

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 11 月 5 日(05.11.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/166640 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2015/002132

(22) 国際出願日:

2015 年 4 月 17 日(17.04.2015)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2014-094869 2014 年 5 月 1 日(01.05.2014) JP

(71) 出願人: 株式会社アネロファーマ・サイエンス
(ANAEROPHARMA SCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒
1030026 東京都中央区日本橋兜町 1 9 - 8 八重
洲 K H ビル 4 F Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小関 弘恵知(KOSEKI, Koichi); 〒3908621
長野県松本市旭 3 - 1 - 1 株式会社アネロ
ファーマ・サイエンス研究所内 Nagano (JP). 榎
木 健(MASAKI, Takeshi); 〒3908621 長野県松本
市旭 3 - 1 - 1 株式会社アネロファーマ・サイ
エンス研究所内 Nagano (JP). 塩谷 公一郎(SH-
IOYA, Koichiro); 〒3908621 長野県松本市旭 3 - 1
- 1 株式会社アネロファーマ・サイエンス研究
所内 Nagano (JP). 清水 瞳(SHIMIZU, Hitomi); 〒
3908621 長野県松本市旭 3 - 1 - 1 株式会社ア
ネロファーマ・サイエンス研究所内 Nagano (JP).
塚本 匡央(TSUKAMOTO, Masao); 〒3908621 長野
県松本市旭 3 - 1 - 1 株式会社アネロファーマ
・サイエンス研究所内 Nagano (JP). 小林 聡
(KOBAYASHI, Satoshi); 〒3908621 長野県松本市旭
3 - 1 - 1 株式会社アネロファーマ・サイエン
ス研究所内 Nagano (JP). 松村 富穂(MAT-
SUMURA, Tomio); 〒3908621 長野県松本市旭 3 -

1 - 1 株式会社アネロファーマ・サイエンス研
究所内 Nagano (JP). 嶋谷 裕子(SHIMATANI,
Yuko); 〒3908621 長野県松本市旭 3 - 1 - 1 株式
会社アネロファーマ・サイエンス研究所内
Nagano (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒
1070052 東京都港区赤坂二丁目 2 番 1 9 号アド
レスビル 6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: HETEROGENEOUS POLYPEPTIDE EXPRESSION CASSETTE

(54) 発明の名称: 異種ポリペプチド発現カセット

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a signal peptide which enables the highly efficient secretion of a heterogeneous polypeptide produced in a cell of a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* to the outside of the cell; an expression cassette which enables the efficient secretion of the heterogeneous polypeptide to the outside of the cell; an expression vector for the heterogeneous polypeptide; and a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, in which the heterogeneous polypeptide can be secreted. A means for solving the problem is a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, which is transformed with a vector having an expression cassette inserted therein, wherein the expression cassette comprises promoter DNA capable of acting in a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, DNA encoding the secretion signal peptide, DNA encoding a single-strand antibody having an anti-tumor activity, and terminator DNA capable of acting in a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* in this order. The single-strand antibody produced in the *Bifidobacterium* bacterium can be secreted efficiently to the outside of a cell of the bacterium.

(57) 要約: ビフィドバクテリウム属細菌において、異種ポリペプチドを菌体外に高効率で分泌することができるシグナルペプチドや、異種ポリペプチドを菌体外に効率的に分泌することができる発現カセットや、異種ポリペプチド発現ベクターや、異種ポリペプチドを分泌しうるビフィドバクテリウム属細菌を提供することを課題とする。その解決手段として、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーター DNA と、上記分泌シグナルペプチドをコードする DNA と、抗腫瘍活性を有する一本鎖抗体をコードする DNA と、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーター DNA とを順次含む発現カセットが挿入されたベクターを用いて形質転換したビフィドバクテリウム属細菌が一本鎖抗体を効率よく菌体外に分泌することができる。

WO 2015/166640 A1

明 細 書

発明の名称：異種ポリペプチド発現カセット

技術分野

[0001] 本発明は、プロモーターDNA、分泌シグナルペプチドをコードするDNA、リンカーペプチドをコードするDNA、異種ポリペプチドをコードするDNA、ターミネーターDNAを順次含む、ビフィドバクテリウム属細菌内で発現する発現カセットに関する。また、本発明は、上記発現カセットを含むベクターや、該ベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌や、該細菌を含む医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] 近年、がん等の疾病に対して、遺伝子輸送担体を用いる治療方法の開発が進んでいる。例えば、嫌気性腸内細菌について、全身投与後、低酸素の固形腫瘍に蓄積する性質を利用して、抗腫瘍活性を有するタンパク質又は抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有するタンパク質を発現する遺伝子を標的患部において発現できる形質転換微生物（例えば、特許文献1参照）等が提案されている。

[0003] また、プロモーター、シグナル配列をコードするDNA、ポリペプチドをコードするDNA、又は該DNAを挿入するためのクローニング部位を含む発現カセット（例えば、特許文献2参照）や、シグナルペプチド、単鎖抗体及び一又は二以上の異種ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸を発現可能な状態で含む組換え偏性嫌気性グラム陽性菌（例えば、特許文献3参照）が提案されている。

[0004] しかしながら、上記文献において提案されているシグナルペプチドは、膜タンパク質や分泌タンパク質に見いだされたシグナルペプチドであり、より分泌効率に優れたシグナルペプチドを特定することが期待されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開WO 2006／109619号パンフレット

特許文献2：国際公開WO 2010／126073号パンフレット

特許文献3：国際公開WO 2014／010758号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、ビフィドバクテリウム属細菌による異種ポリペプチドの産生において、かかる異種ポリペプチドを菌体外に高効率で分泌することができるシグナルペプチドや、かかるシグナルペプチドを利用して異種ポリペプチドを菌体外に効率的に分泌することができる異種ポリペプチドの発現カセットや、該発現カセットを組み込んだ異種ポリペプチド発現ベクターや、該異種ポリペプチド発現ベクターで形質転換され、異種ポリペプチドを分泌しうるビフィドバクテリウム属細菌を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、5-フルオロシトシンを、抗腫瘍活性を有する5-フルオロウラシルに変換する酵素であるシトシン・デアミナーゼ遺伝子を組み込んだベクターを用いて形質転換した、固形がんにおいて特異的に集積、生育するビフィドバクテリウム属細菌を用いる抗がん療法を既に開発している。今回、本発明者らは、標的細胞を特異的に認識する抗体ペプチドと異種ポリペプチドを、局所的にビフィドバクテリウム属細菌で発現・分泌させることにより、各種疾病を治療することができるという知見に基づき、ビフィドバクテリウム属細菌に適用可能な従来公知の分泌シグナルペプチドよりもより効率的に、異種ポリペプチドを発現・分泌させることができる分泌シグナルペプチドを特定しようと試みた。その結果、SP7と命名した分泌シグナルペプチドをはじめとする複数の分泌シグナルペプチドを見いだした。さらに、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターDNAと、上記分泌シグナルペプチドをコードするDNAと、リンカーペプチドをコードするDNAと、抗腫瘍活性を有する一本鎖抗体（single chain fragment variable antibody：scFv antibody）をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム

属細菌で機能するターミネーターDNAとを順次含む発現カセットが挿入されたベクターを用いて形質転換したビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) が一本鎖抗体を効率よく菌体外に分泌することを確認した。さらに、かかる菌体外に分泌された一本鎖抗体は、上記分泌シグナルペプチド配列の種類と、その下流のリンカーペプチド配列のアミノ酸数の相違により、菌体外への分泌量、分泌された一本鎖抗体の抗原への結合能、競合的結合阻害活性に相違が生じることを確認し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 以下の(1)～(4)のDNAを順次含むことを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌内で発現する発現カセット。

(1) ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターDNA；

(2) 以下のa)又はb)に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードするDNA；

a) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列；

b) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列からなるペプチドがビフィドバクテリウム属細菌において分泌シグナルペプチドとして機能するアミノ酸配列；

(3) 異種ポリペプチドをコードするDNA；

(4) ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターDNA；

[2] 分泌シグナルペプチドをコードするDNAの下流にリンカーペプチドをコードするDNAが連結されていることを特徴とする上記[1]記載の発現カセット。

[3] リンカーペプチドが、配列番号25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及び35のいずれかに示されるアミノ酸配列の

C末端からアミノ酸残基が0～29欠損した各アミノ酸配列からなることを特徴とする上記〔2〕記載の発現カセット。

〔4〕リンカーペプチドが、配列番号25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及び35のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が10～29欠損した各アミノ酸配列からなることを特徴とする上記〔2〕記載の発現カセット。

〔5〕異種ポリペプチドが、一本鎖抗体であることを特徴とする上記〔1〕～〔4〕のいずれか記載の発現カセット。

〔6〕一本鎖抗体が、抗PD-1抗体であることを特徴とする上記〔5〕記載の発現カセット。

〔7〕一本鎖抗体が、抗CTLA-4抗体であることを特徴とする上記〔5〕記載の発現カセット。

〔8〕上記〔1〕～〔7〕のいずれか記載の発現カセットを含むベクター。

〔9〕上記〔8〕記載のベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌。

〔10〕ビフィドバクテリウム・ロンガムである上記〔9〕記載のビフィドバクテリウム属細菌。

〔11〕上記〔9〕又は〔10〕記載のビフィドバクテリウム属細菌を含む医薬組成物。

〔12〕配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド。

〔13〕上記〔12〕記載の分泌シグナルペプチドをコードするDNA。

〔14〕配列番号105、106、107、108、109、110、111、112、113、114及び115のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が0～29欠損した各アミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドーリンカー連結体。

〔15〕配列番号105、106、107、108、109、110、111

1、112、113、114及び115のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が10～29欠損した各アミノ酸配列からなることを特徴とする上記[14]記載の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体。

[16] 上記[14]又は[15]記載の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体をコードするDNA。

その他の態様として、上記[9]又は[10]記載のビフィドバクテリウム属細菌の有効量を対象に投与することを特徴とする治療方法；上記[9]又は[10]記載のビフィドバクテリウム属細菌の、治療薬を調製するための使用；疾病の治療に用いるための上記[9]又は[10]記載のビフィドバクテリウム属細菌；等を挙げることができる。

発明の効果

[0009] 本発明によると、異種ポリペプチドの分泌に優れた発現カセットを利用することにより、効率よく異種ポリペプチドを菌体外に分泌しうるビフィドバクテリウム属細菌を提供することができ、上記異種ポリペプチドがPD-1、CTLA-4等の抗がん作用を有する抗体である場合、かかるビフィドバクテリウム属細菌は抗がん剤として非常に有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本発明の発現カセットの概略図である。(a)は、一本鎖抗体として抗PD-1抗体を用いた場合、(b)は、一本鎖抗体として抗CTLA-4抗体を用いた場合を示す。

[図2]抗PD-1または抗CTLA-4一本鎖抗体分泌プラスミド：pHuSP3L22-scFv-PD-1-1、pHuSP7L20-scFv-PD-1-1、pHuSP23L27-scFv-PD-1-1、pHuSP7L20-scFv-PD-1-2、pHuSP7L20-scFv-PD-1-3、pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1、pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2の作製概要を示す図である。

[図3]各種シグナルペプチドーリンカー連結体を用いた場合の抗PD-1-1

一本鎖抗体分泌プラスミドの作製概要を示す図である。

[図4]各種シグナルペプチドーリンカーペプチド連結体と抗PD-1-1一本鎖抗体とを含む発現カセットが挿入されているベクターを用いて形質転換したビフィドバクテリウム属細菌培養上清中に分泌された抗PD-1-1一本鎖抗体のウェスタン解析による結果を示す図である。

[図5]各種シグナル配列と抗PD-1-1一本鎖抗体とを含む発現カセットが挿入されているベクターを用いて形質転換したビフィドバクテリウム属細菌培養上清中に分泌された抗PD-1-1一本鎖抗体のウェスタン解析による結果を示す図である。

[図6]ビフィドバクテリウム属細菌培養上清中に分泌された各種抗体のウェスタン解析による結果を示す図である。

[図7]ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された、抗PD-1-2一本鎖抗体、抗CTLA-4-1一本鎖抗体、抗CTLA-4-2一本鎖抗体の、ヒトPD-1固相化プレートへの結合の有無の結果を示すグラフである。

[図8]ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された、抗PD-1-2一本鎖抗体と、抗CTLA-4-1一本鎖抗体、抗CTLA-4-2一本鎖抗体の、ヒトCTLA-4固相化プレートへの結合の有無の結果を示すグラフである。

[図9]ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された、抗PD-1-2一本鎖抗体、抗PD-1-3一本鎖抗体、抗CTLA-4-2一本鎖抗体の、マウスPD-1固相化プレートへの結合の有無の結果を示すグラフである。

[図10]ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された、抗PD-1-2一本鎖抗体、抗PD-1-3一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体の、ヒトCTLA-4固相化プレートへの結合の有無の結果を示すグラフである。

[図11]ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された抗PD-1-2一本鎖抗体の、ヒトPD-1発現Jurkat細胞への結合をフローサイトメトリーにより示す図である。

[図12]ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された抗PD-1-2一本鎖抗

体の、ヒトPD-1発現HEK293T細胞への結合をフローサイトメトリーにより示す図である。

[図13]抗CTLA-4-1一本鎖抗体、抗CTLA-4-2一本鎖抗体のヒトCTLA-4に対するヒトCD80の結合阻害率を示すグラフである。

[図14]抗CTLA-4-1一本鎖抗体、抗CTLA-4-2一本鎖抗体のヒトCTLA-4に対するヒトCD86の結合阻害率を示すグラフである。

[図15]マウスPD-1とマウスPD-L1との結合反応に対する抗マウスPD-1一本鎖抗体の競合的阻害活性を示すグラフである。縦軸が阻害活性、横軸が抗体濃度を示す。

[図16]フローサイトメトリー解析による図を示す。CD4陽性T細胞へのCD3/CD28刺激によるmPD-1の発現誘導において、Aでは、未刺激CD4陽性細胞に抗マウスPD-1抗体を反応させFITCで検出した。Bでは、CD3/CD28刺激CD陽性細胞に抗マウスPD-1抗体を反応させFITCで検出した。フローサイトメトリー解析による抗マウスPD-1一本鎖抗体のCD3及びCD28刺激CD4陽性細胞への結合において、Cでは、未刺激CD4陽性細胞に抗マウスPD-1一本鎖抗体を反応させそのHisに対してAlexa488-抗His-tag抗体を反応させ検出した。Dでは、CD3/CD28刺激CD陽性細胞に抗マウスPD-1一本鎖抗体を反応させそのHisに対してAlexa488-抗His-tag抗体を反応させ検出した。

[図17] (A)は、抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィズス菌投与マウスの腫瘍組織の免疫組織染色図であり、(B)は、無処理マウスの腫瘍組織の免疫組織染色図である。

[図18]単剤投与群と無処理群のCT26腫瘍体積推移を示すグラフである。

[図19]単剤投与群と2剤併用群と無処理群のCT26腫瘍体積推移を示すグラフである。

[図20]単剤投与群と2剤併用群のCT26腫瘍体積推移を示すグラフである。

[図21]各ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69Ly-hPD-1scFv03株の抗体分泌の有無を示す図である。

[図22]ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L5-hPD-1scFv03株とビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L20-hPD-1scFv03株のELISAによる結合量を示すグラフである。

[図23]ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L5-hPD-1scFv03株とビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L20-hPD-1scFv03株が分泌するscFvにより競合阻害されなかったPD-L1のELISAによる結合量を示す図である。

[図24] (a) (b) は、各ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxL20-hPD-1scFv03株の抗体分泌の有無を示す図である。

[図25] (a) ~ (d) は、各ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxLy-hPD-1scFv03株（ただし、y=5、10、15、20）抗体分泌の有無を示す図である。

[図26] (a) ~ (c) は、各ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxLy-hPD-1scFv03株の抗体分泌の有無を示す図である。

[図27]各ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxLy-hPD-1scFv03株の抗体分泌の有無を示す図である。

[図28]各ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pP30SPxL20-hCTLA-4scFv02株の抗体分泌の有無を示す図である。

[図29] (a) ~ (c) は、各ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pP30SPxLy-hCTLA-4scFv02株の抗体分泌の有無を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0011] 本発明の発現カセットとしては、（１）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターDNA、（２）分泌シグナルペプチドをコードするDNA、（３）リンカーペプチドをコードするDNA、（４）異種ポリペプチドをコードするDNA、及び（５）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターDNAの各DNAを順次含み、上記分泌シグナルペプチドが、
a) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列；又はb) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列からなるペプチドがビフィドバクテリウム属細菌において分泌シグナルペプチドとして機能するアミノ酸配列；からなる、異種ポリペプチドのビフィドバクテリウム属細菌内での発現に使用するための発現カセットであれば特に制限されず、上記各DNA断片の3'末端と、その下流の各DNAの5'末端とは、本発明の効果が得られる限り、直接連結していなくてもよいが、直接連結していることが好ましい。
- [0012] 上記プロモーターDNAとしては、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターDNAであれば特に制限されず、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のヒストン様DNA結合タンパク質をコードする遺伝子の発現に係るプロモーターであるHuプロモーターDNAや、ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来Gap遺伝子のプロモーターDNA (Biotechnol. Lett. 2008 30:1983-1988) や、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来AmyB遺伝子のプロモーターDNA (Biotechnol. Lett. 2006 28:163-168) や、16SrRNAプロモーターDNA (Biotechnol. Lett. 2008 30:165-172)、GAPDH (p_r-BL1363) 遺伝子のプロモーターDNA (Appl Environ Microbiol. 2006 72(11):7401-7405)、P_RP_LプロモーターDNA (Cancer Gene Ther. 2007 14:151-157)、p572 (β -glycosidase from *B. animalis* subsp *lactis*) 遺伝子のプロモーターDNA (J Microbiol Biotechnol. 2012 Dec;22(12):1714-23)、p919(rplM promoter)DNA (J Microbiol. 2012

Aug;50(4):638-43)、p 8 9 5 (rplR promoter) DNA (JMicrobiol, 2012 Aug;50(4):638-43) を例示することができる。

[0013] 上記分泌シグナルペプチドとしては、前記のように、a) 配列番号 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチド、すなわちそれぞれSP 7、SP 45、SP 50、SP 52、SP 55、SP 58、SP 64、SP 66、SP 67、SP 68、SP 69を挙げることができ、また、b) 配列番号 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであって、該ペプチドが、ビフィドバクテリウム属細菌において分泌シグナルペプチドとして機能するペプチド（変異分泌シグナルペプチド）を挙げることができる。上記「1又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」とは、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味し、上記変異分泌シグナルペプチドのアミノ酸配列としては、配列番号 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16に示されるアミノ酸配列のいずれかとの配列同一性が90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましく、98%以上であることがさらに好ましい。

[0014] 上記 a) に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードするDNAとしては、上記 a) に示されるアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するDNAであれば特に制限されず、したがってコドンの縮重によって相違するDNAも含まれるが、例えば、配列番号 116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、及び126のいずれかに示される塩基配列からなるDNAを挙げることができ、これらのDNAは、化学合成、遺伝子工学的手法等の当業者に既知の方法により作製することができる。

[0015] 上記 b) に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコード

するDNAとしては、上記b)に示されるアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するDNAであれば特に制限されず、したがってコドンの縮重によって相違するDNAも含まれるが、これらのDNAは、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の方法により作製することもできる。例えば、配列番号116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、及び126のいずれかに示される塩基配列からなるDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的な手法等を用いて、これらDNAに変異を導入することにより、変異DNAを取得することができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、Molecular Cloning: A laboratory Manual、2nd Ed.、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY.、1989.、Current Protocols in Molecular Biology、Supplement 1~38、John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて行うことができる。

[0016] 上記分泌シグナルペプチドは、異種ポリペプチドの発現・分泌効率の点から、リンカーペプチドと連結したシグナルペプチドーリンカー連結体として用いることが好ましい。かかるリンカーペプチドとしては、上記分泌シグナルペプチドのC末端に連結して用いられ、異種ポリペプチドの発現・分泌効率を高めることができるペプチドであれば特に制限されず、アミノ酸1~30残基のアミノ酸配列からなるペプチドを好適に挙げることができる。具体的には、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株から同定された上記各分泌シグナルペプチドに続く以下に示される11種類のアミノ酸配列について、各配列の1番目から30番目のいずれかまでのアミノ酸配列からなるリンカーペプチド、例えば1番目から5番目、1番目から10番目、1番目から15番目、1番目から20番目のアミノ酸配列からなるリンカーペプチドを挙げることができる

[0017] 1) 配列番号25に示されるリンカーペプチド配列 (SP7の下流) ;
2) 配列番号26に示されるリンカーペプチド配列 (SP45の下流) ;

- 3) 配列番号 27 に示されるリンカーペプチド配列 (SP50 の下流) ;
- 4) 配列番号 28 に示されるリンカーペプチド配列 (SP52 の下流) ;
- 5) 配列番号 29 に示されるリンカーペプチド配列 (SP55 の下流) ;
- 6) 配列番号 30 に示されるリンカーペプチド配列 (SP58 の下流) ;
- 7) 配列番号 31 に示されるリンカーペプチド配列 (SP64 の下流) ;
- 8) 配列番号 32 に示されるリンカーペプチド配列 (SP66 の下流) ;
- 9) 配列番号 33 に示されるリンカーペプチド配列 (SP67 の下流) ;
- 10) 配列番号 34 に示されるリンカーペプチド配列 (SP68 の下流) ;
- 11) 配列番号 35 に示されるリンカーペプチド配列 (SP69 の下流) ;

[0018] 本発明の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体をコードする DNA としては、前記 (2) 分泌シグナルペプチドをコードする DNA の 5' 末端から、前記 (3) リンカーペプチドをコードする DNA の 3' 末端までを含む DNA 領域をいい、(2) 分泌シグナルペプチドをコードする DNA の 3' 末端と、(3) リンカーペプチドをコードする DNA の 5' 末端とが連結しているので、分泌シグナルペプチドーリンカー連結体を以下 $SP \times L y$ (但し、 x は、分泌シグナルペプチドの本明細書における番号、 y は、リンカーペプチドのアミノ酸残基数) と称することがある。かかる分泌シグナルペプチドーリンカー連結体として、以下に示す 11 種類を具体的に挙げるができる。

- [0019] 1) 配列番号 105 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (SP7L30) ;
- 2) 配列番号 106 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (SP45L30) ;
- 3) 配列番号 107 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (SP50L30) ;
- 4) 配列番号 108 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (SP52L30) ;
- 5) 配列番号 109 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (S

P 5 5 L 3 0) ;

6) 配列番号 1 1 0 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (S P 5 8 L 3 0) ;

7) 配列番号 1 1 1 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (S P 6 4 L 3 0) ;

8) 配列番号 1 1 2 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (S P 6 6 L 3 0) ;

9) 配列番号 1 1 3 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (S P 6 7 L 3 0) ;

1 0) 配列番号 1 1 4 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (S P 6 8 L 3 0) ;

1 1) 配列番号 1 1 5 に示される分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (S P 6 9 L 3 0) ;

[0020] また、例えば、配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列からなるリンカーペプチドの C 末端のアミノ酸残基が 0 ~ 2 9、例えば 1 0 ~ 2 9、1 5 ~ 2 9、2 0 ~ 2 9、又は 2 5 ~ 2 9 欠損したリンカーペプチドをコードする DNA の 5' 末端は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードする DNA の 3' 末端に連結され、同様に、配列番号 2 6 ~ 3 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるリンカーペプチドの C 末端のアミノ酸残基が 0 ~ 2 9、例えば 1 0 ~ 2 9、1 5 ~ 2 9、2 0 ~ 2 9、又は 2 5 ~ 2 9 欠損したリンカーペプチドをコードする各 DNA の 5' 末端は、配列番号 7 ~ 1 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードする各 DNA の 3' 末端にそれぞれ連結される。

[0021] かかる分泌シグナルペプチドーリンカー連結体をコードする DNA は、例えば、配列番号 1 1 6 + 配列番号 1 2 7 (S P 7 L 3 0)、配列番号 1 1 7 + 配列番号 1 2 8 (S P 4 5 L 3 0)、配列番号 1 1 8 + 配列番号 1 2 9 (S P 5 0 L 3 0)、配列番号 1 1 9 + 配列番号 1 3 0 (S P 5 2 L 3 0)、配列番号 1 2 0 + 配列番号 1 3 1 (S P 5 5 L 3 0)、配列番号 1 2 1 + 配

列番号132 (SP58L30)、配列番号122+配列番号133 (SP64L30)、配列番号123+配列番号134 (SP66L30)、配列番号124+配列番号135 (SP67L30)、配列番号125+配列番号136 (SP68L30)、配列番号126+配列番号137 (SP69L30) のいずれかに示される塩基配列情報をもとに、化学合成、遺伝子工学的手法等の当業者に既知の方法により作製することができる。

[0022] 本発明の発現カセットにおける、配列番号25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及び35のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が0～29欠損した各アミノ酸配列からなるリンカーペプチドにおいて、上記Lyにおけるyは、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1のいずれかで表すことができる。

[0023] 本発明の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体 (SPxLy) として具体的には、SP7Ly (y=1～30のいずれかの整数 (以下同じ)、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP45Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP50Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP52Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP55Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP58Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP64Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP66Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP67Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5) や、SP68Ly (y=1～30、例えばy=1～20、y=1～15、y=1～10、y=1～5)

や、SP69Ly ($y = 1 \sim 30$ 、例えば $y = 1 \sim 20$ 、 $y = 1 \sim 15$ 、 $y = 1 \sim 10$ 、 $y = 1 \sim 5$) を挙げることができる。

[0024] 本発明の分泌シグナルペプチドや分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の下流に抗hPD-1 s c F v 03が組み込まれた発現カセットを含むベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、抗hPD-1 s c F v 03の分泌が確認された分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の具体例として、SP69L1、SP69L2、SP69L3、SP69L4、SP69L5、SP69L6、SP69L7、SP69L8、SP69L9、SP69L10、SP69L15、SP69L20や、SP7L20、SP45L20、SP50L20、SP52L20、SP55L20、SP58L20、SP64L20、SP66L20、SP67L20、SP68L20や、SP7L5、SP7L10、SP7L15、SP45L5、SP45L10、SP45L15、SP50L5、SP50L10、SP50L15、SP52L5、SP52L10、SP52L15、SP55L5、SP55L10、SP55L15、SP58L15、SP64L5、SP64L10、SP64L15、SP66L5、SP66L10、SP66L15、SP67L5、SP67L10、SP67L15、SP68L5、SP68L10、SP68L15、SP69L5、SP69L10、SP69L15や、SP45L0、SP45L1、SP45L2、SP45L3、SP50L0、SP50L1、SP50L2、SP50L3、SP50L4、SP64L0、SP64L1、SP64L2、SP64L3、SP64L4、SP68L0、SP68L1、SP68L2、SP68L3、SP68L4や、SP67L10、SP69L7などを挙げることができ、とりわけ抗hPD-1 s c F v 03の分泌量の多かった、SPSP50L0、SP50L1、SP50L2、SP50L3、SP50L4、SP50L5、SP50L10、SP50L15、SP50L20、SP64L0、SP64L1、SP64L2、SP64L3、SP64L4、SP64L5、SP64L10、SP64L15、SP64L20、SP68L1、SP

68L2、SP68L3、SP68L4、SP68L5、SP68L10、SP68L15、SP68L20、SP69L7、SP69L8、SP69L9、SP69L10、SP69L15、SP69L20を好適に挙げることができる。

[0025] また、同様に形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、分泌された抗hPD-1 s c F v 03のPD-1へ結合能が確認された分泌シグナルペプチドリンカー連結体の具体例として、SP7L5、SP7L20、SP68L5、SP68L20、SP69L5、SP69L20、SP45L20、SP50L20、SP52L20、SP55L20、SP58L20、SP64L20、SP66L20、SP67L20を挙げることができ、分泌された抗hPD-1 s c F v 03のPD-1への結合量がより多い、SP7L5、SP68L5、SP69L5を好適に挙げることができる。

[0026] さらに、同様に形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、分泌された抗hPD-1 s c F v 03が、hPD-1とPD-L1の結合を阻害することが確認された分泌シグナルペプチドリンカー連結体の具体例として、SP69L5、SP69L20、SP50L5、SP64L5、SP67L10、SP68L1、SP68L5、SP69L1、SP69L7を挙げることができ、SP50L5、SP68L1、SP69L1が好ましく、とりわけ、hPD-1とPD-L1の結合を50%阻害する抗体濃度（IC50）が低かったSP50L5が特に好ましい。

[0027] 本発明の分泌シグナルペプチドや分泌シグナルペプチドリンカー連結体の下流に抗hCTLA-4 s c F v 02が組み込まれた発現カセットを含むベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、抗hCTLA-4 s c F v 02の分泌が確認された分泌シグナルペプチドリンカー連結体の具体例として、SP7L20、SP45L20、SP50L20、SP52L20、SP55L20、SP58L20、SP64L20、SP66L20、SP67L20、SP68L20、SP69

L20、SP45L0、SP45L1、SP45L2、SP45L3、SP45L4、SP45L5、SP50L0、SP50L1、SP50L2、SP50L3、SP50L4、SP50L5、SP64L0、SP64L1、SP64L2、SP64L3、SP64L4、SP64L5、SP68L1、SP68L2、SP68L3、SP68L4、SP68L5、SP69L0、SP69L1、SP69L2、SP69L3、SP69L4、SP69L5、SP69L6、SP69L7、SP69L8、SP69L9、SP69L10を挙げることができることができる。

[0028] 上記異種ポリペプチドをコードするDNAとしては、本発明の発現カセットにおいて発現することができる、ビフィドバクテリウム属細菌以外に由来するポリペプチドであれば特に制限されず、インターフェロン（IFN）- α 、 β 、 γ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン（IL）-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-27、腫瘍壊死因子（TNF）- α 、リンホトキシン（LT）- β 、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）等のサイトカインをコードするDNAや、エンドスタチン、アンジオスタチンなどの血管新生抑制物質をコードするDNAを挙げることができる他、5-フルオロウラシルのプロドラッグである5-フルオロシトシンを5-フルオロウラシルに変換する酵素であるシトシン・デアミナーゼをコードするDNAを好適に挙げることができる。また、抗体ポリペプチドをコードするDNAも使用することができる。かかる異種ポリペプチドをコードするDNAには、ポリペプチドの単離処理等における便宜のため、ヒスチジntag等のアフィニティタグをコードするDNAを適宜付加することもできる。

[0029] 上記抗体としては、インターロイキン-6（IL-6）受容体を標的分子とするリウマチ治療薬に用いられる抗体や、 $\alpha 4$ -インテグリンを標的分子とする多発性硬化症治療薬に用いられる抗体や、CD20、CD33、PD

－1、CTLA－4、CD80、CD86を標的とする抗がん作用を有する抗体を例示することができる。

[0030] 中でも、抗PD－1抗体は、活性化したリンパ球（T細胞、B細胞）に発現するPD－1受容体に結合することにより、がん細胞が発現するPD－L1やPD－L2とPD－1受容体が結合するのを阻害する結果、腫瘍細胞への免疫反応が増強されることから、好適に例示することができる。また、抗CTLA－4抗体は、自己免疫機能の抑制分子として知られているCTLA－4の機能を抑制することにより抗腫瘍免疫応答を増強し、かつ、抗原提示細胞に発現したCD80やCD86へのCTLA－4の結合を阻止することにより、これらの分子の相互作用によって誘発される免疫応答の負の下方制御を阻止すると考えられることから、好適に例示することができる。

[0031] 上記抗体ポリペプチドをコードするDNAとしては、キメラ抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体等をコードするDNAを挙げることができるが、それ自身で標的物質を認識・結合することができ、分子量が大きすぎず、ビフィドバクテリウム属細菌内に導入された場合にも発現可能である一本鎖抗体をコードするDNAが好ましい。これら抗体を含む異種ポリペプチドをコードするDNAは、その配列情報を、公知の文献やGenBank等のデータベースから適宜入手して、化学合成、遺伝子工学的手法等の公知の方法により作製することができる。

[0032] 上記ターミネーターDNAとしては、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターDNAであれば特に制限されず、具体的には、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のHuターミネーター、T572ターミネーター（J Microbiol Biotechnol. 2012 Dec;22(12):1714-23）を挙げることができる。

[0033] 本発明の発現カセット、好ましくはリンカーペプチドをコードするDNAを含む発現カセットの作製方法としては、

- (1) ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターDNA；
- (2) 以下のa)又はb)に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペ

プチドをコードするDNA；

a) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列；

b) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列からなるペプチドがビフィドバクテリウム属細菌においてシグナルペプチドとして機能するアミノ酸配列；

