVKPD~~IQNPEPAVYQLKDP~~  
 RSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSN~~GAI~~AWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATL  
 TEKSFETDMNLFQNL~~LIVLRI~~LLLVAGFNLLMTLRLWSS (配列番号549)

10

【0146】

## 実施例3

この実施例は、患者4238からの11の抗変異型p53TCRの単離を示す。

【0147】

患者4238について、図12～15に記載の通り実験を実施した。

【0148】

患者4238由来のTIL断片(F1～F24、n=24)を、無関係又は変異型p53の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッセイを使用してIFN-γの分泌を評価した。結果を図12に示す。リンパ球→生細胞(PI陰性)→CD3+(T細胞)にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図14に示す。

20

【0149】

患者4238由来のTIL断片(F1～F24、n=24)を、ペプチドビヒクル(DMSO)、又は変異型p53-R248Q配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッセイを使用してIFN-γの分泌を評価した。結果を図13に示す。リンパ球→生細胞(PI陰性)→CD3+(T細胞)にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図15に示す。

30

【0150】

CD8+41BB+T細胞のソート後のTCRの源は、TIL断片F10、F11、及びF17であった。

【0151】

患者4238から単離されたTCR4238-F10-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ(配列番号207)であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ(配列番号208)であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ(配列番号209)であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ(配列番号210)であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ(配列番号211)であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ(配列番号212)である。太字領域は、リンカー(配列番号26)である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域(配列番号23)であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域(配列番号25)である。アルファ鎖可変領域(配列番号213)は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域(配列番号214)は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖(配列番号215)は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖(配列番号216)は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0152】

50

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 3 8 - F 1 0 - T C R 1

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4 2 3 8 - F 1 0 と R 2 4 8 Q ロングペプチドとを共培養、C D 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：2 5 . 0 % ( 1 2 対のうち 3 回観察)

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

【0 1 5 3】

【化 8】

MATASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDCVYETRD~~TTYYL~~FWYKQPPSGELVFLIR~~NSF~~DEQNEI  
SGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVD~~SAVYFCAL~~SEVD~~SGNTPLVFGK~~GTRLSVIANI~~QNP~~EP~~AVYQLK~~D~~PR~~SQ~~D~~STLCL  
FTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSN~~QTSFT~~CQ~~DIF~~KETNATYPSSD~~VPC~~DATL~~TE~~KSFETDM  
NLNFQ~~NLLVIVLRILL~~LKVAGFNLLMTLRLWSSRAK~~RS~~GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHFRLLCCVAFCLLGAGPVD  
SGVTQTPKHLITATGQ~~RVTLR~~CS~~PRSGD~~LSVY~~WYQQSLD~~QGLQFLIQ~~YYNGE~~ERAKGNIL~~ERF~~SAQ~~QFP~~DLHSELNLSL  
ELGDSALYFCASSV~~GSSS~~SDTQYFGPGT~~RLTVLED~~LRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWW  
VNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNH~~ERCQVQFHGL~~SEEDKWPEGSPK~~PVTQ~~NISAEAWGRAD  
CGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMV~~KRKNS~~ (配列番号 5 5 0)

【0 1 5 4】

患者 4 2 3 8 の T C R 4 2 3 8 - F 1 0 - T C R 1 についての統計値を以下の表 6 に記載する。

【0 1 5 5】

【表 1 0】

表 6

| パラメータ          | 数  | 頻度     |
|----------------|----|--------|
| 全ウエル           | 96 | 100%   |
| CDR3アルファ       | 4  | 4. 2%  |
| CDR3ベータ        | 4  | 4. 2%  |
| 4238-F10-TCR1対 | 3  | 3. 1%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12. 5% |

【0 1 5 6】

患者 4 2 3 8 から単離された T C R 4 2 3 8 - F 1 0 - T C R 2 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ (配列番号 2 1 7) であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ (配列番号 2 1 8) であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ (配列番号 2 1 9) であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ (配列番号 2 2 0) であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ (配列番号 2 2 1) であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ (配列番号 2 2 2) である。太字領域は、リンカー (配列番号 2 6) である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域 (配列番号 2 3) であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域 (配列番号 2 5) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号 2 2 3) は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号 2 2 4) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号 2 2 5) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号 2 2 6) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

## 【0157】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4238-F10-TCR2

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：4238-F10とR248Qロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：25.0%（12対のうち3回観察）

TCRの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

## 【0158】

## 【化9】

MATASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDVCVYETRD~~TTYYL~~FWYKQPPSGELVFLIR~~NSFDEQNEI~~  
SGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVD~~SAVYFCALSEVDSGNTPLVFGK~~GTRLSVIANI~~QNP~~EP~~AVYQLK~~DP~~RSQD~~STLCL  
FTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQT~~SFTCQDIFKET~~NATYPSSDVPCDATLTEKSFETDM  
NLNFQ~~NLLVIVLRILL~~LKVAGFNLLMTLRLWSS~~RAKRSGSGATNF~~SLLKQAGDVEENPGPMHFRLLCCVAFCLLGAGPVD  
SGVTQTPKHLITATGQVRVTLRCS~~PRSGDLSVY~~WYQQSLDQGLQFLIH~~YNGEERAKGNIL~~ERFSAQQFPDLHSELNSSL  
ELGDSALYFCASSVGS~~SSSDTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEP~~SKAEIANKQATLVCLARGFFPDHVELSWW  
VNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQNISAEAWGRAD~~  
CGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS（配列番号551）

## 【0159】

患者4238のTCR4238-F10-TCR2についての統計値を以下の表7に記載する。

## 【0160】

## 【表11】

表7

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウェル           | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 4  | 4.2%  |
| CDR3ベータ        | 4  | 4.2%  |
| 4238-F10-TCR2対 | 3  | 3.1%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12.5% |

## 【0161】

患者4238から単離されたTCR4238-F10-TCR3の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号227）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号228）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号229）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号230）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号231）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号232）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号233）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号234）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号235）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号236）は、リンカーの直後に始まり

、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0162】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4238-F10-TCR3

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：4238-F10とR248Qロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：58.3%（12対のうち7回観察）

TCRの配向：アルファベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

#### 【0163】

#### 【化10】

MAKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKED  
GRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMTSPYNNNDMRFGAGTRLTVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHLLLLLLGPGISLLPGSLAG  
SGLGAVVSQHPWSVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLS  
TLTVTSAHPEDSSFYICSGGLEEAARQFIGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVE  
LSWWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAW  
GRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKNS（配列番号552）

#### 【0164】

患者4238のTCR4238-F10-TCR3についての統計値を以下の表8に記載する。

#### 【0165】

#### 【表12】

表8

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウエル           | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 16 | 16.7% |
| CDR3ベータ        | 26 | 27.1% |
| 4238-F10-TCR3対 | 7  | 7.3%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12.5% |

#### 【0166】

患者4238から単離されたTCR4238-F10-TCR4の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号237）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号238）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号239）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号240）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号241）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号242）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号243）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号244）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号245）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直

前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 2 4 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

【0 1 6 7】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 3 8 - F 1 0 - T C R 4

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4 2 3 8 - F 1 0 と R 2 4 8 Q ロングペプチドとを共培養、C D 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：5 8 . 3 % （1 2 対のうち 7 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

【0 1 6 8】

【化 1 1】

MAKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKED  
GRFTAQVDKSSKYISLFI RDSQPSDSATYLCAMTSPYNNNDMRFAGAGTRLTVPKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHLLLLLLGPAGSGLGAVVSQH  
PSRVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTSTLTVTSAHPE  
DSSFYICSGGLEEAARQFIGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEV  
HSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCGITSA  
SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS（配列番号 5 5 3）

【0 1 6 9】

患者 4 2 3 8 の T C R 4 2 3 8 - F 1 0 - T C R 4 についての統計値を以下の表 9 に記載する。

【0 1 7 0】

【表 1 3】

表 9

| パラメータ          | 数  | 頻度     |
|----------------|----|--------|
| 全ウェル           | 96 | 100%   |
| CDR3アルファ       | 16 | 16. 7% |
| CDR3ベータ        | 26 | 27. 1% |
| 4238-F10-TCR4対 | 7  | 7. 3%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12. 5% |

【0 1 7 1】

患者 4 2 3 8 から単離された T C R 4 2 3 8 - F 1 1 - T C R 1 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 2 4 7）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 2 4 8）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 2 4 9）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 2 5 0）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 2 5 1）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 2 5 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 2 5 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 2 5 4）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む

。完全長アルファ鎖（配列番号 2 5 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 2 5 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0172】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 3 8 - F 1 1 - T C R 1

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4 2 3 8 - F 1 1 と R 2 4 8 Q ロングペプチドとを共培養、C D 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：2 5 . 0 % （1 2 対のうち 3 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0173】

#### 【化12】

MALVARVTVFLTFGTIIDAKTTQPPSMDCAEGRAANLPCNHSTISGNEYVYWRQIHSQGPQYIIHGLKNNETNEMASLI  
ITEDRKSSTLILPHATLRDTAVYYCIVPNDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVP  
KTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLVIV  
LRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLV  
KRTGEKVFLECVQDMDHENMFWRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKKEGDIPEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCA  
SSFGTGTSGIQTQYFGPGTRLLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKSAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVC  
TDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVQNISAEAWGRADCGITSASYQQG  
VLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKN（配列番号 5 5 4）

#### 【0174】

患者 4 2 3 8 の T C R 4 2 3 8 - F 1 1 - T C R 1 についての統計値を以下の表 1 0 に記載する。

#### 【0175】

#### 【表14】

表 1 0

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウエル           | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 5  | 5.2%  |
| CDR3ベータ        | 3  | 3.1%  |
| 4238-F11-TCR1対 | 3  | 3.1%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12.5% |

#### 【0176】

患者 4 2 3 8 から単離された T C R 4 2 3 8 - F 1 1 - T C R 2 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 2 5 7）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 2 5 8）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 2 5 9）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 2 6 0）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 2 6 1）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 2 6 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6 2）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 2 6 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号

264) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号 265) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号 266) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0177】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。TCR を単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCR の名称: 4238-F11-TCR2

p53 変異の認識: R248Q

スクリーニング方法: p53 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCR を同定するための共培養: 4238-F11 と R248Q ロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T 細胞をソート

TCR を同定するための方法: 単細胞 RT-PCR

全ての対合 TCR のうちの TCR の存在量: 25.0% (12 対のうち 3 回観察)

TCR の配向: アルファ-ベータ

発現ベクター: SB トランスポゾン

#### 【0178】

#### 【化13】

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYTATGYPSLFWYVQYPGEGLQLLLKATKADDKGSNKG  
FEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALNPNAGGTSYGKLTFGQGTILTVHPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLF  
TDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMN  
LNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHPRLFWALLCCLGTGPVEA  
GVTQSPHLIKTRGQATLRCSPISGHTSVYVYQQALGLGLQFLLWYDEGEERNRGNFPPRFSGRQFPNYSSELNVNALE  
LEDALYLCASSSPGATSGGANTGELFFEGESRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVEL  
SWWWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWG  
RADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS (配列番号 555)

#### 【0179】

患者 4238 の TCR 4238-F11-TCR2 についての統計値を以下の表 11 に記載する。

#### 【0180】

#### 【表15】

表 11

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウェル           | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 5  | 5.2%  |
| CDR3ベータ        | 8  | 8.3%  |
| 4238-F11-TCR2対 | 3  | 3.1%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12.5% |

#### 【0181】

患者 4238 から単離された TCR 4238-F11-TCR3 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は CDR1 アルファ (配列番号 267) であり、2 番目の下線領域は CDR2 アルファ (配列番号 268) であり、3 番目の下線領域は CDR3 アルファ (配列番号 269) であり、4 番目の下線領域は CDR1 ベータ (配列番号 270) であり、5 番目の下線領域は CDR2 ベータ (配列番号 271) であり、6 番目の下線領域は CDR3 ベータ (配列番号 272) である。太字領域は、リンカー (配列番号 26) である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域 (配列番号 23) であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域 (配列番号 25) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号 273) は、アミノ末端から始まり

、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 274）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 275）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 276）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0182】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4238-F11-T C R 3

p53 変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4238-F11と R248Q ロングペプチドとを共培養、C D 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：16.7%（12 対のうち 2 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0183】

#### 【化14】

MATFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFSLVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIPRDSGGGADGLTFGKGTHLIIQPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPDCLTEKSFETDMNLNFQVLLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHLLLLLLGPGISLLLPGLAGSGLGAVVSQHPSPWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKFLINHASLTLSLTLTVTSAHPEDSSFYICASARDLQRSYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISA EAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVRRKNS（配列番号 556）

#### 【0184】

患者 4238 の T C R 4238-F11-T C R 3 についての統計値を以下の表 12 に記載する。

#### 【0185】

#### 【表16】

表 12

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウェル           | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 4  | 4.2%  |
| CDR3ベータ        | 2  | 2.1%  |
| 4238-F11-TCR3対 | 2  | 2.1%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12.5% |

#### 【0186】

患者 4238 から単離された T C R 4238-F11-T C R 4 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 277）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 278）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 279）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 280）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 281）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 282）である。太字領域は、リンカー（配列番号 26）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 23）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配

列番号 25) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号 283) は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号 284) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号 285) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号 286) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0187】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。TCR を単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCR の名称: 4238-F11-TCR4

p53 変異の認識: R248Q

スクリーニング方法: p53 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCR を同定するための共培養: 4238-F11 と R248Q ロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T 細胞をソート

TCR を同定するための方法: 単一細胞 RT-PCR

全ての対合 TCR のうちの TCR の存在量: 16.7% (12 対のうち 2 回観察)

TCR の配向: アルファ-ベータ

発現ベクター: SB トランスポゾン

#### 【0188】

##### 【化15】

MATFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFSLVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQ  
RLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIPRDSGGGADGLTFGKGTHLI IQPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCL  
FTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSTFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDM  
NLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHLLLLLLGPAGSGLGAVVS  
QHPSRVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWRQFPKQSLMLMATSNESKATYEQGVKDKFLINHASLTLSTLTVTSAH  
PEDSSFYICARDLQRSYEQYFGPGTRLTVT EDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNG  
KEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFVHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGI  
TSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS (配列番号 557)

#### 【0189】

患者 4238 の TCR 4238-F11-TCR4 についての統計値を以下の表 13 に記載する。

#### 【0190】

##### 【表17】

表 13

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウエル           | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 4  | 4.2%  |
| CDR3ベータ        | 2  | 2.1%  |
| 4238-F11-TCR4対 | 2  | 2.1%  |
| 全対合TCR         | 12 | 12.5% |

#### 【0191】

患者 4238 から単離された TCR 4238-F17-TCR1 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は CDR1 アルファ (配列番号 287) であり、2 番目の下線領域は CDR2 アルファ (配列番号 288) であり、3 番目の下線領域は CDR3 アルファ (配列番号 289) であり、4 番目の下線領域は CDR1 ベータ (配列番号 290) であり、5 番目の下線領域は CDR2 ベータ (配列番号 291) であり、6 番目の下線領域は CDR3 ベータ (配列番号 292) である。太字領域は、リンカー (配列番号 26) である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ

鎖定常領域（配列番号 23）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 293）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 294）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 295）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 296）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0192】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。TCR を単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCR の名称：4238-F17-TCR1

p53 変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCR を同定するための共培養：4238-F17とR248Q ロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T細胞をソート

TCR を同定するための方法：単一細胞 RT-PCR

全ての対合 TCR のうちの TCR の存在量：33.3%（6 対のうち 2 回観察）

TCR の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

#### 【0193】

#### 【化16】

MAGIRALFMYLWLQLDWVSRGESVGLHLPTLSVQEGDNSIINCAYSNSASDYFIWYKQESGKGPQFIIDIRSNMDKRQGG  
RVTVLLNKTVKHLSLQIAATQPGDSAVYFCAEPVGGLNSGYALNFGKGTSLLVTPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLF  
TDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPDCLTEKSFETDMN  
LNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHPGLLCWVLLCLLGAGPVDA  
GVTQSPHTHLIKTRGQVTLRCSPISGHKSVSQVQVVLGGQGPQFIFQYYEKEERGRGNFDRFSARQFPNYSSELNVNALL  
LGDSALYLCASSGGRTSGAYEQFFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWW  
NGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADC  
GITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKNS（配列番号 558）

#### 【0194】

患者 4238 の TCR 4238-F17-TCR1 についての統計値を以下の表 14 に記載する。

#### 【0195】

#### 【表18】

表 14

| パラメータ          | 数  | 頻度   |
|----------------|----|------|
| 全ウェル           | 96 | 100% |
| CDR3アルファ       | 3  | 3.1% |
| CDR3ベータ        | 2  | 2.1% |
| 4238-F17-TCR1対 | 2  | 2.1% |
| 全対合TCR         | 6  | 6.3% |

#### 【0196】

患者 4238 から単離された TCR 4238-F17-TCR2 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は CDR1 アルファ（配列番号 297）であり、2 番目の下線領域は CDR2 アルファ（配列番号 298）であり、3 番目の下線領域は CDR3 アルファ（配列番号 299）であり、4 番目の下線領域は CDR1 ベータ（配列番号 300）であり、5 番目の下線領域は CDR2 ベータ（配列番号 301）であり、6 番目の下線領域は CDR3 ベータ（配列番号 302）である。太字領域は、リンカー

（配列番号 26）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 23）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 303）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 304）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 305）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 306）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0197】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 3 8 - F 1 7 - T C R 2

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4 2 3 8 - F 1 7 と R 2 4 8 Q ロングペプチドとを共培養、C D 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：3 3 . 3 % （6 対のうち 2 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0198】

##### 【化 17】

MAKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSLNCSTYVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEK  
ERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCVAHTAHRGSLGRLYFGRGTQLTVWPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDCLTEKSFETDMNL  
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSKSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHPGLLCWALLCLLGLVLDAG  
VTQSPHTLIKTRGQQVTLRCSKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQGRNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLL  
GDSALYLCASSRRGGAYNEQFFGPGTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNG  
KEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPFRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGI  
TSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMVVRKNS（配列番号 559）

#### 【0199】

患者 4 2 3 8 の T C R 4 2 3 8 - F 1 7 - T C R 2 についての統計値を以下の表 15 に記載する。

#### 【0200】

##### 【表 19】

表 15

| パラメータ           | 数  | 頻度   |
|-----------------|----|------|
| 全ウエル            | 96 | 100% |
| CDR3 アルファ       | 6  | 6.3% |
| CDR3 ベータ        | 2  | 2.1% |
| 4238-F17-TCR2 対 | 2  | 2.1% |
| 全対合 TCR         | 6  | 6.3% |

#### 【0201】

患者 4 2 3 8 から単離された T C R 4 2 3 8 - F 1 7 - T C R 3 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 307）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 308）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 309）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 310）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 311）であり

、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号312）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号313）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号314）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号315）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号316）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0202】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4238-F17-TCR3

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：4238-F17とR248Qロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：33.3%（6対のうち2回観察）

TCRの配向：アルファベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

#### 【0203】

##### 【化18】

MAKNPLAAPLLILWFHLDVCSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEKK  
KGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCASVGGGADGLTFGKGTHLI IQPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLFWVAFCLLGADHTGAG  
VSQSPSNKVKTEKGDVELRCDPISGHTALYWYRQSLGQGLEFLIYFQGNAPDKSGLPSDRFSAERTGGSVSTLTIQRTQ  
QEDSAVYLCASTWDRGSYNEQFFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWN  
GKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCVQVFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVQNISAEAWGRADCG  
ITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS（配列番号560）

#### 【0204】

患者4238のTCR4238-F17-TCR3についての統計値を以下の表16に記載する。

#### 【0205】

##### 【表20】

表16

| パラメータ          | 数  | 頻度   |
|----------------|----|------|
| 全ウェル           | 96 | 100% |
| CDR3アルファ       | 2  | 2.1% |
| CDR3ベータ        | 2  | 2.1% |
| 4238-F17-TCR3対 | 2  | 2.1% |
| 全対合TCR         | 6  | 6.3% |

#### 【0206】

##### 実施例4

この実施例は、患者4253からの2つの抗変異型p53TCRの単離を示す。

#### 【0207】

患者4253について、図16に記載の通り実験を実施した。

## 【0208】

患者4253由来のTIL断片(F1～F24; n=24)を、(1)ペプチドビヒクル(DMSO)をパルスした、(2)変異型p53-R248W配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした、(3)無関係のTMGをエレクトロポレーションした、又は(4)変異型p53-R248W配列を含むp53-mut-TMGをエレクトロポレーションした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTによってIFN-γの分泌を評価した。結果を図16に示す。TCRをソートするためにF15を選択したが、その理由は、p53-mut-TMG及びp53-R248Wロングペプチドの両方に対して反応性であったからである。

10

## 【0209】

患者4253から単離されたTCR4253-TIL-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ(配列番号187)であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ(配列番号188)であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ(配列番号189)であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ(配列番号190)であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ(配列番号191)であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ(配列番号192)である。太字領域は、リンカー(配列番号26)である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域(配列番号23)であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域(配列番号25)である。アルファ鎖可変領域(配列番号193)は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域(配列番号194)は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖(配列番号195)は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖(配列番号196)は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

20

## 【0210】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称: 4253-TIL-TCR1

p53変異の認識: R248W

方法: 簡易型p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング(変異型TMG及びR248Wロングペプチドのみを評価)

TCRを同定するための共培養: 4253-F15とp53-R248Wロングペプチドとを共培養、CD3+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法: 単細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量: 5.6%(36対のうち2回観察)

TCRの配向: アルファ-ベータ

発現ベクター: SBトランスポゾン

30

## 【0211】

## 【化19】

MAKCPQALLAIFWLLLSWVSSSEDKVVQSPLSLVVHEGDTVTLNCSYEVTNFRSLLWYKQEKKAPTFLFMLTSSGIEKKSG  
RLSSILDKKELSSILNITATQTGDSAIIYLCAGQNYGGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCFLT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVLIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTWLVCAIFSLKAGLTEPE  
VTQTPSHQVTQMGEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTK  
LEDSAMYFCASRDPAYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKE  
VHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITS  
ASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS (配列番号561)

40

## 【0212】

50

患者4253のTCR4253-TIL-TCR1についての統計値を以下の表17に記載する。

【0213】

【表21】

表17

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウェル           | 55 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 3  | 5.5%  |
| CDR3ベータ        | 2  | 3.6%  |
| 4253-TIL-TCR1対 | 2  | 3.6%  |
| 全対合TCR         | 36 | 65.5% |

10

【0214】

患者4253から単離されたTCR4253-TIL-TCR2の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号197）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号198）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号199）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号200）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号201）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号202）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号203）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号204）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号205）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号206）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

20

【0215】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

30

TCRの名称：4253-TIL-TCR2

p53変異の認識：R248W

方法：簡易型p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング（変異型TMG及びR248Wロングペプチドのみを評価）

TCRを同定するための共培養：4253-F15とp53-R248Wロングペプチドとを共培養、CD3+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：91.7%（36対のうち33回観察）

TCRの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

40

【0216】

50

## 【化 2 0】

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDG  
 RFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVNPPVKTSYDKVIFGPGTSLSVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLF  
 TDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCD<sup>ATL</sup>TEKSFETDMN  
 LNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTSLLCWVVLGFLGTDHTGA  
 GVSQSPRYKVKTRGQDVALRCDPISGHVSLYWYRQALGGQPEFLTYFN<sup>YEAQ</sup>QDKSGLPNDRFSAERPEGSISTLTIQRT  
 EQRDSAMYRCASSHREPHTELGELFFGEGSRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWV  
 NGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP<sup>RNH</sup>FRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTKNISAEAWGRADC  
 GITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS (配列番号 5 6 2)

10

## 【0 2 1 7】

患者 4 2 5 3 の T C R 4 2 5 3 - T I L - T C R 2 についての統計値を以下の表 1 8 に記載する。

## 【0 2 1 8】

## 【表 2 2】

表 1 8

| パラメータ          | 数  | 頻度    |
|----------------|----|-------|
| 全ウエル           | 55 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 35 | 63.6% |
| CDR3ベータ        | 33 | 60.0% |
| 4253-TIL-TCR2対 | 33 | 60.0% |
| 全対合TCR         | 36 | 65.5% |

20

## 【0 2 1 9】

## 実施例 5

この実施例は、自己 T 細胞内で変異型 p 5 3 を発現するように誘導された自己 A P C を共培養することによる患者 4 2 7 3 における抗変異型 p 5 3 T 細胞の同定を示す (「p 5 3 ホットスポット変異ユニバーサルスクリーニング」)。また、この実施例は、患者 4 2 7 3 からの 2 つの抗変異型 p 5 3 T C R の単離を示す。

