# 明　細　書

## 発明の名称 ： 抗体遺伝子の発現・分泌システム

## 技術分野

[0001] 本発明は、抗体遺伝子の発現・分泌システム、より詳しくは、トラスツズマブ（Trastuzumab）等の抗体の分泌のために用いる特定のシグナルペプチドやシグナルペプチドーリンカー連結体をコードするＤＮＡ、かかるＤＮＡに抗体遺伝子が結合したＤＮＡインサート、該ＤＮＡインサートが挿入されたベクター、該ベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム属微生物（ビフィズス菌）等の腸内細菌などに関する。

## 背景技術

[0002] シグナルペプチドは、タンパク質分子にある短い（３から６０アミノ酸ほど）疎水性アミノ酸を中心とする分泌（小胞体への輸送）を指示する配列のペプチドで、シグナル配列、局在シグナル、輸送（移行）シグナルなどとも呼ばれている。

[0003] ビフィズス菌のシグナル配列としては、例えば、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスのアミラーゼやビフィドバクテリウム・ブレーベのＳｅｃ１、Ｓｅｃ２、Ｓｅｃ３などの分泌タンパクにおけるシグナル配列が報告されている。また、本発明者らにより、ビフィズス菌の形質転換用プラスミドに適用しうるシグナル配列が提案されている（例えば、特許文献１及び２参照）。

[0004] その他、ビフィドバクテリウム・ロンガムのゲノム解析も報告されている（例えば、特許文献３参照）。

[0005] また、がん患者由来のＢ細胞に発現する抗体遺伝子を、培養がん細胞由来のがん抗原ライブラリーを用いてスクリーニングすることにより、Ｂ細胞の採取源に限定されない、より普遍的な新規のがん抗原に対する抗体遺伝子を同定する方法（例えば、特許文献４参照）や、イムノグロブリンの軽鎖可変領域遺伝子と重鎖可変領域遺伝子の組み合わせからなる遺伝子ライブラリー

を提供する方法（例えば、特許文献５参照）や、短期間で効率的にモノクローナル抗体を調製することが可能であって、しかも汎用性の高い抗体の作製方法（例えば、特許文献６参照）等が提案されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：ＷＯ２０１１／０９３４６５

特許文献2：ＷＯ２０１１／０９３４６７

特許文献3：ＥＰ１２２７１５２Ａ１

特許文献4：特開２０１０－３５４７２

特許文献5：特開２０１１－８７５８６

特許文献6：特開２００６－１８０７０８

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、ビフィズス菌による抗体産生おいて、かかる抗体を菌体外に分泌することができるシグナル配列情報や、かかるシグナル配列情報を利用して抗体を菌体外に分泌することができる抗体発現ベクターや、該抗体発現ベクターで形質転換され、抗体を分泌しうるビフィズス菌を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0008] 乳がん・胃がん・前立腺がんなどにおいて遺伝子増幅によってＨＥＲ２遺伝子産物（細胞の分裂を刺激する細胞表面に存在する受容体ＨＥＲ２）が過剰産生をきたし、がんの増悪因子となっていることがよく知られている。本発明者らは、抗体治療、特にがんに対する抗体治療においては、がんにおいて局所的に抗体を発現・分泌させることが重要であり、そのため、ビフィズス菌の形質転換用プラスミドベクターに適用しうるシグナル配列について、前記特許文献１や２に開示されたシグナル配列を有するビフィズス菌の形質転換用プラスミドを用いたところ、抗体の分泌が十分とはいえないことがわ

かった。そこで、あらたなシグナル配列について検討し、ＳＰ２７及びＳＰ７と命名したシグナル配列や、かかるシグナル配列にリンカー配列を連結したシグナルペプチドーリンカー連結体をコードするＤＮＡの３’末端に、トラスツズマブ一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）の遺伝子が結合されたＤＮＡインサートを挿入したベクターで形質転換したビフィドバクテリウム・ロンガムがトラスツズマブを効率よく菌体外に分泌することを見いだし、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち本発明は、

〔１〕以下のａ）又はｂ）に示されるアミノ酸配列からなるシグナルペプチドをコードするＤＮＡであって、

ａ）配列番号１（ＳＰ２７）又は配列番号１０７（ＳＰ７）に示されるアミノ酸配列；

ｂ）配列番号１又は配列番号１０７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・ロンガムにおいてシグナルペプチドとして機能する、前記アミノ酸配列、

〔２〕配列番号２（ＳＰ２７をコードするＤＮＡ）又は配列番号１０８（ＳＰ７をコードするＤＮＡ）で示される塩基配列からなる上記〔１〕に記載のＤＮＡ、

〔３〕以下のａ）又はｂ）に示されるアミノ酸配列からなるシグナルペプチドのＣ末端に、アミノ酸配列からなるリンカーが連結されたシグナルペプチドーリンカー連結体をコードするＤＮＡであって、

ａ）配列番号１又は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列；

ｂ）配列番号１又は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列において、１又は２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・ロンガムにおいてシグナルペプチドとして機能する、前記アミノ酸配列、

〔４〕シグナルペプチドーリンカー連結体が、配列番号３（ＳＰ２７Ｌ６）

又は配列番号１０９（ＳＰ７Ｌ２０）に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする上記〔３〕に記載のＤＮＡ、

〔５〕配列番号４（ＳＰ２７Ｌ６をコードするＤＮＡ）又は配列番号１１０（ＳＰ７Ｌ２０をコードするＤＮＡ）で示される塩基配列からなる上記〔４〕に記載のＤＮＡ、

〔６〕上記〔１〕～〔５〕のいずれか記載のＤＮＡの３’末端に、抗体遺伝子の５’末端が結合したＤＮＡインサート、

〔７〕抗体遺伝子が、抗がん作用を有する抗体の遺伝子である上記〔６〕に記載のＤＮＡインサート、

〔８〕抗がん作用を有する抗体がトラスツズマブである上記〔７〕に記載のＤＮＡインサート、

〔９〕トラスツズマブが、トラスツズマブ一本鎖抗体である上記〔８〕に記載のＤＮＡインサート、

〔１０〕上記〔６〕～〔９〕のいずれか記載のＤＮＡインサートが挿入されたベクター、

〔１１〕上記〔１０〕に記載のベクターで形質転換された腸内細菌、

〔１２〕ビフィドバクテリウム属に属する微生物である上記〔１１〕に記載の腸内細菌、

〔１３〕ビフィドバクテリウム属に属する微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである上記〔１２〕に記載の腸内細菌、

〔１４〕上記〔１０〕～〔１３〕のいずれか記載の腸内細菌を有効成分とする抗体医薬組成物、

〔１５〕抗がん剤組成物であることを特徴とする上記〔１４〕に記載の抗体医薬組成物に関する。

## 発明の効果

[0010] 本発明によると、抗体の分泌に優れたシグナルペプチドやシグナルペプチドーリンカー連結体をコードするＤＮＡを利用することにより、効率よく抗体を菌体外に分泌しうるビフィズス菌を得ることができ、上記抗体がトラス

ツズマブ等の抗がん作用を有する抗体の場合、かかるビフィズス菌は抗がん剤として有用である。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1]Trastuzumab scFv分泌プラスミドの構造を示す図である。Trastuzumab scFvコード配列をタンパク質発現用シャトルプラスミドに挿入し、組換えビフィズス菌を作製した。分泌用に、Trastuzumab scFvの先頭に、分泌シグナル及びリンカー配列を融合させ、Trastuzumab scFvタンパク質の検出用に、Ｃ末端にヒスチジンタグを融合させた。プラスミドの構造を図１に示す。これらプラスミドを用いてビフィズス菌Bifidobacterium longum 105A株の形質転換を行った。

[図2]Trastuzumab scFv抗体の全塩基配列を示す図である。

[図3]プラスミドpSP1B-9の構造を示す図である。

[図4]プラスミドpHuSP1-Trastuzumab scFvを鋳型としたＰＣＲ産物の構造を示す図である。

[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構造を示す図である。組換えビフィズス菌の培養上清を用いてウェスタン解析を行った。検出は、ヒスチジンタグを指標に行った。３種類の組換え菌（プラスミド名：HuSP27L0-Trastuzumab scFv、HuSP27L6-Trastuzumab scFv、HuSP3L22-Trastuzumab scFv）でバンドが検出された。

[図6]ビフィズス菌２種（HuSP27L6-Trastuzumab scFv、HuSP3L22-Trastuzumab scFv）でのTrastuzumab scFv発現をウェスタンブロッティングにて解析した結果を示す図である。

[図7]Ｈｉｓタグで精製したタンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。上記組換えビフィズス菌３株を培養し、培養上清よりヒスチジンタグ融合タンパク質精製キット(TALON Metal Affinity Resin、タカラバイオ社製)を用いて精製を行った。精製タンパク質を４－２０％ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、染色してバンドを切出した。

[図8]Ｈｉｓタグで精製したタンパク質のＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる分析結果を示す図である。切出したゲルを脱色後、ＤＴＴによるシスチンの還元、アルキル化処理、トリプシン処理し、ペプチド断片をゲル内より抽出した。このペプチド断片溶液を用いてＬＣ－ＭＳ／ＭＳ解析を行った。検出されたペプチドを、データベース（上記プラスミドのTrastuzumab scFvコード配列を予め登録）と照合した。Trastuzumab scFvのアミノ酸配列と一致するペプチド断片を一部検出した。

[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を示す図である。

[図10]Trastuzumab scFv分泌ベクターの構造と大腸菌による発現を示す図である。

[図11]Trastuzumab scFvとＨＥＲ２細胞外ドメインのBiacore X100による親和性測定結果を示す図である。

[図12]Trastuzumab full-body抗体とＨＥＲ２細胞外ドメインのBiacore X100による親和性測定結果を示す図である。

[図13]Trastuzumab scFv及びTrastuzumab full-body抗体のヒト乳癌細胞株結合能ＦＡＣＳ解析の結果を示す図である。

[図14]Cy5.5標識Trastuzumab scFvの生体内動態を示す図である。

[図15]Cy5.5標識Trastuzumab full-body抗体の生体内動態を示す図である。

[図16]ヒト乳癌ＭＤＡ－ＭＢ－３６１細胞の同所移植腫瘍に対するTrastuzumab scFvの増殖抑制効果を示す図である。

[図17]ビフィズス菌B. longum 105A/pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvでのTrastuzumab scFv発現をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析した結果を示す図である。

