

明 細 書

発明の名称： 共発現プラスミド

技術分野

[0001] 本発明は、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；分泌シグナル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；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；を順次含む分泌発現カセットを2種類含むことを特徴とする共発現プラスミドに関する。また、本発明は、上記共発現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や、該細菌を含む医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] 癌等の疾病に対して、これまで数多くの治療薬が提案されているが、いずれもその効果には限界が指摘されており、より高い効果が期待される治療薬や治療法の開発が望まれている。近年、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、全身投与では副作用が不可避な薬剤を、腫瘍局所に高濃度かつ効果的にデリバリーすることが可能な新たな技術として、その発展が期待されている。

[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、又はこれら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）が提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開WO2009/128272号パンフレット

特許文献2：国際公開WO2010/126073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

[0005] 上記文献において提案されているシグナル配列をコードするDNA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配列であり、より分泌効率に優れたシグナル配列として特定することが期待されているとともに、より治療効果の高い、異種タンパク質分泌発現プラスミドや、かかる分泌発現プラスミドで形質転換された嫌気性腸内細菌の開発が望まれている。

[0006] 本発明の課題は、固形腫瘍組織、虚血性疾患部位等の嫌気性部位において、より治療効果の高い嫌気性腸内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、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；分泌シグナル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；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；を順次含む分泌発現カセットを2種類含むことを特徴とする2種の異種ポリペプチドを共発現するプラスミドで形質転換したビフィドバクテリウム属細菌が、異種ポリペプチドの単独発現株と比較して、顕著に高い癌細胞増殖抑制活性を有することを確認し、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] ビフィドバクテリウム属細菌内で発現する、以下の(1)～(4)のDNAを順次含む分泌発現カセットを、2種類含むことを特徴とする共発現プラスミド。

(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) 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]記載の共発現プラスミド。

〔３〕 ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターが、P 3 0 プロモーター、P 5 4 プロモーター及びH u プロモーターから選択される１又は２のプロモーターであることを特徴とする上記〔１〕又は〔２〕記載の共発現プラスミド。

〔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が、H u ターミネーター及びT 2 ターミネーターから選択される１又は２のターミネーターであることを特徴とする上記〔１〕～〔３〕のいずれか記載の共発現プラスミド。

〔５〕 分泌シグナルペプチドが、以下のa) 又はb) のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記〔１〕～〔４〕のいずれか記載の共発現プラスミド。

a) 配列番号5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、及び7 7のいずれかに示されるアミノ酸配列；

b) 配列番号5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、及び7 7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；

〔６〕 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〕～〔５〕のいずれか記載の共発現プラスミド。

〔７〕 一本鎖抗体が、抗PD-1抗体であることを特徴とする上記〔６〕記載の共発現プラスミド。

〔８〕 一本鎖抗体が、抗CTLA-4抗体であることを特徴とする上記〔６〕記載の共発現プラスミド。

〔９〕 一本鎖抗体が、抗HER2抗体であることを特徴とする上記〔６〕記載の共発現プラスミド。

〔１０〕 異種ポリペプチドが、サイトカインであることを特徴とする上記〔１〕～〔５〕のいずれか記載の共発現プラスミド。

〔11〕 サイトカインが、 $\text{TNF-}\alpha$ であることを特徴とする上記〔10〕記載の共発現プラスミド。

〔12〕 サイトカインが、 $\text{IFN-}\gamma$ であることを特徴とする上記〔10〕記載の共発現プラスミド。

〔13〕 異種ポリペプチドが、抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体との組合せであることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれか記載の共発現プラスミド。

〔14〕 異種ポリペプチドが、 $\text{TNF-}\alpha$ と $\text{IFN-}\gamma$ との組合せであることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれか記載の共発現プラスミド。

〔15〕 異種ポリペプチドが、抗HER2抗体と $\text{IFN-}\gamma$ との組合せであることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれか記載の共発現プラスミド。

〔16〕 上記〔1〕～〔15〕のいずれか記載の共発現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。

〔17〕 ビフィドバクテリウム・ロンガムである上記〔16〕記載のビフィドバクテリウム属細菌。

〔18〕 上記〔16〕又は〔17〕記載のビフィドバクテリウム属細菌を含む医薬組成物。

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、同一プラスミド内で2種類併用することにより、効率よく2種の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2種類の異種ポリペプチドが抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体等の抗癌作用を有する抗体等である場合、2種の異種ポリペプチドの相乗効果により、かかるビフィドバクテリウム属細菌は抗癌剤として非常に有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] プラスミドpSP3B- $\text{TNF-}\alpha$ の構成を表す図である。

[図2]プラスミドpHG-2の構成を表す図である。

[図3]プラスミドpTNF11の構成を表す図である。

[図4] (a) はプラスミドp h l F N g 3 3の構成を、(b) はプラスミドp h l F N g 3 3 T Lの構成をそれぞれ表す図である。

[図5]AG8TL株培養上清粗精製物のKPL-1細胞に対する細胞増殖抑制活性を示すグラフである。

[図6]AG8TL株培養上清粗精製物のMIA PaCa-2細胞に対する細胞増殖抑制活性を示すグラフである。

[図7]AG8TL株の培養上清粗精製物の細胞増殖抑制活性の中和抗体添加による中和の効果を検討したグラフである。

[図8] (A) はプラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv03の構成を、(B) はpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02の構成を、(C) はpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAGの構成をそれぞれ表す図である。

[図9] (a) はプラスミドpPC1の構成を、(b) はプラスミドpCP1の構成をそれぞれ表す図である。

[図10] (A) は抗hPD-1 scFvの発現確認を、(B) は抗hCTLA-4 scFvの発現確認をそれぞれ示す図である。

[図11]ヒトPD-1固相化プレートへの抗hPD-1 scFv03の特異的結合を示すグラフである。

[図12]ヒトCTLA-4固相化プレートへの抗hCTLA-4 scFv02の特異的結合を示すグラフである。

[図13]ヒトPD-1に対するヒトPD-L1との結合反応における抗hPD-1 scFv03の競合的結合阻害を示すグラフである。

[図14]ヒトCTLA-4に対するヒトCD80との結合反応における抗hCTLA-4 scFv02の競合的結合阻害を示すグラフである。

[図15]ヒトCTLA-4に対するヒトCD86との結合反応における抗hCTLA-4 scFv02の競合的結合阻害を示すグラフである。

[図16] P C 1 株より精製した抗 h P D - 1 s c F v 0 3 のヒト P D - 1 過剰発現細胞への結合を示すグラフである。

[図17] P C 1 株より精製した抗 h C T L A - 4 s c F v 0 2 のヒト C T L A - 4 過剰発現細胞への結合を示すグラフである。

[図18] ウェスタン解析による、H G - 2 株における抗 H E R 2 s c F v 及び h I F N - γ の分泌確認を示す図である。

[図19] H G - 2 株培養上清濃縮物の抗 H E R 2 s c F v の H E R 2 陽性細胞増殖抑制活性を示すグラフである。

[図20] H G - 2 株培養上清濃縮物の H E R 2 陽性細胞に対する細胞増殖抑制活性を示すグラフである。

[図21] (A) は H G - 2 株のグラム染色図を示し、(B) は B E s h u t t l e 株のグラム染色図を示す。

[図22] (A) は H G - 2 株の抗 h I F N - γ 抗体による免疫組織染色図を示し、(B) は B E s h u t t l e 株の抗 h I F N - γ 抗体による免疫組織染色図を示す。

[図23] (A) は H G - 2 株の抗ヒスチジンタグ抗体による免疫組織染色図を示し、(B) は B E s h u t t l e 株の抗ヒスチジンタグ抗体による免疫組織染色図を示す。

[図24] 共発現プラスミド p P C 2 - p P C 8 の構成の概要を示す図である。

[図25] 共発現プラスミド p P C 2 - p P C 8 の構築方法の概要を示す図である。

[図26] 抗ヒト C T L A - 4 s c F v 0 2 発現プラスミドの構築方法の概要を示す図である。

[図27] p P 3 0 S P x L y - h C T L A - 4 s c F v 0 1 - H i s の構築方法の概要を示す図である。

[図28] p P 3 0 S P x L y - h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G (p C 1 F - p C 3 F) の構築方法の概要を示す図である。

[図29] 共発現プラスミド p P C 2 T L - p P C 8 T L の構成の概要を示す図

である。

[図30]共発現プラスミド p P C 2 T L - p P C 8 T L の構築方法の概要を示す図である。

[図31]ウェスタン解析による、各株における抗 h P D - 1 s c F v 0 3 - H i s (a) 及び抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G (b) の分泌確認を示す図である。

[図32]抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 単独発現株 (p C 1 T L B 、 p C 2 T L B 、 p C 3 T L B) の構築方法の概要を示す図である。

[図33] C 1 F 株、 C 2 F 株、 及び C 3 F 株由来 s c F v のヒト C T L A - 4 発現細胞への結合を、フローサイトメトリーを用いて解析した図である。

[図34] C 1 T L B 株、 C 2 T L B 株、 及び C 3 T L B 株由来 s c F v のヒト C T L A - 4 発現細胞への結合を、フローサイトメトリーを用いて解析した図である。

[図35] P 1 H 株、 P 2 H 株、 及び P 3 H 株由来 s c F v のヒト P D - 1 発現細胞への結合を、フローサイトメトリーを用いて解析した図である。

[図36] P 1 T L 株、 P 2 T L 株及び P 3 T L 株由来 s c F v のヒト P D - 1 発現細胞への結合を、フローサイトメトリーを用いて解析した図である。

[図37](a) 抗ヒト P D - 1 抗体 (E H 1 2 , 2 H 7) のヒト P D - 1 発現細胞への結合、 (b) 抗ヒト C T L A - 4 抗体 (L 3 D 1 0) のヒト C T L A - 4 発現細胞への結合、 (c) P C 4 由来 s c F v のヒト P D - 1 発現細胞への結合、 (d) P C 4 由来 s c F v のヒト C T L A - 4 発現細胞への結合を、フローサイトメトリーを用いて解析した図である。

[図38] P C 4 株より精製した h P D - 1 s c F v 0 3 - H i s と h P D - 1 の結合に対する h P D - L 1 による結合阻害活性を示すグラフである。

[図39] P C 4 株より精製した h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G と h C T L A - 4 の結合に対する h C D 8 0 による結合阻害活性を示すグラフである。

[図40] P C 4 株より精製した h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G と h C

T L A - 4 の結合に対する h C D 8 6 による結合阻害活性を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0011] 本発明の共発現プラスミドとしては、(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) 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；の各DNAを順次含む分泌発現カセットを2種類含み、かつ、ビフィドバクテリウム属細菌に形質転換された場合に、2種の異種ポリペプチドを共発現しうるプラスミド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] 本発明におけるプロモーター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、P30プロモーターDNA (J. Microbiology, 2012, 638-643) や、E l o n g a t i o n F a c t o r T u 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P54プロモーターDNA (J. Bacteriology, 2005, 5799-5808、J. Microbiology, 2012, 638-643) や、ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来G a p 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A m y B 遺伝子のプロモーターDNA (Biotechnol. Lett. 2006 28:163-168) や、16S rRNAプロモーターDNA (Biotechnol. Lett. 2008 30:165-172)、G A P D H (p r - B L 1363) 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. 2012Dec;22(12))

:1714-23)、p 9 1 9 遺伝子のプロモーター(rplM promoter)DNA (J Microbiol. 2012 Aug;50(4):638-43)、p 8 9 5 遺伝子のプロモーター(rplR promoter)DNA (J. Microbiology, 2012, 638-643)を例示することができる。また、上記異種ポリペプチドの分泌に優れた発現カセット毎に、プロモーターは異なることが好ましく、具体的には、HuプロモーターDNAとP 3 0プロモーターDNA、HuプロモーターDNAとP 5 4プロモーターDNA、P 5 4プロモーターDNAとP 3 0プロモーターDNAの組合せを挙げることができる。

[0013] 本発明における分泌シグナルペプチドとしては、a) 配列番号57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、及び77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SP7、SP45、SP50、SP52、SP55、SP58、SP64、SP66、SP67、SP68、及びSP69を挙げることができ、中でも、配列番号56に示されるSP7や配列番号66に示されるSP69を好適に挙げることができる。また、b) 配列番号57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、及び77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57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、及び77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56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、及び76のいずれかに示される塩基配列（配列表上段）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56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、及び76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、本発明における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0～30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

ができるが、具体的には、ビフィドバクテリウム・ロングム 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 0 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を挙げることができる。

- [0017] 1) 配列番号 79 に示されるリンカーペプチド配列 (SP7 の下流) ;
2) 配列番号 81 に示されるリンカーペプチド配列 (SP45 の下流) ;
3) 配列番号 83 に示されるリンカーペプチド配列 (SP50 の下流) ;
4) 配列番号 85 に示されるリンカーペプチド配列 (SP52 の下流) ;
5) 配列番号 87 に示されるリンカーペプチド配列 (SP55 の下流) ;
6) 配列番号 89 に示されるリンカーペプチド配列 (SP58 の下流) ;
7) 配列番号 91 に示されるリンカーペプチド配列 (SP64 の下流) ;
8) 配列番号 93 に示されるリンカーペプチド配列 (SP66 の下流) ;
9) 配列番号 95 に示されるリンカーペプチド配列 (SP67 の下流) ;
10) 配列番号 97 に示されるリンカーペプチド配列 (SP68 の下流) ;
11) 配列番号 99 に示されるリンカーペプチド配列 (SP69 の下流) ;
上記リンカーペプチドのアミノ酸残基数としては、0~30 残基を挙げることができ、0~25 残基が好ましく、0~20 残基がより好ましく、0~15 残基がさらに好ましく、0~10 残基がさらに好ましく、1~10 残基が特に好ましい。

- [0018] また、各配列の 0 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をコードする DNA 配列としては、以下の配列を例示することができる。

- 1) 配列番号 78 に示される DNA 配列 (SP7 の下流) ;
- 2) 配列番号 80 に示される DNA 配列 (SP45 の下流) ;
- 3) 配列番号 82 に示される DNA 配列 (SP50 の下流) ;
- 4) 配列番号 84 に示される DNA 配列 (SP52 の下流) ;
- 5) 配列番号 86 に示される DNA 配列 (SP55 の下流) ;
- 6) 配列番号 88 に示される DNA 配列 (SP58 の下流) ;

- 7) 配列番号90に示されるDNA配列 (SP64の下流) ;
- 8) 配列番号92に示されるDNA配列 (SP66の下流) ;
- 9) 配列番号94に示されるDNA配列 (SP67の下流) ;
- 10) 配列番号96に示されるDNA配列 (SP68の下流) ;
- 11) 配列番号98に示されるDNA配列 (SP69の下流) ;

[0019] 本発明の分泌シグナルペプチドーリンカーペプチド連結体をコードするDNA領域としては、上記各分泌シグナルペプチドをコードするDNAの5'末端から、各分泌シグナルペプチドの下流にある上記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、分泌シグナルペプチドをコードするDNAの3'末端と、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、SPxLy (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。具体的には、SP7L20、SP45L20、SP50L20、SP52L20、SP55L20、SP58L20、SP64L20、SP66L20、SP67L20、SP68L20、SP69L20等を挙げることができる。例えば、SP67L20は、配列番号73のアミノ酸配列に配列番号95の最初の20個のアミノ酸配列が結合した分泌シグナルペプチドーリンカーペプチド連結体を表す。中でも、SP50L1~L15、SP67L1~L15、SP68L1~L15、SP69L1~L15が好ましく、SP50L1~L10、SP67L1~L10、SP68L1~L10、SP69L1~L10が好ましく、SP50L5、SP67L1、SP67L10、SP68L1、SP69L1が特に好ましい。なお、上記L1~L15は、L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15を表し、L1~L10は、L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10を表す。

[0020] 上記異種ポリペプチドをコードするDNAとしては、本発明における分泌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 ）- 1α 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-2$ 、 $IL-3$ 、 $IL-4$ 、 $IL-6$ 、 $IL-7$ 、 $IL-10$ 、 $IL-12$ 、 $IL-13$ 、 $IL-15$ 、 $IL-18$ 、 $IL-21$ 、 $IL-22$ 、 $IL-27$ 、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、クリングル（ NH_4 ）等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や、ニトロアロマティック骨格を有するプロドラッグ抗癌剤のニトロ基を還元して活性化させる酵素であるニトロレダクターゼDNA等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も有利に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、ヒスチジン（ His ）タグ、FLAGタグ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。

[0021] 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、 $CD20$ 、 $CD33$ 、 $PD-1$ 、 $CTLA-4$ 、 $PD-L1$ 、 $CD80$ 、 $CD86$ 、 $LAG3$ 、 $TIM3$ 、 KIR を標的とする抗癌作用を有する抗体、 $OX40$ 、 $CD137$ 、 $ICOS$ 等のアゴニスト抗体や、 $HER2$ 、 $EGFR$ 、 CEA 、 HGF 、 $EpcAM$ （ $CD326$ ）、 $cMET$ 、 $CCR4$ に特異的に結合する抗体などを例示することができる。

[0022] 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、癌細胞が発現する $PD-L1$

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する。すなわち、抗CTLA-4抗体は、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ことで抗腫瘍免疫応答を増強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。さらに、抗HER-2 (human EGFR-related 2) 抗体は、癌遺伝子HER2/neu (c-erbB-2) の遺伝子産物であるHER2タンパク質に特異的に結合し、その増殖シグナルを抑制することにより、抗腫瘍効果を発揮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。

[0023] 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(scFv: single chain Fv)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もできる。

[0024] 本発明における上記異種ポリペプチドの2種の組合せとしては、ビフィドバクテリウム属細菌は生体に全身投与すると正常組織では増殖せず、固形腫瘍組織、虚血性疾患部位等の嫌気性部位に選択的に分布・生着するので、嫌気性疾患部位で局所的に共発現させた場合に相乗的な併用効果が期待される組合せが好ましく、具体的には、TNF- α とIFN- γ との組合せや、抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体との組合せや、抗HER2抗体とIFN- γ との組合せや、抗PD-1抗体とIFN- γ との組合せや、抗PD-1

抗体と抗HER2抗体との組合せや、抗PD-1抗体と抗EpCAM抗体との組合せを挙げることができる。

[0025] 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DNA；ビフィドバクテリウム・ロンガム由来の乳酸脱水素酵素遺伝子のターミネーターであるd0013ターミネーターDNA；ビフィドバクテリウム・アニマリス由来のT572ターミネーターDNA（J. Microbiol Biotechnol. 2012 Dec;22(12):1714-23）の他、人工的にデザインされたターミネーターであるBBa__B0015（T2）ターミネーター）DNA；を挙げることができる。また、上記異種ポリペプチドの分泌に優れた発現カセット毎に、ターミネーターは異なることが好ましく、具体的にはHuターミネーターDNAとd0013ターミネーターDNA、HuターミネーターDNAとT572ターミネーターDNA、HuターミネーターDNAとT2ターミネーターDNA、d0013ターミネーターDNAとT572ターミネーターDNA、d0013ターミネーターDNAとT2ターミネーターDNA、T572ターミネーターDNAとT2ターミネーターDNAとの組合せ等を挙げることができる。

[0026] 本発明における分泌発現カセット、好ましくはリンカーペプチドをコードするDNAを含む分泌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57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、及び77のいずれかに示されるアミノ酸配列；

b）配列番号57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、及び77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を順次含むように連結する方法を例示することができ、本発明における分泌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。

[0027] 本発明の分泌発現カセットを2種類含む共発現プラスミドを作製するために用いることができるプラスミドベクターとしては、本発明における発現カセットを2種類挿入することができ、ビフィドバクテリウム属細菌に形質転換された場合に2種の異種ポリペプチドを分泌発現できるプラスミドベクターであれば特に制限されず、ビフィドバクテリウム属細菌以外の菌、例えば大腸菌においても機能するpUCori等の複製開始点をさらに有するシャトルプラスミドベクターを有利に用いることもできる。

[0028] 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を有するプラスミドベクターの具体例としては、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)、pFI2576 (J Microbiol Biotechnol. 2009 Apr;19(4):403-8)、pCIBAO (Appl Environ Microbiol. 2007 Dec;73(24):7858-66)、pBC1 (Plasmid. 2007 Mar;57(2):165-74)、pDOJH10S (Ap

pl Environ Microbiol. 2006 Jan;72(1):527-35)、P K J 5 O (Microbiology 1999 Mar;145(Pt):585-92) を例示することができ、複製ユニットとしては、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。ビフィドバクテリウム属細菌以外の菌、例えば大腸菌でそれぞれ機能する p U C o r i 等の複製開始点をさらに有するシャトルプラスミドベクターを用いることもできる。

[0029] また、上記プラスミドには、薬剤耐性等のマーカージ遺伝子を含めることもできる。かかる薬剤耐性マーカージ遺伝子としては、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、アンピシリン等の各耐性遺伝子を例示することができる。

[0030] 本発明におけるプラスミドを、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等の公知の遺伝子導入方法を挙げることができる。

[0031] 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、又は寄託機関等から容易に入手することができる。

[0032] 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る、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1-53-8W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1-10-5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。

[0033] 本発明のプラスミドや形質転換ビフィドバクテリウム属細菌の作製は、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] 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2種の異種ポリペプチドを発現することができる。

[0035] 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、好ましくは固形腫瘍の治療に有効な医薬組成物、とりわけ抗癌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、好ましくは抗癌作用を有するサイトカイン、抗体等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。

[0036] 本発明の医薬組成物の投与対象は、哺乳類、好ましくはヒトであり、本発明の医薬組成物の適用対象としては、大腸癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、膵癌、膵島細胞癌、絨毛癌、結腸癌、腎細胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、精巣癌、前立腺癌、睾丸癌、卵巣癌、子宮癌、絨毛癌、甲状腺癌、扁平上皮癌、皮膚癌、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。

[0037] 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して凍結製剤とするか、又は凍結乾燥して凍結乾燥製剤と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。

[0038] 本発明の医薬組成物の投与量は、疾患部位においてビフィドバクテリウム属細菌が生育でき、且つ、有効治療量のサイトカイン、活性抗体等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。

[0039] 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

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 ～数日間連続して投与する。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] [実施例 1]

[ヒト T N F - α 及びヒト I F N - γ 共発現ビフィドバクテリウム属細菌 A G 8 T L 株の作製]

(概要)

ヒト T N F - α を分泌する発現カセット (ヒト T N F - α 分泌発現カセット) と、ヒト I F N - γ を分泌する発現カセット (ヒト I F N - γ 分泌発現カセット) とを含み、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、共発現プラスミド p A G 8 T L を作製した。かかる p A G 8 T L 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法により行い、ヒト T N F - α 及びヒト I F N - γ 共発現ビフィドバクテリウム属細菌 A G 8 T L 株を取得した。実施例 1 ～3 におい

て使用したプライマーを以下の表 1 に示す。

[0043] [表1]