## 【0 2 2 0】

患者 4 2 7 3 について、図 1 7 ~ 2 0 及び 5 6 ~ 6 0 に記載の通り実験を実施した。

## 【0 2 2 1】

患者 4 2 7 3 由来の T I L 断片 (F 1 ~ F 2 4、n = 2 4) を、無関係、W T p 5 3、又は変異型 p 5 3 の配列から構成された T M G をエレクトロポレーションした自己 A P C と共培養した。共培養は 3 7 °C で一晚実施した。E L I S P O T アッセイを使用して I F N - γ の分泌を評価した。結果を図 1 7 に示す。リンパ球 → 生細胞 (P I 陰性) → C D 3 + (T 細胞) にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 1 8 に示す。

## 【0 2 2 2】

患者 4 2 7 3 由来の T I L 断片 (F 1 ~ F 2 4、n = 2 4) を、ペプチドビヒクル (D M S O)、又は W T p 5 3 - R 2 4 8 配列若しくは変異型 p 5 3 - R 2 4 8 W 配列から構成された精製 (H P L C によって > 9 5 %) された 2 5 アミノ酸ペプチドをパルスした自己 A P C と共培養した。共培養は 3 7 °C で一晚実施した。E L I S P O T アッセイを使用して I F N - γ の分泌を評価した。結果を図 1 9 に示す。リンパ球 → 生細胞 (P I 陰性) → C D 3 + (T 細胞) にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 2 0 に示す。

40

## 【0 2 2 3】

患者 4 2 7 3 については、F 1 5 が最も反応性の高い断片であり、L P 及び T M G に対する F 1 5 による応答は同等であり、主に C D 4 T 細胞によるものであった。従って、4 2 7 3 - F 1 5 を、R 2 4 8 W L P をパルスした A P C と共培養し、次の日、C D 4

50

+ 4 1 B B + T 細胞を、9 6 ウェル P C R プレートに 1 細胞／ウェルで単一細胞としてソートした。P C R プレートは、各ウェルに R T - P C R 溶液を有し、これは、同じ溶液中で T C R のアルファ及びベータ C D R 3 領域を増幅するものである。次いで、プレートのウェルを 2 枚の 9 6 ウェル P C R プレートに分け、2 回目の P C R ラウンドを実施して、別個の反応として C D R 3 アルファ又は C D R 3 ベータのいずれかを増幅させる。各ウェルからの P C R 産物（各ウェルにマッピングされた合計 1 9 2 の P C R 産物 - アルファ又はベータ）を S a n g e r シーケンシングによってシーケンスする。ヌクレオチド配列を I M G T / V - Q U E S T ( i m g t . o r g / I M G T \_ v q u e s t / v q u e s t ? l i v r e t = 0 & O p t i o n = h u m a n T c R ) 、 I g B l a s t ( n c b i . n l m . n i h . g o v / i g b l a s t / i g b l a s t . c g i ? C M D = W e b & S E A R C H \_ T Y P E = T C R & L I N K \_ L O C = i g t a b ) に入力し、E x p a s y ( w e b . e x p a s y . o r g / t r a n s l a t e / ) によって翻訳する。可変ファミリーを決定し、C D R 3 及び翻訳された配列からの接合点（J 又は D J）に融合させる。可変配列をマウス定常配列に融合させ、再構成された T C R アルファ及び T C R ベータをプリン - 柔軟性 - P 2 A ( R A K R - S G S G - A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P ) （配列番号 2 6）によって連結させる。次いで、配列から DNA をデノボ合成し、発現ベクター（ガンマーレトロウイルス又は S L E E P I N G B E A U T Y ( S B ) トランスポゾン ( U n i v e r s i t y o f M i n n e s o t a , M i n n e a p o l i s , M N ) ）にクローニングする。次いで、標準的なウイルス形質導入又は非ウイルス転移のプロトコルを使用して T 細胞に T C R を発現させ、マウス化 T C R を発現している T 細胞（マウス T C R ベータ定常鎖によって検出）を推定ペプチドに対して試験する。

#### 【0224】

無関係の変異、W T p 5 3 配列、又は p 5 3 - R 2 4 8 W を含む変異型 p 5 3 配列をコードしている T M G を自己 A P C にトランスフェクトした。培地のみ並びに P M A 及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。患者 4 2 7 3 由来の T I L （断片培養物 8 及び 1 5）を、T M G をトランスフェクトした A P C と 3 7 ° C で一晩共培養した。リンパ球→生細胞（P I 陰性）→C D 3 + （T 細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 5 6 に示す。

#### 【0225】

W T 又は変異型の p 5 3 - R 2 4 8 W ネオエピトープに対応する 2 5 アミノ酸ペプチドを自己 A P C に 3 7 ° C で 2 時間パルスした。p 5 3 - R 2 4 8 W に対して特異性を有する患者 4 2 7 3 由来の T I L （断片培養物 1 5）を、ペプチドをパルスした A P C と 3 7 ° C で一晩共培養した。D M S O がペプチドビヒクルであった。リンパ球→生細胞（P I 陰性）→C D 3 + （T 細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 5 7 に示す。

#### 【0226】

1 4 アミノ酸が重複している p 5 3 - R 2 4 8 W ネオエピトープ由来の 1 5 アミノ酸ペプチドを自己 A P C にパルスした。p 5 3 - R 2 4 8 W に対して特異性を有する患者 4 2 7 3 由来の T I L （断片培養物 1 5）を、ペプチドをパルスした A P C と 3 7 ° C で一晩共培養した。D M S O がペプチドビヒクルであり、培地のみ（T 細胞のみ）並びに P M A 及びイオノマイシンが対照であった。2 5 アミノ酸ペプチド（w t p 5 3 - R 2 4 8 及び変異型 p 5 3 - R 2 4 8 W）が、1 5 アミノ酸ペプチドに対する更なる対照であった。リンパ球→生細胞（P I 陰性）→C D 3 + （T 細胞）→C D 4 + C D 8 - にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 5 8 に示す。

#### 【0227】

C o s 7 細胞（ $2.5 \times 10^4$  個／ウェル）を、平底 9 6 ウェルプレートのウェルにプレートングした。次の日、それぞれ p 5 3 - R 2 4 8 W ネオ抗原の有り無しで、患者 4 2 7 3 由来の個々の H L A アリルと野生型又は変異型のいずれかの T P 5 3 T M G とを

細胞にコトランスフェクトした。次の日、患者4273由来のp53-R248Wに対して特異性を有するTIL（断片培養物15）を、トランスフェクトされたCos7細胞と37℃で一晩共培養した。ELISAによってIFN-γの分泌を評価した。結果を図59に示す。

#### 【0228】

モック（TCR無し）又は4273-TCR1a2を発現しているT細胞を、ペプチドビヒクル（DMSO）、又は野生型p53-R248配列若しくは変異型p53-R248W配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。培地のみ、並びにPMA及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTによってIFN-γの分泌を評価した。結果を図60に示す。

#### 【0229】

患者4273から単離されたTCR4273-TP53-R248W-TCR1a1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号437）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号438）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号439）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号440）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号441）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号442）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号443）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号444）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号445）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号446）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

TCRの名称：4273-TP53-R248W-TCR1a1

p53変異の認識：R248W

方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

#### 【0230】

##### 【化21】

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVTLCGGYNKLIFGAGTRLAVHPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVIVLRILLKVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHNQVLCVVLCCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCENLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIYGVSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRDYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKN（配列番号563）

#### 【0231】

患者4273から単離されたTCR4273-TP53-R248W-TCR1a2の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号447）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号448）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号449）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号450）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号451）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号452）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベ

ータ鎖定常領域（配列番号 25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 453）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 454）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 455）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 456）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

TCRの名称：4273-TP53-R248W-TCR1a2

p53変異の認識：R248W

方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

【0232】

【化22】

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCAVTLSSGGYNKLIFGAGTRLAVHPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS~~SG~~GATNFSLLKQAGDVEENPGPMHNQVLCVVLCCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCENLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIVEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRDYEQYFPGPTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSA~~T~~FWHNPRNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~T~~QNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS（配列番号 564）

【0233】

患者 4273 の TCR についての統計値を以下の表 19 に記載する。表 19 中、変異型 p53 タンパク質（TMG 又はペプチド）と共培養した後、全 96 ウェルを 41BB+T 細胞でソートした。80.2% の対合頻度で、77 ウェルが増殖性対（productive pairs）を有していた（すなわち、（1）配列を有し、（2）該配列中に終止コドンをも有していなかった）。これら対のうち 43 が、4273-TP53-R248W-TCR1a1 を作製するための CDR3A / CDR3B の組み合わせであった（増殖性対の 55.8%）。これら対のうち 30 が、4273-TP53-R248W-TCR1a2 を作製するための CDR3A / CDR3B の組み合わせであった（増殖性対の 39%）。まとめると、4273-TP53-R248W-TCR1a1 の CDR3A 及び CDR3B は、96 ウェルのうち、それぞれ 50 回及び 83 回みられた。まとめると、4273-TP53-R248W-TCR1a2 の CDR3A 及び CDR3B は、96 ウェルのうち、それぞれ 33 回及び 83 回みられた。

【0234】

【表 23】

表 19

| TCRの名称             | 4273-TP53-R248W-TCR1a1      | 4273-TP53-R248W-TCR1a2        |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| CDR3a              | CAVTLGGYNKLIF<br>（配列番号 439） | CAVTLSSGGYNKLIF<br>（配列番号 449） |
| CDR3b              | CASSSRDYEQYF<br>（配列番号 442）  | CASSSRDYEQYF<br>（配列番号 452）    |
| 全ウェル               | 96                          |                               |
| 全CDR3a/CDR3b対      | 77                          |                               |
| 対合%                | 80.21%                      |                               |
| CDR3aの回数           | 50                          | 33                            |
| CDR3bの回数           | 83                          | 83                            |
| 対合したCDR3a/CDR3b    | 43                          | 30                            |
| 対合したCDR3a/CDR3b対の% | 55.84%                      | 38.96%                        |

【0235】

実施例 6

この実施例は、患者4149における抗変異型p53 T細胞の同定を示す。また、この実施例は、患者4149からの1つの抗変異型p53 TCRの単離及び特異的反応性を示す。

#### 【0236】

患者4149について、図21～24に記載の通り実験を実施した。T r a n法を使用してTCRを見出した。次いで、TCRを使用して、「p53ホットスポット変異ユニバーサルスクリーニング」法を検証した。

#### 【0237】

TCR(4149-TCRa2b1又は4149-TCRa2b2)を患者4149由来の自己PBLに転移させ、(1)無関係、WT p53、若しくは変異型p53の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした、あるいは(2)ペプチドビヒクル(DMSO)、又はWT p53-Y220配列若しくは変異型p53-Y220C配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。PMA及びイオノマイシンの組み合わせがポジティブコントロールであった。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッセイを使用してIFN-γの分泌を評価した。結果を図21に示す。リンパ球→生細胞(PI陰性)→CD3+(T細胞)→CD4+mTCR+(TCR転移T細胞)にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図22に示す。

#### 【0238】

TCRADディープシーケンシング及びTCRBディープシーケンシングによってCD4+4-1BB+細胞の百分率も求めた。結果を表Eに示す。

#### 【0239】

#### 【表24】

表E

| TCRの名称        | TCRADディープシーケンシングによるCD4+41BB+の% | TCRBディープシーケンシングによるCD4+41BB+の% |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 4149-TCR-a2b1 | 20%                            | 66%                           |
| 4149-TCR-a2b2 | 20%                            | 18%                           |

#### 【0240】

4149-F11によって認識される推定p53 Y220C最小エпитオプのマッピング：自己DCにペプチドをパルスし(10 μg/mL)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)及びIL-4中で一晩静置した。500 CU/mL IL-2中で2～3日間TILを静置した。2×10<sup>4</sup>個のTIL及び10<sup>5</sup>個の標的細胞を37℃で一晩共培養した。ELISPOTによってIFN-γを測定した。結果を表Fに示す。リンパ球\PI(陰性)CD3+\CD3+CD4+にゲートをかけたFACSによって4-1BB発現を測定した。結果を図23に示す。

#### 【0241】

10

20

30

40

50

## 【表 2 5】

表 F

| ペプチド番号 | ELISPOTの結果<br>IFN- $\gamma$ 生成について陽性 (+) 又は陰性 (-) | ペプチド                     | 配列番号 |
|--------|---------------------------------------------------|--------------------------|------|
| 0      | —                                                 | ビヒクル                     | 該当なし |
| 1      | +                                                 | DRNTRHSVVVP <u>C</u> EP  | 508  |
| 2      | +                                                 | RNTRHSVVVP <u>C</u> EPP  | 509  |
| 3      | +                                                 | NTFRHSVVVP <u>C</u> EPPE | 510  |
| 4      | +                                                 | TFRHSVVVP <u>C</u> EPPEV | 511  |
| 5      | +(弱)                                              | FRHSVVVP <u>C</u> EPPEVG | 512  |
| 6      | —                                                 | RHSVVVP <u>C</u> EPPEVGS | 513  |
| 7      | —                                                 | HSVVVP <u>C</u> EPPEVGSD | 514  |
| 8      | —                                                 | SVVVP <u>C</u> EPPEVGSDC | 515  |
| 9      | —                                                 | VVVP <u>C</u> EPPEVGSDCT | 516  |
| 10     | —                                                 | VVP <u>C</u> EPPEVGSDCTT | 517  |
| 11     | —                                                 | VP <u>C</u> EPPEVGSDCTTI | 518  |

10

## 【0 2 4 2】

Cos7細胞(2.5×10<sup>4</sup>個/ウェル)を、平底96ウェルプレートのウェルにプレートングした。20時間後、TMGの有り無しで、細胞に個々のHLAアリルをコトランスフェクトした。20時間後、並行して自己DC細胞にTMGをトランスフェクトした。全てのHLAクラスIIアリルを、TMGの有り無しで1セットのウェルにコトランスフェクトした。TMGをトランスフェクトしていない細胞に、10μg/mLのp53-Y220C 15-merペプチドを37℃で2~3時間パルスした。洗浄後、2回目のREPの14日目の4149-TCRa2b2が転移したT細胞(10<sup>5</sup>個)をウェルに添加し、37℃で一晩共培養した。ELISAによってIFN- $\gamma$ 分泌を測定した。結果を図24に示す。NetMHCIIpan: cbs. dtu. dk / services / NetMHCIIpan / による予測(表G)。

20

## 【0 2 4 3】

## 【表 2 6】

表 G

| HLA        | ペプチド                                     | 親和性 (nM) | ランク |
|------------|------------------------------------------|----------|-----|
| DRB3*02:02 | NTFRHSVVVP <u>C</u> EPPE<br>(配列番号 5 1 0) | 433.8    | 17  |

30

## 【0 2 4 4】

NCI HLAデータベースではDRB型患者3719人のうちの1367人(37%)、そして、NCI-SBでは子宮内膜及び卵巣のがん患者9人のうちの5人(56%)でDRB3\*02発現が検出された。報告されているDRB3\*02アリルの頻度は、実施例1に記載の通り非常に高い。

40

## 【0 2 4 5】

患者4149から単離されたTCR4149TCRa2b2の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ(配列番号57)であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ(配列番号58)であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ(配列番号59)であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ(配列番号60)であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ(配列番号61)であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ(配列番号62)である。太字領域は、リンカー(配列番号26)である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域(配列

50

番号 23) であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域 (配列番号 25) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号 63) は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号 64) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号 65) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号 66) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0246】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。米国特許出願公開第 2017/0224800 号に記載の T r a n スクリーニング法によって、この患者の p53 反応性細胞を同定した。

T C R の名称：4149 T C R a 2 b 2

p53 変異の認識：Y220C

スクリーニング方法：p53 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニングを検証するために使用

T C R を同定するための共培養：4149-F11 T I L 断片と p53-Y220C ロングペプチドとを共培養、C D 4 + 41 B B + T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：対合頻度。C D 4 + 41 B B + でソートした T 細胞を R E P (迅速拡大プロトコル) で拡大し、得られた T 細胞培養物を、A d a p t i v e B i o t e c h n o l o g i e s による T C R A D (アルファ) 及び T C R B (ベータ) ディープシーケンシングに供した。合計 4 つの T C R のマトリクスにおいて上 2 つの T C R アルファが上 2 つの T C R ベータと対合した。2 番目の T C R アルファ及び 2 番目の T C R ベータは、反応性 T C R であり、従って、T C R a 2 b 2 と命名された。

全ての T C R のうちの T C R の存在量：以下の通り

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0247】

#### 【化23】

MASAPISMLAMLF TSLGLRAQSVAQPEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWYVQYPNRLQFLLKYITGDNLVKGSY  
GFEAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFC AVRVDYKLSFGAGTTTVTRANIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFD  
SQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGATAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQ  
NLLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHNQVLCVVLCLFGANTVDGGITQ  
SPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQNPT  
AFYLCASSISAGGDGYTFGSGTRLTVV EDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGKEVH  
SGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPFRNHFRCVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV TQNISAEAWGRADCGITSAS  
YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKN S (配列番号 565)

#### 【0248】

患者 4149 の T C R 4149 T C R a 2 b 2 についての統計値を以下の表 20 に記載する。

#### 【0249】

#### 【表27】

表 20

| CDR3                            | 固有の増殖性 CDR 3 のランク | CDR3 のカウント               | CDR3 の頻度 |
|---------------------------------|-------------------|--------------------------|----------|
| アルファ：CAVRVDYKLSF<br>(配列番号 59)   | 4,308 のうち 2       | 3,309,400 のうち<br>648,707 | 19.6 %   |
| ベータ：CASSISAGGDGYTF<br>(配列番号 62) | 3,176 のうち 2       | 578,948 のうち<br>104,325   | 18.0 %   |

10

20

30

40

50

## 【0250】

## 実施例7

この実施例は、自己T細胞内で変異型p53を発現するように誘導された自己APCを共培養することによって、患者4213における抗変異型p53T細胞の同定を示す（「p53ホットスポット変異ユニバーサルスクリーニング」）。また、この実施例は、患者4213からの12の抗変異型p53TCRの単離を示す。

## 【0251】

患者4213について、図25～26に記載の通り実験を実施した。

## 【0252】

患者4213由来のTIL断片（F2及びF24）を、ペプチドビヒクル（DMSO）、又は変異型p53-R248Q配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図25に示す。CD8+4-1BB+T細胞を96ウェルプレートのウェルにソートした。単一細胞RT-PCRを使用してTCRを同定した。

## 【0253】

CD4+T細胞は、患者4213の末梢血リンパ球に由来していた。CD4+T細胞培養物を、ペプチドビヒクル（DMSO）、又は変異型p53-R248Q配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTによってIFN-γの分泌を評価した。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図26に示す。CD4+4-1BB+T細胞を96ウェルプレートのウェルにソートした。単一細胞RT-PCRを使用してTCRを同定した。

## 【0254】

患者4213から単離された4213-F2-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号317）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号318）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号319）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号320）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号321）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号322）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号323）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号324）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号325）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号326）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

## 【0255】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4213-F2-TCR1

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：4213-F2とR248Qロングペプチドとを共培養、CD8+4-1BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：8.3%（24対のうち2回観察）

10

20

30

40

50

TCRの配向：アルファベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

【0256】

【化24】

MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIK  
 DKNEGDGRFTVFLNKSASHLHLHIVPSQPGDSAVYFCAANTGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCL  
 FTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDM  
 NLNFQVLLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTE  
 AGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQP  
 AKLEDSAVYLCASSHLAGEFYNEQFFGPGTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW  
 WVNKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRA  
 DCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKNS (配列番号566)

10

【0257】

患者4213のTCR4213-F2-TCR1についての統計値を以下の表21に記載する。

【0258】

【表28】

表21

| パラメータ         | 数  | 頻度    |
|---------------|----|-------|
| 全ウエル          | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ      | 3  | 3.1%  |
| CDR3ベータ       | 8  | 8.3%  |
| 4213-F2-TCR1対 | 2  | 2.1%  |
| 全対合TCR        | 24 | 25.0% |

20

【0259】

患者4213から単離された4213-F2-TCR2の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ (配列番号327) であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ (配列番号328) であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ (配列番号329) であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ (配列番号330) であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ (配列番号331) であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ (配列番号332) である。太字領域は、リンカー (配列番号26) である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域 (配列番号23) であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域 (配列番号25) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号333) は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号334) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号335) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号336) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

30

40

【0260】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4213-F2-TCR2

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：4213-F2とR248Qロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単細胞RT-PCR

50

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：1 2 . 5 %（2 4 対のうち 3 回観察）

T C R の配向：アルファーベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

【0 2 6 1】

【化 2 5】

MAGAFLLYVSMKMGGTAGQSLEQPSEVTAVEGAIVQINCTYQTSIFYGLSWYQQHGGAPTFLSYNALDGLEETGRFSSF  
LSRSDSYGYLLQLQMKDSASYFCAFAYGQNFVFGPGTRLSVLPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCFTDFDSQINVP  
KTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNLVIV  
LRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHFRLLCCVAFCLLGAGPVDGVTQTPKHLI  
TATGQRVTLRCSRGDLSVYVYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDALYFCA  
SSPLGDSGNTIYFGECSWLTVVEDLRNVTTPKVSLEFESKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCT  
DPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGV  
LSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNV（配列番号 5 6 7）

10

【0 2 6 2】

患者 4 2 1 3 の T C R 4 2 1 3 - F 2 - T C R 2 についての統計値を以下の表 2 2 に記載する。

【0 2 6 3】

【表 2 9】

表 2 2

| パラメータ         | 数  | 頻度    |
|---------------|----|-------|
| 全ウエル          | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ      | 4  | 4.2%  |
| CDR3ベータ       | 4  | 4.2%  |
| 4213-F2-TCR2対 | 3  | 3.1%  |
| 全対合TCR        | 24 | 25.0% |

20

【0 2 6 4】

患者 4 2 1 3 から単離された 4 2 1 3 - F 2 - T C R 3 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 3 3 7）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 3 3 8）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 3 3 9）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 3 4 0）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 3 4 1）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 3 4 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 3 4 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 3 4 4）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 3 4 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 3 4 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

30

【0 2 6 5】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 1 3 - F 2 - T C R 3

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4 2 1 3 - F 2 と R 2 4 8 Q ロングペプチドとを共培養、C D 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

40

50

T C Rを同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C Rのうちの T C Rの存在量：70.8% (24対のうち17回観察)

T C Rの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S Bトランスポゾン

【0266】

【化26】

MATLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGR  
LRVLTDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATDAWNNDMRFAGAGRLTVKPNIQNPEPAVYQLKDP RSQDSTLCLFTDFDS  
QINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQN  
LLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSRAKRS GSGATNFSLKQAGDVEENPGPMHIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQT  
PKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHNSMYWYRQDPGMGLRLIYYSASEGTTDKGEVPNGYNVSRLNKREFSLRLESAAPSQTS  
VYFCASSESQGNTEAFGGQGTRLTVV EDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHS  
GVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV SATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV TQNISAEAWGRADCGITSASY  
QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS (配列番号568)

10

【0267】

患者4213の T C R 4 2 1 3 - F 2 - T C R 3 についての統計値を以下の表23に記載する。

【0268】

【表30】

20

表23

| パラメータ         | 数  | 頻度    |
|---------------|----|-------|
| 全ウエル          | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ      | 19 | 19.8% |
| CDR3ベータ       | 42 | 43.8% |
| 4213-F2-TCR3対 | 17 | 17.7% |
| 全対合TCR        | 24 | 25.0% |

【0269】

患者4213から単離された4213-F24-TCRa1の配列を以下に記載する。  
アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号347）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号348）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号349）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号350）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号351）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号352）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号353）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号354）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号355）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号356）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

30

40

【0270】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。T C Rを単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C Rの名称：4213-F24-TCRa1

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C Rを同定するための共培養：4213-F24とR248Qロングペプチドとを共培

50

養、C D 8 + 4 1 B B + T細胞をソート

T C Rを同定するための方法：単一細胞R T - P C R

全ての対合T C RのうちのT C Rの存在量：1 5 . 9 %（4 4 対のうち7 回観察）

T C Rの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

【0 2 7 1】

【化 2 7】

MAKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSSENTKSN  
GRYTATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVSSYKIIFGTGTRLHVFPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDS  
QINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATALTEKSFETDMNLNFQN  
LLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLFWVAFCLLGAYHTGAGVSQS  
PSNKVTEKGKDVELRCDPISGHTALYWYRQLGQGLEFLIYFQGNAPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLTIQRTQQEDS  
AVYLCASSPIQGENSPLHFGNGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEV  
HSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRLHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVNISAIAWGRADCGITSA  
SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKNS（配列番号5 6 9）