[図18]longum 105A/pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvから精製したTrastuzumab scFvとヒト乳癌細胞株（ＨＥＲ２陽性株：ＳＫ－ＢＲ－３、及びＢＴ－４７４／ＨＥＲ２陰性株：ＳＫ－ＭＥＬ－２８）との結合を免疫染色により示す図である。

[図19]longum 105A/pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvから精製したTrastuzum

ab scFvとヒト乳癌細胞株（ＨＥＲ２陽性株：ＳＫ－ＢＲ－３、及びＢＴ－４７４／ＨＥＲ２陰性株：ＳＫ－ＭＥＬ－２８）との結合をフローサイトメトリー法を用いて示す図である。

[図20]B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvより精製したTrastuzumab scFvがＢＴ４７４乳癌細胞に対し用量依存性の細胞増殖抑制活性を持つことを示す図である。

[図21]ヒト胃癌細胞株ＮＣＩ－Ｎ８７の同所移植腫瘍に対するB. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvの抗腫瘍効果を示す図である。

[図22]ヒト胃癌細胞株ＮＣＩ－Ｎ８７の同所移植腫瘍内におけるビフィドバクテリウム属細菌の局在をグラム染色にて示す図である。

[図23]ヒト胃癌細胞株ＮＣＩ－Ｎ８７の同所移植腫瘍内におけるTrastuzumab scFvの局在を抗His-tag抗体を用いた免疫組織染色にて示す図である。

## 発明を実施するための形態

[0012] 本発明におけるシグナルペプチドとしては、ａ）配列番号１（ＳＰ２７）又は配列番号１０７（ＳＰ７）に示されるアミノ酸配列からなるシグナルペプチド、又は、ｂ）配列番号１又は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列において、１若しく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・ロンガムにおいてシグナルペプチドとして機能する、上記アミノ酸配列からなるシグナルペプチド（変異シグナルペプチド）であれば特に制限されず、上記「１若しく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個の任意の数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味する。上記変異シグナルペプチドは、配列番号１又は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列との配列同一性が９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上である。

[0013] 本発明の上記ａ）に示される配列番号１（ＳＰ２７）又は配列番号１０７（ＳＰ７）に示されるアミノ酸配列からなるシグナルペプチドをコードする

ＤＮＡとしては、上記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、配列番号２（ＳＰ２７をコードするＤＮＡ）又は配列番号１０８（ＳＰ７をコードするＤＮＡ）で示される塩基配列からなるＤＮＡを具体的に例示することができる。これらＤＮＡは、化学合成、遺伝子工学的手法などの当業者に既知の任意の方法により作製することができる。

[0014] 本発明の上記ｂ）に示される変異シグナルペプチドをコードするＤＮＡ（変異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任意の方法により作製することもできる。具体的には、配列番号２（ＳＰ２７をコードするＤＮＡ）又は配列番号１０８（ＳＰ７をコードするＤＮＡ）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 Mannual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.,1989.以後”モレキュラークローニング第２版”と略す）、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。

[0015] 本発明のシグナルペプチドのＣ末端にはリンカー（ペプチド）を連結することが好ましい。シグナルペプチドのＣ末端にリンカーを連結したシグナルペプチドーリンカー連結体を構成するリンカーとは、上記シグナルペプチドのＣ末端と、目的タンパク質である抗体のＮ末端との間を連結するアミノ酸配列からなるペプチドを指し、リンカーとしては、例えば、シグナルペプチドのＣ末端に存在するペプチド等から適宜選択することができる。また、アミノ酸０～３０残基、好ましくは３～２５残基、より好ましくは５～１５残基からなるリンカーを好適に挙げることができるが、配列番号３（ＳＰ２７Ｌ６）又は配列番号１０９（ＳＰ７Ｌ２０）に示されるアミノ酸配列からな

るリンカーを特に好適に挙げることができる。

[0016] 本発明のシグナルペプチド－リンカー連結体をコードするＤＮＡとしては、シグナルペプチド－リンカー連結体の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、配列番号４（ＳＰ２７Ｌ６をコードするＤＮＡ）又は配列番号１１０（ＳＰ７Ｌ２０をコードするＤＮＡ）で示される塩基配列からなるＤＮＡを具体的に例示することができる。これら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任意の方法により作製することもできる。

[0017] 本発明のＤＮＡインサートとしては、上記本発明のシグナルペプチドをコードするＤＮＡや、シグナルペプチド－リンカー連結体をコードするＤＮＡの３’末端に、抗体遺伝子の５’末端が結合したＤＮＡであれば特に制限されず、かかるＤＮＡインサートは、発現プラスミドベクターに挿入される。上記抗体遺伝子としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト化抗体タイプのfull-body抗体、Ｆｃ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、ジスルフィド安定化抗体（ｄｓＦｖ）などをコードするＤＮＡを好適に挙げることができる。これら抗体遺伝子は、そのアミノ酸配列情報や塩基配列情報に基づき、化学合成、遺伝子工学的手法等の公知の方法により作製することができる（例えば、特許文献４～６参照）。

[0018] 上記抗体遺伝子の中でも、抗がん作用を有する抗体の遺伝子が好ましい。ここで、抗がん作用を有する抗体として、がん細胞膜上に発現する腫瘍関連抗原と呼ばれる分子、各種増殖因子の受容体、あるいは白血球分化抗原群（ＣＤ）などの分子に対して作製されたモノクローナル抗体などを挙げることができる。主な抗腫瘍作用の機序としては、抗体－抗原結合に起因したＡＤＣＣ（抗体依存性細胞傷害）細胞活性を高めることによる、ＮＫ細胞のがん殺傷能力増強が知られている。抗がん作用を有する抗体として、具体的には抗ヒトＣＤ２０ヒト・マウスキメラモノクローナル抗体のリツキシマブ、抗ＨＥＲ２ヒト化モノクローナル抗体のトラスツズマブ、抗ヒトＣＤ５２ヒト

化モノクローナル抗体のアレムツズマブ、抗ヒト上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）キメラ化モノクローナル抗体のセツキシマブ、抗ヒト血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）ヒト化モノクローナル抗体のベバシズマブ等を挙げることができるが、これら抗体の一本鎖抗体、中でもトラスツズマブ一本鎖抗体を好適に例示することができる。

[0019] 本発明のベクターとしては、上記本発明のＤＮＡインサートが挿入された、宿主細胞に適した発現プラスミドベクターであれば特に制限されず、腸内細菌、好ましくはビフィドバクテリウム属に属する微生物、中でもビフィドバクテリウム・ロンガムで本発明のＤＮＡインサートを発現しうるものが好ましい。また、２種又はそれ以上の異なる生物種の宿主で自律増殖できるシャトルベクターが好ましく、松村らの文献［Matsumura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1211-1212 (1997)］に開示されるビフィドバクテリウム・ロンガムＢＫ５１のｐＴＢ６と大腸菌（E. coli）のｐＢＲ３２２とから構築されたシャトルベクターｐＢＬＥＳ１００や、田中らの文献［Tanaka et al., Biosci Biotechnol Biochem.;69(2):422-425 (2005, Feb)］に開示されるシャトルベクターｐＡＶ００１及びｐＢＲＡＳＴＡ１０１や、ＢＩＣ法（Brevibacillus In vivo Cloning法）で用いられる大腸菌とブレビバチルス（B. subtilis）から構築され、グラム陽性菌において分子内にＳ－Ｓ結合を有する真核生物由来の分泌タンパク質を発現することができるｐＢＥ－ＳＤＮＡシャトルベクター（タカラバイオ社製）が更に好ましい。また、上記発現プラスミドベクターには、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子としての薬剤耐性遺伝子を含んでいてもよい。

[0020] また、上記発現プラスミドベクターは、目的とする抗体の高分泌発現系用のシグナルペプチドのスクリーニング系を利用して、例えば、以下のようにして選択・評価することができる。ビフィドバクテリウム・ロンガムｈｕｐプロモーター（Ｈｕプロモーター）、或いはビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａ Ｐ３０プロモーター（Ｐ３０プロモーター）等のプロモーターを含み、その下流に分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ、マルチクロー

ニングサイト（ＭＣＳ）及びＨｉｓタグ配列が配置され、ＭＣＳに目的とする抗体遺伝子を挿入したのち、制限酵素で切断して線状化したものと、Clontech社のIn-Fusionクローニングシステム等を用いて、目的とする抗体に適した本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ等を挿入したベクターで形質転換したビフィズス菌の抗体の分泌量を測定することにより、使用可能である発現プラスミドベクターを選択することができる。

[0021] 本発明の腸内細菌としては、上記本発明のベクターで形質転換された腸内細菌であれば特に制限されず、宿主細胞である腸内細菌はヒトや動物の腸内部に生息している偏性嫌気性菌を主とする常在細菌であり、ラクトバチルス菌、ビフィズス菌といったグラム陽性の乳酸菌や、クロストリジウム菌、大腸菌、バクテロイデス菌などのグラム陰性菌を具体的に例示することができるが、中でも、ビフィズス菌を好適に挙げることができる。

[0022] 上記ビフィズス菌としては、具体的にはビフィドバクテリウム・ロンガム（Bifidobacterium longum）、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. thermophirum）、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）などを挙げることができる。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、寄託機関から容易に入手することができ、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガムＡＴＣＣ－１５７０７、ビフィドバクテリウム・ビフィダムＡＴＣＣ－１１８６３、ビフィドバクテリウム・インファンティスＡＴＣＣ－１５６９７を用いることができる。

[0023] 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１０５Ａ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株を挙げることができ、中でもビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａ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ａＳ－１株、ビフィドバクテリウム・ブレーベＩ－５３－８W株を挙げることができ、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ａＳ－１株が好ましい。ビフィドバクテリウム・インファンティスについては、例えば、ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株（ＪＣＭ１２２２）、ビフィドバクテリウム・インファンティスＩ－１０－５株を挙げることができ、中でも、ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株、ビフィドバクテリウム・インファンティスＩ－１０－５株が好ましい。ビフィドバクテリウム・ラクテンティスの株については、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。

