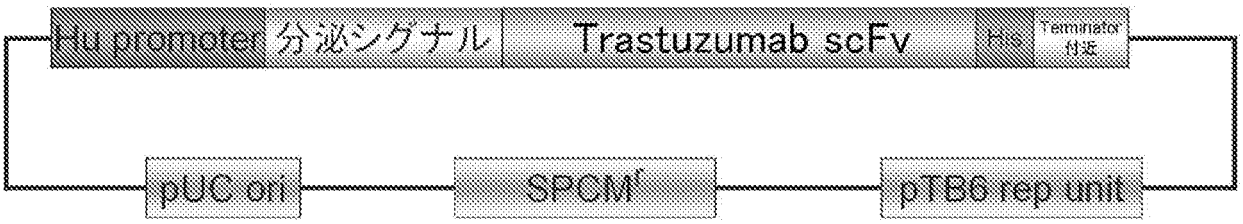
[図1]

Trastuzumab scFv分泌プラスミドの構造



ベクター骨格: pBEshuttle (SPCM^r, *E. coli*及びB菌の複製起点を持つ)

[図2]

Trastuzumab scFv 抗体の全塩基配列

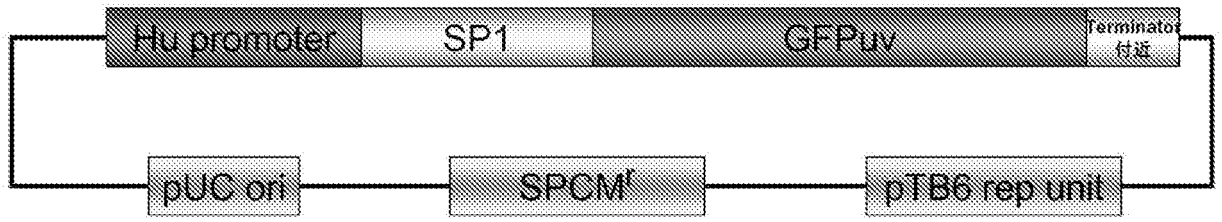
Trastuzumab-scFv-His :

```
  1 ATGGAAGTTC AGCTGGTTGA AAGCGGTGGC GGTCTGGTTC AGCCTGGTGG
 51 TAGCCTGCGT CTGAGCTGTG CAGCAAGCGG TTTTAACATT AAAGATACCT
101 ATATTCATTG GGTGCGTCAG GCACCGGGTA AAGGTCTGGA ATGGGTTGCA
151 CGTATTTATC CGACCAATGG TTATACCCGT TATGCCGATA GCGTTAAAGG
201 TCGTTTTACC ATTAGCGCAG ATACCAGCAA AAATACCGCA TATCTGCAGA
251 TGAATAGCCT GCGTGCAGAG GATACCGCAG TGTATTATTG TAGCCGTTGG
301 GGTGGTGATG GTTTTTATGC AATGGATTAT TGGGGTCAGG GCACCCTGGT
351 TACCGTTAGC AGTGGTGGTG GTGGTAGCGG TGGTGGGGGT TCAGGTGGTG
401 GTGGATCCGA TATTCAGATG ACCCAGAGCC CGAGCAGCCT GAGCGCAAGC
451 GTTGGTGATC GTGTTACCAT TACCTGTCGT GCAAGCCAGG ATGTTAATAC
501 CGCAGTTGCA TGGTATCAGC AGAAACCGGG TAAAGCACCG AAACTGCTGA
551 TTTATAGCGC AAGCTTTCTG TATAGCGGTG TTCCGAGCCG TTTTAGCGGT
601 AGCCGTAGCG GCACCGATTT TACCCTGACC ATTAGCAGCC TGCAGCCGGA
651 AGATTTTGCA ACCTATTATT GTCAGCAGCA TTACACCACC CCTCCGACCT
701 TTGGTCAGGG CACCAAAGTT GAAATTAAAC ATCATCATCA CCATCATTAA
```

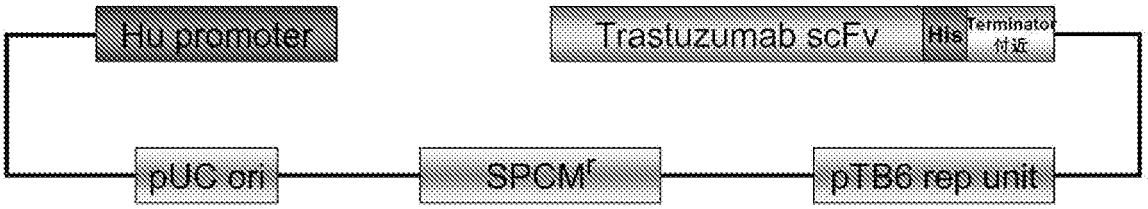
1-750	Trastuzumab-scFv-His	配列番号５
1-363	Trastuzumab-scFv VH	配列番号６
(292-331	CDR3-1)	配列番号７
364-408	Trastuzumab-scFv linker	配列番号８
409-729	Trastuzumab-scFv VK	配列番号９
(673-699	CDR3-2)	配列番号１０
730-747	6xHis-tag	配列番号１１

[図3]