(3) リンカーペプチドをコードするDNA；

(4) 異種ポリペプチドをコードするDNA；

(5) ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターDNA；

の各DNAを、(1)を上流側として(5)を下流側として、(1)～(5)のDNAを順次含むように作製する方法を例示することができ、本発明の発現カセットの作製は、市販の実験書、例えば、遺伝子マニュアル講談社、高木康敬編遺伝子操作実験法講談社、モレキュラー・クローニング[コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(1982)]、モレキュラー・クローニング第2版[コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(1989)]、メソッズ・イン・エンザイモロジー 194(1991)、実験医学別冊・酵母による遺伝子実験法、羊土社(1994)等に記載された方法にしたがって行うことができる。

[0034] 本発明のベクターとしては、本発明の発現カセットが挿入されて、ビフィドバクテリウム属細菌に形質転換された場合に、異種ポリペプチドが発現しうるベクターであれば特に制限されず、本発明の発現カセットは、一種又は二種以上、ベクターに挿入することができる。本発明のベクターに含まれるビフィドバクテリウム属細菌で機能するプラスミド複製ユニットの具体例としては、pTB6 (Biosci Biotechnol Biochem, 2005 Feb;69(2):422-5)、pMB1 (Lett Appl Microbiol, 1990 Oct;11(4):220-3)、pTB4 (Bifidobacterium longum 由来のプラスミドpTB4の構造解析と応用一般演題

ポスター発表 プログラム - 日本分子生物学会、1994)、p F I 2 5 7 6 (J Microbiol Biotechnol. 2009 Apr;19(4):403-8)、p C I B A O (Appl Environ Microbiol. 2007 Dec;73(24):7858-66)、p B C 1 (Plasmid. 2007 Mar;57(2):165-74)、p D O J H 1 O S (Appl Environ Microbiol. 2006 Jan;72(1):527-35)、P K J 5 O (Microbiology 1999 Mar;145(Pt):585-92) の複製ユニットを例示することができ、p T B 6 由来の O r i V 領域及び R e p B 遺伝子からなる p T B 6 r e p ユニットを好適に挙げることができる。また、上記ベクターには、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を含めることもできる。

[0035] 上記マーカー遺伝子としては、スペクチノマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、アンピシリン等を例示することができる。

[0036] 本発明におけるベクターを、ビフィドバクテリウム属細菌へ導入する方法としては、エレクトロポレーション法を挙げることができる。

[0037] 本発明におけるビフィドバクテリウム属細菌としては、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*B. breve*)、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス (*B. adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*B. pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*B. thermophilum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*B. infantis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*B. animalis*)、ビフィドバクテリウム・アングラタム (*B. angulatum*)、ビフィドバクテリウム・アステロイデス (*B. asteroides*)、ビフィドバクテリウム・ボウム (*B. boum*)、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム (*B. catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・コエリナム (*B. choerinum*)、ビフィドバクテリウム・コリネフォルメ (*B. coryneforme*)、ビフィドバクテリウム・クニクリ (*B. cuniculi*)、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス (*B. denticolens*)、ビフィドバクテリウム・デンティウム (*B. dentium*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*B. gallicum*)、ビフィドバクテリウム・ガリナラム (*B. gallinarum*)、ビフィドバ

クテリウム・グロボサム (*B. globosum*)、ビフィドバクテリウム・インディクム (*B. indicum*)、ビフィドバクテリウム・イノピナタム (*B. inopinatum*)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*B. lactis*)、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス (*B. lactentis*)、ビフィドバクテリウム・マグナム (*B. magnum*)、ビフィドバクテリウム・メリシクム (*B. merycicum*)、ビフィドバクテリウム・ミニマム (*B. minimum*)、ビフィドバクテリウム・モンゴリエンス (*B. Mongolia Enns*)、ビフィドバクテリウム・パルブロラム (*B. parvulorum*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム (*B. pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・サイクラエロフィラム (*B. psychraerophilum*)、ビフィドバクテリウム・プロラム (*B. pullorum*)、ビフィドバクテリウム・ルミナレ (*B. ruminale*)、ビフィドバクテリウム・ルミナンチウム (*B. ruminantium*)、ビフィドバクテリウム・サエクラレ (*B. saeculare*)、ビフィドバクテリウム・スカルドヴィ (*B. scardovii*)、ビフィドバクテリウム・サブタイル (*B. subtile*)、ビフィドバクテリウム・スイス (*B. suis*)、ビフィドバクテリウム・テルマシドフィラム (*B. thermacidophilum*)などを例示することができる。中でも、年齢に関係なくヒトの腸内に常在していることが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティスを宿主細胞として用いることが好ましく、ビフィドバクテリウム・ロンガムを用いることがより好ましい。これらの菌は、いずれも市販されているか、又は寄託機関から容易に入手することができる。

[0038] また、それぞれの菌株についても特に限定されず、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガムについては、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A株、ビフィドバクテリウム・ロンガム aE-194b株、ビフィドバクテリウム・ロンガム bs-601株、ビフィドバクテリウム・ロンガム M101-2株、ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC-15707株を挙げることができ、中でもビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A株が好ま

しい。ビフィドバクテリウム・ブレーベについては、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株（JCM1192）、ビフィドバクテリウム・ブレーベa S-1株、ビフィドバクテリウム・ブレーベI-53-8W株を挙げることができる。中でも、ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株、ビフィドバクテリウム・ブレーベa S-1株が好ましい。ビフィドバクテリウム・インファンティスについては、例えば、ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株（JCM1222）、ビフィドバクテリウム・インファンティスI-10-5株を挙げることができる。ビフィドバクテリウム・ラクテンティスについては、例えば、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス標準株（JCM1210）を挙げることができる。ビフィドバクテリウム・ビフィダムの株については、例えば、ビフィドバクテリウム・ビフィダムATCC-11863株を挙げることができる。

[0039] 本発明のベクター、形質転換ビフィドバクテリウム属細菌等の作製は、市販の実験書、例えば、遺伝子マニュアル講談社、高木康敬編遺伝子操作実験法講談社、モレキュラー・クローニング [コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（1982）]、モレキュラー・クローニング第2版 [コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（1989）]、メソッズ・イン・エンザイモロジー194（1991）、実験医学別冊・酵母による遺伝子実験法、羊土社（1994）等に記載された方法にしたがって行うことができる。

[0040] 上記形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌は、正常組織では増殖せず嫌氣的環境下にある腫瘍組織内でのみ増殖し、腫瘍組織内で治療に有用なポリペプチドを発現することができる。したがって、かかる形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌は、嫌氣的環境を有する腫瘍に対して腫瘍増殖抑制作用、腫瘍体積の抑制作用、好ましくは完全退縮作用をもたらす、固形腫瘍の治療に有効な医薬組成物、とりわけ抗がん剤として使用することができる。したがって、本発明の医薬組成物としては、異種ポリペプチド、好ましくは抗がん作用を有する抗体を分泌しうる上記本発明のビフィドバクテリ

ウム属細菌を有効成分として含有している限り特に制限されず、分泌するポリペプチドの作用・効果を妨げない限り、任意成分としての薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等を含んでいてもよい。

[0041] 本発明の医薬組成物が抗がん剤である場合、適用対象としては、大腸がん、頭頸部がん、乳がん、肺がん、食道がん、胃がん、肝がん、胆嚢がん、胆管がん、膵がん、膵島細胞がん、絨毛がん、結腸がん、腎細胞がん、副腎皮質がん、膀胱がん、精巣がん、前立腺がん、睾丸がん、卵巣がん、子宮がん、絨毛がん、甲状腺がん、扁平上皮がん、皮膚がん、脳腫瘍、悪性カルチノイド腫瘍、骨肉腫、軟部組織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、網膜芽細胞腫、メラノーマを例示することができる。

[0042] 本発明の医薬組成物の剤型としては、液剤又は固形製剤を挙げることができる。液剤は、本発明のビフィドバクテリウム属細菌の培養液を精製し、これに必要な応じて適当な生理食塩水若しくは補液又は医薬添加物を加えてアンプル又はバイアル瓶などに充填することにより製造することができる。固形製剤は、液剤に適当な保護剤を添加してアンプル又はバイアル瓶などに充填した後凍結乾燥するか、液剤に適当な保護剤を添加して凍結乾燥した後これをアンプル又はバイアル瓶などに充填することにより製造することができる。本発明の医薬組成物の投与方法としては、経口投与、非経口投与共に可能であるが、非経口投与が好ましく、例えば、静脈内投与、局所投与を挙げることができる。

[0043] 本発明の医薬組成物の投与量は、本発明のビフィドバクテリウム属細菌が、疾患部位において生育でき、且つ、有効治療量の活性抗体を発現するのに十分な量である限り特に制限はされず、疾患の程度、患者の体重、年齢、性別に応じて適宜選択し、改善の度合いに応じて適宜増減することができるが、経済上の観点及び副作用を可能な限り回避する観点から、必要な治療効果が得られる範囲においてできる限り少ない方が好ましい。

[0044] 例えば、静脈内投与の場合には、特に、菌塊による塞栓等のリスクを低減することが求められるため、できるだけ低濃度の注射用製剤を複数回に分け

て分注するか、又は適当な補液で希釈して持続注入することが好ましい。例えば、成人の場合、本発明のビフィドバクテリウム属細菌の菌体を、体重 1 k g 当たり $10^4 \sim 10^{12}$ c f u を 1 日 1 ～複数回に分け、1 ～数日間、連続して又は適宜間隔をおいて投与する。より具体的には、本発明のビフィドバクテリウム属細菌の菌体を $10^4 \sim 10^{10}$ c f u / m L 含有する製剤を、成人 1 人あたり 1 ～1000 m L を直接、又は適当な補液で希釈して、1 日 1 ～数回に分け、1 ～数日連続して投与する。

[0045] また、例えば、疾患組織へ直接投与する局所投与の場合は、できるだけ疾患組織全体へ菌が生着、増殖することが求められるため、高濃度の注射剤を、疾患組織の複数個所に投与することが望ましい。例えば、成人の場合、本発明のビフィドバクテリウム属細菌の菌体を、体重 1 k g 当たり $10^4 \sim 10^{12}$ c f u を 1 日 1 ～複数回、必要に応じ 1 ～複数日間、連続して、又は適宜間隔をおいて投与する。より具体的には、本発明のビフィドバクテリウム属細菌の菌体を $10^4 \sim 10^{10}$ c f u / m L 含有する製剤を、成人 1 人あたり 0 . 1 ～100 m L を直接、一日数回、必要に応じて 1 ～複数日間連続して投与する。

[0046] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[0047] [実施例 1]

[p H u S P 3 L 2 2 - s c F v - P D - 1 - 1、p H u S P 7 L 2 0 - s c F v - P D - 1 - 1、p H u S P 2 3 L 2 7 - s c F v - P D - 1 - 1 の作製]

公知の分泌シグナルペプチドと新規の分泌シグナルペプチドとを用いて、抗 P D - 1 - 1 一本鎖抗体分泌プラスミドを作製した。

[0048] 実施例 1、5 ～8 において、用いたプライマーの詳細は以下の表 1 及び表 2 のとおりである。

[0049]

[表1]

インサート及びベクター増幅時に用いたPCRプライマー

インサート	フォワードプライマー	リバースプライマー	PCR product (bp)
PD-1-1	Ins_PD-1-1_F1	Ins_PD-1-1_R1	747
PD-1-2	Ins_PD-1-2_F1	Ins_PD-1-2_R1	759
PD-1-3	Ins_PD-1-3_F1	Ins_PD-1-3_R1	771
CTLA-4-1	Ins_CTLA-4-1_F1	Ins_CTLA-4-1_R1	774
CTLA-4-2	Ins_CTLA-4-1_F1	Ins_CTLA-4-2_R1	756
ベクター	フォワードプライマー	リバースプライマー	PCR product (bp)
Vec-SP3L20	TGA_Hu_Terminator_F	vec-SP3L20-PD-1-1_R1	4019
Vec-SP7L20-1	TGA_Hu_Terminator_F	vec-SP7L20-PD-1-1_R1	4019
Vec-SP23L20	TGA_Hu_Terminator_F	vec-SP23L20-PD-1-1_R1	4019
Vec-SP7L20-2	TGA_Hu_Terminator_F	vec-SP7L20-PD-1-2_R1	4019
Vec-SP7L20-3	TGA_Hu_Terminator_F	vec-SP7L20-PD-1-3_R1	4019
SP3L22	Ins_PD-1-1_F1 (5' - リン酸化)	SP3L22_R1 (5' - リン酸化)	4742
SP23L27	Ins_PD-1-1_F1 (5' - リン酸化)	SP23L27_R1 (5' - リン酸化)	4757

[0050] [表2]

インサート及びベクター増幅時のプライマー配列

プライマー名	配列 (5' → 3')
Ins_PD-1-1_F1	CAGGTCCAGCTGGTCCAGAGCGGCAGCGAA (配列番号 36)
Ins_PD-1-2_F1	CAGGTCCAGCTGCAGGAATCGGGCCCGGC (配列番号 37)
Ins_PD-1-3_F1	GAAGTGCCTCTGCTGGAATCGGGCGGCGGC (配列番号 38)
Ins_CTLA-4-1_F1	CAGGTCCAGCTGGTCAATCGGGCGGCGGC (配列番号 39)
Ins_PD-1-1_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGGTGATGATGGTGCTT (配列番号 40)
vec-SP3L20-PD-1-1_R1	GACCAGCTGGACCTGGGTCACTTGCCTCGGCTTGTA (配列番号 41)
vec-SP7L20-PD-1-1_R1	GACCAGCTGGACCTGCACCGAACTCGCCTTCGGGAA (配列番号 42)
vec-SP23L20-PD-1-1_R1	GACCAGCTGGACCTGCAGGAATCTTCTCTCCTGCGC (配列番号 43)
Ins_PD-1-2_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGATGATGGTGGTGACG (配列番号 44)
vec-SP7L20-PD-1-2_R1	CTGCAGCTGGACCTGCACCGAACTCGCCTTCGGGAA (配列番号 45)
Ins_PD-1-3_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGATGATGGTGGTGATGGCC (配列番号 46)
vec-SP7L20-PD-1-3_R1	CAGCAGACGCACTCCACCGAACTCGCCTTCGGGAA (配列番号 47)
Ins_CTLA-4-1_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGATGATGGTGGTGATGCTT (配列番号 48)
Ins_CTLA-4-2_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGATGATGGTGGTGATGCTT (配列番号 49)
SP3L22_R1	GGCGATGGTCAGCTTGGCGGCTTGTACGT (配列番号 50)
SP23L27_R1	GATCGTCTTGAGAATCTTCAGACGAATCTTCTCTCCTGCGC (配列番号 51)
TGA_Hu_Terminator_F	TGACCTTCTGCTCGTAGCGATTAC (配列番号 52)

[0051] [抗PD-1一本鎖抗体発現カセット]

抗PD-1一本鎖抗体の発現カセットは図1(a)に示されるとおり、HuプロモーターDNA(ビフィドバクテリウム・ロンガム由来)、分泌シグナルペプチドをコードするDNAと前記分泌シグナルペプチドに続くリンカーペプチドをコードするDNA、抗PD-1一本鎖抗体(重鎖配列、リンカー((GGGS)₃)、軽鎖配列を含む)をコードするDNA、Hisタグ配列、及びHuターミネーター(ビフィドバクテリウム・ロンガム由来)で構成した。各発現カセット中の抗PD-1一本鎖抗体(重鎖配列、リンカー((GGGS)₃)、軽鎖配列を含む塩基配列を含む)は、以下に示すとおり、以下の表3に示される文献を参照し、二種類の抗ヒトPD-1一本鎖抗体と一種類の抗マウスPD-1一本鎖抗体を使用した。

[0052] [表3]

抗体	配列	参照文献
s c F v - P D - 1 - 1 (抗ヒトPD-1抗体)	配列番号1(738塩基) 配列番号138(245アミノ酸) 重鎖配列(1~354塩基) (GGGS) ₃ リンカー(355~399塩基) 軽鎖配列(400~717塩基) ヒスチジンタグ(718~735塩基)	US特許7332582B2
s c F v - P D - 1 - 2 (抗ヒトPD-1抗体)	配列番号2(750塩基) 配列番号139(249アミノ酸) 重鎖配列(1~360塩基) (GGGS) ₃ リンカー(361~405塩基) 軽鎖配列(406~729塩基) ヒスチジンタグ(730~747塩基)	日本国特許4532409号
s c F v - P D - 1 - 3 (抗マウスPD-1抗体)	配列番号3(762塩基配列) 配列番号140(253アミノ酸) 重鎖配列(1~366塩基) (GGGS) ₃ リンカー(367~411塩基) 軽鎖配列(412~741塩基) ヒスチジンタグ(742~759塩基)	日本国特許4249013号

[0053] s c F v - P D - 1 - 1、s c F v - P D - 1 - 2及びs c F v - P D - 1 - 3の各抗PD-1一本鎖抗体遺伝子については、ジェンスクリプトジャ

パン株式会社において、大腸菌用プラスミド pUC57 にサブクローニングされ、プラスミド pUC57-scFv-PD-1-1、pUC57-scFv-PD-1-2 及び pUC57-scFv-PD-1-3 として人工遺伝子合成された。

[0054] 分泌シグナルペプチド配列として、分泌シグナルペプチドリンカー連結体 SP3L22、SP7L20、及び SP23L27 を使用した。

[0055] 上記 SP3L22 としては、国際公開番号 WO2011/093467 において配列番号 8 として記載されている公知の配列を、SP23L27 としては、国際公開番号 WO2011/093467 において配列番号 25 として記載されている公知の配列を使用した。SP7L20 としては、国際公開番号 WO2011/093467 に記載されている配列番号 12 の塩基配列に更に 5' 側に 66 塩基上流の ATG から始まる塩基配列：ATGGCGTTGATGATGAGCGTTAAGACTATTATTTCCACATCAGTGGCGATTATCGCCACGGGTGCC を付加した塩基配列をもとに、SP7L20（配列番号 81）を使用した。かかる塩基配列を付加した理由は、SP7 が、分泌シグナルの有無を予測するシグナル配列予測プログラム SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 解析にて、タンパクの N 末端に分泌シグナルペプチド配列を有すると予測されたことが判明したためである。ここにおいて、SP7 に続くリンカーペプチド配列としては、SP7 の C 末端側の 20 アミノ酸残基とした。

[0056] 抗 PD-1 一本鎖抗体分泌プラスミドの作製概要を図 2 に示す。図 2 左側において、scFv-gene は、PD-1 であり、pHuSP7L20-scFv-PD-1-1 の作製においては、 $x=7$ 、 $n=1$ である。また pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 の作製においては、 $x=7$ 、 $n=2$ であり、pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 の作製においては、 $x=7$ 、 $n=3$ である。さらに図 2 右側において、pHuSP3L22-scFv-PD-1-1 の作製においては、 $x=3$ 、 $y=22$ であり、pHuSP23L27-scFv-PD-1-1 の作製においては、 $x=23$ 、 $y=27$ である。構築方法の詳細を以下に示す。

[0057] [プラスミドpHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製]

プラスミドpHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製にあたり、まず、プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1を作製した。

[0058] [プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1の作製]

(抗PD-1-1一本鎖抗体インサート調製)

プラスミドpUC57-scFv-PD-1-1 500pgを鋳型として、表1及び表2記載のIns_PD-1-1_F1プライマー及びIns_PD-1-1_R1プライマーセットを用いてPCR増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端15bpが重複するように設計された。各プライマー0.2μM、反応容量30μLとして、PrimeSTAR HS(Premix)(タカラバイオ株式会社製)キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて60秒を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いて精製し、抗PD-1-1一本鎖抗体インサートを調製した。

[0059] (ベクター断片調製)

配列番号20に記載されているベクター直鎖化断片500pgを鋳型として、上記表1及び表2に記載されている、TGA_Hu_Terminator_Fプライマー及びvec-SP3L20-PD-1-1_R1プライマーからなるプライマーセットを用いて、プライマー0.2μM、反応容量30μLとして、PrimeSTAR HS(Premix)キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて5分を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いて精製し、5'-Huターミネーター-pTB6repunit-SPCMr

－pUCori－Huプロモーター－SP3L20－3’ベクター断片を調製した。

[0060] 上記ベクター直鎖化断片は、配列番号20の第4番から第3845番までの塩基配列において下記のとおり構成される。

Huターミネーター：配列番号20の第4番から第117番までの塩基配列
ビフィドバクテリウム属細菌複製起点pTB6 rep unit：配列番号20の第124番から第1719番までの塩基配列

スペクチノマイシン耐性遺伝子SPCMr：配列番号20の第1726番から第2804番までの塩基配列

大腸菌複製起点、pUCori：配列番号20の第2811番から第3478番までの塩基配列

Huプロモーター：配列番号20の第3485番から第3845番までの塩基配列。

[0061] (インフュージョン反応)

上記で調製されたベクター断片と上記抗PD-1-1一本鎖抗体インサートとをIn-Fusion (登録商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製)を用いて連結した。即ち、マイクロチューブに、上記ベクターとインサートを1：5のモル比にて添加後、2 μ Lの5×In-Fusion HD Enzyme premixを添加し、反応液容量を10 μ Lに調整した。これを50℃にて15分間保温した。その他の手順は、キットの製品説明書にしたがい、インフュージョン反応液を調製した。

[0062] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記インフュージョン反応液5 μ Lを用いて、大腸菌HST08コンピテント細胞(タカラバイオ株式会社製)の形質転換を製品説明書にしたがい行った。形質転換後の菌懸濁液は、75 μ g/mLスペクチノマイシン含有LB寒天培地に塗布し、37℃にて一晩静置培養した。上記寒天培地上に形成された大腸菌コロニーを75 μ g/mLスペクチノマイシン含有LB液体培地にて30℃にて一晩培養し、これよりQIAprep Spin Minip

rep Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドにおける抗PD-1-1一本鎖抗体発現カセット (HuプロモーターからHuターミネーターまでを含む) 配列を決定するため、BigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いてシーケンス反応を行った。抽出したプラスミドをpHuSP3L20-scFv-PD-1-1と名付けた。

[0063] [pHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製]

(リン酸化プライマーの調製)

表1及び表2記載のIns_PD-1-1_F1プライマー、SP3L22_R1プライマーを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (タカラバイオ株式会社製) を用いて、製品説明書にしたがい、各プライマーをリン酸化した。

Ins_PD-1-1_F1リン酸化プライマー及びSP3L22_R1リン酸化プライマーを、それぞれ0.1×TEバッファー (1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、pH7.5) で終濃度20µMに調整した。

[0064] (pHuSP3L22-scFv-PD-1-1ベクター直鎖化断片調製)

上記プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1 500pgを鋳型として、上記Ins_PD-1-1_F1リン酸化プライマー及びSP3L22_R1リン酸化プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度0.2µM、反応容量30µLにて、PrimeSTAR HS (Premix) キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて5分を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、pHuSP3L22-scFv-PD-1-1ベクター直鎖化断片を調製した。

[0065] (ライゲーション反応)

上記ベクター直鎖化断片について、T4 DNA Ligase (サーモフ

イッシャーサイエンティフィック株式会社製)を用いて、製品説明書にしたがって、ライゲーション反応を行った。添付の10×バッファー for T4 DNAリガーゼ 2 μ Lを添加して反応液容量を20 μ Lとし、これを22℃にて10分間ライゲーション反応を行い、ライゲーション反応液を調製した。

[0066] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記ライゲーション反応液10 μ Lを用いて、大腸菌HST08コンピテント細胞の形質転換を行った。形質転換後の菌懸濁液は、75 μ g/mLスペクチノマイシン含有LB寒天培地に塗布し、37℃にて一晩静置培養した。

形質転換条件は、大腸菌HST08コンピテント細胞についての製品説明書にしたがったが、以下に概要を記載する。上記寒天培地上に形成した大腸菌コロニーを、75 μ g/mLスペクチノマイシン含有LB液体培地にて30℃にて一晩培養し、これよりQIAprep Spin Miniprep Kitを用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドの抗PD-1-1一本鎖抗体発現カセット(HuプロモーターからHuターミネーターまでを含む)配列を決定するため、BigDye(登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いてシーケンス反応を行った。抽出したプラスミドをpHuSP3L22-scFv-PD-1-1と名付けた。

[0067] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換)

上記形質転換した大腸菌より抽出した1000 ngのプラスミドpHuSP3L22-scFv-PD-1-1を用いて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステム(ジーンパルサーII、バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社製)により行なった。電気ショック(2 kV、25 μ F、200 Ω)後は、キュベット(2 mmギャップ)に800 μ LのIMR液体培地と50 μ LのビタミンC添加液との混合液を即時に添加し、これを滅菌済みの2 mLマイクロチューブに回収した。各チューブについて同様の操作を行い、これら2 mLチューブの蓋をゆ

るめて、脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック（登録商標）・ケンキ、三菱ガス化学株式会社製）とともに密閉容器に入れ、37℃に設定したインキュベータにて3時間保温した。

[0068] 保温後の各菌懸濁液を75 µg/mL スペクチノマイシン含有IMR寒天培地に塗布した。これらのプレートを上記脱酸素・炭酸ガス発生剤とともに密閉容器に入れ、37℃に設定したインキュベータにて2日間培養した。

[0069] 上記スペクチノマイシン含有IMR寒天培地上に形成したコロニーを釣菌し、75 µg/mL スペクチノマイシン含有BL-bS寒天培地（馬脱繊維血を含まないBL寒天培地）に画線後、脱酸素・炭酸ガス発生剤とともに密閉容器に入れ、37℃に設定したインキュベータにて1日間培養し、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP3L22-scFv-PD-1-1株を取得した。

[0070] [pHuSP7L20-scFv-PD-1-1の作製]

（抗PD-1-1一本鎖抗体インサート調製）

上記[プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1の作製]における（抗PD-1-1一本鎖抗体インサート調製）と同様の手順で抗PD-1-1一本鎖抗体インサートを調製した。

[0071] （ベクター断片調製）

配列番号21に記載されているベクター直鎖化断片500 pgを鋳型として、上記表1及び表2に記載されている、TGA__Hu__Terminator__Fプライマー及びvec-SP7L20-PD-1-1__R1プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度0.2 µM、反応容量30 µLとして、PrimeSTAR HS (Premix)キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて5分を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、5'-Huターミネーター-pTB6repunit-SPCMr-pUCori-H

uプロモーター—SP7L20—3'ベクター断片(1)を調製した。

[0072] 上記ベクター直鎖化断片は、配列番号21の第4番から第3845番までの塩基配列において下記のとおり構成される。

Huターミネーター:配列番号21の第4番から第117番までの塩基配列

ビフィドバクテリウム属細菌複製起点pTB6 rep unit: 配列番号21の第124番から第1719番までの塩基配列

スペクチノマイシン耐性遺伝子SPCMr: 配列番号21の第1726番から第2804番までの塩基配列

大腸菌複製起点、pUCori: 配列番号21の第2811番から第3478番までの塩基配列

Huプロモーター: 配列番号21の第3485番から第3845番までの塩基配列。

[0073] (インフュージョン反応)

上記で調製されたベクター断片と上記抗PD-1-1一本鎖抗体インサートとを用いたことの他は、上記[プラスミドpHuSP3L20—scFv—PD-1-1の作製]におけるインフュージョン反応と同様の手順でインフュージョン反応液を調製した。

[0074] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記で調製されたインフュージョン反応液5 μ Lを用いたことの他は、上記[プラスミドpHuSP3L20—scFv—PD-1-1の作製]の(大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)におけると同様の手順にて、大腸菌HST08コンピテント細胞の形質転換を行い、抽出したプラスミドにおける抗PD-1-1一本鎖抗体発現カセット(HuプロモーターからHuターミネーターまでを含む)配列を決定するためシーケンス反応を行った。抽出したプラスミドをpHuSP7L20—scFv—PD-1-1と名付けた。

[0075] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換)

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミドpHuSP7L20—s

cFv-PD-1-1 1000 ngのDNAを用いたことの他は、上記[pHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製]における(ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換)と同様の方法で、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-1株を取得した。

[0076] [pHuSP23L27-scFv-PD-1-1の作製]

プラスミドpHuSP23L27-scFv-PD-1-1の作製にあたり、まず、プラスミドpHuSP23L20-scFv-PD-1-1を作製した。

[0077] [プラスミドpHuSP23L20-scFv-PD-1-1の作製]

(抗PD-1-1一本鎖抗体インサート調製)

上記[プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1の作製]における(抗PD-1-1一本鎖抗体インサート調製)と同様の手順で抗PD-1-1一本鎖抗体インサートを調製した。

[0078] (ベクター断片調製)

配列番号22に記載されているベクター直鎖化断片500 pgを鋳型として、上記表1及び表2に記載されている、TGA_Hu_Terminator_Fプライマー及びvec-SP23L20-PD-1-1_R1プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度0.2 μ M、反応容量30 μ Lとして、PrimeSTAR HS (Premix)キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて5分を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、5'-Huターミネーター-pTB6repunit-SPCMr-pUCori-Huプロモーター-SP23L20-3'ベクター断片を調製した。

[0079] 上記ベクター直鎖化断片は、配列番号22の第4番から第3845番までの塩基配列において下記のとおり構成される。

Huターミネーター:配列番号22の第4番から第117番までの塩基配列
ビフィドバクテリウム属細菌複製起点pTB6 rep unit: 配列番号22の第124番から第1719番までの塩基配列

スペクチノマイシン耐性遺伝子SPCMr: 配列番号22の第1726番から第2804番までの塩基配列

大腸菌複製起点、pUCori: 配列番号22の第2811番から第3478番までの塩基配列

Huプロモーター: 配列番号22の第3485番から第3845番までの塩基配列。

[0080] (インフュージョン反応)

上記で調製したベクター断片と抗PD-1-1一本鎖抗体インサートとを用いたことの他は、上記[プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1の作製]におけるインフュージョン反応と同様の手順でインフュージョン反応液を調製した。

[0081] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記で調製されたインフュージョン反応液5 μ Lを用いたことの他は、上記[プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1の作製]の(大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)におけると同様の手順にて、大腸菌HST08コンピテント細胞の形質転換を行い、抽出したプラスミドにおける抗PD-1-1一本鎖抗体発現カセット(HuプロモーターからHuターミネーターまでを含む)配列を決定するためシーケンス反応を行い、抽出したプラスミドをpHuSP23L20-scFv-PD-1-1と名付けた。

[0082] [プラスミドpHuSP23L27-scFv-PD-1-1の作製]

(リン酸化プライマーの調製)

表1及び表2記載のIns__PD-1-1__F1プライマー、SP23L27__R1プライマーを、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、製品説明書にしたがい、各プライマーをリン酸化した。Ins__PD-1-1__F

1リン酸化プライマー及びSP23L27__R1リン酸化プライマーを、それぞれ0.1×TEバッファー（1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、pH7.5）で終濃度20μMに調整した。

[0083]（pHuSP23L27-scFv-PD-1-1ベクター直鎖化断片調製）

上記プラスミドpHuSP23L20-scFv-PD-1-1 500pgを鋳型として、上記Ins__PD-1-1__F1リン酸化プライマー及びSP23L27__R1リン酸化プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度0.2μM、反応容量30μLにて、PrimeSTAR HS（Premix）キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて5分を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、PCR産物をQIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、pHuSP23L27-scFv-PD-1-1ベクター直鎖化断片を調製した。

[0084]（ライゲーション反応）

上記[プラスミドpHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製]における（ライゲーション反応）と同様の手順にて、上記ベクター断片について、ライゲーション反応を行い、ライゲーション反応液を調製した。

[0085]（大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認）

上記[プラスミドpHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製]における（大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認）と同様の手順にて、上記ライゲーション反応液10μLを用いて、大腸菌HST08コンピテント細胞の形質転換を行い、シーケンス反応を行った。抽出したプラスミドをpHuSP23L27-scFv-PD-1-1と名付けた。

[0086]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

上記形質転換した大腸菌より抽出した1000ngのプラスミドpHuS

P23L27-scFv-PD-1-1のDNAを用いて、上記〔プラスミドpHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製〕における（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP23L27-scFv-PD-1-1株を取得した。

[0087] [実施例2]

（組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討1）

上記実施例1にて作製した三種類の抗PD-1-1一本鎖抗体分泌プラスミドによる3種類の組換えビフィドバクテリウム属細菌（ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP3L22-scFv-PD-1-1株、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-1株、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP23L27-scFv-PD-1-1株）のそれぞれについて、抗PD-1-1一本鎖抗体の分泌確認をウェスタン解析により以下のとおり実施した。