[0024] 本発明における腸内細菌内へのベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法、In-Fusionクローニングシステム（Clontech社）、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、ＤＥＡＥデキストラン法、リン酸カルシウム法等を挙げることができるが、エレクトロポレーション法が好ましく、また、Lipofectin Reagent（登録商標）、Lipofectamine（登録商標）、Lipofectamine（登録商標）2000 Reagent（Invitrogen社製）や、SuperFect（登録商標）Transfection Reagent（キアゲン社製）、FuGENE（登録商標）HD Transfection Reagent（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、FuGENE（登録商標）6 Transfection Reagent（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）等の市販のトランスフェクション試薬を用いる当技術分野で広く用いられている手法を挙げることができる。

[0025] 上記本発明の腸内細菌は、抗体医薬として使用することができ、抗がん作用を有する抗体の遺伝子を含むＤＮＡインサートで形質転換された本発明の腸内細菌は抗がん剤として使用することができる。したがって、本発明の抗体医薬組成物としては、抗体、好ましくは抗がん作用を有する抗体を分泌し

うる上記本発明の腸内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、分泌する抗体の作用・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。

[0026] 本発明の抗体医薬組成物の剤型としては、液剤あるいは固形製剤を挙げることができる。液剤は、本発明の腸内細菌の培養液を精製し、これに必要に応じて適当な生理食塩液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。また、固形製剤は、液剤に適当な保護剤を添加してアンプル又はバイアル瓶などに充填した後凍結乾燥するか、液剤に適当な保護剤を添加して凍結乾燥した後これをアンプル又はバイアル瓶などに充填することにより製造することができる。本発明の抗体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、例えば静脈注射、皮下注射、局所注入、脳室内投与等を行うことができ、静脈注射が最も好ましい。

[0027] 本発明の抗体医薬組成物の投与量は、疾患部位において生育でき、且つ、有効治療量の活性抗体を発現するのに十分な量である限り特に制限はされず、疾患の程度、患者の体重、年齢、性別に応じて適宜選択し、改善の度合いに応じて適宜増減することができるが、経済上の観点及び副作用を可能な限り回避する観点から、必要な治療効果が得られる範囲においてできる限り少ない方が好ましい。

[0028] 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、適当な補液で希釈して持続注入することが好ましい。例えば、成人の場合、本発明の腸内細菌の菌体を、体重１ｋｇ当たり$10^{6}$～$10^{12}$ｃｆｕを１日１～複数回に分け、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微生物の菌体を$10^{4}$～$10^{10}$ｃｆｕ／ｍＬ含有する製剤を、成人１人あたり１～１０００ｍＬを直接、又は適当な補液で希釈して、１日１～数回に分け、１～数日連続して投与する。

[0029] また、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微生物の菌体を、体重１ｋｇ当たり$10^6$～$10^{12}$ｃｆｕ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、本発明のビフィズス菌の菌体を$10^4$～$10^{10}$ｃｆｕ／ｍＬ含有する製剤を、成人１人あたり１～１０００ｍＬを直接、１日数回、必要に応じ１～数日連続して投与する。

[0030] 本発明の抗体医薬組成物が抗がん剤組成物は、例えば大腸がん、脳腫瘍、頭頸部がん、乳がん、肺がん、食道がん、胃がん、肝がん、胆嚢がん、胆管がん、膵がん、膵島細胞がん、絨毛がん、結腸がん、腎細胞がん、副腎皮質がん、膀胱がん、精巣がん、前立腺がん、睾丸腫瘍、卵巣がん、子宮がん、絨毛がん、甲状腺がん、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚がん、悪性黒色腫、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、扁平上皮がんなどに適用することができる。

## 実施例

[0031] 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。

## 実施例 1

[0032] １．分泌型Trastuzumab scFv発現プラスミド（pHuSPx-Trastuzumab scFv）の構築

ビフィズス菌のヒストン様プロモーター（Huプロモーター）にて分泌型Trastuzumab scFv（抗ＨＥＲ２低分子化一本鎖抗体［ｓｃＦｖ］）を発現させるプラスミドを構築した。最初にシグナルペプチド１（ＳＰ１）にTrastuzumab scFvを連結したプラスミドpHuSP1-Trastuzumab scFvを作製後、シグナルペプチド部分を入れ換えてpHuSPx-Trastuzumab scFvを作製した。作製の概要を図１に示す。詳細は以下のとおりである。

[0033] ２．pHuSP1-Trastuzumab scFv作製におけるインサート調製

Trastuzumab scFvインサートを以下のように調製した。まず、Trastuzumab full-body抗体のアミノ酸配列を、RCSB Protein data bank（ＰＤＢ）（http://www.pdb.org/pdb/home/home.do）からダウンロード（PDB 1N8Z）した。ＶＨ、ＶＬおよびリンカー配列のＤＮＡは、ＰＤＢデータベースに登録されたｃＤＮＡ配列をもとに決定し（図２）（配列番号５～１１）、このTrastuzumab scFvコード配列（末端にHis-tag配列を含む）をpOZ1ベクターに挿入したプラスミドpOZ Trastuzumab scFv-Hisを鋳型としてＰＣＲを行った。プライマーとしてTrastuzumab scFv_ins_F3プライマー（配列番号１４）及びTrastuzumab scFv_ins_R2プライマー（配列番号１５）（表１、各プライマーの５’側の１５塩基は、以下に示すベクターと相同な配列を有する。）を使用し、Trastuzumab scFvコード領域を増幅して７７７ｂｐのインサートＰＣＲ産物を得た。２．０％アガロースゲル（１×TEB buffer、エチジウムブロマイド入り）を使用してインサートＰＣＲ産物をＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0034] [表1]

| 配列番号 | | プライマー名 | 配列(5' -> 3') | 鋳型プラスミド |
|---|---|---|---|---|
| 12 | ベクター調製プライマー | SP1_Vec_F3 | CCTTCTGCTCGTAGCGATTAC | SP1B-9 |
| 13 | | SP1_Vec_R2 | TTCCACGCGCTCCTTGG | （配列番号16） |
| 14 | Trastuzumabインサート | Trastuzumab scFv_ins_INF_F3 | asggagcgcgtggaaGAAGTTCAGCTGGTTGAAAGC | pOZ Trastuzumab |
| 15 | 調製用プライマー(In-Fusion) | Trastuzumab scFv_ins_INF_R2 | gctacgagcagaaggTTAATGATGGTGATGATGATGTTTAATTTC | scFv-His |

小文字はIn-Fusionクローニング用に目的遺伝子増幅用プライマーへ付加したベクター5'末端に相補的な15塩基配列

[0035] ３．pHuSP1-Trastuzumab scFv作製におけるベクター調製

ベクターを以下のように調製した。プラスミドpSP1B-9（ＧＦＰｕｖ遺伝子、大腸菌の複製起点、ビフィズス菌の複製起点、スペクチノマイシン耐性遺伝子を含む。（図３）（配列番号１６）を、鋳型としてＰＣＲを行った。プライマーとしてSP1_Vec_F3プライマー（配列番号１２）及びSP1_Vec_R2プライマー（配列番号１３）（表１）を使用し、ＧＦＰｕｖ遺伝子を除いた領域を増幅して３９８３ｂｐのベクターＰＣＲ産物を得た。（PrimeSTAR；登録商標 HS Premix、タカラバイオ社製）。０．８％アガロースゲル（１×TEB buffer、エチジウムブロマイド入り）を使用してベクターＰＣＲ産物をＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0036] ４．pHuSP1-Trastuzumab scFv作製におけるIn-Fusion反応によるインサートとベクターの連結

In-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit with Cloning Enhancer（Clontech社製）を用いてインサートＰＣＲ産物とベクターＰＣＲ産物の連結を行った。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た。５×In-Fusion HD Enzymes premix ２μＬ、Cloning Enhancer １μＬ、インサート及びベクターの必要量を混合し、滅菌水で反応系の総量を１０μＬとした。３７℃で１５分間反応後、５０℃で１５分間反応し、４℃に静置した。

[0037] ５．pHuSP1-Trastuzumab scFv作製における大腸菌の形質転換、プラスミド抽出、シークエンス

In-Fusion反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（Invitrogen社製）の形質転換を行い、ＬＢ（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイシン含有）プレートに塗布後３７℃で一晩培養した。形質転換条件は、製品説明書に従った。形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit，キアゲン社製）。このプラスミドの全塩基配列が設計通りになっていることを確認し、プラスミドpHuSP1-Trastuzumab scFvとした。

[0038] ６．シグナルペプチドを入れ換えたpHuSPx-Trastuzumab scFv（ｘ＝２～１０，１２～１６，１９，２１～２７）作製におけるインサート調製（ＳＰ２～ＳＰ１０，ＳＰ１２～ＳＰ１６，ＳＰ１９，ＳＰ２１～ＳＰ２７）

各シグナルペプチドを含むプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行い、インサートを調製した。表２に示したプライマー（各プライマーの５’側の１５塩基は以下に示したベクターと相同な配列を有する）及び鋳型を用いてＰＣＲを行い、インサートＰＣＲ産物を得た。２．０％アガロースゲルを使用してインサートＰＣＲ産物をＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見