プラスミド SP1B-9

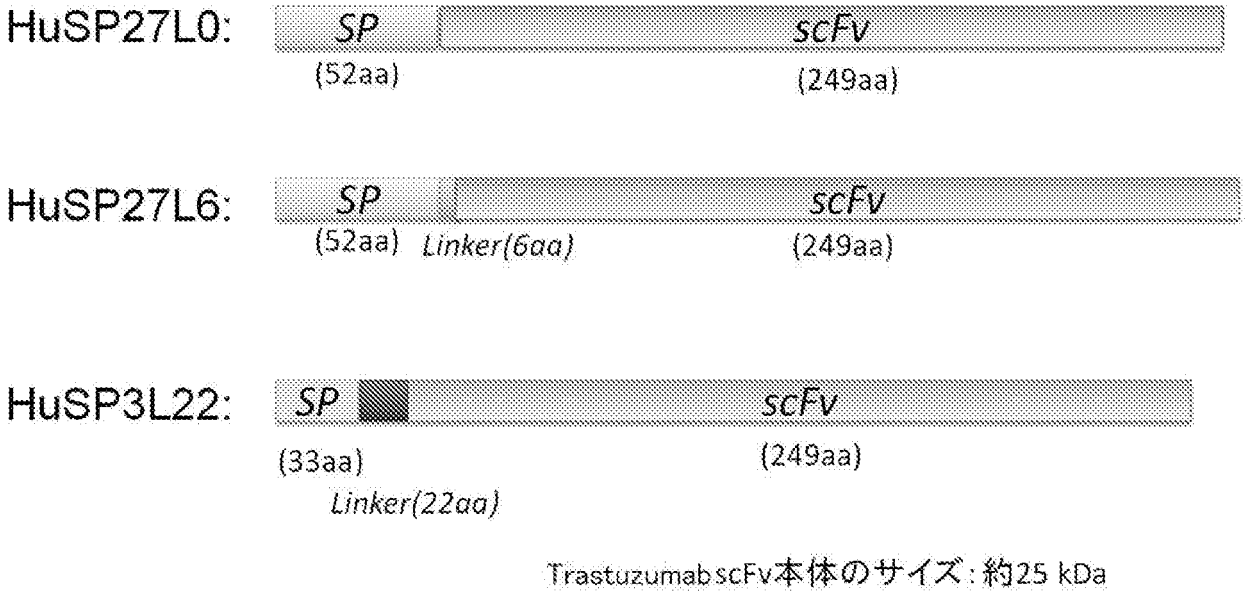


[図4]



[図5]

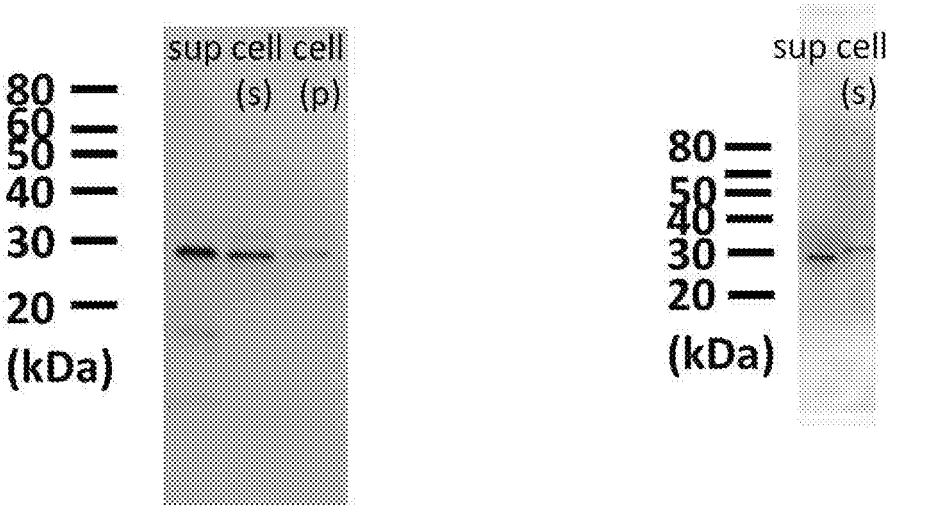
組換えビフィズス菌のウェスタンブロッティング解析により検出された組換え菌の Trastuzumab scFv 構造



Trastuzumab scFv本体のサイズ：約25 kDa

[図6]

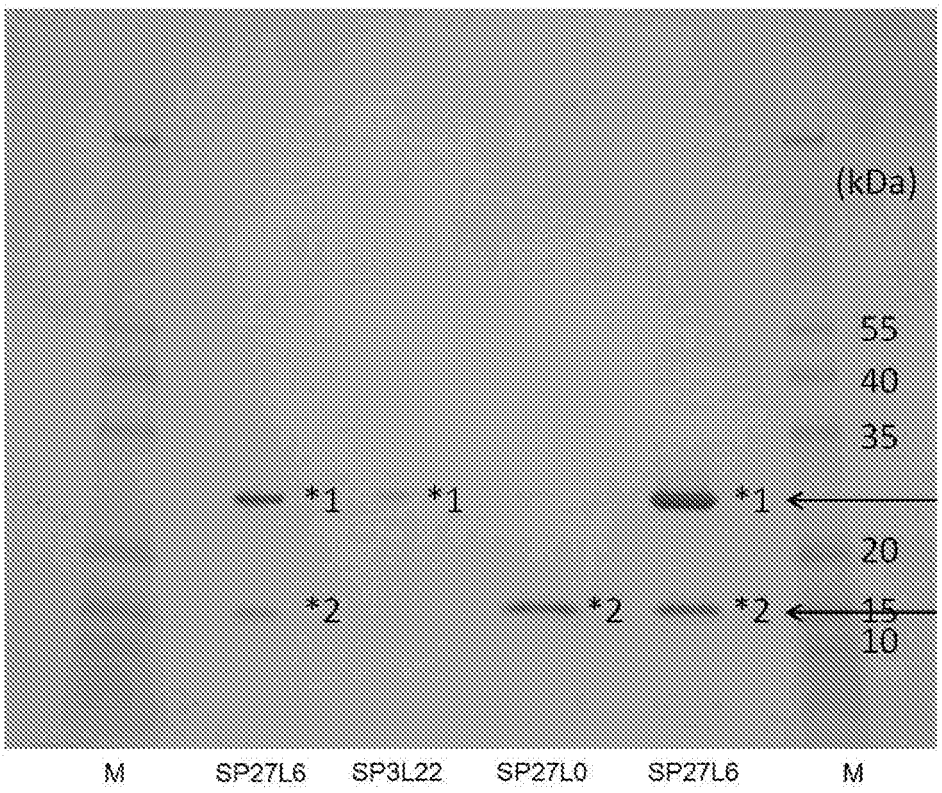
ビフィズス菌でのTrastuzumab scFv発現 （ウェスタン解析）



Sup:培養液500μL分のビフィズス菌培養上清
Cell-s:培養液2.5μL分のビフィズス菌可溶性画分
Cell-p:培養液25μL分のビフィズス菌不溶性画分

C末端のヒスチジンタグを指標に検出

[図7]



[図8]

His-Tagで精製したタンパク質のLC-MS/MSによる分析結果



[図9]