[0088] 上記各組換えビフィドバクテリウム属細菌株の75 μ g/mLスペクチノマイシン含有BL-bS寒天培地上の画線培養物を、スペクチノマイシン（終濃度75 μ g/mL）及びビタミンC添加液（100mLあたりアスコルビン酸35g、L-システイン塩酸塩一水和物2g及び炭酸ナトリウム11gを含む溶液）100 μ Lを添加したMRS（ベクトン・ディッキンソン社製）液体培地10mLに植菌し、37℃にて24時間嫌気培養し、活性化培養液とした。次に、DMEM(Cat No. 11885-084：ライフテクノロジーズ社製)：MRSを9：1の割合で混合した培地20mLに、ビタミンC添加液100 μ L、スペクチノマイシンを75 μ g/mLになるよう添加し、上記活性化培養液100 μ Lを植菌した。これを37℃にて18時間嫌気培養した。

[0089] かかる嫌気培養後の活性化培養液を遠心分離後、培養上清を回収した。この培養上清中のタンパク質をトリクロロ酢酸（TCA、和光純薬工業株式会社製）により沈殿させ、アセトンにて洗浄後、SDS-PAGE用バッファーに溶解し、95℃にて3分間熱処理を行い、培養上清濃縮物とした。同様の操作をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pBEシャトル株についても行い、陰性コントロールとした。

[0090] 上記培養上清濃縮物（培養液1mL相当）をミニプロティアン（登録商標）TGX™ゲル（4～20%）（バイオラッド社製）にて電気泳動し、ゲルをPVD膜（iBlot Transfer Stacks、ライフテクノロジーズ社製）にiBlotトランスファーデバイス（ライフテクノロジーズ社製）を用いて転写した。ブロッティング終了後の膜をブロッキング（2% ECL Prime Blocking agent（GEヘルスケアジャパン株式会社製）in TTBS）した後、一次抗体にマウスヒスチジンタグ抗体（THE HIS Tag Antibody、mAb、Mouse、ジェンスク립トジャパン株式会社製）、二次抗体にECL-ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（GEヘルスケアジャパン株式会社製）を使用して反応を行ない、Western Lightning Ultra（パーキンエルマー社製）を用いて発光させた。これをイメージングアナライザー（Fluor SMax、バイオラッド社製）にて解析した。結果を図4に示す。レーンMはマーカー、レーン1は陰性コントロール、レーン2はpHuSP3L22-scFv-PD-1-1により形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌からの分泌抗体、レーン3はpHuSP7L20-scFv-PD-1-1により形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌からの分泌抗体、レーン4はpHuSP23L27-scFv-PD-1-1により形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌から分泌された抗体を示す。

[0091] （結果）

図4からも明らかなとおり、分泌シグナルペプチド配列SP7とこれに続く20アミノ酸配列からなる、新規の分泌シグナルペプチド-リンカー-連結体SP7L20が挿入されているpHuSP7L20-scFv-PD-1

ー 1 により形質転換されたビフィドバクリウム属細菌においては、抗 PD-1-1 一本鎖抗体の分泌が認められた。一方、pHuSP3L22-scFv-PD-1-1 又は pHuSP23L27-scFv-PD-1-1 により形質転換されたビフィドバクリウム属細菌においては、抗 PD-1-1 一本鎖抗体の分泌は認められなかった。

[0092] [実施例 3]

[33 種類の分泌シグナルペプチド-リンカー連結体についての検討]

上記 pHuSP7L20-scFv-PD-1-1 について、分泌シグナルペプチド-リンカー連結体 SP7L20 を、33 種類の分泌シグナルペプチド-リンカー連結体 (SP42L20~SP46L20、SP48L20~SP75L20) にそれぞれ置換した、33 種類の抗 PD-1-1 一本鎖抗体分泌プラスミドを構築した。構築方法の概要を図 3 に示す。用いたプライマーの詳細は以下の表 4 及び表 5 のとおりである。

[0093] [表 4]

インサート	フォワードプライマー	リバースプライマー	PCR product (bp)
SP42L20	SP42-ins_F1	SP42-ins_R1	177
SP45L20	SP45-ins_F1	SP45-ins_R1	192
SP48L20	SP48-ins_F1	SP48-ins_R1	168
SP50L20	SP50-ins_F1	SP50-ins_R1	258
SP52L20	SP52-ins_F1	SP52-ins_R1	195
SP55L20	SP55-ins_F1	SP55-ins_R1	234
SP58L20	SP58-ins_F1	SP58-ins_R1	186
SP62L20	SP62-ins_F1	SP62-ins_R1	222
SP64L20	SP64-ins_F1	SP64-ins_R1	183
SP66L20	SP66-ins_F1	SP66-ins_R1	168
SP67L20	SP67-ins_F1	SP67-ins_R1	189
SP68L20	SP68-ins_F1	SP68-ins_R1	219
SP69L20	SP69-ins_F1	SP69-ins_R1	180

[0094]

[表5]

プライマー名	配列 (5 → 3)
PD-1-scFv_vec_F1	CAGGTCCAGCTGGTCCAGAG (配列番号 5 3)
Hu_Vec_R1	AAAGCATCCTTCTTGGGTCAGG (配列番号 5 4)
SP42-ins_F1	caagaaggatgctttGTGCCCGTACTACGCG (配列番号 5 5)
SP42-ins_R1	gaccagctggacctgTCCAGCAAGGTGCAGAG (配列番号 5 6)
SP45-ins_F1	caagaaggatgctttATGAAGCACCTCTCCACCG (配列番号 5 7)
SP45-ins_R1	gaccagctggacctgATGCCCGTCGTTCCCT (配列番号 5 8)
SP48-ins_F1	caagaaggatgctttGTGCTGATTCTCATCGTTCTCG (配列番号 5 9)
SP48-ins_R1	gaccagctggacctgGAGCGCGTTCAAAGTGTCTG (配列番号 6 0)
SP50-ins_F1	caagaaggatgctttATGATCGTGGCCTACCCG (配列番号 6 1)
SP50-ins_R1	gaccagctggacctgTTCCATATCGTTGTATGAAACGC (配列番号 6 2)
SP52-ins_F1	caagaaggatgctttATGAGTTTCCATGTATCCGCG (配列番号 6 3)
SP52-ins_R1	gaccagctggacctgCAGTTCGTTATACGCGTGACCG (配列番号 6 4)
SP55-ins_F1	caagaaggatgctttATGGTTCTGCGGCCCA (配列番号 6 5)
SP55-ins_R1	gaccagctggacctgCCAGGTGGCGTAGTCAACG (配列番号 6 6)
SP58-ins_F1	caagaaggatgctttATGGCAATGGCAGGC (配列番号 6 7)
SP58-ins_R1	gaccagctggacctgGGTGGTTGCCCGTTGATG (配列番号 6 8)
SP62-ins_F1	caagaaggatgctttATGACTCGTTCGGACGACGT (配列番号 6 9)
SP62-ins_R1	gaccagctggacctgCATGTTGAACATCGAACGTTTG (配列番号 7 0)
SP64-ins_F1	caagaaggatgctttATGAAGTCACTAATCAGGAATGTAGCG (配列番号 7 1)
SP64-ins_R1	gaccagctggacctgCTTCTTGCCGTTGAACGCG (配列番号 7 2)
SP66-ins_F1	caagaaggatgctttGTGAAGCATTGGAAGAAGATGGC (配列番号 7 3)
SP66-ins_R1	gaccagctggacctgCTTAGTAGTCTGCACTGTCCGG (配列番号 7 4)
SP67-ins_F1	caagaaggatgctttATGAAGATAACAATAAGGGCAAGG (配列番号 7 5)
SP67-ins_R1	gaccagctggacctgGGGCTGGAAGTTGGTGTATGTC (配列番号 7 6)
SP68-ins_F1	caagaaggatgctttATGGTTTATAACATTACATATTGCAAAC (配列番号 7 7)
SP68-ins_R1	gaccagctggacctgCTTCCAACCATTAAGATCGTCTTCG (配列番号 7 8)
SP69-ins_F1	caagaaggatgctttATGAATTATTACGACAAAAAATTCGG (配列番号 7 9)
SP69-ins_R1	gaccagctggacctgACCGCTATCAGTCGTGGTGTAAAC (配列番号 8 0)

[0095] [分泌シグナルペプチド配列、及びこれに続くリンカーペプチド配列の選定]

NCBIのゲノムデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)に登録されているビフィドバクテリウム・ロンガムNCC2705株由来タンパクの全アミノ酸配列を分泌シグナルの有無を予測するシグナル配列予測プログラムSignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)で解析した。この解析により、タンパクのN末端に分泌シグナルペプチド配列を有すると予測されたタンパクの一部のアミノ酸配列に

対し、膜貫通領域（TM）を推定するプログラムTMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)にてトポロジー解析を行った。このトポロジー解析結果より、タンパク質のN末端にTMが存在すると推定されたタンパク質として33種のタンパク質を選定した。この33種のタンパク質を、TMを有すると予想されるビフィドバクテリウム・ロンガムNCC 2705株由来の分泌シグナルペプチドとして選定した。選定した33種のペプチドのアミノ酸配列に対応するビフィドバクテリウム・ロンガム105A株のアミノ酸配列において、各タンパク質のアミノ酸配列N末端からSignalP解析によってプロテアーゼ切断推定部位と推定されたアミノ酸配列までを各分泌シグナルペプチド配列とした。また、リンカーペプチド配列は、各シグナル配列のC末端より続く20アミノ酸残基とした。

[0096] [プラスミドpHuSPxL20-scFv-PD-1-1の作製]

(SPxL20インサート調製)

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株120pgを鋳型として、表4及び表5に記載されている各プライマーセットを用いてPCR増幅を行った。各プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端15bpが重複するように設計した。プライマー濃度0.2 μ M、反応容量20 μ Lにて、PrimeSTAR HS (Premix) キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて10秒、65℃にて5秒、72℃にて20秒を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃にて30秒伸長反応を行い、上記33種類の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体インサートが増幅された。

[0097] (ベクター調製)

上記pHuSP7L20-scFv-PD-1-1 2.5ngを鋳型として、上記表4及び表5に記載されているPD-1-scFv__vec__F1プライマー及びHu__Vec__R1プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度0.2 μ M、反応容量50 μ Lにて、PrimeSTAR HS (Premix) キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラ

ムとしては、98℃にて10秒、65℃にて5秒、72℃にて4分45秒を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃にて30秒伸長反応を行った。かかる処理により、5'-scFv-PD-1-1-Huターミネーター-pTB6repunit-SPCMr-pUCori-Huプロモーター-3'のベクター断片が調製された。

[0098] (インフュージョン反応)

上記で調製したベクター断片と33種類の各分泌シグナルペプチドリンカー連結体インサートをIn-Fusion (登録商標) HD Cloning Kitを用いて連結した。即ち、マイクロチューブに、ベクターとインサートを1:2のモル比にて添加し、キット内の5xIn-Fusion HD Enzyme premix 2μLを添加、0.1xTEバッファー (1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、pH7.5) にて10μLに調整した。これを、37℃にて15分間保温した後、さらに50℃にて15分間保温した。その他の手順は、キットの製品説明書にしたがい、33種類のインフュージョン反応液を調製した。

[0099] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記33種類のインフュージョン反応液0.8μLを用いて大腸菌HST16CRコンピテント細胞(タカラバイオ株式会社製)の形質転換をそれぞれ行った。形質転換後の菌懸濁液は、75μg/mLスペクチノマイシン含有LB寒天培地に塗布し、37℃にて一晩静置培養した。形質転換条件は、大腸菌HST16CRコンピテント細胞についての製品説明書にしたがったが、以下に概要を記載する。上記寒天培地上に形成した大腸菌コロニーを75μg/mLスペクチノマイシン含有LB液体培地にて37℃にて一晩培養し、これよりQIAprep Spin Miniprep Kitを用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドの抗PD-1-1一本鎖抗体発現カセット(HuプロモーターからHuターミネーターまでを含む)配列を決定するため、BigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いてシーケンス反応を行った。抽

出したプラスミドを pHuSPxL20-scFv-PD-1-1（但し、 $x=42\sim46$ 、 $48\sim75$ ）とした。

[0100]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミド pHuSPxL20-scFv-PD-1-1（但し、 $x=42\sim46$ 、 $48\sim75$ ）について、各々 500 ng の DNA を用いて、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株の形質転換を、上記「プラスミド pHuSP3L22-scFv-PD-1-1 の作製」における（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）と同様の方法で行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSPxL20-scFv-PD-1-1（但し、 $x=42\sim46$ 、 $48\sim75$ ）のそれぞれの株を取得した。

[0101] [実施例 4]

（組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討 2）

上記実施例 3 で取得した組換えビフィドバクテリウム属細菌である、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSPxL20-scFv-PD-1-1 株（但し、 $x=42\sim46$ 、 $48\sim75$ ）のそれぞれについて、上記（組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討 1）と同様の方法にて抗 PD-1-1 一本鎖抗体の分泌確認をウェスタン解析により実施した。結果を図 5 に示す。

[0102] 図 5 から明らかなとおり、以下の 11 種類（SP7L20、SP45L20、SP50L20、SP52L20、SP55L20、SP58L20、SP64L20、SP66L20、SP67L20、SP68L20、SP69L20）の各分泌シグナルペプチド-リンカー連結体が挿入されている抗 PD-1-1 一本鎖抗体分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株において分泌が認められた。一方、SP42、SP48、SP62 の分泌シグナルペプチド配列とそれぞれに続く 20 アミノ酸残基からなるリンカーペプチド配列からなる SP42L20、SP4

8 L 2 0、S P 6 2 L 2 0の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されているプラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌においては、抗PD-1-1一本鎖抗体の分泌は認められなかった。

[0103] 上記検討により、一本鎖抗体を分泌することができたビフィドバクテリウム属細菌は、S P 4 5 L 2 0、S P 5 0 L 2 0、S P 5 2 L 2 0、S P 5 5 L 2 0、S P 5 8 L 2 0、S P 6 4 L 2 0、S P 6 6 L 2 0、S P 6 7 L 2 0、S P 6 8 L 2 0、S P 6 9 L 2 0を含む発現カセットを用いて形質転換した細菌のみであった。その他の23種の配列については、分泌しない、もしくは分泌が不十分であったことを確認した。分泌しない、もしくは分泌が不十分であった分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の例として、S P 4 2 L 2 0、S P 4 8 L 2 0、S P 6 2 L 2 0の配列を、配列番号17、18、19にそれぞれ示す。

[0104] [実施例5]

[p H u S P 7 L 2 0 - s c F v - P D - 1 - 2 の作製]

異種ペプチドとして上記抗PD-1-2一本鎖抗体を用い、分泌シグナルペプチドーリンカー連結体S P 7 L 2 0を有する抗PD-1-2一本鎖抗体分泌プラスミドp H u S P 7 L 2 0 - s c F v - P D - 1 - 2を構築した。詳細は以下のとおりである。

[0105] (抗PD-1-2一本鎖抗体インサート調製)

前記人工的に合成されたプラスミドp U C 5 7 - s c F v - P D - 1 - 2 5 0 0 p g を鋳型として、上記表1及び表2に記載されている、I n s _ _ P D - 1 - 2 _ _ F 1 プライマー及びI n s _ _ P D - 1 - 2 _ _ R 1 プライマーからなるプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端15bpが重複するように設計された。PCR反応液は、P r i m e S T A R H S (P r e m i x) キットを用いて、プライマー0.2μM、反応容量30μLとした。増幅のプログラムは、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて60秒を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を2%アガロースゲルにて

電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、抗PD-1-2一本鎖抗体インサートを調製した。

[0106] (ベクター断片調製)

配列番号23に記載されているベクター直鎖化断片500pgを鋳型として、上記表1及び表2に記載されている、TGA__Hu__Terminator__Fプライマー及びvec-SP7L20-PD-1-2__R1プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度0.2μM、反応容量30μLにて、PrimeSTAR HS (Premix) キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムは、98℃で10秒、55℃で5秒、72℃で5分を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、5'-Huターミネーター-pTB6repunit-SPCMr-pUCori-Huプロモーター-SP7L20-3'ベクター断片(2)を調製した。

[0107] 上記ベクター直鎖化断片は、配列番号23の第4番から第3845番までの塩基配列において下記のとおり構成される。

Huターミネーター:配列番号23の第4番から第117番までの塩基配列

ビフィドバクテリウム属細菌複製起点pTB6repunit: 配列番号23の第124番から第1719番までの塩基配列

スペクチノマイシン耐性遺伝子SPCMr: 配列番号23の第1726番から第2804番までの塩基配列

大腸菌複製起点、pUCori: 配列番号23の第2811番から第3478番までの塩基配列

Huプロモーター: 配列番号23の第3485番から第3845番までの塩基配列。

[0108] (インフュージョン反応)

上記で調製されたベクター断片と抗PD-1-2一本鎖抗体インサートと

を用いたことの他は、上記〔プラスミド pHuSP3L20-scFv-PD-1-1 の作製〕におけるインフュージョン反応と同様の手順でインフュージョン反応液を調製した。

[0109] (大腸菌の形質転換及びプラスミド DNA の配列確認)

上記で調製されたインフュージョン反応液 5 μ L を用いた他は、前記実施例 1 の〔プラスミド pHuSP3L20-scFv-PD-1-1 の作製〕の (大腸菌の形質転換及びプラスミド DNA の配列確認) と同様の手順にて、大腸菌 HST08 コンピテント細胞の形質転換を行い、抽出したプラスミドにおける抗 PD-1-2 一本鎖抗体発現カセット (Hu プロモーターから Hu ターミネーターまでを含む) 配列を決定するためシーケンス反応を行い、抽出したプラスミドを pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 と名付けた。

[0110] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換)

上記形質転換した大腸菌より抽出した 1000 ng のプラスミド pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 の DNA を用いて、上記〔プラスミド pHuSP3L22-scFv-PD-1-1 の作製〕における (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換) と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 株を取得した。

[0111] [実施例 6]

[pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 の作製]

異種ペプチドとして抗 PD-1-3 一本鎖抗体を選択し、分泌シグナルペプチド-リンカー連結体 (SP7L20) を有する抗 PD-1-3 一本鎖抗体分泌プラスミド pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 を構築した。詳細は以下のとおりである。

[0112] (抗 PD-1-3 一本鎖抗体インサート調製)

前記人工的に合成されたプラスミド pUC57-scFv-PD-1-3

500 pg を鋳型として、上記表 1 及び表 2 に記載されている、Ins_PD-1-3_F1 プライマー及び Ins_PD-1-3_R1 プライマーからなるプライマーセットを用いたことの他は、上記 [pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 の作製] の (抗 PD-1-2 一本鎖抗体インサート調製) と同様の手順にて、抗 PD-1-3 一本鎖抗体インサートを調製した。

[0113] (ベクター断片調製)

配列番号 24 に記載されているベクター直鎖化断片 500 pg を鋳型として、上記表 1 及び表 2 に記載されている、TGA_Hu_Terminator_F プライマー及び vec-SP7L20-PD-1-3_R1 プライマーからなるプライマーセットを用いたことの他は、pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 の作製] の (ベクター断片調製) と同様の手順で、5'-Huターミネーター-pTB6 rep unit-SPCMr-pUCori-Huプロモーター-SP7L20-3' ベクター断片 (3) を調製した。

[0114] 上記ベクター直鎖化断片は、配列番号 24 の第 4 番から第 3845 番までの塩基配列において下記の塩基配列で構成される。

Huターミネーター: 配列番号 24 の第 4 番から第 117 番までの塩基配列

ビフィドバクテリウム属細菌複製起点 pTB6 rep unit: 配列番号 24 の第 124 番から第 1719 番までの塩基配列

スペクチノマイシン耐性遺伝子 SPCMr: 配列番号 24 の第 1726 番から第 2804 番までの塩基配列

大腸菌複製起点、pUCori: 配列番号 24 の第 2811 番から第 3478 番までの塩基配列

Huプロモーター: 配列番号 24 の第 3485 番から第 3845 番までの塩基配列。

[0115] (インフュージョン反応)

上記で調製したベクター断片と抗 PD-1-3 一本鎖抗体インサートとを

用いたことの他は、上記〔プラスミド pHuSP3L20-scFv-PD-1-1 の作製〕におけるインフュージョン反応と同様の手順でインフュージョン反応液を調製した。

[0116] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記で調製されたインフュージョン反応液 5 μ L を用いた他は、前記実施例 1 の〔プラスミド pHuSP3L20-scFv-PD-1-1 の作製〕の (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認) におけると同様の手順にて、大腸菌 HST08 コンピテント細胞の形質転換を行い、抽出したプラスミドにおける抗 PD-1-3 一本鎖抗体発現カセット (Hu プロモーターから Hu ターミネーターまでを含む) 配列を決定するためシーケンス反応を行い、抽出したプラスミドを pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 と名付けた。

[0117] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換)

上記形質転換した大腸菌より抽出した 1000 ng のプラスミド pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 の DNA を用いて、上記〔プラスミド pHuSP3L22-scFv-PD-1-1 の作製〕における (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換) と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 株を取得した。

[0118] [実施例 7]

[pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1 の作製]

分泌シグナルペプチドリンカー連結体 SP7L20 を有する抗 CTLA-4-1 一本鎖抗体分泌プラスミド pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1 を構築した。

抗 CTLA-4 一本鎖抗体分泌プラスミドの作製概要を図 2 に示す。図 2 左側において、scFv-gene は、CTLA-4 であり、pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1 の作製において、 $x=7$ 、 $m=1$ であ

り、pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2の作製において、 $x = 7$ 、 $m = 2$ である。

詳細は以下のとおりである。

[0119] [抗CTLA-4一本鎖抗体の発現カセット]

抗CTLA-4一本鎖抗体の発現カセットは図1(b)に示されるとおり、HuプロモーターDNA(ビフィドバクテリウム・ロンガム由来)、分泌シグナルペプチドをコードするDNAと前記分泌シグナルペプチドに続くリンカーペプチドをコードするDNA、抗CTLA-4一本鎖抗体(重鎖配列、リンカー((GGGGS)₃)、軽鎖配列を含む)をコードするDNA、Hisタグ配列、及びHuターミネーター(ビフィドバクテリウム・ロンガム由来)で構成した。各発現カセット中の抗CTLA-4一本鎖抗体(重鎖配列、リンカー((GGGGS)₃)、軽鎖配列を含む塩基配列を含む)は、以下に示すとおり、以下の表6に示される文献を参照し、二種類の抗ヒトCTLA-4一本鎖抗体を使用した。

[0120] [表6]

抗体		参考文献
scFv-CTLA-4-1	配列番号4(765塩基配列) 配列番号141(254アミノ酸) 重鎖配列(1~378塩基) (GGGGS) ₃ リンカー(379~423塩基) 軽鎖配列(424~744塩基) ヒスチジンタグ(745~762塩基)	日本国特許3793693号
scFv-CTLA-4-2	配列番号5(747塩基配列) 配列番号142(248アミノ酸) 重鎖配列(1~357塩基) (GGGGS) ₃ リンカー(358~402塩基) 軽鎖配列(403~726塩基) ヒスチジンタグ(727~744塩基)	日本国特許4093757号

[0121] 配列番号4に示されたs c F v - C T L A - 4 - 1及び配列番号5に示されたs c F v - C T L A - 4 - 2の各一本鎖抗体遺伝子については、ジェンスクリプトジャパン株式会社にて、大腸菌用プラスミドp U C 5 7にサブクローニングされ、プラスミドp U C 5 7 - s c F v - C T L A - 4 - 1及びp U C 5 7 - s c F v - C T L A - 4 - 2として人工遺伝子合成された。

[0122] (抗C T L A - 4 - 1一本鎖抗体インサート調製)

プラスミドp U C 5 7 - s c F v - C T L A - 4 - 1 5 0 0 p gを鋳型として、上記表1及び表2に記載されている、I n s _ C T L A - 4 - 1 _ F 1プライマー及びI n s _ C T L A - 4 - 1 _ R 1プライマーからなるプライマーセットを用いてP C R増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端1 5 b pが重複するように設計した。P C R反応液は、プライマー0. 2 μM、反応容量3 0 μLとし、P r i m e S T A R H S (P r e m i x) (タカラバイオ株式会社)キットを用いて増幅をおこなった。増幅のプログラムは、9 8 °Cで1 0秒、5 5 °Cで5秒、7 2 °Cで6 0秒を1サイクルとして、3 0サイクル行った。増幅されたインサートP C R産物を2 %アガロースゲルにて電気泳動した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i tを用いて精製し、抗C T L A - 4 - 1一本鎖抗体インサートを調製した。

[0123] (ベクター断片調製)

前記[p H u S P 7 L 2 0 - s c F v - P D - 1 - 1の作製]の(ベクター断片調製)と同様の手順にて、5' - H uターミネーター- p T B 6 r e p u n i t - S P C M r - p U C o r i - H uプロモーター- S P 7 L 2 0 - 3'ベクター断片(1)を調製した。

[0124] (インフュージョン反応)

上記で調製されたベクター断片と上記抗C T L A - 4 - 1一本鎖抗体インサートとを用いたことの他は、上記[プラスミドp H u S P 3 L 2 0 - s c F v - P D - 1 - 1の作製]におけるインフュージョン反応と同様の手順でインフュージョン反応液を調製した。

[0125] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記で調製されたインフュージョン反応液 5 μ L を用いたことの他は、上記 [プラスミド pHuSP3L20-scFv-PD-1-1 の作製] の (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認) と同様の手順にて、大腸菌 HST08 コンピテント細胞の形質転換を行い、抽出したプラスミドにおける抗CTLA-4-1 一本鎖抗体発現カセット (Huプロモーターから Huターミネーターまでを含む) 配列を決定するためシーケンス反応を行い、抽出したプラスミドを pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1 と名付けた。

[0126] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換)

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミド pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1 1000 ng の DNA を用いたことの他は、上記 [pHuSP3L22-scFv-PD-1-1 の作製] における (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換) と同様の方法で、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1 株を取得した。

[0127] [実施例 8]

[pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2 の作製]

分泌シグナルペプチドリンカー連結体 (SP7L20) を有する抗CTLA-4-2 一本鎖抗体分泌プラスミド pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2 を構築した。詳細は以下のとおりである。

[0128] (抗CTLA-4-2 一本鎖抗体インサート調製)

上記プラスミド pUC57-scFv-CTLA-4-2 を鋳型として、上記表 1 及び表 2 に記載されている、Ins__CTLA-4-1__F1 プライマー及び Ins__CTLA-4-2__R1 プライマーセットからなるプライマーセットを用いたことの他は、上記 (抗CTLA-4-1 一本鎖抗体インサート調製) と同様に手順にて、抗CTLA-4-2 一本鎖抗体インサート

トを精製した。

[0129] (ベクター調製)

前記 [pHuSP7L20-scFv-PD-1-1の作製] の (ベクター断片調製) と同様の手順にて 5' -Huターミネーター-pTB6repunit-SPCMr-pUCori-Huプロモーター-SP7L20-3' ベクター断片 (1) を調製した。

[0130] (インフュージョン反応)

上記で調製されたベクター断片と上記抗CTLA-4-2一本鎖抗体インサートとを用いたことの他は、上記 [プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1の作製] におけるインフュージョン反応と同様の手順でインフュージョン反応液を調製した。

[0131] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記で調製されたインフュージョン反応液 5 μ L を用いた他は、前記実施例 1 の [プラスミドpHuSP3L20-scFv-PD-1-1の作製] の (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認) と同様の手順にて、大腸菌HST08コンピテント細胞の形質転換を行い、抽出したプラスミドにおける抗CTLA-4-2一本鎖抗体発現カセット (HuプロモーターからHuターミネーターまでを含む) 配列を決定するためシーケンス反応を行い、抽出したプラスミドをpHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2と名付けた。

[0132] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換)

上記形質転換した大腸菌より抽出した1000ngのプラスミドpHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2を用いたことの他は、上記 [pHuSP3L22-scFv-PD-1-1の作製] における (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換) と同様の方法で、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2株を取得した。

[0133] [実施例9]

(組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討3)

抗PD-1一本鎖抗体分泌プラスミド及び抗CTLA-4一本鎖抗体分泌プラスミドによる組換えビフィドバクテリウム属細菌である、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-1株、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-2株、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-3株、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1株及びビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2株について、上記(組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討1)と同様の方法にて抗PD-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4一本鎖抗体の分泌確認をウェスタン解析により実施した。但し、培養時間は15時間とした。結果を図6に示す。

[0134] (結果)

図6から明らかなとおり、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-1株の培養上清で抗PD-1-1一本鎖抗体の分泌が認められ、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-2株の培養上清で抗PD-1-2一本鎖抗体の分泌が認められ、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-3株の培養上清で抗PD-1-3一本鎖抗体の分泌が確認され、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1株の培養上清で抗CTLA-4-1一本鎖抗体の分泌が認められ、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2株の培養上清で抗CTLA-4-2一本鎖抗体の分泌が確認された。

[0135] [実施例10]

[組換えビフィドバクテリウム属細菌株からの抗PD-1及び抗CTLA-

4 一本鎖抗体の精製]

ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-1 株、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 株、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 株、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1 株及びビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-2 株について、一本鎖抗体の精製を以下に示す方法で行った。

- [0136] 上記各組換えビフィドバクテリウム属細菌株を、スペクチノマイシン(終濃度 $75 \mu\text{g}/\text{mL}$)及びビタミンC添加液 $100 \mu\text{L}$ を添加したMRS培地 10 mL に植菌し、 37°C にて24時間嫌気培養を行った。DMEM:MRS (9:1) 培地に、スペクチノマイシン(終濃度 $75 \mu\text{g}/\text{mL}$)、ビタミンC添加液(培地 100 mL あたり $500 \mu\text{L}$) を添加して調整し、これに上記培養液を培地量の0.5%量植菌し、 37°C にて18時間嫌気培養をした。

上記嫌気培養後の培養液を遠心分離して得た培養上清を攪拌しながら、硫酸アンモニウムを80%飽和になるよう少しずつ添加し、 4°C にて一晩攪拌し塩析を行った。これを遠心分離後、沈殿を回収し、ヒスチジントグ付きタンパク質の精製キット(TALON resin、タカラバイオ株式会社製)にてヒスチジントグ融合タンパクを精製した。この精製溶液を限外ろ過(アミコンウルトラ-0.5、メルクミリポア社製)にて濃縮した。精製タンパク質の濃度は、Bradford法にて測定した(Coomassie Plus Protein Assay、Thermo Scientific社製)。上記精製一本鎖抗体の一部を用いてSDS-PAGE後、クーマシーブリリアントブルー染色(SimplyBlue(登録商標) Safe Stain、ライフテクノロジーズ社製)を行い、約9割の純度でscFv-PD-1-1、scFv-PD-1-2、scFv-PD-1-3、scFv-CTLA4-1、及びscFv-CTLA4-2の各一本鎖抗体が精製され

ていることを確認した。

[0137] [実施例 11]

[ヒト PD-1 と、抗 PD-1 一本鎖抗体又は抗 CTLA-4 一本鎖抗体との結合の有無の確認]

ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSP7L20-scFv-PD-1-2 株の培養上清より精製した抗 PD-1-2 一本鎖抗体についてヒト PD-1 (hPD-1) との結合の有無の確認を、ELISA 法により行った。

[0138] 96 ウェルプレートに、1×PBS にて 1 μg/mL に調整した hPD-1 (Recombinant Human PD-1 Fc Chimera、R&D Systems 社製) を 100 μL ずつ分注し 4℃ にて一晩静置することで固相化した。液を除去後、1×PBS を 350 μL ずつ分注し、液を除去した。これを 3 回繰り返し洗浄した。上記プレートに 1% の BSA 溶液を 350 μL ずつ分注し室温で 2 時間静置することでブロッキングを行った。液を除去後、1×PBS を 350 μL ずつ分注し、液を除去した。これを 3 回繰り返し洗浄した。

[0139] 抗 PD-1-2 一本鎖抗体をシグナル増強試薬 (Signal Enhancer HIKARI、nacalai tesque 社製) にて 1000 ng/mL、100 ng/mL、10 ng/mL 及び 1 ng/mL に調整し、100 μL ずつ上記ブロッキング終了後プレートに分注した。陰性コントロールとして、ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗 CTLA-4-1 一本鎖抗体、抗 CTLA-4-2 一本鎖抗体についても、上記と同様に調整した。ブランクのウェルにはシグナル増強試薬のみを 100 μL 分注した。プレートにシールをし、室温で 2 時間静置後、固相化した hPD-1 と各一本鎖抗体を反応した。液を除去後、1×PBS を 350 μL ずつ分注し、液を除去した。これを 3 回繰り返し洗浄した。

[0140] 二次抗体 (The His-Tag Antibody、GenScript 社製) をシグナル増強試薬で 2500 倍に薄め、これを 100 μL ずつ分注した。プレートにシールをし、室温で 2 時間静置した。液を除去後、1×PBS を 350 μL ずつ分注し