積もった。

[0039] [表2]

| 配列番号 | | プライマー名 | 配列(5' -> 3') | 鋳型プラスミド |
|---|---|---|---|---|
| 17 | ベクター調製用プライマー | Hu-Trastuzumab_vec_F1 | GAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGG | pHuSP1-Trastuzumab(配列番号67) |
| 18 | | Hu-Vec_R1 | AAAGCATCCTTCTTGGGTCAGG | |
| 19 | SPインサート調製用プライマー(In-Fusion) | SP2B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttGTGGGTATGACTGAGAAGGC | SP2B-3(配列番号68) |
| 20 | | SP2B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcCAAAAACAGCACGCGG | |
| 21 | | SP3B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGTTCAATAAGCGACAGATCG | SP3B-4(配列番号69) |
| 22 | | SP3B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagntgaacttcGGCGATGGTCAGCTTGC | |
| 23 | | SP4B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGACCACTCACAACAGCCAG | SP4B-1(配列番号70) |
| 24 | | SP4B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGCCGAACAGACGCGG | |
| 25 | | SP5B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGACCGCGATTGACGAG | SP5B-2(配列番号71) |
| 26 | | SP5B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcTTGGTCGATGATGGCCTTG | |
| 27 | | SP6B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAAGATTGCGGTTGCAG | SP6B-1(配列番号72) |
| 28 | | SP6B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcATCGACAATAGGACTTTTCCCATTG | |
| 29 | | SP7B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGTTTGCGTGCGTAGCC | SP7B-1(配列番号73) |
| 30 | | SP7B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGGTGGAGGTGGATTCGG | |
| 31 | | SP8B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGGTTGGTGACGACACCG | SP8B-1(配列番号74) |
| 32 | | SP8B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcCATCGTTGCCTCGCC | |
| 33 | | SP9B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGGGCACCATGATGCG | SP9B-1(配列番号75) |
| 34 | | SP9B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGACGATCTGATGCGCCAG | |
| 35 | | SP10B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGATGACTGGTGCACAGGC | SP10B-1(配列番号76) |
| 36 | | SP10B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcTCGCTGCTTGAGTTTGCC | |
| 37 | | SP12B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGGTGTCTTTCAATAAACTGACC | SP12B-2(配列番号77) |
| 38 | | SP12B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGGAACGGGTCCACAGGGT | |
| 39 | | SP13B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGGTCGCCGTCCTCAG | SP13B-1(配列番号78) |
| 40 | | SP13B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcAGACTCGCTAGCACAGCACAG | |
| 41 | | SP14B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttTTGCCGGGACCTATATGTCC | SP14B-3(配列番号79) |
| 42 | | SP14B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcTTGGGCCACTATTGTCTTCTCG | |
| 43 | | SP15B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAAACGTAGCGATTATATGTTGG | SP15B-2(配列番号80) |
| 44 | | SP15B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcCTTGCCTGAGGCATCTTGAATC | |
| 45 | | SP16B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAGCAATAGTGCATCATCGTTTAC | SP16B-2(配列番号81) |
| 46 | | SP16B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGGCCAACGGAGTCGTCTC | |
| 47 | | SP19B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttTTGGCAAGATGGGTCACTC | SP19B-4(配列番号82) |
| 48 | | SP19B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGCCCATGACCGGCATG | |
| 49 | | SP21B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGGCATTGACTGATGAACAGG | SP21B-1(配列番号83) |
| 50 | | SP21B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcACGTGCAGTGGTATGGATGATT | |
| 51 | | SP22B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttTTGGTGTCTATGAGAAGCCCAC | SP22B-2(配列番号84) |
| 52 | | SP22B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGATGCGCTCACGCTTGG | |
| 53 | | SP23B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAACAAGCGATGGAACAAAC | SP23B(配列番号85) |
| 54 | | SP23B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGATCGTCTTGAGAATCTTCAGACG | |
| 55 | | SP24B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGGTCGGCATGCGC | SP24B-4(配列番号86) |
| 56 | | SP24B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGTTGGTGCGGTTCCGG | |
| 57 | | SP25B_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttGTGATGTTATCCACACCCTCCA | SP25B-3(配列番号87) |
| 58 | | SP25B-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcCTGCTCATGATCGGCCCA | |
| 59 | | SP26_HU_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAAGAAGAAAGCTCTTGCTTTCG | SP26-1(配列番号88) |
| 60 | | SP26_L0-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcAGCGTTGCTGTTGGAGCC | |
| 61 | | SP26_HU_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAAGAAGAAAGCTCTTGCTTTCG | SP26-2(配列番号89) |
| 62 | | SP26_L5-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGGTGTCACCGGAGGCAG | |
| 63 | | SP27_HU_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAACACCATTCGTCGCATC | SP27-3(配列番号90) |
| 64 | | SP27_L0-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcCGCTTGTGCGGTTTGAC | |
| 65 | | SP27_HU_ins_INF_F1 | caagaaggatgctttATGAACACCATTCGTCGCATC | SP27-4(配列番号91) |
| 66 | | SP27_L6-Trastuzumab_ins_INF_R1 | aaccagctgaacttcGGTGCGGTTAGCCGTG | |

小文字はIn-Fusionクローニング用に目的遺伝子増幅用プライマーへ付加したベクター5'末端に相補的な15塩基配列

[0040] 7．シグナルペプチドを入れ換えたpHuSPx-Trastuzumab scFv（ｘ＝２～１０

，１２～１６，１９，２１～２７）作製におけるベクター調製（ＳＰ２～ＳＰ１０，ＳＰ１２～ＳＰ１６，ＳＰ１９，ＳＰ２１～ＳＰ２７）

プラスミドpHuSP1-Trastuzumab scFvを鋳型としてＰＣＲを行い、ベクターを調製した。プライマーとしてHu-Trastuzumab_vec_F1プライマー（配列番号１７）及びHu-vec_R1プライマー（配列番号１８）（表２）を使用し、シグナルペプチド部分（ＳＰ１）を除いた領域を増幅して４５８９ｂｐのベクターＰＣＲ産物を得た（図４，Trastuzumab scFv遺伝子、大腸菌の複製起点、ビフィズス菌の複製起点、スペクチノマイシン耐性遺伝子を含む）。ベクターＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにてＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0041] ８．シグナルペプチドを入れ換えたpHuSPx-Trastuzumab scFv（ｘ＝２～１０，１２～１６，１９，２１～２７）作製におけるIn-Fusion反応によるインサートとベクターの連結（ＳＰ２～ＳＰ１０，ＳＰ１２～ＳＰ１６，ＳＰ１９，ＳＰ２１～ＳＰ２７）

上記と同様にIn-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit with Cloning Enhancer（Clontech社製）を用い、インサートＰＣＲ産物とベクターＰＣＲ産物の連結を行った。

[0042] ９．シグナルペプチドを入れ換えたpHuSPx-Trastuzumab scFv（ｘ＝２～１０，１２～１６，１９，２１～２７）作製における大腸菌の形質転換、プラスミド抽出、シークエンス（ＳＰ２～ＳＰ１０，ＳＰ１２～ＳＰ１６，ＳＰ１９，ＳＰ２１～ＳＰ２７）

In-Fusion反応液１μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（Invitrogen社）の形質転換を行い、ＬＢ（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイシン含有）プレートに塗布後３７℃で一晩培養した。形質転換条件は、製品説明書に従った。形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit，キアゲン社製）。このプラスミドのHuプロモーター付近からターミネーター付近までの塩基配列が設計

通りになっていることを確認した。表３に作製したプラスミドを示す。

[0043] [表3]

作製したプラスミド

| 番号 | プラスミド[*1] | SignalP による Cleavage site[*2] |
|---|---|---|
| 1 | pHuSP1-Trastuzumab scFv | 無し |
| 2 | pHuSP2-Trastuzumab scFv | 無し |
| 3 | pHuSP3L22-Trastuzumab scFv | 33/34 |
| 4 | pHuSP4-Trastuzumab scFv | 無し |
| 5 | pHuSP5-Trastuzumab scFv | 無し |
| 6 | pHuSP6-Trastuzumab scFv | 無し |
| 7 | pHuSP7-Trastuzumab scFv | 無し |
| 8 | pHuSP8-Trastuzumab scFv | 無し |
| 9 | pHuSP9-Trastuzumab scFv | 無し |
| 10 | pHuSP10-Trastuzumab scFv | 無し |
| 11 | pHuSP12L20-Trastuzumab scFv | 37/38 |
| 12 | pHuSP13-Trastuzumab scFv | 無し |
| 13 | pHuSP14L20-Trastuzumab scFv | 42/43 |
| 14 | pHuSP15L20-Trastuzumab scFv | 30/31 |
| 15 | pHuSP16-Trastuzumab scFv | 無し |
| 16 | pHuSP19L43-Trastuzumab scFv | 22/23 |
| 17 | pHuSP21-Trastuzumab scFv | 無し |
| 18 | pHuSP22-Trastuzumab scFv | 無し |
| 19 | pHuSP23L27-Trastuzumab scFv | 33/34 |
| 20 | pHuSP24-Trastuzumab scFv | 無し |
| 21 | pHuSP25-Trastuzumab scFv | 無し |
| 22 | pHuSP26L0-Trastuzumab scFv | 21/22 |
| 23 | pHuSP26L5-Trastuzumab scFv | 21/22 |
| 24 | pHuSP27L0-Trastuzumab scFv | 52/53 |
| 25 | pHuSP27L6-Trastuzumab scFv | 52/53 |

*1: プラスミドの名前について
例:pHuSP3L22-Trastuzumab scFv
・p はプラスミドの p
・Hu は Hu プロモーターのこと
・SP はシグナルペプチドのこと、固有の通し番号がある。
・L はリンカー数のこと。シグナルペプチド切断予測部位と目的タンパク間のアミノ酸数
(この場合は切断予測部位と Trastuzumab scFv の間に 22 アミノ酸あり)
・最後に目的タンパクの名前(この場合は Trastuzumab scFv)
*2: 分泌シグナル切断部位予測ソフト SignalP Ver4.0 で解析した切断予測部位。
切断予測部位がない場合は、リンカー数を設定できないためプラスミドの名前に
Lxx の記述が無い。

[0044] １０．シグナルペプチドを入れ換えたpHuSPx-Trastuzumab scFv（ｘ＝２～１

０，１２～１６，１９，２１～２７）作製におけるビフィズス菌の形質転換（ＳＰ２～ＳＰ１０，ＳＰ１２～ＳＰ１６，ＳＰ１９，ＳＰ２１～ＳＰ２７）

形質転換した大腸菌から抽出したプラスミドＤＮＡ（表３）を１．５～３μＬ用いて、ビフィズス菌Bifidobacterium longum 105A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社製）により行った。電気ショック後は、キュベットにＩＭＲ液体培地８００μＬとビタミンＣ添加液５０μＬの混合液を即時に加え、これを滅菌済みの２ｍＬマイクロチューブに回収した。各チューブについて同様の操作を行い、これら２ｍＬチューブの蓋をゆるめてアネロパックとともに密閉容器に入れ、３７℃に設定したインキュベータに入れ、３時間保温した。保温後の各菌懸濁液をよく混ぜた後、その１００μＬを量り取り、ＩＭＲ寒天培地（７５μｇ／ｍＬ ＳＰＣＭを含有）１枚にそれぞれ塗抹した。これらの寒天培地を脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学社製）とともに密閉容器に入れ、３７℃に設定したインキュベータにて２～３日間培養した。生育したプレート上のコロニーをディスポスティックでピックアップし、ＢＬ－ｂＳ寒天培地（７５μｇ／ｍＬ ＳＰＣＭを含有）に画線し、脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学社製）とともに密閉容器に入れ、３７℃に設定したインキュベータにて１日間培養し、画線培養物とした。