LC-MS/MS 分析により
Trastuzumab scFv アミノ酸配列と一致したペプチド断片

1) TEVQLVESGGGLVQPGGSLR

2) LSCAASGFNIKDTYIHWVR

3) GLEWVARIYPTNGYTR

4) NTAYLQMNSLR

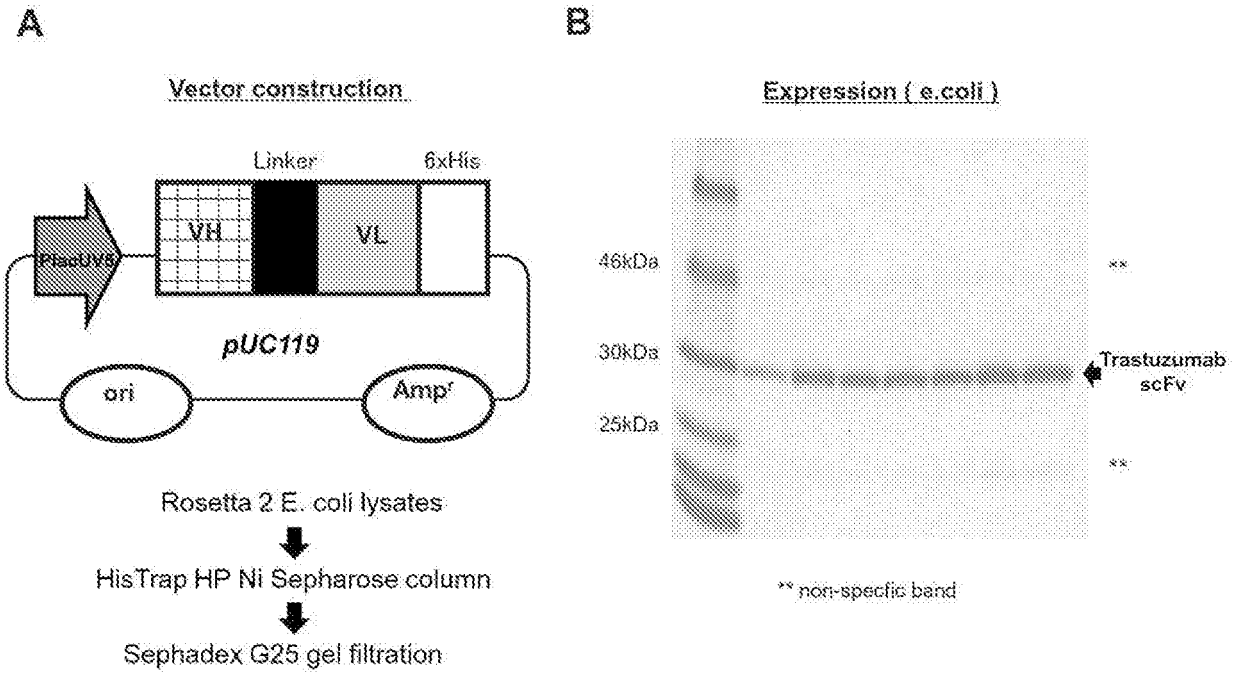
5) WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR

6) VTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK

7) LLIYSASFLYSGVPSR

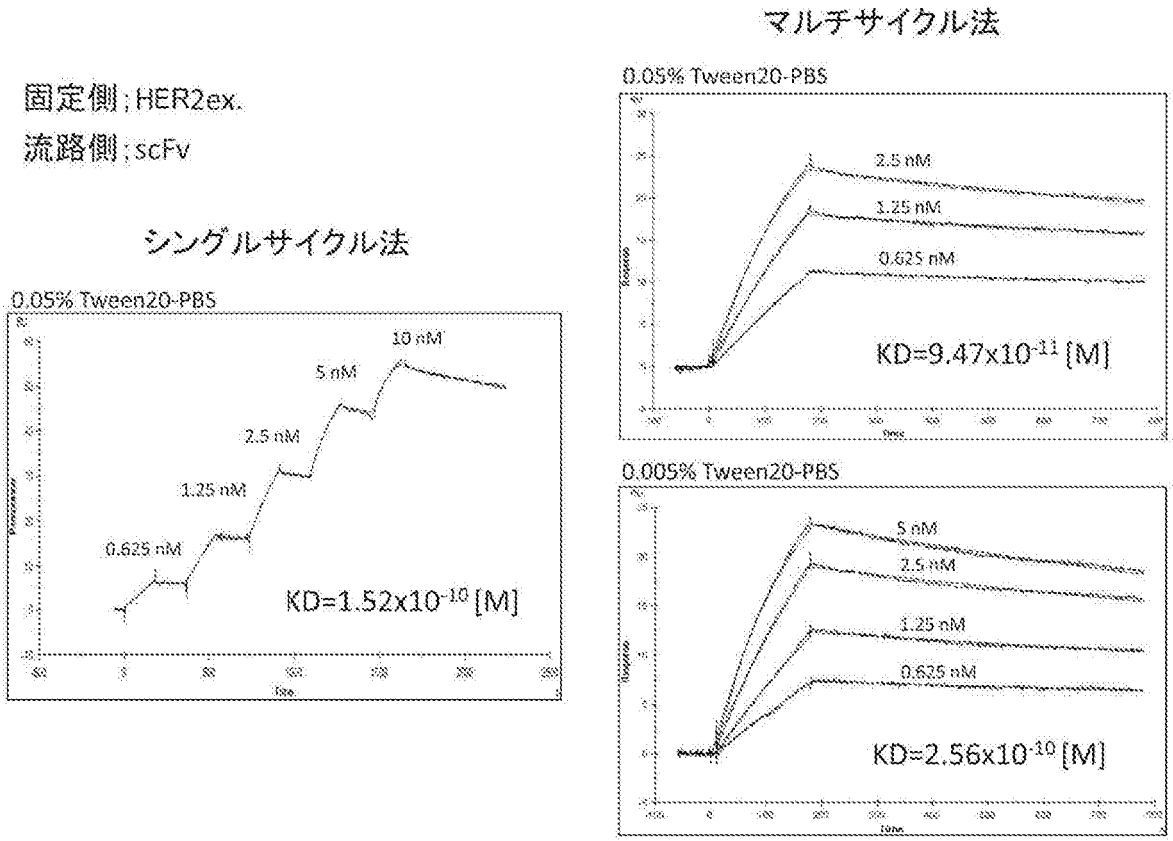
[図10]