、液を除いた。これを3回繰り返し洗浄した。

[0141] 三次抗体 (Biotin anti-mouse IgG、Biolegend社製) をシグナル増強試薬で20,000倍に薄め、これを100 μ Lずつ分注した。プレートにシールをし、室温で30分間静置した。液を除去後、1 $\times$ PBSを350 μ Lずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Vectastain ABC Kit, Vector社製) としてA液及びB液を3滴ずつシグナル増強試薬7.5mLに添加した。これを100 μ Lずつ分注後、プレートにシールをし、室温で30分間静置した。液を除去後、1 $\times$ PBSを350 μ Lずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0142] 検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B (R&D Systems社製) を等量ずつ混ぜ、200 μ Lずつ分注し、遮光して室温で20分静置した。正確に20分経過後Stop solution (R&D Systems社製) を50 μ Lずつ添加し呈色反応を停止した。測定は450nmの吸光度を、570nmを対照として測定した。ELISA法を用いたヒトPD-1固相化プレートへの抗PD-1-2一本鎖抗体、抗CTLA-4-1一本鎖抗体、抗CTLA-4-2一本鎖抗体の結合の有無の結果を以下の表7及び図7に示す。

[0143] [表7]

抗体濃度	抗PD-1-2一本鎖抗体 (scFvPD-1-2)	抗CTLA-4-1一本鎖抗体 (scFvCTLA-4-1)	抗CTLA-4-2一本鎖抗体 (scFvCTLA-4-2)
1000ng/mL	2.816	-0.038	-0.022
100ng/mL	3.062	-0.117	-0.151
10ng/mL	0.912	-0.106	-0.153
1ng/mL	0.058	-0.092	-0.161

[0144] (結果)

表7及び図7から明らかとなおり、ビフィドバクテリウム属細菌より精製

された抗PD-1-2一本鎖抗体は、濃度依存的にhPD-1と結合した。一方、ビフィドバクテリウム属細菌より同様に精製された抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体は、hPD-1に結合しなかった。かかる結果により、ビフィドバクテリウム属細菌が分泌した抗PD-1-2一本鎖抗体（抗ヒトPD-1抗体）は、hPD-1に特異的に結合していることが確認された。

[0145] [実施例12]

[ヒトCTLA-4と、抗PD-1一本鎖抗体又は抗CTLA-4一本鎖抗体との結合の有無の確認]

上記培養上清より精製した抗PD-1-2一本鎖抗体と、抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体とを用いて、ヒトCTLA-4（hCTLA-4）（Recombinant Human CTLA-4-Fc Chimera、carrier-free BioLegend社製）との結合の有無の確認を上記[ヒトPD-1と、抗PD-1一本鎖抗体又は抗CTLA-4一本鎖抗体との結合の有無の確認]と同様の手順で行った。ヒトCTLA-4固相化プレートへ抗PD-1-2一本鎖抗体と、抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体の結合の有無の結果を以下の表8及び図8に示す。

[0146] [表8]

抗体濃度	抗PD-1-2一本鎖抗体 (scFv PD-1-2)	抗CTLA-4-1一本鎖抗体 (scFv CTLA-4-1)	抗CTLA-4-2一本鎖抗体 (scFv CTLA-4-2)
1000ng/mL	0.649	2.240	2.967
100ng/mL	0.085	1.528	1.643
10ng/mL	-0.006	0.365	0.404
1ng/mL	-0.012	0.059	0.028

[0147] (結果)

表8及び図8から明らかとなおり、抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体は、濃度依存的にhCTLA-4と結合した。

一方、ビフィドバクテリウム属細菌より同様に精製された抗PD-1-2一本鎖抗体は、hCTLA-4に結合しなかった。かかる結果により、ビフィドバクテリウム属細菌が分泌した抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体（共に抗ヒトCTLA-4抗体）は、hCTLA-4に特異的に結合していることが確認された。

[0148] [実施例13]

（マウスPD-1と抗PD-1-3一本鎖抗体の結合の有無の確認1）

上記ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scfv-PD-1-3株の培養上清より精製した抗PD-1-3一本鎖抗体とマウスPD-1（mPD-1）との結合の有無の確認を以下のELISA法にて行った。

[0149] 96ウェルプレートに、1×PBSにて1μg/mLに調整したmPD-1（Recombinant Mouse PD-1 Fc Chimera、R&D Systems社製）を100μLずつ分注し4℃で一晩静置することで固相化した。液を除去後、1×PBSを350μLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。上記プレートに1%BSA溶液を350μLずつ分注し室温で2時間静置することでブロッキングを行った。液を除去後、1×PBSを350μLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0150] ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗PD-1-3一本鎖抗体をシグナル増強試薬（Signal Enhancer HIKARI、nacalaitesque社製）で調整し、1000ng/mL、100ng/mL及び10ng/mLとし、100μLずつ上記ブロッキング終了後プレートに分注した。コントロールとして、ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗PD-1-2一本鎖抗体及びビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗CTLA-4-2一本鎖抗体についても、上記と同様に調整した。ブランクのウェルにはシグナル増強試薬のみを100μL分注した。プレートにシールをし、室温で2時間静置後、固相化したmPD-1と抗PD-1-3一本鎖抗体を反応した。液を除去後、1×PBSを350μLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し

洗浄した。

[0151] 二次抗体 (Anti-His-tag mAb-Biotin、MBL) をシグナル増強試薬で2、000倍に薄め、これを100 μ Lずつ分注した。プレートにシールをし、室温で2時間静置した。液を除去後、1 $\times$ PBSを350 μ Lずつ分注し、液を除いた。これを3回繰り返し洗浄した。

[0152] 前記アビジン-ビオチン標識酵素複合体を用いて、キットのA液及びB液を3滴ずつシグナル増強試薬7.5 mLに添加した。これを100 μ Lずつ分注後、プレートにシールをし、室温で30分間静置した。液を除去後、1 $\times$ PBSを350 μ Lずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0153] 検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B (R&D Systems社製) を等量ずつ混ぜ、200 μ Lずつ分注後、遮光して室温で20分静置した。正確に20分経過後Stop solution (R&D Systems社製) を50 μ Lずつ添加し呈色反応を停止した。

[0154] 測定は450 nmの吸光度を、570 nmを対照として測定した。マウスPD-1固相化プレートへの抗PD-1-2一本鎖抗体、抗PD-1-3一本鎖抗体、抗CTLA-4-2一本鎖抗体の結合の有無の結果を表9及び図9に示す。

[0155] [表9]

抗体濃度	抗PD-1-2一本鎖抗体 (scFv PD-1-2)	抗PD-1-3一本鎖抗体 (scFv PD-1-3)	抗CTLA-4-2一本鎖抗体 (scFv CTLA-4-2)
1000ng/mL	0.014	3.107	0.090
100ng/mL	-0.010	0.561	-0.038
10ng/mL	0.075	0.312	-0.036

[0156] (結果)

抗PD-1-3一本鎖抗体は、濃度依存的にmPD-1と結合した。一方、同様に精製した抗PD-1-2一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖

抗体は、mPD-1に結合しなかった。これよりビフィドバクテリウム属細菌が分泌した抗PD-1-3一本鎖抗体（抗マウスPD-1抗体）は、mPD-1に特異的に結合していることが示された。

[0157] [実施例14]

（マウスPD-1と抗PD-1-3一本鎖抗体との結合の有無の確認2）

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-3株の培養上清より精製した抗PD-1-3一本鎖抗体について、マウスPD-1（mPD-1）への結合の特異性を確認した。プレートに固相化するタンパク質をhCTLA-4（Recombinant Human CTLA-4-Fc Chimera carrier-free、BioLegend社製）として、上記[実施例13]と同様の試験を実施した。結果を表10と図10に示す。

[0158] （結果）

表10と図10からも明らかとなおり、陽性コントロールである抗CTLA-4-2一本鎖抗体は、濃度依存的にhCTLA-4と結合しているが、抗PD-1-3一本鎖抗体は、結合しなかった。また、抗ヒトPD-1抗体である抗PD-1-2一本鎖抗体も、結合しなかった。これらの結果からも上記[実施例13]でのmPD-1と抗PD-1-3一本鎖抗体の結合は特異的であることが示された。

[0159] [表10]

抗体濃度	抗PD-1-2一本鎖抗体 (scFv PD-1-2)	抗PD-1-3一本鎖抗体 (scFv PD-1-3)	抗CTLA-4-2一本鎖抗体 (scFv CTLA-4-2)
1000ng/mL	0.045	0.166	2.984
100ng/mL	-0.031	0.030	1.035
10ng/mL	-0.010	0.004	0.117

[0160] [実施例15]

（抗PD-1-2一本鎖抗体とヒトPD-1とのフローサイトメトリー解析による結合の有無の確認）

抗PD-1-2一本鎖抗体のヒトPD-1過剰発現細胞との結合

ヒトPD-1を過剰発現したJurkat細胞(信州大学分子腫瘍学講座谷口俊一郎教授より供与)、及びヒトPD-1を過剰発現したHEK293T細胞(信州大学分子腫瘍学講座谷口俊一郎教授より供与)を使用して検討した。ヒトPD-1過剰発現Jurkat細胞は100mmペトリディッシュ(イナ・オプティカ社)に 5×10^6 cells / 10 mL 培地(非働化した10%ウシ胎児血清、50 μ Mの2-メルカプトエタノール及び8 mM HEPESを含むRPMI 1640培地)/dishに播き、ヒトPD-1過剰発現HEK293T細胞は100mmディッシュ(グライナー・ジャパン社製)に 2×10^6 cells / 10 mL 培地(非働化した10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地)に播いた。翌日、ヒトPD-1過剰発現Jurkat細胞は、15 mLファルコンチューブ(ベクトン・ディッキンソン社製)に回収後、細胞数を血球計算盤にて計測し、 1×10^5 cells / mL / チューブになるよう1.5 mLチューブ(イナ・オプティカ社製)に分注した。ヒトPD-1過剰発現HEK293T細胞は、培養上清を除去し、PBS (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} フリー・リン酸緩衝液)にて2度洗浄し、PBSで10倍に希釈したトリプシン・EDTA溶液(Wako社製)1 mLを加え1分間室温で静置後、10 mLの非働化した10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地を加え、15 mLファルコンチューブに移した。低速遠心機(トミー精工社製)で1000 rpm、5分間遠心後、上清を除去し1 mLの非働化した10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地を加え、細胞数を計測した。さらにDMEM培地を添加し、 1×10^5 cells / mLに細胞懸濁液を調製し、1.5 mLチューブ(イナ・オプティカ社)に 1×10^5 cells / mL / tubeになるように分注した。

- [0161] 1.5 mLチューブに分注したPD-1過剰発現Jurkat細胞及びHEK293T細胞を微量冷却遠心機(トミー精工社製)にて5000 rpm、4℃にて1分間遠心し、遠心後上清を除去した。チューブに残った細胞のペレットを0.5 mLのPBSにて2度洗浄後、抗PD-1-2一本鎖抗体

及び、陽性コントロールとして L E A F p u r i f i e d a n t i - h u m a n P D - 1 抗体（クローン：E H 1 2, 2 H 7）（BioLegend社製）を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で $50 \mu\text{L}$ 添加し、氷上にて 30 分間静置した。F A C S バッファ（1% B S A、0.1% NaN_3 を含む P B S）を $500 \mu\text{L}$ チューブに加え、上記微量冷却遠心機にて 5000rpm 、 4°C にて 1 分間遠心し、遠心後上清を除去した。 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に滅菌超純水にて希釈したビオチン化プロテイン L（Pierce社製） $50 \mu\text{L}$ を 1.5mL チューブに加え、ピペティングにてよく混合し、氷上にて 30 分間静置した。30 分後、F A C S バッファ（1% B S A、0.1% NaN_3 を含む P B S） $500 \mu\text{L}$ をチューブに加え、微量冷却遠心機にて 5000rpm 、 4°C にて 1 分間遠心し、遠心後上清を除去した。F A C S バッファにて $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した b r i l l i a n t v i o l e t 4 2 1 s t r e p t a v i d i n（BioLegend社製） $50 \mu\text{L}$ を 1.5mL チューブに添加後、ピペティングにてよく混合し、氷上にて 15 分間静置した。15 分後、微量冷却遠心機にて 5000rpm 、 4°C にて 1 分間遠心後上清を除去し、 $500 \mu\text{L}$ の F A C S バッファを添加後、 5mL ポリスチレンラウンドボトムチューブ（ベクトン・ディッキンソン社製）に F A C S バッファにて懸濁した細胞を移した。 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に F A C S バッファにて希釈したヨウ化プロピジウム溶液を $5 \mu\text{L}$ 添加し、B D F A C S c a n t o I I フローサイトメーター（ベクトン・ディッキンソン社製）及びフローサイトメトリー解析ソフトウェア K a l u z a v e r 1. 2（ベックマン・コールター社製）にて解析を行った。結果を図 1 1 及び図 1 2 に示す。

[0162] （結果）

図 1 1 から明らかなとおり、P D - 1 を過剰発現する J u r k a t 細胞に抗 P D - 1 - 2 一本鎖抗体が結合していることが確認された。一方、P D - 1 を発現していない J u r k a t - M o c k 細胞においては、抗 P D - 1 - 2 一本鎖抗体の結合は認められなかった。また、図 1 2 から明らかなとおり、ヒト P D - 1 を過剰発現した H E K 2 9 3 T - P D - 1 細胞へ、抗 P D -

1-2一本鎖抗体及び抗ヒトPD-1抗体(クローン:EH12,2H7)の結合が確認された。一方、PD-1を発現していないHEK293T-Mock細胞への抗PD-1-2一本鎖抗体及び抗ヒトPD-1抗体(クローン:EH12,2H7)の結合は確認されなかった。

[0163] [実施例16]

(ELISA法を用いた抗CTLA-4一本鎖抗体のヒトCTLA-4に対するCD80及びCD86との競合的結合阻害活性の確認)

上記実施例7及び8で作製した組換えビフィドバクテリウム属細菌が分泌する抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体を用いて、ヒトCTLA-4(hCTLA-4)に対するヒトCD80(hCD80)又はヒトCD86(hCD86)との結合に対する競合的結合阻害活性確認を行った。陰性コントロールとして抗PD-1-2一本鎖抗体を用いた。

[0164] 96ウェルプレートに、1×PBSにて1μg/mLに調整したhCTLA-4(Recombinant Human CTLA-4-Fc Chimera, carrier-free, BioLegend社製)を100μLずつ分注し4℃で一晩静置することで固相化した。液を除去後、1×PBSを350μLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0165] 上記プレートに1%のBSA溶液を350μLずつ分注し室温で2時間静置することでブロッキングを行った。液を除去後、1×PBSを350μLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。hCD80(Recombinant Human B7-1/CD80 Fc Chimera, R&D Systems社製)及びhCD86(Recombinant Human B7-2/CD86 Fc Chimera, R&D Systems社製)をシグナル増強試薬(Signal Enhancer HIKARI, nacalaitesque社製)にて2000ng/mLに調整した。

[0166] ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗CTLA-4-1抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体をシグナル増強試薬にて20000ng/mL、2000ng/mL、200ng/mL、20ng/mL及び2ng/mL

Lに調整し、 $110\mu\text{L}$ ずつ調整したhCD80及びhCD86と等量混合後、 $100\mu\text{L}$ ずつ上記ブロッキング終了後プレートに分注した。陰性コントロールとして、ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗PD-1-2一本鎖抗体についても上記と同様に調整した。ブランクのウェルにはシグナル増強試薬のみを $100\mu\text{L}$ 分注した。プレートにシールをし、室温で2時間静置後、固相化したhCTLA-4に対して抗CTLA-4一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体と混合したhCD80及びhCD86を反応した。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。hCD80に対する二次抗体 (Human B7-1/CD80 Biotinylated Antibody、R&D Systems社製) 及びhCD86に対する二次抗体 (Biotinylated Anti-human B7-2 Antibody、R&D Systems社製) をシグナル増強試薬で $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整し、これを $100\mu\text{L}$ ずつ分注した。プレートにシールをし、室温で30分間静置した。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除いた。これを3回繰り返し洗浄した。

[0167] 前記アビジン-ビオチン標識酵素複合体としてA液及びB液を3滴ずつシグナル増強試薬 7.5mL に添加した。これを $100\mu\text{L}$ ずつ分注後、プレートにシールをし、室温で30分間静置した。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0168] 検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B (R&D Systems社製) を等量ずつ混ぜ、 $200\mu\text{L}$ ずつ分注後、遮光して室温で20分静置した。正確に20分経過後Stop solution (R&D Systems社製) を $50\mu\text{L}$ ずつ添加し呈色反応を停止した。測定は 450nm の吸光度を用い、 570nm の吸光度を対照として測定した。測定結果を表11及び表12に示し、阻害率を図13及び図14に示した。

[0169]

[表11]

ELISA法による抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体のヒトCTLA-4（固相）に対するhCD80との競合的結合（拮抗阻害率）

抗体濃度	吸光度：450 nm－570 nm（結合阻害率％）		
	抗CTLA-4-1一本鎖抗体 (scFv CTLA4-1)	抗CTLA-4-2一本鎖抗体 (scFv CTLA4-2)	抗PD-1-2一本鎖抗体 (scFv PD1-2)
0.001μg/mL	1.807 (10.3%)	1.862 (7.5%)	1.299 (35.5%)
0.01μg/mL	1.546 (23.2%)	2.118 (-5.2%)	1.559 (22.6%)
0.1μg/mL	1.682 (16.5%)	1.116 (44.6%)	1.343 (33.3%)
1μg/mL	0.772 (61.7%)	0.541 (73.1%)	1.466 (27.2%)
10μg/mL	0.119 (94.1%)	0.015 (99.3%)	1.633 (18.9%)
Non-scFv	2.014 (0%)		

[0170] [表12]

ELISA法による抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体のヒトCTLA-4（固相）に対するhCD86との競合的結合（拮抗阻害率）

抗体濃度	吸光度：450 nm－570 nm（結合阻害率％）		
	抗CTLA-4-1一本鎖抗体 (scFv CTLA4-1)	抗CTLA-4-2一本鎖抗体 (scFv CTLA4-2)	抗PD-1-2一本鎖抗体 (scFv PD1-2)
0.001μg/mL	1.200 (39.6%)	1.534 (22.8%)	1.301 (34.5%)
0.01μg/mL	1.610 (18.9%)	1.266 (36.3%)	1.174 (40.9%)
0.1μg/mL	1.293 (34.9%)	1.136 (42.8%)	1.206 (39.3%)
1μg/mL	0.324 (83.7%)	0.181 (90.9%)	1.395 (29.8%)
10μg/mL	0.079 (96.0%)	0.045 (97.7%)	1.716 (13.6%)
Non-scFv	1.986 (0%)		

[0171]（結果）

hCD80のhCTLA-4への結合に対する阻害率は、1μg/mLの

抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体でそれぞれ61.7%及び73.1%、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ではそれぞれ94.1%及び99.3%であった。またhCD86のhCTLA-4への結合に対する阻害率は、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体でそれぞれ83.7%及び90.9%、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ではそれぞれ96.0%及び97.7%であった。以上の結果より、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のhCD80及びhCD86のhCTLA-4への結合に対して、抗CTLA-4-1一本鎖抗体及び抗CTLA-4-2一本鎖抗体はいずれも $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で競合的に結合阻害することが示された。

[0172] [実施例17]

[マウスPD-1とマウスPD-L1との結合反応に対する抗マウスPD-1一本鎖抗体の競合的阻害活性]

実施例6で作製したビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-3株が分泌する抗マウスPD-1一本鎖抗体を用いて、マウスPD-1 (mPD-1) とマウスPD-L1 (mPD-L1) との結合に対する競合的阻害活性確認を、ELISA法を用いて行った。陰性コントロールとして抗ヒトCTLA-4-2一本鎖抗体を用いた。

96ウェルプレートに、 $1\times\text{PBS}$ にて $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した前記mPD-1を $100\mu\text{L}$ ずつ分注し 4°C で一晩静置することで固相化した。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。上記プレートに1%BSA溶液を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し室温で2時間静置することでブロッキングを行った。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0173] mPD-L1 (Recombinant Mouse B7-H1/PD-L1 Fc Chimera、R&D Systems社製) をシグナル増強試薬 (Signal Enhancer HIKARI、nacalaitesque社製) にて $2000\text{ng}/\text{mL}$ に調整した。ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-3株より精製した抗

マウスPD-1一本鎖抗体をシグナル増強試薬にて20000 ng/mL、2000 ng/mL、200 ng/mL及び20 ng/mLに調整し、mPD-L1と等量混合し、100 µLずつ上記ブロッキング終了後プレートに分注した。陰性コントロールとして、ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗ヒトCTLA-4-2一本鎖抗体についても上記と同様に調整した。ブランクのウェルにはシグナル増強試薬のみを100 µL分注した。プレートにシールを貼り、室温で2時間静置し、固相化したmPD-1に対して抗マウスPD-1一本鎖抗体と混合したmPD-L1を反応させた。液を除去後、1×PBSを350 µLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0174] mPD-L1に対する二次抗体(Biotin anti-mouse CD274, Biolegend社製)をシグナル増強試薬で10 ng/mLに調整し、これを100 µLずつ分注した。プレートにシールを貼り、室温で30分間静置した。液を除去後、1×PBSを350 µLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。前記アビジン-ビオチン標識酵素複合体(Vectastain ABC Kit, Vector社製)としてA液及びB液を1滴ずつシグナル増強試薬2.5 mLに添加した。これを100 µLずつ分注し、プレートにシールを貼り、室温で30分間静置した。液を除去後、1×PBSを350 µLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0175] 検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B(R&D Systems社製)を等量ずつ混ぜ、200 µLずつ分注後、遮光して室温で20分静置した。正確に20分経過後Stop solution(R&D Systems社製)を50 µLずつ添加し呈色反応を停止した。測定は450 nmの吸光度を用い、570 nmの吸光度を対照として測定した。測定結果を以下の表13及び図15に示した。

[0176]

[表13]

マウスPD-1とマウスPD-L1との結合反応に対する抗マウスPD-1一本鎖抗体の競合的阻害活性

	吸光度：450 nm－570 nm（阻害率%）	
抗体濃度	抗マウスPD-1 一本鎖抗体 (mPD-1 scFv)	抗ヒトCTLA-4-2 一本鎖抗体 (hCTLA-4 scFv02)
0.01μg/mL	2.104 (8.3%)	2.100 (8.5%)
0.1μg/mL	2.195 (4.4%)	2.059 (10.3%)
1μg/mL	2.152 (6.2%)	2.124 (7.5%)
10μg/mL	1.116 (51.4%)	2.443 (-6.4%)
Non-scFv	2.295 (0%)	

[0177]（結果）

表13及び図15から明らかなとおり、固相化したmPD-1に1μg/mLのmPD-L1を添加した場合その結合反応に対する一本鎖抗体の競合的阻害率は、10μg/mLの抗マウスPD-1一本鎖抗体で51.4%であった。対照とした抗ヒトCTLA-4-2一本鎖抗体では競合阻害は見られなかった（-6.4%）。以上の結果より、1μg/mLのmPD-L1に対して10μg/mL以上の抗マウスPD-1一本鎖抗体が競合阻害活性を示すことが確認された。

[0178] [実施例18]

[抗マウスPD-1一本鎖抗体とマウスT細胞（CD3/CD28刺激CD4陽性細胞）との結合の有無の確認]

抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌の培養上清より精製した抗マウスPD-1一本鎖抗体とmPD-1発現細胞との結合の有無を、CD3及びCD28刺激によりmPD-1を発現誘導したCD4陽性細胞（以下、「CD3/CD28刺激CD4陽性細胞」ともいう）を用いてフローサイトメトリー解析により検討した。

[0179]（CD3/CD28刺激CD4陽性細胞の調製）

B a l b / c マウスより脾臓を摘出し脾細胞を回収した後、B i o t i n a n t i - m o u s e C D 4 A n t i b o d y (B i o l e g e n d 社) で C D 4 陽性細胞をラベルした。余剰の抗体を洗浄により除いた後、S t r e p t a v i d i n P a r t i c l e s P l u s - D M (日本ベクトン・ディッキンソン社製) を加え、C D 4 陽性細胞に磁気ビーズを結合させた。これをマグネットにより分離し、磁石に引き寄せられた細胞を C D 4 陽性細胞として回収し、10%ウシ胎児血清、8 mM H E P E S、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含む R P M I - 1 6 4 0 培地に懸濁し、 2×10^6 c e l l s / m L

 の C D 4 陽性細胞を調製した。

[0180] 2 μ g / m L に調整した P u r i f i e d a n t i - m o u s e C D 3 ϵ 抗体 (B i o l e g e n d 社製、以下「抗 C D 3 抗体」ともいう) を、48 ウェルプレートに 110 μ L / ウェルずつ分注し、4 $^{\circ}$ C にて一晩静置し固相化した。上記 C D 4 陽性細胞を、固相化プレートに 500 μ L / ウェルずつ分注した。さらに 1 m g / m L に調整した F u n c t i o n a l G r a d e A n t i - M o u s e C D 2 8 (e B i o s c i e n c e 社製、以下「抗 C D 2 8 抗体」ともいう) を 1 μ L / ウェルずつ添加し、C D 3 / C D 2 8 刺激 C D 4 陽性細胞とした。同様に、抗 C D 3 抗体を固相化していないウェルにも C D 4 陽性細胞を分注し、未刺激 C D 4 陽性細胞とした。このプレートを 37 $^{\circ}$ C にて C O₂ 5% の条件で 2 日間培養した。

[0181] 上記 2 日間培養した細胞をピペティングにて剥がし 1.5 mL チューブに移し、4 $^{\circ}$ C にて、5000 r p m で 1 分間遠心分離後上清を除去した。P B S を 1 mL 添加後遠心分離し、上清を除去する操作を 2 回繰り返し洗浄した後、F A C S バッファー (1% B S A を含む P B S) 0.9 mL を加え同様に遠心分離、上清除去を行った。S o r t i n g バッファー (0.5% B S A を含む P B S) で 50 倍希釈した T r u S t a i n f c X (B i o l e g e n d 社製) を 20 μ L 加え攪拌後、氷上で 10 分間静置した。これに F A C S バッファーで 200 倍希釈した A l e x a F l u o r 6 4 7 a n t i - m o u s e C D 4 A n t i b o d y (B i o l e g e n d 社製) を 2

0 μ L 添加し攪拌後、氷上で20分間静置した。FACSバッファーを1 mL 加えて遠心分離し、上清を除去する操作を2回繰り返し洗浄した。次にFACSバッファーで200倍希釈したPE anti-mouse CD69 Antibody (Biolegend社製)を20 μ L 添加し、攪拌後氷上で20分間静置した。FACSバッファーを1 mL 加え遠心分離し、上清を除去する操作を2回繰り返し洗浄し、CD3/CD28刺激CD4陽性細胞を取得した。かかる細胞を二つに分け、一方は抗マウスPD-1一本鎖抗体の結合確認、もう一方はPD-1発現確認に使用した。

[0182] (抗マウスPD-1一本鎖抗体の細胞への結合確認)

抗マウスPD-1一本鎖抗体の細胞への結合確認は、マウス脾細胞から得られた未刺激CD4陽性細胞とCD3/CD28刺激CD4陽性細胞とを、使用した。この細胞を回収後、1 mLの1×PBSバッファーで遠心分離し上清を除去する操作を2回行い培地成分を洗浄した。さらにFACSバッファーを加え遠心分離し上清を除去した。ここにFACSバッファーで50倍希釈したTruStain fcX (Biolegend社製)を20 μ L 添加し、よく攪拌した後氷上で10分間静置した。次にFACSバッファーで200倍希釈したAlexa Fluor 647 anti-mouse CD4 Antibody (Biolegend社製)を20 μ L 添加し、良く攪拌した後氷上で20分間静置した。反応後、1 mLのFACSバッファーで遠心分離し上清を除去する操作を2回行い洗浄した。次に、FACSバッファーで200倍希釈したPE anti-mouse CD69 Antibody (Biolegend社製)を20 μ L 添加し、良く攪拌した後氷上で20分間静置した。反応後、1 mLのFACSバッファーで遠心分離し情勢を除去する操作を2回行い洗浄した。FACSバッファーで10 μ g/mLに調整した抗マウスPD-1一本鎖抗体20 μ Lを添加し、攪拌後氷上で20分間静置した。FACSバッファーを1 mL 加え遠心分離後、上清を除去する操作を2回繰り返して、洗浄を行った。次にFACSバッファーで1000倍希釈したAnti-His-Tag Alexa Fluor 488

Antibody (MBL社) を $20\mu\text{L}$ 添加し、攪拌後氷上で 20 分間静置した。FACSバッファを 1mL 加え遠心分離し、上清を除去する操作を、 2 回繰り返し洗浄を行った。 1mL のFACSバッファを添加後、 5mL ポリスチレンラウンドボトムチューブ (ベクトン・ディッキンソン社製) にFACSバッファにて懸濁した細胞を移した。

[0183] (細胞のPD-1発現確認)

使用した細胞にPD-1が発現しているか否かの確認は、マウス脾細胞から得られた未刺激CD4陽性細胞とCD3/CD28刺激CD4陽性細胞を、CD4とCD69を抗体で蛍光ラベル処理したものを使用した。この細胞にFACSバッファで 100 倍希釈したFITC anti-mouse CD279 (PD-1) 抗体 (Biolegend社製) $20\mu\text{L}$ を添加し攪拌後氷上で 20 分間静置した。これに、FACSバッファ 1mL を加え遠心分離し、上清を除去する操作を 2 回繰り返して洗浄を行った。 1mL のFACSバッファを添加後、 5mL ポリスチレンラウンドボトムチューブ (ベクトン・ディッキンソン社製) にFACSバッファにて懸濁した細胞を移した。

[0184] 上記蛍光ラベルした細胞懸濁液に、FACSバッファにて $5\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したヨウ化プロピジウム溶液 $5\mu\text{L}$ を添加し、BD FACS canto II フローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン社) 及びフローサイトメトリ解析ソフトウェアKaluza ver 1. 2 (ベックマン・コールター社製) にて解析を行った。細胞懸濁液をフローサイトメーターにて前方散乱 (FSC) 及び (側方散乱) SSCを調べ、細胞集団を細胞の大きさと細胞の形態によってゲーティングした。次にその集団をPIによるゲーティングを行い、死細胞を除いた細胞集団とした。さらに波長 647nm でCD4陽性細胞をゲーティングし、PEでその細胞がCD69を発現しCD3/CD28によって刺激された状態にあるかを確認した。mPD-1の発現確認及びmPD-1への抗マウスPD-1一本鎖抗体の結合はCD4陽性細胞の集団のうち、FITC陽性 (=mPD-1発現若しくは抗マウスP

D-1 一本鎖抗体が結合している)の細胞の増加として確認した。抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗マウス PD-1 一本鎖抗体の CD3 / CD28 刺激 CD4 陽性細胞への結合結果を図 16C と図 16D に、細胞の mPD-1 発現を図 16A と図 16B に示した。

[0185] (結果)

図 16A と図 16B から明らかとなおり、CD3 / CD28 刺激 CD 陽性細胞にて特異的に抗 mPD-1 抗体が結合しており、細胞表面での PD-1 発現が確認された。また、図 16C と図 16D に示したように、抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗マウス PD-1 一本鎖抗体は、mPD-1 発現細胞 (CD3 / CD28 刺激 CD4 陽性細胞) に特異的に結合することが確認された。

[0186] [実施例 19]

[抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌の担癌マウスの腫瘍内での生着及び抗マウス PD-1 一本鎖抗体の分泌]

マウス大腸癌細胞株 CT26 の担癌マウスを用いて、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSP7L20-scFv-PD-1-3 株を静脈内に投与し、腫瘍内への菌の生着確認及び抗マウス PD 一本鎖抗体の局在 (分泌) を免疫組織染色で確認した。

[0187] マウス大腸癌細胞株 CT-26 (ATCC) を、FBS (EQUITECH-BIO, INC. 社製) を 10% 含有する RPMI 1640 培地 (和光純薬工業社製) で培養し、6 週齢のメスの BALB/c マウス (日本エスエルシー社製) に移植して担癌マウスを作製した。腫瘍サイズが 30.18 ~ 138.16 mm³ の担癌マウスを下記表のように 3 群 (各群 3 匹) に分けた (Day 1)。第 1 群及び第 2 群は、腫瘍組織における組換えビフィドバクテリウム属細菌からの抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌確認用、第 3 群は、腫瘍組織での組換えビフィドバクテリウム属細菌の生着確認用とした。第 2 群及び第 3 群には、抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム

属細菌であるビフィドバクテリウム・ロングム 105-A/pHuSP7L 20-scFv-PD-1-3 株の簡易凍結製剤を尾静脈から 1.0×10^9 cfu の用量で投与した。なお、10%マルトース溶液を 1 mL ずつ 1 日 2 回の頻度で 5 日間投与した。ビフィドバクテリウム属細菌投与 7 日後に腫瘍を摘出した。第 3 群の腫瘍は、凍結保存した後、生菌数を測定した。第 1 群及び第 2 群の腫瘍は、O. C. T. コンパウンド（サクラファインテック社製）で凍結包埋した。これより凍結ミクロトーム Leica CM1900（Leica 社製）を用いて薄切スライド標本を作製し、組織染色に供した。