プライマー名	DNA 配列 (5'→3')	配列番号
GA1_primer	gagcagaaggTCACTGGGAGGCGCGACGGCCAC	配列番号 18
GA2_primer	AGTGAccttctgctcgtagcg	配列番号 19
GA5_primer_rev	ggtatgtaggcggtgctacag	配列番号 20
GA6_primer	caccgcctacatacctcgct	配列番号 21
GA100_primer	cggtgGTGCGCTCCTCCTCCCGTAC	配列番号 22
GA101_primer	TCACAGGGCGATGATGCC	配列番号 23
GA103_primer	AGGAGCGCACcaccgaactgccttcgg	配列番号 24
GA104_primer	ATCATCGCCCTGTGAAACCGCTTCTCATTTCATTGCG	配列番号 25
GA113_primer	CGGTGCACACTAGTctctccaggacctc	配列番号 26
GA116_primer	gACTAGTGTGCACCGAATCGCGCTG	配列番号 27
IFNG1_primer	gaaggatgctttATGCAGGACCCGTACGTCAAGG	配列番号 28
IFNG2_primer	CATCATCACCACCACTGAccttctgctcgtagcg	配列番号 29
IFNG3_primer	GTGGTGGTGATGATGGTGCTGGGAGGCGCGACGGCC	配列番号 30
hIFNG4_primer	caggaccgtagctcAAGG	配列番号 31
SP69-ins_F1_primer	caagaaggatgctttATGAATTATTTACGACAAAAAATTTTCGG	配列番号 32
SP69-ins_R2_primer	gacgtacgggtcctgACCGCTATCAGTCGTGGTGTAAC	配列番号 33
pCDshuttle_R1_primer	cataaagcatcctcttgggtcag	配列番号 34
Hu-mCCL21-vecR1_primer	AAAGCATCCTTCTTGGGTCAGG	配列番号 35

[0044] (ヒトTNF- α 分泌発現カセットの構成)

ヒトTNF- α 分泌発現カセットとして、(1) P30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) ヒトTNF- α タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNA、及び(4) d0013ターミネーターDNAを、(1)を上流(5'末端)側として(4)を下流(3'末端)側として、(1)～(4)のDNAを順次含むカセットを作製した。

[0045] (ヒトIFN- γ 分泌発現カセットの構成)

ヒトIFN- γ 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SP69L20をコードするDNA、(3) ヒトIFN- γ タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNA

、及び(4)HuターミネーターDNA(ビフィドバクテリウム・ロンガム由来)を、(1)を上流(5'末端)側として(4)を下流(3'末端)側として、(1)～(4)のDNAを順次含むカセットを作製した。

[0046] (プラスミドpAG8TLの作製)

プラスミドpAG8TLの作製にあたり、まず、プラスミドpAG8を作製した。

[0047] (プラスミドpAG8の作製)

(hTNF- α インサート断片の調製)

国際公開2011/093465号パンフレットに記載されているプラスミドpSP3B-TNF α (図1参照)(1ng)を鋳型として、上記表1記載のGA100__primer(フォワード)及びGA101__primer(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15bpが重複するように設計した。各プライマー濃度を0.2 μ M、反応容量20 μ Lとして、PrimeSTAR HS(Premix)キット(タカラバイオ株式会社製)(以下、「STAR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、75℃にて40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、約0.5kbpのh(ヒト)TNF- α インサート断片増幅産物を調製した。

[0048] (ヒトIFN- γ タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAを含むベクター断片の調製)

プラスミドpHG-2(図2)の直鎖化断片(配列番号1)を鋳型として、表1記載のGA104__primer(フォワード)及びGA103__primer(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15bpが重複するように設計した。各プライマー濃度を0.2 μ M、反応容量20 μ Lとして、STAR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、75℃にて5分を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、約5 k b p の5' -Huプロモーター-SP69L20-ヒトIFN-γタンパク質-Hisタグ-Huターミネーター-pTB rep unit-SPCMr-pUCori-P30プロモーター-SP7L20-3' ベクター断片増幅産物を調製した。

[0049] 上記プラスミドpHG-2の直鎖化断片は、配列番号1の第1番から第4975番までの塩基配列において下記のとおり構成される。

d0013ターミネーター：配列番号1の第16番から第129番までの塩基配列

Huプロモーター：配列番号1の第136番から第496番までの塩基配列

SP69L20：配列番号1の第497番から第646番までの塩基配列

ヒトIFN-γタンパク質：配列番号1の第647番から第1075番までの塩基配列

Hisタグ：配列番号1の第1076番から第1093番までの塩基配列

Huターミネーター：配列番号1の第1097番から第1210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1の第1217番から第2812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1の第2819番から第3897番までの塩基配列

大腸菌複製起点、pUCori：配列番号1の第3904番から第4571番までの塩基配列

P30プロモーター：配列番号1の第4572番から第4806番までの塩基配列

SP7L20：配列番号1の第4807番から第4965番までの塩基配列。

[0050] (インフュージョン反応1)

上記で調製したベクター断片増幅産物及びインサート断片増幅産物を *In-Fusion* (登録商標) *HD Cloning* キット (タカラバイオ株式会社製) (以下、「HDキット」) を用いて連結した。すなわち、マイクロチューブに、上記ベクター断片増幅産物 50 ng とインサート断片増幅産物 13 ng とを添加し、キット内の 5×*In-Fusion HD Enzyme premix* 2 μL、*Cloning Enhancer* 1 μL をさらに添加し、0.1×TEバッファー (1 mM *Tris-HCl*、0.1 mM *EDTA*、pH 7.5) にて反応液容量を 10 μL 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、インフュージョン反応液 1 を調製した。

[0051] (大腸菌の形質転換及びプラスミド pAG8 の DNA 配列確認)

1 μL の上記インフュージョン反応液 1 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 μg/mL スペクチノマイシン含有 LB 寒天培地に塗布し、37℃ にて一晩振とう培養した。上記寒天培地上に形成された大腸菌コロニーを 75 μg/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* キット (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上記ヒト *TNF-α* 分泌発現カセット及びヒト *IFN-γ* 分泌発現カセットを含む領域 1 (5′-P30 プロモーター-S P7 L20-ヒト *TNF-α* タンパク質-d0013 ターミネーター-Hu プロモーター-S P69 L20-ヒト *IFN-γ* タンパク質-His タグ-Hu ターミネーター-3′) の配列を決定するため、*Big Dye* (登録商標) *Terminator v3.1 Cycle Sequencing* キット (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 pAG8 と名付けた。pAG8 のヒト *TNF-α* 分泌

発現カセット及びヒトIFN- γ 分泌発現カセットを含む領域1の配列を配列番号2に示す。

[0052] (pAG8TL株の調製)

上記pAG8を鋳型として、表1記載のGA2__primer (フォワード) 及びGA6__primer (リバース) のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、65℃にて5秒、75℃にて3分15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ほかは、上記(プラスミドpAG8の作製)と同様の手順にて、約3.3 kbpのPCR増幅産物Aを調製した。

[0053] 上記pAG8を鋳型として、表1記載のGA5__primer__rev (フォワード) 及びGA1__primer (リバース) のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、65℃にて5秒、75℃にて2分10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ほかは、上記(プラスミドpAG8の作製)と同様の手順にて、約2.2 kbpのPCR増幅産物Bを調製した。

[0054] (インフュージョン反応2)

PCR増幅産物Aを50 ng、PCR増幅産物Bを33 ng使用したほかは、上記(インフュージョン反応1)と同様の手順にて、上記PCR増幅産物AとPCR増幅産物Bとを連結し、インフュージョン反応液2を調製した。

[0055] (大腸菌の形質転換及びプラスミドpAG8TLのDNAの配列確認)

上記(大腸菌の形質転換及びプラスミドpAG8のDNA配列確認)と同様の手順にて上記インフュージョン反応液2を用いて上記大腸菌HST16 CRコンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおけるヒトTNF- α 分泌発現カセット及びヒトIFN- γ 分泌発現カセットを含む領域2 (5' - P30プロモーター - SP7L20 - ヒトTNF- α タンパク質 - d0013ターミネーター - H

uプロモーター—SP69L20—ヒトIFN- γ タンパク質—Huターミネーター—3') の配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミドをpAG8TLと名付けた。pAG8TLのヒトTNF- α 分泌発現カセット及びヒトIFN- γ 分泌発現カセットを含む領域2の配列を配列番号3に示す。

[0056] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1)

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミドpAG8TL (250 ng) 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。この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°Cに設定したインキュベーターにて3時間保温した。

[0057] 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°Cに設定したインキュベーターにて2日間培養した。

[0058] 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形質転換体ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pAG8TL株 (以下、AG8TL株という) とした。

[0059] [実施例2]

[ヒトTNF- α 単独発現株TNF11株の作製]

共発現ビフィドバクテリウム属細菌AG8TL株に対応するヒトTNF- α 単独発現株TNF11株を以下のとおり作製した。

[0060] pAG12を鋳型として、表1記載のGA113__primer (フォワード) 及びGA6__primer (リバーズ) のプライマーセットを用いて

PCR増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、65℃にて5秒、75℃にて3分50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ほかは、上記（プラスミドpAG8の作製）と同様の手順にて、約3.2kbpのPCR増幅産物60を調製した。

[0061] pAG12を鋳型として、表1記載のGA5__primer__rev（フォワード）及びGA116__primer（リバーズ）のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、65℃にて5秒、72℃にて1分15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ほかは、上記（プラスミドpAG8の作製）と同様の手順にて、約1.2kbpのPCR増幅産物61を調製した。なお、鋳型に用いたプラスミドpAG12は、pAG8TLのhIFN- γ のSP/LinkerがSP69L20からSP56L20に置換されたものである。

[0062] （インフュージョン反応3）

PCR増幅産物60を50ng、PCR増幅産物61を20ng使用したほかは、上記（インフュージョン反応1）と同様の手順にて、上記PCR増幅産物60とPCR増幅産物61とを連結し、インフュージョン反応液3を調製した。

[0063] （大腸菌の形質転換及びプラスミドpTNF11のDNAの配列確認）

上記（大腸菌の形質転換及びプラスミドpAG8のDNA配列確認）と同様の手順にて上記インフュージョン反応液3を用いて上記大腸菌HST16CRコンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおけるヒトTNF- α 分泌発現カセット（5'-P30プロモーター-SP7L20-ヒトTNF- α タンパク質-d0013ターミネーター）の配列決定を行った。抽出したプラスミドをpTNF11と名付けた。pTNF11のプラスミド構成を図3に示す。

[0064] （ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換2）

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミド pTNF11 (500 ng) を用いたほかは、上記 (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1) と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pTNF11株 (以下、TNF11株という) とした。

[0065] [実施例3]

[ヒトIFN- γ 単独発現株hIFNg33TL株の作製]

共発現ビフィドバクテリウム属細菌AG8TL株に対応するヒトIFN- γ 単独発現株hIFNg33TL株を、以下のとおり作製した。

[0066] 共発現AG8TL株に対応するヒトIFN- γ 単独発現株hIFNg33TL株を作製した。プラスミドphIFNg33TLの作製にあたり、まず、プラスミドphIFNg33を作製した。

[0067] (hIFN- γ 遺伝子の人工DNA合成)

hIFN- γ 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合成を依頼した。hIFN- γ 配列は、Accession#CAA31639の成熟タンパク質のアミノ酸配列 (Gln24-Gln166) に基づき、コドンビフィドバクテリウム・ロンガムNCC2705に最適化した (納品プラスミド: pUC57-hIFNg)。配列番号4に人工合成したhIFN- γ のDNA配列を示した。

[0068] pBEShuttle (配列番号5) を鋳型として、表1記載のpCDShuttle__R1__primer (リバーズ) 及びIFNG2__primer (フォワード) のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、55℃にて5秒、75℃にて3分50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ほかは、上記 (プラスミドpAG8の作製) と同様の手順にて、約3.9kbpのPCR増幅産物vector1を調製した。

[0069] 上記pUC57-hIFNg (hIFNg in pUC57) を鋳型とし

て、表1記載の I F N G 1 __ p r i m e r (フォワード) 及び I F N G 3 __ p r i m e r (リバー) のプライマーセットを用いて P C R 増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、55℃にて5秒、75℃にて30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ほかは、上記(プラスミド p A G 8 の作製)と同様の手順にて、約0.5 k b p の P C R 増幅産物 i n s e r t 1 を調製した。

[0070] (インフュージョン反応4)

P C R 増幅産物 v e c t o r 1 を 50 n g 、 P C R 増幅産物 i n s e r t 1 を 12 n g 使用したほかは、上記(インフュージョン反応1)と同様の手順にて、上記 P C R 増幅産物 v e c t o r 1 と P C R 増幅産物 i n s e r t 1 とを連結し、インフュージョン反応液4を調製した。

[0071] (大腸菌の形質転換及び非分泌型プラスミド p h I F N g の D N A の配列確認)

上記(大腸菌の形質転換及びプラスミド p A G 8 の D N A 配列確認)と同様の手順にて上記インフュージョン反応液4 (2 μ L) を用いて大腸菌 H S T 16 C R の形質転換を行い、組換え大腸菌からのプラスミド抽出、抽出したプラスミド D N A の全長配列決定を行った。抽出したプラスミドを p h I F N g (非分泌型プラスミド) と名付けた。

[0072] (分泌型プラスミド h I F N g 33 の作製)

上記 p h I F N g を鋳型として、表1記載の h I F N G 4 __ p r i m e r (フォワード) 及び H u - m C C L 21 - v e c R 1 __ p r i m e r (リバー) のプライマーセットを用いて P C R 増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、55℃にて5秒、75℃にて4分20秒を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃にて30秒伸長反応を行ったほかは、上記(プラスミド p A G 8 の作製)と同様の手順にて、約4.3 k b p の P C R 増幅産物 v e c t o r 2 を調製した。

[0073] ビフィドバクテリウム・ロンガム 105 - A 株 g e n o m i c D N A を鋳型として、表1記載の S P 69 - i n s __ F 1 __ p r i m e r (フォワード

）及びSP69-ins_R2__primer（リバー）のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、55℃にて5秒、75℃にて15秒を1サイクルとして、30サイクルを行った後、72℃にて30秒伸長反応を行ったほかは、上記（プラスミドpAG8の作製）と同様の手順にて、約0.2kbpのPCR増幅産物insert2を調製した。

[0074]（インフュージョン反応5）

PCR増幅産物vector2を50ng、PCR増幅産物insert2を5ng使用したほかは、上記（インフュージョン反応1）と同様の手順にて、上記PCR増幅産物vector2とPCR増幅産物insert2とを連結し、インフュージョン反応液5を調製した。

[0075]（大腸菌の形質転換及びプラスミドpHIFNg33のDNAの配列確認）

上記（大腸菌の形質転換及びプラスミドpAG8のDNA配列確認）と同様の手順にて上記インフュージョン反応液3（2μL）を用いて上記大腸菌HST16CRコンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおけるヒトIFN-γ分泌発現カセット（5'-Huプロモーター-SP69L20-ヒトIFN-γタンパク質-Hisタグ-Huターミネーター-3'）の配列決定を行った。抽出したプラスミドをpHIFNg33と名付けた。pHIFNg33のプラスミド構成を図4（a）に示す。

[0076]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換3）

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミドpHIFNg33（605ng）を用いたことのほかは、上記（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHIFNg33株（HIFNg33株という）とした。

[0077] 上記pHIFNg33を鋳型として、表1記載のGA5__primer__

rev (フォワード) 及び GA1__primer (リバーズ) のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、65℃にて5秒、75℃にて1分20秒を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃にて30秒伸長反応を行ったほかは、上記(プラスミド pAG8 の作製)と同様の手順にて、約1.2 kbp の PCR 増幅産物 C を調製した。

[0078] 上記 phIFNg33 を鋳型として、表1記載の GA2__primer (フォワード) 及び GA6__primer (リバーズ) のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。増幅のプログラムとして、98℃にて10秒、65℃にて5秒、75℃にて3分20秒を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃にて30秒伸長反応を行ったほかは、上記(プラスミド pAG8 の作製)と同様の手順にて、約3.3 kbp の PCR 増幅産物 D を調製した。

[0079] (インフュージョン反応6)

PCR 増幅産物 C を 18 ng、PCR 増幅産物 D を 50 ng 使用したほかは、上記(インフュージョン反応1)と同様の手順にて、上記 PCR 増幅産物 C と PCR 増幅産物 D とを連結し、インフュージョン反応液6を調製した。

[0080] (大腸菌の形質転換及びプラスミド phIFNg33TL の DNA の配列確認)

上記(大腸菌の形質転換及びプラスミド pAG8 の DNA 配列確認)と同様の手順にて上記インフュージョン反応液6を用いて上記大腸菌 HST16 CR コンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおけるヒト IFN- γ 分泌発現カセット(5'-Huプロモーター-SP69L20-ヒト IFN- γ タンパク質-Huターミネーター-3')の配列決定を行った。抽出したプラスミドを phIFNg33TL と名付けた。phIFNg33TL のプラスミド構成を図4(b)に示す。

[0081] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換4)

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミド p h I F N g 3 3 T L (4 3 5 n g) を用いたことのほかは、上記 (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1) と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 - A 株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 - A / p h I F N g 3 3 T L 株 (h I F N g 3 3 T L 株という) とした。

[0082] [実施例4]

[A G 8 T L 株における h T N F - α 及び h I F N - γ の分泌確認]

A G 8 T L 株の培養上清中のヒト T N F - α タンパク質とヒト I F N - γ タンパク質の分泌の有無を E L I S A 法にて以下のとおり確認した。陰性コントロール株としてビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 A / p B E s h u t t l e 株 (以下、B E s h u t t l e 株という) についても同様に実施した。

[0083] (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養)

上記 A G 8 T L 株、T N F 1 1 株、及び h I F N g 3 3 T L 株、B E s h u t t l e 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 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 M R S (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、D M E M (C a t N o . 1 1 8 8 5 - 0 8 4 : ライフテクノロジーズ社製) : M R S 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。

[0084] (培養上清の回収及び E L I S A)

上記嫌気培養後の各株の培養液を遠心分離後、各株の培養上清を回収し、E L I S A に供した。同様の操作を B E s h u t t l e 株についても行い、

陰性コントロールとした。TNF- α 測定用のELISAキットとしては、Quantikine Human TNF α /TNFSF1A Immunoassay (R&D systems社製)を、hIFN- γ 測定用のELISAキットとしては、Quantikine Human IFN- γ Immunoassay (R&D systems社製)を用いた。ELISAの操作は、各ELISAキットの製品マニュアルにしたがって実施した。結果を以下の表2に示す。

[0085] [表2]

(ng/mL培養上清)		
組換えビフィドバクテリウム属細菌株	hTNF- α 分泌量	hIFN- γ 分泌量
AG8TL	501	376
TNF11	515	N. D.
hIFNg33TL	N. D.	346
BEshuttle	N. D.	N. D.

[0086] (結果)

表2から明らかとなおり、AG8TL株の培養上清中には、hTNF- α タンパク質とhIFN- γ タンパク質との両方がみとめられた。陽性対照の単独発現株であるTNF11株培養上清中にはhTNF- α タンパク質がみとめられ、hIFNg33TL株の培養上清中にはヒトIFN- γ タンパク質がみとめられた。

[0087] [実施例5]

[AG8TL株のKPL-1細胞増殖抑制活性の検討]

(培養上清粗精製物の調製)

実施例4の(組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養)と(培養上清の回収及びELISA)と同様の手順にて調製した上記AG8TL株、TNF11株、及びhIFNg33TL株の培養上清各7mLをアミコンウルトラ-4、MWCO:10k(ミリポア社製)を用いて濃縮後、PBSバッファ

ー (pH 7.4) にて3回洗浄、濃縮し、0.5 mL ずつ各株の培養上清粗精製物として調製した。陰性コントロール株としてビフィドバクテリウム・ロンガム 105A / pBEShuttle株の培養上清粗精製物についても同様に調製した。上記各株の培養上清粗精製物を細胞増殖抑制活性の測定に使用した。hTNF- α 及び hIFN- γ の濃度は、上記 TNF- α 測定用の ELISA キットと上記 hIFN- γ 測定用の ELISA キットを用いて見積もった。

[0088] (KPL-1 細胞の調製及び被験サンプルの添加)

ヒト乳癌細胞株である KPL-1 細胞 (川崎医科大学紅林淳一教授より供与) を使用して、細胞増殖抑制活性の測定を行った。KPL-1 細胞を 100 mm ペトリディッシュにて 10% ウシ胎児血清 (EQUITECH-BIO 社製) / ダルベッコ改変イーグル培地 (高グルコース) (シグマアルドリッチ社製) で培養した。かかる試験培地を除去後、PBS (-) (和光純薬工業株式会社製) にて洗浄し、0.25% Trypsin-EDTA (ライフテクノロジーズ社製) を添加して細胞を回収し、遠心分離後、上清を除去し、上記試験培地にて 6×10^3 cells/mL になるように細胞を懸濁し、細胞懸濁液を調製した。

[0089] 上記細胞懸濁液を 96 穴プレートの各ウェルに 0.1 mL ずつ分注し、37°C に設定した CO₂ インキュベーターにて培養を開始した。翌日、上記試験培地にさらに AG8TL 株培養上清粗精製物 (20 ng/mL hIFN- γ 、51.1 ng/mL hTNF- α を含む) を添加した培地と交換し、刺激を開始した。AG8TL 株の濃度と同じ濃度となるように TNF11 株又は hIFNg33TL 株の培養上清粗精製物を添加した各培地を陽性対照として同様に処理した。刺激開始から 4 日後に培地を除去し、10 分の 1 量の Cell Counting キット-8 (同仁化学研究所製) を添加した培地と交換して、さらに 3 時間反応させた。反応後、マルチモードプレートリーダー (DS ファーマバイオメディカル社製) にて 450 nm 及び 630 nm (参照波長) での吸光度を測定した。ブランクは、培地と Cell Count

i n g キットー 8 のみを添加した細胞非添加ウェルの吸光度を差し引いたものとして算出した。なお、上記各培養上清粗精製物を添加せずに K P L - 1 細胞の培養を続けた試験培地における値を無処理区の吸光度として 1 0 0 % とし、各 K P L - 1 細胞の増殖率を算出した。結果を図 5 に示す。

[0090] (結果)

図 5 から明らかなとおり、A G 8 T L 株分泌物は、T N F 1 1 株単独又は h I F N g 3 3 T L 株単独の分泌物に比べ、K P L - 1 細胞の増殖を顕著に抑制した。すなわち、分泌物が h T N F - α である T N F 1 1 株において増殖率は 8 9 . 9 % を示し、分泌物が h I F N - γ である h I F N g 3 3 T L 株において増殖率は 8 3 % を示したのに対し、分泌物が h T N F - α と h I F N - γ である A G 8 T L 株において増殖率は 3 5 . 5 % を示し、A G 8 T L 株がヒト乳癌細胞株に対して強い増殖抑制効果が有することが確認された。かかる結果は、h T N F - α 分泌物と h I F N - γ 分泌物との併用効果によるものと考えられる。