[0045] １１．培養上清及び細胞内タンパク質のウェスタンブロット解析

上記で得た組換えビフィズス菌（Bifidobacterium longum 105A/pHuSPx-Trastuzumab scFv（ｘ＝２～１０，１２～１６，１９，２１～２７）の画線培養物を、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイシン）液体培地に植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養液）。次に、ＤＭＥＭ（低グルコース、ピルビン酸、ＨＥＰＥＳ）細胞培養用培地（ライフテクノロジーズ社製、cat #12320-032）：APS-2S-2.5SE＝９：１にスペクチノマイシンを７５μｇ／ｍＬになるよう添加した培地に、活性化培養液０．５％を

植菌した。これを３７℃で１５時間嫌気培養した。この培養液を用いて、培養上清及び細胞内タンパク質を以下のように調製した。培養液を遠心分離後、培養上清を回収した。この培養上清中のタンパク質をトリクロロ酢酸（ＴＣＡ）により沈殿させ、アセトンにて洗浄後、電気泳動用バッファーに溶解し、培養上清中のタンパク質を濃縮した。別に、細胞内タンパク質を以下のように抽出した。培養液１ｍＬを４ｍＬのＰＢＳと混合し、１２，０００ｒｐｍ、５ｍｉｎ、４℃にて遠心分離後、上清を除去し、この沈殿に５ｍＬのＰＢＳを加え懸濁、遠心分離し上清を除去する操作を２回行なった。洗浄後の菌体にＰＢＳを加え全量を１ｍＬとした後、超音波処理により菌体を破砕した。これを遠心分離後、上清を回収し、これを細胞内抽出物とした。上記培養上清濃縮物（培養液１ｍＬ相当）、細胞内タンパク抽出物培養液１ｍＬ相当）をミニプロティアンＴＧＸゲル４－２０％（バイオラッド社製）にて電気泳動した。これをＰＶＤＦ膜（Invitrogen社製、iBlot Transfer Stacks）にiBlot Transfer Device（Invitrogen社製）を用いて転写した。ブロッティング終了後の膜をブロッキングした後、一次抗体にAnti-His antibody（GE Healthcare社製）、二次抗体にanti-mouse Ab-HRP（GE Healthcare社製）を使用して反応を行ない、Western Lightning Ultra（Perkin Elmer社製）にて発光させた。これをイメージングアナライザー（Fluor S Max，バイオラッド社製）にて解析した。その結果、３種の菌（B. longum 105A/pHuSP3L22-Trastuzumab scFv、B. longum 105A/pHuSP27L0-Trastuzumab scFv、B. longum 105A/pHuSP27L6-Trastuzumab scFv）で分泌が認められた（図５）。ウェスタンブロッティングの結果のうち、B. longum 105A/pHuSP27L6-Trastuzumab scFvとB. longum 105A/pHuSP3L22-Trastuzumab scFvの結果を図６に示す。Trastuzumab scFvのサイズ付近（約２５ｋＤａ）にバンドを確認することができた。

[0046] １２．ビフィズス菌培養上清精製物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ

分泌型Trastuzumab scFvによる組換えビフィズス菌（Bifidobacterium longum 105A)の画線培養物を、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイ

シン）液体培地に植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した(活性化培養液)。次に、ＤＭＥＭ（低グルコース、ピルビン酸、ＨＥＰＥＳ）細胞培養用培地（ライフテクノロジーズ社製、cat #12320-032）：APS-2S-2.5SE＝９：１にスペクチノマイシンを７５μｇ／ｍＬになるよう添加した培地に、活性化培養液０．５％を植菌した。これを３７℃で１６時間嫌気培養した。培養液を遠心分離後、培養上清に、硫酸アンモニウム（酵素精製用、和光純薬工業社製）を８０％飽和溶液になるよう添加し、４℃にて一晩撹拌した。これを遠心分離後、沈殿物に１×ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）を加え、沈殿を溶解した。この溶液を、ヒスチジンタグタンパク質の精製キット（TALON Metal Affinity Resin、タカラバイオ社製)を用いて精製した。精製溶液を限外濾過（アミコンウルトラ 10K、メルクミリポア社製）にて濃縮した。濃縮タンパク質溶液に、等量の２×SDS sample bufferを混合し、９５℃にて３分間加熱し、これをＳＤＳ－ＰＡＧＥの試料とした。上記試料を、ミニプロティアンＴＧＸゲル（４－２０%、BIO-RAD社製）を用いて１×ＳＤＳバッファーにて電気泳動した。電気泳動終了後のゲルを水にて洗浄後、染色液（SimplyBlue eTM SafeStain）にて染色し、水にて脱色した。結果を図７に示す。リンカーのないSP27L0では、Trastuzumab scFvのサイズ付近（約２５ｋＤａ）のバンドを確認することができなかったが、（図中上段矢印）、リンカーを組み込んだSP27L6、SP3L22では、予想されるTrastuzumab scFvのサイズのバンドが確認された（図７）。

[0047] １３．精製タンパク質のＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる分析

組換えビフィズス菌B. longum 105A/pHuSP27L6-scFvを培養し、培養上清よりヒスチジンタグ融合タンパク質精製キット（TALON Metal Affinity Resin，タカラバイオ社製）を用いて精製を行った。精製タンパク質を４－２０％ポリアクリルアミドゲル（ミニプロティアンＴＧＸゲル、Bio-Rad社製）にて電気泳動後、Simply Blue Stain（Invitrogen社製）で染色してバンドを切出した。染色後のゲルからバンドを切り出し、１×１ｍｍ$^3$サイズのゲルキューブにし、ゲルを脱色液（３０％アセトニトリル（和光純薬社製）、２５ｍＭ

重炭酸アンモニウム（SIGMA社製）を含む水溶液）で脱色後、１０ｍＭ ＤＴＴ（（±）－ジチオトレイトール、和光純薬社製）で還元（５６℃、４５ｍｉｎ．）、室温まで空冷後５５ｍＭ $ICH_2CONH_2$（ヨードアセトアミド、和光純薬社製）でアルキル化（室温、遮光、３０ｍｉｎ．）した。アルキル化後、１２．５ｎｇ／ｍＬトリプシン（Promega社製）でゲル内消化（３７℃、１６ｈ）し、消化ペプチド断片をゲル内より抽出し濃縮した。（Reference: Shevchenko A. et al. Anal. Chem. 68, 850-858, 1996.）得られたペプチド断片を用いてＬＣ－ＭＳ／ＭＳ（Waters nano ACQUITY UPLC, Xevo QTOF社製）で分析及び解析し、同定されたペプチドを、Trastuzumab scFvアミノ酸配列と照合した（図８）。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を図９に示す。

[0048] １４．組換えベクター（pUC119プラスミド）の構築およびTrastuzumab scFvの作製

上述と同様にＰＤＢデータベースから得られた、Trastuzumabｃ ＤＮＡ配列をもとに、人工的に遺伝子合成されたＤＮＡを、pUC119プラスミドへ組み入れてベクターを作製し、Trastuzumab scFv発現用ベクターとした。Rosetta2 E. coli (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) にtrastuzumab-scFv-His plasmidを遺伝子導入し、アンピシリンとクロラムフェニコールを含むagarでコロニーを選別した。コロニーは、２％グルコースを含むアンピシリン含有ＬＢ培地１０ｍＬにて３７℃で増殖させた。その後IPTGを含む２００ｍＬのＬＢ培地に移し、２５℃で２０時間培養を継続した。大腸菌を回収し、ベンゾヌクレアーゼを含むBugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen社製）にて細胞ライセートを抽出し、その後１００００×ｇで５分間遠心し、抗体タンパクを含む上清を回収した。Ｈｉｓタグの付いた抗体タンパクは、His Trap HP Ni Sepharose columnおよびSephadex G25 gel filtrationにて精製された。精製後、Tris-Glycine gelにてＳＤＳ－ＰＡＧＥを施行し、３０ｋＤａに一致したTrastuzumab scFvのバンドが確認された（図１０）。精製されたｓｃＦｖ抗体は、フローサイトメトリーやビアコアでの表面プラズモン

共鳴（ＳＰＲ）アッセイに使用された。

[0049] １５．表面プラズモン共鳴(ＳＰＲ)法を用いたBiacore X100によるTrastuzumab scFvのＨＥＲ２細胞外ドメインに対する親和性測定

Trastuzumab scFvは大腸菌Rozetta2株を用いて作製したものを使用し、ＨＥＲ２細胞外ドメインタンパク（ＨＥＲ２.ex.)及びTrastuzumab full-body抗体は昆虫由来ＨＦ細胞株を用いて作製したものを使用した。ＳＰＲ解析はBiacore X100を用いて行った。測定に使用したすべての試薬やセンサーチップはＧＥヘルスケアから購入した。ＨＥＲ２.ex.のＣＭ５センサーチップ上への固定にはｐＨ５．０の１０ｍＭ Acetate溶液を、Trastuzumab full-body抗体の固定にはｐＨ５．５の溶液を用いた。測定は０．０５％又は０．００５％Tween-PBS（ｐＨ７．４）の緩衝液を用い、流速３０μＬ／ｍＬ、２５℃で行った。センサーチップ上で、固定化したＨＥＲ２.ex.に対し、添加したTrastuzumab scFvとの相互作用を観察した後、結合したTrastuzumab scFvを再生溶液で完全に除去し、続いて、濃度の異なるTrastuzumab scFvについても同様の測定サイクルを繰り返し、得られた結果をまとめて解析するマルチサイクル法と、１回の測定サイクル中に５通りの濃度のTrastuzumab scFvを順次添加するだけで、解析に必要な情報を得ることができ、ＨＥＲ２.ex.に結合したTrastuzumab scFvを除去する必要のないシングルサイクル法の、ふたつの方法でTrastuzumab scFvの抗原に対する結合親和性を求めた。結合、解離に関する動態定数の計算はBiacore X100 evaluation softwareを用いて算出した。解析結果を図１１に示す。