[0188]（生菌数測定）

凍結した腫瘍組織に嫌気性希釈液を添加し、ホモジナイズ処理をした。このホモジネートを嫌気性希釈液にて適宜希釈した後、BLFS 寒天培地（ $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 5-フルオロウラシル、 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ スペクチノマイシン含有 BL 寒天培地）に塗布し、嫌気条件下で 37°C にて 3 日間培養した。BLFS 寒天培地上に形成されたコロニー数を数え、腫瘍中の組換えビフィドバクテリウム属細菌の生菌数を算出した。結果を以下の表 14 に示す。

[0189] [表14]

群	投与	評価法	腫瘍体積(mm^3) (摘出時)	腫瘍重量 (g) (摘出時)	生菌数 (cfu/g)
1	無処理	免疫組織染色 (コントロール)	370.60 ± 379.82	0.31 ± 0.36	-
2	ビフィドバクテリウム属細菌	免疫組織染色	202.52 ± 201.33	0.18 ± 0.20	-
3	ビフィドバクテリウム属細菌	生菌数測定	265.56 ± 273.73	0.31 ± 0.37	$2.7\text{E}+06 \pm 7.0\text{E}+05$

[0190]（結果）

表 14 から明らかなとおり、腫瘍 1 g あたり 2.7×10^6 cfu の生菌が認められた。

[0191] (免疫組織染色)

薄切したスライドを風乾し、4% PFA (和光純薬工業社製) に10分間浸漬し固定した。固定後、純水にて1分間洗浄し、1×PBS (−) で5分間の洗浄を3回実施した。組織の周辺の水分を拭き取り、Dakopén (Dako社製) で組織の周囲を囲み、3% BSA-PBSを組織に滴下し60分間反応させ、非特異的結合の阻害を実施した。Anti-His-tag mAb-Alexa Fluor (登録商標) 488 (MBL社製) 抗体反応液を3% BSA-PBSで1000倍希釈した溶液を、組織に滴下した。これを4℃にて一晩反応させた。抗体反応後、1×PBS (−) にて5分間の洗浄を3回実施し、VECTASHIELD(R) Mounting Medium with DAPIで封入した。上記の染色した切片を顕微鏡DM5000B (Leica社製) で鏡検し画像を撮影した。結果を図17に示す。

[0192] (結果)

図17から明らかなとおり、抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌を投与したマウス (図17A) では、抗マウスPD-1一本鎖抗体 (緑色に染色) が腫瘍組織内にびまん性に陽性を示した。

[0193] [実施例20]

[抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌のCT26担癌モデルマウスに対する薬理 (抗腫瘍) 効果の検討]

CT26担癌モデルマウスを実施例19と同様の方法にて作製した。腫瘍サイズが40.51から88.03mm³の担癌マウスを下記表15のとおり5群 (各群7匹) に分けた (Day 0)。第1群は無処理対照群、第2群は抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌株 (ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-3株) 単剤 (i. v.) 投与群、第3群は抗mPD-1抗体 (BioXcell社製、Clone: RPM1-14) 単剤投与 (i. t.) 群、第4群は抗mCTLA-4抗体 (BioXcell社製、Clone: 9D9) 単剤 (i. t.) 投与群

、第5群は、抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌（i.v.）と抗mCTLA-4抗体（i.t.）の2剤併用投与群とした。薬剤の投与日、投与量及び投与経路は以下の表15のとおりである。また、第2群及び第5群については、10%マルトース溶液を1mLずつ1日2回の頻度でDay 1からDay 5及びDay 8からDay 12に腹腔内投与した。各群共に定期的に腫瘍径を測定（Day 0, 3, 7, 10, 14, 17, 22）し、Day 22に腫瘍を摘出して腫瘍重量を測定した。腫瘍体積の推移を表16に、CT26担癌マウスにおける腫瘍体積の統計学的検定を表17に、単剤投与群と無処理群のCT26腫瘍体積推移を図18に示した。

[0194] [表15]

群	投与薬	投与量	投与経路	投与日	匹数
1	なし	—	—	—	7
2*	抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌 ビフィドバクテリウ ム属細菌	5 x 10 ⁸ cfu 1日2回	i.v.	Day 1, 4, 8, 11	7
	抗 mPD-1 抗体	100 µg 1日1回	i.t.	Day 1, 4, 8, 11	7
4	抗 mCTLA-4 抗体	100 µg 1日1回	i.t.	Day 1, 4, 8, 11	7
5*	抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌 ビフィドバクテリウ ム属細菌	5 x 10 ⁸ cfu 1日2回	i.v.	Day 1, 4, 8, 11	7
	抗 mCTLA-4 抗体	100 µg 1日1回	i.t.	Day 1, 4, 8, 11	

i.v.: 静脈内投与、i.t.: 腫瘍局所投与

[0195]

[表16]

単剤及び2剤併用投与したC T 2 6 担癌マウスの平均腫瘍体積									
Day	無処理	Tumor volume (mm ³)							
		抗マウスPD-1 一本鎖抗体分泌ブイドバクテリウム属細菌		抗 mPD-1 抗体		抗 mCTLA-4 抗体		抗マウスPD-1 一本鎖抗体分泌ブイドバクテリウム属細菌 + 抗 mCTLA-4 抗体	
0	60.30 ± 13.46	60.59 ± 13.86	61.31 ± 13.74	61.08 ± 13.84	61.21 ± 14.94				
3	148.48 ± 36.43	69.96 ± 25.13	78.88 ± 21.81	108.99 ± 30.86	72.87 ± 34.89				
7	466.83 ± 167.61	153.42 ± 77.79	115.71 ± 49.80	175.70 ± 79.77	116.26 ± 67.78				
10	902.05 ± 352.64	209.58 ± 119.71	138.55 ± 86.62	200.04 ± 118.46	88.04 ± 61.75				
14	1571.61 ± 636.62	364.42 ± 246.94	195.31 ± 202.52	241.99 ± 192.36	78.58 ± 54.86*				
17	2506.78 ± 993.48	615.38 ± 380.16	282.07 ± 328.92	322.65 ± 296.33	98.33 ± 85.98*				
22	3718.65 ± 1064.17	1259.90 ± 737.04	556.60 ± 599.70	475.74 ± 516.73	175.93 ± 215.91*				

The mean values ± S.D. of seven mice.

*: The mean values ± S.D. of six mice.

[表17]

C T 2 6 担癌マウスにおける腫瘍体積の統計学的検定

T-test P (T<=f)						
Day	第 1 群 vs 第 2 群	第 1 群 vs 第 3 群	第 1 群 vs 第 4 群	第 1 群 vs 第 5 群	第 2 群 vs 第 5 群	第 4 群 vs 第 5 群
3	0.000 **	0.000 **	0.049 *	0.002 **	0.861	0.063
7	0.002 **	0.001 **	0.002 **	0.001 **	0.359	0.159
10	0.002 **	0.001 **	0.002 **	0.001 **	0.034 *	0.047 *
14	0.002 **	0.001 **	0.001 **	0.001 **	0.021 *	0.069
17	0.002 **	0.001 **	0.001 **	0.001 **	0.010 *	0.098
22	0.000 **	0.000 **	0.000 **	0.000 **	0.007 **	0.199
*: P value < 0.05						
**: P value < 0.01						
第 1 群: 無処理						
第 2 群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフドバクテリウム属細菌投与群 [#]						
第 3 群: 抗 mPD-1 抗体投与群						
第 4 群: 抗 mCTLA-4 抗体投与群						
第 5 群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフドバクテリウム属細菌 [#] ・抗 mCTLA-4 抗体 2 剤併用投与群						
[#] : ビフドバクテリウム・ロンガム 105A/pHuSP7L20-mPD-1scFv						

[表18]

単剤及び2剤併用投与したC T 2 6 担癌マウスの平均腫瘍体積のT / C

Day	T/C (無処理対照群に対する処理群の比)			
	抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌 ビフィドバクテリ ウム属細菌	抗 mPD-1 抗体	抗 mCTLA-4 抗体	抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバ クテリウム属細菌 + 抗 mCTLA-4 抗体
0	1.00	1.02	1.01	1.02
3	0.47	0.53	0.73	0.49
7	0.33	0.25	0.38	0.25
10	0.23	0.15	0.22	0.10
14	0.23	0.12	0.15	0.05
17	0.25	0.11	0.13	0.04
22	0.34	0.15	0.13	0.05

[0198] (結果)

表 1 7、図 1 8 から明らかなとおり、抗マウス P D - 1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群（第 2 群）では、無処理群（第 1 群）と比較して全ての時点で低い腫瘍体積推移を示しており、全ての時点で有意差のある増殖抑制効果が認められた（表 1 7）。また、その腫瘍増殖抑制は無処理対照に対する処理群の比（T / C）で見ると D a y 1 0 以降で 0. 3 4 以下であった。

抗 m P D - 1 抗体単剤投与群（第 3 群）では、無処理群（第 1 群）と比較して腫瘍体積において全ての時点で有意差のある抑制作用が認められ、T / C は D a y 1 0 以降で 0. 1 5 以下であった。なお腫瘍内に投与した抗 m C T L A - 4 抗体単剤投与群（第 4 群）は、無処理群と比較して腫瘍体積において全ての時点で有意差のある抑制作用が認められ、T / C は D a y 1 0 以降で 0. 2 2 以下であった。

[0199] 一方、抗マウス P D - 1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌と抗 m C T L A - 4 抗体の 2 剤併用群（第 5 群）では、無処理群と比較して腫瘍体積において全ての時点で有意差が認められ、T / C は D a y 1 0 以降で 0. 1 0 以下と最も強い抗腫瘍作用であった。2 剤併用群と単剤の群を比較す

ると、Day 10では各単剤投与群に対して、またDay 14以降では抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群に対して有意差のある強い抑制作用が認められた（表16、表17、表18、図19、図20参照）。なお抗mCTLA-4抗体投与群と2剤併用群において各1例のマウスに腫瘍の完全退縮が認められた。

[0200] 腫瘍重量においても腫瘍体積と同様の結果であり、無処理群に対して全ての群で有意差が認められ、T/Cは抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群、抗mPD-1抗体投与群、抗mCTLA-4抗体投与群及び2剤併用群でそれぞれ0.31、0.12、0.10及び0.04であり、2剤併用群が腫瘍重量で最も低い値であった（表19、表20参照）。

[0201] [表19]

CT26担癌マウスに対する単剤及び2剤併用投与の抗腫瘍効果
(平均腫瘍重量及びT/C比)

投与薬	Day 22	
	腫瘍重量 (g)	T/C ratio
無処理 (C)	5.20 ± 2.16	-
抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌 ビフィドバクテリウム属細菌 [#]	1.62 ± 0.92	0.31
抗 mPD-1 抗体	0.60 ± 0.70	0.12
抗 mCTLA-4 抗体	0.54 ± 0.61	0.10
2剤併用 (抗マウス PD-1 s 一本鎖抗体分泌 ビフィドバクテリウム属細菌 [#] + 抗 mCTLA-4 抗体)	0.21 ± 0.26*	0.04

The mean values ± S.D. of seven animals.

*: The mean values ± S.D. of six animals.

T/C ratios = 薬剤投与群の平均腫瘍重量 / 無処理群の平均腫瘍重量

-: Not determined

[#]: ビフィドバクテリウム・ロンガム 105A/pHuSP7L20-mPD-1scFv

[0202]

[表20]

C T 2 6 担癌マウスにおける腫瘍重量の統計学的検定

VS	Day 22		**: P value < 0.01
	T-test	P (T<=f)	
第 1 群 vs 第 2 群	0.004	**	第 1 群: 無処理 第 2 群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌 ビフィドバクテリウム属細菌投与群 [#]
第 1 群 vs 第 3 群	0.001	**	第 3 群: 抗 mPD-1 抗体投与群 第 4 群: 抗 mCTLA-4 抗体投与群
第 1 群 vs 第 4 群	0.001	**	第 5 群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌 ビフィドバクテリウム属細菌 [#] ・抗 mCTLA-4 抗体 2 剤併用投与群
第 1 群 vs 第 5 群	0.001	**	# : ビフィドバクテリウム・ロンガム 105A/pHuSP7L20-mPD-1scFv
第 2 群 vs 第 5 群	0.006	**	
第 4 群 vs 第 5 群	0.231		

[0203] (結果)

以上の結果より、抗マウス P D - 1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌は静脈内投与で C T - 2 6 担癌マウスの腫瘍内に生着し（実施例 1 9）、抗マウス P D - 1 一本鎖抗体を分泌して腫瘍増殖抑制効果を発揮し、その効果は試薬抗体である抗 m P D - 1 抗体を腫瘍内に直接投与した場合とほぼ同程度であった。ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された抗マウス P D - 1 一本鎖抗体は、i n v i t r o の試験にて m P D - 1 と m P D - L 1 との結合を競合的に阻害する活性を有しており（実施例 1 7）、腫瘍内でも同様な機序で T 細胞上の P D - 1 と腫瘍細胞上の P D - L 1 間の負のシグナル伝達を遮断することにより T c e l l が活性化した結果、抗腫瘍効果が発揮されたものと推定された。また抗マウス P D - 1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌と抗 m C T L A - 4 抗体との併用効果が確認されたことから、C T L A - 4 を阻害する一本鎖抗体と P D - 1 を阻害する一本鎖抗体とを同時に分泌する共発現ビフィドバクテリウム属細菌の有用性が示唆された。

[0204] [実施例 2 1]

[各種リンカー長の抗ヒトPD-1 s c F v 0 3一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌の作製]

(概要)

分泌シグナルがSP7、分泌シグナルに続くリンカー長が20アミノ酸残基である抗ヒトPD-1 s c F v 0 3分泌プラスミドpHuSP7L20-hPD-1 s c F v 0 3を構築した。このプラスミドの分泌シグナル及び分泌シグナルに続くリンカーを、SP69及びSP69に対応するリンカー（20アミノ酸残基）に置換した抗ヒトPD-1 s c F v 0 3分泌プラスミドpHuSP69L20-hPD-1 s c F v 0 3を構築した。さらにリンカーの長さを20から、L0～10、15（L0、L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10及びL15）に変更したプラスミドも構築した。

[0205] [プラスミドpHuSP7L20-hPD-1 s c F v 0 3の作製]

(概要)

抗hPD-1 s c F v 0 3を分泌する発現カセット（抗ヒトPD-1 s c F v 0 3分泌発現カセット）を含み、大腸菌-ビフィドバクテリウム属細菌シャトルベクターであるプラスミドpHuSP7L20-hPD-1 s c F v 0 3を作製した。使用したプライマーを以下の表21に示す。

[0206] [表21]

プライマー名	DNA 配列(5'→3')	配列番号
Ins-hPD-1scFv03-F1	CAGGTCCAGCTGGTCGAATCGGGCGGCGGC	配列番号 82
Ins-hPD-1scFv03-R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGGTGATGATG GTGCTT	配列番号 83
TGA-Hu-Terminator-F	TGACCTTCTG CTCGTAGCGA TTAC	配列番号 84
vec-SP7L20-R1	GACCAGCTGGACCTGCACCGAACTCGCCTTCGGGAA	配列番号 85

[0207] (抗ヒトPD-1 s c F v 0 3分泌発現カセットの構成)

抗ヒトPD-1 s c F v 0 3分泌発現カセットとして、(1)HuプロモーターDNA、(2)シグナルペプチド-リンカー連結体SP7L20をコードするDNA、(3)抗hPD-1 s c F v 0 3のアミノ酸配列（重鎖配

列、リンカー (GGGGS)₃、軽鎖配列を含む) をコードする DNA、及び (4) His タグ配列をコードする DNA、(5) Hu ターミネーター DNA を、(1) を上流 (5' 末端) 側として (5) を下流 (3' 末端) 側として、(1) ~ (5) の DNA を順次含むカセット (上記抗 hPD-1 scFv03 のアミノ酸配列における重鎖配列、リンカー (GGGGS)₃、軽鎖配列を含む) をコードする DNA の塩基配列は、以下の表 22 に示される文献を参照した。

[0208] (抗 hPD-1 scFv03 の人工 DNA 合成)

配列番号 86 に示された抗 hPD-1 scFv03 については、ジェンスクリプトジャパン社にて、大腸菌用プラスミド pUC57 にサブクローニングされ、プラスミド pUC57-hPD-1 scFv03 として人工遺伝子合成された。

[0209] [表22]

抗 hPD-1 scFv03 に関する文献

抗体		参考文献
抗 hPD-1 scFv03	配列番号 86 (729 塩基配列) 重鎖配列 (1~342 塩基) (GGGGS) ₃ リンカー (343~387 塩基) 軽鎖配列 (388~708 塩基) ヒスチジンタグ (709~726 塩基)	日本国特許 5028700 号

[0210] (抗 hPD-1 scFv03 インサート断片の調製 1)

上記プラスミド pUC57-hPD-1 scFv03 (500 pg) を鋳型として、上記表 21 に記載の Ins-hPD-1 scFv03-F1 プライマー (フォワード) 及び Ins-hPD-1 scFv03-R1 プライマー (リバーズ) のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端 15 bp が重複するように設計した。各プライマー濃度を 0.2 µM、反応容量 30 µL として、前記 PrimeSTAR HS (Premix) キット (タカラバイオ社製) を用いて PCR 増幅を行った。増幅のプログラムとしては、98℃にて 10 秒、

55℃にて5秒、72℃にて60秒を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたインサートPCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extractionキット（キアゲン社製）を用いて精製し、約0.7 kbpの抗hPD-1 scFv03インサート断片（1）を調製した。

[0211]（SP7L20のアミノ酸配列をコードするDNAを含むベクター断片（1）の調製）

配列番号87に記載されているベクター直鎖化断片（500 pg）を鋳型として、上記表21に記載されている、TGA-Hu-Terminator-Fプライマー（フォワード）及びvec-SP7L20-R1プライマー（リバーズ）のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。各プライマー濃度を0.2 μM、反応容量30 μLとして、PrimeSTAR HS（Premix）キットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムは、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて5分を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAquick Gel Extractionキットを用いて精製し、約4.0 kbpの5'-Huターミネーター-pTB6 rep unit-SPCMr-pUCori-Huプロモーター-SP7L20-3'ベクター断片（1）を調製した。

[0212]（インフュージョン反応）

上記で調製されたベクター断片（1）と上記抗hPD-1 scFv03インサート断片（1）とをIn-Fusion（登録商標）HD Cloningキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。すなわち、マイクロチューブに、キット内の上記ベクターとインサートとを1:5のモル比にて添加後、2 μLの5×In-Fusion（登録商標）HD Enzyme premix（タカラバイオ社製）を添加し、反応液容量を10 μLに調整した。これを50℃にて15分間保温した。その他の手順は、キットの製品説明書にしたがい、インフュージョン反応液1を調製した。

[0213] (大腸菌の形質転換及びpHuSP7L20-hPD-1scFv03のDNA配列確認)

上記インフュージョン反応液5 μ Lを用いて、大腸菌HST16CRコンピテント細胞の形質転換を製品説明書に従い行った。形質転換後の菌懸濁液は、75 μ g/mLスペクチノマイシン含有LB寒天培地に塗布し、37℃にて一晩静置培養した。寒天培地上に形成したコロニーを、75 μ g/mLスペクチノマイシン含有LB液体培地中で30℃にて一晩振とう培養し、これよりQIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製)を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドにおける抗ヒトPD-1scFv03分泌発現カセット(5'-Huプロモーター-SP7L20-抗hPD-1scFv03-Hisタグ-Huターミネーター-3')の配列決定するため、BigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いてシーケンス反応を行った。配列確認したプラスミドをpHuSP7L20-hPD-1scFv03と名付けた。pHuSP7L20-hPD-1scFv03の配列を配列番号88に示す。

[0214] [プラスミドpHuSP69L20-hPD-1scFv03の作製]

上記抗ヒトPD-1scFv03分泌プラスミドpHuSP7L20-hPD-1scFv03のシグナルペプチド配列及びシグナルペプチド配列に続くリンカーペプチド配列をSP7L20からSP69L20に置換したプラスミドpHuSP69L20-hPD-1scFv03を以下のように構築した。

[0215] (ベクター断片及びインサート断片の調製)

ベクター断片の調製は、プラスミドpHuSP7L20-hPD-1scFv03を鋳型として、下記表23(V1)及び表24に記載されているhPD-1scFv03__Vec__F1プライマー及びHu-mCCL21__Vec__R1プライマーからなるプライマーセットを用いて、プライマー濃度0.2 μ M、反応容量50 μ Lとして、PrimeSTAR HS (Pre

m i x) キットを用いてP C R増幅を行った。増幅プログラムは、9 8℃にて1 0秒、6 5℃にて5秒、7 2℃にて4分4 5秒を1サイクルとして、3 0サイクル行った後、7 2℃にて3 0秒とした。増幅したP C R産物をベクター断片V 1とした。

[0216] ビフィドバクテリウム・ロンガム1 0 5－AゲノムDNA 8 0 0 p gを鋳型として、下記表2 3 (I n s－1) 及び表2 4に記載されているS P 6 9－i n s__F 1プライマー及びS P 6 9－i n s__R 1__h P D 1__0 3プライマーよりなるプライマーセットを用いてP C R増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端1 5 b pが重複するように設計した。上記ベクターと同様にP C R増幅を行った。ただし7 2℃での伸長反応時間は2 0秒とした。増幅したP C R産物をインサート断片I n s－1とした。

[0217]

[表23]

P C R 増幅時の鋳型及びプライマー

PCR product	Template	Forward Primer	Reverse primer	PCR product (bp)
V1	pHuSP7L20-hPD-1 scFv03	hPD-1 scFv03_Vec-F1	Hu-mCCL21_Vec_R1	4568 bp
Ins-1	ビフィドバクテリウム・ ロンガム 105-A	SP69-ins_F1	SP69-ins_R1_hPD1_03	180 bp
Ins-L0	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L0-ins_R1_hPD1_03	120 bp
Ins-L1	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L1-ins_R1_hPD1_03	123 bp
Ins-L2	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L2-ins_R1_hPD1_03	126 bp
Ins-L3	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L3-ins_R1_hPD1_03	129 bp
Ins-L4	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L4-ins_R1_hPD1_03	132 bp
Ins-L5	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L5-ins_R1_hPD1_03	135 bp
Ins-L6	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L6-ins_R1_hPD1_03	138 bp
Ins-L7	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L7-ins_R1_hPD1_03	141 bp
Ins-L8	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L8-ins_R1_hPD1_03	144 bp
Ins-L9	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L9-ins_R1_hPD1_03	147 bp
Ins-L10	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L10-ins_R1_hPD1_03	150 bp
Ins-L15	pHuSP69L20-hPD-1 scFv03	SP69-ins_F1	SP69L15-ins_R1_hPD1_03	165 bp

[0218]

[表24]

PCR増幅時のプライマー配列

プライマー名	配列 (5' → 3')	配列番号
Hu-mCCL2l_Vec_R1	AAAGCATCCTTCTTGGGTCAGG	配列番号 89
hPD-1 scFv03_Vec_F1	CAGGTCCAGCTGGTTCGAATC	配列番号 90
SP69-ins_F1	CAAGAAAGGATGCTTTATGAATTATTACGACAAAAAATTCGG	配列番号 91
SP69-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGACCGCTATCAGTCGTGGTGTAAC	配列番号 92
SP69L5-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGGCGTTGAATCATCCGC	配列番号 93
SP69L10-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGATGGCGTTGAAGATGG	配列番号 94
SP69L15-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGGGTGTAAGTCCATCCGATG	配列番号 95
SP69L20-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGCAAAGACCGGCATTG	配列番号 96
SP69L1-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGATCCGCAAAGACCGCAT	配列番号 97
SP69L2-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGATCATCCGCAAAGACCGG	配列番号 98
SP69L3-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGAATCATCCGCAAAGACCG	配列番号 99
SP69L4-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGTTGAATCATCCGCAAAGAC	配列番号 100
SP69L6-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGAGATGGCGTTGAATCATCCG	配列番号 101
SP69L7-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGAAGATGGCGTTGAATCATCC	配列番号 102
SP69L8-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGTTGAAGATGGCGTTGAATC	配列番号 103
SP69L9-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGGCGTTGAAGATGGCG	配列番号 104

[0219] (インフュージョン反応)

上記で調整したベクター断片V1及びインサート断片Ins-1をIn-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結した。即ち、マイクロチューブに、上記ベクター断片とインサート断片を1:2のモル比にて添加後、5×In-Fusion (登録商標) HD Enzyme premix 2 μ L、Cloning Enhancer 1 μ Lを添加し、反応容量を10 μ Lに調整した。これを37℃にて15分、その後50℃にて15分間保温した。その他の手順は、キットの製品説明書に従いインフュージョン反応液を調製した。

[0220] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記インフュージョン反応液1 μ Lを用いて、大腸菌HST16CRコンピテント細胞(タカラバイオ社製)の形質転換を製品説明書に従い行った。形質転換後の菌懸濁液は、75 μ g/mL スペクチノマイシン含有LB寒天培地に塗布し、37℃にて一晩静置培養した。寒天培地上に形成したコロニ

一を、 $75\mu\text{g/mL}$ スペクチノマイシン含有LB液体培地中で 37°C にて一晩振とう培養し、これよりQIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドにおける抗ヒトPD-1 scFv03発現カセット（HuプロモーターからHuターミネーターまでを含む）配列を決定するため、BigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてシーケンス反応を行った。配列確認したプラスミドをpHuSP69L20-hPD-1 scFv03と名付けた。

[0221] [pHuSP69Ly-hPD-1 scFv03 ($y=0\sim10, 15$) の作製]

上記pHuSP69L20-hPD-1 scFv03のリンカーを3' 末端より短くして $0\sim10$ 及び 15 アミノ酸をコードするDNAとしたプラスミド、pHuSP69Ly-hPD-1 scFv03 ($y=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15$) を以下のように作製した。

[0222] (ベクター断片及びインサート断片の調製)

ベクター断片は、上記ベクター断片V1を使用した。インサート断片の調製は、プラスミドpHuSP69L20-hPD-1 scFv03を鋳型として、表23 (Ins-L0 $\sim$ 10、Ins-L15) に記載されているプライマーセットを用いて、上記インサート断片Ins-1の調製と同様の方法にて調製した。増幅したPCR産物をインサート断片Ins-L0、Ins-L1、Ins-L2、Ins-L3、Ins-L4、Ins-L5、Ins-L6、Ins-L7、Ins-L8、Ins-L9、Ins-L10及びIns-L15とした。

[0223] (インフュージョン反応)

上記で調製したベクター断片V1及び各インサート断片Ins-Ly ($y=0\sim10, 15$) を、上記pHuSP69L20-hPD-1 scFv03作製時と同様の方法にてインフュージョン反応にてつなげた。

[0224] (大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認)

上記インフュージョン反応液を用いて pHuSP69Ly-hPD-1scFv03 作製時と同様の方法にて大腸菌の形質転換及びプラスミドDNAの配列確認を行った。

[0225] [ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換]

上記にて作製した13種類のプラスミド pHuSP69Ly-hPD-1scFv03 (L0、L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L15、及びL20) を用いて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステム(ジーンパルサー11、バイオ・ラッドラボラトリーズ社製)により行った。電気ショック(2kV、25 μ F、200 Ω)後はキュベット(2mmギャップ)に800 μ LのIMR液体培地と50 μ LのビタミンC添加液との混合液を即時に添加し、これを滅菌済みの2mLマイクロチューブに回収した。各チューブについて同様の操作を行い、これら2mLチューブの蓋をゆるめて、脱酸素・炭酸ガス発生剤(アネロパック(登録商標)・ケンキ、三菱ガス化学社製)とともに密閉容器に入れ、37℃に設定したインキュベータにて3時間保温した。保温後の各菌懸濁液を75 μ g/mLスペクチノマイシン含有IMR寒天培地に塗布した。これらのプレートを上記脱酸素・炭酸ガス発生剤とともに密閉容器に入れ、37℃に設定したインキュベータにて2日間培養した。

[0226] 上記スペクチノマイシン含有IMR寒天培地上に形成したコロニーを釣菌し、75 μ g/mLスペクチノマイシン含有BL-bS寒天培地(馬脱繊維血を含まないBL寒天培地)に画線後、脱酸素・炭酸ガス発生剤とともに密閉容器に入れ、37℃に設定したインキュベータにて1日間培養し、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69Ly-hPD-1scFv03株(y=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15及び20)を取得した。

[0227] [実施例22]

[各種リンカー長の抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 分泌ビフィドバクテリウム属細菌の s c F v 発現解析]

実施例 2 1 にて作製したビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 - A / p H u S P 6 9 L y - h P D - 1 s c F v 0 3 株 (y = 0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 5 及び 2 0) より分泌される抗 h P D - 1 s c F v 0 3 は、C 末端にヒスチジンタグを融合しているため、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。

[0228] (ビフィドバクテリウム属細菌の培養)

上記各組換えビフィドバクテリウム属細菌株の $75 \mu\text{g}/\text{mL}$ スペクチノマイシン含有 B L - b S 寒天培地上の画線培養物を、スペクチノマイシン (終濃度 $75 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及びビタミン C 添加液 (100 mL あたりアスコルビン酸 35 g 、L - システイン塩酸塩一水和物 2 g 及び炭酸ナトリウム 11 g を含む溶液) $100 \mu\text{L}$ を添加した MRS (ベクトン・ディッキンソン社製) 液体培地 10 mL に植菌し、 37°C にて 24 時間嫌気培養し、活性化培養液とした。次に、DMEM (C a t N o . 1 2 3 2 0 - 0 3 2 : ライフテクノロジー社製) : MRS を $9 : 1$ の割合で混合した培地 20 mL に、ビタミン C 添加液 $100 \mu\text{L}$ 、スペクチノマイシンを $75 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう添加し、上記活性化培養液 $100 \mu\text{L}$ を植菌した。これを 37°C にて 18 時間嫌気培養した。

かかる嫌気培養後の培養液を遠心分離後、培養上清を回収した。この培養上清中のタンパク質をトリクロロ酢酸 (T C A、和光純薬工業社製) により沈殿させ、アセトンにて洗浄後、SDS-PAGE 用バッファーに溶解し、 95°C にて 3 分間熱処理を行い、培養上清濃縮物とした。

[0229] 上記培養上清濃縮物 (培養液 1 mL 相当) をミニプロティアン (登録商標) T G X TM ゲル ($4 \sim 20\%$) (バイオラッド社製) にて電気泳動し、ゲルを P V D F 膜 (i B l o t T r a n s f e r S t a c k s、ライフテクノロジー社製) に T r a n s - B l o t T u r b o (バイオラッド社製) を

用いて転写した。ブロッティング終了後の膜をブロッキング（2% ECL Prime Blocking agent（GEヘルスケアジャパン社製）in TTBS）した後、一次抗体にマウスヒスチジンタグ抗体（THE HIS Tag Antibody、mAb、Mouse、ジェンスクリプトジャパン社製）、二次抗体にECL-ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（GEヘルスケアジャパン社製）を使用して反応を行ない、Western Lightning Ultra（パーキンエルマー社製）を用いて発光させた。これをイメージングアナライザー（myECL Imager, Thermo Scientific社製又はFluor S Max、バイオラッド社製）にて解析した。結果を図21に示す。

[0230] （結果）

図21から明らかなとおり、リンカーがL0であるビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L0-hPD-1scFv03株を除いて全ての菌株にて抗hPD-1scFv03が検出された。また、抗hPD-1scFv03分泌量は、リンカー長が短くなると少なくなる傾向があった。

[0231] [実施例23]

[リンカー長の異なる抗hPD-1scFv03のヒトPD-L1へのELISAによる結合確認]

（抗hPD-1scFv03の精製）

リンカー長の異なる2種類のビフィドバクテリウム属細菌、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L20-hPD-1scFv03株及びビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L5-hPD-1scFv03を上記実施例22と同様の方法で培養した。ただし培養は200mLにスケールアップした。

[0232] 上記嫌気培養後の培養液を遠心分離して得た培養上清を攪拌しながら、硫酸アンモニウムを80%飽和になるよう少しずつ添加し、4℃にて一晩攪拌し塩析を行った。これを遠心分離後、沈殿を回収し、ヒスチジンタグ付きタ

ンパク質の精製キット (TALON resin、タカラバイオ社製) にてヒスチジンタグ融合タンパクを精製した。この精製溶液を限外ろ過 (アミコン ウルトラ-0.5、NMWL: 10,000、メルクミリポア社製) にて濃縮した。精製タンパク質の濃度は、Bradford法にて測定した (Coomassie Plus Protein Assay、Thermo Scientific社製)。濃度スタンダードはアルブミンとした。上記精製一本鎖抗体の一部を用いてSDS-PAGE後、クーマシーブリリアントブルー染色 (ライフテクノロジーズ、SimplyBlue™ Safe Stain) を行い、約9割の純度で抗hPD-1 scFv03の各一本鎖抗体が精製されていることを確認した。