[0091] [実施例 6]

[A G 8 T L 株の M I A P a C a - 2 細胞増殖抑制活性の検討]

K P L - 1 細胞の代わりに、ヒト膵臓癌由来細胞 M I A P a C a - 2 細胞 (独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより入手) を用いた場合は、実施例 5 と同様の手順にて M I A P a C a - 2 細胞に対する増殖抑制活性を検討した。ただし、M I A P a C a - 2 細胞の 9 6 穴プレートへ分注した細胞懸濁液の播種濃度は、 1×10^4 c e l l s / m L とした。結果を図 6 に示す。

[0092] (結果)

図 6 から明らかなとおり、A G 8 T L 株分泌物は、T N F 1 1 株単独又は h I F N g 3 3 T L 株単独の分泌物に比べ、M I A P a C a - 2 細胞の増殖を顕著に抑制した。すなわち、分泌物が h T N F - α である T N F 1 1 株において増殖率は 5 1 . 6 % を示し、分泌物が h I F N - γ である h I F N g 3 3 T L 株において増殖率が 7 5 . 4 % を示したのに対し、分泌物が h T N

F- α とhIFN- γ であるAG8TL株において増殖率は24.2%を示し、AG8TL株がヒト膵臓癌細胞株に対して強い増殖抑制効果が有することが確認された。かかる結果は、hTNF- α 分泌物とhIFN- γ 分泌物との併用効果によるものと考えられる。

[0093] [実施例7]

[AG8TL株の増殖抑制活性の中和抗体による特異性検討]

AG8TL株の培養上清粗精製物の細胞増殖抑制活性が、hTNF- α 及びhIFN- γ が分泌されたことによるものであることを確認するため、中和抗体であるHumanIFN- γ Antibody及びHumanTNF- α Antibody（共にR&Dsystems社製）を用いた検討を以下のとおり行った。

[0094] 実施例6と同様の手順にて、96穴プレートにMIA PaCa-2細胞を播種し、その翌日にAG8TL株、TNF11株、hIFNg33TL株、Beshuttle株（陰性対照）のいずれかの培養上清粗精製物と、以下の表3に示す抗体との組合せを添加した培地と交換した。培地への添加物は以下の表3に示す。実施例5と同様の手順にて、細胞増殖率を算出した。結果を図7に示す。

[0095]

[表3]

培地	培養上清粗精製物	分泌物	抗体
1)	AG8TL株	hIFN- γ (20 ng/mL) hTNF- α (51.1 ng/mL)	
2)	AG8TL株	hIFN- γ (20 ng/mL) hTNF- α (51.1 ng/mL)	抗hTNF- α 抗体 (6 μ g/mL) 抗hIFN- γ 抗体 (1 μ g/mL)
3)	AG8TL株	hIFN- γ (20 ng/mL) hTNF- α (51.1 ng/mL)	抗hTNF- α 抗体 (6 μ g/mL)
4)	AG8TL株	hIFN- γ (20 ng/mL) hTNF- α (51.1 ng/mL)	抗hIFN- γ 抗体 (1 μ g/mL)
5)	TNF11株	hTNF- α (51.1 ng/mL)	
6)	hIFNg33TL株	hIFN- γ (20 ng/mL)	
7)	BEshuttle株		
8)	BEshuttle株		抗hTNF- α 抗体 (6 μ g/mL) 抗hIFN- γ 抗体 (1 μ g/mL)

[0096] (結果)

図7からも明らかなとおり、AG8TL株培養上清粗精製物添加時のM1A PaCa-2細胞増殖率は15.3%を示したが、抗hIFN- γ 抗体単独添加時、抗hTNF- α 抗体単独添加時の細胞増殖率は、それぞれ31.8%、44.4%と増加した。抗hIFN- γ 抗体及び抗hTNF- α 抗体の両抗体添加時の細胞増殖率は74.1%とさらに増加した。これは、AG8TL株の分泌したhTNF- α 及びhIFN- γ の生物活性が抗体により

中和された結果であり、M I A P a C a - 2 細胞増殖抑制は、A G 8 T L 株の分泌する h T N F - α 及び h I F N - γ によるものであると考えられる。

[0097] [実施例 8]

[抗 h P D - 1 s c F v 0 3 及び抗 h C T L A - 4 s c F v 0 2 共発現ビフィドバクテリウム属細菌 P C 1 株及び C P 1 株の作製]

(概要)

抗 h P D - 1 s c F v 0 3 を分泌する発現カセット（抗ヒト P D - 1 s c F v 0 3 分泌発現カセット）と、抗 h C T L A - 4 s c F v 0 2 F L A G を分泌する発現カセット（抗ヒト C T L A - 4 s c F v 0 2 F L A G 分泌発現カセット）とを含み、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、共発現プラスミド p P C 1 及び p C P 1 を作製した。かかる p P C 1 と p C P 1 とを用いてビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 - A 株の形質転換をエレクトロポレーション法により行い、抗 h P D - 1 s c F v 0 3 及び抗 h C T L A - 4 s c F v 0 2 共発現ビフィドバクテリウム属細菌 P C 1 株と C P 1 株とを取得した。実施例 8 において使用したプライマーを以下の表 4 に示す。

[0098]

[表4]

プライマー名	DNA 配列 (5'→3')	配列番号
Ins-hPD-1 scFv03-F1	CAGGTCCAGCTGGTCGAATCGGGCGGCGGC	配列番号 36
Ins-hPD-1 scFv03-R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGGTGATGATGGTGCTT	配列番号 37
TGA-Hu-Terminator-F	TGACCTTCTGCTCGTAGCGATTAC	配列番号 38
vec-SP7L20-R1	GACCAGCTGGACCTGCACCGAACTCGCCTTCGGGAA	配列番号 39
Ins-hCTLA-4 scFv02-F1	CAGGTCCAGCTGGTCGAATCGGGCGGCGGC	配列番号 40
Ins-hCTLA-4 scFv02-R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGATGATGATGATGATGCTT	配列番号 41
hCTLA-4 scFv02-FLAG-F1	GACTACAAGGACGACGACGACAAGTGACCTTCTGCTCGTAGCGAT	配列番号 42
hCTLA-4 scFv02-FLAG-R1	GTCGTCCTTGTAAGTCCTTGATTCCACCTTGGT	配列番号 43
InF_pTB6 rep_F1	ACTAGTCCTCCAGGACCTCGTCTACGAGGC	配列番号 44
InF_Hu Prom_F1	GTCTTCTGCTGGCCTATGCATTGGGTTC	配列番号 45
InF_Hu Term-Hu Prom_R1	GGCCAGCAGGAAGACCCGGAATAATACGGTTGGAC	配列番号 46
InF_Hu Term-pTB6_R1	TCCTGGAGGACTAGTCCGGAATAATACGGTTGGAC	配列番号 47

[0099] (抗ヒトPD-1 scFv03分泌プラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv03の作製)

pPC1及びpCP1の作製にあたり、まず、抗ヒトPD-1 scFv03の分泌型プラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv03を作製した。

[0100] (抗ヒトPD-1 scFv03分泌発現カセットの構成)

抗ヒトPD-1 scFv03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 scFv03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5 (1) に示される文献を参照した。

[0101] (抗hPD-1 scFv03の人工DNA合成)

配列番号11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株式会社にて、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。

[0102] [表5]

抗体		参考文献
(1) 抗 hPD-1 scFv03	配列番号 11 (729 塩基配列) 重鎖配列 (1~342 塩基) (GGGS) 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
(2) 抗 hCTLA-4 scFv02	配列番号 12 (747 塩基配列) 重鎖配列 (1~357 塩基) (GGGS) 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
(3) 抗 hCTLA-4 scFv02FLAG	配列番号 13 (753 塩基配列) 重鎖配列 (1~357 塩基) (GGGS) ₃ リンカー (358~402 塩基) 軽鎖配列 (403~726 塩基) FLAG タグ (727~750 塩基)	日本国特許 4093757 号

[0103] (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4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、STAR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（キアゲン株式会社製）（以下、「QIAGel」）を用いて精製し、約0.7 kbpの抗hPD-1 scFv 03インサート断片（1）を調製した。

[0104]（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14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4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、STAR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、QIAGel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。

[0105]（インフュージョン反応7）

上記で調製されたベクター断片（1）と上記抗hPD-1 scFv 03インサート断片（1）とを上記In-Fusion（登録商標）HD Cloningキットを用いて連結した。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 HD Enzyme premix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7を調製した。

[0106]（大腸菌の形質転換及びpHuSP7L20-hPD-1 scFv 03のD

NA配列確認)

5 μ Lの上記インフュージョン反応液7を用いたほかは、前記(大腸菌の形質転換及びプラスミドpAG8のDNA配列確認)と同様の手順にて、上記大腸菌HST16CRコンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。ただし、形質転換後、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℃にて一晩振とう培養した。抽出したプラスミドにおける抗ヒトPD-1 scFv03分泌発現カセット(5'-Huプロモーター-SP7L20-抗hPD-1 scFv03-Hisタグ-Huターミネーター-3')の配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミドをpHuSP7L20-hPD-1 scFv03と名付けた。pHuSP7L20-hPD-1 scFv03の構成を図8(A)に、配列を配列番号6に示す。

[0107] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換5)

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv03(550 ng)を用いたことのほかは、上記(ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1)と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-hPD-1 scFv03株(以下hPD-1 scFv03株という)とした。

[0108] (抗hCTLA-4 scFv02分泌プラスミドpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02の作製)

pPC1及びpCP1の作製にあたり、まず、FLAGタグがない、抗hCTLA-4 scFv02の分泌型プラスミドpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02を作製した。

[0109] (抗ヒトCTLA-4 scFv02分泌発現カセット及び抗ヒトCTLA-4 scFv02 FLAG分泌発現カセットの構成)

抗ヒトCTLA-4 scFv02分泌発現カセットとして、(1)Huプロ

ロモーターDNA、(2) シグナルペプチドーリンカー連結体SP7L20をコードするDNA、(3) 抗hCTLA-4 scFv02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hCTLA-4 scFv02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、上記の表5(2)に示される文献を参照した。

[0110] また、抗ヒトCTLA-4 scFv02 FLAG分泌発現カセットとして、(1) HuプロモーターDNA、(2) シグナルペプチドーリンカー連結体SP7L20をコードするDNA、(3) 抗hCTLA-4 scFv02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) FLAG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hCTLA-4 scFv02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、上記の表5(3)に示される文献を参照した。

[0111] (hCTLA-4 scFv02の人工DNA合成)

配列番号12に示されたhCTLA-4 scFv02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pUC57にサブクローニングされ、プラスミドpUC57-hCTLA-4 scFv02として人工遺伝子合成された。

[0112] (抗hCTLA-4 scFv02インサート断片の調製)

上記プラスミドpUC57-hCTLA-4 scFv02を鋳型として、上記表4に記載のIns-hCTLA-4 scFv02-F1(フォワード)及びIns-hCTLA-4 scFv02-R1(リバーズ)のプライマ

ーセットを用いたほかは、上記（抗hPD-1 s c F v 0 3 インサート断片の調製1）と同様の手順にて、約0.8 k b pの抗hCTLA-4 s c F v 0 2 インサート断片を調製した。

[0113] （インフュージョン反応8）

上記ベクター断片（1）と上記抗hCTLA-4 s c F v 0 2 インサート断片とを用いたほかは、上記（インフュージョン反応7）におけるインフュージョン反応と同様の手順にてインフュージョン反応液を調製した。

[0114] （大腸菌の形質転換及びpHuSP7L20-hCTLA-4 s c F v 0 2 のDNA配列確認）

5 μ L の上記インフュージョン反応液8を用いたほかは、前記（大腸菌の形質転換及びプラスミドpHuSP7L20-hPD-1 s c F v 0 3 のDNA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ヒトCTLA-4 s c F v 0 2 分泌発現カセット（5' -Huプロモーター-SP7L20-抗hCTLA-4 s c F v 0 2 -Hisタグ-Huターミネーター-3'）の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-hCTLA-4 s c F v 0 2 と名付けた。pHuSP7L20-hCTLA-4 s c F v 0 2 の構成を図8（B）に、配列を配列番号7に示す。

[0115] [抗hCTLA-4 s c F v 0 2 FLAG単独発現ビフィドバクテリウム属細菌株の作製]

（抗hCTLA-4 s c F v 0 2 FLAG分泌発現カセットを含むベクター断片の調製）

上記プラスミドpHuSP7L20-hCTLA-4 s c F v 0 2（500 p g）を鋳型として、上記表4に記載のhCTLA-4 s c F v 0 2 -FLAG-F1（フォワード）及びhCTLA-4 s c F v 0 2 -FLAG-R1（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、PCR産物の両末端15 b pずつが重複するように設計した。各プライマー濃度を0.2 μ M、反応容量30 μ Lとして、前記STAR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サイクル行い、約4.8 kbpの抗hCTLA-4 scFv02FLAG分泌発現カセットを含むベクター断片増幅産物を調製した。

[0116] (インフュージョン反応9)

上記で調製された抗ヒトCTLA-4 scFv02FLAG分泌発現カセットを含むベクター断片増幅産物をIn-Fusion (登録商標) HD Cloningキットを用いてインフュージョン反応を行い、自己閉環させた。すなわち、マイクロチューブに、上記ベクター断片増幅産物5 µLとCloning Enhancer 2 µLを混合した反応液を37℃にて15分間、引き続き80℃にて15分間保温した。次にこの反応液の0.5 µLと、2 µLの5×In-Fusion HD Enzyme premix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9を調製した。

[0117] (大腸菌の形質転換及びpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAGのDNA配列確認)

上記(大腸菌の形質転換及びプラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv03のDNA配列確認)と同様の手順にて上記5 µLのインフュージョン反応液9を用いて上記大腸菌HST08コンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおける抗ヒトCTLA-4 scFv02FLAG分泌発現カセット(5'-Huプロモーター-SP7L20-抗ヒトCTLA-4 scFv02-FLAGタグ-Huターミネーター-3')の配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミドをpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAGと名付けた。pHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAGの構成を図8(C)に、配列を配列番号8に示す。

[0118] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換6)

256 ng の上記プラスミド pHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAG を用いたほかは、上記（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAG株（以下hCTLA-4 scFv02株という）とした。

[0119] [抗hPD-1 scFv03及び抗hCTLA-4 scFv02共発現株の作製]

抗hPD-1 scFv03及び抗hCTLA-4 scFv02の両方を分泌する共発現株PC1株及びCP1株を作製した。PC1株は、図9（a）に示すように、大腸菌複製起点pUCoriの3'末端側に続く分泌発現カセットが、抗ヒトPD-1 scFv03分泌発現カセット、これに続いて抗ヒトCTLA-4 scFv02分泌発現カセットの順に配置されたプラスミドを有しており、CP1株は図9（b）に示すように、大腸菌複製起点pUCoriの3'末端側に続く分泌発現カセットが、抗ヒトCTLA-4 scFv02分泌発現カセット、これに続いて抗ヒトPD-1 scFv03分泌発現カセットの順に配置されたプラスミドを有している。

[0120] [PC1株の作製]

（抗hCTLA-4 scFv02FLAGインサート断片の調製）

プラスミドpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAG（500 pg）（配列番号8）を鋳型として、上記表4記載のInF__Hu Prom__F1（フォワード）及びInF__Hu Term-pTB6__R1（リバー）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、上記STAR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2分を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0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAGENを用いて精製し、約1.4 kbpの抗ヒトCTLA-4 scFv 02 FLAG インサート断片を調製した。

[0121] (抗hPD-1 scFv 03 分泌発現カセットを含むベクター断片の調製)

上記プラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv 03 (500 pg) (配列番号6) を鋳型として、上記表4記載のInF__pTB6rep__F1 (フォワード) 及びInF__HuTerm-HuProm__R1 (リバー) 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 μ M、反応容量30 μ Lとして、上記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。増幅されたインサートPCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、QIAGEN Quick Gel Extraction キットを用いて精製し、約4.7 kbpの抗hPD-1 scFv 03 分泌発現カセットを含むベクター断片(2)を調製した。

[0122] (インフュージョン反応10)

上記で調製されたベクター断片(2)と上記抗ヒトCTLA-4 scFv 02 FLAG インサート断片とを上記In-Fusion (登録商標) HD Cloning キットを用いて連結した。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1:3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10を調製した。

[0123] (大腸菌の形質転換及びpPC1のDNA配列確認)

2 μ Lの上記インフュージョン反応液10を用いたほかは、前記(大腸菌

の形質転換及びプラスミドpHuSP7L20-hPD-1scFv03のDNA配列確認)と同様の手順にて、上記大腸菌HST16CRコンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。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')及び抗ヒトCTLA-4scFv02FLAG分泌発現カセット(5'-Huプロモーター-SP7L20-抗hCTLA-4scFv02-FLAGタグ-Huターミネーター-3')の配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミドをpPC1と名付けた。pPC1の構成を図9(a)に、pPC1のDNA配列を配列番号9に示す。

[0124] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換7)

250ngの上記プラスミドpPC1を用いたほかは、上記(ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1)と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC1株(以下PC1株という)とした。

[0125] [CP1株の作製]

(抗hPD-1scFv03インサート断片の調製2)

上記プラスミドpHuSP7L20-hPD-1scFv03(500pg)(配列番号6)を鋳型として、上記表4記載のInF__HuProm__F1(フォワード)及びInF__HuTerm-pTB6__R1リバーシ)のプライマーセットを用いたほかは、上記(抗ヒトCTLA-4scFv02FLAGインサート断片の調製)と同様の手順でPCR増幅及びゲル抽出キットによる精製を行った。約1.4kbpの抗hPD-1scFv03インサート断片(2)を調製した。

[0126] (抗ヒトCTLA-4scFv02FLAG分泌発現カセットを含むベクター断片の調製)

上記プラスミドpHuSP7L20-hCTLA-4scFv02FLAG

G（配列番号8）を鋳型として、上記表4記載の *Inf__pTB6rep__F1*（フォワード）及び *Inf__HuTerm-HuProm__R1*（リバース）のプライマーセットを用いたほかは、上記（抗hPD-1 scFv03 インサート断片の調製2）と同様の手順でPCR増幅及びゲル抽出キットによる精製を行った。約4.8 kbpの抗ヒトCTLA-4 scFv02 FLAG分泌発現カセットを含むベクター断片（3）を調製した。

[0127]（インフュージョン反応11）

上記で調製されたベクター断片（3）と上記抗hPD-1 scFv03 インサート断片（2）を用いたほかは、上記（インフュージョン反応10）と同様の手順でインフュージョン反応液11を調製した。

[0128]（大腸菌の形質転換及びpCP1のDNA配列確認）

2 µLの上記インフュージョン反応液11を用いたほかは、前記（大腸菌の形質転換及びプラスミドpHuSP7L20-hPD-1 scFv03のDNA配列確認）と同様の手順にて、上記大腸菌HST16CRコンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおける抗ヒトPD-1 scFv03分泌発現カセット（5' - Huプロモーター-SP7L20-抗hPD-1 scFv03-Hisタグ-Huターミネーター-3'）と抗ヒトCTLA-4 scFv02 FLAG分泌発現カセット（5' - Huプロモーター-SP7L20-抗hCTLA-4 scFv02-FLAGタグ-Huターミネーター-3'）の配列決定を上記（大腸菌の形質転換及びpCP1のDNA配列確認）と同様の手順で行った。抽出したプラスミドをpCP1と名付けた。pCP1の構成を図9（b）に、pCP1のDNA配列を配列番号10に示す。

[0129]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換8）

250 ngの上記プラスミドpCP1を用いたほかは、上記（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-

A／pCP1株（以下CP1株という）とした。

[0130] [実施例9]

[PC1株及びCP1株における抗hPD-1scFv及び抗hCTLA-4scFv分泌確認]

PC1株及びCP1株の培養上清中の抗hPD-1scFv03（ヒスチジンタグ付）及び抗hCTLA-4scFv02（FLAGタグ付）の有無をウェスタンブロッティング法にて以下のとおり確認した。陰性コントロール株としてBEShuttle株についても同様に実施した。

[0131] （組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養）

上記PC1株及びCP1株、hPD-1scFv03株、hCTLA-4scFv02株、BEShuttle株について実施例4（組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養）と同様の手順にて上記ビフィドバクテリウム属細菌を培養し、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、各培養上清濃縮物とした。

[0132] （ウェスタン解析）

上記各培養上清濃縮物（培養液0.1mL相当）をミニプロティアン（登録商標）TGXTMゲル（4～20%）（バイオラッド社製）にて電気泳動し、ゲルをPVDF膜（メンブラン）（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PVDF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。電気泳動及び膜へのブロッティングは、2セット行い、一枚目のPVDF膜は抗hPD-1scFv03を検出するために一次抗体として抗ヒスチジン抗体（THE His Tag Antibody, mAb, Mouse）（GenScript社製）を、二次抗体としてECL peroxidase lab

elled anti-mouse antibody (GEヘルスケア社製) を使用した。もう一つのPVDF膜は抗hCTLA-4 scFv02を検出するために一次抗体として抗FLAG抗体Monoclonal ANTI-FLAG M2 Antibody (produced in mouse) (シグマ社製) を、二次抗体としてECL peroxidase labelled anti-mouse antibody (GEヘルスケア社製) を使用した。抗体反応終了後のメンブランを、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装置MYECL Imager (Thermo Scientific社製) にて解析した。結果を図10に示す。

[0133] (結果)

図10から明らかとなっており、抗hPD-1 s c F v 03のC末端にHisタグ融合している抗ヒトPD-1 s c F v 03分泌発現カセット及び、抗hCTLA-4 s c F v 02のC末端にFLAGタグ融合している抗ヒトCTLA-4 s c F v 02 FLAG分泌発現カセットを含むPC1株（A、Bともレーン1）及びCP1株（A、Bともレーン2）の培養上清中には、抗hPD-1 s c F v 03と抗hCTLA-4 s c F v 02の両方がみとめられた。また、PC1株（A：レーン1）とCP1株（A：レーン2）のhPD-1 s c F v分泌タンパク質の大きさとhPD-1 s c F v 03単独発現株（A：レーン3）のhPD-1 s c F v分泌タンパク質の大きさは同じであり、PC1株（B：レーン1）とCP1株（B：レーン2）のhCTLA-4 s c F v分泌タンパク質の大きさとhCTLA-4 s c F v 02単独発現株（B：レーン4）のhCTLA-4 s c F v分泌タンパク質の大きさは同じであった。したがって、共発現ビフィドバクテリウム属細菌株PC1株及びCP1株は培養上清中に抗hPD-1 s c F vと抗hCTLA-4 s c F vの両方を分泌できる組換えビフィドバクテリウム属細菌株であることが確認された。