[0050] １６．表面プラズモン共鳴(ＳＰＲ)法を用いたBiacore X100によるAnti-HER2/neu抗体とＨＥＲ２細胞外ドメインの親和性測定

上記と同様に、Trastuzumab full-body抗体を固定側、流路側にＨＥＲ２.ex.を用いて、ＨＥＲ２抗原との結合親和性をBiacore X100によるシングルサイクル法にて解析し、作製したTrastuzumab scFvにおける結合親和性との比較を行った。便宜上、Trastuzumab scFvでの解析は、固定側にＨＥＲ２.ex.、流路側にTrastuzumab scFvを用いたため、流路と固定の関係がTrastuzumab

full-body抗体での解析とは逆転した形となった（図１２）。結果、作製したTrastuzumab scFvは、Trastuzumab full-body抗体と比べて同等の結合親和性があることが分かった。また、反応速度定数のｋａ値（大きいほど抗原との親和性が高い）及びｋｄ値（小さいほど抗原との結合が強い）の値から、作製したTrastuzumab scFvは、Trastuzumab full-body抗体と比べて抗原との親和性は高いが、抗原との結合が弱い性質であることが示された。

[0051] １７．Trastuzumab scFv及びTrastuzumab full-body抗体のヒト乳癌細胞株に対する結合能ＦＡＣＳ解析

ヒト乳がん細胞株は、ＨＥＲ２陽性株（ＳＫＢＲ-３）、陰性株（ＭＤＡ-ＭＤ２３１、４６８）を使用した。ＦＡＣＳ用の抗Ｈｉｓ抗体は、ＰＥ標識抗Ｈｉｓ抗体（CAT. 130-092-691、Miltenyi社製）を使用した。またTrastuzumab scFvの対照コントロールとして、human CMVpp65 scFvを使用した。試薬には、Ab bufferとしてＰＢＳ（－）＋０．１％ ＢＳＡ＋０．１％ sodium azide、FACS bufferとしてＰＢＳ（－）＋１％ ＦＢＳ＋０．１％ sodium azide+２ｍＭ ＥＤＴＡ、fixation bufferとしてFACS buffer＋０．５％ ＰＦＡ（paraform aldehyde）を使用し、Trastuzumab scFv及びhuman CMVpp65 scFvは１０μｇ／ｍＬに調整した。２次抗体にはPE-anti-His抗体を用いた。

１～２×１０$^{5}$/wellの細胞をFACS bufferに懸濁し、96well round-bottom plateに撒き、Plateを１４００ｒｐｍにて２分間遠心後、上清を吸引した。１０μＬのAb bufferを添加し懸濁後、１０μＬのTrastuzumab scFv又は、対照用のhuman CMVpp65 scFv（１０μｇ／ｍＬ）を添加した。４℃にて１５分間のインキュベーションの後、１５０μＬのFACS bufferにて２回洗浄した。１４００ｒｐｍにて４分間遠心した後、上清を吸引して除去した。１０μＬのAb bufferを添加した後、１０μＬのPE-anti-His抗体(希釈なし)を加え、４℃にて１５分間インキュベーションを行った。１５０μＬのFACS bufferにて２回洗浄した後、１４００ｒｐｍにて２分間遠心を行い、上清を吸引した。４００μＬのfixation bufferを加え、ピペッティングにてFACS tubeに移し、２４時間以内にFlow Cytometry（FACSCanto、BD Biosciences社製）によ

る測定を行った。結果を図１３に示す。full-body抗体にはやや劣るものの、Trastuzumab scFvは、十分に陰性コントロール細胞との分離が良い抗体であることが示された（図１３中央と右）。また、ＳＫＢＲ-３細胞の発現するＨＥＲ２抗原を検出できない、コントロールの抗サイトメガロウイルス抗原scFvとの比較において、Trastuzumab scFvが抗原特異的に結合していることが示された（図１３左）。

[0052] １８．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

ＨＥＲ２抗原を高発現するヒト乳腺癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－３６１（５×１０$^6$細胞／個体［マトリゲル含有］）を、免疫学的にＴ細胞機能が欠如したBALB/cA-nu/nuマウス（メス、７週齢、日本クレア社製）の乳腺上皮に移植した。腫瘍体積が約２９０ｍｍ$^3$に達したMDA-MB-361担癌マウス（１匹）に蛍光色素Cy5.5を標識したTrastuzumab scFvの３．７５ｍｇ／ｋｇ相当量を腫瘍内に１回投与（１００μＬ）した。Cy5.5標識Trastuzumab scFvの腫瘍内投与における滞留性を確認するためにイソフルラン吸入麻酔下にて、in vivoイメージング装置eXplore Optix（ＧＥヘルスケア社製）を使用して１週間測定した（図１４）。１週目では、安楽死処置を行った後、腫瘍、肝臓、脾臓、肺、及び小腸を摘出してイメージング能を測定した。結果、Cy5.5標識Trastuzumab scFvを腫瘍内投与してから、7日目後においても検出可能であることが示された。

[0053] １９．in vivo腫瘍モデルを用いたCy5.5標識Trastuzumab full-body抗体の生体内動態イメージング

上記と同様に、４×１０$^6$細胞／個体のＭＤＡ－ＭＢ－３６１を乳腺上皮に移植した、担癌ヌードマウスの系を用い、Cy5.5標識Trastuzumab full-body抗体の腫瘍内投与における滞留性を確認するため、移植後５６日目の担癌マウス（４００ｍｍ$^3$）に、Cy5.5標識Trastuzumab full-body抗体３．７５ｍｇ／ｋｇ相当量を腫瘍内投与した。腫瘍内滞留性はイソフルラン吸入麻酔下にeXplore Optixを使用して投与後５日目まで測定した（図１５）。腫瘍内投与

から５日後においても、マウス生体内での蛍光標識抗体を観察できたことから、Cy5.5標識Trastuzumab scFv同様に長期間の検出が可能であることが示された。

[0054] ２０．ヒト乳癌ＭＤＡ－ＭＢ－３６１細胞の同所移植腫瘍に対するTrastuzumab scFvの抗腫瘍効果

ＨＥＲ２抗原を高発現するヒト乳腺癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－３６１（５×１０$^6$細胞／個体［マトリゲル含有］）を、上述のBALB/cA-nu/nuマウス（ｎ＝４～５／群）乳腺上皮に移植した。平均腫瘍体積が２５０ｍｍ$^3$に達したMDA-MB-361担癌マウスに、Trastuzumab scFvの３．７５ｍｇ／ｋｇ相当量を１日おきに５回、腫瘍内投与（５０μＬ）した。Trastuzumab scFv投与開始から経日的に腫瘍体積を測定して、無処理群（コントロール群）との抗腫瘍活性を比較した。３～４日ごとに計測した腫瘍体積を指標とした結果から、明確な腫瘍細胞の増殖抑制効果が示された(図１６)。

## 実施例 2

[0055] ２１．ビフィズス菌のコドンに最適化した分泌プラスミド（pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv）の作製

Trastuzumab scFv遺伝子の塩基配列をビフィズス菌のコドンに最適化した（opt-Trastuzumab scFv遺伝子：配列番号９２）。更に、opt-Trastuzumab scFv遺伝子を組み込んだ分泌プラスミド（pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv：配列番号９４）を作製した。

opt-Trastuzumab scFv遺伝子は、大腸菌用プラスミドpUC57にサブクローニングされたプラスミドpUC57-opt-Trastuzumab scFvとして、人工遺伝子合成（ジェンスクリプトジャパン社製）した。第一段階として、既存のTrastuzumab scFv 発現・分泌プラスミドであるpHuSP27L0-Trastuzumab scFv（配列番号９３）のTrastuzumab scFv遺伝子をopt-Trastuzumab scFv遺伝子と交換し、プラスミドpHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFvを作製した。第二段階として、シグナルペプチド＋リンカー配列であるSP27L0をSP7L20に交換し、pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv（配列番号９４）を作製した。第三段階として、pH

uSP7L20-opt-Trastuzumab scFvのHuプロモーターをP30プロモーターに交換し、pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv（配列番号９５）を作製した。詳細は以下のとおりである。

[0056] ２２．pHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFv作製におけるインサート調製

pHuSP27L0-Trastuzumab scFvのTrastuzumab scFv遺伝子部分をopt-Trastuzumab scFv遺伝子に入れ換える手順を以下に示す。まず、opt-Trastuzumab scFvインサートを以下のように調製した。opt-Trastuzumab scFvコード配列（末端にHis-tag配列を含む）を有するプラスミドpUC57-opt-Trastuzumab scFvを鋳型としてＰＣＲを行った。プライマーとして、opt-Trastuzumab scFv_ins_INF_F1プライマー（配列番号９６）、及びopt-Trastuzumab scFv_ins_INF_R1プライマー（配列番号９７）（各プライマーの５’側の１５塩基は、以下に示すベクターと相同な配列を有する）を使用し、opt-Trastuzumab scFvコード領域を増幅して７７７ｂｐのインサートＰＣＲ産物を得た。２．０％アガロースゲル（１×TEB buffer、エチジウムブロマイド入り）を使用してインサートＰＣＲ産物をＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0057] ２３．pHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFv作製におけるベクター調製

ベクターを以下のように調製した。pHuSP27L0-Trastuzumab scFv（Trastuzumab scFv遺伝子、大腸菌の複製起点、ビフィズス菌の複製起点、スペクチノマイシン耐性遺伝子を含む）を鋳型としてＰＣＲを行った。プライマーとしてSP1_Vec_F1プライマー（配列番号９８）及びd0018_0aa_Vec_R3プライマー（配列番号９９）を使用し、Trastuzumab scFv遺伝子を除いた領域を増幅して約４ｋｂのベクターＰＣＲ産物を得た。（PrimeSTAR；登録商標 HS Premix、タカラバイオ社製）。０．８％アガロースゲル（１×TEB buffer、エチジウムブロマイド入り）を使用してベクターＰＣＲ産物をＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0058] ２４．pHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFv作製におけるIn-Fusion反応によるインサートとベクターの連結

In-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit with Cloning Enhancer（Clontech社製）を用いてインサートPCR産物とベクターPCR産物の連結を行った。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た。５×In-Fusion HD Enzymes premix ２μＬ、Cloning Enhancer １μＬ、インサート及びベクターの必要量を混合し、滅菌水で反応系の総量を１０μＬとした。３７℃で１５分間反応後、５０℃で１５分間反応し、４℃に静置した。

[0059] ２５．pHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFv作製における大腸菌の形質転換、プラスミド抽出、シークエンス