Trastuzumab scFv分泌ベクターの構造と
E.ColiによるTrastuzumab scFv発現



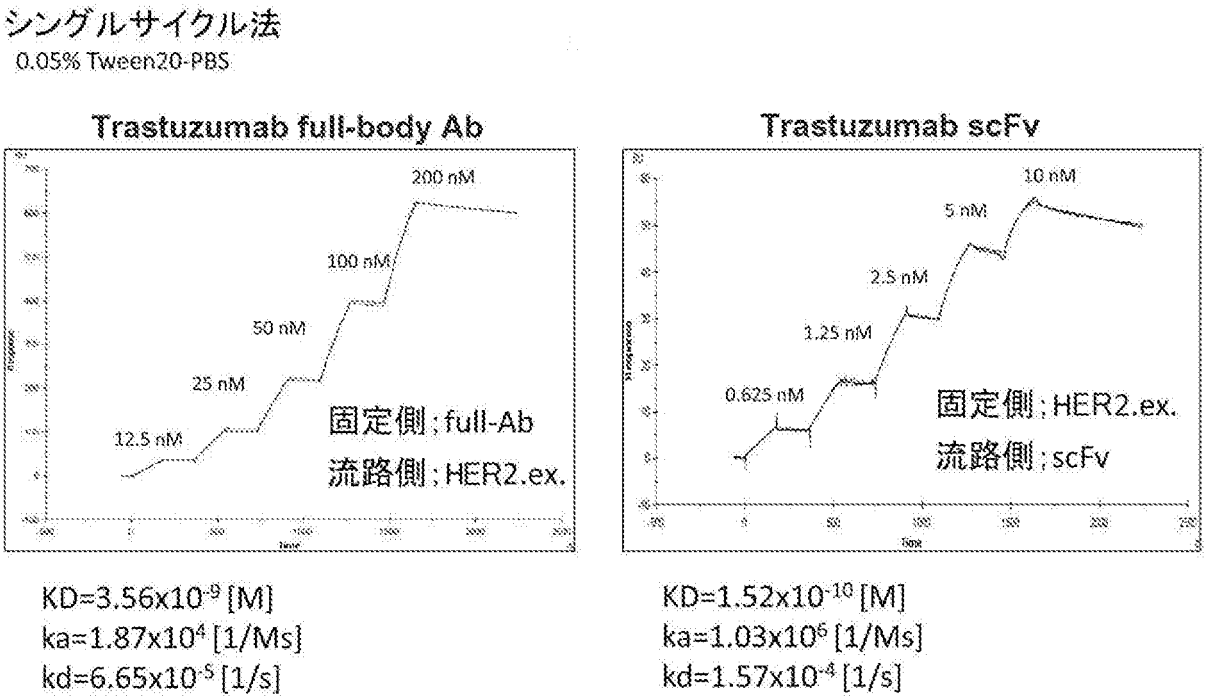
[図11]

Trastuzumab scFvとHER2細胞外ドメインのBiacore X100による親和性測定



[図12]

Trastuzumab full-body 抗体とHER2細胞外ドメインの
Biacore X100による親和性測定

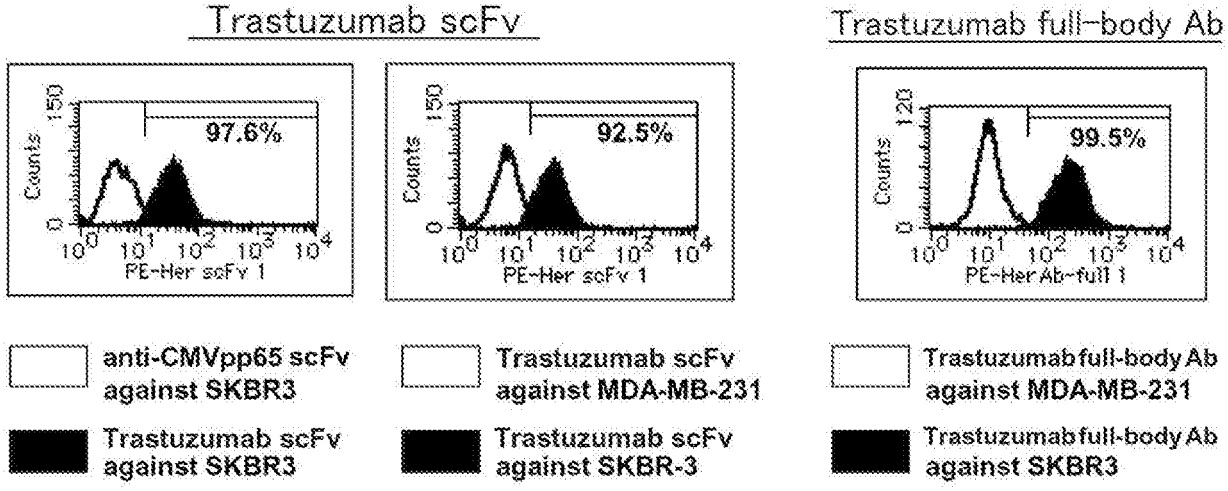


KD=3.56x10-9 [M]
ka=1.87x10^4 [1/Ms]
kd=6.65x10-5 [1/s]

KD=1.52x10-10 [M]
ka=1.03x10^6 [1/Ms]
kd=1.57x10-4 [1/s]

[図13]