10

【0 2 7 2】

患者4 2 1 3のT C R 4 2 1 3 - F 2 4 - T C R a 1についての統計値を以下の表2 4  
に記載する。

【0 2 7 3】

20

【表 3 1】

表 2 4

| パラメータ           | 数  | 頻度     |
|-----------------|----|--------|
| 全ウエル            | 96 | 100%   |
| CDR3アルファ        | 7  | 7. 3%  |
| CDR3ベータ         | 80 | 83. 3% |
| 4213-F24-TCRa1対 | 7  | 7. 3%  |
| 全対合TCR          | 44 | 45. 8% |

【0 2 7 4】

30

患者4 2 1 3から単離された4 2 1 3 - F 2 4 - T C R a 2の配列を以下に記載する。  
アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域はC D R 1 アルファ（配列番号3 5 7）であり、  
2 番目の下線領域はC D R 2 アルファ（配列番号3 5 8）であり、3 番目の下線領域は  
C D R 3 アルファ（配列番号3 5 9）であり、4 番目の下線領域はC D R 1 ベータ（配列  
番号3 6 0）であり、5 番目の下線領域はC D R 2 ベータ（配列番号3 6 1）であり、6  
番目の下線領域はC D R 3 ベータ（配列番号3 6 2）である。太字領域は、リンカー（配  
列番号2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定  
常領域（配列番号2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番  
号2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号3 6 3）は、アミノ末端から始まり、アル  
ファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号3 6 4  
）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完  
全長アルファ鎖（配列番号3 6 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に  
終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号3 6 6）は、リンカーの直後に始まり、カル  
ボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0 2 7 5】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。T C R  
を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C Rの名称：4 2 1 3 - F 2 4 - T C R a 2

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

50

TCRを同定するための共培養：4213-F24とR248Qロングペプチドとを共培養、CD8+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：84.1%（44対のうち37回観察）

TCRの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

【0276】

【化28】

MAKHLTTFVLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSN  
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSSYKLIFGTGTRLQVFPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDS  
QINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATALTEKSFETDMNLFQNL  
LLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLFWVAFCLLGAYHTGAGVSQS  
PSNKVTEKGGDVELRCDPISGHTALYWYRQLGQGLEFLIYFQGSNAPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLTIQRTQQEDS  
AVYLCASSPIQGENSPLHFFGNGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEV  
HSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSA  
SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKNS（配列番号570）

10

【0277】

患者4213のTCR4213-F24-TCRa2についての統計値を以下の表25に記載する。

20

【0278】

【表32】

表25

| パラメータ           | 数  | 頻度    |
|-----------------|----|-------|
| 全ウエル            | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ        | 39 | 40.6% |
| CDR3ベータ         | 80 | 83.3% |
| 4213-F24-TCRa2対 | 37 | 38.5% |
| 全対合TCR          | 44 | 45.8% |

30

【0279】

患者4213から単離された4213-PBL-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号367）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号368）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号369）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号370）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号371）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号372）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号373）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号374）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号375）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号376）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0280】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4213-PBL-TCR1

p53変異の認識：R248Q

50

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング  
T C Rを同定するための共培養：R 2 4 8 Qロングペプチドによるインビトロ感作後のC  
D 4 +メモリT細胞を、R 2 4 8 Qロングペプチドと共培養し、C D 4 + 4 1 B B + T細胞  
をソートした。

T C Rを同定するための方法：単一細胞R T - P C R

全ての対合T C RのうちのT C Rの存在量：9 . 5 % ( 6 3 対のうち6 回観察)

T C Rの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S Bトランスポゾン ( U n i v e r s i t y o f M i n n e s o t a ,  
M i n n e a p o l i s , M N )

【0 2 8 1】

【化 2 9】

MALLLVPAFQVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVPVFEEAPVELRCNYSSSVYLFWYVQYPNQGLQLLLKYLSGSTLVESIN  
GFEAEFNKSQTSFHLRKPSVHISDTAEYFC~~CAVSKGTGAQKL~~VFGQGTRLTINP~~NIQNP~~EPAYQLKDP~~SR~~QDSTLCLFTD  
FDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP~~CD~~ATL~~TEK~~SFETDMNLN  
FQNLLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS~~GS~~GATNFSLLKQAGDVEENPGPMHNQVLCVLCFLGANTVDGGI  
TQSPKYLFRKEGQNVTLSC~~EQNL~~NHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLIVTSAQKN  
PTASYLCASEAFFGQGTRLT~~VV~~EDLRNVTPPKVSLFEP~~SKAE~~IANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVCT  
DPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCVQFHGLSEEDKWPEGSPKPTQ~~NISAE~~AWGRADCGITSASYQQGV  
LSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS (配列番号 5 7 1)

10

20

【0 2 8 2】

患者 4 2 1 3 の T C R 4 2 1 3 - P B L - T C R 1 についての統計値を以下の表 2 6 に  
記載する。

【0 2 8 3】

【表 3 3】

表 2 6

| パラメータ          | 数   | 頻度     |
|----------------|-----|--------|
| 全ウェル           | 192 | 100%   |
| CDR3アルファ       | 9   | 4. 7%  |
| CDR3ベータ        | 6   | 3. 1%  |
| 4213-PBL-TCR1対 | 6   | 3. 1%  |
| 全対合TCR         | 63  | 32. 8% |

30

【0 2 8 4】

患者 4 2 1 3 から単離された 4 2 1 3 - P B L - T C R 2 の配列を以下に記載する。ア  
ミノ末端から始めて、1 番目の下線領域はC D R 1 アルファ (配列番号 3 7 7) であり、  
2 番目の下線領域はC D R 2 アルファ (配列番号 3 7 8) であり、3 番目の下線領域はC  
D R 3 アルファ (配列番号 3 7 9) であり、4 番目の下線領域はC D R 1 ベータ (配列番  
号 3 8 0) であり、5 番目の下線領域はC D R 2 ベータ (配列番号 3 8 1) であり、6 番  
目の下線領域はC D R 3 ベータ (配列番号 3 8 2) である。太字領域は、リンカー (配列  
番号 2 6) である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常  
領域 (配列番号 2 3) であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域 (配列番号  
2 5) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号 3 8 3) は、アミノ末端から始まり、アル  
ファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号 3 8 4)  
は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全  
長アルファ鎖 (配列番号 3 8 5) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終  
わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号 3 8 6) は、リンカーの直後に始まり、カル  
ボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0 2 8 5】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。T C R

50

を単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4213-PBL-TCR2

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：R248Qロングペプチドによるインビトロ感作後のCD4+メモリT細胞を、R248Qロングペプチドと共培養し、CD4+41BB+T細胞をソートした。

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：7.9%（63対のうち5回観察）

TCRの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

【0286】

【化30】

MALVTSITVLLSLGIMGDAKTTQPNMESNEEPPVHLPCNHSTISGTDYIHWRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNNRMASLA  
IAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILASGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQI  
NVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATALTEKSFETDMNLNFQNL  
VIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHCRLLCCVVFCLLQAGPLDTAVSQTPK  
YLVTQMGNDSIKCEQNLGHDTMYWYKQDSKKFLKIMFSYNNKELIINETVPNRFSKSPDKAHLNLHINSLELGDSAVY  
FCASRTIGYNTEAFFGGQTRLTVVEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGV  
CTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPTQNISAEAWGRADCGITSASYQQ  
GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS（配列番号572）

【0287】

患者4213のTCR4213-PBL-TCR2についての統計値を以下の表27に記載する。

【0288】

【表34】

表27

| パラメータ          | 数   | 頻度    |
|----------------|-----|-------|
| 全ウェル           | 192 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 8   | 4.2%  |
| CDR3ベータ        | 8   | 4.2%  |
| 4213-PBL-TCR2対 | 5   | 2.6%  |
| 全対合TCR         | 63  | 32.8% |

【0289】

患者4213から単離された4213-PBL-TCR3の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号387）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号388）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号389）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号390）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号391）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号392）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号393）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号394）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号395）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号396）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

## 【0290】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4213-PBL-TCR3

p53変異の認識：R248Q

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：R248Qロングペプチドによるインビトロ感作後のCD4+メモリT細胞を、R248Qロングペプチドと共培養し、CD4+41BB+T細胞をソートした。

TCRを同定するための方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：6.3%（63対のうち4回観察）

TCRの配向：アルファベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

## 【0291】

## 【化31】

MAKIRQFLAILWLQLSCVSAAKNEVEQSPQNLTAGEGEFITINCSYSVGISALHWLQQHPGGGIVSLFMLS~~SGKKKHGR~~  
 LIATINIQEKHSSLHITASHPRDSAVYICAALSYNTDKLIFGTGTRLQVFPNIQNP~~EP~~AVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFD  
 SQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSN~~GA~~IAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCD~~ATL~~TEKSFETDMNLFQ  
 NLLVIVLRILLK~~VAGFNLL~~MTLRLWSSRAKRS~~GS~~GATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGADHTGAGVSQ  
 TPSNKVTEKGYVELRCDPISGHTALYWYRQSLGQGPFLIYFQGTGAADDSGLPNDRFFAVRPEGSVSTLKIQRTERGD  
 SAVYLCASSLSGLLQETQYFGPGTRLLVLEDLRNVTPPKVSLFEP~~SKAE~~IANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGKE  
 VHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP~~R~~NHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQ~~NISAEAWGRADCGITS  
 ASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMV~~K~~RKNS（配列番号573）

## 【0292】

患者4213のTCR4213-PBL-TCR3についての統計値を以下の表28に記載する。

## 【0293】

## 【表35】

表28

| パラメータ          | 数   | 頻度    |
|----------------|-----|-------|
| 全ウェル           | 192 | 100%  |
| CDR3アルファ       | 4   | 2.1%  |
| CDR3ベータ        | 7   | 3.6%  |
| 4213-PBL-TCR3対 | 4   | 2.1%  |
| 全対合TCR         | 63  | 32.8% |

## 【0294】

患者4213から単離した4213-PBL-TCR4a1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号397）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号398）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号399）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号400）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号401）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号402）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号403）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号404）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号405）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に

終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 4 0 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【 0 2 9 5 】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 1

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：R 2 4 8 Q ロングペプチドによるインビトロ感作後の C D 4 + メモリ T 細胞を、R 2 4 8 Q ロングペプチドと共培養し、C D 4 + 4 1 B B + T 細胞をソートした。

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：3 . 2 % （ 6 3 対のうち 2 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【 0 2 9 6 】

#### 【 化 3 2 】

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYTATGYPSLFWYVQYPGEGQLLLLKATKADDKGSNKG  
FEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSHTGSSNTGKLIFGQGTRLQVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAG  
VAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPIISGHATLYWYQQILGQGPKLIIQFNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAK  
LEDSAVYLCASSTGGGRHQPHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWN  
GKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPРНHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCG  
ITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS（配列番号 5 7 4）

#### 【 0 2 9 7 】

患者 4 2 1 3 の T C R 4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 1 についての統計値を以下の表 2 9 に記載する。

#### 【 0 2 9 8 】

#### 【 表 3 6 】

表 2 9

| パラメータ            | 数   | 頻度     |
|------------------|-----|--------|
| 全ウエル             | 192 | 100%   |
| CDR3 アルファ        | 2   | 1. 0%  |
| CDR3 ベータ         | 36  | 18. 8% |
| 4213-PBL-TCR4a1対 | 2   | 1. 0%  |
| 全対合TCR           | 63  | 32. 8% |

#### 【 0 2 9 9 】

患者 4 2 1 3 から単離した 4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 2 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 4 0 7）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 4 0 8）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 4 0 9）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 4 1 0）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 4 1 1）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 4 1 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 4 1 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 4 1 4

）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 4 1 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 4 1 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0300】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 2

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：R 2 4 8 Q ロングペプチドによるインビトロ感作後の C D 4 + メモリ T 細胞を、R 2 4 8 Q ロングペプチドと共培養し、C D 4 + 4 1 B B + T 細胞をソートした。

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：3. 2 % （6 3 対のうち 2 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0301】

#### 【化33】

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYTATGYPSLFWYVQYPGEGQLLLLKATKADDKGSNKG  
FEATYRKETTSFHFLEKGSVQVSDSAVYFCALSQTGSSKTGKLIFGQGTRLQVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVLVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAG  
VAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPI SGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNGGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAK  
LEDSAVYLCASSTGGGRHQPHFGDGTLSILEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWV  
GKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCG  
ITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMVMVKKRNS（配列番号 5 7 5）

#### 【0302】

患者 4 2 1 3 の T C R 4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 2 についての統計値を以下の表 3 0 に記載する。

#### 【0303】

#### 【表37】

表 3 0

| パラメータ            | 数   | 頻度    |
|------------------|-----|-------|
| 全ウエル             | 192 | 100%  |
| CDR3アルファ         | 2   | 1.0%  |
| CDR3ベータ          | 36  | 18.8% |
| 4213-PBL-TCR4a2対 | 2   | 1.0%  |
| 全対合TCR           | 63  | 32.8% |

#### 【0304】

患者 4 2 1 3 から単離した 4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 3 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 4 1 7）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 4 1 8）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 4 1 9）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 4 2 0）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 4 2 1）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 4 2 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番

号 2 5) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号 4 2 3) は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号 4 2 4) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号 4 2 5) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号 4 2 6) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0305】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称: 4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 3

p 5 3 変異の認識: R 2 4 8 Q

スクリーニング方法: p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養: R 2 4 8 Q ロングペプチドによるインビトロ感作後の C D 4 + メモリ T 細胞を、R 2 4 8 Q ロングペプチドと共培養し、C D 4 + 4 1 B B + T 細胞をソートした。

T C R を同定するための方法: 単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量: 4 . 8 % ( 6 3 対のうち 3 回観察)

T C R の配向: アルファ-ベータ

発現ベクター: S B トランスポゾン

#### 【0306】

#### 【化34】

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYTATGYPSLFWYVQYPGEGLQLLLKATKADDKGSNKG  
FEATYRKETTSFHFLEKGSVQVSDSAVYFCALSQTGSSNTGKLIFGQGTRLQVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVLVILRLILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAG  
VAQSPRYKII EKRSVAFWCNPI SGHATLYWYQILGQGPKLLIQFNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAK  
LEDSAVYLCASSTGGGRHQPHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWN  
GKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCG  
ITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS (配列番号 5 7 6)

#### 【0307】

患者 4 2 1 3 の T C R 4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 3 についての統計値を以下の表 3 1 に記載する。

#### 【0308】

#### 【表38】

表 3 1

| パラメータ            | 数   | 頻度    |
|------------------|-----|-------|
| 全ウエル             | 192 | 100%  |
| CDR3アルファ         | 4   | 2.1%  |
| CDR3ベータ          | 36  | 18.8% |
| 4213-PBL-TCR4a3対 | 3   | 1.6%  |
| 全対合TCR           | 63  | 32.8% |

#### 【0309】

患者 4 2 1 3 から単離した 4 2 1 3 - P B L - T C R 4 a 4 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ (配列番号 4 2 7) であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ (配列番号 4 2 8) であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ (配列番号 4 2 9) であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ (配列番号 4 3 0) であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ (配列番号 4 3 1) であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ (配列番号 4 3 2) である。太字領域は、リンカー (配

列番号 26) である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域 (配列番号 23) であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域 (配列番号 25) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号 433) は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号 434) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号 435) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号 436) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0310】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。TCR を単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCR の名称: 4213-PBL-TCR4a4

p53 変異の認識: R248Q

スクリーニング方法: p53 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCR を同定するための共培養: R248Q ロングペプチドによるインビトロ感作後の CD4+ メモリ T 細胞を、R248Q ロングペプチドと共培養し、CD4+ 41BB+ T 細胞をソートした。

TCR を同定するための方法: 単細胞 RT-PCR

全ての対合 TCR のうちの TCR の存在量: 3.2% (63 対のうち 2 回観察)

TCR の配向: アルファ-ベータ

発現ベクター: SB トランスポゾン

#### 【0311】

#### 【化35】

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYTATGYPSLFWYVQYPGEGQLQLLKATKADDKGSNKG  
FEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSTTGSSNTGKLIFGQGTTLQVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAG  
VAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLIIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAK  
LEDSAVYLCASSTGGGRHQPHFGDGTLSILEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVN  
GKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCG  
ITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMVMVKRKN (配列番号 577)

#### 【0312】

患者 4213 の TCR4213-PBL-TCR4a4 についての統計値を以下の表 32 に記載する。

#### 【0313】

#### 【表39】

表 32

| パラメータ            | 数   | 頻度    |
|------------------|-----|-------|
| 全ウエル             | 192 | 100%  |
| CDR3アルファ         | 2   | 1.0%  |
| CDR3ベータ          | 36  | 18.8% |
| 4213-PBL-TCR4a3対 | 2   | 1.0%  |
| 全対合TCR           | 63  | 32.8% |

#### 【0314】

#### 実施例 8

この実施例は、自己 T 細胞内で変異型 p53 を発現するように誘導された自己 APC を共培養することによる、患者 4268 における抗変異型 p53 T 細胞の同定を示す (「p53 ホットスポット変異ユニバーサルスクリーニング」)。また、この実施例は、患者 4

268からの5つの抗変異型p53TCRの単離も示す。

【0315】

患者4268について、図27～30に記載の通り実験を実施した。

【0316】

患者4268由来のTIL断片(F1～F24、n=24)を、無関係、WTp53、又は変異型p53の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッセイを使用してIFN-γの分泌を評価した。結果を図27に示す。

【0317】

患者4268由来のTIL断片(F1～F24、n=24)を、ペプチドビヒクル(DMSO)、又はWTp53-R248配列若しくは変異型p53-R248Q配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッセイを使用してIFN-γの分泌を評価した。結果を図28に示す。

【0318】

患者4268由来のTIL断片(F1～F24、n=24)を、ペプチドビヒクル(DMSO)、又はwt p53-R248配列若しくは変異型p53-R248Q配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。リンパ球→生細胞(PI陰性)→CD3+(T細胞)にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図29に示す。CD4+4-1BB+T細胞をソートした後のTCRの源は、TIL断片F18及びF19であった。

【0319】

患者4268由来のTIL断片(F1～F24、n=24)を、ペプチドビヒクル(DMSO)、又はWTp53-R248配列若しくは変異型p53-R248Q配列から構成された精製(HPLCによって>95%)された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。リンパ球→生細胞(PI陰性)→CD3+(T細胞)にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図30に示す。CD8+4-1BB+T細胞をソートした後のTCRの源は、TIL断片F7、F8、及びF15であった。

【0320】

患者4268から単離された4268-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ(配列番号137)であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ(配列番号138)であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ(配列番号139)であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ(配列番号140)であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ(配列番号141)であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ(配列番号142)である。太字領域は、リンカー(配列番号26)である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域(配列番号23)であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域(配列番号25)である。アルファ鎖可変領域(配列番号143)は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域(配列番号144)は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖(配列番号145)は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖(配列番号146)は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

【0321】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4268-TCR1

p53変異の認識：R248Q

10

20

30

40

50

方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C Rを同定するための共培養：4 2 6 8－F 7及び4 2 6 8－F 8とp 5 3－R 2 4 8

Qロングペプチドとを共培養、C D 8＋4 1 B B＋T細胞をソート

T C Rを同定する方法：単一細胞R T－P C R

全ての対合T C RのうちのT C Rの存在量：7 8．7 %（6 1対のうち4 8回観察）

T C Rの配向：アルファ－ベータ

発現ベクター：S Bトランスポゾン

【0 3 2 2】

【化3 6】

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDG  
RFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLC~~AVSWYSTLT~~TFGKGTMLLVSPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDS  
QINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMD~~SKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATL~~TEKSFETDMNLNFQN  
LLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLFFYVALCLLWAGHRDAGITQS  
PRYKITETGRQVTLMCHQT~~WSHSY~~MFWYRQDLGHLRLIYYSAAADITDKGEVPDGYVVSRSKTENFPLTLESATRSQTS  
VYFCASSGSRDTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSG  
VCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPTQNISAEAWGRADCGITSASYQ  
QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKN（配列番号5 7 8）

10

【0 3 2 3】

患者4 2 6 8のT C R 4 2 6 8－T C R 1についての統計値を以下の表3 3に記載する。

20

【0 3 2 4】

【表4 0】

表3 3

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウエル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 54 | 56.3% |
| CDR3ベータ    | 71 | 74.0% |
| 4268-TCR1対 | 48 | 50.0% |
| 全対合TCR     | 61 | 63.5% |

30

【0 3 2 5】

患者4 2 6 8から単離された4 2 6 8－T C R 2の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はC D R 1アルファ（配列番号1 4 7）であり、2番目の下線領域はC D R 2アルファ（配列番号1 4 8）であり、3番目の下線領域はC D R 3アルファ（配列番号1 4 9）であり、4番目の下線領域はC D R 1ベータ（配列番号1 5 0）であり、5番目の下線領域はC D R 2ベータ（配列番号1 5 1）であり、6番目の下線領域はC D R 3ベータ（配列番号1 5 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号2 6）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号2 3）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号1 5 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号1 5 4）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号1 5 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号1 5 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0 3 2 6】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。T C Rを単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C Rの名称：4 2 6 8－T C R 2

p 5 3変異の認識：R 2 4 8 Q

50

方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C Rを同定するための共培養：4 2 6 8－F 7及び4 2 6 8－F 8とp 5 3－R 2 4 8

Qロングペプチドとを共培養、C D 8＋4 1 B B＋T細胞をソート

T C Rを同定する方法：単一細胞R T－P C R

全ての対合T C RのうちのT C Rの存在量：6．6％（6 1対のうち4回観察）

T C Rの配向：アルファ－ベータ

発現ベクター：S Bトランスポゾン

【0 3 2 7】

【化3 7】

MALKFSVSILWILQAWVSTQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLLVTYVTGGEVKKLKRLT  
FQFGDARKDSSLHITAAQPGDTGLYLCLAGEFAGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCFLTDFDSQI  
NVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDALTTEKSFETDMNLNFQNL  
VIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHCRLLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPK  
HLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQAKKPELPMFYVSYEKLISINESVPSRFSPECNSSLNLHLHALQPEDSALY  
LCASSQVGLTYEQYFPGPTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGV  
CTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCGITSASYQQ  
GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS（配列番号5 7 9）

10

【0 3 2 8】

患者4 2 6 8のT C R 4 2 6 8－T C R 2についての統計値を以下の表3 4に記載する。

20

【0 3 2 9】

【表4 1】

表3 4

| パラメータ      | 数  | 頻度     |
|------------|----|--------|
| 全ウエル       | 96 | 100%   |
| CDR3アルファ   | 6  | 6. 3%  |
| CDR3ベータ    | 4  | 4. 2%  |
| 4268-TCR2対 | 4  | 4. 2%  |
| 全対合TCR     | 61 | 63. 5% |

30

【0 3 3 0】

患者4 2 6 8から単離された4 2 6 8－T C R 3の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はC D R 1アルファ（配列番号1 5 7）であり、2番目の下線領域はC D R 2アルファ（配列番号1 5 8）であり、3番目の下線領域はC D R 3アルファ（配列番号1 5 9）であり、4番目の下線領域はC D R 1ベータ（配列番号1 6 0）であり、5番目の下線領域はC D R 2ベータ（配列番号1 6 1）であり、6番目の下線領域はC D R 3ベータ（配列番号1 6 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号2 6）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号2 3）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号1 6 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号1 6 4）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号1 6 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号1 6 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0 3 3 1】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。T C Rを単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C Rの名称：4 2 6 8－T C R 3

p 5 3変異の認識：R 2 4 8 Q

50

方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：4 2 6 8 - F 1 5 と p 5 3 - R 2 4 8 Q ロングペプチドとを共培養、CD 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

TCRを同定する方法：単一細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：8 8 . 6 % ( 3 5 対のうち3 1 回観察)

TCRの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

【0 3 3 2】

【化3 8】

MASAPISMLAMLFITLSGLRAQSVAPEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWYVQYPNRLQFLLKYITGDNLVKGSY  
GFEAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFCAVRDNSGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLF  
TDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDALTTEKSFETDMN  
LNFQVLLVIVLRILLKVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEA  
GVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPI SGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPA  
KLEDSAVYLCASSLGQGTQYFGPGTRLLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNG  
KEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVNFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVNISAEAWGRADCGI  
TSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKN (配列番号5 8 0)