[0134] [实施例 10]

[PC1株が分泌する抗体のhPD-1及びhCTLA-4への結合確認]

上記共発現株PC1株の培養上清より精製した抗hPD-1 scFv03のヒトPD-1 (hPD-1) との結合活性の有無、抗hCTLA-4 scFv02のヒトCTLA-4との結合活性の有無につき、ELISA法にて確認した。

[0135] 96穴プレートに、1×PBSにて1 µg/mLに調整したhPD-1 (Recombinant Human hPD-1 Fc Chimera、R&D Systems社製)、hCTLA-4 (Recombinant Human CTLA-4-Fc Chimera、Biolegend社製)、mPD-1 (Recombinant Human hPD-1 Fc Chimera、R&D Systems社製) 及びmCTLA-4 (Recombinant mouse CTLA-4-Fc Chimera、Biolegend社製) をそれぞれ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%BSA溶液を350 µLずつ分注し室温にて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。

[0136] 抗hPD-1 scFv03及び抗hCTLA-4 scFv02をシグナル増強試薬 (Signal Enhancer HIKARI、Nacalaitesque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。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、室温にて2時間静置後、固相化したhPD-1、mPD-1及びhCTLA-4と、抗hPD-1 scFv03とを反応させた。同様に固相化したhCTLA-4、mCTLA-4及びhPD-1と、抗hCTLA-4 scFv02とを反応させた。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。

[0137] 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、これを抗hPD-1 scFv 03を反応させたウェルに100 μ L分注した。同様に、二次抗体 (THE (登録商標) DYKDDDDK Tag Antibody [Biotin], mAb, mouse、GenScript社製) をシグナル増強試薬で2500倍に薄め、これを抗hCTLA-4 scFv 02を反応させたウェルに100 μ L分注した。プレートにシールを貼り、室温にて2時間静置した。液を除去後、1 $\times$ PBSを350 μ Lずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄した。

[0138] アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (VECTASTAIN ABCキット、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。これを各プレートに100 μ Lずつ分注後、プレートにシールを貼り、室温にて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。

[0139] 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、遮光して室温にて20分静置した。正確に20分経過後Stop Solution (R&D Systems社) を50 μ Lずつ添加し呈色反応を停止した。450 nm及び570 nm (参照波長) での吸光度を測定した。ELISA法によるヒトPD-1固相化プレートへの抗hPD-1 scFv 03の結合の結果を以下の表6及び図11に示す。同様に、ヒトCTLA-4固相化プレートへの抗hCTLA-4 scFv 02の結合の結果を以下の表7及び図12に示す。

[0140]

[表6]

ヒトPD-1固相化プレートへの抗hPD-1 scFv03の結合 (OD値)

抗 hPD-1 scFv03 の濃度	hPD-1 固相化	hCTLA-4 固相化	mPD-1 固相化
1ng/mL	-0.030	-0.062	-0.059
10ng/mL	0.373	-0.055	-0.057
100ng/mL	3.774	-0.018	-0.049
1000ng/mL	3.788	0.341	0.107

[0141] [表7]

ヒトCTLA-4固相化プレートへの抗hCTLA-4 scFv02の結合 (OD値)

抗 hCTLA-4 scFv02 の濃度	hPD-1 固相化	hCTLA-4 固相化	mCTLA-4 固相化
1ng/mL	-0.018	0.009	0.026
10ng/mL	-0.031	0.026	0.005
100ng/mL	-0.038	0.255	0.001
1000ng/mL	-0.001	1.419	0.051

[0142] (結果)

表6及び図11から明らかとなおり、共発現株PC1株の培養上清より精製した抗hPD-1 scFv03はhPD-1と結合した。また、表7及び図12より明らかとなおり、抗hCTLA-4 scFv02はhCTLA-4と結合した。一方、抗hPD-1 scFv03はhCTLA-4及びmPD-1とは結合せず、また抗hCTLA-4 scFv02はhPD-1及びmCTLA-4とは結合しなかった。このことから、共発現株PC1株が分泌した抗hPD-1 scFv03及び抗hCTLA-4 scFv02は、対応する抗原タンパク質と特異的に結合していることが確認された。

[0143] [実施例11]

[ヒトPD-1に対するヒトPD-L1の結合反応における抗hPD-1 scFvの競合的阻害活性]

PD-1 にリガンドPD-L1 が結合すると、T細胞に負のシグナルが伝達され、免疫反応を抑制する（免疫寛容）とされている。そこで、ヒトPD-1 に対するヒトPD-L1 の結合反応における抗hPD-1 scFv の競合的阻害活性について検討した。

[0144] 上記共発現株PC1 株の培養上清より精製した抗hPD-1 scFv 03 を用いて、ヒトPD-1（hPD-1）に対するヒトPD-L1（hPD-L1）と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hCTLA-4 scFv 02を用いた。

[0145] 96穴プレートに、1×PBSにて1 μg/mLに調整したhPD-1（Recombinant HumanPD-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。

[0146] 上記プレートに1%BSA溶液を350 μLずつ分注し室温にて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。hPD-L1（R&D Systems, Recombinant HumanB7-H1/PD-L1 Fc Chimera）を上記シグナル増強試薬にて2000 ng/mLに調整した。

[0147] ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗hPD-1 scFv 03を上記シグナル増強試薬にて20000 ng/mL、2000 ng/mL、2000 ng/mL及び20 ng/mLに調整し、120 μLずつ調整したhPD-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hCTLA-4 scFv 02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、室温にて2時間静置し、固相化したhPD-1に対して抗hPD-1 scFv 03と混合したhPD-L1を反応した。液を除去後、1

×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。hPD-L1に対する二次抗体（Biotinant i-human CD274、Biolegend社製）をシグナル増強試薬で0.2 μ g/mLに調整し、これを100 μ Lずつ分注した。プレートにシールを貼り、室温にて30分間静置した。液を除去後、1×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。

[0148] 上記アビジン-ビオチン標識酵素複合体としてA液及びB液を1滴ずつシグナル増強試薬2.5mLに添加した。これを100 μ Lずつ分注し、プレートにシールを貼り、室温にて30分間静置した。液を除去後、1×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。検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B（R&D）を等量ずつ混ぜ、200 μ Lずつ分注し、遮光して室温にて20分静置した。正確に20分経過後Stop solution（R&D）を50 μ Lずつ添加し呈色反応を停止した。450nm及び570nm（参照波長）での吸光度を測定した。測定結果を以下の表8及び図13に示した。

[0149] [表8]

ヒトPD-1に対するヒトPD-L1の結合反応における抗hPD-1 scFv03の競合的結合阻害

scFv 濃度	1000ng/mL hPD-L1 に対する結合 (OD) と阻害率 (%)	
	抗 hPD-1 scFv03	抗 hCTLA-4 scFv02
10ng/mL	3.479 (-0.7%)	3.697 (-7.0%)
100ng/mL	3.503 (-1.4%)	3.473 (-0.5%)
1000ng/mL	3.309 (4.2%)	3.555 (-2.9%)
10000ng/mL	1.062 (69.3%)	3.596 (-4.1%)
Non-scFv	3.455 (0%)	

[0150] (結果)

表8及び図13から明らかとなおり、10000ng/mLのhPD-L1

のhPD-1への結合に対する阻害率は、10000 ng/mLの抗hPD-1 scFv 03で69.3%であった。以上の結果より、1000 ng/mLのhPD-L1のhPD-1への結合に対して、抗hPD-1 scFv 03は10000 ng/mL以上の濃度で競合的に結合阻害することが示された。

[0151] [実施例11-1]

[ヒトCTLA-4に対するヒトCD80及びヒトCD86との結合反応におけるhCTLA-4 scFvの競合的阻害活性の確認]

上記共発現株PC1株の培養上清より精製した抗hCTLA-4 scFv 02を用いて、ヒトCTLA-4 (hCTLA-4) に対するヒトCD80 (hCD80) 及びヒトCD86 (hCD86) と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hPD-1 scFv 03を用いた。

[0152] 96穴プレートに、1×PBSにて1 µg/mLに調整したhCTLA-4 (Recombinant Human CTLA-4-Fc Chimera, carrier-free、BioLegend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。

[0153] 上記プレートに1%BSA溶液を350 µLずつ分注し、室温にて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。hCD80 (R&D Systems, Recombinant Human B7-1/CD80 Fc Chimera) 及びhCD86 (R&D Systems, Recombinant Human B7-2/CD86 Fc Chimera) を上記シグナル増強試薬にて2000 ng/mLに調整した。

[0154] ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗hCTLA-4 scFv 02を上記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、120 µLずつ調整したh

CD80及びhCD86と等量混合し、100 μ 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hPD-1 s c F v 03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 μ L分注した。プレートにシールを貼り、室温にて2時間静置し、固相化したhCTLA-4に対して抗hCTLA-4 s c F v 02と混合したhCD80及びhCD86を反応した。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。

[0155] hCD80に対する二次抗体 (R&D Systems, Human B7-1/CD80 Biotinylated Antibody) 及びhCD86に対する二次抗体 (R&D Systems, Biotinylated Anti-human B7-2 Antibody) を上記シグナル増強試薬で2.5 μ g/mL及び0.5 μ g/mLに調整し、これを10 μ Lずつ分注した。プレートにシールを貼り、室温にて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。

[0156] 上記アビジン-ビオチン標識酵素複合体として上記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ずつ分注し、プレートにシールを貼り、室温にて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。検出試薬としてColor Solution A及びColor Solution B (R&D) を等量ずつ混ぜ、200 μ Lずつ分注し、遮光して室温にて20分静置した。正確に20分経過後Stop solution (R&D) を50 μ Lずつ添加し呈色反応を停止した。450nm及び570nm (参照波長) での吸光度を測定した。結果を以下の表9及び表10並びに図14及び図15に示す。

[0157]

[表9]

ヒトCTLA-4に対するヒトCD80の結合反応における抗hCTLA-4 scFv 02の競合的結合阻害

scFv 濃度	1000ng/mL hCD80 に対する結合 (OD) と阻害率 (%)	
	抗 hCTLA-4 scFv02	抗 hPD-1 scFv03
10ng/mL	2.656 (15.7%)	2.638 (16.2%)
100ng/mL	2.403 (23.7%)	2.410 (23.5%)
1000ng/mL	1.774 (43.7%)	2.464 (21.8%)
10000ng/mL	0.577 (81.7%)	2.862 (9.1%)
Non-scFv	3.149 (0%)	

[0158] [表10]

ヒトCTLA-4に対するヒトCD86の結合反応における抗hCTLA-4 scFv 02の競合的結合阻害

scFv 濃度	1000ng/mL hCD86 に対する結合 (OD) と阻害率 (%)	
	抗 hCTLA-4 scFv02	抗 hPD-1 scFv03
10ng/mL	2.085 (0.3%)	1.491 (28.7%)
100ng/mL	1.421 (32.0%)	1.396 (33.2%)
1000ng/mL	0.627 (70.0%)	1.265 (39.5%)
10000ng/mL	0 (100.0%)	1.526 (27.0%)
Non-scFv	2.091 (0%)	

[0159] (結果)

表9及び表10並びに図14及び図15から明らかとなっており、1000ng/mLのhCD80及びhCD86のhCTLA-4への結合に対する阻害率は、1000ng/mLの抗hCTLA-4 scFv02でそれぞれ43.7%及び70.0%であり、10000ng/mLの抗hCTLA-4 scFv02でそれぞれ81.7%及び100.0%であった。1000ng/mLのhCD80及びhCD86のhCTLA-4への結合に対して、抗hCTLA-4 scFv02は1000ng/mL以上の濃度で競合的に

結合阻害することが示された。

[0160] [実施例 1 2]

[共発現ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗 h P D - 1 s c F v 及び抗 h C T L A - 4 s c F v の細胞への結合：抗原過剰発現細胞株を用いた検討]

上記共発現株 P C 1 株の培養上清より精製した抗 h P D - 1 s c F v とヒト P D - 1 (h P D - 1) 発現細胞との結合の有無、及び抗 h C T L A - 4 s c F v とヒト C T L A - 4 (h C T L A - 4) 発現細胞との結合の有無を、以下の抗原タンパク質を過剰発現させた細胞を用いてフローサイトメトリー法で検討した。

[0161] h P D - 1 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞 (h P D - 1 はラット C D 2 とバイシストロニックに発現) 及び、h C T L A - 4 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞 (h C T L A - 4 はラット C D 2 とバイシストロニックに発現) を使用した。h P D - 1 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞及び h C T L A - 4 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞は、非働化した 1 0 % ウシ胎児血清を含む D M E M 培地にて培養を行い、1 0 0 m m ディッシュ (グライナー・ジャパン社製) に播種した。h P D - 1 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞及び h C T L A - 4 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞の培養上清を除去し、P B S (C a ²⁺、M g ²⁺フリー・リン酸緩衝液) にて 2 度洗浄し、P B S で 1 0 倍に希釈したトリプシン・E D T A 溶液 (和光純薬工業社製) 1 m L を加え 1 分間室温にて静置後、1 0 m L の非働化した 1 0 % ウシ胎児血清を含む D M E M 培地を加え、1 5 m L 遠沈管 (B D フアルコン社製) に移した。低速遠心機 (トミー精工社製) で 1 0 0 0 r p m、5 分間遠心分離後、上清を除去し、1 m L の非働化した 1 0 % ウシ胎児血清を含む D M E M 培地を加え、細胞数を計測した。さらに D M E M 培地を添加し、1 × 1 0 ⁵ c e l l s / m L に細胞懸濁液を調製し、1 . 5 m L チューブ (イナ・オプティカ社製) に 1 × 1 0 ⁵ c e l l s / m L / t u b e になるように分注した。1 . 5 m L チューブに分注した h P D - 1 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞及び h C T L A - 4 過剰発現 H E K 2 9 3 T 細胞

胞を微量冷却遠心機（トミー精工社製）にて5000rpm、4℃にて1分間遠心分離後、上清を除去した。チューブに残った細胞のペレットを0.5mLのPBSにて2度洗浄後、組換えビフィドバクテリウム属細菌より精製し、10μg/mLに調製した抗hPD-1 scFv03及び抗hCTLA-4 scFv02を各チューブに100μL添加し、氷上にて30分間静置した。30分後、FACSバッファー（1%BSA、0.1%NaN₃を含むPBS）を500μLチューブに加え、上記微量冷却遠心機にて5000rpm、4℃にて1分間遠心分離後、上清を除去し洗浄を行った。同様の操作をもう一度行い洗浄操作を2度行った。FACSバッファーにて0.5μg/mLに希釈したanti-His-tag Alexa Fluor 488抗体（MBL社製）及び、anti-DDDDK-tag Alexa Fluor 488抗体（MBL社製）100μL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30分間静置した。30分後、FACSバッファーを500μLチューブに加え、上記微量冷却遠心機にて5000rpm、4℃にて1分間遠心分離後、上清を除去し洗浄を行った。同様の操作をもう一度行い洗浄操作を2度行った。500μLのFACSバッファーを添加後、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バッファーにて懸濁した細胞を移した。FACSバッファーにて5μg/mLに希釈したヨウ化プロピジウム溶液を5μL添加し、BD FACS canto IIフローサイトメーター（ベクトン・ディッキンソン社製）及びフローサイトメトリー解析ソフトウェアKaluza ver 1.2（ベックマン・コールター社製）にて解析を行った。PC1株より精製した抗PD-1 scFv03のヒトPD-1過剰発現細胞への結合の結果を図16に示す。同様に、共発現株PC1株より精製した抗CTLA-4 scFv02のヒトCTLA-4過剰発現細胞への結合の結果を図17に示す。

[0162] （結果）

図16から明らかなとおり、PC1株より精製した抗PD-1 scFv0

3は、ヒトPD-1高発現細胞（ラットCD2高発現細胞）に特異的に結合することが確認された。同様に、図17から明らかとなっており、PC1株より精製した抗CTLA-4 scFv 02は、ヒトCTLA-4高発現細胞（ラットCD2高発現細胞）に特異的に結合することが確認された。これらの結果より、共発現株PC1株より精製したscFvは、ヒトPD-1及びヒトCTLA-4過剰発現細胞に特異的に結合することが確認された。

[0163] [実施例13]

[抗HER2 scFv及びhIFN- γ 共発現ビフィドバクテリウム属細菌株HG-2株の作製]

(概要)

抗HER2 scFvを分泌する発現カセット（抗HER2 scFv分泌発現カセット）と、hIFN- γ を分泌する発現カセット（ヒトIFN- γ 分泌発現カセット）とを含み、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、共発現プラスミドpHG-2を作製した（図2）。かかるpHG-2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法により行い、抗HER2 scFv及びhIFN- γ 共発現ビフィドバクテリウム属細菌HG-2株を取得した。実施例13において使用したプライマーを以下の表11に示す。

[0164]

[表11]

プライマー名	DNA 配列 (5'→3')	配列番号
pTB6_Vec_F1	ACTAGTCCTCCAGGACCTCGTCTAC	配列番号 48
Hu-term_Vec_R1	CCGGAATAATACGGTTGGACAAC	配列番号 49
Hu-HuT_ins_F1	accgtattattccggGGATCCGTCTTCCTGCTGG	配列番号 50
HuT-pTB6_ins_R1	tcctggaggactagtCCGGAATAATACGGTTGGACAAC	配列番号 51
Hu_Vec_F1	GGATCCGTCTTCCTGCTGG	配列番号 52
bHER2-His_Vec_R1	TCAGTGATGATGATGATGATGCTTG	配列番号 53
d0013+T_ins_F1	catcatcatcactgaAACCGCTTCTCATTTCATTG	配列番号 54
d0013+T_ins_R1	caggaagacggatccGTGCACCGAATCGCGCT	配列番号 55

[0165] 抗HER2 scFv分泌発現カセットとして、(1) P30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HER2 scFvのアミノ酸配列をコードするDNA、(4) Hisタグ配列をコードするDNA、(5) d0013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を作製した。

[0166] (プラスミドpHG-2の作製)

プラスミドpHG-2の作製にあたり、まず、プラスミドpHG-1を作製した。

[0167] (プラスミドpHG-1の作製)

(hIFNgインサート断片の調製)

プラスミドphIFNg33(配列番号16)を鋳型として、上記表11記載のHu-HuT_ins_F1(フォワード)及びHuT-pTB6_ins_R1(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15bpが重複するように設計された。各プライマー濃度を0.2 μM、反応容量20 μLとして、STAR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72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、約1.1 kbpのhIFNg インサート断片増幅産物を調製した。

[0168] (抗HER2 scFv タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAを含むベクター断片の調製)

pP30SP7L20-bHER2 (配列番号15) を鋳型として、表1記載のpTB6__Vec__F1 (フォワード) 及びHu-term__Vec__R1 (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15bpが重複するように設計された。各プライマー濃度を0.2 μM、反応容量20 μLとして、STAR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秒伸長反応を行い、約4.6 kbpのベクター断片増幅産物を調製した。

[0169] (インフュージョン反応12)

上記で調製した4.6 kbpのベクター断片増幅産物及び約1.1 kbpのインサート断片をIn-Fusion (登録商標) HD Cloningキット (タカラバイオ株式会社製) を用いて連結した。まずClontech社のウェブサイトIn-Fusion (登録商標) Molar Ratio Calculator (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>) にて必要なインサート量及びベクター量を算出し、ベクター：インサート=1：2のモル比とした。5×In-Fusion HD Enzymes premix 2 μL、Cloning Enhancer 1 μL、インサート及びベクターの必要量を混合し、0.1×TEバッファー (1 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA、pH 7.5) で反応系の総量を10 μLとした。37℃にて15分間反応後、50℃にて15分間反応し、4℃に静置した。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12を調

製した。

[0170] (大腸菌の形質転換及びプラスミド p H G - 1 の D N A 配列確認)

上記(大腸菌の形質転換及びプラスミド p A G 8 の D N A 配列確認)と同様の手順にて上記インフュージョン反応液 1 2 を用いて上記大腸菌 H S T 1 6 C R コンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおける抗 H E R 2 s c F v 分泌発現カセット及びヒト I F N - γ 分泌発現カセットの D N A 配列の配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミド p H G - 1 と名付けた。プラスミド p H G - 1 の D N A 配列を配列番号 1 7 に示す。

[0171] (p H G - 2 株の調製)

プラスミド p H G - 1 の抗 H E R 2 s c F v 発現分泌カセットのターミネーターを H u ターミネーターから d O O 1 3 ターミネーターへ交換した。上記 p H G - 1 を鋳型として、上記表 1 1 記載の H u __ V e c __ F 1 (フォワード) 及び b H E R 2 - H i s __ V e c __ R 1 (リバーズ) のプライマーセットを用いて P C R 増幅を行った。増幅のプログラムとして、9 8 ° C にて 1 0 秒、6 5 ° C にて 5 秒、7 2 ° C にて 5 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 ° C にて 3 0 秒伸長反応を行ったほかは、上記(プラスミド p A G 8 の作製)と同様の手順にて、約 5 . 6 k b p のベクター断片増幅産物を調製した。

[0172] ビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5 - A のゲノム D N A を鋳型として、上記表 1 1 記載の d O O 1 3 + T __ i n s __ F 1 (フォワード) 及び d O O 1 3 + T __ i n s __ R 1 (リバーズ) のプライマーセットを用いて P C R 増幅を行った。増幅のプログラムとして、9 8 ° C にて 1 0 秒、6 5 ° C にて 5 秒、7 2 ° C にて 3 5 秒を 1 サイクルとして、3 0 サイクル行った後、7 2 ° C にて 3 0 秒伸長反応を行ったほかは、上記(プラスミド p A G 8 の作製)と同様の手順にて、約 1 4 4 b p のインサート断片増幅産物を調製した。

[0173] (インフュージョン反応 1 3)

上記で調製されたベクター断片とインサート断片を用いたほかは、上記(

インフュージョン反応 10) と同様の手順でインフュージョン反応液 13 を調製した。

[0174] (大腸菌の形質転換及びプラスミド pHG-2 の DNA の配列確認)

上記 (大腸菌の形質転換及びプラスミド pAG8 の DNA 配列確認) と同様の手順にて上記インフュージョン反応液 13 を用いて上記大腸菌 HST16CR コンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドにおける抗HER2scFv 分泌発現カセット及びヒトIFN- γ 分泌発現カセットの DNA 配列の配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミド pHG-2 と名付けた。プラスミド pHG-2 の DNA 配列を配列番号 100 に示す。

[0175] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換 9)

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミド pHG-2 (500 ng) を用いたほかは、上記 (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換 1) と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A / pHG-2 (以下、HG-2 株という) とした。

[0176] [実施例 14]

[HG-2 株における抗HER2scFv 及びヒトIFN- γ の分泌確認]