Trastuzumab scFv及びTrastuzumab full-body抗体の
ヒト乳癌細胞株結合能FACS解析

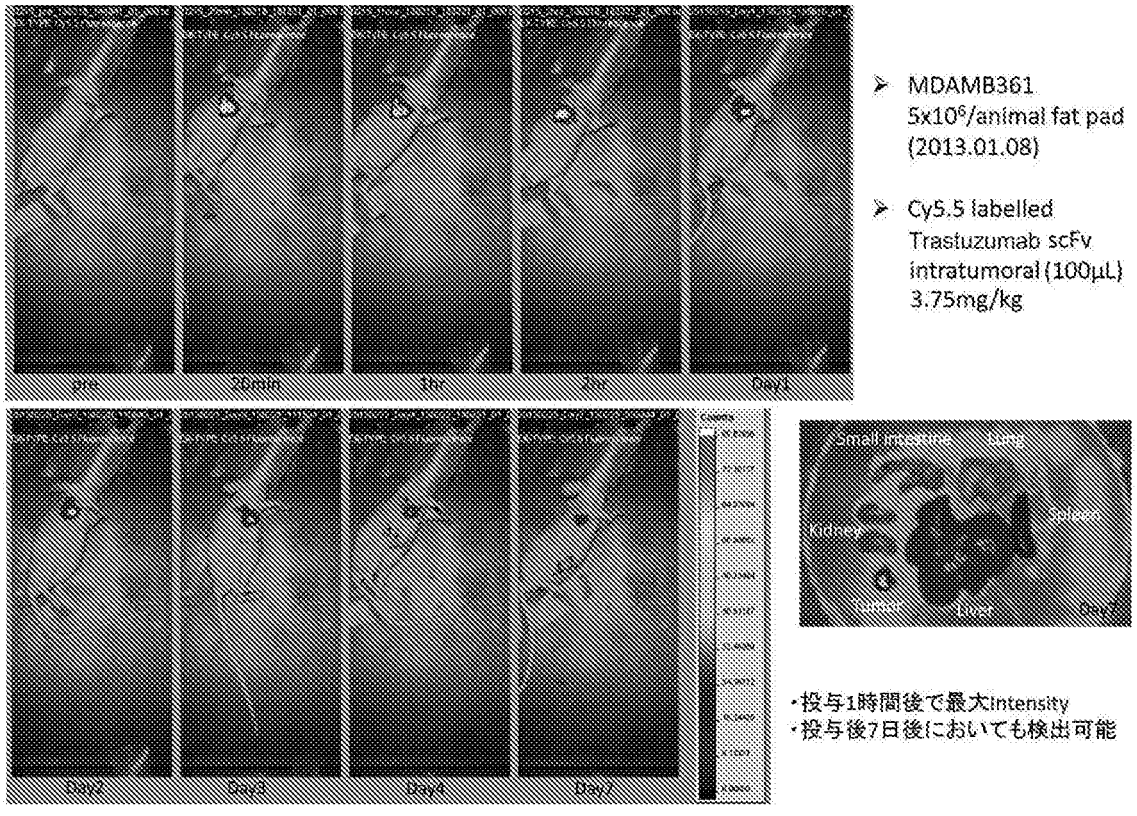


*Trastuzumab scFv and anti-CMVpp65 scFv Ab at 10ug/ml, Trastuzumab full-body Ab (neat supernatant of Sf9 cells)

**MDA-MB-231(HER2-) SKBR-3 (HER2++)

[図14]

in vivo 腫瘍モデルを用いた Cy5.5 標識 Trastuzumab scFv の
生体内動態イメージング

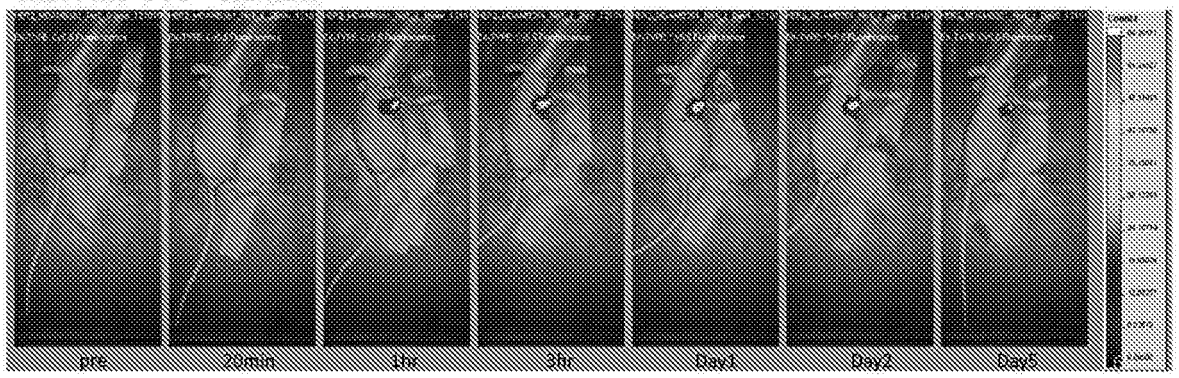


[図15]

in vivo 腫瘍モデルを用いた Cy5.5 標識 Trastuzumab full-body Ab の生体内動態イメージング

・MDA-MB-361 4x10^{6}個 移植後の動物を使用
・Cy5.5標識Trastuzumab full-body 抗体(3．75mg／kg相当量)のを腫瘍内投与(Day56)
・投与後、20min, 1hr, 3hr, Day1, 2, 5まで経時的にイメージング

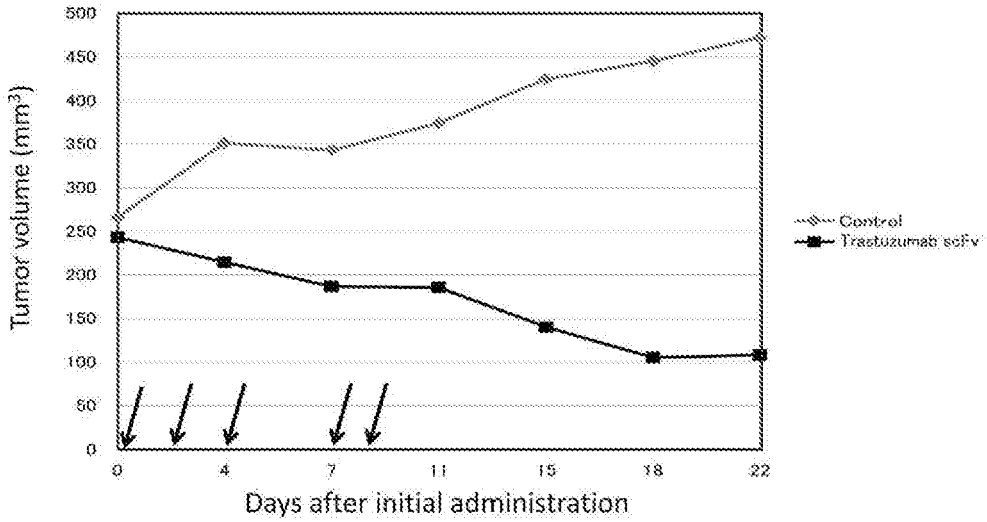
MDA-MB-361 0.1mL it



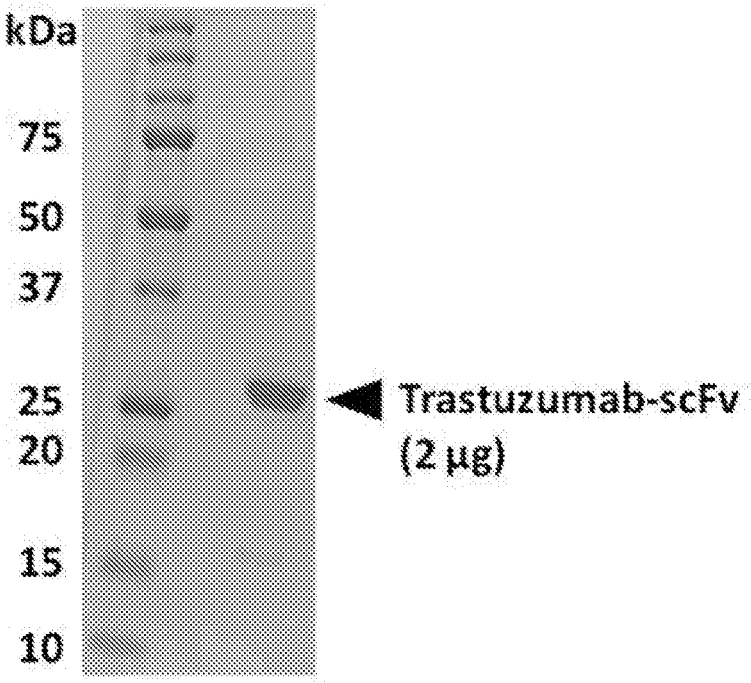
[図16]