In-Fusion反応液２μＬを用いて大腸菌HST16CR Competent Cells（タカラバイオ社製）の形質転換を行い、ＬＢ（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイシン含有）プレートに塗布後、３７℃で一晩培養した。形質転換条件は、製品説明書に従った。形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬ、スペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養した後、プラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit、キアゲン社製）。このプラスミドの全塩基配列が設計通りになっていることを確認し、プラスミドpHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFvとした。

[0060] ２６．pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製におけるインサート調製

pHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFv のシグナルペプチド＋リンカー配列（SP27L0）をSP7L20に入れ換える手順を以下に示す。まずBifidobacterium longum 105AのゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、シグナルペプチドインサートを以下のように調製した。SP7L20-opt-Trastuzumab scFv_ins_INF_F1プライマー（配列番号１００）及びSP7L20-opt-Trastuzumab scFv_ins_INF_R1プライマー（配列番号１０１）（各プライマーの５’側の１５塩基は、以下に示すベクターと相同な配列を有する）を用いてＰＣＲを行い、１８９ｂｐのインサートＰＣＲ産物（SP7L20）を得た。２．０％アガロースゲルを使用してインサートＰＣＲ産物をＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度

を見積もった。

[0061] ２７．pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製におけるベクター調製

プラスミドpHuSP27L0-opt-Trastuzumab scFvを鋳型としてＰＣＲを行い、ベクターを調製した。プライマーとしてHu-opt-Trastuzumab_vec_F1プライマー（配列番号１０２）及びHu-Vec_R1プライマー（配列番号１８）を使用し、シグナルペプチド＋リンカー部分を除いた領域を増幅して約４．５ｋｂのベクターＰＣＲ産物を得た。ベクターＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにてＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0062] ２８．pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製におけるIn-Fusion反応によるインサートとベクターの連結

上記と同様にIn-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit with Cloning Enhancer（Clontech社製）を用い、インサートＰＣＲ産物とベクターＰＣＲ産物の連結を行った。

[0063] ２９．pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製における大腸菌の形質転換、プラスミド抽出、及びシークエンス

上記と同様にIn-Fusion反応液を用いた大腸菌HST16CR Competent Cellsの形質転換、培養、及びプラスミド抽出を行い、このプラスミドのopt-Trastuzumab scFv発現カセット（Huプロモーターからターミネーターまで）の塩基配列が設計通りになっていることを確認した。

[0064] ３０．pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製におけるインサート調製

pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvのプロモーターを、B. longum 105Aのゲノムに存在する遺伝子のP30プロモーターに交換した。

まず、B. longum 105AのゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、シグナルペプチドインサートを以下のように調製した。P30_ins_F1プライマー（配列番号１０３）及びP30_SP7_ins_R1プライマー（配列番号１０４）（各プライマーの５’側の１５塩基は、以下に示すベクターと相同な配列を有する）を用いてＰＣＲを行い、２６５ｂｐのインサートＰＣＲ産物を得た。２．０％アガロースゲルを使用してインサートＰＣＲ産物をＤＮＡ濃度マーカーと

ともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0065] ３１．pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製におけるベクター調製

プラスミドpHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvを鋳型としてＰＣＲを行い、ベクターを調製した。プライマーとしてSP7_Vec_F1プライマー（配列番号１０５）及びpUC_ori_Vec_R2プライマー（配列番号１０６）を使用し、opt-Trastuzumab scFv発現ユニットのプロモーターを除いた領域を増幅して約４．４ｋｂのベクターＰＣＲ産物を得た。ベクターＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにてＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、濃度を見積もった。

[0066] ３２．pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製におけるIn-Fusion反応によるインサートとベクターの連結

上記と同様にIn-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit with Cloning Enhancer（Clontech社製）を用いてインサートPCR産物とベクターPCR産物の連結を行った。

[0067] ３３．pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv作製における大腸菌の形質転換、プラスミド抽出、シークエンス

前述の操作と同様にIn-Fusion反応液を用いた大腸菌HST16CR Competent Cellsの形質転換、培養及びプラスミド抽出を行い、このプラスミドのopt-Trastuzumab scFv発現カセット（P30プロモーターからターミネーターまで）の塩基配列が設計通りになっていることを確認した。

[0068] ３４．ビフィズス菌の形質転換

プラスミドpHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv、及びpP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvを用いてビフィズス菌の形質転換を以下のように実施した。プラスミドＤＮＡを用いて、ビフィズス菌B. longum 105A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社製）により行った。電気ショック後は、キュベットにＩＭＲ液体培地８００μＬとビタミンＣ添加液５０μＬの混合液を即時に加え、これを滅菌済みの２ｍＬマイクロチューブに回収した。各チューブについて同様の操作を行い、これら２ｍＬチューブの蓋をゆるめてアネロパックとともに密閉容器

に入れ、３７℃に設定したインキュベータに入れ、３時間保温した。保温後の各菌懸濁液をよく混ぜた後、その１００μＬを量り取り、ＩＭＲ寒天培地（７５μｇ／ｍＬ ＳＰＣＭを含有）１枚にそれぞれ塗抹した。これらの寒天培地を脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学社製）とともに密閉容器に入れ、３７℃に設定したインキュベータにて２～３日間培養した。生育したプレート上のコロニーをディスポスティックでピックアップし、ＢＬ－ｂＳ寒天培地（７５μｇ／ｍＬ ＳＰＣＭを含有）に画線し、脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学社製）とともに密閉容器に入れ、３７℃に設定したインキュベータにて１日間培養し、画線培養物とし、組換えビフィズス菌B. longum 105A/pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFv、及びB. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvを得た。

[0069] ３５．ビフィズス菌からのTrastuzumab scFvの精製

上記にて作製したTrastuzumab scFv分泌ビフィズス菌B. longum 105A/pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvを用い、Trastuzumab scFvの精製を行った。

B. longum 105A/ pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvを、ＡＰＳ－２Ｓ－２．５ＳＥ培地（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）に植菌し、３７℃にて２４時間嫌気培養を行った。この培養液をＤＭＥＭ：ＡＰＳ－２Ｓ－２．５ＳＥ＝９：１にスペクチノマイシンを７５μｇ／ｍＬになるよう添加した培地に０．５％添加し、３７℃にて１８時間嫌気培養をした。

上記培養液を遠心分離して得た培養上清を撹拌しながら、硫酸アンモニウムを８０％飽和になるよう少しずつ添加し、４℃にて一晩撹拌し、塩析を行った。これを遠心分離後、沈殿を回収し、ヒスチジンタグ付きタンパク質の精製キット（TALON resin、タカラバイオ社製）にてヒスチジンタグを指標とした精製を行った。この精製溶液を限外ろ過（アミコンウルトラ－０．５、メルクミリポア社製）にて濃縮した。

上記精製単鎖抗体の一部を用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、クマシーブルー染色（ライフテクノロジーズ社製、SimplyBlueTM SafeStain）を行い、約９割

の純度でTrastuzumab scFvが精製されていることを確認した。精製タンパク質の濃度は、Bradford法にて測定した（Coomassie Plus Protein Assay、Thermo Scientific社製）。

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を図１７に示す。Trastuzumab scFvのサイズ付近（約２５ｋＤａ）にバンドを確認することができた。

[0070] ３６．蛍光抗体法によるTrastuzumab scFvとヒト乳癌細胞株の結合確認

B. longum 105A/pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvから精製したTrastuzumab scFvを用いてヒト乳癌細胞株との結合を確認した。

ヒト乳癌細胞株は、ＨＥＲ２陽性株（ＳＫ－ＢＲ－３、及びＢＴ－４７４）、及びＨＥＲ２陰性株（ＳＫ－ＭＥＬ－２８）を使用した（全てAmerican Type Culture Collection、ＡＴＣＣより購入）。免疫染色用の抗Ｈｉｓ抗体は、Alexa Fluor 488標識抗Ｈｉｓ抗体（Cat. D291-A48、医学生物学研究所社製）を使用した。また、抗ＨＥＲ２ full-body抗体（Cat. 427041、ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し、細胞のＨＥＲ２の発現を確認した。試薬には、wash bufferとしてＰＢＳ（－）、Ab bufferとしてＰＢＳ（－）＋１．５％ ＢＳＡ、fixation bufferとして４％ ＰＦＡ（paraform aldehyde）・リン酸緩衝液（和光純薬工業社製）を使用し、Trastuzumab scFvおよび抗ＨＥＲ２ full-body抗体はAb bufferで５μｇ／ｍＬに調製した。Trastuzumab scFvに対する２次抗体にはAnti-His-tag mAb-Alexa Fluor 488を、抗ＨＥＲ２ full-body抗体に対する２次抗体にはDyLight 594 goat anti-mouse IgG（Cat. 405311、BioLegend社製）を用いた。封入剤にはVECTASHIELD Mounting Medium with DAPI（Cat. H-1200、VECTOR Laboratories社製）を使用した。

6 well plate（NEST社製）に１８ｍｍ×１８ｍｍのカバーガラス（松浪硝子工業社製）を置き、Poly-L-lysine（シグマアルドリッチ社製）コーティングを行い、１～２×１０$^4$cells/glassで細胞を培養した。その１日後にプレートを氷上に静置して培地を吸引し、wash bufferにて３回洗浄した。細胞に１００μＬのAb bufferを添加し、氷上にて３０分間インキュベーションを行

った。その後、１００μＬのTrastuzumab scFv、又は陰性コントロールとしてのAb bufferを添加し、氷上にて１時間インキュベーションを行った。scFv反応後、wash bufferにて３回洗浄した。洗浄後、１００μＬのAnti-His-tag mAb-Alexa Fluor 488（４００倍希釈）を加え、氷上にて３０分間インキュベーションを行った。インキュベーション後、wash bufferにて３回洗浄し、５００μＬのfixation bufferを加えて氷上で１０分間インキュベーションを行った。その後、wash bufferにて３回洗浄し、ＤＡＰＩ含有封入剤で封入し、蛍光顕微鏡（DM5000B、Leica MICROSYSTEMS社製）による観察を行った。

結果を図１８に示す。ＨＥＲ２陽性細胞にＨＥＲ２が発現し、ＨＥＲ２陰性細胞にはＨＥＲ２が発現していないことを確認した。さらに、Trastuzumab scFvはＨＥＲ２陽性細胞に特異的に結合し、細胞表面のＨＥＲ２と共局在していることが示された。