10

【0 3 3 3】

患者4 2 6 8 のTCR 4 2 6 8 - TCR 3 についての統計値を以下の表3 5 に記載する。

20

【0 3 3 4】

【表4 2】

表3 5

| パラメータ      | 数  | 頻度     |
|------------|----|--------|
| 全ウエル       | 96 | 100%   |
| CDR3アルファ   | 42 | 43. 8% |
| CDR3ベータ    | 37 | 38. 5% |
| 4268-TCR3対 | 31 | 32. 3% |
| 全対合TCR     | 35 | 36. 5% |

30

【0 3 3 5】

患者4 2 6 8 から単離された4 2 6 8 - TCR 4 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域はCDR 1 アルファ (配列番号1 6 7) であり、2 番目の下線領域はCDR 2 アルファ (配列番号1 6 8) であり、3 番目の下線領域はCDR 3 アルファ (配列番号1 6 9) であり、4 番目の下線領域はCDR 1 ベータ (配列番号1 7 0) であり、5 番目の下線領域はCDR 2 ベータ (配列番号1 7 1) であり、6 番目の下線領域はCDR 3 ベータ (配列番号1 7 2) である。太字領域は、リンカー (配列番号2 6) である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域 (配列番号2 3) であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域 (配列番号2 5) である。アルファ鎖可変領域 (配列番号1 7 3) は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域 (配列番号1 7 4) は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖 (配列番号1 7 5) は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖 (配列番号1 7 6) は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0 3 3 6】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性T細胞を同定した。TCRを単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCRの名称：4 2 6 8 - TCR 4

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

50

方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C Rを同定するための共培養：4 2 6 8－F 1 8とp 5 3－R 2 4 8 Qロングペプチドとを共培養、C D 4＋4 1 B B＋T細胞をソート

T C Rを同定する方法：単一細胞R T－P C R

全ての対合T C RのうちのT C Rの存在量：9 5．2％（4 2対のうち4 0回観察）

T C Rの配向：アルファ－ベータ

発現ベクター：S Bトランスポゾン

【0 3 3 7】

【化 3 9】

MALLLVPAFQVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVPVFEEAPVELRCNYSSSVSYLFWYVQYPNQGLQLLLKYLSGSTLVESIN  
GFEAEFNKSQTSFHLRKPSVHISDTAEYFCAVRGSSGTYYKIFGTGTRLKVLANIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTD  
FDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLN  
FQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHIRLLCRVAFCLAVGLVDVKV  
TQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKKEGDIPEGYSVSREKKERFSLILESASTN  
QTSMYLCASKGDQNTAEFFGQGTSLTVVEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEV  
HSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVQNISAEAWGRADCGITSA  
SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVVRKNS（配列番号 5 8 1）

10

【0 3 3 8】

患者 4 2 6 8 の T C R 4 2 6 8－T C R 4 についての統計値を以下の表 3 6 に記載する。

20

【0 3 3 9】

【表 4 3】

表 3 6

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウエル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 43 | 44.8% |
| CDR3ベータ    | 53 | 55.2% |
| 4268-TCR4対 | 40 | 41.7% |
| 全対合TCR     | 42 | 43.8% |

30

【0 3 4 0】

患者 4 2 6 8 から単離された 4 2 6 8－T C R 5 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 1 7 7）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 1 7 8）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 1 7 9）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 1 8 0）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 1 8 1）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 1 8 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 1 8 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 1 8 4）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 1 8 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 1 8 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

40

【0 3 4 1】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 6 8－T C R 5

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 Q

50

方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C Rを同定するための共培養：4 2 6 8－F 1 9とp 5 3－mut－TMGとを共培養、C D 4＋4 1 B B＋T細胞をソート

T C Rを同定する方法：単一細胞R T－P C R

全ての対合T C RのうちのT C Rの存在量：1 1．8 %（1 7 対のうち2 回観察）

T C Rの配向：アルファ－ベータ

発現ベクター：S Bトランスポゾン

【0 3 4 2】

【化 4 0】

MAGVFLLYVSMKMGTTGQNIQPTMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHAGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSF  
LSRSKGYSYLLKELQMKDSASYLC~~AVRDLQ~~TGANNLFFGTGRLTVIPNIQNP~~EP~~AVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQ  
INVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNL  
LVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSS  
RYLVKRTGEKVFL~~ECVQ~~MDHENMFWYRQDPGLRLIYFSYDV~~KM~~KEKGDIP~~EGYSVS~~REKKERFSLILEASTNQTSM  
YLCASSLTFGTTEAF~~FG~~QGQTRLTVV~~EDLRNV~~TPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSG  
VCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFR~~CVQ~~FHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQ~~NISAEAWGRADCGITSASYQ  
QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS（配列番号 5 8 2）

10

【0 3 4 3】

患者4 2 6 8のT C R 4 2 6 8－T C R 5についての統計値を以下の表 3 7 に記載する。

20

【0 3 4 4】

【表 4 4】

表 3 7

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウエル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 2  | 2.1%  |
| CDR3ベータ    | 87 | 90.6% |
| 4268-TCR5対 | 2  | 2.1%  |
| 全対合TCR     | 17 | 17.7% |

30

【0 3 4 5】

#### 実施例 9

この実施例は、自己T細胞内で変異型p 5 3を発現するように誘導された自己A P Cを共培養することによる、患者4 2 6 6における抗変異型p 5 3 T細胞の同定を示す（「p 5 3 ホットスポット変異ユニバーサルスクリーニング」）。また、この実施例は、患者4 2 6 6からの4つの抗変異型p 5 3 T C Rの単離を示す。

【0 3 4 6】

患者4 2 6 6について、図 3 1～3 4 及び 5 3～5 5 に記載の通り実験を実施した。

【0 3 4 7】

患者4 2 6 6由来のT I L断片（F 1～F 2 4、n＝2 4）を、無関係、WT p 5 3、又は変異型p 5 3の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己A P Cと共培養した。共培養は3 7℃で一晩実施した。E L I S P O Tアッセイを使用してI F N－γの分泌を評価した。結果を図 3 1に示す。リンパ球→生細胞（P I 陰性）→C D 3＋（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4－1 B Bの発現を評価した。結果を図 3 2に示す。

40

【0 3 4 8】

患者4 2 6 6由来のT I L断片（F 1～F 2 4、n＝2 4）を、ペプチドビヒクル（D M S O）、又はWT p 5 3－R 2 4 8配列若しくは変異型p 5 3－R 2 4 8 W配列から構成された精製（H P L Cによって＞9 5 %）された2 5 アミノ酸ペプチドをパルスした自己A P Cと共培養した。共培養は3 7℃で一晩実施した。E L I S P O Tアッセイを使用

50

してIFN- $\gamma$ の分泌を評価した。結果を図33に示す。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図34に示す。

#### 【0349】

Cos7細胞（ $2.5 \times 10^4$ 個/ウェル）を、平底96ウェルプレートのウェルにブレーティングした。次の日、患者4266由来の個々のHLAアリルを細胞にコトランスフェクトした。次の日、ペプチド無し、DMSO、野生型p53-R248ペプチドSSCMGGMNRR（配列番号590）又は変異型p53-R248WペプチドSSCMGGMNWR（配列番号591）を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、細胞に37℃で2時間パルスした。患者4266由来のTIL培養物（ $10^5$ 個）をウェルに添加し、37℃で一晩共培養した。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）→CD4-CD8+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図53に示す。

#### 【0350】

モック（TCR無し）、4266-TILから同定されたp53-R248Wに対して推定特異性を有する4266-TCR1、4266-TCR2、4266-TCR3、又は4266-TCR4を発現しているT細胞を、ペプチドビヒクル（DMSO）、又はWtp53-R248配列若しくは変異型p53-R248W配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。培地のみ並びにPMA及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。共培養は37℃で一晩実施した。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）→CD4-CD8+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図54に示す。

#### 【0351】

患者4266から摘出した異種移植腫瘍断片から腫瘍細胞（TC）株を樹立し、次いで、免疫無防備状態のマウスで連続継代した（TC#4266）。モック（TCR無し）又はp53-R248W特異的TCR（4266-TCR2、4266-TCR3、又は4266-TCR4）を発現しているT細胞（ $10^5$ 個）とTC#4266を37℃で一晩共培養した。TC#4266細胞を、何も無しで、W6/32汎HLAクラスI特異的遮断抗体、IVA12汎HLAクラスII特異的遮断抗体、又は変異型p53-R248WペプチドSSCMGGMNWR（配列番号591）と共に37℃で2時間インキュベートした。抗体を、最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で共培養物中において維持した。ペプチドを $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ でインキュベートし、インキュベート後に過剰のペプチドを洗浄した。培地のみ（TC無し）並びにPMA及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）→CD4-CD8+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図55に示す。

#### 【0352】

患者4266から単離された4266-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号97）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号98）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号99）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号100）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号101）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号102）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号103）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号104）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号105）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む

。完全長ベータ鎖（配列番号 106）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0353】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4266-T C R 1

p 53 変異の認識：R 248W

スクリーニング方法：p 53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4266-F 1、4266-F 3、4266-F 5、及び 4266-F 6 と p 53 mutant T M G 又は R 248W ロングペプチドとの共培養（両共培養物は同じ T C R を検出）、C D 8+41BB+T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T-PCR

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：17.0%（53 対のうち 9 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0354】

##### 【化 41】

MALLLVPAFQVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVPVFEEAPVELRCNYSSSVSVYLFWYVQYPNQLQLLLKYLSGSTLVESIN  
GFEAEFNKSQTSFHLRKPSVHISDTAEYFCAVSDLVRRDKLIIFGKGTRLHILPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTD  
FDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLN  
FQNLIVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHIGLLCCVAFSLLWASPVNAGV  
TQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHNSMYWYRQDPGMGLRLIYYSAEGTTDKGEVPNGYNVSRLNKRFSRLRESAAPS  
QTSVYFCASIGGFEAFFGGQTRLTVVEDLRNVTTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHS  
GVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVQNISAEAWGRADCGITSASY  
QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKN（配列番号 583）

#### 【0355】

患者 4266 の T C R 4266-T C R 1 についての統計値を以下の表 38 に記載する。

#### 【0356】

##### 【表 45】

表 38

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウェル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 9  | 9.4%  |
| CDR3ベータ    | 10 | 10.4% |
| 4266-TCR1対 | 9  | 9.4%  |
| 全対合TCR     | 53 | 55.2% |

#### 【0357】

患者 4266 から単離された 4266-T C R 2 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 107）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 108）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 109）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 110）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 111）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 112）である。太字領域は、リンカー（配列番号 26）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 23）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 113）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 114）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルフ

α鎖（配列番号 115）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長β鎖（配列番号 116）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0358】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4266-T C R 2

p 53 変異の認識：R 248W

スクリーニング方法：p 53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4266-F1、4266-F3、4266-F5、及び 4266-F6 と p 53 mutant TMG 又は R 248W ロングペプチドとの共培養（両共培養物は同じ T C R を検出）、CD8+41BB+T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T-P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：24.5%（53 対のうち 13 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0359】

##### 【化 42】

MAGVFLLYVSMKMGTTGQNIQPTMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHAGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLSRSGYSYLLKELQMKDSASYLCAVYTGFGKTFGAGTRLFVKANIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATALTEKSFETDMNLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASNLGGGSTDQYFPGGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS（配列番号 584）

#### 【0360】

患者 4266 の T C R 4266-T C R 2 についての統計値を以下の表 39 に記載する。

#### 【0361】

##### 【表 46】

表 39

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウエル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 21 | 21.9% |
| CDR3ベータ    | 18 | 18.8% |
| 4266-TCR2対 | 13 | 13.5% |
| 全対合TCR     | 53 | 55.2% |

#### 【0362】

患者 4266 から単離された 4266-T C R 3 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 117）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 118）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 119）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 120）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 121）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 122）である。太字領域は、リンカー（配列番号 26）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 23）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 123）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 124）は、リン

カーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 1 2 5）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 1 2 6）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0 3 6 3】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。T C R を単離するために使用した方法を以下に記載する。

T C R の名称：4 2 6 6 - T C R 3

p 5 3 変異の認識：R 2 4 8 W

スクリーニング方法：p 5 3 「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

T C R を同定するための共培養：4 2 6 6 - F 1、4 2 6 6 - F 3、4 2 6 6 - F 5、及び 4 2 6 6 - F 6 と p 5 3 m u t T M G 又は R 2 4 8 W ロングペプチドとの共培養（両共培養物は同じ T C R を検出）、C D 8 + 4 1 B B + T 細胞をソート

T C R を同定するための方法：単一細胞 R T - P C R

全ての対合 T C R のうちの T C R の存在量：3 4 . 0 % （5 3 対のうち 1 8 回観察）

T C R の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：S B トランスポゾン

#### 【0 3 6 4】

#### 【化 4 3】

MAGVFLLYVSMKMGTTGQNIQPTMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHAGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSF  
LSRSKGYSYLLKELQMKDSASYLCAFYGGSGQNLIFGKGTLSVKPNIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQI  
NVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNL  
VIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSKSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWVVLGFLGTDTGAGVSQSPR  
YKVAKRQGDVALRCDPI SGHVS LFWYQQALQGQPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQRTOQEDSAV  
YLCASSFGSGSTDTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHS  
GVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASY  
QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKNS（配列番号 5 8 5）

#### 【0 3 6 5】

患者 4 2 6 6 の T C R 4 2 6 6 - T C R 3 についての統計値を以下の表 4 0 に記載する。

#### 【0 3 6 6】

#### 【表 4 7】

表 4 0

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウエル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 19 | 19.8% |
| CDR3ベータ    | 26 | 27.1  |
| 4266-TCR3対 | 18 | 18.8% |
| 全対合TCR     | 53 | 55.2% |

#### 【0 3 6 7】

患者 4 2 6 6 から単離された 4 2 6 6 - T C R 4 の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1 番目の下線領域は C D R 1 アルファ（配列番号 1 2 7）であり、2 番目の下線領域は C D R 2 アルファ（配列番号 1 2 8）であり、3 番目の下線領域は C D R 3 アルファ（配列番号 1 2 9）であり、4 番目の下線領域は C D R 1 ベータ（配列番号 1 3 0）であり、5 番目の下線領域は C D R 2 ベータ（配列番号 1 3 1）であり、6 番目の下線領域は C D R 3 ベータ（配列番号 1 3 2）である。太字領域は、リンカー（配列番号 2 6）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 2 3）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 2 5）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 1 3 3）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定

常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 134）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 135）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 136）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

#### 【0368】

以下に記載するスクリーニング方法を使用して、がん反応性 T 細胞を同定した。TCR を単離するために使用した方法を以下に記載する。

TCR の名称：4266-TCR4

p53 変異の認識：R248W

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCR を同定するための共培養：4266-F1、4266-F3、4266-F5、及び 4266-F6 と p53mutTMG 又は R248W ロングペプチドとの共培養（両共培養物は同じ TCR を検出）、CD8+41BB+T 細胞をソート

TCR を同定するための方法：単一細胞 RT-PCR

全ての対合 TCR のうちの TCR の存在量：9.4%（53 対のうち 5 回観察）

TCR の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SB トランスポゾン

#### 【0369】

#### 【化44】

MAGVFLLYVSMKMGTTGQNIQPTMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHAGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSF  
LSRSKGYSYLLKELQMKDSASYLCAVYPGGSQGNLIFGKGTCLSVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQI  
NVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPDCLTEKSFETDMNLNFQNL  
VIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHTRLLCWAALCCLLGAELTEAGVAQSPR  
YKIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNQNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQAILEDASV  
YLCASSLGTGSDTDQYFGPGTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHS  
GVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTNISAEAWGRADCGITSASY  
QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKNS（配列番号 586）

#### 【0370】

患者 4266 の TCR4266-TCR4 についての統計値を以下の表 41 に記載する。

#### 【0371】

#### 【表48】

表 41

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウエル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 5  | 5.2%  |
| CDR3ベータ    | 13 | 13.5  |
| 4266-TCR3対 | 5  | 5.2%  |
| 全対合TCR     | 53 | 55.2% |

#### 【0372】

#### 実施例 10

この実施例は、T 細胞による p53「ホットスポット」変異に対する応答の概要を示す。

#### 【0373】

T 細胞による p53「ホットスポット」変異に対する応答の概要を表 42 に提供する。表 42 の 1～15 番は、後ろ向き研究であった。表 42 の 16～33 番は、前向き研究であった。

#### 【0374】

## 【表 4 9】

表 4 2

| 番号 | 腫瘍の種類 | 患者   | p53 mut | T細胞スクリーニング* | HLA             |
|----|-------|------|---------|-------------|-----------------|
| 1  | 胃     | 3446 | G245S   | n/a         | n/a             |
| 2  | 胃食道   | 3788 | Y220C   | N           | n/a             |
| 3  | 直腸    | 3942 | R273C   | n/a         | n/a             |
| 4  | 結腸    | 4023 | R282W   | Y           | クラスII           |
| 5  | 結腸    | 4095 | R282W   | n/a         | n/a             |
| 6  | 卵巣    | 4127 | G245S   | Y           | DRB3*02:02      |
| 7  | 乳     | 4130 | R273H   | Y           | クラスII           |
| 8  | 結腸    | 4141 | R175H   | Y           | A*02:01         |
| 9  | 卵巣    | 4149 | Y220C   | Y           | DRB3*02:02      |
| 10 | 結腸    | 4160 | R273H   | N           | n/a             |
| 11 | 黒色腫   | 4165 | G245D   | N           | n/a             |
| 12 | 結腸    | 4166 | R248W   | n/a         | n/a             |
| 13 | 直腸    | 4171 | R248Q   | N           | n/a             |
| 14 | 黒色腫   | 4187 | R273H   | N           | n/a             |
| 15 | 結腸    | 4196 | R175H   | Y           | A*02:01         |
| 16 | 結腸    | 4213 | R248Q   | Y           | 両方              |
| 17 | 結腸    | 4217 | R175H   | N           | n/a             |
| 18 | 胆管    | 4220 | R248Q   | N           | n/a             |
| 19 | 直腸    | 4235 | R273C   | N           | n/a             |
| 20 | 結腸    | 4238 | R248Q   | Y           | Class-I         |
| 21 | 結腸    | 4244 | R282W   | N           | n/a             |
| 22 | 結腸    | 4245 | R248Q   | N           | n/a             |
| 23 | 結腸    | 4252 | R175H   | N           | n/a             |
| 24 | 黒色腫   | 4253 | R248W   | Y           | 未知              |
| 25 | 結腸    | 4254 | R273H   | N           | n/a             |
| 26 | 結腸    | 4257 | R248W   | N           | n/a             |
| 27 | 子宮内膜  | 4258 | R273H   | N           | n/a             |
| 28 | 結腸    | 4259 | Y220C   | Y           | A*02:01、DRB1*04 |
| 29 | 結腸    | 4266 | R248W   | Y           | A*68:01         |
| 30 | 結腸    | 4268 | R248Q   | Y           | 両方              |
| 31 | 膵臓    | 4270 | R282W   | Y           | 未知              |
| 32 | 直腸    | 4273 | R248W   | Y           | DPB1*02:01      |
| 33 | 直腸    | 4274 | R175H   | n/a         |                 |
| 34 | 結腸    | 4283 | R175H   | N           | n/a             |
| 35 | 結腸    | 4285 | R175H   | Y           | DRB1*13:01      |
| 36 | 結腸    | 4287 | R248W   | N           | n/a             |
| 37 | 結腸    | 4312 | R175H   | N           | n/a             |

n/a = 該当なし ; N = 陰性 ; Y = 反応性が確認 ; TBS = スクリーニングすべき。

## 【0375】

## 実施例 11

この実施例は、p53 変異反応性 TIL による患者の治療を示す。

## 【0376】

p53 変異反応性 TIL による患者の治療の概要を表 43 に提供する。

## 【0377】

10

20

30

40

50

【表 50】

表 4 3

| 番号 | 腫瘍の種類 | 患者   | p53 mut | 輸液バッグスクリーニング | 細胞の総数 (×10 <sup>9</sup> ) | p53反応性TILの% | p53反応性TILの数 (×10 <sup>9</sup> ) | 応答    | 期間 (月) |
|----|-------|------|---------|--------------|---------------------------|-------------|---------------------------------|-------|--------|
| 1  | 卵巣    | 4127 | G245S   | Y            | 143                       | 2.8         | 4.0                             | P. R. | 4      |
| 2  | 結腸    | 4141 | R175H   | Y            | 69                        | 0.8         | 0.6                             | N. R. | —      |
| 3  | 結腸    | 4196 | R175H   | Y            | 92                        | 3.3         | 3.0                             | N. R. | —      |
| 4  | 卵巣    | 4149 | Y220C   | Y            | 37                        | 11.1        | 4.1                             | N. R. | —      |
| 5  | 結腸    | 4213 | R248Q   | TBS          | 33                        |             |                                 | P. R. | 4      |
| 6  | 結腸    | 4238 | R248Q   | TBS          | 57                        |             |                                 | N. R. |        |
| 7  | 結腸    | 4266 | R248W   | Y            | 104                       | 50.8        | 52.8                            |       |        |
| 8  | 結腸    | 4268 | R248Q   | **TBS        |                           |             |                                 |       |        |
| 9  | 直腸    | 4273 | R248W   | **Y          | 117                       | 6.8         | 8.0                             | N. R. | —      |
| 10 | 結腸    | 4285 | R175H   | Y            | 69.6                      | 2.4         | 1.7                             | N. R. | —      |

N T＝治療無し；T B S＝スクリーニングすべき；N. R.＝応答なし；P. R.＝部分応答；\*\*まだ治療していない患者。

## 【0378】

## 実施例 12

この実施例は、患者 4141 からの T C R の単離及び特異的反応性を示す。

## 【0379】

無関係の変異、W T p 5 3 配列、又は R 1 7 5 H を含む変異型 p 5 3 配列をコードしている T M G を自己 A P C にトランスフェクトした。培地のみ並びに P M A 及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。次の日、患者 4141 由来の T I L (断片培養物 12) を、T M G をトランスフェクトした A P C と 37℃で一晩共培養した。E L I S P O T によって I F N - γ の分泌を評価した。リンパ球→生細胞 (P I 陰性) →C D 3 + (T 細胞) →C D 4 - C D 8 + にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 38 に示す。

## 【0380】

C o s 7 細胞 (2.5 × 10<sup>4</sup> 個/ウェル) を、平底 96 ウェルプレートのウェルにプレーティングした。次の日、患者 4141 由来の個々の H L A アリル、及び追加の遺伝子無し、W T T P 5 3 T M G、又は p 5 3 - R 1 7 5 H 配列を含有する変異型 T P 5 3 T M G のいずれかを細胞にコトランスフェクトした。次の日、患者 4141 由来の p 5 3 - R 1 7 5 H に対して特異性を有する T I L (断片培養物 12) を、トランスフェクトされた C o s 7 細胞と共培養し、37℃で一晩インキュベートした。E L I S P O T によって I F N - γ の分泌を評価した。結果を図 39 に示す。

## 【0381】

モック（TCR無し）又は4141-TCR1a2を発現しているT細胞を、T2腫瘍細胞（HLA-A\*02:01を発現している）と共培養した。ペプチドビヒクル（DM SO）、又はWT p53-R175ペプチドHMT E V V R R C（配列番号532）若しくは変異型p53-R175HペプチドHMT E V V R H C（配列番号530）から構成された精製（HPLCによって>95%）されたペプチドを37℃で2時間T2細胞にパルスした。培地のみ並びにPMA及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。共培養は37℃で一晩実施した。ELISAによってIFN-γの分泌を評価した。結果を図40に示す。

## 【0382】

4141-TCR1a2を発現しているT細胞を、37℃で一晩、Saos2細胞（p53-NUL L及びHLA-A\*02:01+）と共培養したが、この細胞は、操作されていないか又は完全長p53-R175Hタンパク質を過剰発現するようにされていた。T細胞内のサイトカインを捕捉するために、分泌の阻害因子（モネンシン及びブレフェルジンA）を共培養物に添加した。6時間共培養した後、細胞を固定し、透過処理し、次いで、IL-2、CD107a、IFN-γ、及び腫瘍壊死因子アルファ（TNFα）を染色した。フローサイトメトリーを使用して、リンパ球ゲートに基づいて共培養物を分析した。結果を図41に示す。