ヒト乳癌MDA-MB-361細胞の同所移植腫瘍に対するTrastuzumab scFvの増殖抑制効果

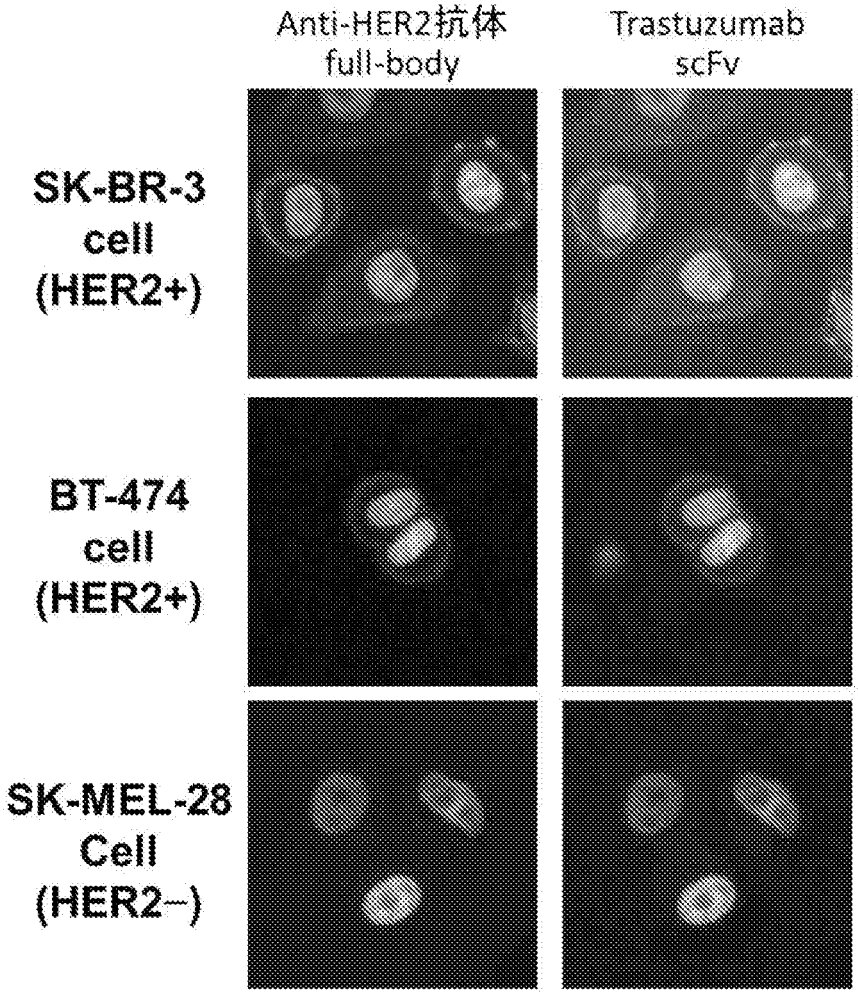
MDA-MB-361 1x10^6 cells (contain Matrigel)/mouse, female BALB/cA-*nu/nu* mice, fad pad (n=4-5)
Trastuzumab scFv 3.75mg/kg (injection volume 50μL/it) x 4 (Days 0, 2, 4, 7, 9)



[図17]



[図18]



HER2染色

1次抗体...**Anti-HER2 antibody (full-body)**
(5 μg/mL) 4˚C, 1h.

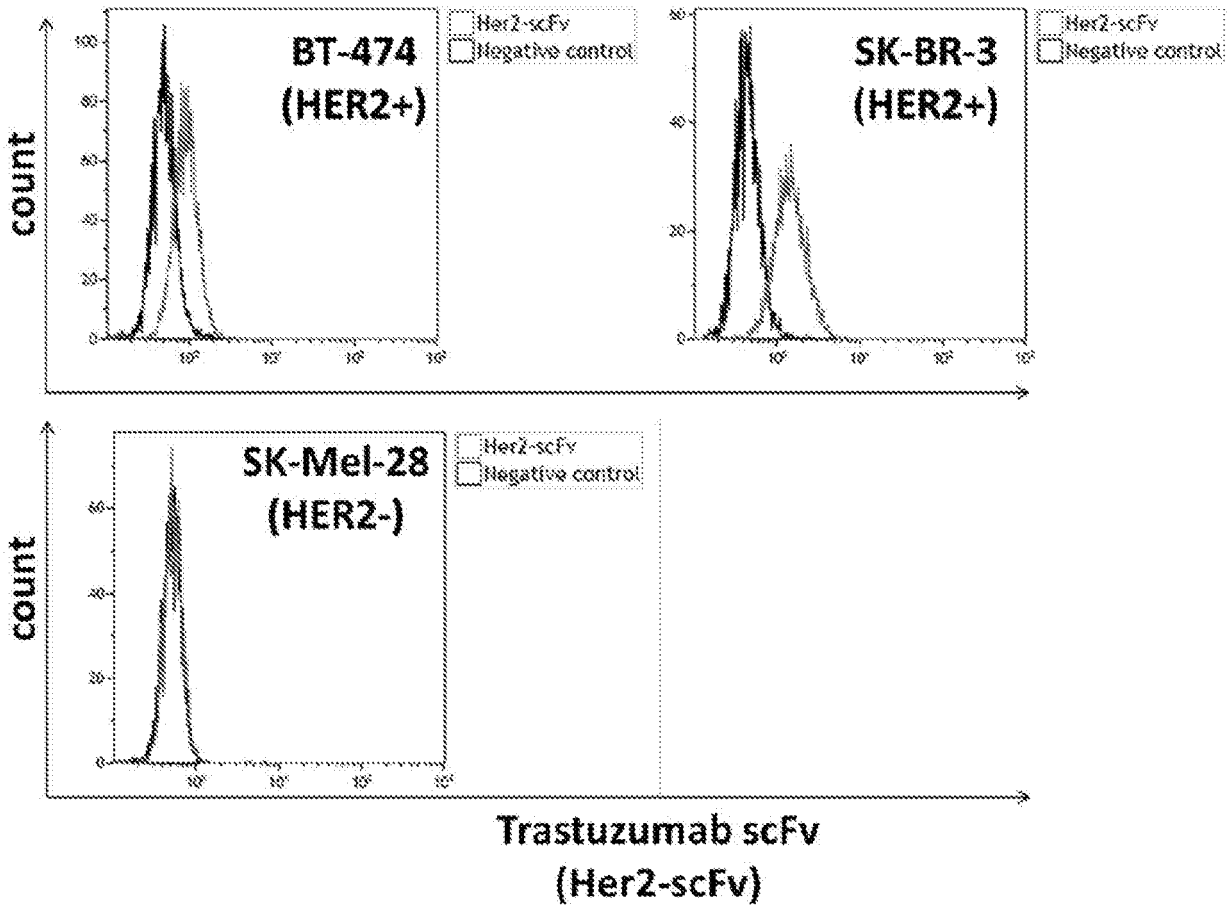
2次抗体...DyLight 594 goat anti-mouse IgG
(5 μg/mL) 4˚C, 0.5h