[0071] ３７．フローサイトメトリーを用いたTrastuzumab scFvとヒト乳癌細胞株の結合確認

B. longum 105A/pHuSP7L20-opt-Trastuzumab scFvから精製したTrastuzumab scFvを用いてヒト乳癌細胞株との結合を確認した。

ヒトＨＥＲ２が陽性であるＢＴ－４７４細胞及びＳＫ－ＢＲ－３細胞、及び陰性であるＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞（全てAmerican Type Culture Collection、ATCCより購入）を使用した。これらの細胞は１００ｍｍペトリディッシュ（日本ジェネティクス社製）にて培養した。ＢＴ－４７４細胞はＨｙｂｒｉ－ｃａｒｅ培地、ＳＫ－ＢＲ－３細胞はＭｃＣｏｙ’ｓ ５Ａ培地、ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞はＥ－ＭＥＭ培地を用いてそれぞれ培養した。これらの培地には全て、非働化した１０％ウシ胎児血清（EQUITECH-BIO社製）、及びペニシリン／ストレプトマイシン液（コスモバイオ社製）を混合した。

上記細胞がある程度密集してきた段階で培地を除去し、ＰＢＳ（－）（和光純薬工業社製）にて洗浄し、Trypsin-EDTA（Life Technologies社製）を用いてペトリディッシュから細胞を剥がし、１５ｍＬコニカルチューブ（サンプラテック社製）に移した。卓上小型遠心機（久保田製作所製）で１０００

ｒｐｍ、５分間遠心後、上清を除去し、培地を５ｍＬ加えた。この細胞懸濁液内に含まれる細胞数を血球計算盤にて計測し、３×１０$^4$cells／チューブになるように１．５ｍＬチューブ（Eppendorf社製）に分注した。１．５ｍＬチューブに分注した上記細胞を微量冷却遠心機（TOMY社製）にて５０００ｒｐｍ、４℃で１分間遠心し、遠心後上清を除去した。チューブに残った細胞のペレットを１ｍＬ ＰＢＳ（－）を用いて２回洗浄後、精製した抗HER2 scFvを１０μｇ／ｍＬの濃度で１００μＬ添加し、氷上にて３０分間静置した。そこに蛍光標識抗His-tag抗体（Anti-His-tag Alexa Fluor 488、医学生物学研究所社製）２０μＬを加え、ピペッティングにてよく混合し、氷上で２０分間静置した。静置後、ＦＡＣＳバッファー（１％ＢＳＡ、０．１％$NaN_3$を含むＰＢＳ）を５００μＬチューブに加えて懸濁し、微量冷却遠心機にて５０００ｒｐｍ、４℃で１分間遠心し、上清を除去した。この洗浄操作を再度行った後、５００μＬ ＦＡＣＳバッファーを添加して細胞を懸濁し、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）に細胞を移した。

解析直前にヨウ化プロピジウム溶液（５μｇ／ｍＬ）を５μＬ添加し、BD FACS cantoII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 ver1.2（ベックマン・コールター社製）にて解析を行った。

結果を図１９に示す。図１９上段では、ＨＥＲ２陽性細胞であるＢＴ－４７４細胞、及びＳＫ－ＢＲ－３細胞にTrastuzumab scFvが結合していることが確認された。一方図１９下段では、ＨＥＲ２陰性細胞であるＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞には、Trastuzumab scFvの結合は認められなかった。

[0072] ３８．Trastuzumab scFvの癌細胞増殖抑制活性

Trastuzumab scFvの生理活性は、B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvの培養上清をＨｉｓタグ精製することにより得たTrastuzumab scFv（ＰＢＳ置換）を、ＨＥＲ２陽性細胞（ＢＴ４７４（乳癌）細胞）に添加し、細胞増殖抑制活性を測定した。

ＢＴ４７４細胞をＭｃＣｏｙ’ｓ５Ａ培地（１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含む）にて３７℃、５％$CO_2$の条件下で培養後、９６穴プレートに１×１０$^4$cellsずつ播種し、３７℃、５％$CO_2$の条件下で２４時間培養した。培養後、培地を吸引除去し、新たなＭｃＣｏｙ’ｓ５Ａ培地（１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含む）を９８μＬずつ添加した。次に、測定試料としてＰＢＳ（－）、抗Trastuzumab scFvを２４４ｎｇ／ｍＬ～１ｍｇ／ｍＬに調整したものを２μＬずつ添加した。このプレートを３７℃にて５％$CO_2$の条件下で５日間培養した。

上記５日間培養後の培地を吸引除去した後、新しいＭｃＣｏｙ’ｓ５Ａ培地（１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含む）９ｍＬにCell Counting キット－８を１ｍＬ添加したものを１００μＬずつ添加し、更に３時間、３７℃、５％$CO_2$の条件下で保温し、波長４５０ｎｍと６３０ｎｍ（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２０に示す。B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvより精製したTrastuzumab scFvは、ＢＴ４７４乳癌細胞に対し用量依存性の細胞増殖抑制活性を示し、Trastuzumab scFvは生理活性を有することを確認した。

[0073] ３９．Trastuzumab scFv 分泌ビフィズス菌B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvの抗腫瘍効果の確認

ヒト胃癌細胞株ＮＣＩ－Ｎ８７の担癌ヌードマウスを用いて、B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvの抗腫瘍効果を以下のように確認した。

ヒト胃癌細胞株ＮＣＩ－Ｎ８７（ＡＴＣＣにて購入）を、１０％ＦＢＳ（EQUITECH-BIO,INC.社製）を添加した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。実験には、腫瘍体積が約２００ｍｍ$^3$となった担癌マウスを使用した。群構成は１群：無処置群（対照群）、２群：B. longum 105A/pBEshu

ttle株（Trastuzumab scFv非発現菌）投与群、３群：B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv（Trastuzumab scFv発現菌）投与群、とした。各群につき８匹の担癌マウスを使用した。

ビフィズス菌の投与は、尾静脈から６×１０$^{8}$ｃｆｕの用量で週２回投与を行った。またビフィズス菌投与群（２群及び３群）には１０％マルトース溶液を１ｍＬずつ１日２回の頻度で週５回投与（５投２休）を行った。試験期間を３週間として経時的に腫瘍体積の測定を行い、２２日目に腫瘍を摘出してグラム染色及び免疫組織染色に使用した。

腫瘍体積の経時変化を抗腫瘍効果の結果を図２１に示す。B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv投与群の腫瘍体積は、試験期間を通じて他の群より低く推移した。試験終了時（２２日目）ではB. longum 105A/pBEshuttleと比較して有意に腫瘍体積が減少しており、B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvの抗腫瘍効果が確認された。

[0074] ４０．腫瘍内のB. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvの確認、及び分泌されたTrastuzumab scFvの確認

上記３９．で摘出した腫瘍を用い、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、Trastuzumab scFvの局在を抗His-tag抗体を用いた免疫組織染色で確認した。

摘出した腫瘍は、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）を用いて薄切スライド標本を作製し、各組織染色に供した。

[0075] グラム染色の手順を以下に示す。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２２に示す。グラム染色により、B. longum 105A/pBEshuttle及びB. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvのそれぞれについて、腫瘍組織中に菌の存在が確認された（図２２の矢印部分）。

[0076] 抗ヒスチジンタグ抗体による免疫組織染色の手順を以下に示す。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×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、Dako pen（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）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℃にて、一晩反応させた。抗体反応後、１×ＰＢＳ（－）にて５分間の洗浄を３回実施し、VECTASHIELD（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２３に示す。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（Trastuzumab scFv）が確認された（図２３の矢印部分）。

[0077] グラム染色、及び免疫組織染色の結果より、B. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFv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生着すること、及びB. longum 105A/pP30SP7L20-opt-Trastuzumab scFvから分泌されたTrastuzumab scFvが腫瘍内に存在していることが確認された。

## 産業上の利用可能性

[0078] 本発明のベクターや該ベクターで形質転換された腸内細菌は従来のものと比較して、嫌気性疾患組織において、治療剤を効率的に疾患部位に供給することができるため、医薬品分野や治療分野で有用である。

# 請求の範囲

[請求項1] 以下のａ）又はｂ）に示されるアミノ酸配列からなるシグナルペプチドをコードするＤＮＡ。

ａ）配列番号１又は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列；

ｂ）配列番号１又は配列番号１０７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・ロンガムにおいてシグナルペプチドとして機能する、前記アミノ酸配列；

[請求項2] 配列番号２又は配列番号１０８で示される塩基配列からなる請求項１記載のＤＮＡ。

[請求項3] 以下のａ）又はｂ）に示されるアミノ酸配列からなるシグナルペプチドのＣ末端に、アミノ酸配列からなるリンカーが連結されたシグナルペプチドーリンカー連結体をコードするＤＮＡ。

ａ）配列番号１又は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列；

ｂ）配列番号１又は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列において、１又は２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・ロンガムにおいてシグナルペプチドとして機能する、前記アミノ酸配列；

[請求項4] シグナルペプチドーリンカー連結体が、配列番号３又は配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項３記載のＤＮＡ。

[請求項5] 配列番号４又は配列番号１１０で示される塩基配列からなる請求項４記載のＤＮＡ。

[請求項6] 請求項１～５のいずれか記載のＤＮＡの３’末端に、抗体遺伝子の５’末端が結合したＤＮＡインサート。

[請求項7] 抗体遺伝子が、抗がん作用を有する抗体の遺伝子である請求項６記載

のＤＮＡインサート。

[請求項8] 抗がん作用を有する抗体がトラスツズマブである請求項７記載のＤＮＡインサート。

[請求項9] トラスツズマブが、トラスツズマブ一本鎖抗体である請求項８記載のＤＮＡインサート。

[請求項10] 請求項６～９のいずれか記載のＤＮＡインサートが挿入されたベクター。

[請求項11] 請求項１０記載のベクターで形質転換された腸内細菌。

[請求項12] ビフィドバクテリウム属に属する微生物である請求項１１記載の腸内細菌。

[請求項13] ビフィドバクテリウム属に属する微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである請求項１２記載の腸内細菌。

[請求項14] 請求項１０～１３のいずれか記載の腸内細菌を有効成分とする抗体医薬組成物。

[請求項15] 抗がん剤組成物であることを特徴とする請求項１４記載の抗体医薬組成物。