HG-2 株の培養上清中の抗HER2scFv 及びヒトIFN- γ の有無をウェスタンブロッティング法にて以下のとおり確認した。

[0177] (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養)

上記HG-2 株、ヒトIFN- γ 分泌発現カセットの一方のみを持つ単独発現株であるP30SP7L20-bHER2 (プラスミド pP30SP7L20-bHER2 導入株) 株、ヒトIFN γ 33 株について実施例 4 (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養) と同様の手順にて上記ビフィドバクテリウム属細菌を培養し、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、各培養上清濃縮物とした。

[0178] (ウェスタン解析)

上記各培養上清濃縮物（培養液0.1mL相当）を実施例9の（ウェスタン解析）と同様の手順にて、ブロッキング終了後の膜をブロッキングした。その後、一次抗体として抗ヒスチジン抗体である上記THE His Tag Antibody, mAb, Mouseを、二次抗体として、上記ECL peroxidase labelled anti-mouse antibodyを使用し、抗体反応終了後のメンブランを、上記Western Lightning Ultraを用いて発光させた。これをイメージング装置Fluor-S Max（BIO-RAD社製）にて解析した。結果を図18に示す。

[0179] (結果)

図18から明らかとなっており、HG-2株では、抗HER2 scFvとhIFN- γ の両方が検出されており、その大きさは、それぞれの単独発現株の分泌物と同様であった。なお、レーンMはマーカー、レーン1は抗HER2 scFv単独発現株（P30SP7L20-bHER2株）からの分泌タンパク質、レーン2はhIFN- γ 単独発現株（hIFNg33株）からの分泌タンパク質、レーン3は抗HER2 scFv及びhIFN- γ 共発現株（HG-2株）からの分泌タンパク質をロードした。

[0180] [実施例15]

[HG-2株分泌物の生理活性の検討]

(培養上清濃縮物の調製とhIFN- γ タンパク質の発現量確認)

上記HG-2株、P30SP7L20-bHER2株、hIFNg33株、BEshuttle株についてそれぞれMRS（75 μ g/mLスペクチノマイシン、1%ビタミンC添加液）液体培地に1%植菌し、37℃にて24時間嫌気培養した（活性化培養）。DMEM培地（低グルコース、Life technologies社製）18mLにMRS液体培地2mLを加え

たDMEM／MRS（75 μ g／mLスペクチノマイシン、0.5%ビタミンC添加液）培地に活性化培養液0.5%を植菌した。これを37℃にて18時間嫌気培養した（本培養）。この培養液20 mLを遠心分離し、培養上清13 mLを回収した後、ポアサイズ0.2 μ mのフィルターで濾過して菌体を除去した。この培養上清10 mLをAmicon Ultra-4（Millipore社製）で濃縮した後、PBS（－）に置換し500 μ Lとした（ビフィドバクテリウム属細菌培養上清の濃縮物（PBS置換））。各細菌培養上清濃縮物を前記hIFN- γ 測定用のELISAキットを用いて、ELISA法により培養上清中のIFN- γ 量を測定した。測定結果を以下の表12に示した。

[0181] [表12]

ビフィドバクテリウム属細菌培養上清濃縮物のヒトIFN- γ 濃度測定	
Sample name	hIFN- γ conc. (ng/mL)
BE shuttle株	0
P30SP7L20-bHER2株 (抗HER2 scFv単独発現株)	0
hINFg33株(hIFN- γ 単独発現株)	3697
HG-2株(抗HER2 scFv/hIFN- γ 共発現株)	6851

[0182] (HG-2株分泌物中の抗HER2 scFvの癌細胞増殖抑制活性)

抗HER2 scFvの生理活性は、P30SP7L20-bHER2株の培養上清よりHisタグ精製した抗HER2 scFv（PBS置換）をHER2陽性細胞（NCI-N87（胃癌）細胞）に添加し、細胞増殖抑制活性を測定した。即ち、NCI-N87細胞をRPMI1640培地（10%（v/v）FBS）にて37℃にて5%CO₂の条件下で培養後、96穴プレートに2×10⁴ cellsずつ播種し37℃にて5%CO₂の条件下で24時間培養した。その後古い培地を吸引除去し、新しいRPMI1640培地（10%（v/v）FBS）を98 μ Lずつ添加した。次に、測定試料として

PBS (－)、抗HER2 scFvを244 ng/mL～1 mg/mLに調整したものを2 μ Lずつ添加した。このプレートを37℃にて5%CO₂の条件下で5日間培養した。

[0183] 上記5日間培養後の培地を吸引除去した後、新しいRPMI 1640培地(10% (v/v) FBS) 9 mLにCell Counting キットー8を1 mL添加したものを100 μ Lずつ添加後、さらに3時間37℃にて5%CO₂の条件下で保温し、波長450 nmと630 nm (参照波長)での吸光度を測定することにより上記HER2陽性細胞に対する細胞増殖抑制活性を測定した。結果を図19に示す。

[0184] (結果)

図19から明らかなとおり、上記ビフィドバクテリウム・ロンガムRe-105A/pP30SP7L20-bHER2より精製した抗HER2 scFvは、NCI-N87胃癌細胞に対し用量依存性の細胞増殖抑制活性を示し、組換えビフィドバクテリウム属細菌が分泌した抗HER2 scFvは生理活性を有することを確認した。

[0185] [実施例16]

(HG-2株が分泌した抗HER2 scFv及びhIFN- γ の癌細胞増殖抑制活性1)

共発現株により分泌されたタンパク質である抗HER2 scFv及びhIFN- γ の生理活性は、HER2陽性細胞(NCI-N87細胞)に実施例15で得たビフィドバクテリウム属細菌(HG-2株)培養上清の濃縮物(PBS置換)を添加し、増殖抑制活性を調べることにより判定した。すなわち、NCI-N87細胞をRPMI 1640培地(10% (v/v) FBS)にて37℃にて5%CO₂の条件下で培養後、96穴プレートに2 $\times$ 10⁴ cellsずつ播種し37、5%CO₂の条件下で24時間培養した。この細胞培養液より古い培地を吸引除去し、新しいRPMI 1640培地(10% (v/v) FBS)を90 μ Lずつ添加した。次に、測定試料としてPBS (－)、BEShuttle株培養上清濃縮物(ネガティブコントロール

）、P30SP7L20-bHER2株培養上清濃縮物、hINFg33株培養上清濃縮物（hINF- γ 濃度を2000ng/mLになるようにPBSで希釈して調整）、HG-2株培養上清濃縮物、及びリコンビナントhINF- γ （ポジティブコントロール、hINF- γ 濃度を2000ng/mLになるように調整）を10 μ Lずつ添加した。このプレートを37℃にて5%CO₂の条件下で5日間培養した。

[0186] 細胞増殖抑制活性の測定は、上記（抗HER2scFvの細胞増殖抑制活性）にて記載した同じ方法で実施した。結果を図20に示す。

[0187] 図20から明らかとなおり、抗HER2scFv/hINF- γ 共発現株であるHG-2株由来の培養上清濃縮物はNCI-N87細胞に対し非常に強い細胞増殖抑制活性を示した。一方、hINF- γ 単独発現株のhINFg33株培養上清由来の濃縮物は、200ng/mLのhINF- γ で、標準品として用いたリコンビナントhINF- γ （PeploTech社製）と同様の細胞増殖抑制活性を示した。またP30SP7L20-bHER2株由来の濃縮物は、実施例15と同様の細胞増殖抑制活性が確認された。抗HER2scFv/hINF- γ 共発現株のHG-2株の細胞増殖抑制活性は、同時に行ったhINF- γ 単独発現株及びP30SP7L20-bHER2株のいずれの活性よりも強く、共分泌されたhINF- γ 及び抗HER2scFv両タンパクの相乗的な併用効果によるものと考えられる。

[0188] [実施例17]

[抗HER2scFv及びhINF- γ 共発現株の腫瘍内分泌の確認]

ヒト胃癌細胞株NCI-N87の担癌ヌードマウスを用いて、腫瘍内のビフィドバクテリウム属細菌の局在をグラム染色にて、抗HER2scFvとhINF- γ の局在を抗ヒスチジン抗体及び抗hINF- γ 抗体による免疫組織染色にて確認した。

[0189] ヒト胃癌細胞株NCI-N87（ATCC）を10%FBS（EQUITECH-BIO, INC. 社製）のRPMI1640培地（和光純薬工業社製）で培養し、ヌードマウス（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。腫瘍サイズが約 470 mm^3 の担癌マウスに抗HER2scFv及びhIFN- γ 共発現株(HG-2株)の簡易凍結製剤ならびにコントロールとして非発現株のBeshuttle株の簡易凍結製剤を尾静脈から $6 \times 10^8\text{ cfu}$ の用量で投与した。なお、10%マルトース溶液を1mLずつ1日2回の頻度で5日間投与した。投与7日後に腫瘍を摘出し、O.C.T. compound(サクラファインテック社製)で凍結包埋し、凍結ミクロトームLeica CM1900(Leica社製)で薄切スライド標本を作製し、各組織染色に供した。

[0190] (グラム染色)

上記薄切スライド標本を風乾し、4%PFA(和光純薬工業社製)に10分間浸漬し固定した。固定後、前染色としてバーミーMクリスタルバイオレット溶液(武藤化学社製)にて2分間染色した後、バーミーMヨウ素・水酸化ナトリウム溶液(武藤化学社製)に1分間反応させた。バーミーMアセトン・エチルアルコール混合液(武藤化学社製)にて脱色後、バーミーMO.1%フクシン液(武藤化学社製)にて1分間染色した。染色後、精製水にて洗浄し、99.5%エタノール(和光純薬工業社製)で脱水し、レモゾール(和光純薬工業社製)で透徹後、エンテランニュー(MERCK KGaA社製)で封入した。結果を図21に示す。

[0191] (抗ヒスチジンタグ抗体及び抗hIFN- γ 抗体による免疫組織染色)

上記薄切スライド標本を風乾し、4%PFA(和光純薬工業社製)に約4時間浸漬し固定した。固定後、精製水にて1分間洗浄し、 $1 \times \text{PBS}$ (-)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、Dakopen(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)594(MBL社製)及びFITC Anti-human IFN- γ 抗体(BioLegend社製)をCan Get Signal(登録商標)immunostain(TOYOBO社製)で混合希釈し、抗体反応液として組織に滴下し 4°C

にて、一晚反応させた。抗体反応後、 $1 \times \text{PBS}$ (一) にて5分間の洗浄を3回実施し、VECTASHIELD (登録商標) 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22及び23に示す。

[0192] (結果)

図21から明らかなとおり、グラム染色により、HG-2株(A)及びB E s h u t t l e株(B)それぞれについて腫瘍組織中に菌の存在が確認された(図21(A)及び(B)、矢印部分)。一方、抗h I F N- γ 抗体による免疫組織染色により、共発現株HG-2株を投与した担癌マウスの腫瘍組織において、h I F N- γ 陽性像が確認された(図22、矢印で示す緑色部分)。また、ヒスチジンタグの免疫組織染色によりヒスチジンタグ陽性像(抗HER2 s c F v及びh I F N- γ)が確認された(図23、矢印で示す赤色部分)。これらの結果より、HG-2株をヒト胃癌NCI-N87担癌マウスに静脈内投与すると、腫瘍内にHG-2株が生着し、HG-2株から分泌されたh I F N- γ 及び抗HER2 s c F vタンパク質が腫瘍内に同時に存在していることが確認された。

[0193] [実施例18]

[抗ヒトPD-1 s c F v 03-H i s及び抗ヒトCTLA-4 s c F v 01-FLAG共発現株の作製]

抗ヒトPD-1 s c F v 03-H i s及び抗ヒトCTLA-4 s c F v 01-FLAGを分泌する、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、共発現プラスミドpPC2、pPC3、pPC4、pPC5、pPC6、pPC7、及びpPC8を作製し、これら7種類の共発現プラスミドそれぞれを用いてビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換を行った。

[0194] 7種類の共発現プラスミドpPC2~pPC8における、抗ヒトPD-1 s c F v 03-H i s発現カセット及び抗ヒトCTLA-4 s c F v 01-

FLAG発現カセットの構成を以下の表13-1及び表13-2に示した。プラスミド分子内の相同配列を回避するため、各発現カセット内のプロモーターDNA、ターミネーターDNA、タグ及びシグナルペプチドーリンカーペプチド連結体をコードするDNA配列は、同一の構成を含まないようにした。

[0195] [表13-1]

plasmid	anti-hPD-1 scFv03-His expression cassette				
	promoter	SP/Linker	scFv	tag	terminator
pPC2	Hu	SP50L5	anti-hPD-1 scFv03	His	Hu
pPC3	Hu	SP50L5	anti-hPD-1 scFv03	His	Hu
pPC4	Hu	SP67L10	anti-hPD-1 scFv03	His	Hu
pPC5	Hu	SP67L10	anti-hPD-1 scFv03	His	Hu
pPC6	Hu	SP69L1	anti-hPD-1 scFv03	His	Hu
pPC7	Hu	SP69L1	anti-hPD-1 scFv03	His	Hu
pPC8	Hu	SP69L1	anti-hPD-1 scFv03	His	Hu

[0196] [表13-2]

plasmid	anti-hCTLA-4 scFv01-FLAG expression cassette				
	promoter	SP/Linker	scFv	tag	terminator
pPC2	P30	SP67L1	anti-hCTLA-4 scFv01	FLAG	T2
pPC3	P30	SP68L1	anti-hCTLA-4 scFv01	FLAG	T2
pPC4	P30	SP50L5	anti-hCTLA-4 scFv01	FLAG	T2
pPC5	P30	SP68L1	anti-hCTLA-4 scFv01	FLAG	T2
pPC6	P30	SP50L5	anti-hCTLA-4 scFv01	FLAG	T2
pPC7	P30	SP67L1	anti-hCTLA-4 scFv01	FLAG	T2
pPC8	P30	SP68L1	anti-hCTLA-4 scFv01	FLAG	T2

[0197] (抗hPD-1 scFv03-His分泌発現カセットの構成)

抗hPD-1 scFv03-His分泌発現カセットとして、(1) HuプロモーターDNA、(2) シグナルペプチドーリンカーペプチド連結体をコードするDNA、(3) 抗hPD-1 scFv03アミノ酸配列をコード

するDNA、(4) Hisタグ配列をコードするDNA、及び(5) Hutter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を作製した。上記シグナルペプチドリンカーペプチド連結体としては、SP50L5(配列番号61のアミノ酸配列に配列番号83の最初の5個のアミノ酸配列(Ala Thr Leu Thr Pro)が結合した分泌シグナルペプチドリンカーペプチド連結体)、SP67L10(配列番号73のアミノ酸配列に配列番号95の最初の10個のアミノ酸配列(Ala Gly Val Asp Tyr Leu Pro Thr Ile Gly)が結合した分泌シグナルペプチドリンカーペプチド連結体)、又はSP69L1(配列番号77のアミノ酸配列に配列番号99の最初の1個のアミノ酸配列(Asp)が結合した分泌シグナルペプチドリンカーペプチド連結体)を使用した。

[0198] (抗hCTLA-4 scFv01-FLAG分泌発現カセットの構成)

抗hCTLA-4 scFv01-FLAG分泌発現カセットとして、(1) P30プロモーターDNA、(2) シグナルペプチドリンカーペプチド連結体をコードするDNA、(3) 抗hCTLA-4 scFv01のアミノ酸配列をコードするDNA、(4) FLAGタグ配列をコードするDNA、及び(5) T2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を作製した。上記シグナルペプチドリンカーペプチド連結体としては、SP50L5(配列番号61のアミノ酸配列に配列番号83の最初の5個のアミノ酸配列(Ala Thr Leu Thr Pro)が結合した分泌シグナルペプチドリンカーペプチド連結体)、SP67L1(配列番号73のアミノ酸配列に配列番号95の最初の1個のアミノ酸配列(Ala)が結合した分泌シグナルペプチドリンカーペプチド連結体)、又はSP68L1(配列番号75のアミノ酸配列に配列番号97の最初の1個のアミノ酸配列(Asp)が結合した分泌シグナルペプチドリンカーペプチド連結体)を使用した。

[0199] 共発現プラスミドpPC2～pPC8の、基本構成を図24に示す。

また、作製方法の概要を図25に示す。

(1) 第1工程では、共発現プラスミドpPC2～pPC8の作製に使用した鋳型プラスミド(pHuSPxLy-hPD-1scFv03-His(SPxLy=SP50L5, SP67L10, SP69L1))を作製した。

(2) 第2工程では、抗hPD-1scFv03-His発現プラスミドpHuSPxLy-hPD-1scFv03-His(SPxLy=SP50L5, SP67L10, SP69L1)の抗hPD-1scFv03-His発現カセットの下流にT2ターミネーター断片を挿入したプラスミドpHuSPxLy-hPD-1scFv03-His-T2(SPxLy=SP50L5, SP67L10, SP69L1)を作製した。

(3) 第3工程では、第2工程にて作製したプラスミドのHuターミネーターとT2ターミネーターの間に、抗hCTLA-4scFv01-FLAG発現カセット(但し、ターミネーターを除く)を挿入し、共発現プラスミドpPC2～pPC8の作製を行った。

[0200] (第1工程)

A工程：実施例8にて作製したプラスミドpHuSP7L20-hPD-1scFv03(scFv配列の3'末端にヒスチジンタグが付加)を鋳型DNAとして作製した直鎖ベクター(vector)と、105-AゲノムDNAから作製したSP50インサート(insert)、SP67インサート、SP69インサートとのPCR産物を調製した。プライマーは、PCR産物の末端15bpが、次工程のIn-fusion反応において連結する隣接PCR産物の末端15bpと同配列になるよう設計した。伸長反応時間は1kbpあたり1分を目安とした。ここでのPCR増幅工程を「PCR増幅工程1」とする)。

[0201] 上記直鎖ベクターと各インサートを、HDキットを用いてインフュージョン反応にて連結した。上記(実施例1：大腸菌の形質転換及びプラスミドpAG8のDNA配列確認)と同様の手順にて、インフュージョン反応液を用

いて上記大腸菌HST16CRコンピテント細胞の形質転換、組換え大腸菌からのプラスミド抽出を行い、抽出したプラスミドにおける“抗hPD-1 scFv03-His発現カセット領域”（HuプロモーターからHuターミネーターを含む）の配列決定を行った（以下、インフュージョン反応から配列決定までは、同様の手順で行われる）。抽出したプラスミドをpHuSP50L20-hPD-1 scFv03-His、pHuSP67L20-hPD-1 scFv03-His及びpHuSP69L20-hPD-1 scFv03-Hisと名付けた。

[0202] B工程：上記pHuSP50L20-hPD-1 scFv03-His、pHuSP67L20-hPD-1 scFv03-His及びpHuSP69L20-hPD-1 scFv03-Hisから作製したSP50L5インサート、SP67L10インサート、SP69L1インサートのPCR産物を調製した。

[0203] A工程において作製した直鎖ベクターと、上記SP50L5インサート、SP67L10インサート、SP69L1インサートとを、前記同様にHDキットを用いて連結し、“抗hPD-1 scFv03-His発現カセット領域”の配列決定を行った。抽出したプラスミドをpHuSP50L5-hPD-1 scFv03-His、pHuSP67L10-hPD-1 scFv03-His及びpHuSP69L1-hPD-1 scFv03-Hisと名付けた。

[0204] （第2工程）

（T2ターミネーターの作製）

（配列番号101）をジェンスクリプトジャパン株式会社に合成を依頼し、T2ターミネーターと名付けた。プラスミドベクターpUC57に組込まれたDNA（Bba-B0015 in pUC57）として納品された。

[0205] 上記pHuSP50L5-hPD-1 scFv03-His、pHuSP67L10-hPD-1 scFv03-His及びpHuSP69L1-hPD-1 scFv03-Hisをそれぞれ鋳型DNAとして、PC1__pr

i mer（配列番号102）をフォワードプライマーとして、PC2__p r i mer（配列番号103）をリバープライマーとして用いていずれも上記PCR増幅1と同様にPCR産物を調製してA1，A2，又はA3の直鎖ベクターとした。PCR産物のサイズは、それぞれ、4751bp、4697bp、4661bpであった。

[0206] 上記Bba-B0015 in pUC57を鋳型DNAとして、PC3__p r i mer（配列番号104）をフォワードプライマーとして、PC4__p r i mer（配列番号105）をリバープライマーとして用いてPCR産物B（159bp）を調製した。

[0207] [表14]

Plasmid to be constructed	インフュージョン反応時の組合せ
pHuSP50L5-hPD-1 scFv03-His-T2	A1 and B
pHuSP67L10-hPD-1 scFv03-His-T2	A2 and B
pHuSP69L1-hPD-1 scFv03-His-T2	A3 and B

[0208] 上記表14に示す組合せで、前記同様にHDキットを用いて連結し、各“抗hPD-1 scFv03-His発現カセット及びT2ターミネーター領域”（5'-Huプロモーター-SPxLy-ヒトPD-1 scFv03-His-T2ターミネーター-3'）の配列決定を行った。抽出したプラスミドをpHuSP50L5-hPD-1 scFv03-His-T2、pHuSP67L10-hPD-1 scFv03-His-T2及びpHuSP69L1-hPD-1 scFv03-His-T2と名付けた。

[0209] [プラスミドphCTLAzの作製]

実施例8にて作製したプラスミドpHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAGのHuプロモーターをP30プロモーターに置換した。概要を図26に示す。

[0210] pHuSP7L20-hCTLA-4 scFv02FLAGを鋳型DNAとしてvec__F5__p r i mer（配列番号106）をフォワードプライ

マーとして、*vec_R2_primer*（配列番号107）をリバースプライマーとして用いて作製した直鎖ベクターのPCR産物（4410bp）と、105-AゲノムDNAを鋳型として*P30_F1_primer*（配列番号108）をフォワードプライマーとして、*P30_R1_primer*（配列番号109）をリバースプライマーとして用いてインサートのPCR産物（245bp）を調製した。かかる直鎖ベクター及びインサートを、前記同様にHDキットを用いて連結し、抽出したプラスミドの全長配列の決定を行った。抽出したプラスミドを*phCTLA1*と名付けた。

[0211]（プラスミド*phCTLAz*（ $z=4, 10, 11$ ）の作製）

上記で作製したプラスミド*phCTLA1*のシグナルペプチド配列をSP7からSP50、SP67及びSP68に置換した。

[0212] 表15に示す鋳型DNA及びプライマーを使用して、PCR増幅1と同様にPCR増幅を行い、ベクター及びインサートを調製した。

[0213] [表15]