scFv染色

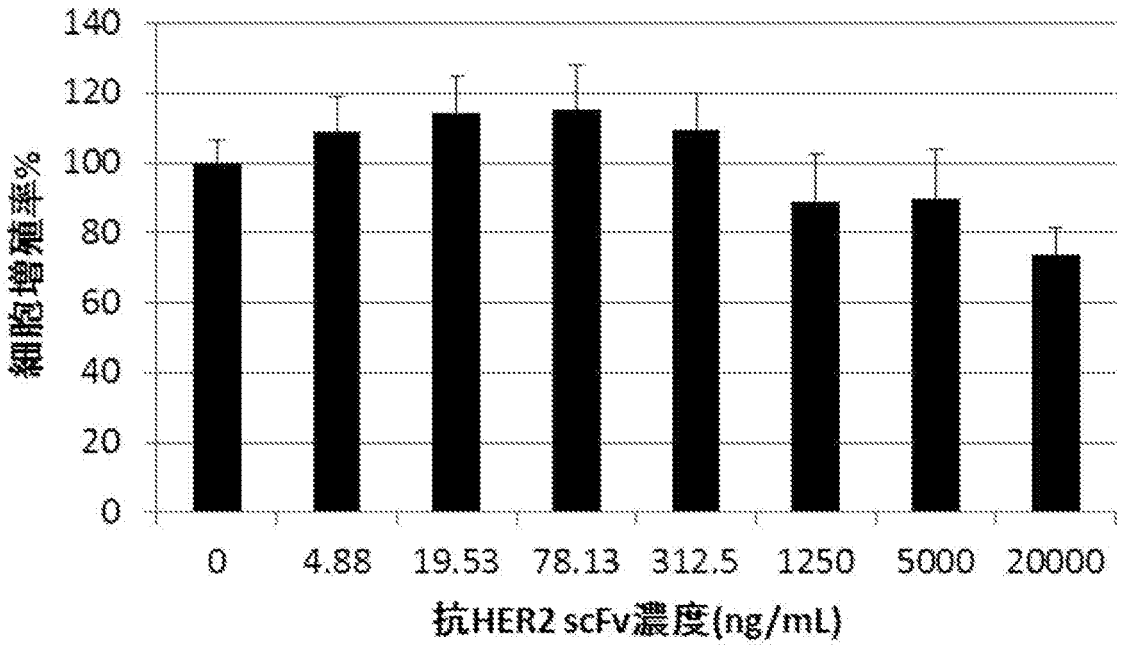
1次抗体...***B. longum* Trastuzumab scFv**
(5 μg/mL) 4˚C, 1h.

2次抗体...anti-His-tag-Alexa Fluor 488
(2.5 μg/mL) 4˚C, 0.5h

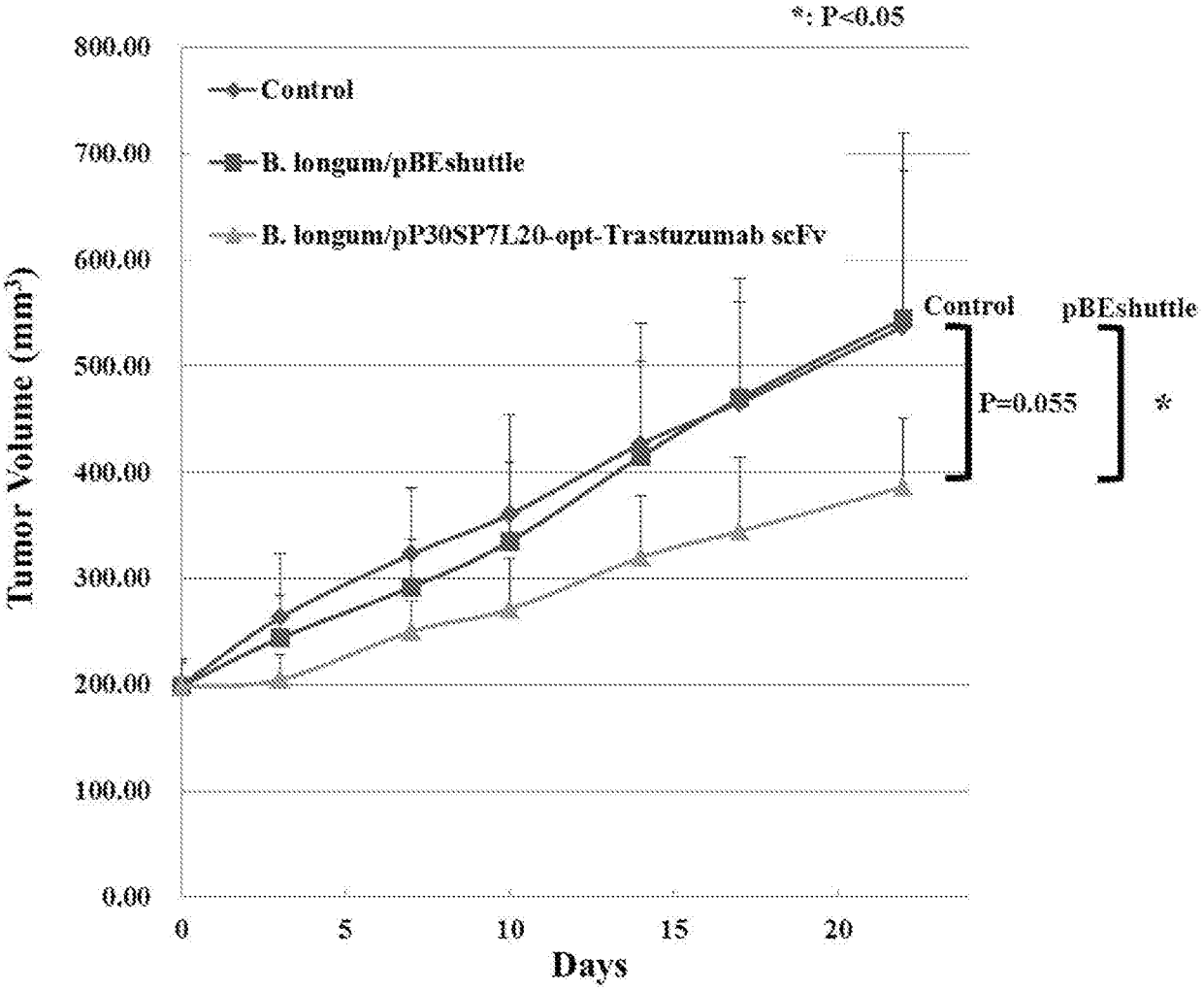
[図19]