[0233] (抗hPD-1 scFv03のヒトPD-1への結合確認)

上記で精製したビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L20-hPD-1 scFv03株及びビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L5-hPD-1 scFv03由来の抗hPD-1 scFv03について、ヒトPD-1 (hPD-1) との結合確認をELISA法により行った。

[0234] 96ウェルプレートに、1×PBSにて1 µg/mLに調整したhPD-1 (Recombinant Human PD-1 Fc Chimera、R&D Systems社製) を100 µLずつ分注し4℃にて一晩静置することで固相化した。液を除去後、1×PBSを350 µLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。上記プレートに1%のBSA溶液を350 µLずつ分注し室温で2時間静置することでブロッキングを行った。液を除去後、1×PBSを350 µLずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0235] 抗hPD-1 scFv03をシグナル増強試薬 (Signal Enhancer HIKARI、nacalaitesque社製) にて5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mLおよび40 ng/mLに調整し、100 µLずつ上記ブロッキング終了後プレートに分注した。ブランクのウェルにはシグナル増強試薬のみを100 µL分注した。プレートにシールをし、室温で2時間静置後、固相化したh

PD-1と各一本鎖抗体を反応した。液を除去後、 $1 \times \text{PBS}$ を $350 \mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0236] 二次抗体 (Anti-His-tag-Biotin、MBL社製) をシグナル増強試薬で2000倍に薄め、これを $100 \mu\text{L}$ 分注した。プレートにシールを貼り、室温で30分間静置した。液を除去後、 $1 \times \text{PBS}$ を $350 \mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除いた。これを3回繰り返し洗浄した。アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Vectastain ABC Kit, Vector社製) としてA液及びB液を3滴ずつシグナル増強試薬7.5 mLに添加した。これを $100 \mu\text{L}$ ずつ分注後、プレートシールにシールを貼り、室温で30分間静置した。液を除去後、 $1 \times \text{PBS}$ を $350 \mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B (R&D Systems社製) を等量ずつ混ぜ、 $200 \mu\text{L}$ ずつ分注し、遮光して室温で20分静置した。正確に20分経過後Stop solution (R&D Systems社製) を $50 \mu\text{L}$ ずつ添加し呈色反応を停止した。測定は 450 nm の吸光度を、 570 nm を対照として測定した。

[0237] (結果)

抗hPD-1 scFv 03の結合ELISAの結果を図22に示す。抗hPD-1 scFv 03は、L5、L20のリンカー長に関わらずヒトPD-1に結合し、結合量はscFv濃度に依存的であった。

[0238] [実施例24]

[リンカー長の異なる抗hPD-1 scFv 03のヒトPD-1とPD-L1との結合反応に対する競合的結合阻害活性の確認]

上記実施例23にて精製したリンカー長の異なる抗hPD-1 scFv 03を用いて、ヒトPD-1に対するヒトPD-L1の結合に対する競合的結合阻害活性の確認をELISA法により行った。陰性コントロールとして抗ヒトCTLA-4-2一本鎖抗体を用いた。

[0239] 96ウェルプレートに、 $1 \times \text{PBS}$ にて $1 \mu\text{g/mL}$ に調整したhPD-

1 (Recombinant Human PD-1 Fc Chimera、R&D Systems社製) を $100\mu\text{L}$ ずつ分注し 4°C で一晩静置することで固相化した。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。上記プレートに 1% BSA 溶液を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し室温で2時間静置することでブロッキングを行った。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。hPD-L1 (R&D Systems社製、Recombinant Human B7-H1、hPDL1) をシグナル増強試薬 (Signal Enhancer HIKARI、nacalai tesque社製) にて 40nM に調整した。

[0240] 各ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗ヒトPD-1一本鎖抗体をシグナル増強試薬にて 1280nM 、 640nM 、 320nM 、 160nM 、 80nM 、 40nM 、 20nM 及び 10nM に調整し、 40nM のhPD-L1と等量混合した。このscFv/hPD-L1混合液を $100\mu\text{L}$ ずつ上記ブロッキング終了後プレートに分注した。陰性コントロールとして、ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗ヒトCTLA-4-2一本鎖抗体についても上記と同様に操作した。また、scFv非添加 (競合阻害なし) のウェルとして、シグナル増強試薬にて 20nM に調整したhPD-L1溶液を $100\mu\text{L}$ 分注した。ブランクのウェルにはシグナル増強試薬のみを $100\mu\text{L}$ 分注した。プレートにシールを貼り、室温で2時間静置し、固相化したhPD-1に対して抗hPD-1scFvと混合したhPD-L1を反応させた。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0241] hPD-L1に対する二次抗体 (Biotin-anti-human CD274、PD-L1、Biolegend社製) をシグナル増強試薬で 200ng/mL に調整し、これを $100\mu\text{L}$ ずつ分注した。プレートにシールを貼り、室温で30分間静置した。液を除去後、 $1\times\text{PBS}$ を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除いた。これを3回繰り返し洗浄した。アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Vectastain ABC Kit, Vector社製) としてA液及びB液を4滴ずつシグナル増強試薬 10mL に添加した。これを $100\mu\text{L}$ ずつ分注し、プレートにシールを貼り、室温で3

0分間静置した。液を除去後、 $1 \times \text{PBS}$ を $350 \mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0242] 検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B (R&D Systems社製)を等量ずつ混ぜ、 $200 \mu\text{L}$ ずつ分注し、遮光して室温で20分静置した。正確に20分経過後Stop solution (R&D Systems社製)を $50 \mu\text{L}$ ずつ添加し呈色反応を停止した。測定は 450 nm の吸光度を、 570 nm を対照として測定した。測定値をフリーソフトウェアImage Jを用いて回帰式を求め、PD-1とPD-L1の結合を50%阻害する抗体濃度 (IC_{50})を算出した。測定及び解析結果を以下の表25及び図23に示した。

[0243] [表25]

リンカー長の異なる各種抗ヒトPD-1一本鎖抗体のhPD-1とhPD-L1との結合反応に対する競合的阻害活性

scFv 濃度 nM	SP69L5 hPD-1 scFv03		SP69L20 hPD-1 scFv03		SP69L20 hCTLA4 scFv02	
	A450-570	Inhibition (%)	A450-570	Inhibition (%)	A450-570	Inhibition (%)
0	2.571	0	2.249	0	2.249	0
5	2.021	21.4	2.469	-9.8	2.47	-9.8
10	1.857	27.8	2.398	-6.6	2.579	-14.7
20	1.248	51.5	2.02	10.2	2.582	-14.8
40	0.697	72.9	1.492	33.7	2.558	-13.7
80	0.378	85.3	0.939	58.2	2.489	-10.7
160	0.183	92.9	0.587	73.9	2.375	-5.6
320	0.131	94.9	0.31	86.2	2.535	-12.7
640	0.079	96.9	0.211	90.6	2.469	-9.8
IC_{50}	18.7 nM		51.7 nM			

[0244] (結果)

表25及び図23から明らかなとおり、抗hPD-1 scFv03は、L5、L20のリンカー長に関わらずヒトPD-L1のヒトPD-1への結合に対して競合阻害活性を示した。SP69L5及びSP69L20の抗hPD-1 scFv03の IC_{50} はそれぞれ18.7 nM及び51.7 nMであ

り、リンカー長の短いSP69L5の方がより低濃度で競合阻害活性を示した。なお、陰性コントロールの抗ヒトCTL A-4-2一本鎖抗体では競合阻害は認められなかった。

[0245] [実施例25]

[各種シグナルペプチドを組み込んだ抗ヒトPD-1 scFv 03分泌ビフィドバクテリウム属細菌のscFv発現解析]

実施例21の「プラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv 03の作製」と同様の方法で、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxL20-hPD-1-scFv 03株（但し、x=7、45、50、52、55、58、64、66、67、68、69）のそれぞれについて、分泌される抗hPD-1 scFv 03は、C末端にヒスチジンタグを融合しているため、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図24（a）及び（b）に示す。

[0246] 図24（a）及び（b）から明らかとなおり、以下の11種類（SP7L20、SP45L20、SP50L20、SP52L20、SP55L20、SP58L20、SP64L20、SP66L20、SP67L20、SP68L20、SP69L20）の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の下流に抗hPD-1 scFv 03が組み込まれた発現カセットを含むベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、抗hPD-1 scFv 03の分泌が確認された

[0247] なかでも、SP50L20、SP64L20、SP68L20、SP69L20の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されている上記ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、分泌量が比較的多かった。

[0248] [実施例26]

[抗hPD-1 scFv 03のヒトPD-1へのELISAによる結合確認]

ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHuSPxL20-hPD-1-scFv03 株の各培養上清より精製した上記各種抗 hPD-1-scFv03 を用いて、ヒト PD-1 への結合確認を行った。測定は 450 nm の吸光度を、570 nm を対照として測定した。抗 hPD-1-scFv03 の結合 ELISA の結果を以下の表 26 に示す。

[0249] [表26]

SP/Linker	結合 ELISA
	A450-570
SP7L20	3.171
SP45L20	2.605
SP50L20	3.481
SP52L20	2.427
SP55L20	1.449
SP58L20	3.017
SP64L20	3.055
SP66L20	1.928
SP67L20	3.411
SP68L20	2.187
SP69L20	1.827

[0250] (結果)

上記表 26 より明らかなとおり、各抗 hPD-1-scFv03 は、シグナルペプチドの種類に関わらずヒト PD-1 に結合したが、なかでも SP7、

SP50、SP64、SP67の場合に結合量が多かった。

[0251] [実施例27]

[抗hPD-1 scFv03のヒトPD-1とPD-L1との結合反応に対する競合的結合阻害活性の確認]

上記ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxL20-hPD-1-scFv03株から精製された各種抗hPD-1 scFv03を用いて、ヒトPD-1を固相化したマイクロプレートに、各種抗hPD-1 scFv03 (10 μ g/mL) とヒトPD-L1 (1 μ g/mL) との混合物を添加し、ヒトPD-1に結合したPD-L1量を測定した。抗hPD-1 scFv03非添加の場合のPD-L1結合阻害率を0%として、抗hPD-1 scFv03を共存させたときのPD-1/PD-L1結合に対する競合阻害率(%)を算出した。結果を以下の表27に示す。

[0252]

[表27]

SP/Linker	競合阻害率
	%
SP7L20	75.5
SP45L20	73.7
SP50L20	81.4
SP52L20	74.4
SP55L20	64.2
SP58L20	88.1
SP64L20	84.9
SP66L20	87.5
SP67L20	88.4
SP68L20	90.4
SP69L20	84.6

[0253] (結果)

表27より明らかとなおり、シグナルペプチドの種類によって競合阻害率の値に大きな相違はなかったが、SP55L20を用いた場合、競合阻害率はいくぶん低かった。

[0254] [実施例28]

[リンカー長の検討]

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxLy-hPD

－1－s c F v 0 3株（但し、x = 7、4 5、5 0、5 2、5 5、5 8、6 4、6 6、6 7、6 8、6 9）のそれぞれについて、様々なリンカー長（L y）において検討を行った。

[0255] 抗hPD－1－s c F v 0 3抗体について、11種類（SP 7、SP 4 5、SP 5 0、SP 5 2、SP 5 5、SP 5 8、SP 6 4、SP 6 6、SP 6 7、SP 6 8、SP 6 9）の各分泌シグナルペプチドについて、様々なリンカー長を有する、各分泌シグナルペプチド－リンカー連結体が挿入されている抗hPD－1 s c F v 0 3分泌プラスミドを構築し、かかるプラスミドで形質転換された各種ビフィドバクテリウム・ロンガム105－A株を作製した。

[0256] 上記検討用各種ビフィドバクテリウム・ロンガム105－A株それぞれについて、抗hPD－1－s c F v 0 3抗体の分泌確認を、抗ヒスチジntag抗体を用いたウェスタンブロットティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図25(a)～(d)に示す。

[0257] （結果）

図25(a)～(d)から明らかとなおり、SP 5 8 L 5、SP 5 8 L 1 0を除き、SP 7 L 5、SP 7 L 1 0、SP 7 L 1 5、SP 7 L 2 0、SP 4 5 L 5、SP 4 5 L 1 0、SP 4 5 L 1 5、SP 4 5 L 2 0、SP 5 0 L 5、SP 5 0 L 1 0、SP 5 0 L 1 5、SP 5 0 L 2 0、SP 5 2 L 5、SP 5 2 L 1 0、SP 5 2 L 1 5、SP 5 2 L 2 0、SP 5 5 L 5、SP 5 5 L 1 0、SP 5 5 L 1 5、SP 5 5 L 2 0、SP 5 8 L 1 5、SP 5 8 L 2 0、SP 6 4 L 5、SP 6 4 L 1 0、SP 6 4 L 1 5、SP 6 4 L 2 0、SP 6 6 L 5、SP 6 6 L 1 0、SP 6 6 L 1 5、SP 6 6 L 2 0、SP 6 7 L 5、SP 6 7 L 1 0、SP 6 7 L 1 5、SP 6 7 L 2 0、SP 6 8 L 5、SP 6 8 L 1 0、SP 6 8 L 1 5、SP 6 8 L 2 0、SP 6 9 L 5、SP 6 9 L 1 0、SP 6 9 L 1 5、SP 6 9 L 2 0の各分泌シグナルペプチド－リンカー連結体が挿入されている抗hPD－1 s c F v 0 3分泌プラスミドで形質転換された各種ビフィドバクテリウム・ロンガム105－A株から一本鎖

抗体が分泌された。

[0258] また、SP7は設計したリンカー長に関係なく同じ分子サイズの分泌物が検出された。SP45は設計したリンカー長に応じた分子サイズの分泌物が検出された。SP50は設計したリンカー長に応じた分子サイズの分泌物が確認された。SP58は設計したリンカー長がL20でも分泌物の分子サイズが小さく、またリンカーを短くする(L10, L5)と分泌しなくなった(図25(c)参照)。一本鎖抗体のウェスタン解析での分子サイズと設計したリンカー長は必ずしも一致しなかった。

[0259] [実施例29]

[抗hPD-1 scFv03のヒトPD-1へのELISAによる結合確認]

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxLy-hPD-1-scFv03株(但し、x=7、68、69)各培養上清より精製した抗hPD-1 scFv03抗体を1 μ g/mL添加し、ヒトPD-1(hPD-1)との結合量の確認を、ELISA法により行った。測定は450nmの吸光度を、570nmを対照として測定した。ELISA法を用いたヒトPD-1固相化プレートへの抗hPD-1 scFv03抗体の結合量を以下の表28に示す。

[0260] [表28]

SPx	Ly		結合量
			OD450-570
SP7	L20	SP7L20-hPD-1 scFv03	1.728
SP7	L5	SP7L5-hPD-1 scFv03	2.861
SP68	L20	SP68L20-hPD-1 scFv03	2.358
SP68	L5	SP68L5-hPD-1 scFv03	3.119
SP69	L20	SP69L20-hPD-1 scFv03	2.332
SP69	L5	SP69L5-hPD-1 scFv03	3.643

[0261] (結果)

表28から明らかなとおり、SP7、SP68、SP69のいずれの場合においても、リンカー長20（L20）よりもリンカー長5（L5）において、抗hPD-1 scFv03抗体のヒトPD-1固相化プレートへの結合量が多かった。したがって、リンカー長の最適化により、PD-1への抗hPD-1 scFv03抗体の結合量を向上できる可能性が示された。

[0262] [実施例30]

（リンカー長の検討 L=0～10）

SP45、SP50、SP64、SP68、SP69の5種類のシグナルペプチドについて、リンカー長について検討をすすめた。SPxLy（ただし、x=45の場合、y=0、1、2、3、5；x=50、64、68の場合、y=0、1、2、3、4、5；x=69の場合、y=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されている抗hPD-1 scFv03分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株を作製し、抗ヒスチジntag抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図26に示す。

[0263] （結果）

図26から明らかなとおり、SP69L0の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されている抗hPD-1 scFv03分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株では分泌が認められなかった（図26（c）参照）以外は、SP45L0、SP45L1、SP45L2、SP45L3、SP45L5、SP50L0、SP50L1、SP50L2、SP50L3、SP50L4、SP50L5、SP64L0、SP64L1、SP64L2、SP64L3、SP64L4、SP64L5、SP68L0、SP68L1、SP68L2、SP68L3、SP68L4、SP68L5、SP69L1、SP69L2、SP69L3、SP69L4、SP69L5、SP69L6、SP69L7、SP69L8、SP69L9、SP69L10の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が

挿入されている抗hPD-1 s c F v 0 3分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において分泌が認められた。SP68L0やSP68L1が分泌シグナルペプチドリンカー連結体として用いられている場合は、分泌量が少なかった（図26（b）参照）。

[0264] [実施例31]

SP50Ly（ただしy=0、1、5）、SP64Ly（ただしy=0、5）、SP67Ly（ただしy=10）、SP68Ly（ただしy=1、5）、SP69Ly（ただしy=1、7）の各分泌シグナルペプチドリンカー連結体が挿入されている抗hPD-1 s c F v 0 3分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株を作製し、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図27に示す。

[0265] （結果）

図27から明らかとなおり、SP50L0、SP50L1、SP50L5、SP64L0、SP64L5、SP67L10、SP68L1、SP68L5、SP69L1、SP69L7のいずれの分泌シグナルペプチドリンカー連結体が挿入されている抗hPD-1 s c F v 0 3分泌プラスミドで形質転換された株においても、抗hPD-1-s c F v 0 3抗体の分泌が確認された。

[0266] [実施例32]

（抗hPD-1 s c F v 0 3のヒトPD-1とPD-L1との結合反応に対する競合的結合阻害活性の確認）

実施例24の手順と同様に、hPD-1 s c F v 0 3分泌各ビフィドバクテリウム属細菌より精製したs c F vによるPD-1/PD-L1結合の競合的結合阻害活性の確認を行った。測定は450nmの吸光度を、570nmを対照として測定した。s c F v非添加時のPD-L1の結合量を100%とし、PD-1とPD-L1の結合を50%阻害するs c F v濃度（IC50）を算出した。測定結果を以下の表29に示した。

[0267] [表29]

SP/Linker	IC50* (nM)
SP50L5	10.9
SP64L5	23.4
SP67L10	26.9
SP68L1	21.7
SP68L5	41.1
SP69L1	21.8
SP69L7	28.8

[0268] (結果)

表29から明らかとなっており、SP50L5が最も低濃度でPD-1とPD-L1との結合を阻害した。同一SPでリンカー長の異なるSP68L1とSP68L5、及びSP69L1とSP69L7とを比べるとどちらもリンカー長が短い方(L1)がより低濃度においてもPD-1とPD-L1との結合を阻害することが示された。

[0269] [実施例33]

(結合親和性)

抗PD-1抗体は、ビアコア分析(Biacore AB、Uppsala、Sweden)によって、以下の表30に示すNo1~No7の7つのサンプルをそれぞれn=5で、結合親和性を解析した。リガンドとしてヒトPD-1 Fcキメラ(R&D社製)をAcetate pH4.5(GEヘルスケア社製)にて5 μ g/mLに調製した。この液を、CM基を導入したデキストランを金膜表面にコートしたセンサーチップ上に標準のタンパク質固定化法(アミンカップリング法)により固定化した。アナライトとなる抗ヒトP

D-1 一本鎖抗体はHBS-E Pバッファー（GEヘルスケア社製）にて12.5、25、50、100及び200 nMに調製した。カインेटクス測定は、各アナライトを低濃度から添加時間60秒、解離時間60秒、流速30 μ L/分の条件でシングルサイクル法にて実施した。測定後の試料の解離条件はGlycine 1.5（GEヘルスケア社製）を添加時間60秒、流速30 μ L/分とした。本試験のランニング緩衝液はHBS-E Pバッファーとした。結果を以下の表30に示す。

[0270] [表30]

Sample Name	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
No1 SP50L5 PD-1 scFv	417037.2	0.002666	6.39E-09
No2 SP64L5 PD-1 scFv	274449.6	0.003960	1.44E-08
No3 SP67L10 PD-1 scFv	359502.6	0.003186	8.86E-09
No4 SP68L1 PD-1 scFv	398089.3	0.003388	8.51E-09
No5 SP68L5 PD-1 scFv	291332.5	0.005457	1.87E-08
No6 SP69L1 PD-1 scFv	393708.8	0.003379	8.58E-09
No7 SP69L7 PD-1 scFv	238025.4	0.003652	1.53E-08

[0271] (結果)

表30から明らかとなおり、抗体としての機能としては、結合が強く（KD値が小さい）、解離が遅い（ k_d 値が低い）SP50L5が最も優れていた。次点はNo3、4、6のSP67L10、SP68L1、SP69L1であった。

[0272] [実施例34]

[各種シグナルペプチドを組み込んだ抗hCTLA-4 scFv 02-FLAG分泌ビフィドバクテリウム属細菌のscFv発現解析]

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pP30SPxL20-hCTLA-4 scFv 02株（但し、 $x=7, 45, 50, 52, 55, 58, 64, 66, 67, 68, 69$ ）のそれぞれについて、18時間培養の培養液からサンプル調製し、培養上清80 μ Lを用いて、抗FLAGタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なっ

た。結果を図28に示す。

[0273] 図28から明らかなとおり、以下の11種類（SP7L20、SP45L20、SP50L20、SP52L20、SP55L20、SP58L20、SP64L20、SP66L20、SP67L20、SP68L20、SP69L20）の各分泌シグナルペプチドリンカー連結体が挿入されている抗hCTLA-4scFv02分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において抗体分泌が認められた。

[0274] なかでも、SP50L20、SP52L20、SP64L20、SP67L20、SP68L20、SP69L20の各分泌シグナルペプチドリンカー連結体が挿入されている抗hCTLA-4scFv02分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、分泌量が比較的多かった。

[0275] [実施例35]

[抗hCTLA-4scFv02のヒトCTLA-4へのELISAによる結合確認]

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pP30SPxL20-hCTLA-4scFv02株の各培養上清より精製した各種抗hCTLA-4scFv02を用いて、ヒトCTLA-4への結合確認を行った。測定は450nmの吸光度を、570nmを対照として測定した。ヒトCTLA-4への結合ELISAの結果を以下の表31に示す。

[0276]

[表31]

SP/Linker	結合 ELISA
	A450-570
SP7L20	1.281
SP45L20	0.379
SP50L20	0.655
SP52L20	0.388
SP55L20	0.402
SP58L20	0.715
SP64L20	0.697
SP66L20	0.306
SP67L20	0.981
SP68L20	0.218
SP69L20	0.344

[0277] (結果)

表31から明らかなとおり、SP/Linkerの種類によりscFvの結合量は異なった。SP7L20及びSP67L20が比較的高値であった。

[0278] [実施例36]

[抗hCTLA-4 scFv 02のヒトCTLA-4/ヒトCD80との結合反応又はヒトCTLA-4/ヒトCD86との結合反応に対する競合的結合阻害活性の確認]

ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A/pP30SPxL20-hCTLA-4 scFv02 株から得られた抗 hCTLA-4 scFv02 を用いて、ヒトCTLA-4 を固相化したマイクロプレートに、精製 scFv ($10 \mu\text{g/mL}$) と、ヒトCD80 又はヒトCD86 ($1 \mu\text{g/mL}$) との混合物を添加し、ヒトCTLA-4 に結合したヒトCD80 又はヒトCD86 の量を測定した。抗 hCTLA-4 scFv02 非添加の場合のヒトCD80 又はヒトCD86 結合阻害率を 0% として、抗 hCTLA-4 scFv02 を共存させたときのヒトCTLA-4/ヒトCD80 結合又はヒトCTLA-4/ヒトCD86 結合に対する競合阻害率 (%) を算出した。結果を以下の表 32 に示した。

[0279]

[表32]

SP/Linker	競合阻害率 (%)	
	hCD80	hCD86
SP7L20	98.0	94.8
SP45L20	72.3	81.9
SP50L20	80.2	88.5
SP52L20	77.9	85.6
SP55L20	80.8	88.8
SP58L20	97.3	98.7
SP64L20	97.0	98.8
SP66L20	91.4	94.8
SP67L20	100	100
SP68L20	92.3	87.8
SP69L20	97.9	96.2

[0280] (結果)

リンカー長が20の場合、シグナルペプチドによる大きな違いはなかった。

[0281] [実施例37]

抗hCTLA-4 s c F v 0 2抗体について、SP45、SP50、SP64、SP68、SP69のシグナルペプチドについて、リンカー長につい

て検討をすすめた。SPxLy（ただし、 $x=45, 50, 64, 68$ の場合、 $y=0, 1, 2, 3, 4, 5$ ； $x=69$ の場合、 $y=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ）の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されている抗hCTLA-4scFv02分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株を作製し、18時間培養の培養液からサンプル調製し、培養上清100 μ Lを用いて、抗FLAGタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図29（a）～（c）に示す。

[0282]（結果）

図29から明らかなとおり、S68L0以外の、SP45L0、SP45L1、SP45L2、SP45L3、SP45L4、SP45L5、SP50L0、SP50L1、SP50L2、SP50L3、SP50L4、SP50L5、SP64L0、SP64L1、SP64L2、SP64L3、SP64L4、SP64L5、SP68L1、SP68L2、SP68L3、SP68L4、SP68L5、SP69L0、SP69L1、SP69L2、SP69L3、SP69L4、SP69L5、SP69L6、SP69L7、SP69L8、SP69L9、SP69L10の分泌シグナルペプチドや分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の下流に抗hCTLA-4scFv02が組み込まれた発現カセットを含むベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株において、抗hCTLA-4scFv02の分泌が確認された。

産業上の利用可能性

[0283] 本発明のビフィドバクテリウム属細菌や医薬組成物は、医療分野において有用である。

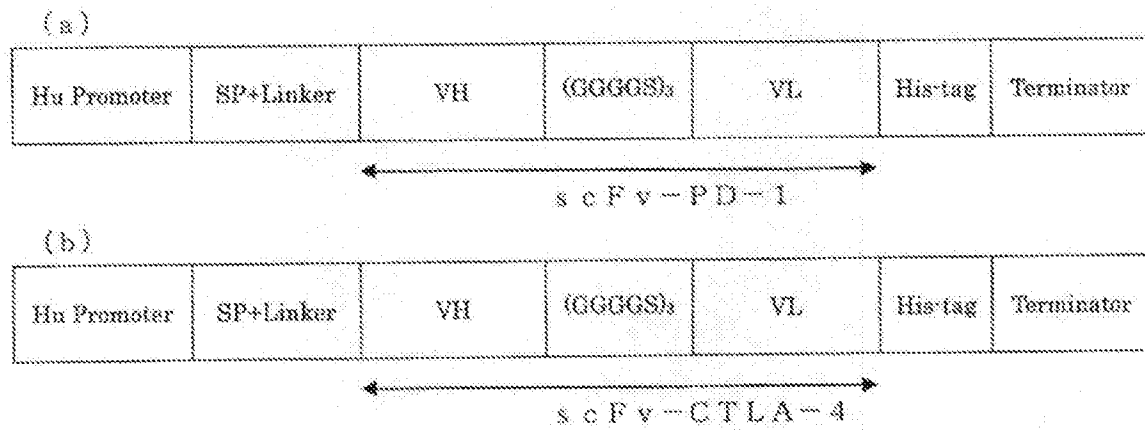
請求の範囲

- [請求項1] 以下の(1)～(4)のDNAを順次含むことを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌内で発現する発現カセット。
- (1) ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターDNA；
- (2) 以下のa)又はb)に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードするDNA；
- a) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列；
- b) 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列からなるペプチドがビフィドバクテリウム属細菌において分泌シグナルペプチドとして機能するアミノ酸配列；
- (3) 異種ポリペプチドをコードするDNA；
- (4) ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターDNA；
- [請求項2] 分泌シグナルペプチドをコードするDNAの下流にリンカーペプチドをコードするDNAが連結されていることを特徴とする請求項1記載の発現カセット。
- [請求項3] リンカーペプチドが、配列番号25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及び35のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が0～29欠損した各アミノ酸配列からなることを特徴とする請求項2記載の発現カセット。
- [請求項4] リンカーペプチドが、配列番号25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及び35のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が10～29欠損した各アミノ酸配列からなることを特徴とする請求項2記載の発現カセット。
- [請求項5] 異種ポリペプチドが、一本鎖抗体であることを特徴とする請求項1～

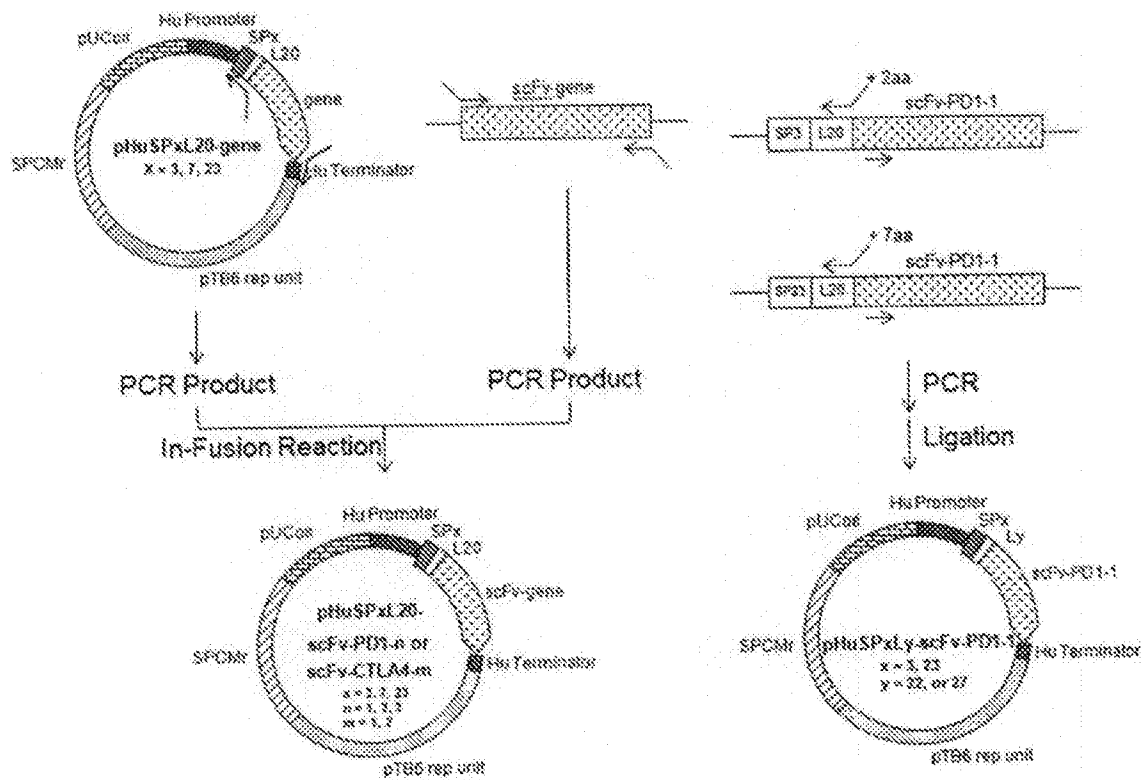
4のいずれか記載の発現カセット。

- [請求項6] 一本鎖抗体が、抗PD-1抗体であることを特徴とする請求項5記載の発現カセット。
- [請求項7] 一本鎖抗体が、抗CTLA-4抗体であることを特徴とする請求項5記載の発現カセット。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれか記載の発現カセットを含むベクター。
- [請求項9] 請求項8記載のベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌。
- [請求項10] ビフィドバクテリウム・ロンガムである請求項9記載のビフィドバクテリウム属細菌。
- [請求項11] 請求項9又は10記載のビフィドバクテリウム属細菌を含む医薬組成物。
- [請求項12] 配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及び16のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド。
- [請求項13] 請求項12記載の分泌シグナルペプチドをコードするDNA。
- [請求項14] 配列番号105、106、107、108、109、110、111、112、113、114及び115のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が0～29欠損した各アミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドーリンカー連結体。
- [請求項15] 配列番号105、106、107、108、109、110、111、112、113、114及び115のいずれかに示されるアミノ酸配列のC末端からアミノ酸残基が10～29欠損した各アミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドーリンカー連結体。
- [請求項16] 請求項14又は15記載の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体をコードするDNA。