PCRに使用した鋳型及びプライマー

PCR 産物	鋳型 DNA	Fow. Primer (フォワードプライマー)	Rev. primer (リバースプライマー)	PCR産物 サイズ
Vector	<i>phCTLA1</i>	<i>hCTLA3_primer</i> (配列番号 110)	<i>P30_R1_primer</i> (配列番号 109)	4466 bp
Insert-SP50	<i>B. longum</i> 105A genome	<i>SP50-ins_F2_primer</i> (配列番号 111)	<i>SP50-ins_R6_primer</i> (配列番号 112)	258 bp
Insert-SP67	<i>B. longum</i> 105A genome	<i>SP67-ins_F2_primer</i> (配列番号 113)	<i>SP67-ins_R6_primer</i> (配列番号 114)	189 bp
Insert-SP68	<i>B. longum</i> 105A genome	<i>SP68-ins_F2_primer</i> (配列番号 115)	<i>SP68-ins_R6_primer</i> (配列番号 116)	219 bp

[0214] 上記表15記載のベクターと各インサートとを、前記同様にHDキットを用いて連結し、“抗*hCTLA-4 scFv*02-FLAGカセット領域”の配列決定を行った。抽出したプラスミドを*phCTLA4*（SP50の場合）、*phCTLA10*（SP67の場合）、*phCTLA11*（SP68の場合）と名付けた。

[0215] (pP30SPx'Ly'-hCTLA-4scFv01-Hisの作製)
作製概要を図27に示した。

[0216] (抗CTLA-4一本鎖抗体の発現カセットの作製)

WO2015/166640における[pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1の作製]を参照して、pHuSP7L20-scFv-CTLA-4-1を作製し、本実施例においては、pHuSP7L20-hCTLA-4scFv01-Hisと名付けた。

[0217] 表16に示す鋳型DNA及びプライマーを使用して、上記PCR増幅1と同様にPCR産物を調製した。

[0218] [表16]

PCR product	鋳型 DNA	Fow. primer	Rev. primer	PCR産物 サイズ
A	pHuSP7L20-hCTLA-4 scFv01-His	hCTLA3_primer	GA6_primer (配列番号117)	4020 bp
B-SP50L5	phCTLA4	GA5_primer_rev (配列番号118)	SP50L5-ins_R1_hPD1_03 (配列番号128)	671 bp
B-SP67L1	phCTLA10	GA5_primer_rev	SP67L1-ins_R1_hPD1_03 (配列番号129)	590 bp
B-SP68L1	phCTLA11	GA5_primer_rev	SP68L1-ins_R1_hPD1_03 (配列番号130)	620 bp

[0219] 上記表16記載のPCR産物Aと、各Bとを、前記同様にHDキットを用いて連結し、“抗hCTLA-4scFv01-Hiscaset領域”の配列決定を行った。抽出したプラスミドをpP30SP50L5-hCTLA-4scFv01-His、pP30SP67L1-hCTLA-4scFv01-His及びpP30SP68L1-hCTLA-4scFv01-Hisと名付けた。

[0220] [プラスミドpP30SPx'Ly'-hCTLA-4scFv01-FLAGの作製]

上記で作製したプラスミドpP30SPx'Ly'-hCTLA-4scFv01-His (SPx'Ly' = SP50L5, SP67L1, SP6

8 L 1) のヒスチジンタグを F L A G タグに変更した。概要を図 2 8 に示す。以降、抗 h C T L A - 4 s c F v の場合に S P x' L y' と表すことがある。

[0221] 表 1 7 に示す鋳型 D N A 及びプライマーを使用して、上記 P C R 増幅 1 と同様に P C R 産物を調製した。

[0222] [表17]

P C R 産物	鋳型 D N A	Fow. primer	Rev. primer	P C R 産物 サイズ
A	pP30SP50L5-hCTLA-4 scFv01-His	hCTLA15_primer (配列番号 1 2 0)	GA6_primer	3280 bp
B-SP50L5	pP30SP50L5-hCTLA-4 scFv01-His	GA5_primer_rev	hCTLA16_primer (配列番号 1 1 9)	1417 bp
B-SP67L1	pP30SP67L1-hCTLA-4 scFv01-His	GA5_primer_rev	hCTLA16_primer	1336 bp
B-SP68L1	pP30SP68L1-hCTLA-4 scFv01-His	GA5_primer_rev	hCTLA16_primer	1366 bp

[0223] 上記表 1 7 記載の P C R 産物 A と、各 P C R 産物 B とを、前記同様に H D キットを用いて連結し、“抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G カセット領域”の配列決定を行った。抽出したプラスミドを p P 3 0 S P 5 0 L 5 - h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G (以下、p C 1 F という)、p P 3 0 S P 6 7 L 1 - h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G (以下、p C 2 F という) 及び p P 3 0 S P 6 8 L 1 - h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G (以下、p C 3 F という) と名付けた。

[0224] (第 3 工程)

表 1 8 に示す鋳型 D N A 及びプライマーを使用して、上記 P C R 増幅 1 と同様に P C R 産物を調製した。

[0225]

[表18]

PCR 産物	鋳型 DNA	Fow. primer	Rev. primer	PCR産物 サイズ
A7	pHuSP50L5-hPD-1 scFv03-His-T2	PC5_primer (配列番号 1 2 1)	PC2_primer	4886 bp
A8	pHuSP67L10-hPD-1 scFv03-His-T2	PC5_primer	PC2_primer	4832bp
A9	pHuSP69L1-hPD-1 scFv03-His-T2	PC5_primer	PC2_primer	4796 bp
B1	pC1F	PC6_primer (配列番号 1 2 2)	PC7_primer (配列番号 1 2 3)	1210 bp
B2	pC2F	PC6_primer	PC7_primer	1129 bp
B3	pC3F	PC6_primer	PC7_primer	1159 bp

[0226] [表19]

Plasmid to be constructed	インフュージョン反応時の組合せ
pPC2	A7 and B2
pPC3	A7 and B3
pPC4	A8 and B1
pPC5	A8 and B3
pPC6	A9 and B1
pPC7	A9 and B2
pPC8	A9 and B3

[0227] 上記表 18 記載の PCR 産物を上記表 19 に示す組合せで前記同様に HD キットを用いて連結し、抽出したプラスミドの全長 DNA 配列決定を行った。抽出したプラスミドを pPC2、pPC3、pPC4、pPC5、pPC6、pPC7 及び pPC8 と名付けた。それぞれの概要を示す。

[0228] (pPC2 の scFv 発現カセット配列 (2618bp) (配列番号 131))

1 . . 1 3 8 4 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 - H i s 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 5 4 4 S P 5 0 L 5

5 4 5 . . 1 2 4 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 2 5 0 . . 1 2 6 7 H i s タグ

1 2 6 8 . . 1 2 7 0 停止コドン

1 2 7 1 . . 1 3 8 4 H u ターミネーター

1 3 8 5 . . 2 6 1 8 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 - F L A G 発現カセット

1 3 8 5 . . 1 6 1 9 P 3 0 プロモーター

1 6 2 0 . . 1 7 2 1 S P 6 7 L 1

1 7 2 2 . . 2 4 6 2 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 4 6 3 . . 2 4 8 6 F L A G タグ

2 4 8 7 . . 2 4 8 9 停止コドン

2 4 9 0 . . 2 6 1 8 T 2 ターミネーター

[0229] (p P C 3 の s c F v 発現カセット配列 (2 6 4 8 b p) (配列番号 1 3 2))

1 . . 1 3 8 4 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 - H i s 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 5 4 4 S P 5 0 L 5

5 4 5 . . 1 2 4 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 2 5 0 . . 1 2 6 7 H i s タグ

1 2 6 8 . . 1 2 7 0 停止コドン

1 2 7 1 . . 1 3 8 4 H u ターミネーター

1 3 8 5 . . 2 6 4 8 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 - F L A G 発現カセット

1 3 8 5 . . 1 6 1 9 P 3 0 プロモーター
1 6 2 0 . . 1 7 5 1 S P 6 8 L 1
1 7 5 2 . . 2 4 9 2 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1
2 4 9 3 . . 2 5 1 6 F L A G タグ
2 5 1 7 . . 2 5 1 9 停止コドン
2 5 2 0 . . 2 6 4 8 T 2 ターミネーター

[0230] (pPC4のscFv発現カセット配列(2645bp)(配列番号133))

1 . . 1 3 3 0 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 - H i s 発現カセット
1 . . 3 6 1 H u プロモーター
3 6 2 . . 4 9 0 S P 6 7 L 1 0
4 9 1 . . 1 1 9 5 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3
1 1 9 6 . . 1 2 1 3 H i s タグ
1 2 1 4 . . 1 2 1 6 停止コドン
1 2 1 7 . . 1 3 3 0 H u ターミネーター

1 3 3 1 . . 2 6 4 5 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 - F L A G 発現カセット
1 3 3 1 . . 1 5 6 5 P 3 0 プロモーター
1 5 6 6 . . 1 7 4 8 S P 5 0 L 5
1 7 4 9 . . 2 4 8 9 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1
2 4 9 0 . . 2 5 1 3 F L A G タグ
2 5 1 4 . . 2 5 1 6 停止コドン
2 5 1 7 . . 2 6 4 5 T 2 ターミネーター

[0231] (pPC5のscFv発現カセット配列(2594bp)(配列番号134))

1 . . 1 3 3 0 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 - H i s 発現カセット
1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 9 0 S P 6 7 L 1 0

4 9 1 . . 1 1 9 5 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 9 6 . . 1 2 1 3 H i s タグ

1 2 1 4 . . 1 2 1 6 停止コドン

1 2 1 7 . . 1 3 3 0 H u ターミネーター

1 3 3 1 . . 2 5 9 4 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 - F L A G 発現カ
セット

1 3 3 1 . . 1 5 6 5 P 3 0 プロモーター

1 5 6 6 . . 1 6 9 7 S P 6 8 L 1

1 6 9 8 . . 2 4 3 8 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 4 3 9 . . 2 4 6 2 F L A G タグ

2 4 6 3 . . 2 4 6 5 停止コドン

2 4 6 6 . . 2 5 9 4 T 2 ターミネーター

[0232] (p P C 6 の s c F v 発現カセット配列 (2 6 0 9 b p) (配列番号 1 3 5
))

1 . . 1 2 9 4 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 - H i s 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 5 4 S P 6 9 L 1

4 5 5 . . 1 1 5 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 6 0 . . 1 1 7 7 H i s タグ

1 1 7 8 . . 1 1 8 0 停止コドン

1 1 8 1 . . 1 2 9 4 H u ターミネーター

1 2 9 5 . . 2 6 0 9 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 - F L A G 発現カ
セット

1 2 9 5 . . 1 5 2 9 P 3 0 プロモーター

1 5 3 0 . . 1 7 1 2 S P 5 0 L 5

1 7 1 3 . . 2 4 5 3 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 4 5 4 . . 2 4 7 7 F L A G タグ

2 4 7 8 . . 2 4 8 0 停止コドン

2 4 8 1 . . 2 6 0 9 T 2 ターミネーター

[0233] (p P C 7 の s c F v 発現カセット配列 (2 5 2 8 b p) (配列番号 1 3 6
))

1 . . 1 2 9 4 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 - H i s 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 5 4 S P 6 9 L 1

4 5 5 . . 1 1 5 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 6 0 . . 1 1 7 7 H i s タグ

1 1 7 8 . . 1 1 8 0 停止コドン

1 1 8 1 . . 1 2 9 4 H u ターミネーター

1 2 9 5 . . 2 5 2 8 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 - F L A G 発現カ
セット

1 2 9 5 . . 1 5 2 9 P 3 0 プロモーター

1 5 3 0 . . 1 6 3 1 S P 6 7 L 1

1 6 3 2 . . 2 3 7 2 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 3 7 3 . . 2 3 9 6 F L A G タグ

2 3 9 7 . . 2 3 9 9 停止コドン

2 4 0 0 . . 2 5 2 8 T 2 ターミネーター

[0234] (p P C 8 の s c F v 発現カセット配列 (2 5 5 8 b p) (配列番号 1 3 7
))

1 . . 1 2 9 4 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 - H i s 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 5 4 S P 6 9 L 1

4 5 5 . . 1 1 5 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1160. . . 1177 Hisタグ

1178. . . 1180 停止コドン

1181. . . 1294 Huターミネーター

1295. . . 2558 抗ヒトCTLA-4 scFv 01-FLAG発現カセット

1295. . . 1529 P30プロモーター

1530. . . 1661 SP68L1

1662. . . 2402 抗ヒトCTLA-4 scFv 01

2403. . . 2426 FLAGタグ

2427. . . 2429 停止コドン

2430. . . 2558 T2ターミネーター

[0235] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換10)

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミド pPC2、pPC3、pPC4、pPC5、pPC6、pPC7及びpPC8を5 μ Lずつ用いた他は、上記(ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1)と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC2(以下、PC2株という)、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC3(以下、PC3株という)、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC4(以下、PC4株という)、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC5(以下、PC5株という)、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC6(以下、PC6株という)、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC7(以下、PC7株という)及びビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC8(以下、PC8株という)とした。

[0236] [実施例19]

[PC2TL株-PC8TL株の作製]

臨床開発を念頭に、上記実施例 18 にて作製したプラスミドより s c F v のマーカートグ（ヒスチジントグ／F L A G タグ）及び大腸菌中でのプラスミド複製起点 p U C o r i を除去した、抗ヒト P D - 1 s c F v 03 及び抗ヒト C T L A - 4 s c F v 01 を共発現するプラスミド p P C 2 T L ~ p P C 8 T L を作製した。これらのプラスミドにてビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A の形質転換を行い、共発現株 P C 2 T L 株 ~ P C 8 T L 株を取得した。

[0237] 共発現株 P C 2 T L 株 ~ P C 8 T L 株の基本的なプラスミド構成を図 29 に示す。7 種類のタグ無共発現プラスミド p P C 2 T L ~ p P C 8 T L における、抗ヒト P D - 1 s c F v 03 発現カセット及び抗ヒト C T L A - 4 s c F v 01 発現カセットの構成を以下の表 20 及び表 21 に示した。

[0238] [表20]

Plasmid	Anti-hPD-1 scFv03 expression cassette (タグ無し)				
	Promoter	SP/Linker	scFv	Tag	Terminator
pPC2TL	Hu	SP50L5	anti-hPD-1 scFv03	-	Hu
pPC3TL	Hu	SP50L5	anti-hPD-1 scFv03	-	Hu
pPC4TL	Hu	SP67L10	anti-hPD-1 scFv03	-	Hu
pPC5TL	Hu	SP67L10	anti-hPD-1 scFv03	-	Hu
pPC6TL	Hu	SP69L1	anti-hPD-1 scFv03	-	Hu
pPC7TL	Hu	SP69L1	anti-hPD-1 scFv03	-	Hu
pPC8TL	Hu	SP69L1	anti-hPD-1 scFv03	-	Hu

[0239]

[表21]

Plasmid	Anti-hCTLA-4 scFv01 expression cassette (タグ無し)				
	Promoter	SP/Linker	scFv	Tag	Terminator
pPC2TL	P30	SP67L1	anti-hCTLA-4 scFv01	-	T2
pPC3TL	P30	SP68L1	anti-hCTLA-4 scFv01	-	T2
pPC4TL	P30	SP50L5	anti-hCTLA-4 scFv01	-	T2
pPC5TL	P30	SP68L1	anti-hCTLA-4 scFv01	-	T2
pPC6TL	P30	SP50L5	anti-hCTLA-4 scFv01	-	T2
pPC7TL	P30	SP67L1	anti-hCTLA-4 scFv01	-	T2
pPC8TL	P30	SP68L1	anti-hCTLA-4 scFv01	-	T2

[0240] (抗hPD-1 scFv03分泌発現カセットの構成)

抗hPD-1 scFv03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-リンカーペプチド連結体をコードするDNA、(3) 抗hPD-1 scFv03アミノ酸配列をコードするDNA、及び(4) HuターミネーターDNAを、(1)を上流(5'末端)側として(4)を下流(3'末端)側として、(1)～(4)のDNAを順次含むカセットを作製した。上記シグナルペプチド-リンカーペプチド連結体としては、SP50L5、SP67L10又はSP69L1を使用した。

[0241] (抗hCTLA-4 scFv01分泌発現カセットの構成)

抗hCTLA-4 scFv01分泌発現カセットとして、(1) P30プロモーターDNA、(2) シグナルペプチド-リンカーペプチド連結体をコードするDNA、(3) 抗hCTLA-4 scFv01のアミノ酸配列をコードするDNA、及び(4) T2ターミネーターDNAを、(1)を上流(5'末端)側として(4)を下流(3'末端)側として、(1)～(4)のDNAを順次含むカセットを作製した。上記シグナルペプチド-リンカーペプチド連結体としては、SP50L5、SP67L1又はSP68L1を使用した。

[0242] (pPC2TL～pPC8TLの作製方法)

プラスミドの作製方法の概要を図30に示した。以下の4工程よりなる。

(1) 第1工程では、共発現プラスミドpPC2TL-pPC8TLの作製に使用した鋳型プラスミドpHuSPxLy-hPD-1scFv03TLを作製した。

(2) 第2工程では、抗hPD-1scFv03（タグ無）発現プラスミドの抗PD-1scFv03発現カセットの下流にT2ターミネーター断片を挿入したプラスミドpHuSPxLy-hPD-1scFv03TL-T2（SPxLy=SP50L5, SP67L10, SP69L1）を作製した。

(3) 第3工程では、第2工程にて作製したプラスミドのHuターミネーターとT2ターミネーターの間に、抗hCTLA-4scFv01（タグ無）発現カセット（但し、ターミネーターを除く）を挿入したプラスミドpPC2TLS~pPC8TLSを作製した。

(4) 第4工程では、第3工程にて作製したプラスミドより大腸菌中でのプラスミド複製起点であるpUCori断片を制限酵素にて切断、除去後、自己閉環した共発現プラスミド（タグなし、非シャトル）pPC2TL~pPC8TLの作製を行った。

[0243] (第1工程)

前記pHuSP50L5-hPD-1scFv03-Hisを鋳型DNAとして、pCDshuttle_F1__プライマー（配列番号126）をフォワードプライマーとして、GA6__プライマーをリバープライマーとして用いていずれも上記PCR増幅1と同様にPCR産物A-1（3261bp）を調製した。pHuSP50L5-hPD-1scFv03-His、pHuSP67L10-hPD-1scFv03-His及びpHuSP69L1-hPD-1scFv03-Hisをそれぞれ鋳型DNAとして、GA5__primer__revプライマーをフォワードプライマーとして、hPD1scFv03-1__プライマー（配列番号127）をリバープライマーとして用いて上記PCR増幅1と同様にPCR産物B-SP50L5（

1502bp)、B-SP67L10(1448bp)、B-SP69L1(1412bp)をそれぞれ調製した

[0244] 上記PCR産物A-1と、B-SP50L5、B-SP67L10、B-SP69L1それぞれとを、前記同様にHDキットを用いて連結し、“抗hPD-1scFv03発現カセット領域”(HuプロモーターからHuターミネーターを含む)の配列決定を行った。抽出したプラスミドをpHuSP50L5-hPD-1scFv03TL、pHuSP67L10-hPD-1scFv03TL及びpHuSP69L1-hPD-1scFv03TLと名付けた。

[0245] (第2工程)

表22に示す鋳型DNA及びプライマーを使用して、上記PCR増幅1と同様にPCR産物を調製した。

[0246] [表22]

PCR産物	鋳型 DNA	Fow. primer	Rev. primer	PCR産物 サイズ
A4	pHuSP50L5-hPD-1 scFv03TL	PC1_primer	PC2_primer	4733 bp
A5	pHuSP67L10-hPD-1 scFv03TL	PC1_primer	PC2_primer	4679 bp
A6	pHuSP69L1-hPD-1 scFv03TL	PC1_primer	PC2_primer	4643 bp
B	Bba-B0015 in pUC57	PC3_primer	PC4_primer	159 bp

[0247] [表23]

Plasmid to be constructed	インフュージョン反応時の組合せ
pHuSP50L5-hPD-1 scFv03TL-T2	A4 and B
pHuSP67L10-hPD-1 scFv03TL-T2	A5 and B
pHuSP69L1-hPD-1 scFv03TL-T2	A6 and B

[0248] 上記表22記載のPCR産物を上記表23に示す組合せで前記同様にHDキットを用いて連結し、“抗hPD-1scFv03(タグなし)発現カセット及びT2ターミネーター領域”(5'-Huプロモーター-SPxLy

ーヒトPD-1 scFv03-Huターミネーター-T2ターミネーター-3')の配列決定を行った。抽出したプラスミドをpHuSP50L5-hPD-1 scFv03TL-T2、pHuSP67L10-hPD-1 scFv03TL-T2及びpHuSP69L1-hPD-1 scFv03TL-T2と名付けた。

[0249] (第3工程)

表24に示す鋳型DNA及びプライマーを使用して、上記PCR増幅1と同様にPCR産物を調製した。

[0250] [表24]

PCR産物	鋳型DNA	Fow. primer	Rev. primer	PCR産物サイズ
A10	pHuSP50L5-hPD-1 scFv03TL-T2	PC8_primer (配列番号124)	PC2_primer	4868 bp
A11	pHuSP67L10-hPD-1 scFv03TL-T2	PC8_primer	PC2_primer	4814 bp
A12	pHuSP69L1-hPD-1 scFv03TL-T2	PC8_primer	PC2_primer	4778 bp
B4	pP30SP50L5-hCTLA-4 scFv01-FLAG	PC6_primer (配列番号122)	PC9_primer (配列番号125)	1186 bp
B5	pP30SP67L1-hCTLA-4 scFv01-FLAG	PC6_primer	PC9_primer	1105 bp
B6	pP30SP68L1-hCTLA-4 scFv01-FLAG	PC6_primer	PC9_primer	1135 bp

[0251] [表25]

Plasmid to be constructed	インフュージョン反応時の組合せ
pPC2TLS	A10 and B5
pPC3TLS	A10 and B6
pPC4TLS	A11 and B4
pPC5TLS	A11 and B6
pPC6TLS	A12 and B4
pPC7TLS	A12 and B5
pPC8TLS	A12 and B6

[0252] 上記表 2 4 記載の P C R 産物を上記表 2 5 に示す組合せで前記同様に H D キットを用いて連結し、抽出したプラスミドの全長 D N A 配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミドを p P C 2 T L S、p P C 3 T L S、p P C 4 T L S、p P C 5 T L S、p P C 6 T L S、p P C 7 T L S 及び p P C 8 T L S と名付けた。

[0253] (第 4 工程)

上記プラスミド作製の第 3 工程にて作製したプラスミド p P C 2 T L S ~ p P C 8 T L S 各 2 μ g に、制限酵素 B a m H I 及び B g I I I (サーモサイエンティフィック社製) を各 1 0 ユニットずつ添加し、3 7 °C で 3 時間の保温により切断した。B a m H I 及び B g I I I 認識部位は、図 3 0 に示すとおり、大腸菌中でのプラスミド複製起点である p U C o r i の隣接部分に 1 箇所ずつある。制限酵素処理後の D N A 溶液の一部を用いて、プラスミド D N A が予定のサイズ (約 5 . 3 k b p 及び約 0 . 7 k b p) に切断されていることを、0 . 8 % アガロースゲルを用いて電気泳動にて確認した。