## 【0383】

患者4141から単離されたTCR4141-TCR1a2の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号467）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号468）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号469）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号470）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号471）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号472）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号473）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号474）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号475）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号476）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

## 【0384】

がん反応性T細胞を下記の通り同定した。TCRを下記の通り単離した。  
TCRの名称：4141-TCR1a2  
p53変異の認識：R175H  
スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング  
TCRを同定するための共培養：4141輸液バッグTILとp53mutTMGとを共培養、CD8+41BB+T細胞をソート  
TCRを同定するための方法：単細胞RT-PCR、次いで、アルファ鎖のためのTATOP Oクローニングキット（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）  
TCRの配向：アルファ-ベータ  
発現ベクター：SBトランスポゾン

## 【0385】

10

20

30

40

50

## 【化 4 5】

MASIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKGPQLIIDIRSNVGEKKDQR  
IAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAASKSAIMVVLQTSSSLELALCLSSQVNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLC  
LFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETD  
MNLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHPQLLGYVVLCLLGAGPL  
EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSKEKRNFPILLES  
PSPNQTSLYFCASSIQQGADTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWW  
NGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPРНHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVNISAEAWGRADC  
GITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS (配列番号 5 8 7)

10

## 【0 3 8 6】

患者 4 1 4 1 由来の 4 1 4 1 - T C R 1 a 2 についての統計値を以下の表 4 4 に記載する。

## 【0 3 8 7】

## 【表 5 1】

表 4 4

| パラメータ    | 数                  | 頻度     |
|----------|--------------------|--------|
| 全ウェル     | 96                 | 100%   |
| CDR3アルファ | 未知 (TA TOPOクローニング) | 適用不可   |
| CDR3ベータ  | 58                 | 60. 4% |

20

## 【0 3 8 8】

## 実施例 1 3

この実施例は、患者 4 2 5 9 から単離された T C R の単離及び特異的反応性を示す。

## 【0 3 8 9】

患者 4 2 5 9 由来の T I L 断片培養物 (6 番) を、(1) 無関係、W T p 5 3、又は変異型 p 5 3 の配列から構成された T M G をエレクトロポレーションした、あるいは (2) ペプチドビヒクル (D M S O)、又は W T p 5 3 - Y 2 2 0 配列若しくは変異型 p 5 3 - Y 2 2 0 C 配列から構成された精製 (H P L C によって > 9 5 %) された 2 5 アミノ酸ペプチドをパルスした自己 A P C と共培養した。共培養は 3 7 °C で一晚実施した。リンパ球 → 生細胞 (P I 陰性) → C D 3 + (T 細胞) にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 4 2 に示す。

30

## 【0 3 9 0】

漸減濃度の、W T p 5 3 - Y 2 2 0 又は変異型 p 5 3 - Y 2 2 0 C の配列に対応する 2 5 アミノ酸ペプチドを、3 7 °C で 2 時間自己 A P C にパルスした。患者 4 2 5 9 由来の T I L 断片培養物 (6 番) を、ペプチドをパルスした A P C と共培養した。リンパ球 → 生細胞 (P I 陰性) → C D 3 + (T 細胞) にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現をアッセイした。結果を図 4 3 に示す。

## 【0 3 9 1】

自己抗原提示細胞に、D M S O、W T p 5 3 - Y 2 2 0 ペプチド R N T F R H S V V V P Y E (配列番号 5 3 3)、又は変異型 p 5 3 - Y 2 2 0 C ペプチド R N T F R H S V V V P C E (配列番号 5 3 4) を 3 7 °C で 2 時間パルスした。過剰のペプチドを洗い流した。p 5 3 - Y 2 2 0 C に対して特異性を有する患者 4 2 5 9 由来の T I L (断片培養物 6) を、ペプチドをパルスした A P C と 3 7 °C で一晚共培養した。リンパ球 → 生細胞 (P I 陰性) → C D 3 + (T 細胞) にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって 4 - 1 B B の発現を評価した。結果を図 4 4 に示す。

40

## 【0 3 9 2】

C o s 7 細胞 (2 . 5 × 1 0 <sup>4</sup> 個 / ウェル) を、平底 9 6 ウェルプレートのウェルにプレートングした。次の日、患者 4 2 5 9 由来の個々の H L A アリルを細胞にコトランスフェクトした。次の日、D M S O 又は p 5 3 - Y 2 2 0 C ペプチド R N T F R H S V V V

50

PCE（配列番号534）を、トランスフェクトしたCos7細胞に2時間パルスした。過剰のペプチドを洗い流した。患者4259由来のTIL断片培養物6番を添加した（ $10^5$ 細胞／ウェル）。共培養物を37℃で一晩インキュベートした。リンパ球→生細胞→CD3+（T細胞）→CD8-CD4+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現をアッセイした。結果を図45に示す。

【0393】

WT p53-Y220又は変異型 p53-Y220Cの配列に対応する25アミノ酸ペプチドを、37℃で2時間、患者4259にとって自己のAPCにパルスした。過剰のペプチドを洗い流した。4259-F6-TCRを発現しているT細胞を、ペプチドをパルスしたAPCと37℃で一晩共培養した。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。導入されたTCRをマウスTCRベータ（mTCR）によって測定した。結果を表45に示す。

【0394】

【表52】

表45

|              | WT p53-Y220 | Mut p53-Y220C |
|--------------|-------------|---------------|
| 4-1BB+/mTCR+ | 0.27        | 5.22          |
| 4-1BB-/mTCR- | 68.5        | 73.7          |
| 4-1BB+/mTCR- | 0.18        | 1.59          |
| 4-1BB-/mTCR+ | 31.0        | 19.5          |

【0395】

患者4259から摘出した異種移植腫瘍断片から腫瘍細胞（TC）株を樹立し、次いで、免疫無防備状態のマウスで連続継代した（TC#4259）。TC#4259を、モック（TCR無し）又はp53-Y220C特異的TCR（4259-F6-TCR）を発現しているT細胞（ $10^5$ 個）と37℃で一晩共培養した。TC#4259細胞を、何も無しで、W6/32汎HLAクラスI特異的遮断抗体、IVA12汎HLAクラスII特異的遮断抗体、又は変異型 p53-Y220CペプチドRNTFRHSVVVPCE（配列番号534）と共に37℃で2時間インキュベートした。抗体を、最終濃度5μg/mLで共培養物中において維持した。ペプチドを10μg/mLでインキュベートし、インキュベート後に過剰のペプチドを洗浄した。培地のみ（TC無し）並びにPMA及びイオノマイシンが、それぞれ、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールであった。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図46に示す。

【0396】

患者4259から単離されたTCR4259-F6-TCRの配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号477）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号478）であり、3番目の下線領域はCDR3アルファ（配列番号479）であり、4番目の下線領域はCDR1ベータ（配列番号480）であり、5番目の下線領域はCDR2ベータ（配列番号481）であり、6番目の下線領域はCDR3ベータ（配列番号482）である。太字領域は、リンカー（配列番号26）である。アミノ末端から始めて、1番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号23）であり、2番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号483）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号484）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号485）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号486）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル末端で終わる配列を含む。

## 【0397】

がん反応性T細胞を下記の通り同定した。TCRを下記の通り単離した。

TCRの名称：4259-F6-TCR

p53変異の認識：Y220C

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCRを同定するための共培養：4259-F6とp53-Y220Cペプチドとを共培養、CD4+41BB+T細胞をソート

TCRを同定するための方法：単細胞RT-PCR

全ての対合TCRのうちのTCRの存在量：81.1%（44対のうち36回観察）

TCRの配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SBトランスポゾン

## 【0398】

## 【化46】

MASLRVLLVILWLQLSWWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDG  
RFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCWNSGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNP~~PA~~VYQLKDPRSQDSTLC~~LFTD~~  
FDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKNGAI~~AW~~SNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCD~~ATL~~TEKSFETDMNLN  
FQNL~~L~~VIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS~~SG~~GATNFSLLKQAGDVEENPGPMHLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGV  
TQTPKFRVLKTGQSM~~TL~~LCAQDMNHE~~Y~~MYWYRQDPGMGLRLIHYSVGE~~GT~~TAKGEVPDGYNVSRLKKQNFLLGLESAAPS  
QTSVYFCASSYSQAWGQPQHFGDGTRL~~S~~ILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGK  
EVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV~~S~~ATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~T~~QNISAEAWGRADCGIT  
SASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKR~~KNS~~（配列番号588）

## 【0399】

患者4259由来の4259-F6-TCRについての統計値を以下の表46に記載する。

## 【0400】

## 【表53】

表46

| パラメータ        | 数  | 頻度    |
|--------------|----|-------|
| 全ウエル         | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ     | 41 | 42.7% |
| CDR3ベータ      | 47 | 49.0% |
| 4259-F6-TCR対 | 36 | 37.5% |
| 全対合TCR       | 44 | 45.8% |

## 【0401】

## 実施例14

この実施例は、患者4285からのTCRの単離及び特異的反応性を示す。

## 【0402】

患者4285由来のTIL断片（F1～F22及びF24、n=23）を、無関係、WTP53、又は変異型p53の配列から構成されたTMGをエレクトロポレーションした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッセイを使用してIFN-γの分泌を評価した。結果を図47に示す。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図49に示す。

## 【0403】

患者4285由来のTIL断片（F1～F22及びF24、n=23）を、ペプチドビヒクル（DMSO）、又はWTP53-R175配列若しくは変異型p53-R175H配列から構成された精製（HPLCによって>95%）された25アミノ酸ペプチドをパルスした自己APCと共培養した。共培養は37℃で一晩実施した。ELISPOTアッ

セイを使用してIFN- $\gamma$ の分泌を評価した。結果を図48に示す。リンパ球→生細胞（PI陰性）→CD3+（T細胞）にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現を評価した。結果を図50に示す。CD4+41BB+T細胞をソートした後の4285-TCR1の源は、TIL断片F6であった。

#### 【0404】

14アミノ酸が重複しているp53-R175H配列由来の15-アミノ酸ペプチド（表45における下線付きアミノ酸置換）を自己APCにパルスした。p53-R175Hに対して特異性を有する患者4285由来のTIL（断片培養物10、6、及び9）を、ペプチドをパルスしたAPCと37℃で一晩共培養した。DMSOがペプチドビヒクルであった。ELISPOTアッセイを使用してIFN- $\gamma$ の分泌を評価した。結果を表47に示す。

#### 【0405】

#### 【表54】

表47

|                               |      | ELISPOTの結果<br>IFN- $\gamma$ 生成について陽性（+）又は陰性（-） |         |         |
|-------------------------------|------|------------------------------------------------|---------|---------|
| ペプチド                          | 配列番号 | 4285-F10                                       | 4285-F6 | 4285-F9 |
| 無し（ビヒクル）                      | 該当なし | —                                              | —       | —       |
| YKQSQHMT <sup>H</sup> EVVRHCP | 519  | —                                              | —       | —       |
| KQSQHMT <sup>H</sup> EVVRHCPH | 520  | —                                              | —       | +       |
| QSQHMT <sup>H</sup> EVVRHCPHH | 521  | —                                              | +       | +       |
| SQHMT <sup>H</sup> EVVRHCPHHE | 522  | +                                              | +       | +       |
| QHMT <sup>H</sup> EVVRHCPHHER | 523  | +                                              | +       | +       |
| HMT <sup>H</sup> EVVRHCPHHERC | 524  | +                                              | +       | +       |
| MTEVVRHCPHHERCS               | 525  | +                                              | +       | +       |
| TEVVRHCPHHERCSD               | 526  | +                                              | +       | +       |
| EVVRHCPHHERCSDS               | 527  | +                                              | +       | +       |
| VVRHCPHHERCSDSD               | 528  | +                                              | +       | —       |
| VRHCPHHERCSDSDG               | 529  | +                                              | +       | —       |

#### 【0406】

Cos7細胞（ $2.5 \times 10^4$ 個／ウェル）を、平底96ウェルプレートのウェルにプレートした。次の日、患者4285由来の個々のHLAアリルを細胞にコトランスフェクトした。次の日、DMSO又は変異型p53-R175HペプチドYKQSQHMT<sup>H</sup>EVVRHCPHHERCSDSDG（配列番号2）を10 $\mu$ g/mLで、細胞に37℃で2時間パルスした。患者4285由来のp53-R175Hに対して特異性を有する、選択されたTIL断片培養物（4285-F6、4285-F9、及び4285-F10）を、トランスフェクトされたCos7細胞と37℃で一晩共培養した。リンパ球→生細胞→CD3+（T細胞）→CD8-CD4+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現をアッセイした。結果を図51に示す。

#### 【0407】

漸減濃度の、WT又は変異型p53-R175Hの配列に対応する25又は15アミノ酸ペプチドを、自己APCに37℃で2時間パルスした。患者4285由来4285-TCR1を転移させたT細胞を、37℃で一晩、ペプチドをパルスしたAPCと共培養した。リンパ球→生細胞→CD3+（T細胞）→CD8-CD4+にゲートをかけた後、フローサイトメトリーによって4-1BBの発現をアッセイした。結果を図52に示す。

#### 【0408】

患者4285から単離された4285-TCR1の配列を以下に記載する。アミノ末端から始めて、1番目の下線領域はCDR1アルファ（配列番号487）であり、2番目の下線領域はCDR2アルファ（配列番号488）であり、3番目の下線領域はCDR3ア

ルファ（配列番号 489）であり、4 番目の下線領域は CDR1 ベータ（配列番号 490）であり、5 番目の下線領域は CDR2 ベータ（配列番号 491）であり、6 番目の下線領域は CDR3 ベータ（配列番号 492）である。太字領域は、リンカー（配列番号 26）である。アミノ末端から始めて、1 番目のイタリック体領域はアルファ鎖定常領域（配列番号 23）であり、2 番目のイタリック体領域はベータ鎖定常領域（配列番号 25）である。アルファ鎖可変領域（配列番号 493）は、アミノ末端から始まり、アルファ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。ベータ鎖可変領域（配列番号 494）は、リンカーの直後に始まり、ベータ鎖定常領域の始まる直前に終わる配列を含む。完全長アルファ鎖（配列番号 495）は、アミノ末端から始まり、リンカーの始まる直前に終わる配列を含む。完全長ベータ鎖（配列番号 496）は、リンカーの直後に始まり、カルボキシル

10

#### 【0409】

がん反応性 T 細胞を下記の通り同定した。TCR を下記の通り単離した。

TCR の名称：4285-TCR1

p53 変異の認識：R175H

スクリーニング方法：p53「ホットスポット」変異ユニバーサルスクリーニング

TCR を同定するための共培養：4285-F6 と p53-R175H ペプチドとを共培養、CD4+41BB+T 細胞をソート

TCR を同定する方法：単細胞 RT-PCR

全ての対合 TCR のうちの TCR の存在量：81.8%（44 対のうち 36 回観察）

20

TCR の配向：アルファ-ベータ

発現ベクター：SB トランスポゾン

#### 【0410】

#### 【化47】

MAKNPLAAPLLILWFHLCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEKK  
KGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALITGGGNKLTFTGTQTKVELNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCFLT  
DFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHLGLLCCGAFSLLWAGPVNAG  
VTQTPKFRVLKTGQSMTLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTTAKGEVPDGYNVSRLLKKQNFLLGLESAAP  
SQTSVYFCASRLQGWN SPLHFGNGTRLTVTEDLRNVTTPKVSLEFSPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGK  
EVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCVQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV TQNISA EAWGRADCGIT  
SASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNV（配列番号 589）

30

#### 【0411】

患者 4185 由来の 4285-TCR1 についての統計値を表 48 に記載する。

#### 【0412】

#### 【表55】

表 48

| パラメータ      | 数  | 頻度    |
|------------|----|-------|
| 全ウエル       | 96 | 100%  |
| CDR3アルファ   | 37 | 39.8% |
| CDR3ベータ    | 39 | 40.6% |
| 4285-TCR1対 | 36 | 37.5% |
| 全対合TCR     | 44 | 45.8% |

40

#### 【0413】

#### 実施例 15

この実施例は、実施例 2 の患者 4196 由来の 3 つの抗変異型 p53 TCR の特異的反応性を示す。

#### 【0414】

50

様々な標的細胞株によるHLA-A\*0201及びp53 R175Hの発現を表49に提示する。

【0415】

【表56】

表49

| 細胞株         | 報告されたHLA-A*0201 | FACS MFI (MFIアライメント) によるHLA-A2 | 報告されたP53 R175H | 1e5 GAPDHあたりの推定P53 R175Hコピー数 |
|-------------|-----------------|--------------------------------|----------------|------------------------------|
| KLE         | +               | + 46733 (2038)                 | +              | 167                          |
| SKUT1       | +               | - 1009 (1009)                  | +              | 308                          |
| TYKNU       | +               | + 6556 (1537)                  | +              | 175                          |
| TYKNU CpR   | +               | + 8611 (1511)                  | +              | 179                          |
| VMRCLCD     | +               | + 8340 (949)                   | +              | 43                           |
| SKBR3       | +               | 弱3414 (2546)                   | +              | 99                           |
| CEM/C1      | —               | - 387 (330)                    | +              | 138                          |
| HCC1395     | —               | - 1743 (1537)                  | +              | 105                          |
| KMS26       | +               | + 57284 (679)                  | +              | 87                           |
| AU565       | +               | 弱3839 (1870)                   | +              | 80                           |
| LS123       | —               | - 1916 (2009)                  | +              | 190                          |
| CCRF CEM    | —               | - 235 (177)                    | +              | 149                          |
| SAOS2 R175H | +               | + 51049 (1417)                 | +              | N/A                          |
| SAOS親       | +               | + 40003 (1272)                 | —              | 22 (検出限界)                    |
| 培地          | 該当なし (n/a)      | n/a                            | n/a            | n/a                          |
| PMA/Io      | n/a             | n/a                            | n/a            | n/a                          |

【0416】

表49の標的細胞を、実施例2のTCRのうちの1つを形質導入した細胞と共培養した。モックを形質導入した細胞 (TCR無し) を対照エフェクタ細胞として使用した。IFN- $\gamma$ 分泌 (pg/mL) (表50) 及び4-1BB発現 ((mTCR $\beta$ +) の4-1BBの%) (表51) を測定した。

【0417】

10

20

30

40

50

## 【表 5 7】

表 5 0

| 細胞株                | TP53 TCR AV38/<br>BV10 CD8+ | TP53 TCR AV12/<br>BV6 CD8+ | TP53 TCR AV6/<br>BV11 CD8+ | モックTCR     |
|--------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------|
| KLE                | <u>741</u>                  | 110                        | <u>71</u>                  | 51         |
| SKUT1              | 28                          | 24                         | 26                         | 38         |
| TYKNU              | <u>196</u>                  | 41                         | 27                         | 33         |
| TYKNU CpR          | <u>298</u>                  | 65                         | 34                         | 24         |
| VMRCLCD            | 23                          | 22                         | 23                         | 23         |
| SKBR3              | 26                          | 23                         | 24                         | 26         |
| CEM/C1             | 26                          | 23                         | 22                         | 28         |
| HCC1395            | 25                          | 23                         | 26                         | 24         |
| KMS26              | <u>472</u>                  | <u>168</u>                 | <u>95</u>                  | 23         |
| AU565              | 21                          | 30                         | 25                         | 28         |
| LS123              | 25                          | 23                         | 25                         | 26         |
| CCRF CEM           | 23                          | 23                         | 30                         | 30         |
| SAOS2 R175H        | <u>&gt;2000</u>             | <u>1064</u>                | <u>190</u>                 | 24         |
| SAOS親              | 29                          | 26                         | 26                         | 25         |
| 培地                 | 25                          | 26                         | 26                         | 25         |
| PMA/I <sub>o</sub> | <u>1166</u>                 | <u>485</u>                 | <u>98</u>                  | <u>161</u> |

10

20

## 【 0 4 1 8 】

## 【表 5 8】

表 5 1

| 細胞株         | TP53 TCR AV38<br>/BV10 CD8+ | TP53 TCR AV12/<br>BV6 CD8+ | TP53 TCR AV6/<br>BV11 CD8+ | モックTCR |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|
| KLE         | <u>91.5</u>                 | <u>80.9</u>                | <u>84.3</u>                | 2.2    |
| SKUT1       | 2.6                         | 2.5                        | 2.5                        | 8.3    |
| TYKNU       | <u>70.4</u>                 | <u>67.3</u>                | <u>56.4</u>                | 2.7    |
| TYKNU CpR   | <u>87.7</u>                 | <u>78.5</u>                | <u>74.7</u>                | 2.8    |
| VMRCLCD     | 3.0                         | 2.8                        | 8.0                        | 6.3    |
| SKBR3       | 1.5                         | 2.4                        | 2.1                        | 5.2    |
| CEM/C1      | 2.6                         | 3.5                        | 5.0                        | 4.1    |
| HCC1395     | 1.5                         | 2.3                        | 3.4                        | 2.6    |
| KMS26       | <u>65.7</u>                 | <u>58.7</u>                | <u>61.5</u>                | 6.9    |
| AU565       | 2.0                         | 2.0                        | 2.3                        | 5.6    |
| LS123       | 2.0                         | 2.7                        | 3.2                        | 4.6    |
| CCRF CEM    | 3.9                         | 5.6                        | 6.2                        | 2.4    |
| SAOS2 R175H | <u>89.3</u>                 | <u>88.4</u>                | <u>88.5</u>                | 5.5    |
| SAOS親       | 2.3                         | 0.0                        | 11.0                       | 5.2    |

30

40

## 【 0 4 1 9 】

## 実施例 1 6

この実施例は、実施例 1 ～ 1 5 の T C R の反応性の概要を示す。

## 【 0 4 2 0 】

表 5 2 の T C R を単離し、T 細胞で発現させ、関連する抗原に対して試験した。結果の概要を表 5 2 に示す。

## 【 0 4 2 1 】

50

## 【表 5 9】

表 5 2

| TCRの名称                  | p53 a. a. 置換 | TCRを試験した? | p53変異反応性? |
|-------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 4127-TP53-G245S-TCR1    | G245S        | した        | 有り        |
| 4127-TP53-G245S-TCR4    | G245S        | した        | 有り        |
| 4127_0102_TCR           | G245S        | した        | 有り        |
| 4149TCRa2b2             | Y220C        | した        | 有り        |
| 4196_AV12-1_with_BV6-1  | R175H        | した        | 有り        |
| 4196_AV38-1_with_BV10-3 | R175H        | した        | 有り        |
| 4196_AV6_with_BV11-2    | R175H        | した        | 有り        |
| 4253-TIL-TCR1           | R248W        | した        | 無し        |
| 4253-TIL-TCR2           | R248W        | した        | 無し        |
| 4266-TCR1               | R248W        | した        | 無し        |
| 4266-TCR2               | R248W        | した        | 有り        |
| 4266-TCR3               | R248W        | した        | 有り        |
| 4266-TCR4               | R248W        | した        | 有り        |
| 4268-TCR1               | R248Q        | した        | 無し        |
| 4268-TCR2               | R248Q        | した        | 無し        |
| 4268-TCR3               | R248Q        | した        | 無し        |
| 4268-TCR4               | R248Q        | した        | 無し        |
| 4268-TCR5               | R248Q        | した        | 無し        |
| 4273-TP53-R248W-TCR1a1  | R248W        | した        | 無し        |
| 4273-TP53-R248W-TCR1a2  | R248W        | した        | 有り        |
| 4141-TCR1a2             | R175H        | した        | 有り        |
| 4285-TCR1               | R175H        | した        | 有り        |
| 4259-F6-TCR             | Y220C        | した        | 有り        |
| 4127-037-TCR            | G245S        | した        | 有り        |

10

20

30

40

## 【0 4 2 2】

本明細書に引用した刊行物、特許出願、及び特許を含む全ての参照文献は、各参照文献が個々にかつ具体的に参照によって組み入れられると示されており、その全体が本明細書に記載されているかのように、参照によって本明細書に組み入れられる。

## 【0 4 2 3】

本発明の説明に関連して（特に以下の特許請求の範囲に関連して）用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ」、並びに類似の参照対象の使用は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、単数形及び複数形の両方を網羅すると解釈されるべきである。1つ以上の項目のリストの後の用語「少な