BT-474
(HER2+)
Her2-scFv
Negative control
SK-BR-3
(HER2+)
Her2-scFv
Negative control
SK-Mel-28
(HER2-)
Her2-scFv
Negative control
count
count
Trastuzumab scFv
(Her2-scFv)

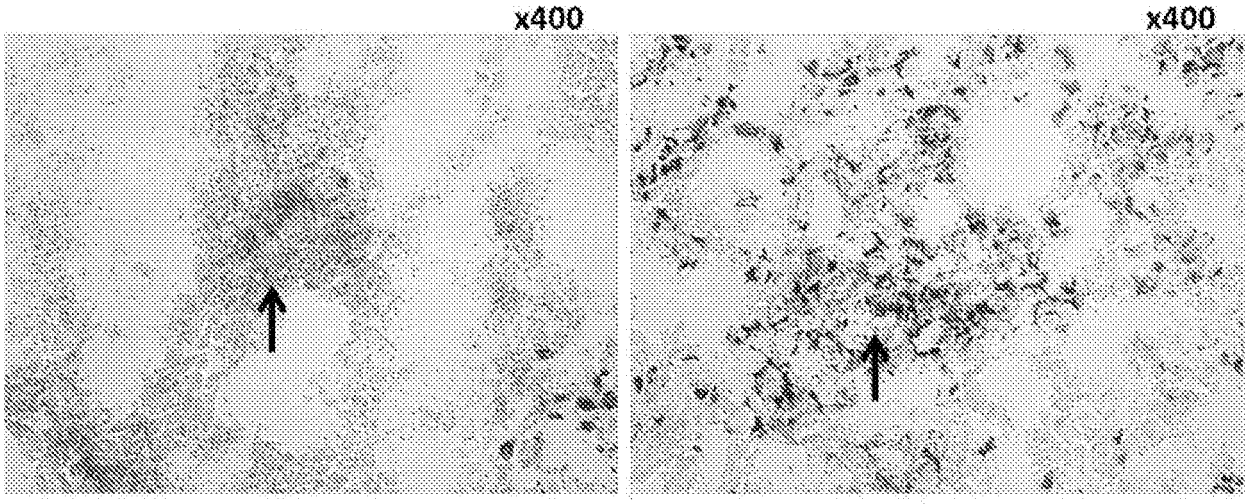
[図20]


140
120
100
80
60
40
20
0
細胞増殖率%
0
4.88
19.53
78.13
312.5
1250
5000
20000
抗HER2 scFv濃度(ng/mL)

[図21]



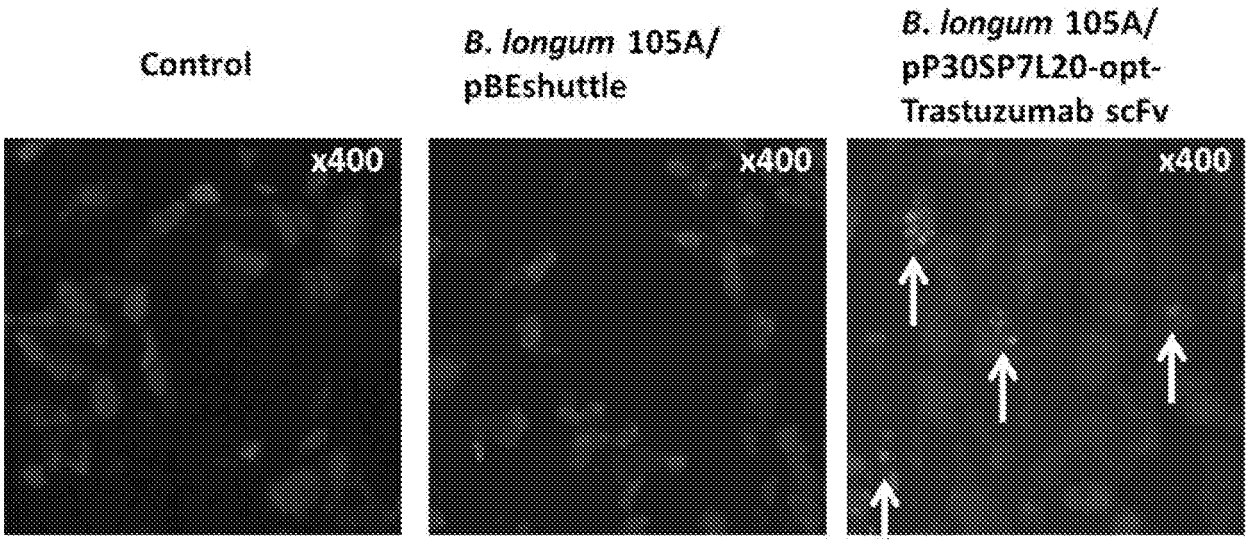
[図22]



B. longum 105A/pBEshuttle

B. longum 105A/
pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv

[図23]


Control
B. longum 105A/ pBEshuttle
B. longum 105A/ pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv
x400
x400
x400