[0254] (アガロースゲル電気泳動による分離及び精製)

上記制限酵素処理後の D N A を、アガロースゲルを用いた電気泳動にて分離し、約 5 . 3 k b p の D N A バンドを切出し、Q I A G e l を用いて D N A 抽出を行った。この D N A 濃度をアガロースゲル電気泳動にて見積もった。

[0255] (D N A の自己閉環)

上記の約 5 . 3 k b p の精製 D N A を R a p i d D N A L i g a t i o n キット (サーモサイエンティフィック社製) を用いてセルフライゲーション反応を行った。反応終了後の溶液を、Q I A q u i c k P C R P u r i f i c a t i o n K i t (キアゲン株式会社製) により精製し、p P C 2 T L、p P C 3 T L、p P C 4 T L、p P C 5 T L、p P C 6 T L、p P C 7 T L 及び p P C 8 T L を作製した。

[0256] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換 1 1)

上記プラスミド作製の第 4 工程にて調製したプラスミド p P C 2 T L、p

PC3TL、pPC4TL、pPC5TL、pPC6TL、pPC7TL及びpPC8TLを5 μ L用いた他は、上記（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体をビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC2TL（以下、PC2TL株という）、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC3TL（以下、PC3TL株という）、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC4TL（以下、PC4TL株という）、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC5TL（以下、PC5TL株という）、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC6TL（以下、PC6TL株という）、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC7TL（以下、PC7TL株という）及びビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pPC8TL（以下、PC8TL株という）とした。

[0257]（プラスミドDNAの配列確認）

上記（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換11）にて取得したビフィドバクテリウム属細菌形質転換体の菌体に、リゾチーム（和光純薬工業社製）とProteinase K（キアゲン株式会社製）とをそれぞれ40mg/mL及び0.4mg/mLになるよう1mMのTris-HCl-0.1mM EDTA バッファー（pH8.0）にて調製した、リゾチーム-Proteinase K混合液1.5mLを加えて懸濁し、37℃にて約1.5時間保温した。遠心分離にて上清を除去した菌体を用いて、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン株式会社製）にてプラスミドDNAを抽出した。上記（実施例1：大腸菌の形質転換及びプラスミドpAG8のDNA配列確認）と同様に、抽出したプラスミドの全長DNA配列決定を行った。抽出したプラスミドをプラスミドpPC2TL、pPC3TL、pPC4TL、pPC5TL、pPC6TL、pPC7TL及びpPC8TLと名付けた。概要を以下に示す。プラスミドpPC2TL、pPC3TL、pPC4TL、pPC5TL、pPC6TL、pPC7TL及びpPC

8 T L の発現カセット配列は、抗 h P D - 1 s c F v 0 3 の発現カセット配列及び抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 の発現カセット配列がいずれもタグ配列を含まないこと以外は、それぞれ p P C 2、p P C 3、p P C 4、p P C 5、p P C 6、p P C 7 及び p P C 8 配列と同じである。

[0258] (p P C 2 T L の s c F v 発現カセット配列 (2 5 7 6 b p) (配列番号 1 3 8))

1 . . 1 3 6 6 抗ヒト P D - 1 s c F v 0 3 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 5 4 4 S P 5 0 L 5

5 4 5 . . 1 2 4 9 抗ヒト P D - 1 s c F v 0 3

1 2 5 0 . . 1 2 5 2 停止コドン

1 2 5 3 . . 1 3 6 6 H u ターミネーター

1 3 6 7 . . 2 5 7 6 抗ヒト C T L A - 4 s c F v 0 1 発現カセット

1 3 6 7 . . 1 6 0 1 P 3 0 プロモーター

1 6 0 2 . . 1 7 0 3 S P 6 7 L 1

1 7 0 4 . . 2 4 4 4 抗ヒト C T L A - 4 s c F v 0 1

2 4 4 5 . . 2 4 4 7 停止コドン

2 4 4 8 . . 2 5 7 6 T 2 ターミネーター

[0259] (p P C 3 T L の s c F v 発現カセット配列 (2 6 0 6 b p) (配列番号 1 3 9))

1 . . 1 3 6 6 抗ヒト P D - 1 s c F v 0 3 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 5 4 4 S P 5 0 L 5

5 4 5 . . 1 2 4 9 抗ヒト P D - 1 s c F v 0 3

1 2 5 0 . . 1 2 5 2 停止コドン

1 2 5 3 . . 1 3 6 6 H u ターミネーター

1 3 6 7 . . 2 6 0 6 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 発現カセット

1 3 6 7 . . 1 6 0 1 P 3 0 プロモーター

1 6 0 2 . . 1 7 3 3 S P 6 8 L 1

1 7 3 4 . . 2 4 7 4 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 4 7 5 . . 2 4 7 7 停止コドン

2 4 7 8 . . 2 6 0 6 T 2 ターミネーター

[0260] (p P C 4 T L の s c F v 発現カセット配列 (2 6 0 3 b p) (配列番号 1 4 0))

1 . . 1 3 1 2 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 9 0 S P 6 7 L 1 0

4 9 1 . . 1 1 9 5 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 9 6 . . 1 1 9 8 停止コドン

1 1 9 9 . . 1 3 1 2 H u ターミネーター

1 3 1 3 . . 2 6 0 3 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 発現カセット

1 3 1 3 . . 1 5 4 7 P 3 0 プロモーター

1 5 4 8 . . 1 7 3 0 S P 5 0 L 5

1 7 3 1 . . 2 4 7 1 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 4 7 2 . . 2 4 7 4 停止コドン

2 4 7 5 . . 2 6 0 3 T 2 ターミネーター

[0261] (p P C 5 T L の s c F v 発現カセット配列 (2 5 5 2 b p) (配列番号 1 4 1))

1 . . 1 3 1 2 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 9 0 S P 6 7 L 1 0

4 9 1 . . 1 1 9 5 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 9 6 . . 1 1 9 8 停止コドン

1 1 9 9 . . 1 3 1 2 H u ターミネーター

1 3 1 3 . . 2 5 5 2 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 発現カセット

1 3 1 3 . . 1 5 4 7 P 3 0 プロモーター

1 5 4 8 . . 1 6 7 9 S P 6 8 L 1

1 6 8 0 . . 2 4 2 0 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 4 2 1 . . 2 4 2 3 停止コドン

2 4 2 4 . . 2 5 5 2 T 2 ターミネーター

[0262] (p P C 6 T L の s c F v 発現カセット配列 (2 5 6 7 b p) (配列番号 1 4 2))

1 . . 1 2 7 6 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 5 4 S P 6 9 L 1

4 5 5 . . 1 1 5 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 6 0 . . 1 1 6 2 停止コドン

1 1 6 3 . . 1 2 7 6 H u ターミネーター

1 2 7 7 . . 2 5 6 7 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 発現カセット

1 2 7 7 . . 1 5 1 1 P 3 0 プロモーター

1 5 1 2 . . 1 6 9 4 S P 5 0 L 5

1 6 9 5 . . 2 4 3 5 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 4 3 6 . . 2 4 3 8 停止コドン

2 4 3 9 . . 2 5 6 7 T 2 ターミネーター

[0263] (p P C 7 T L の s c F v 発現カセット配列 (2 4 8 6 b p) (配列番号 1 4 3))

1 . . 1 2 7 6 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 5 4 S P 6 9 L 1

4 5 5 . . 1 1 5 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 6 0 . . 1 1 6 2 停止コドン

1 1 6 3 . . 1 2 7 6 H u ターミネーター

1 2 7 7 . . 2 4 8 6 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 発現カセット

1 2 7 7 . . 1 5 1 1 P 3 0 プロモーター

1 5 1 2 . . 1 6 1 3 S P 6 7 L 1

1 6 1 4 . . 2 3 5 4 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 3 5 5 . . 2 3 5 7 停止コドン

2 3 5 8 . . 2 4 8 6 T 2 ターミネーター

[0264] (p P C 8 T L の s c F v 発現カセット配列 (2 5 1 6 b p) (配列番号 1 4 4))

1 . . 1 2 7 6 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3 発現カセット

1 . . 3 6 1 H u プロモーター

3 6 2 . . 4 5 4 S P 6 9 L 1

4 5 5 . . 1 1 5 9 抗ヒトPD-1 s c F v 0 3

1 1 6 0 . . 1 1 6 2 停止コドン

1 1 6 3 . . 1 2 7 6 H u ターミネーター

1 2 7 7 . . 2 5 1 6 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1 発現カセット

1 2 7 7 . . 1 5 1 1 P 3 0 プロモーター

1 5 1 2 . . 1 6 4 3 S P 6 8 L 1

1 6 4 4 . . 2 3 8 4 抗ヒトCTLA-4 s c F v 0 1

2 3 8 5 . . 2 3 8 7 停止コドン

2 3 8 8 . . 2 5 1 6 T 2 ターミネーター

[0265] [実施例 2 0]

[共発現ビフィドバクテリウム属細菌株における s c F v 分泌確認]

共発現株 P C 2 株 ~ P C 8 株 の 培養上清中の抗 h P D - 1 s c F v 0 3 -

H i s 及び抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G の分泌の有無をウェスタンブロッティング法にて以下のとおり確認した。陰性コントロール株として前記 B E s h u t t l e 株についても同様に実施した。

[0266] (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養)

上記 P C 2 株～P C 8 株、及び実施例 8 で作製した P C 1 株、及び B E s h u t t l e 株について、実施例 4 (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養)と同様の手順にて培養し、培養上清を回収した。培養上清の T C A による濃縮を、上記実施例 9 (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養)と同様の手順にて行い、各培養上清濃縮物を得た。

[0267] (ウェスタン解析)

上記各培養上清濃縮物 (各培養液 0. 0 1 m L 相当) を用いて、実施例 9 (ウェスタン解析)と同様の方法にて、ウェスタン解析を行った。但し、ゲルから膜への転写は T r a n s - B l o t T u r b o (バイオ・ラッド社製)を使用し、ブロッキング溶液は、前記 2 % E C L A d v a n c e B l o c k i n g A g e n t を用いた。抗 h P D - 1 s c F v 0 3 - H i s についての結果を図 3 1 (A) に、抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G についての結果を図 3 1 (B) に示す。

[0268] (結果)

図 3 1 A 及び B から明らかなとおり、P C 2 株 (A 、 B ともレーン 1) 、 P C 3 株 (A 、 B ともレーン 2) 、 P C 4 株 (A 、 B ともレーン 3) 、 P C 5 株 (A 、 B ともレーン 4) 、 P C 6 株 (A 、 B ともレーン 5) 、 P C 7 株 (A 、 B ともレーン 6) 及び P C 8 株 (A 、 B ともレーン 7) 及び P C 1 株 (A 、 B ともレーン 9) の培養上清中には、抗 h P D - 1 s c F v 0 3 - H i s と抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G の両方の分泌がみとめられた (ただし、P C 1 株は抗 h C T L A - 4 s c F v 0 2 - F L A G) 。また、P C 2 株～P C 8 株から分泌された抗 h P D - 1 s c F v 0 3 - H i s 及び抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G の量は、P C 1 株から分泌された一本鎖抗体量よりも多かった。

[0269] 以上の結果より、共発現ビフィドバクテリウム属細菌株PC2株～PC8株は、培養上清中に抗hPD-1 s c F vと抗hCTLA-4 s c F vの両方を分泌できる組換えビフィドバクテリウム属細菌株であり、前記PC1株より多くの一本鎖抗体を分泌することが確認された。

[0270] [実施例21]

[共発現株PC2TL株～PC8TL株におけるs c F vの分泌確認]

上記共発現株PC2TL株～PC8TL株が分泌する抗体について、ヒトPD-1 (hPD-1) との結合活性の有無、及びヒトCTLA-4 との結合活性の有無につき、ELISA法にて確認した。

[0271] (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養)

上記実施例19で作製した共発現ビフィドバクテリウム属細菌PC2TL株～PC8TL株及びBEshuttle株について、実施例4 (組換えビフィドバクテリウム属細菌の培養) と同様の手順にて培養し、培養上清を回収した。PC2TL株～PC8TL株の培養上清を、BEshuttle株の培養上清にて適宜希釈して、ELISA用試料とした。

[0272] (抗hPD-1 s c F v 03の分泌評価)

96穴プレート (マキシソープ、C型、Nunc社製) に、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のhPD-1液 (抗原として使用。Recombinant Human PD-1 Fc Chimera、R&D Systems社を1×PBSにて調製) をそれぞれ $100\mu\text{L}$ ずつ分注し、プレート上部にシールを貼り4℃にて一晩静置して抗原を固相化した。プレートより液を除去後、1×PBSを $400\mu\text{L}$ ずつ分注し、液を除去した。これを3回繰り返し洗浄 (以下「PBS洗浄」) した。

[0273] 上記洗浄後のプレートに、1%BSA溶液を $350\mu\text{L}$ ずつ分注し室温にて2時間静置することでブロッキングを行い、PBS洗浄した。

[0274] 上記プレートに、ELISA用試料を分注し、ブランクのウェルには、BEshuttle株の培養上清 $100\mu\text{L}$ を分注した。また、陽性対照として、BEshuttle株の培養上清に抗hPD-1 s c F v 03精製物を

100 ng/mLの濃度になるよう調整した溶液100 μ Lを分注した。プレート上部にシールを貼り常温にて2時間静置して、固相化抗原へのscFv結合反応を行い、PBS洗浄した。

[0275] 上記固相化抗原へのscFv結合反応を行ったプレートに、0.2 μ g/mLビオチン化Protein L溶液（Biotinylated Protein L: Thermo Scientific社製を、Signal Enhancer HIKARI: ナカライテスク社製のB液にてうすめ0.2 μ g/mLに調製）100 μ Lを添加した。プレート上部にシールを貼り常温にて1時間静置し（scFvの軽鎖 κ 鎖へのビオチン化Protein Lの結合反応）、PBS洗浄した。

[0276] 上記ビオチン化Protein Lの結合反応後のプレートに、アビジン-ビオチン標識酵素複合体調整溶液（アビジン-ビオチン標識酵素複合体VECTASTAIN ABC Kit: ベクターラボラトリーズ社製のA液及びB液30 μ LずつをSignal Enhancer HIKARIのB液7.5 mLに添加・混合して調製した）100 μ Lを添加し、プレート上部にシールを貼り常温にて30分間静置し、PBS洗浄した。

[0277] 上記、酵素を結合させたプレートに、検出試薬（Color Reagent A及びColor Reagent B: 共にR&D Systems社製を等量混合）200 μ Lを添加し、遮光下常温にて静置した。正確に20分経過後、前記停止液50 μ Lを添加して呈色反応を停止した。プレートリーダーにて450 nm、及び570 nm（参照波長）での吸光度を測定した。

[0278] （抗hCTLA-4 scFv 01の分泌評価）

1) プレートに固相化する抗原として、1 μ g/mLのhCTLA-4溶液（（Recombinant Human CTLA-4-Fc Chimera、バイオレジェンド社製）を1 $\times$ PBSにて調製）を使用し、2) 陽性対照として、BEShuttle株の培養上清に抗hCTLA-4 scFv 01精製物を用い、3) ビオチン化Protein L溶液濃度を0.05 μ g/mLとした点を除き、上記（抗hPD-1 scFv 03の分泌評価）と

同様の方法にて実施した。結果を表 2 6 に示す。

[0279] [表26]

固相化抗原に対する s c F v の結合活性

Sample	Binding (OD450-570) to immobilized antigen	
	hPD-1 immobilized	hCTLA-4 immobilized
PC2TL	0.812	1.312
PC3TL	0.792	1.286
PC4TL	0.363	1.788
PC5TL	0.305	1.39
PC6TL	0.528	1.116
PC7TL	0.549	1.457
PC8TL	0.733	1.320
P.C. 1 (anti-hPD-1 scFv03)	0.667	n.t.
P.C. 2 (anti-hCTLA-4 scFv01)	n.t.	1.074

n.t.:実施なし, P.C.: 陽性対照

[0280] (結果)

表 2 6 から明らかとなっており、E L I S A 共発現株 P C 2 T L 株～P C 8 T L 株の培養上清は、固相化したヒト P D - 1 及びヒト C T L A - 4 の両方に結合する活性を有していた。なお、かかる s c F v の結合活性は、対応する抗原に特異的であることを確認している（データ記載せず）。

[0281] [実施例 2 2]

上記共発現ビフィドバクテリウム属細菌 P C 2 株～P C 8 株に対応する抗 h P D - 1 s c F v 0 3 - H i s 単独発現株及び抗 h C T L A - 4 s c F v 0 1 - F L A G 単独発現株を表 2 7 に示す。

[0282]

[表27]

共発現株	対応する 抗 hPD-1 scFv03-His 単独発現株	対応する 抗 hCTLA-4 scFv01-FLAG 単独発現株
PC2	P1H	C2F
PC3	P1H	C3F
PC4	P2H	C1F
PC5	P2H	C3F
PC6	P3H	C1F
PC7	P3H	C2F
PC8	P3H	C3F

[0283] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換12)

上記実施例18にて作製したプラスミド pHuSP50L5-hPD-1 scFv03-His、pHuSP67L10-hPD-1 scFv03-His 及び pHuSP69L1-hPD-1 scFv03-His を用いて、上記(ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換1)と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体を、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP50L5-hPD-1 scFv03-His (以下、P1H株という)、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP67L10-hPD-1 scFv03-His (以下、P2H株という) 及びビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pHuSP69L1-hPD-1 scFv03-His (以下P3H株という) とした。

[0284] 同様に、実施例18にて作製したプラスミド pC1F、pC2F 及び pC3F を用いてビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pC1F (以下、C1F株という)、ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pC2F (以下、C2F株という) 及びビフィドバクテリウム・ロンガム105-A/pC

3 F（以下、C 3 F株という）を得た。

[0285] [実施例 2 3]

上記共発現ビフィドバクテリウム属細菌 P C 2 T L－P C 8 T L 株に対応する抗 h P D－1 s c F v 0 3 単独発現株及び抗 h C T L A－4 s c F v 0 1 単独発現株を表 2 8 に示した。

[0286] [表28]

共発現株	対応する抗 hPD-1 scFv03 単独発現株	対応する抗 hCTLA-4 scFv01 単独発現株
PC2TL	P1TL	C2TLB
PC3TL	P1TL	C3TLB
PC4TL	P2TL	C1TLB
PC5TL	P2TL	C3TLB
PC6TL	P3TL	C1TLB
PC7TL	P3TL	C2TLB
PC8TL	P3TL	C3TLB

[0287] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換 1 3)

上記実施例 1 9 にて作製したプラスミド p H u S P 5 0 L 5－h P D－1 s c F v 0 3 T L、p H u S P 6 7 L 1 0－h P D－1 s c F v 0 3 T L 及び p H u S P 6 9 L 1－h P D－1 s c F v 0 3 T L を用いて、上記（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換 1）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5－A 株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体を、ビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5－A／p H u S P 5 0 L 5－h P D－1 s c F v 0 3 T L（以下、P 1 T L 株という）、ビフィドバクテリウム・ロンガム 1 0 5－A／p H u S P 6 7 L 1 0－h P D－1 s c F v 0 3 T L（以下、P 2 T L 株という）及び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 1－h P D－1 s c F v 0 3 T L（以下 P 3 T L 株という）とした。

[0288] (抗 h C T L A－4 s c F v 0 1 単独発現株の作製)

抗hCTLA-4 scFv01発現プラスミドpC1TLB、pC2TLB及びpC3TLBの作製方法の概要を図32に示した。プラスミドpC1F、pC2F及びpC3Fより、FLAGタグ除去及びT2ターミネーターへの置換を行うT2置換工程と、プラスミドpC1TL、pC2TL、pC3TLからpUCoriを除去するpUCori除去工程との、2つの工程よりなる。

[0289] (T2置換工程)

表29に示す鋳型DNA及びプライマーを使用して、上記PCR増幅1と同様にPCR産物を調製した。

[0290] [表29]

PCR産物	鋳型 DNA	Fow. primer	Rev. primer	PCR産物 サイズ
A1	pC1F	PC1_primer	PC9_primer	4538 bp
A2	pC2F	PC1_primer	PC9_primer	4457 bp
A3	pC3F	PC1_primer	PC9_primer	4487 bp
B	BBa-B0015 in pUC57	PC8_primer	PC4_primer	150 bp

[0291] PCR産物の組合せは、A1及びB（pC1TL作製用）、A2及びB（pC2TL作製用）、A3及びB（pC3TL作製用）の3種類とし、前記同様にHDキットを用いて連結し、抽出したプラスミドの全長DNA配列決定を同様の手順にて行った。抽出したプラスミドをpC1TL、pC2TL、pC3TLと名付けた。

[0292] (pUCori除去工程)

上記pC1TL、pC2TL、pC3TLからのpUCori除去は、上記実施例19の共発現プラスミドpPC2TL～pPC8TL作製の第3工程と同様の方法にて行い、pC1TLB、pC2TLB及びpC3TLBを得た。

[0293] (ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換14)

上記プラスミドpC1TLB、pC2TLB及びpC3TLBを用いて、

上記（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換１）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株の形質転換をエレクトロポレーションシステムにて実施した。得られた形質転換体を、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＣ１ＴＬＢ（以下、Ｃ１ＴＬＢ株という）、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＣ２ＴＬＢ（以下、Ｃ２ＴＬＢ株という）及びビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＣ３ＴＬＢ（以下、Ｃ３ＴＬＢ株という）とした。

[0294] [実施例２４]

（細胞への結合）

共発現株ＰＣ２株～ＰＣ８株に対応する抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０１－ＦＬＡＧ単独発現株より精製した抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０１－ＦＬＡＧを用いた細胞への結合を検討した。

[0295] 抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０１－ＦＬＡＧ単独発現ビフィドバクテリウム属細菌Ｃ１Ｆ株、Ｃ２Ｆ株及びＣ３Ｆ株の各培養上清より、抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０１－ＦＬＡＧをＰｒｏｔｅｉｎＬカラムにて精製した。細胞内ドメイン欠損ｈＣＴＬＡ－４を、レトロウイルスベクターを用いて過剰発現させたＨＥＫ２９３Ｔ細胞に、１μｇ／ｍＬに調製した精製ｓｃＦｖを１００μＬ添加し３０分間氷上にて静置した。細胞を洗浄後、ビオチン化ＰｒｏｔｅｉｎＬを１００μＬ加え、３０分間静置し、細胞に結合したｓｃＦｖにｐｒｏｔｅｉｎＬを結合させた。細胞を洗浄後、０．５μｇ／ｍＬに調製したＢｒｉｌｌｉａｎｔＶｉｏｌｅｔ４２１Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎを１００μＬ加え３０分間静置した。細胞を洗浄後、フローサイトメトリーを用いて解析した。結果を図３３に示す。