50

くとも1つ」の使用（例えば、「A及びBのうちの少なくとも1つ」）は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、列挙される項目から選択される1つの項目（A又はB）又は列挙される項目のうちの2つ以上の任意の組み合わせ（A及びB）を意味すると解釈されるべきである。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」、及び「含有する（containing）」は、特に断らない限り、オープンエンドな用語である（すなわち、「含むがこれらに限定されない」を意味する）と解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において他の指定がない限り、単に、範囲内の各別個の値を個々に参照する省略法として機能することを意図し、各別個の値が、本明細書に個々に列挙されているかのように明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、任意の好適な順序で実施することができる。本明細書に提供される任意の及び全ての例又は例示的な表現（例えば、「など」）の使用は、特に主張しない限り、単に本発明をより深く説明することを意図し、本発明の範囲の限定を提起するものではない。明細書中の表現はいずれも、任意の請求されていない要素が本発明の実施に必須であることを示すと解釈されるべきではない。

【0424】

本発明の好ましい実施形態は、本発明を実施するための本発明者らに公知の最良の形態を含む、本明細書に記載される。好ましい実施形態の変形は、前述の記載を読んだときに当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形を適宜使用すると予想し、そして、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されているのとは別の方法で本発明が実施されることを意図している。したがって、本発明は、準拠法によって認められている通り、本明細書に添付される特許請求の範囲に列挙される発明主題の全ての変形及び等価物を含む。更に、その全ての可能な変形における上記要素の任意の組み合わせは、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、本発明によって包含される。