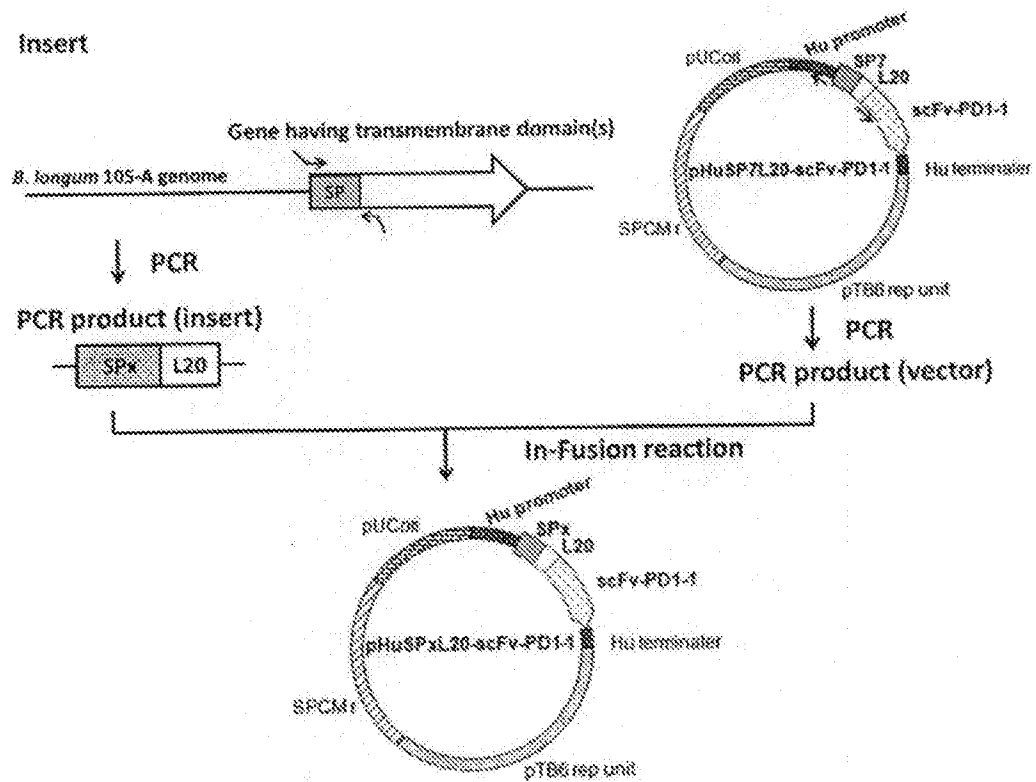
[図1]



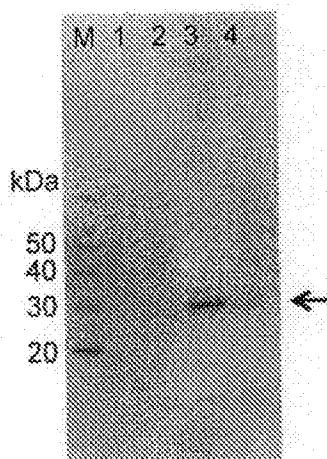
[図2]



[図3]



[図4]



レーンM: マーカー

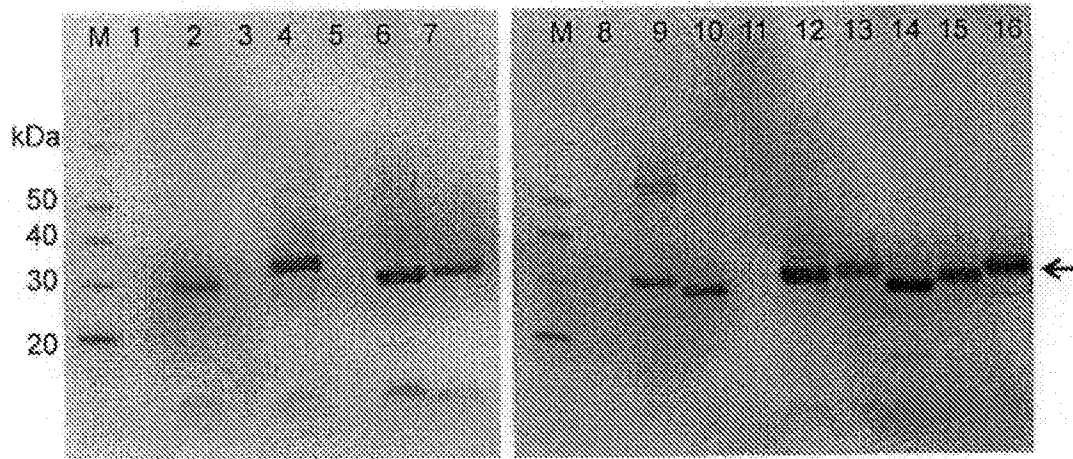
レーン1: 陰性コントロール

レーン2: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP2L22-scFv-PD-1-1株

レーン3: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-scFv-PD-1-1株

レーン4: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP23L27-scFv-PD-1-1株

[図5]



ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSPxL20-scFv-PD-1-1株において、
用いられたシグナルペプチド-リンカーペプチド連結体

レーン1、8：陰性コントロール (pBEシヤトル)

レーン2：SP7L20

レーン3：SP42L20

レーン4：SP45L20

レーン5：SP48L20

レーン6：SP50L20

レーン7：SP52L20

レーン9：SP55L20

レーン10：SP58L20

レーン11：SP62L20

レーン12：SP64L20

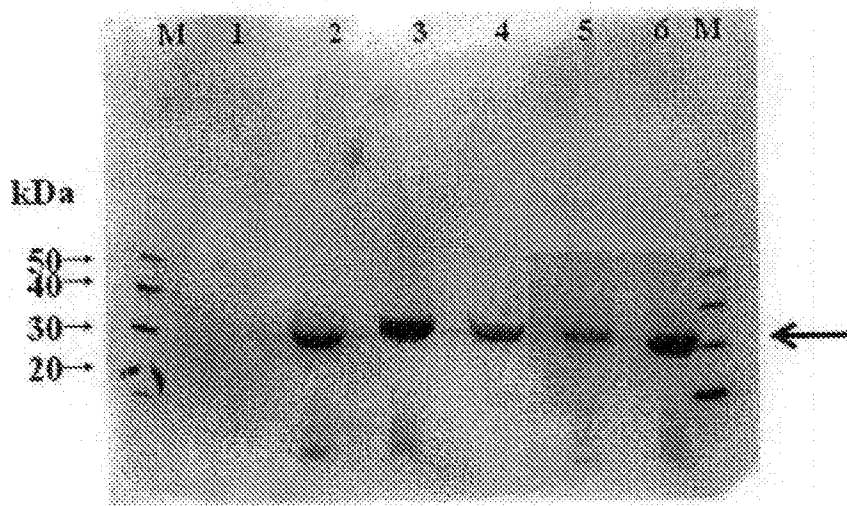
レーン13：SP66L20

レーン14：SP67L20

レーン15：SP68L20

レーン16：SP69L20

[図6]



レーン1: 陰性コントロール (pBEシヤトル株)

レーン2: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-PD-1-1株

レーン3: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-PD-1-2株

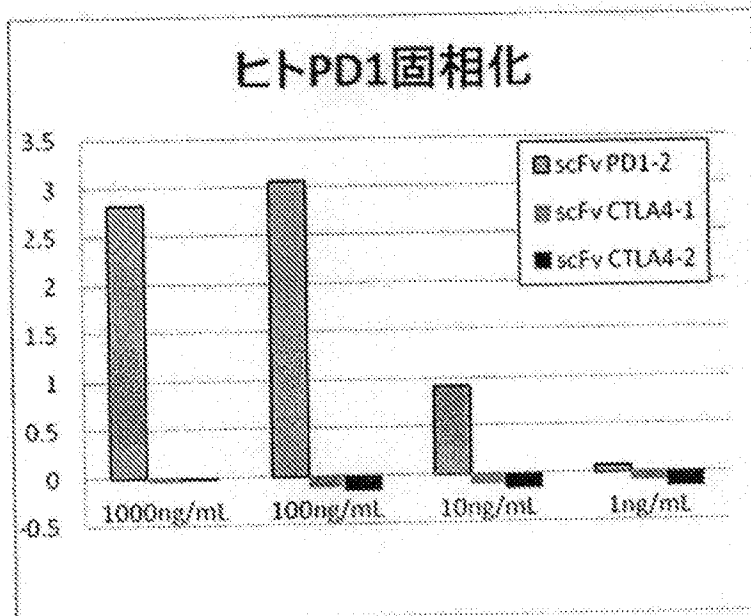
レーン4: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-PD-1-3株

レーン5: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-CTLA-4-1株

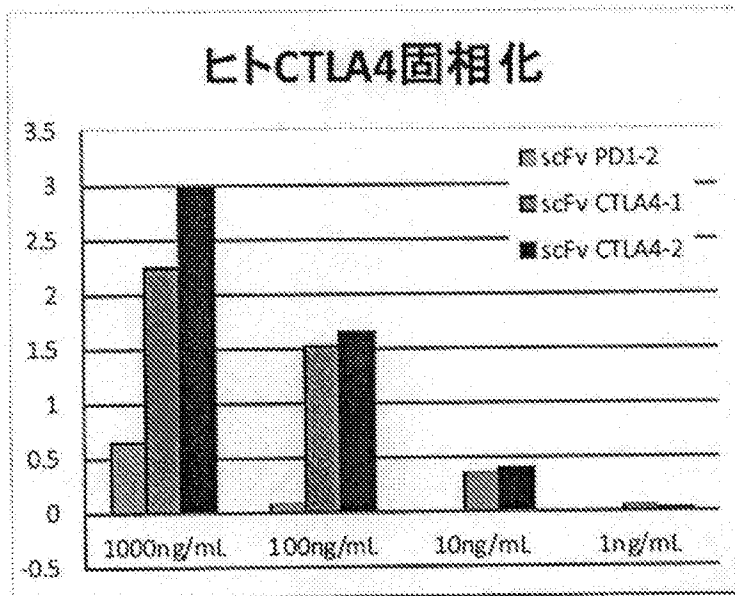
レーン6: ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-CTLA-4-2株

M : 分子量マーカー

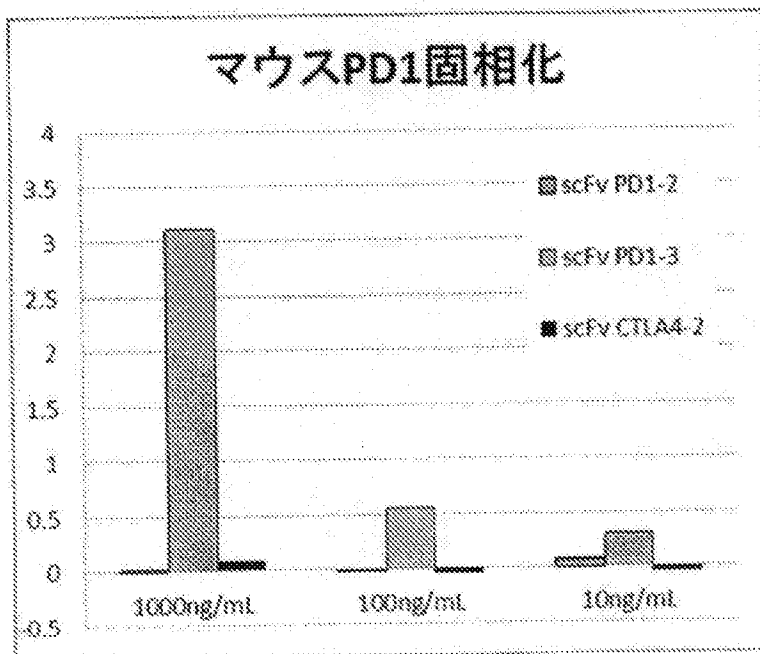
[図7]



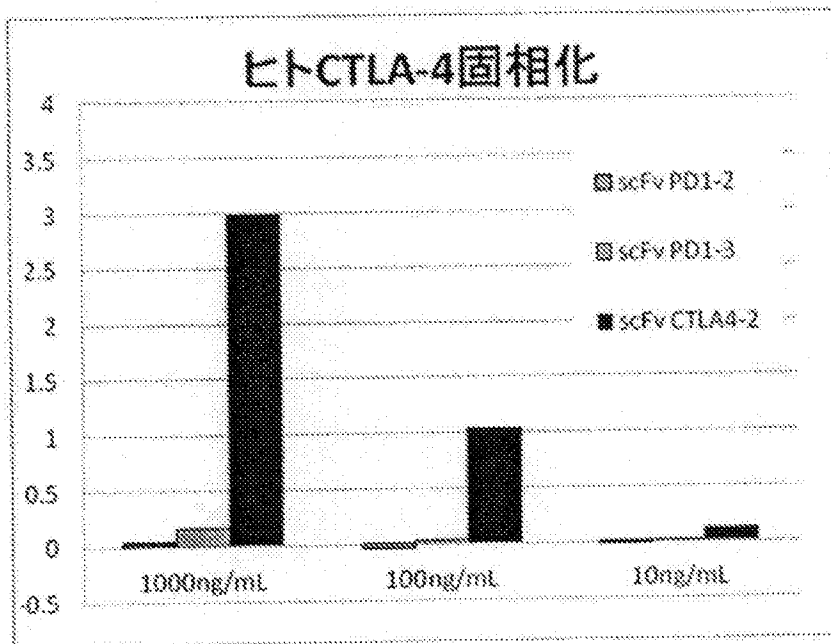
[図8]



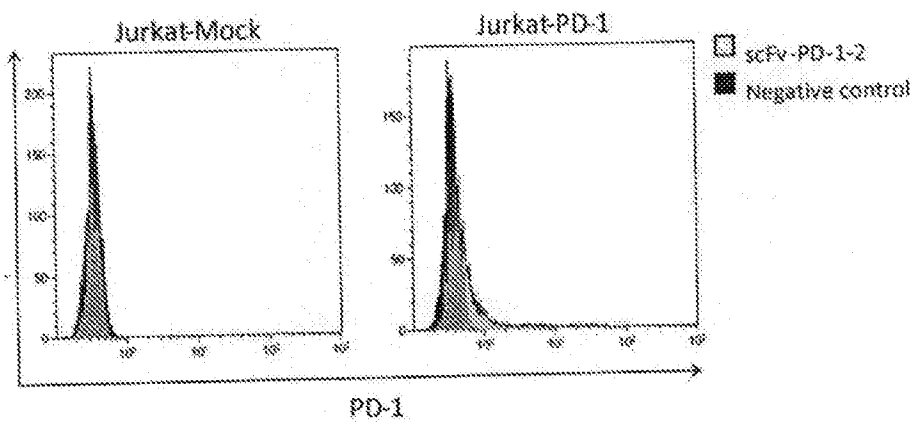
[図9]



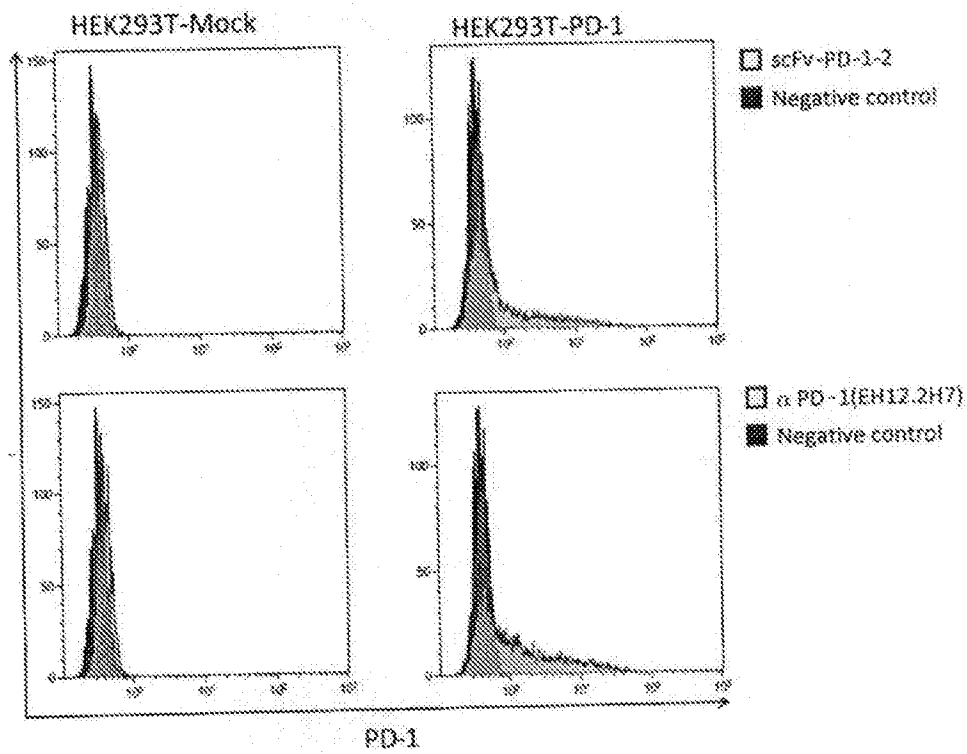
[図10]



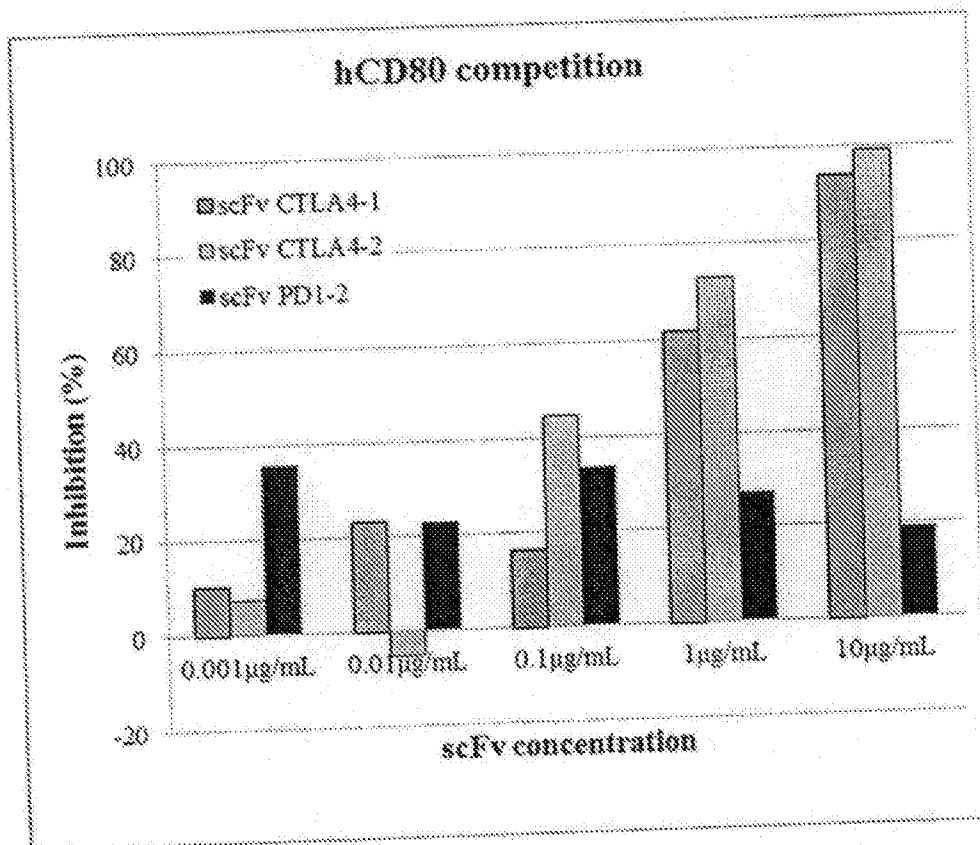
[図11]



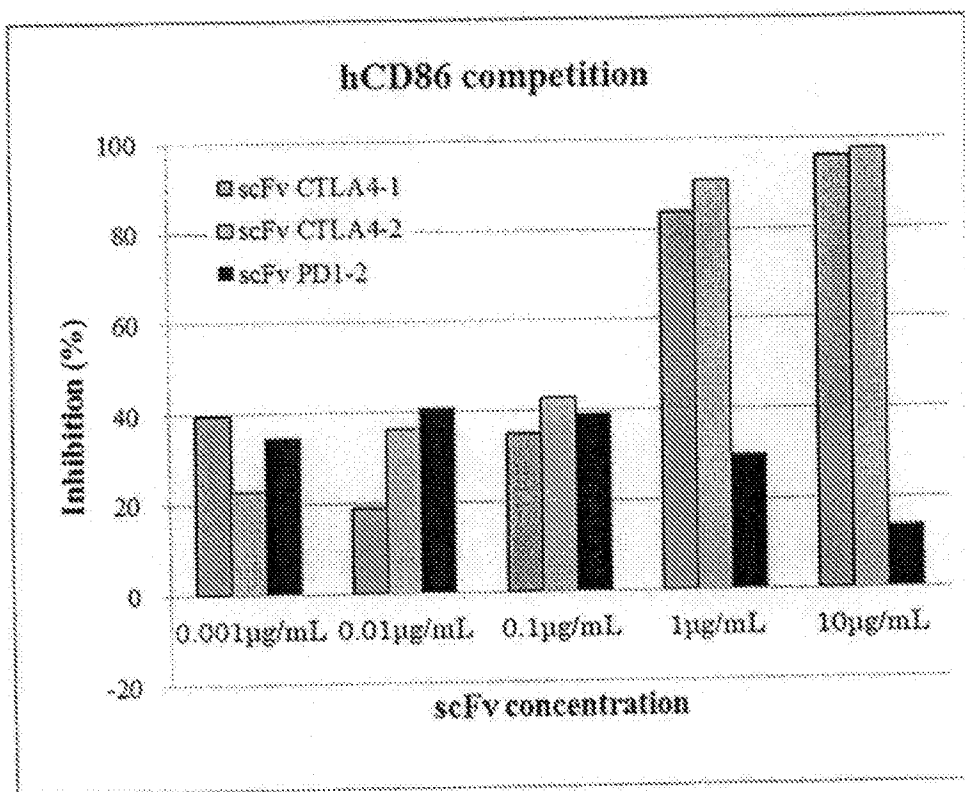
[図12]



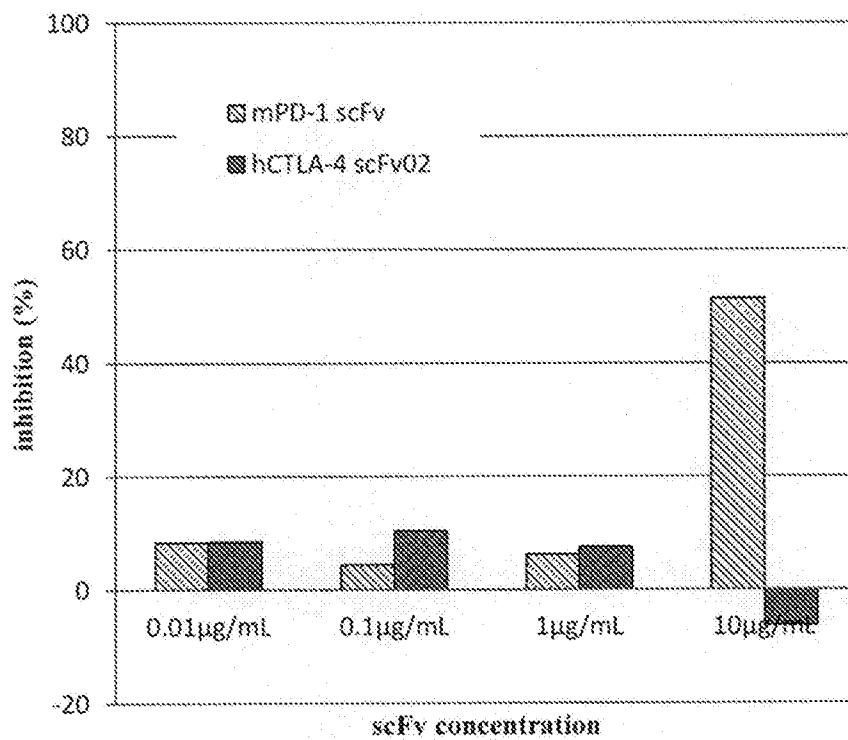
[図13]



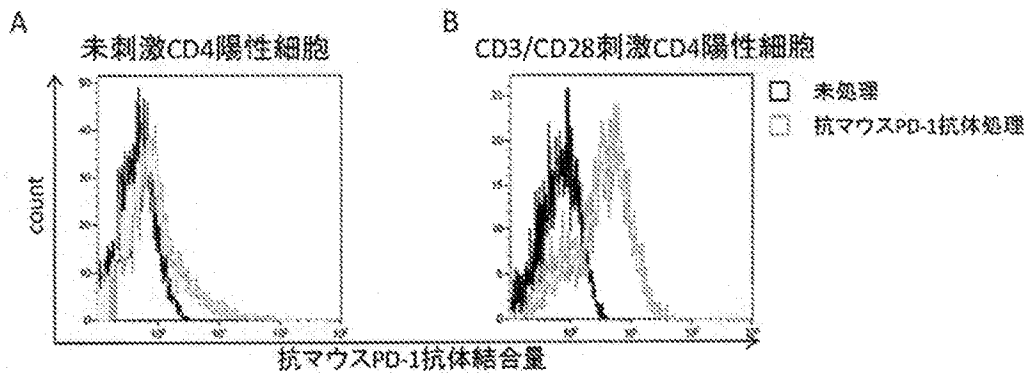
[図14]



[図15]

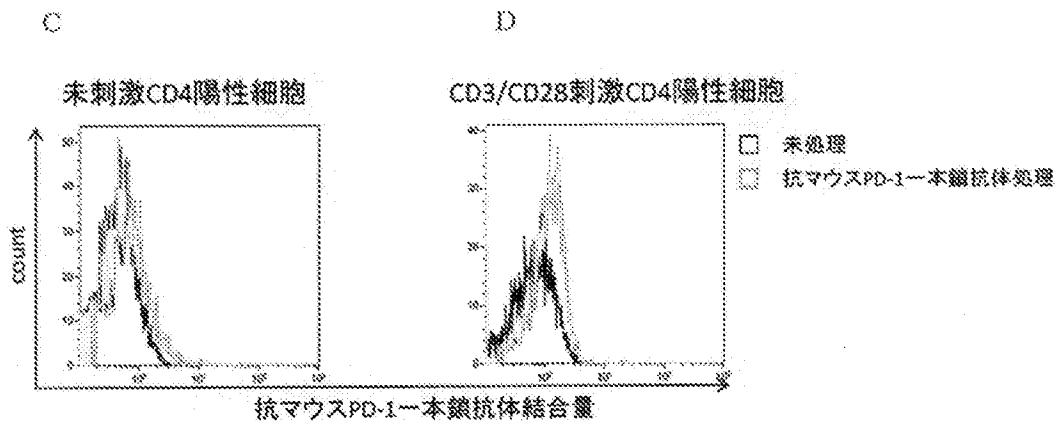


[図16]



CD4 陽性 T 細胞への CD3/CD28 刺激による mPD-1 の発現誘導
(フローサイトメトリー解析)

- A. 未刺激 CD4 陽性細胞に抗マウス PD-1 抗体(□)を反応させ FITC で検出した。
B. CD3/CD28 刺激 CD 陽性細胞に抗マウス PD-1 抗体(□)を反応させ FITC で検出した。

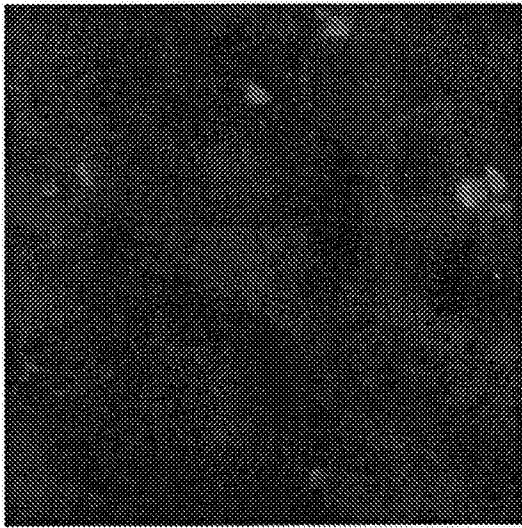


抗マウス PD-1 一本鎖抗体の CD3 及び CD28 刺激 CD4 陽性細胞への結合
(フローサイトメトリー解析)

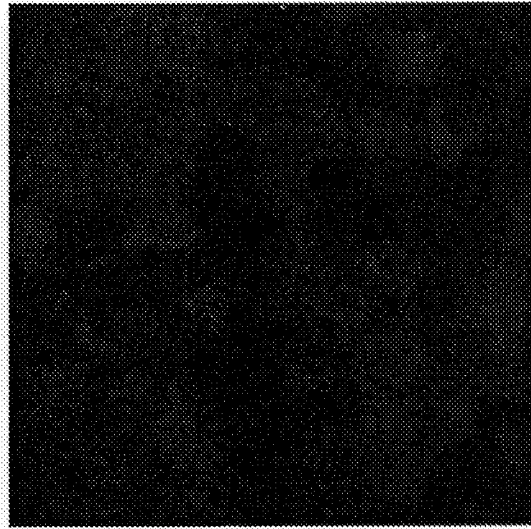
- C. 未刺激 CD4 陽性細胞に抗マウス PD-1 一本鎖抗体(□)を反応させその His に対して Alexa 488-抗 His-tag 抗体を反応させ検出した。
D. CD3/CD28 刺激 CD 陽性細胞に抗マウス PD-1 一本鎖抗体(□)を反応させその His に対して Alexa 488-抗 His-tag 抗体を反応させ検出した

[図17]

(A)



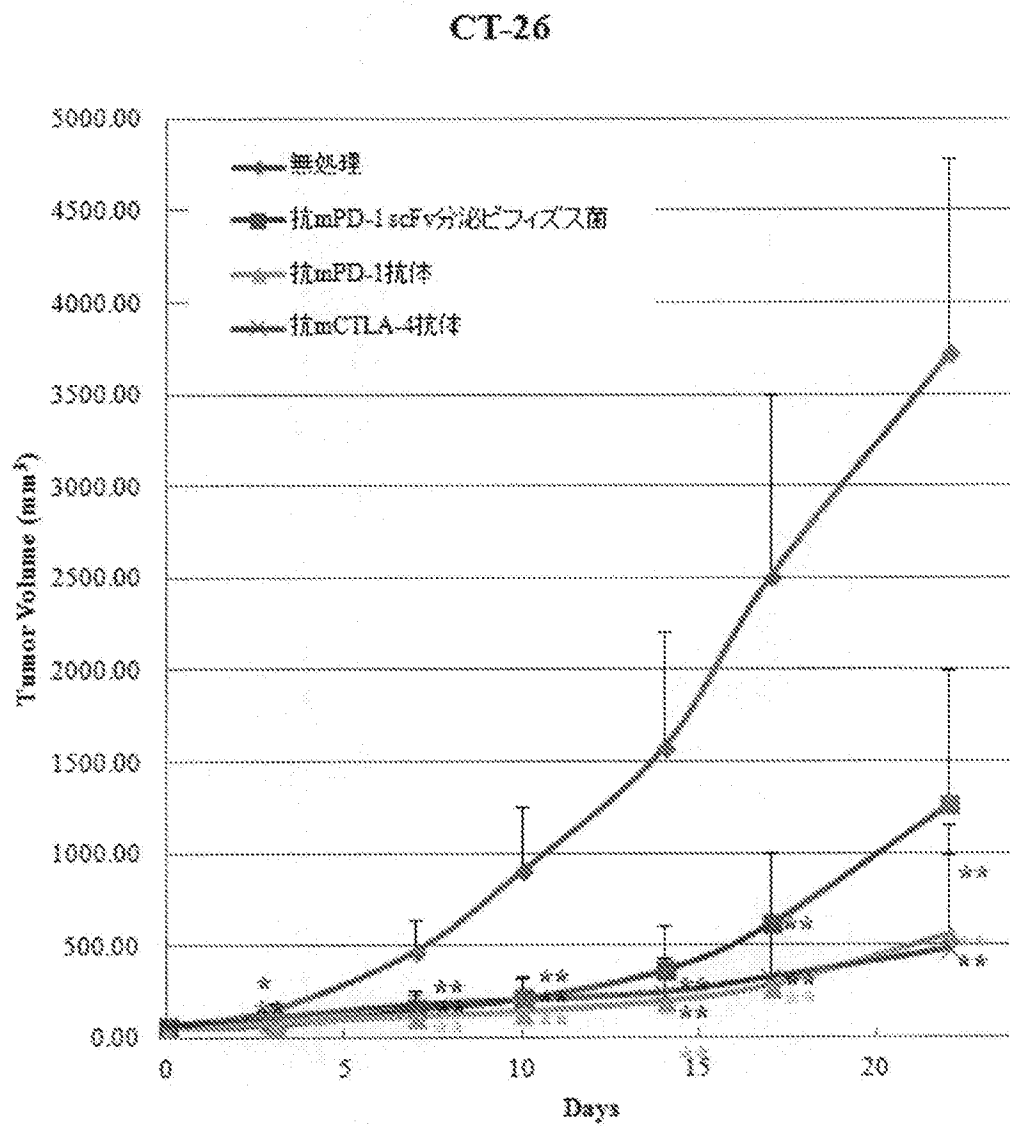
(B)



A: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィズス菌投与マウスの腫瘍組織

B: 無処理マウスの腫瘍組織

[図18]

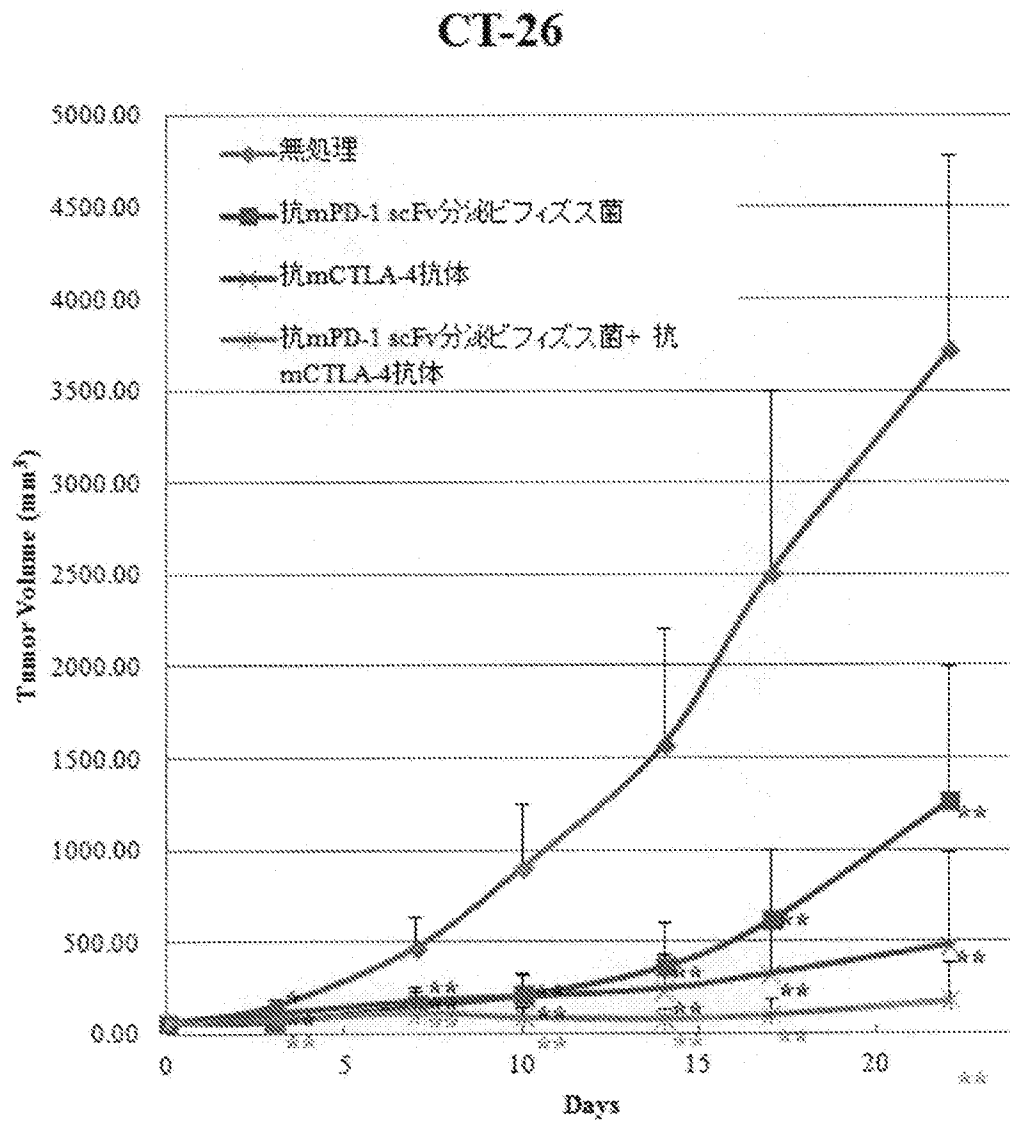


The mean values + S.D. of seven mice.

*: P value < 0.05 (vs Non-treated)

**: P value < 0.01 (vs Non-treated)

[図19]



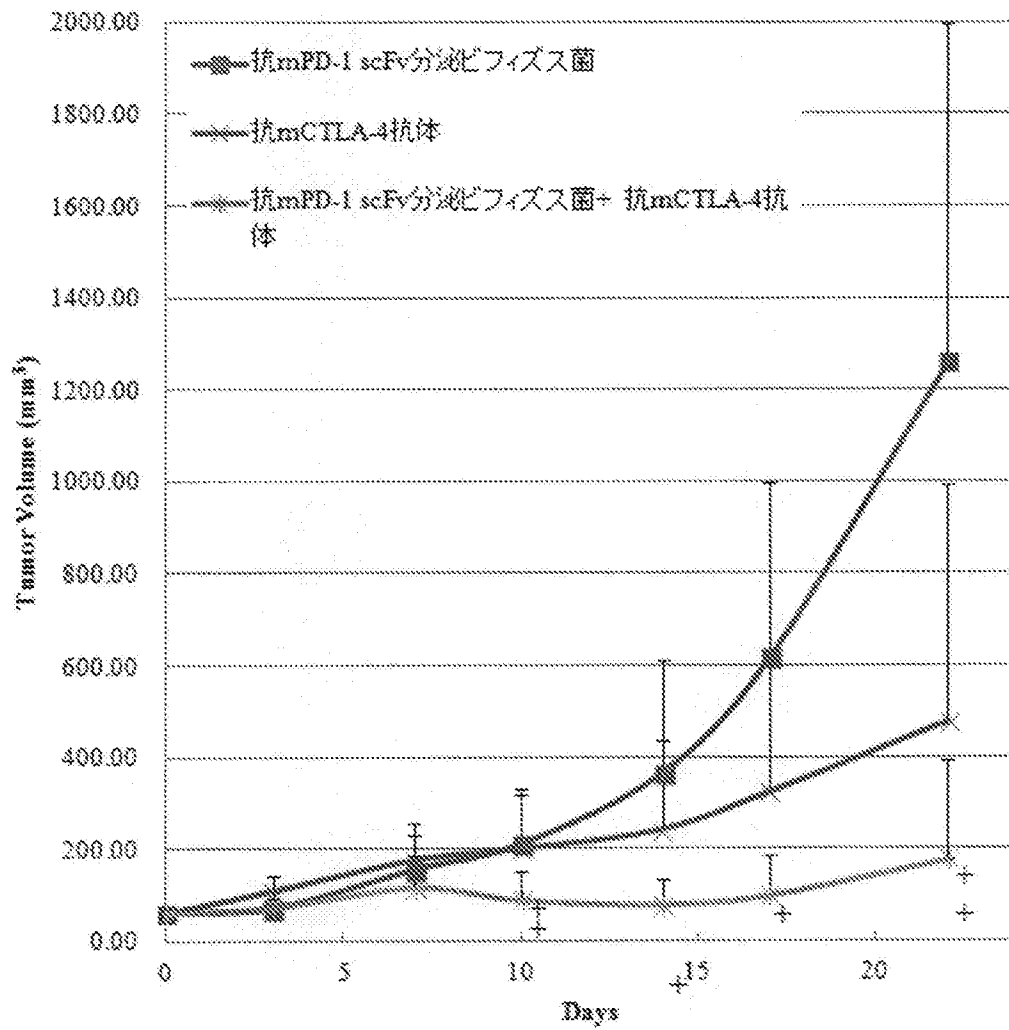
The mean values + S.D. of seven or six mice.

*: P value < 0.05 (vs Non-treated)

**: P value < 0.01 (vs Non-treated)

[図20]

CT-26



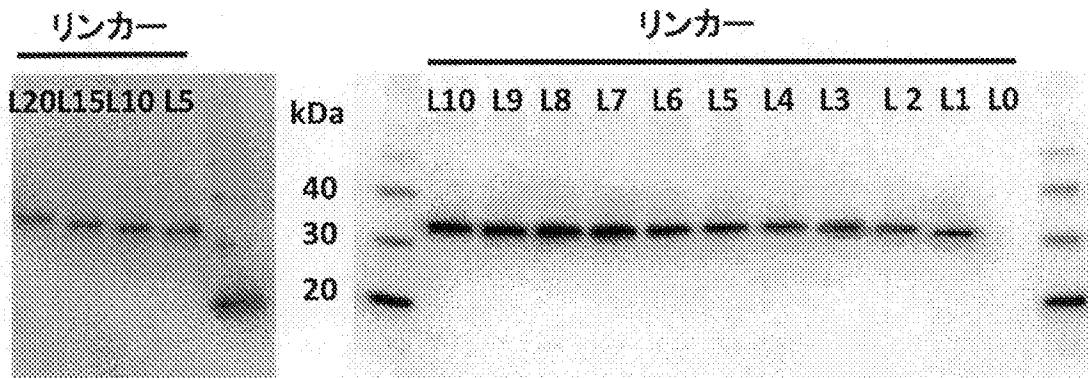
The mean values + S.D. of seven or six animals

+ : P value < 0.05 (vs combination treatment)

++ : P value < 0.01 (vs combination treatment)

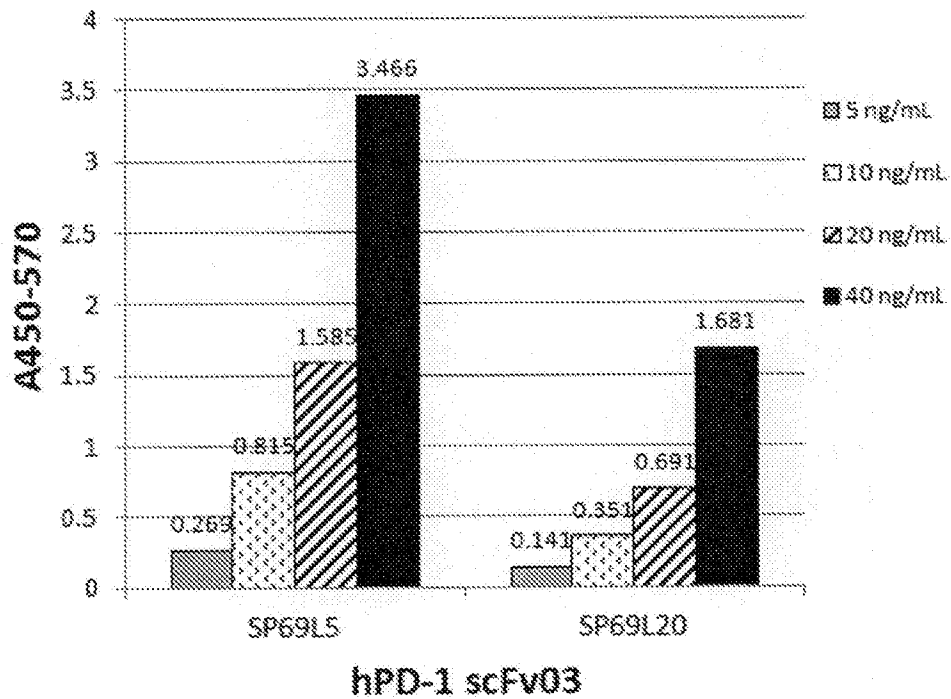
[図21]

ビフィドバクテリウムロンガム105-A/pHuSP69Ly-hPD-1scFv03株

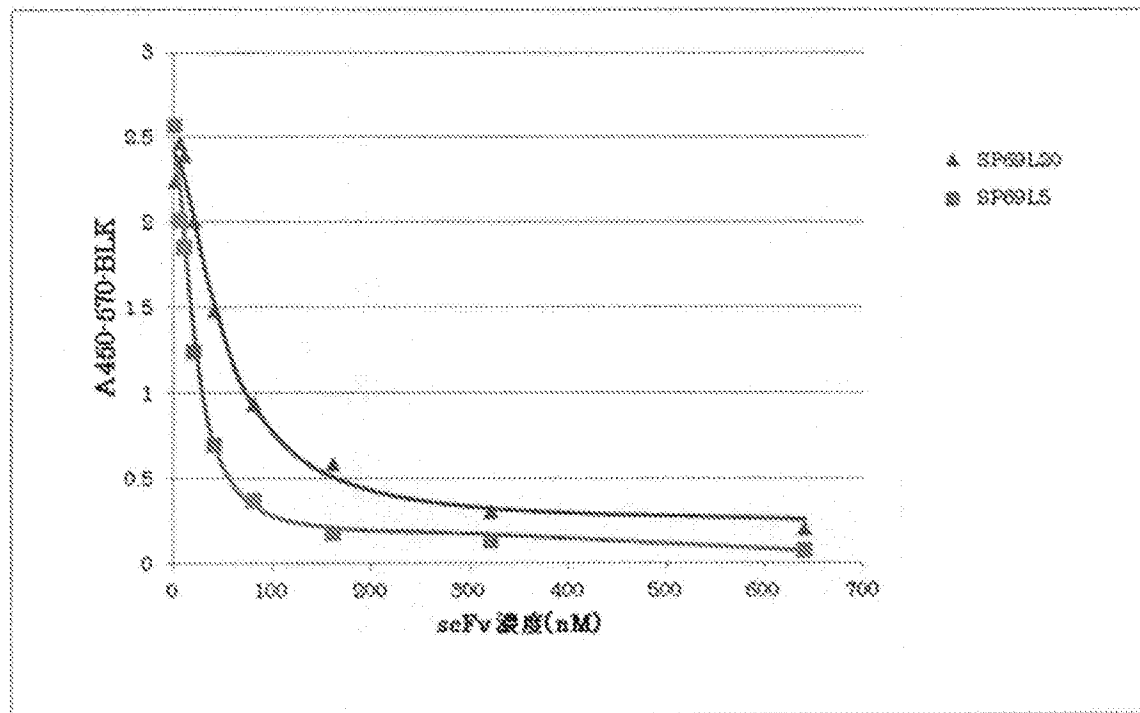


ビフィドバクテリウム属細菌培養上清中に分泌された各リンカー長の抗 hPD-1 scFv03 抗体のウェスタン解析

[図22]

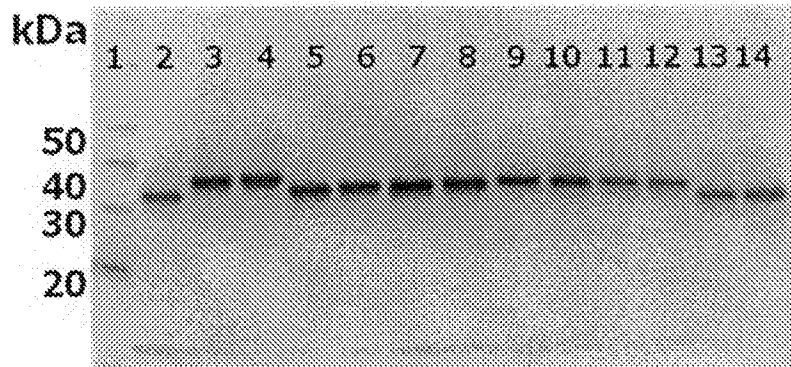


[図23]



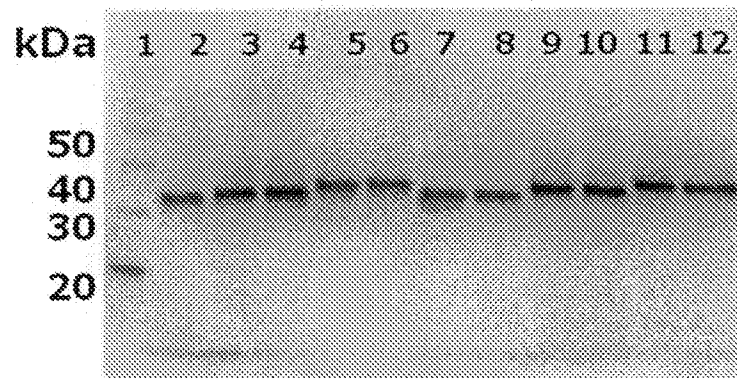
[図24]

(a)

B. longum 105A/pHuSPxL20-hPD-1 scFv03

1: Marker	8: SP50 #2
2: SP7	9: SP52 #1
3: SP45 #1	10: SP52 #2
4: SP45 #2	11: SP55 #1
5:	12: SP55 #2
6:	13: SP58 #1
7: SP50 #1	14: SP58 #2

(b)



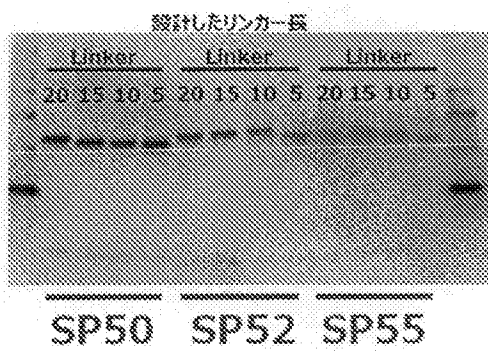
1: Marker	7: SP67 #1
2: SP7	8: SP67 #2
3: SP64 #1	9: SP68 #1
4: SP64 #2	10: SP68 #2
5: SP66 #1	11: SP69 #1
6: SP66 #2	12: SP69 #2

[図25]

(a)



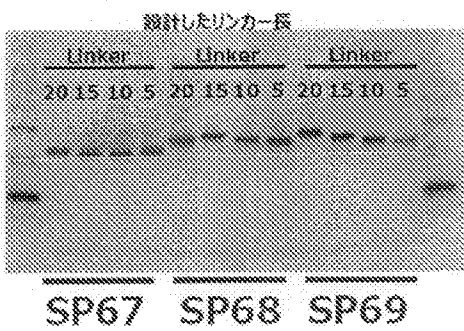
(b)



(c)

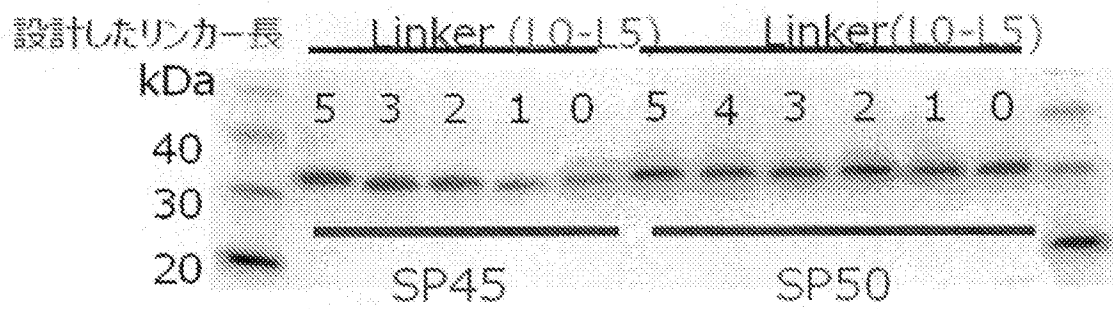


(d)

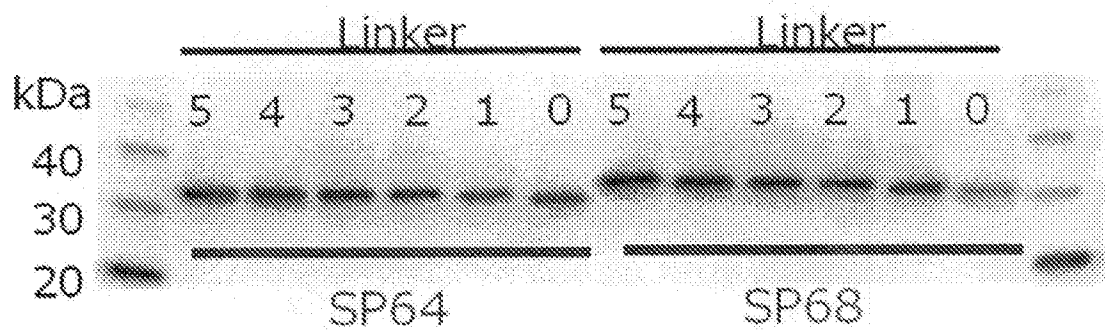


[図26]

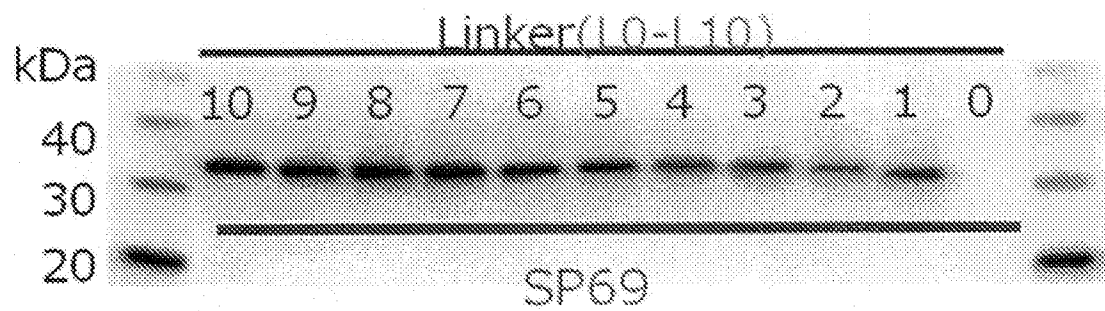
(a)



(b)

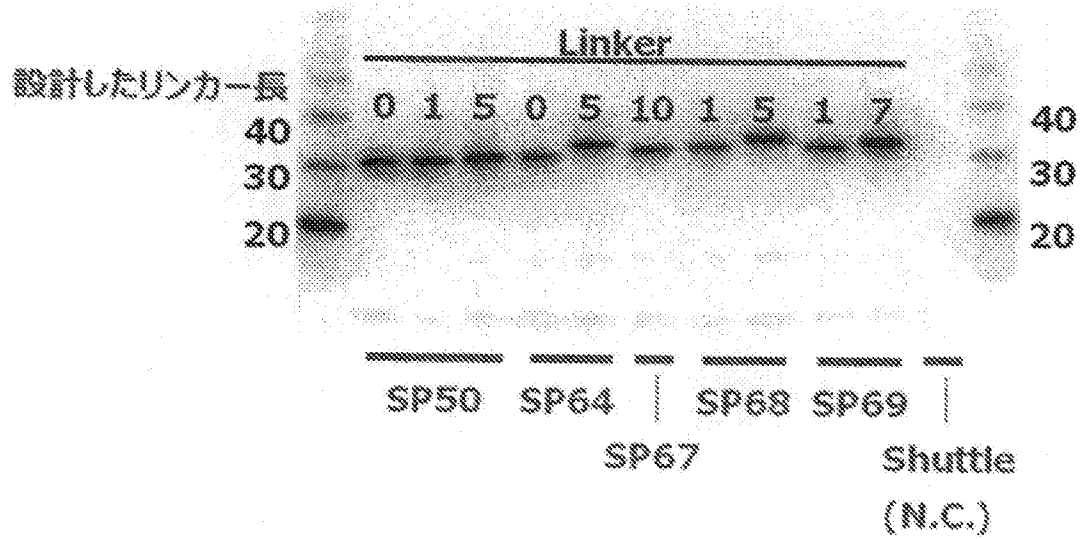


(c)



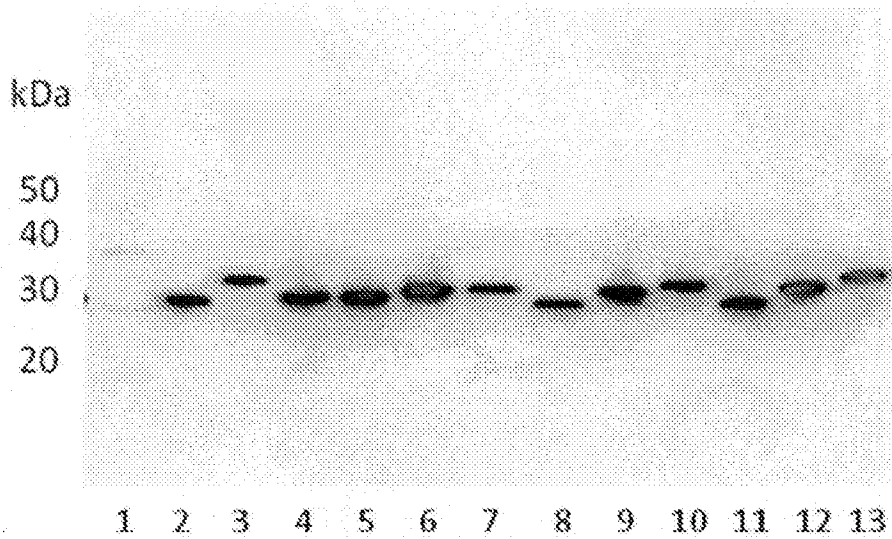
[図27]

B.longum 105A/pHuSPxLy-hPD-1 scFV03 (His-tag 付き)



[図28]

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pP30SPxL20-hCTLA-4 scFv
02株

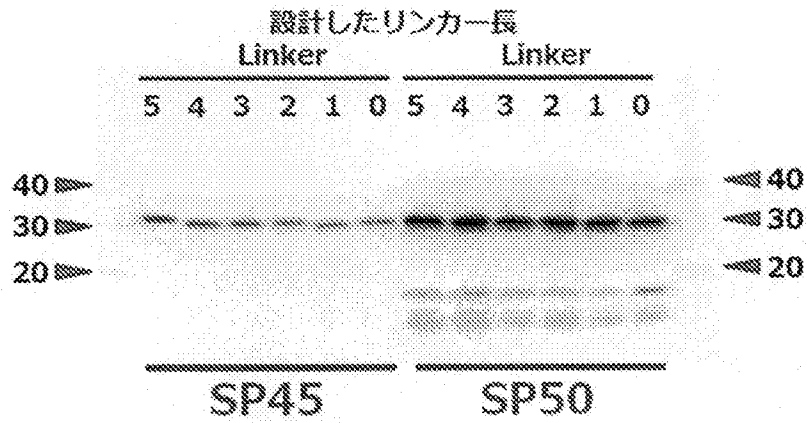


- | | |
|-----------|----------|
| 1: Marker | 7: SP55 |
| 2: SP7 | 8: SP58 |
| 3: SP45 | 9: SP64 |
| 4: | 10: SP66 |
| 5: SP50 | 11: SP67 |
| 6: SP52 | 12: SP68 |
| | 13: SP69 |

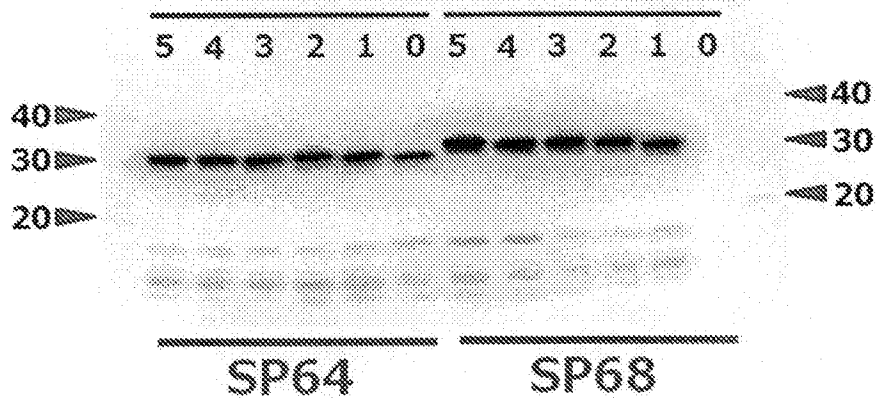
[図29]

ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pP30SPxLy-hCTLA-4scFv0
2株(FLAG-tag 付き)

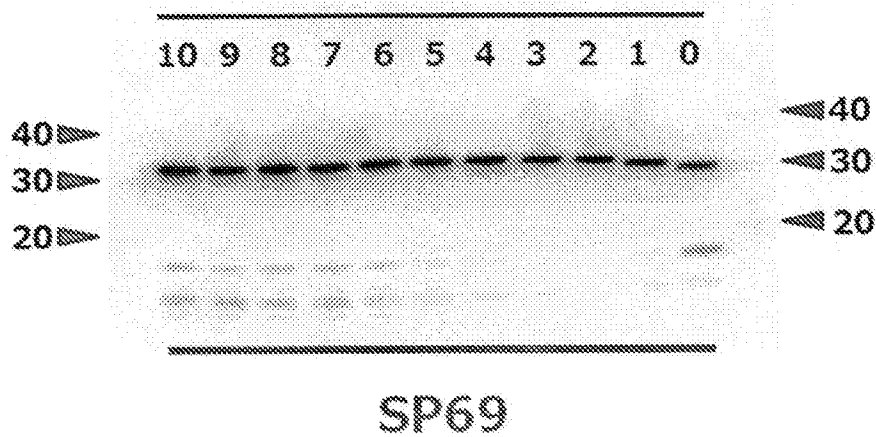
(a)



(b)



(c)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K35/74(2015.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n, C07K16/28(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K35/74, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/04, C12N1/21, C07K16/18, C07K16/28

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/093465 A1 (Anaeropharma Science Inc.), 04 August 2011 (04.08.2011), & US 2011/0189758 A1 & EP 2530150 A1	1-16
Y	WO 2011/093468 A1 (Anaeropharma Science Inc.), 04 August 2011 (04.08.2011), US 2011/0190472 A1	1-16
Y	WO 2014/010758 A1 (Teikyo Heisei University), 16 January 2014 (16.01.2014), (Family: none)	1-16
Y	JP 2004-531245 A (Societe des Produits Nestle S.A.), 14 October 2004 (14.10.2004), & US 2004/0126870 A1 & WO 2002/074798 A2 & EP 1227152 A1	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 June 2015 (25.06.15)

Date of mailing of the international search report
07 July 2015 (07.07.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002132

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GenBank Accession Number: EIJ27286, 04-MAY-2012, [retrieval date: 26 June 2015 (26.06.2015)], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIJ27286	1-16
Y	GenBank Accession Number: EIJ22210, 04-MAY-2012, [retrieval date: 26 June 2015 (26.06.2015)], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIJ22210	1-16
Y	GenBank Accession Number: ADQ02103, 31-JAN-2014, [retrieval date: 26 June 2015 (26.06.2015)], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADQ02103	1-16
Y	GenBank Accession Number: EIJ27376, 04-MAY-2012, [retrieval date: 26 June 2015 (26.06.2015)], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIJ27376	1-16
Y	GenBank Accession Number: BAJ72090, 29-JAN-2011, [retrieval date: 26 June 2015 (26.06.2015)], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAJ72090	1-16
Y	GenBank Accession Number: EPE38071, 17-JUN-2013, [retrieval date: 26 June 2015 (26.06.2015)], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EPE38071	1-16
Y	Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2013, vol.244, no.9, p.809-815	6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002132

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

DWPI(Thomson Innovation)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/74(2015.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P37/04(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n, C07K16/28(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09, A61K35/74, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/04, C12N1/21, C07K16/18, C07K16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq
DWPI (Thomson Innovation)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2011/093465 A1 (株式会社アネロファーマ・サイエンス) 2011.08.04, & US 2011/0189758 A1 & EP 2530150 A1	1-16
Y	WO 2011/093468 A1 (株式会社アネロファーマ・サイエンス) 2011.08.04, US 2011/0190472 A1	1-16
Y	WO 2014/010758 A1 (学校法人帝京平成大学) 2014.01.16, (ファミリーなし)	1-16

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 5 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 7 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

福岡 信子

4 N

3 5 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2004-531245 A (ソシエテ デ プロデュイ ネツスル ソシエ テ アノニム) 2004.10.14, & US 2004/0126870 A1 & WO 2002/074798 A2 & EP 1227152 A1	1-16
Y	GenBank Accession Number: EIJ27286, 04-MAY-2012, [検索日 : 2015 年 6 月 26 日], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIJ27286	1-16
Y	GenBank Accession Number: EIJ22210, 04-MAY-2012, [検索日 : 2015 年 6 月 26 日], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIJ22210	1-16
Y	GenBank Accession Number: ADQ02103, 31-JAN-2014, [検索日 : 2015 年 6 月 26 日], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADQ02103	1-16
Y	GenBank Accession Number: EIJ27376, 04-MAY-2012, [検索日 : 2015 年 6 月 26 日], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIJ27376	1-16
Y	GenBank Accession Number: BAJ72090, 29-JAN-2011, [検索日 : 2015 年 6 月 26 日], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAJ72090	1-16
Y	GenBank Accession Number: EPE38071, 17-JUN-2013, [検索日 : 2015 年 6 月 26 日], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EPE38071	1-16
Y	医学のあゆみ, 2013, vol.244, no.9, p.809-815	6, 7