[0296] （結果）

図３３から明らかなとおり、Ｃ１Ｆ株、Ｃ２Ｆ株及びＣ３Ｆ株由来のｓｃＦｖは全て細胞内ドメイン欠損ｈＣＴＬＡ－４発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に結合した。これより、Ｃ１Ｆ株と同一のｓｃＦｖを分泌する共発現株のＰＣ４株及びＰＣ６株、Ｃ２Ｆ株と同一のｓｃＦｖを分泌する共発現株のＰＣ２株

及びPC7株、ならびにC3F株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC3株、PC5株及びPC8株より各々分泌される抗hCTLA-4 scFv 01-FLAGもhCTLA-4発現細胞に結合できると推察された。図33(a)よりhCTLA-4を発現しないMock細胞にもわずかに結合が認められたが、図37(d)の結果から、共発現PC4株より精製した抗hCTLA-4 scFv 01-FLAGではMock細胞への結合は認められないことから、C1F株、C2F株及びC3F株由来のscFvのMock細胞への結合は非特異的な結合であると考えられる。

[0297] [実施例25]

(抗hCTLA-4 scFv 01単独発現株より精製した抗hCTLA-4 scFv 01を用いた細胞への結合)

共発現株PC2TL株～PC8TL株に対応する、抗hCTLA-4 scFv 01単独発現株C1TLB株、C2TLB株及びC3TLB株の各培養上清より、抗hCTLA-4 scFv 01をProteinLカラムにて精製した。細胞内ドメイン欠損hCTLA-4を、レトロウイルスベクターを用いて過剰発現させたHEK293T細胞に、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した精製scFvを $100\mu\text{L}$ 添加し30分間氷上にて静置した。細胞を洗浄後、ビオチン化ProteinLを $100\mu\text{L}$ 加え、30分間静置し、細胞に結合したscFvにproteinLを結合させた。細胞を洗浄後、 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したBrilliant Violet 421 Streptavidinを $100\mu\text{L}$ 加え30分間静置した。細胞を洗浄後、フローサイトメトリーを用いて解析した。結果を図34に示す。

[0298] (結果)

図34から明らかなとおり、C1TLB株、C2TLB株及びC3TLB株由来のscFvは全てhCTLA-4発現細胞に結合した。これより、C1TLB株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC4TL株及びPC6TL株、C2TLB株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC2TL株及びPC7TL株、ならびにC3TLB株と同一のscFvを分泌する共発

現株のPC3TL株、PC5TL株及びPC8TL株より各々分泌される抗hCTLA-4scFv01もhCTLA-4発現細胞に結合できると推察される。

[0299] [実施例26]

(抗hPD-1scFv03-His単独発現株より精製した抗PD-1scFv03-Hisを用いた細胞への結合)

共発現株PC2株～PC8株に対応する、抗PD-1scFv03-His単独発現菌P1H株、P2H株及びP3H株の各培養上清より、抗PD-1scFv03-HisをProteinLにて精製した。hPD-1をレトロウイルスベクターを用いて過剰発現させたHEK293T細胞に、1μg/mLに調製した精製scFvを100μL添加し30分間氷上にて静置した。細胞を洗浄後、ビオチン化ProteinLを100μL加え、30分間静置し、細胞に結合したscFvにproteinLを結合させた。細胞を洗浄後、0.5μg/mLに調製したBrilliant Violet 421Streptavidinを100μL加え30分間静置した。細胞を洗浄後、フローサイトメトリーを用いて解析した。結果を図35に示す。

[0300] (結果)

図35から明らかなとおり、P1H株、P2H株及びP3H株由来のscFvは全てhPD-1発現細胞に結合した。これより、P1H株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC2株及びPC3株、P2H株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC4株及びPC5株、ならびにP3H株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC6株、PC7株及びPC8株より各々分泌される抗PD-1scFv03-HisもhPD-1発現細胞に結合できると推察される。

[0301] [実施例27]

(抗hPD-1scFv03単独発現株より精製した抗hPD-1scFv03を用いた細胞への結合)

共発現株PC2TL株～PC8TL株に対応する、PD-1scFv03

単独発現ビフィドバクテリウム属細菌P1TL株、P2TL株及びP3TL株の各培養上清より、抗hPD-1 scFv03をProteinLカラムにて精製した。hPD-1を、レトロウイルスベクターを用いて過剰発現させたHEK293T細胞に、1 µg/mLに調製した精製scFvを100 µL添加し30分間氷上にて静置した。細胞を洗浄後、ビオチン化ProteinLを100 µL加え、30分間静置し細胞に結合したscFvにproteinLを結合させた。細胞を洗浄後、0.5 µg/mLに調製したBrilliant Violet 421 Streptavidinを100 µL加え30分間静置した。細胞を洗浄後、フローサイトメトリーを用いて解析した。結果を図36に示す。

[0302] (結果)

図36から明らかなとおり、P1TL株、P2TL株及びP3TL株由来のscFvは全てhPD-1発現細胞に結合した。これより、P1TL株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC2TL株及びPC3TL株、P2TL株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC4TL株及びPC5TL株、ならびにP3TL株と同一のscFvを分泌する共発現株のPC6TL株、PC7TL株及びPC8TL株より各々分泌される抗PD-1 scFv03もhPD-1発現細胞に結合できると推察される。

[0303] [実施例28]

(共発現株PC4株より精製したscFvを用いた細胞への結合)

共発現株PC4株の培養上清よりHis-tag用精製カラムにて抗hPD-1 scFv03-Hisを、またFLAG-tag用精製カラムにて抗hCTLA-4 scFv01-FLAGを精製した。上記[実施例26]と同様の方法にて、抗hPD-1 scFv03のhPD-1発現細胞への結合を、また[実施例24]と同様の方法にて、抗hCTLA-4 scFv01のhCTLA-4発現細胞への結合を検討した。ポジティブコントロールとしてPE標識抗hPD-1抗体(clone:EH12, 2H7)及びPE標識抗hCTLA-4抗体(clone:L3D10)を用いた。結果を図

37に示す。

[0304] 図37(a)より、ポジティブコントロールであるPE標識抗hPD-1抗体(clone:EH12, 2H7)は、hPD-1発現細胞への結合は認められたが、Mock細胞やhCTLA-4発現細胞への結合は認められなかった。(b)よりPE標識抗hCTLA-4抗体(clone:L3D10)は、hCTLA-4発現細胞への結合が認められたが、Mock細胞やhPD-1発現細胞への結合は認められなかった。図37(c)(d)から明らかとなおり、共発現株PC4株より精製した抗hPD-1 scFv 03-His及び抗hCTLA-4 scFv 01-FLAGは、それぞれ対応する抗原発現細胞への結合が認められた。

[0305] [実施例29]

(抗hCTLA-4 scFv 01-FLAG単独発現株より精製した抗hCTLA-4 scFv 01-FLAGを用いた抗原への親和性(ビアコア))

共発現株PC2株~PC8株に対応する、抗hCTLA-4 scFv 01-FLAG単独発現ビフィドバクテリウム属細菌C1F、C2F及びC3Fの培養上清より抗hCTLA-4 scFv 01-FLAGをProtein Lカラムにてそれぞれ精製した。精製した各抗hCTLA-4 scFv 01-FLAGとhCTLA-4(ヒトIgG1Fcとの融合タンパク)との結合カイネティックパラメータ測定を、Biacoreシステム(GEヘルスケア社製)を用いた表面プラズモン共鳴によりおこなった。カルボキシルメチルデキストランが金膜表面上にコートされた基盤にマウス抗ヒトIgG(Fc)モノクローナル抗体(GEヘルスケア社製)をアミンカップリング法にて結合し、リガンドとしてFc融合組換えhCTLA-4(Biolegend)をキャプチャーした。アナライトとして精製したscFvを0.7404、2.2222、6.6667、20及び60nMに調製し、濃度が薄いものから連続的に結合させるシングルサイクルカイネティクス法で解析を行った。得られたデータの解析はBIA評価用ソフト(GEヘルスケア社製)を用いた。結果を表30に示す。

[0306] [表30]

sample	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
C1F	9.18E+05	9.96E-04	1.08E-09
C2F	4.52E+05	1.03E-03	2.28E-09
C3F	3.47E+05	1.03E-03	2.97E-09
C1TLB	6.61E+05	9.80E-04	1.48E-09
C2TLB	9.81E+05	9.61E-04	9.80E-10
C3TLB	7.73E+05	9.96E-04	1.29E-09

[0307] (結果)

表30より明らかなとおり、単発現株C1F、C2F及びC3Fから分泌されたscFvは高いKD値を示しており、hCTLA-4に対する親和性を有していた。共発現株のPC4株及びPC6株より分泌される抗hCTLA-4 scFvもC1F株由来のscFvと同様のhCTLA-4に対する親和性を有すると推察される。同様に、共発現株のPC2株及びPC7株のscFvはC2F株のscFvと、PC3株、PC5株及びPC8株のscFvはC3F株のscFvと同様のhCTLA-4に対する親和性を有すると推察される。

[0308] [実施例30]

(抗hCTLA-4 scFv 01単独発現株より精製した抗hCTLA-4 scFv 01を用いた抗原への親和性(ピアコア))

共発現株PC2TL株～PC8TL株に対応する、抗hCTLA-4 scFv 01単独発現ビフィドバクテリウム属細菌C1TLB株、C2TLB株及びC3TLB株の培養上清より抗hCTLA-4 scFv 01をProtein Lカラムにてそれぞれ精製し、hCTLA-4 (ヒトIgG1Fcとの融合タンパク)との結合カイネティックパラメータ測定を、Biacoreシステムを用いた表面プラズモン共鳴により行った。以下、実施例29と

同様に解析を行った。結果を表30に示す。

[0309] (結果)

表30から明らかとなっており、単発現株C1TLB、C2TLB及びC3TLBから分泌されたscFvは高いKD値を示しており、hCTLA-4に対する親和性を有していた。共発現株のPC4TL及びPC6TL株より分泌されるscFvもC1TLB株由来のscFvと同様のhCTLA-4に対する親和性を有すると推察される。同様に、共発現株のPC2TL株及びPC7TL株のscFvはC2TLB株のscFvと、PC3TL株、PC5TL株及びPC8TL株のscFvはC3TLB株のscFvと同様のhCTLA-4に対する親和性を有すると推察される。

[0310] [実施例31]

(抗hPD-1 scFv 03-His単独発現株より精製した抗hPD-1 scFv 03-Hisを用いた抗原への親和性(ビアコア))

共発現株PC2株～PC8株に対応する、抗hPD-1 scFv 03-His単独発現ビフィドバクテリウム属細菌P1H株、P2H株及びP3H株の培養上清より抗hPD-1 scFv 03-HisをProteinLカラムにてそれぞれ精製し、hPD-1(ヒトIgG1Fcとの融合タンパク)との結合カイネティックパラメータ測定を、Biacoreシステムを用いた表面プラズモン共鳴によりおこなった。リガンドとしてFc融合組換えhPD-1(R&D)をキャプチャーした他は、実施例29と同様に解析を行った。結果を表31に示す。

[0311]

[表31]

sample	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
P1H	4.79E+05	1.29E-03	2.69E-09
P2H	4.60E+05	1.86E-03	4.04E-09
P3H	4.33E+05	1.99E-03	4.60E-09
P1TL	3.44E+05	1.34E-03	3.89E-09
P2TL	3.35E+05	1.96E-03	5.85E-09
P3TL	3.03E+05	2.07E-03	6.83E-09

[0312] (結果)

表 3 1 から明らかなとおり、単発現株 P 1 H、P 2 H 及び P 3 H から分泌された s c F v は高い K D 値を示しており、h P D - 1 に対する親和性を有していた。共発現株の P C 2 株及び P C 3 株より分泌される s c F v も P 1 H 株由来 s c F v と同様の h P D - 1 に対する親和性を有すると推察される。同様に、共発現株の P C 4 株及び P C 5 株の s c F v は P 2 H 株の s c F v と、P C 6 株、P C 7 株及び P C 8 株の s c F v は P 3 H 株の s c F v と同様の h P D - 1 に対する親和性を有すると推察される。

[0313] [実施例 3 2]

(抗 h P D - 1 s c F v 0 3 単独発現株より精製した抗 h P D - 1 s c F v 0 3 を用いた抗原への親和性 (ピアコア))

共発現株 P C 2 T L 株 ~ P C 8 T L 株 に対応する、抗 h P D - 1 s c F v 0 3 単独発現ビフィドバクテリウム属細菌 P 1 T L 株、P 2 T L 株 及び P 3 T L 株 の培養上清より抗 h P D - 1 s c F v 0 3 を P r o t e i n L カラムにてそれぞれ精製し、h P D - 1 (ヒト I g G 1 F c との融合タンパク) との結合カイネティックパラメータ測定を、B i a c o r e システムを用いた表面プラズモン共鳴によりおこなった。リガンドとして F c 融合組換え h P D - 1 (R & D) をキャプチャーした他は、実施例 2 9 と同様に解析を行っ

た。結果を表31に示す。

[0314] (結果)

表31から明らかとなっており、単発現株P1TL、P2TL及びP3TLから分泌されたscFvは高いKD値を示しており、hPD-1に対する親和性を有していた。共発現株のPC2TL株及びPC3TL株より分泌されるscFvもP1TL株由来scFvと同様のhPD-1に対する親和性を有すると推察される。同様に、共発現株のPC4TL株及びPC5TL株のscFvはP2TL株のscFvと、PC6TL株、PC7TL株及びPC8TL株のscFvはP3TL株のscFvと同様のhPD-1に対する親和性を有すると推察される。

[0315] [実施例33]

(共発現株PC4株のscFvによる抗原・リガンドの結合阻害活性)

共発現株PC4株の培養上清よりHis-tag用精製カラムにて抗hPD-1 scFv 03-Hisを、またFLAG-tag用精製カラムにて抗hCTLA-4 scFv 01-FLAGを精製した。これらを用いて、各抗原との結合に対するリガンドとの競合活性(ELISA)の評価を行った。

[0316] (抗hPD-1 scFv 03の抗原との結合に対するヒトPD-L1との競合活性)

試料添加操作を除き、実施例21の(抗hPD-1 scFv 03の分泌評価)と同様の方法にて操作した。試料は、共発現株PC4株の培養上清よりHis-tag精製して得た2nM(固定濃度)の抗hPD-1 scFv 03-Hisと、各種濃度(640nM、320nM、160nM、80nM、40nM、20nM、5nM、0.5nM、0nM)のヒトPD-L1溶液(Recombinant Human B7-H1/PD-L1FcChimera、R&D systems、以下hPD-L1という)との混合液を用いた。また、コントロールとして、2nMの抗hCTLA-4 scFv 01-FLAG(C1F株由来)、640nMのhPD-L1を試料としたウェルも設けた。hPD-1/抗hPD-1 scFv 03-Hisの結合に対

するhPD-L1の結合阻害率を、式1により算出した。PC4株より精製したhPD-1 scFv03とhPD-1の結合に対するhPD-L1による結合阻害活性について、結果を表32に示す。

[0317] [数1]

$$\text{結合阻害率 (\%)} = 100 - \frac{(\text{hPD-L1添加時の吸光度})}{(\text{hPD-L1非添加時の吸光度})} \times 100 \quad (\text{式1})$$

[0318] [表32]

試料		結合	阻害率
hPD-1 scFv03-His	hPD-L1	A450-570	(%)
2 nM	0 nM	1.942	0
2 nM	0.5 nM	1.426	26.6
2 nM	5 nM	1.359	30
2 nM	20 nM	1.481	23.7
2 nM	40 nM	1.021	47.4
2 nM	80 nM	0.851	56.2
2 nM	160 nM	0.649	66.6
2 nM	320 nM	0.396	79.6
2 nM	640 nM	0.272	86
no	640 nM	0	-
hCTLA-4 scFv	no	-0.001	-

[0319] 表32からわかるように、hPD-L1濃度が高くなるとともに吸光度は減少し、hPD-L1の濃度依存的に、抗hPD-1 scFv03-Hisの抗原への結合は減少した。一方、2 nMの抗hCTLA-4 scFv01-FLAGの添加では、プレートへの結合は認められず、抗hPD-1 scFv03-Hisの固相化ヒトPD-1への結合は、特異的結合であるといえる。また、hPD-L1のみの添加でもプレートへの結合が認められないことより、抗hPD-1 scFv03-His及びhPD-L1の混合液の添加によりプレートに結合したものは、抗hPD-1 scFv03-Hisであるといえる。hPD-1と抗hPD-1 scFv03-Hisの結合に

対するhPD-L1による結合阻害率を図38に示した。hPD-L1濃度依存的に、hPD-1と抗hPD-1 scFv03-Hisの結合は阻害されている。

[0320] (抗hCTLA-4 scFv01の抗原との結合に対するリガンドとの競合活性)

試料添加操作を除き、実施例21の(抗hCTLA-4 scFv01の分泌評価)と同様の方法にて操作した。試料は、共発現株PC4株よりFLAG-tag精製して得た1nMの抗hCTLA-4 scFv01-FLAGと各種濃度のヒトCD80 (Recombinant Human B7-1/CD80 Fc Chimera、R&D Systems、以下hCD80という) (30nM、20nM、10nM、5nM、3nM、及び0nM)の混合液、及び1nMの抗hCTLA-4 scFv01-FLAGと各種濃度のヒトCD86 (Recombinant Human B7-1/CD86 Fc Chimera、R&D Systems、以下hCD86という) (100nM、80nM、60nM、40nM、20nM及び0nM)の混合液を用いた。また、コントロールとして、1nMの抗hPD-1 scFv03-His (P2H株由来)、30nMのhCD80のみ、或いは100nMのhCD86のみを試料としたウェルも設けた。hCTLA-4/抗hCTLA-4 scFv01-FLAGの結合に対するhCD80或いはhCD86の結合阻害率を、式2により算出した。

[0321] [数2]

$$\text{結合阻害率 (\%)} = 100 - \frac{(\text{リガンド*添加時の吸光度})}{(\text{リガンド*非添加時の吸光度})} \times 100 \quad (\text{式2})$$

*リガンド：hCD80或いはhCD86

[0322] (結果)

競合ELISAの結果を、表33 (リガンドとしてhCD80を使用) 及び表34 (リガンドとしてhCD86を使用) に示す。

[0323] [表33]

PC4株より精製したhCTLA-4scFv01-FLAGとhCTLA-4の結合に対するhCD80による結合阻害活性

試料		結合	阻害
hCTLA-4scFv01-FLAG	hCD80	A450-570	(%)
1 nM	0 nM	1.027	0
1 nM	3 nM	1.352	-31.6
1nM	5 nM	0.489	52.4
1nM	10 nM	0.407	60.4
1nM	20 nM	0.248	75.9
1nM	30 nM	0.185	82
no	30 nM	0.004	-
hPD-1 scFv	no	-0.020	-

[0324] [表34]

PC4株より精製したhCTLA-4scFv01-FLAGとhCTLA-4の結合に対するhCD86による結合阻害活性

試料		結合	阻害
hCTLA-4scFv01-FLAG	hCD86	A450-570	(%)
1 nM	0 nM	1.027	0
1 nM	20 nM	1.084	-5.6
1nM	40 nM	0.799	22.2
1nM	60 nM	0.614	40.2
1nM	80 nM	0.521	49.3
1nM	100 nM	0.374	63.6
no	100 nM	0.009	-
hPD-1 scFv	no	-0.020	-

[0325] 表33及び表34からわかるように、hCD80或いはhCD86の濃度が高くなるとともに吸光度は減少し、hCD80或いはhCD86の濃度依存的に、抗hCTLA-4scFv01-FLAGの抗原への結合は減少した。一方、1nMの抗hPD-1scFv03-Hisの添加では、プレートへの結合は認めらなかった。これより、hCTLA-4scFv01-FLAGの固相化ヒトCTLA-4への結合は、特異的結合であるといえる。また、hCD80のみ或いはhCD86のみの添加でもプレートへの結合が認められないことより、抗hCTLA-4scFv01-FLAG及びhCD80の混合液、或いは抗hCTLA-4scFv01-FLAG及びhC

D86の混合液の添加によりプレートに結合したものは、抗hCTLA-4 scFv01-FLAGであるといえる。

[0326] hCTLA-4と抗hCTLA-4 scFv01-FLAGの結合に対するhCD80或いはhCD86による結合阻害率を図39及び図40に示した。hCD80或いはhCD86の濃度依存的に、hCTLA-4と抗hCTLA-4 scFv01-FLAGの結合は阻害されている。

[0327] 以上の結果より、共発現株PC4株より分泌した抗hPD-1 scFv03-His及び抗hCTLA-4 scFv01-FLAGは、それぞれ対応する抗原に対して、リガンドとの競合活性を有することが確認できた。

請求の範囲

- [請求項1] ビフィドバクテリウム属細菌内で発現する、以下の(1)～(4)のDNAを順次含む分泌発現カセットを、2種類含むことを特徴とする共発現プラスミド。
- (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) 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記載の共発現プラスミド。
- [請求項3] ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターが、P30プロモーター、P54プロモーター及びHuプロモーターから選択される1又は2のプロモーターであることを特徴とする請求項1又は2記載の共発現プラスミド。
- [請求項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が、Huターミネーター及びT2ターミネーターから選択される1又は2のターミネーターであることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の共発現プラスミド。
- [請求項5] 分泌シグナルペプチドが、以下のa)又はb)のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の共発現プラスミド。
- a) 配列番号57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、及び77のいずれかに示されるアミノ酸配列；
 - b) 配列番号57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、及び77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；

[請求項6] 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1～5のいずれか記載の共発現プラスミド。

[請求項7] 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6記載の共発現プラスミド。

[請求項8] 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6記載の共発現プラスミド。

[請求項9] 一本鎖抗体が、抗HER2抗体であることを特徴とする請求項6記載の共発現プラスミド。

[請求項10] 異種ポリペプチドが、サイトカインであることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の共発現プラスミド。

[請求項11] サイトカインが、TNF- α であることを特徴とする請求項10記載の共発現プラスミド。

[請求項12] サイトカインが、IFN- γ であることを特徴とする請求項10記載の共発現プラスミド。

[請求項13] 異種ポリペプチドが、抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体との組合せであることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の共発現プラスミド。

[請求項14] 異種ポリペプチドが、TNF- α とIFN- γ との組合せであることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の共発現プラスミド。

[請求項15] 異種ポリペプチドが、抗HER2抗体とIFN- γ との組合せであることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の共発現プラスミド。

[請求項16] 請求項1～15のいずれか記載の共発現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。

[請求項17] ビフィドバクテリウム・ロンガムである請求項16記載のビフィドバクテリウム属細菌。

[請求項18] 請求項16又は17記載のビフィドバクテリウム属細菌を含む医薬組

成物。