10

20

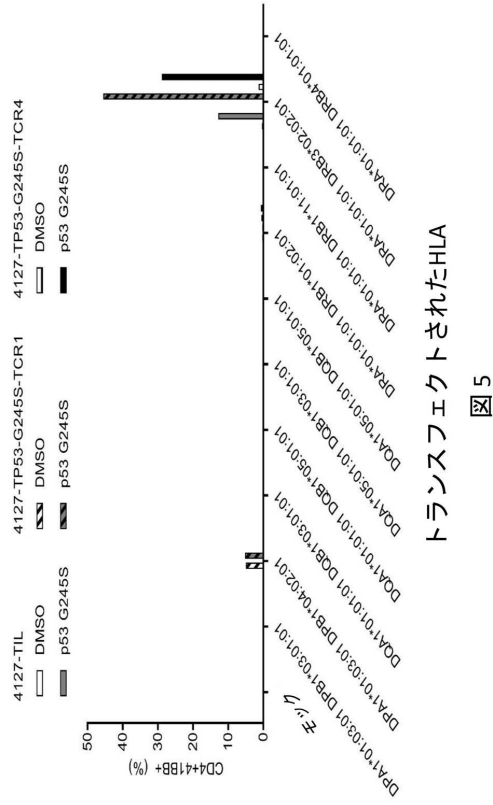
30

40

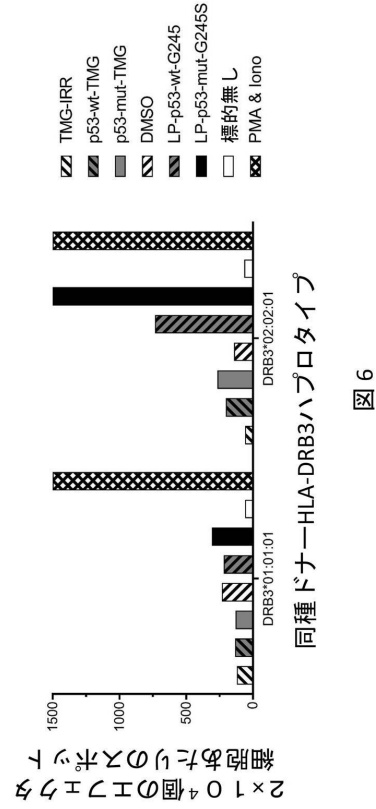
50



【図 5】

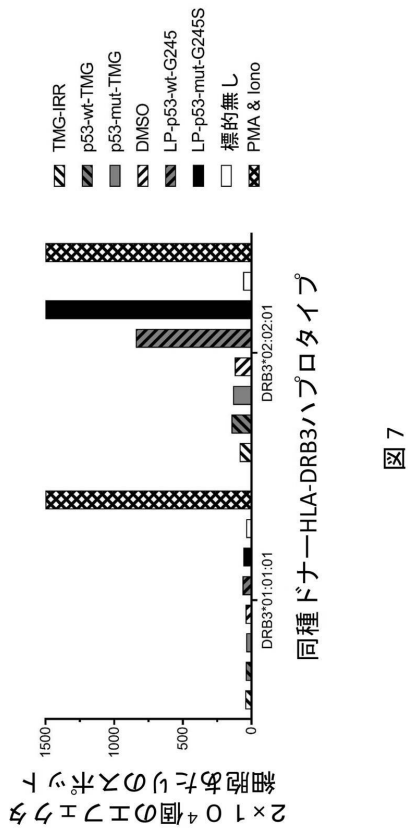


【図 6】

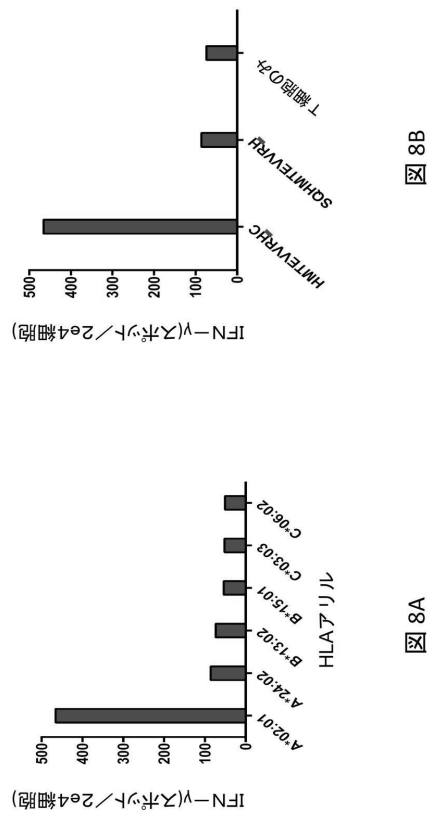


6 ☒ 炎

【図 7】



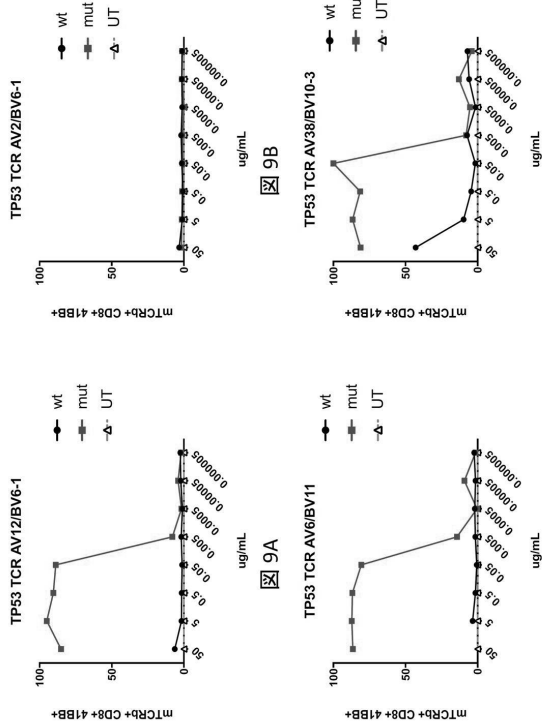
【図 8】



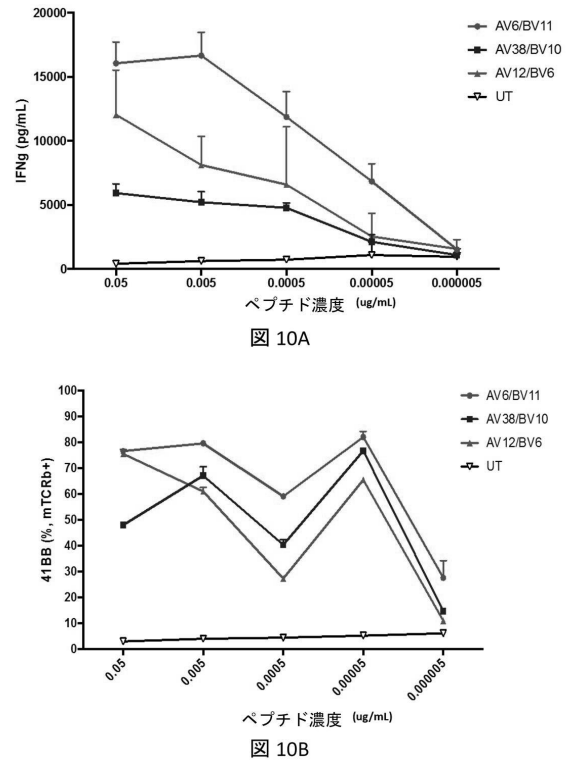
8A

8B

【図 9】



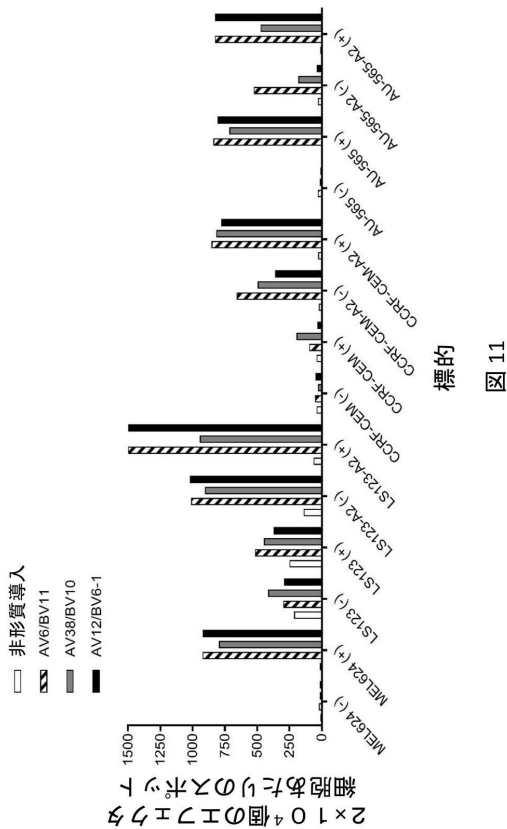
【図 10】



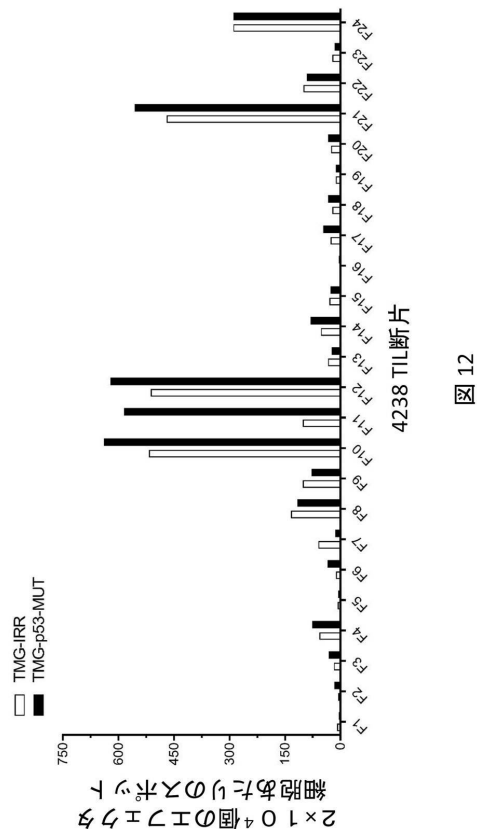
10

20

【図 11】



【図 12】



30

40

50

【図 13】

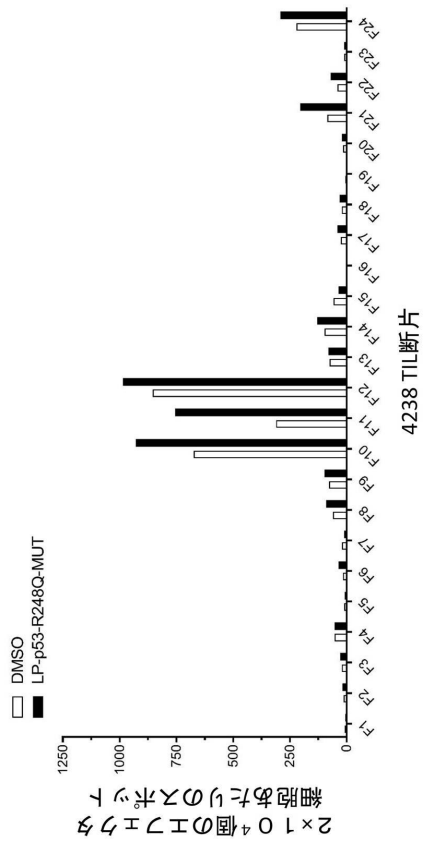


図 13

【図 14】

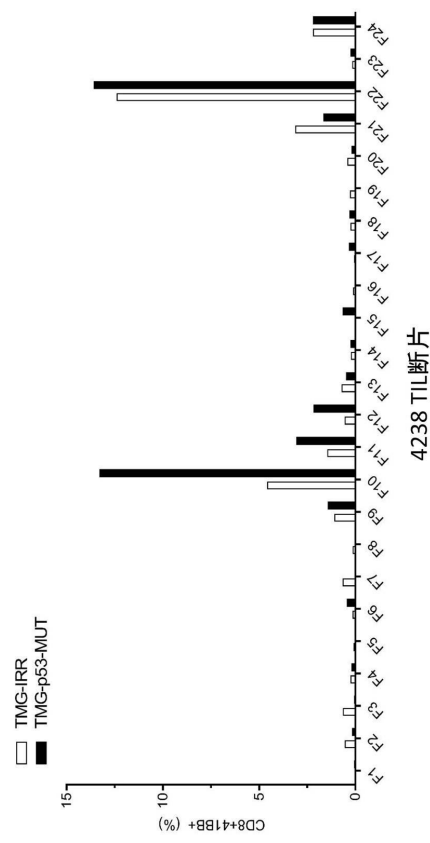


図 14

【図 15】

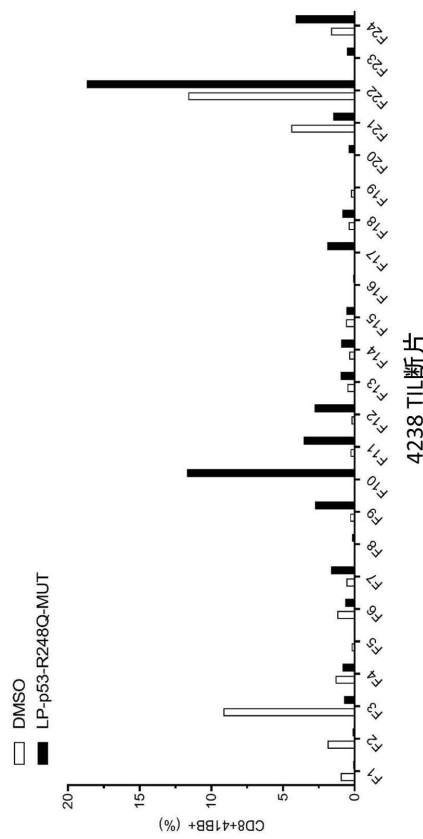


図 15

【図 16】

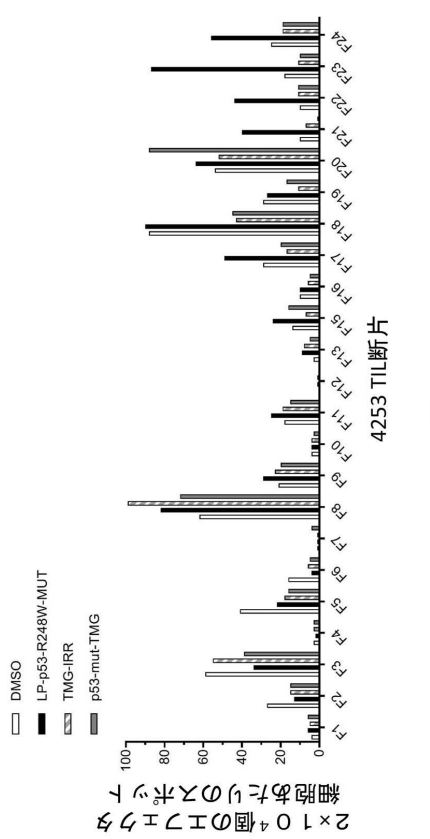


図 16

10

20

30

40

50

【図 17】

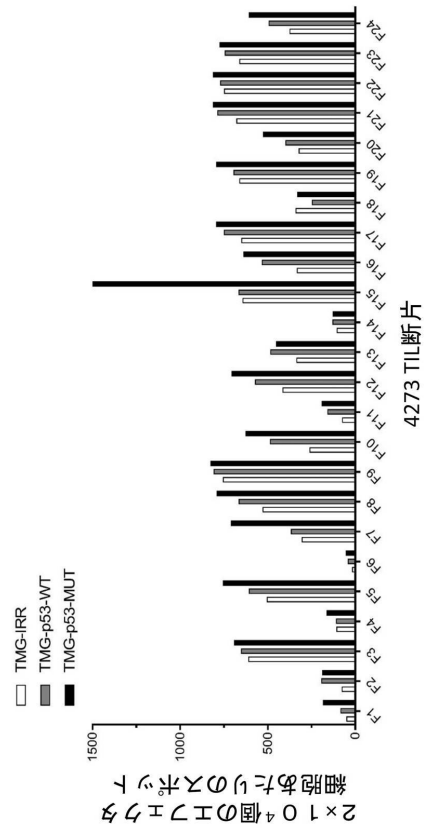


図 17

【図 18】

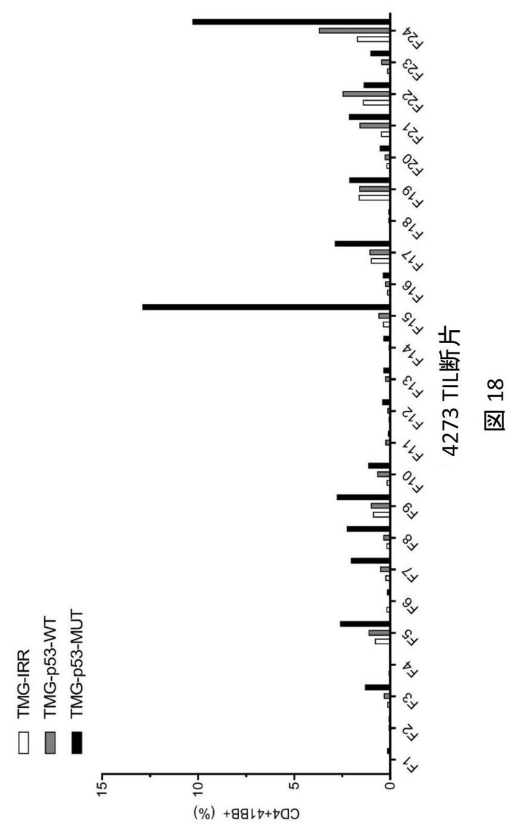


図 18

【図 19】

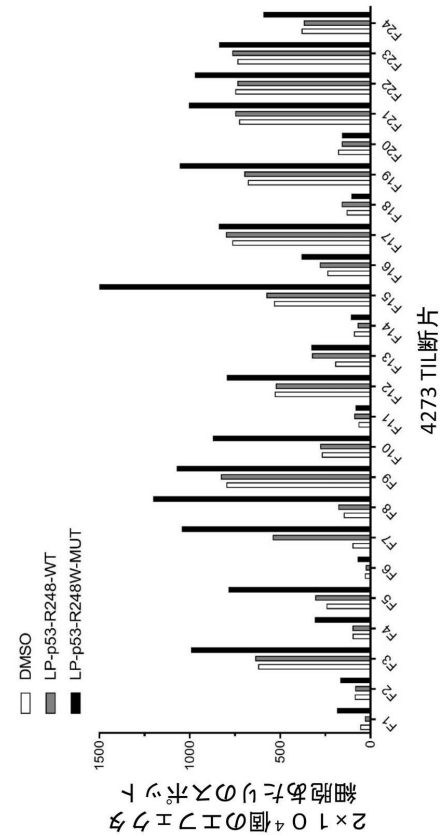


図 19

【図 20】

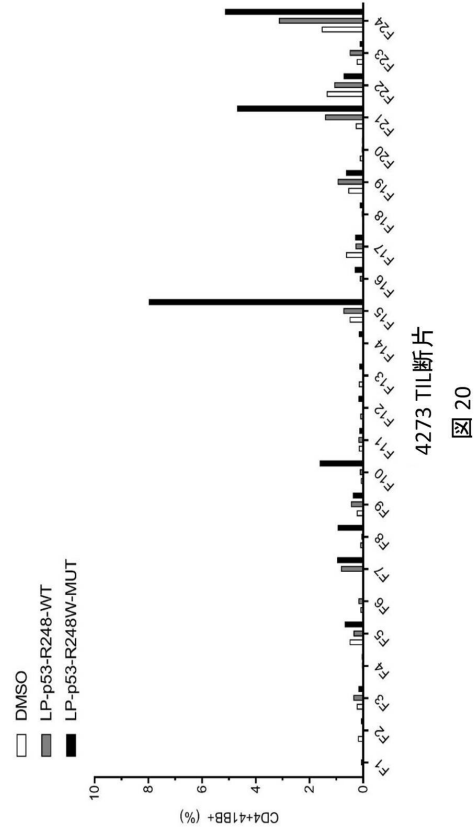


図 20

10

20

30

40

50

【図 2 1】

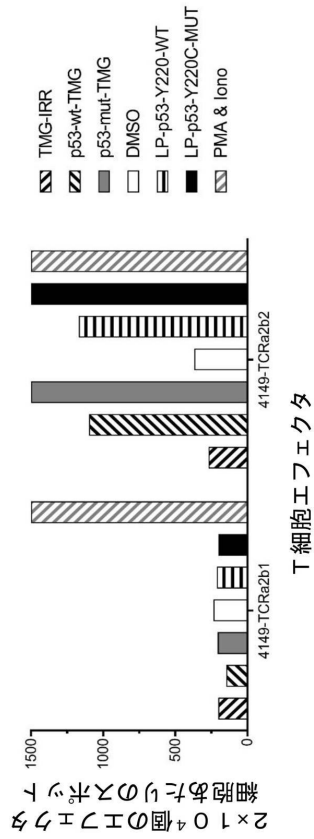


図 21

【図 2 2】

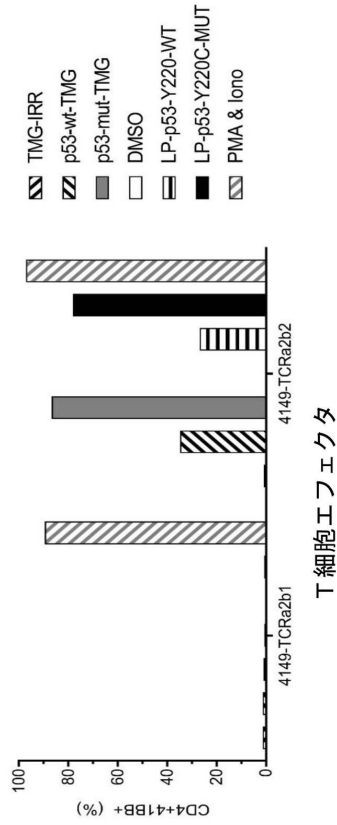


図 22

【図 2 3】

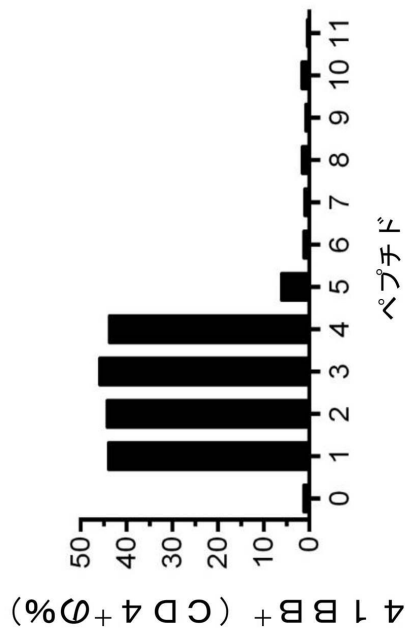


図 23

【図 2 4】

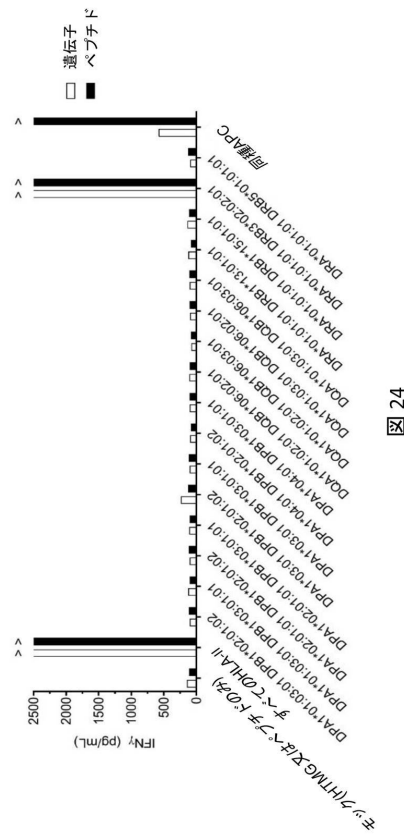


図 24

【図 25】

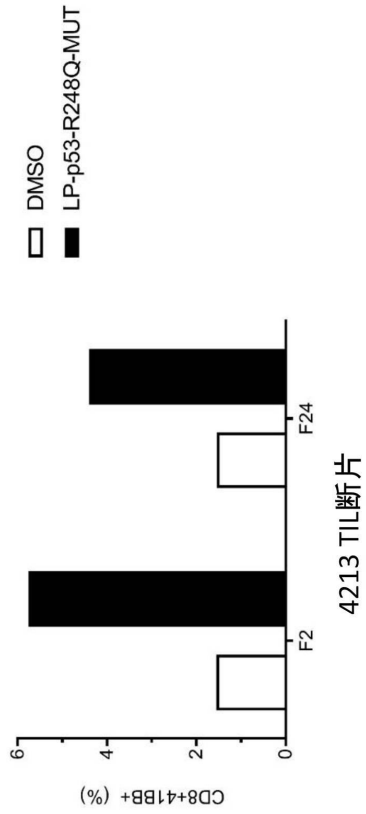


図 25

【図 26】

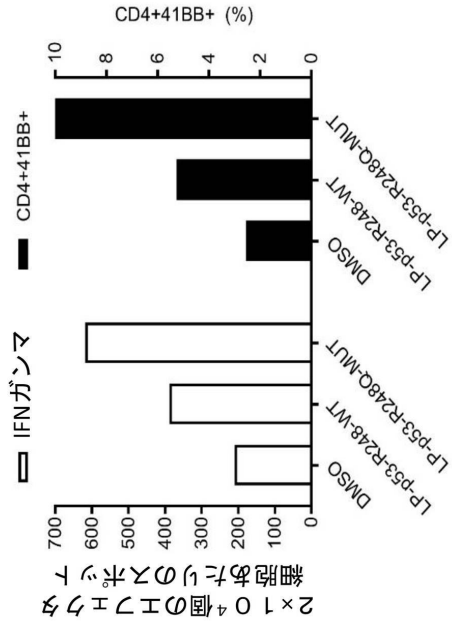


図 26

【図 27】

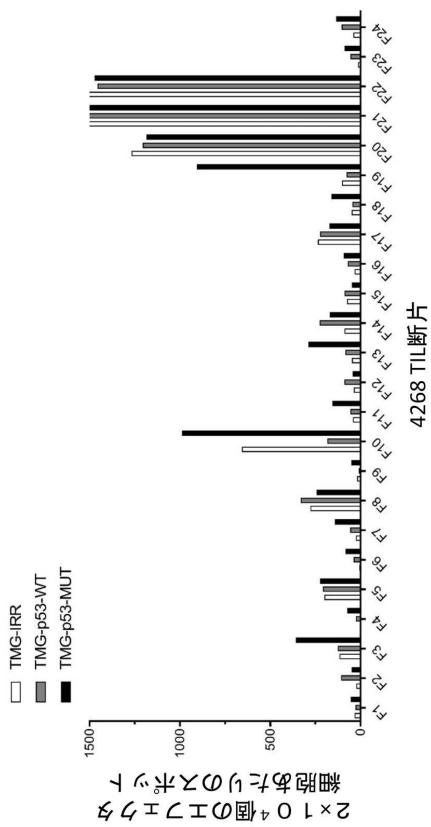


図 27

【図 28】

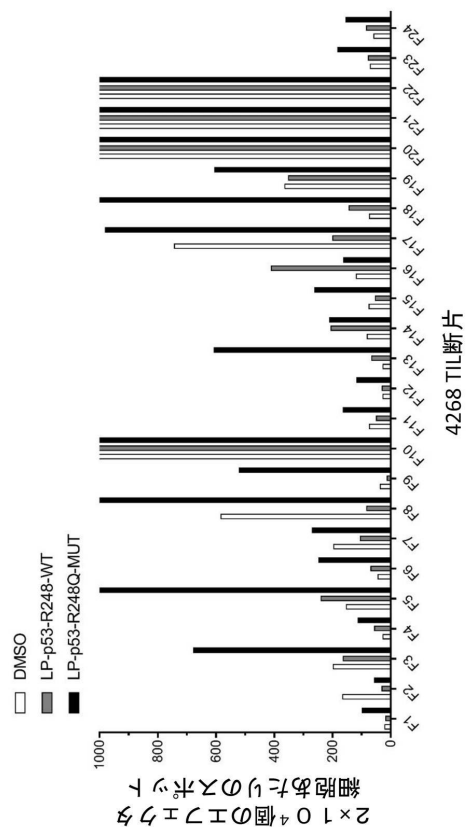


図 28

【図 29】

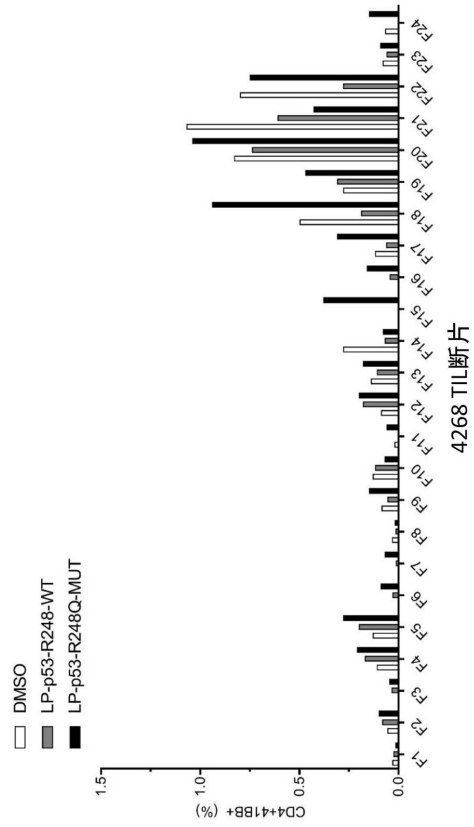


図 29

【図 30】

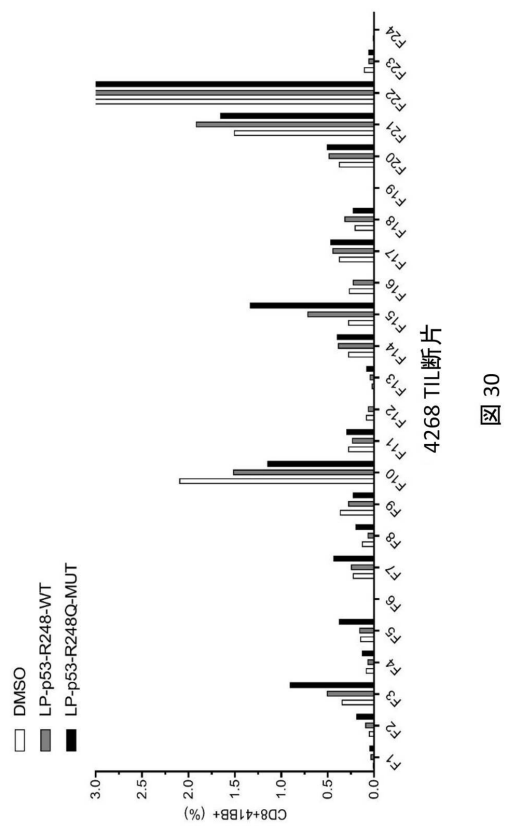


図 30

【図 31】

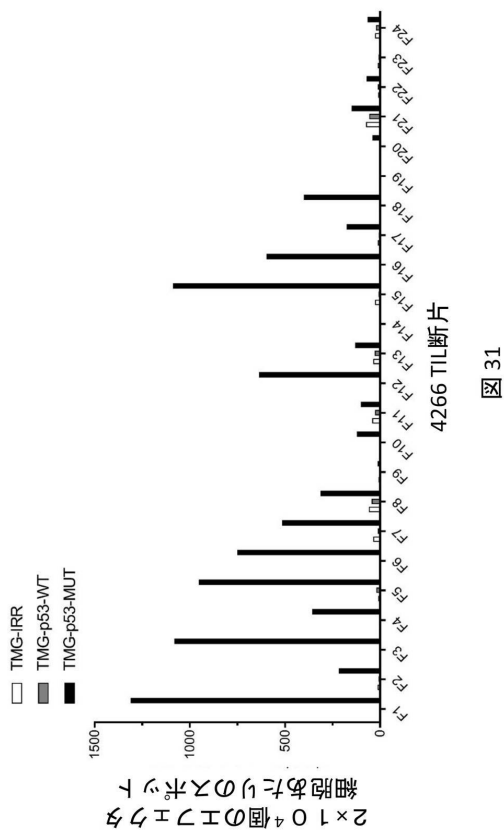


図 31

【図 32】

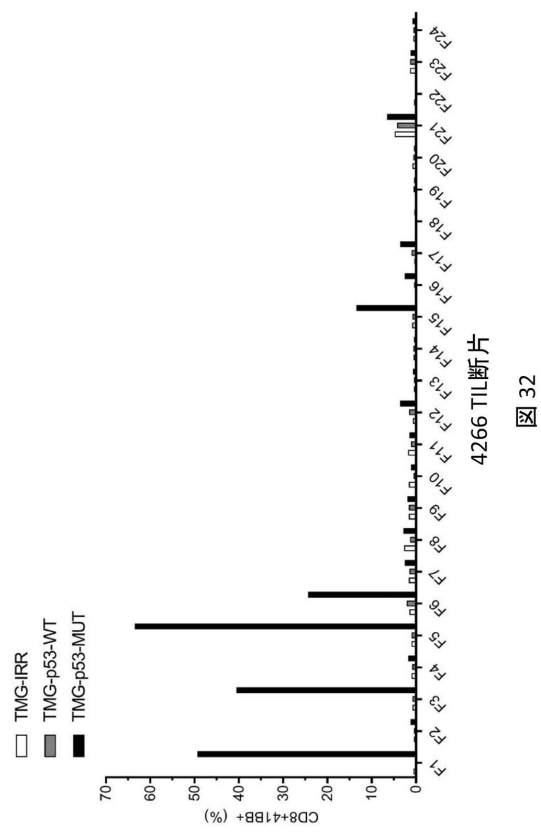


図 32

10

20

30

40

50

【図 3 3】

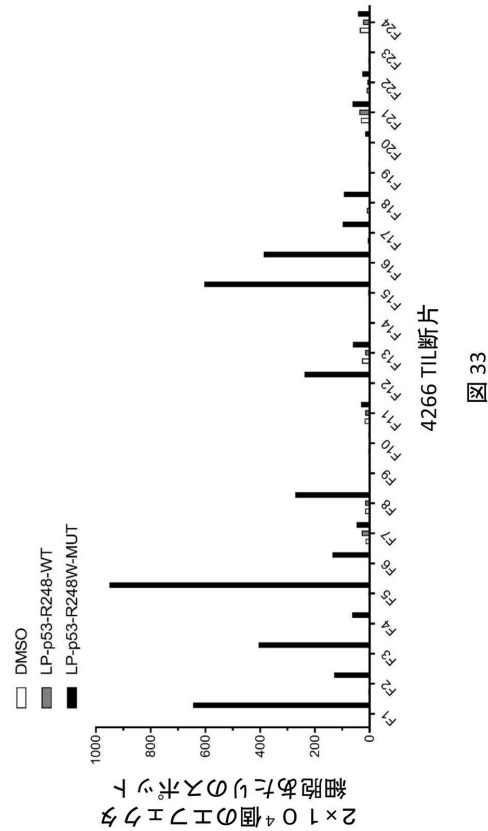


図 33

【図 3 4】

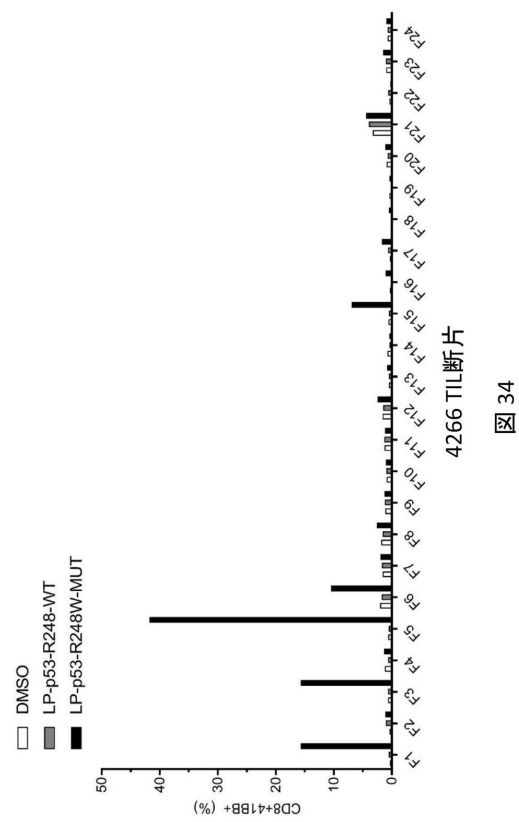


図 34

【図 3 5】

CLUSTAL O(1.2.4) 多重配列整理

```
SP|P04637|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 66
SP|P04637-2|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 66
SP|P04637-3|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 66
SP|P04637-4|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 21
SP|P04637-5|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 21
SP|P04637-6|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 21
SP|P04637-7|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 21
SP|P04637-8|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 21
SP|P04637-9|P53_HUMAN  MEEFQSDPSVEPLSQETFSDLKLLPENNVLSPLPSQAMQDLMLSPDQTEQFTEDPGP 21

SP|P04637|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 128
SP|P04637-2|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 128
SP|P04637-3|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 128
SP|P04637-4|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 81
SP|P04637-5|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 81
SP|P04637-6|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 81
SP|P04637-7|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 81
SP|P04637-8|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 81
SP|P04637-9|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPSNPLSSVSPQKTYQSGVGRFLGHSHTAK 81

SP|P04637|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 188
SP|P04637-2|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 188
SP|P04637-3|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 188
SP|P04637-4|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 141
SP|P04637-5|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 141
SP|P04637-6|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 141
SP|P04637-7|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 48
SP|P04637-8|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 48
SP|P04637-9|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNMFCQAKTQVQLWVSTFPPGTRVRAMATYVQSGHTEVVRRCNHE 48

SP|P04637|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 248
SP|P04637-2|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 248
SP|P04637-3|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 248
SP|P04637-4|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 281
SP|P04637-5|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 281
SP|P04637-6|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 281
SP|P04637-7|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 188
SP|P04637-8|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 188
SP|P04637-9|P53_HUMAN  RCSDSGLAPQHLIRVEGNLRYEVDLNTFRHSVVPVEPVEGSDCTTHYNYMNC 188

SP|P04637|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 380
SP|P04637-2|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 380
SP|P04637-3|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 380
SP|P04637-4|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 261
SP|P04637-5|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 261
SP|P04637-6|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 261
SP|P04637-7|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 168
SP|P04637-8|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 168
SP|P04637-9|P53_HUMAN  SCGGMNRRPILITITLEDSSGILGNSFEVRCACGDRDTEENLRKKGEPHEL 168

SP|P04637|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 368
SP|P04637-2|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 341
SP|P04637-3|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 346
SP|P04637-4|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 321
SP|P04637-5|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 382
SP|P04637-6|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 387
SP|P04637-7|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 228
SP|P04637-8|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 289
SP|P04637-9|P53_HUMAN  PGSTRALPNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMRELNEALEKDAQAGEP 214

SP|P04637|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 393
SP|P04637-2|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 341
SP|P04637-3|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 354
SP|P04637-4|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 354
SP|P04637-5|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 261
SP|P04637-6|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 261
SP|P04637-7|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 261
SP|P04637-8|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 261
SP|P04637-9|P53_HUMAN  GSRHSHLSKSKKGQTSRHKLMFKTEGPDS 261
```

FIG. 35

【図 3 6】

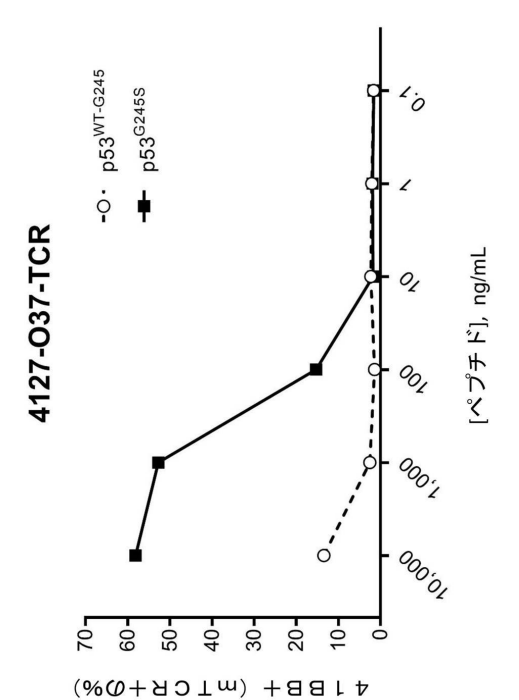


図 36

【図 37】

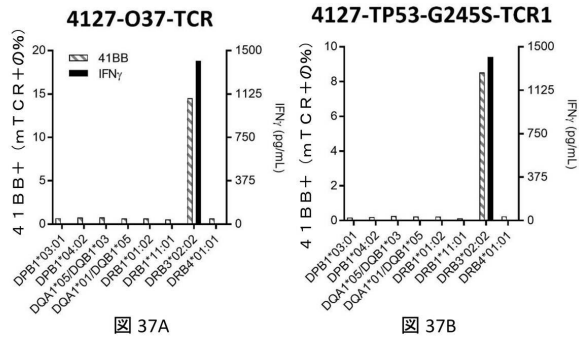


図 37A

図 37B

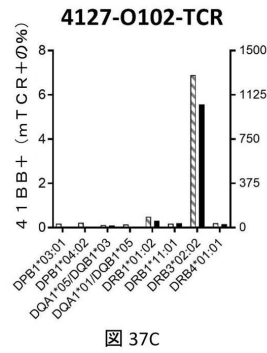


図 37C

【図 38】

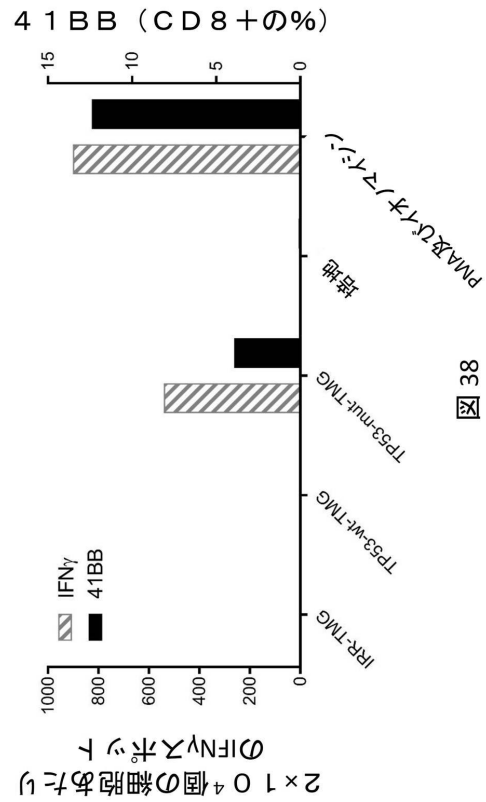


図 38

【図 39】

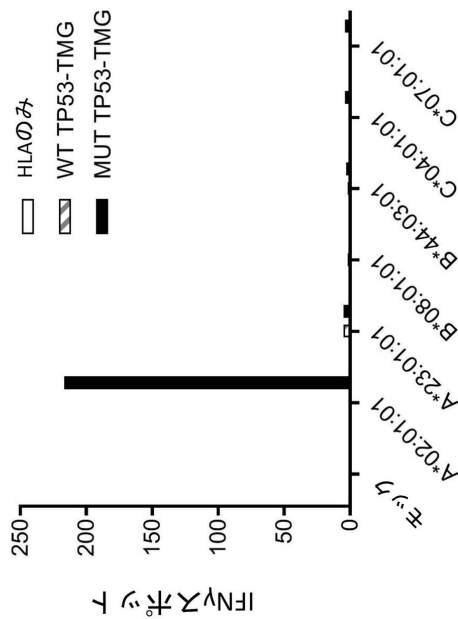


図 39

【図 40】

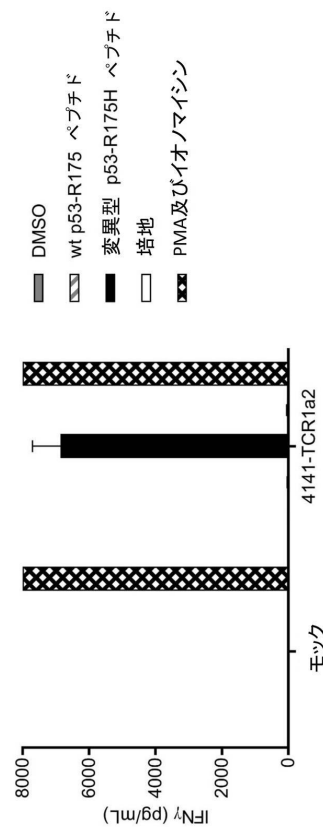


図 40

10

20

30

40

50

【図 4 1】

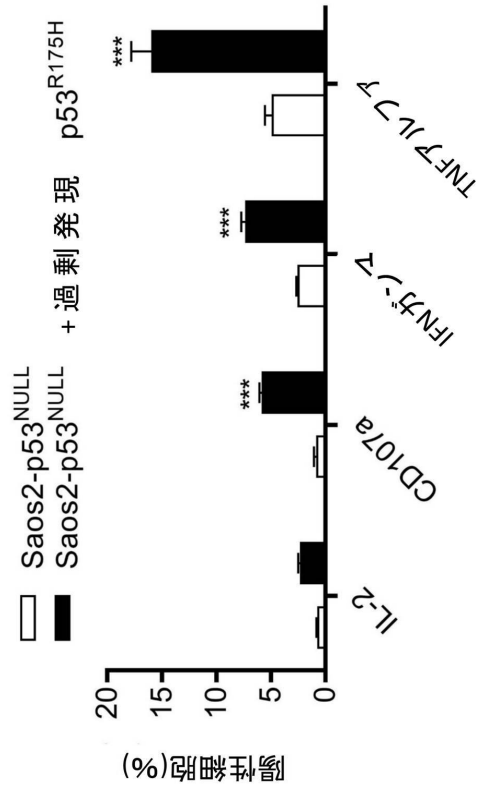


図 41

【図 4 2】

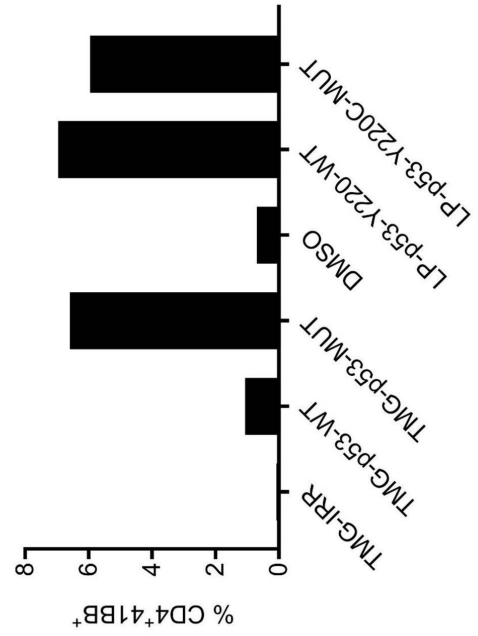


図 42

【図 4 3】

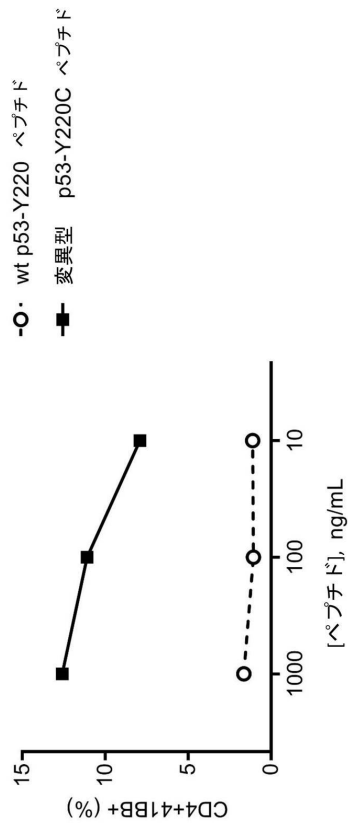


図 43

【図 4 4】

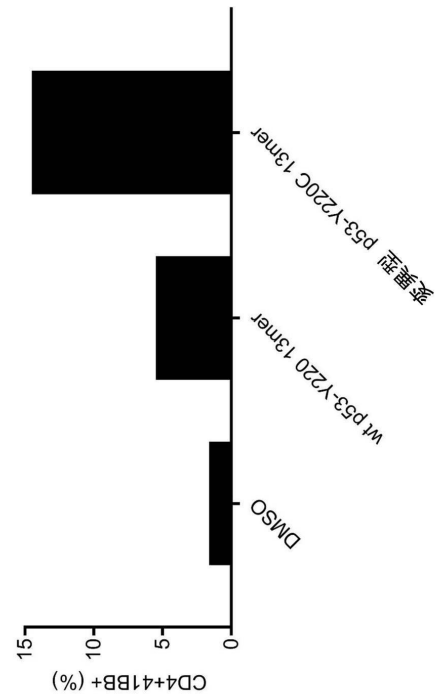


図 44

【図 45】

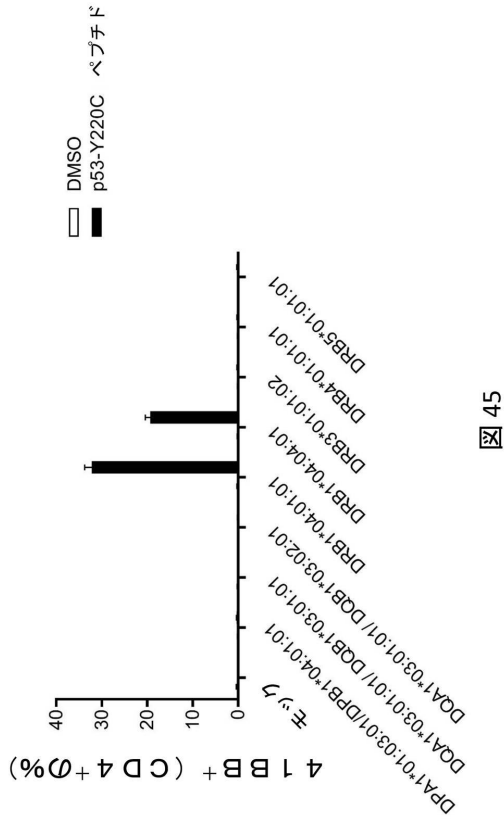


図 45

【図 46】

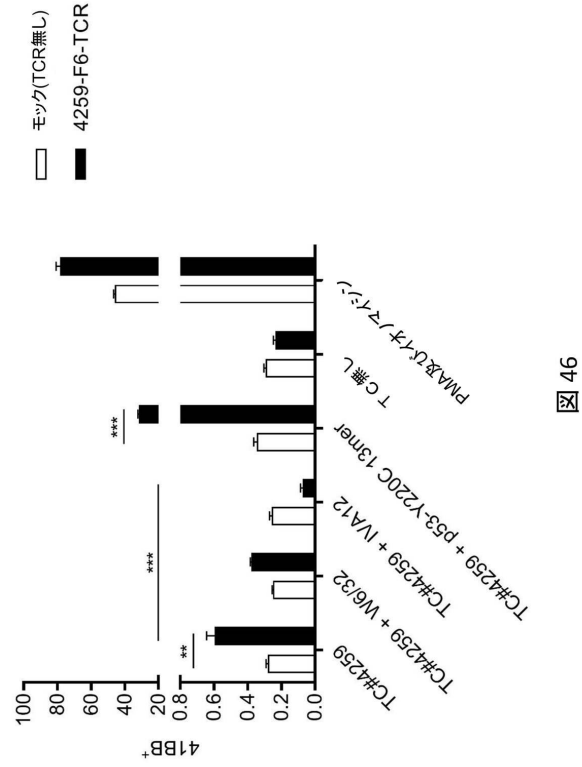


図 46

【図 47】

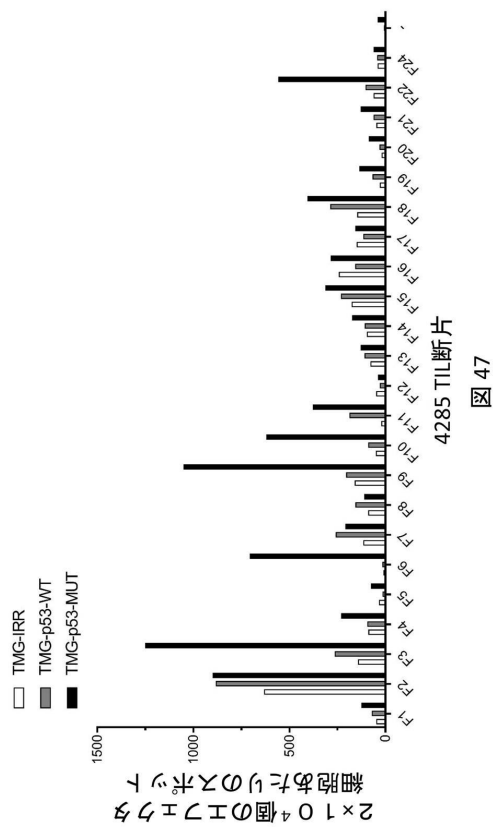


図 47

【図 48】

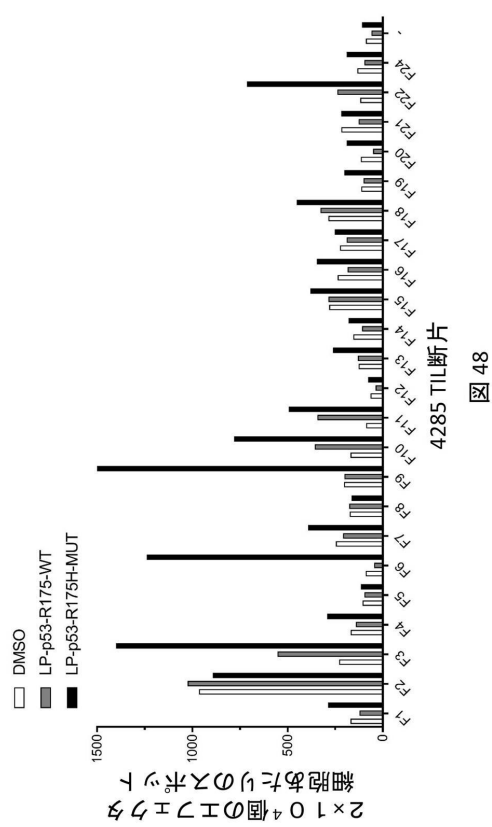


図 48

【図 49】

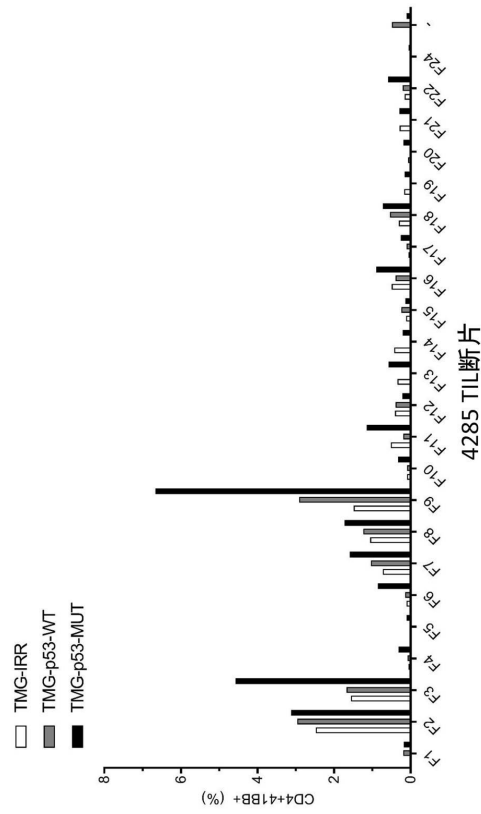


図 49

【図 50】

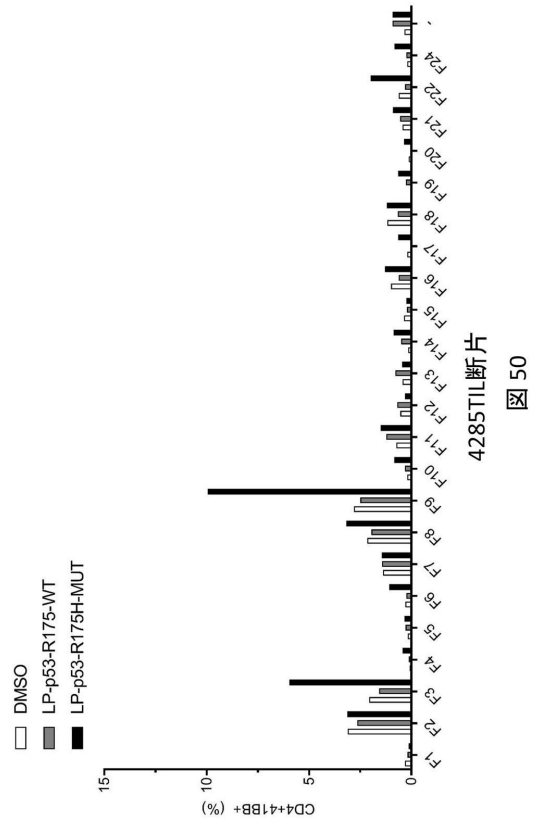


図 50

【図 51】

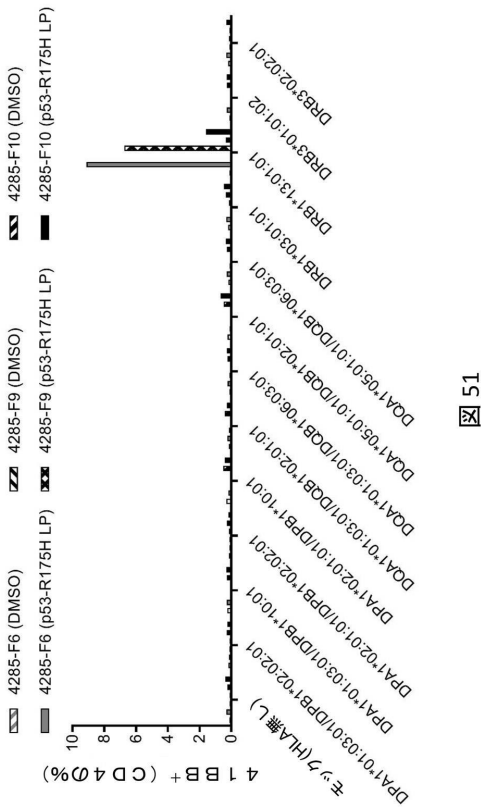


図 51

【図 52】

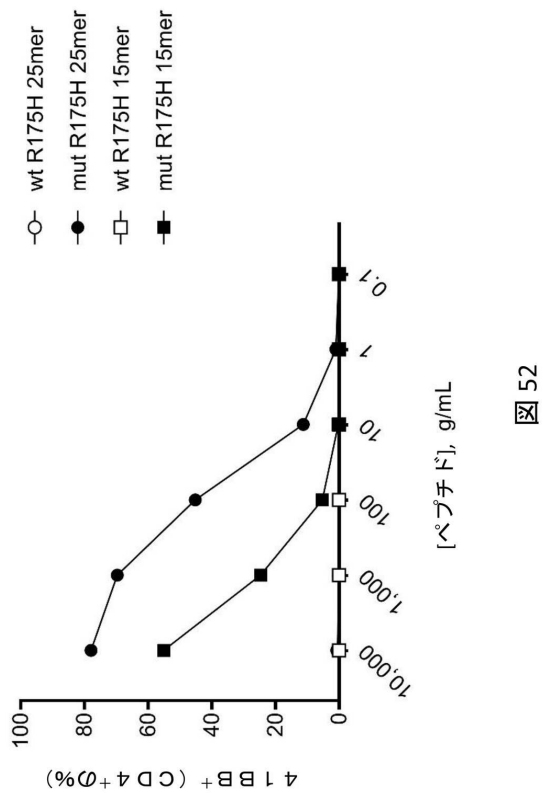


図 52

10

20

30

40

50

【図 5 3】

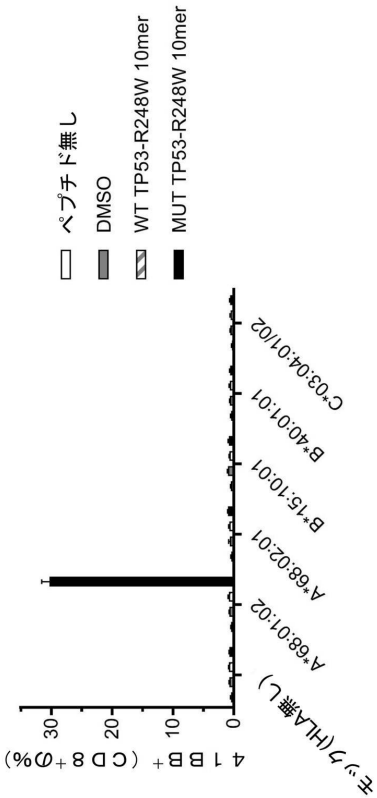


図 53

【図 5 4】

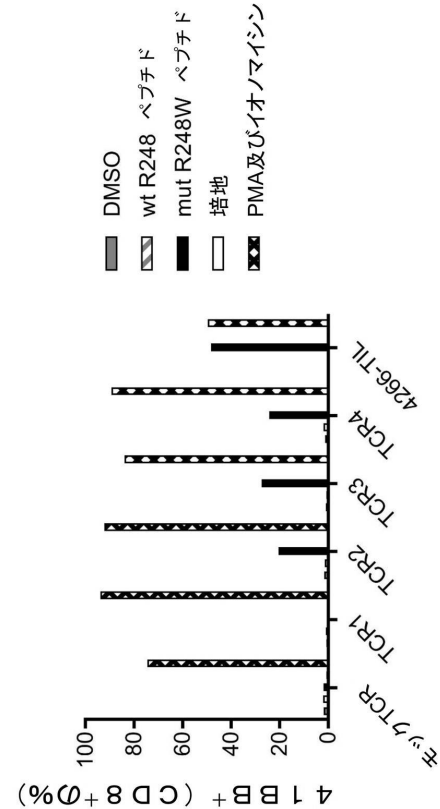


図 54

【図 5 5】

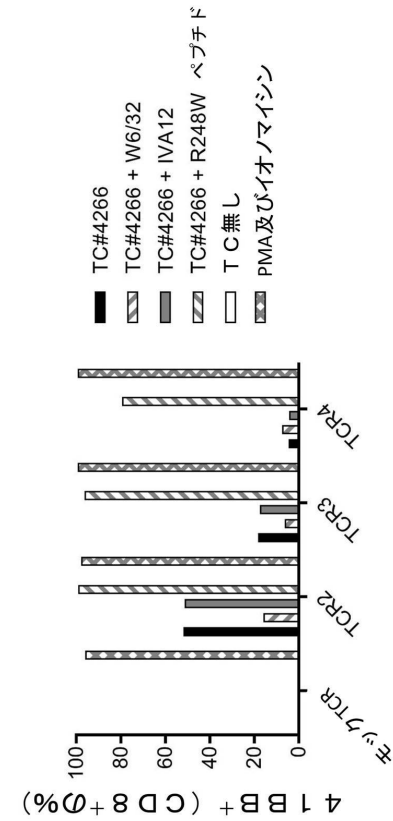


図 55

【図 5 6】

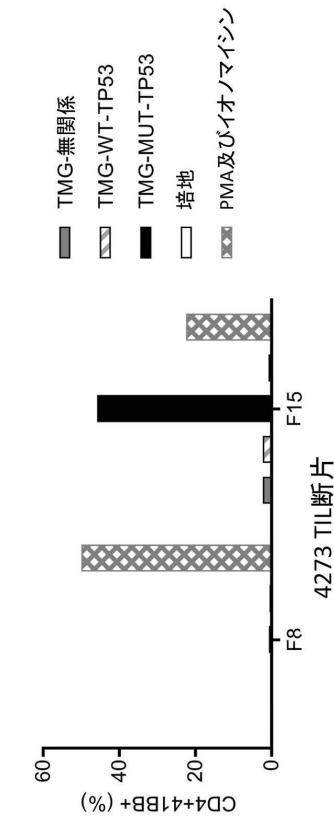


図 56

【図 57】

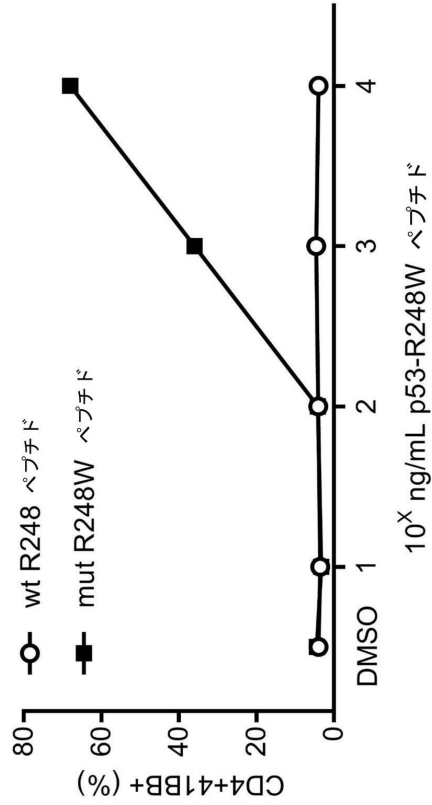


図 57

【図 58】

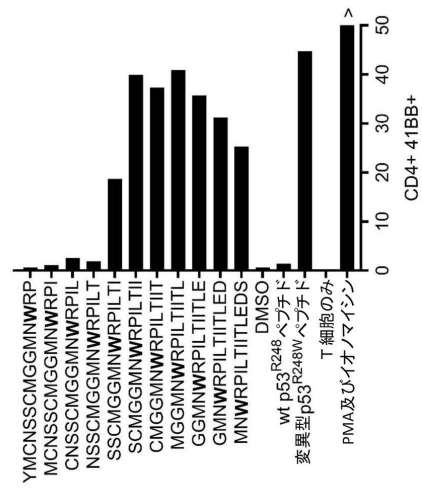


図 58

【図 59】

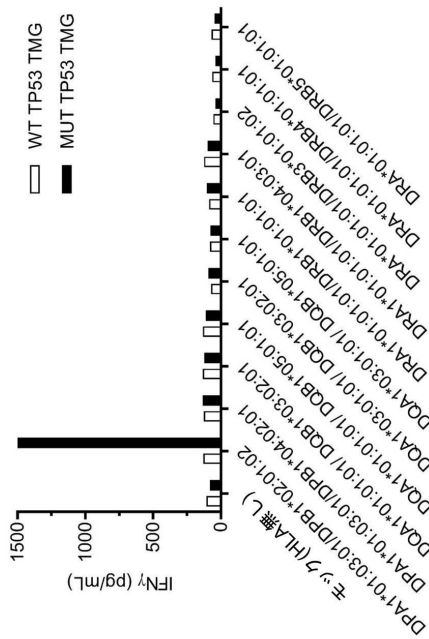


図 59

【図 60】

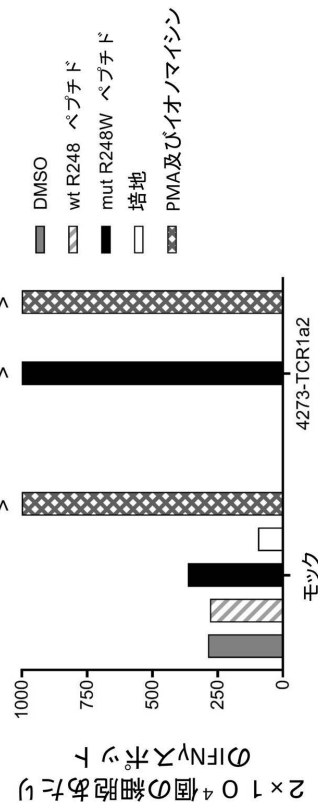


図 60

【配列表】  
0007324193000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

|                |                         |                |               |          |
|----------------|-------------------------|----------------|---------------|----------|
| <b>C 1 2 N</b> | <b>5/10 (2006.01)</b>   | <b>C 1 2 N</b> | <b>5/10</b>   |          |
| <b>C 1 2 Q</b> | <b>1/02 (2006.01)</b>   | <b>C 1 2 Q</b> | <b>1/02</b>   |          |
| <b>C 0 7 K</b> | <b>14/725 (2006.01)</b> | <b>C 0 7 K</b> | <b>14/725</b> |          |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>35/00 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 P</b> | <b>35/00</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>38/17 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 K</b> | <b>38/17</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>48/00 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 K</b> | <b>48/00</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>35/12 (2015.01)</b>  | <b>A 6 1 K</b> | <b>35/12</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>35/76 (2015.01)</b>  | <b>A 6 1 K</b> | <b>35/76</b>  |          |
| <b>G 0 1 N</b> | <b>33/574 (2006.01)</b> | <b>G 0 1 N</b> | <b>33/574</b> | <b>A</b> |
|                |                         | <b>G 0 1 N</b> | <b>33/574</b> | <b>D</b> |

- (74)代理人 100121212  
弁理士 田村 弥栄子
- (74)代理人 100174296  
弁理士 富麻 博文
- (74)代理人 100137729  
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301  
弁理士 戸崎 富哉
- (72)発明者 デニガー、ドリュウ シー。  
アメリカ合衆国、7 7 0 0 5 テキサス州、ヒューストン、マーロウ ストリート 4 0 2 0
- (72)発明者 ローゼンバーグ、スティーヴン エー。  
アメリカ合衆国、2 0 8 5 4 メリーランド州、ポトマック、アイアン ゲイト ロード 1 0 1 0 4
- (72)発明者 バセット、アンナ  
スウェーデン国、1 1 5 5 7、ストックホルム、スチューデントバックケン 3 4、アパートメント 1 5 0 1
- (72)発明者 ヨセフ、ラミ  
アメリカ合衆国、2 0 8 5 0 メリーランド州、ロックヴィル、エルムクロフト ブールヴァード 6 4 0 アpartment 1 4 0 9
- (72)発明者 ロ、ウィニフレッド エム。  
アメリカ合衆国、4 5 2 0 6 オハイオ州、シンシナティ、ヴィクトリー パークウェイ 2 2 0 0、アpartment 8 0 5
- (72)発明者 ルー、ヨナーチェン  
アメリカ合衆国、2 0 8 5 2 メリーランド州、ロックヴィル、イースト ジェファークソン 1 6 2 0、アpartment 1 1 1
- (72)発明者 パークハースト、マリア アール。  
アメリカ合衆国、2 1 0 4 3 メリーランド州、エリコット シティ、グレース コート 4 9 3 8
- (72)発明者 ロビンズ、ポール エフ。  
アメリカ合衆国、2 0 8 1 5 メリーランド州、チェヴィー チェイス、グレンデール ロード 7 9 0 7
- (72)発明者 マレクザデ、パリサ  
アメリカ合衆国、2 3 5 1 0 ヴァージニア州、ノーフォーク、イースト メイン ストリート 3 2 1 アpartment 1 9 0 9

審査官 田ノ上 拓自

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 6 / 1 8 7 5 0 8 (WO, A 2)

Eur. J. Immunol. 1993年, Vol.23, p.2072-2077

Protein Cell, 2017年1月20日, Vol.9, No.3, p.254-266, DOI 10.1007/s13238-016-0367-1

Seminars in Immunology, 2016年, Vol.28, p.22-27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.11.002>

SCIENCE, 2015年, Vol.348, Issue 6230, p.62-68, DOI: 10.1126/science.aaa4967

Nature Reviews Clinical Oncology, 2017年9月26日, Vol.15, p.13-30

The Journal of Immunology, 2005年, Vol.175, p.5799-5808, doi: 10.4049/jimmunol.175.9.5799

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 Q 1 / 0 2

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 K 3 8 / 1 6

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 1 2

A 6 1 K 3 5 / 7 6

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )