明　細　書

発明の名称 ： 異種ポリペプチド発現カセット

技術分野

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

背景技術

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

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

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

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開ＷＯ２００６／１０９６１９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
特許文献3：国際公開ＷＯ２０１４／０１０７５８号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

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

課題を解決するための手段

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

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

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

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

（１）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターＤＮＡ；

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

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

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

（３）異種ポリペプチドをコードするＤＮＡ；

（４）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターＤＮＡ；

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

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

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

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

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

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

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

［８］上記［１］～［７］のいずれか記載の発現カセットを含むベクター。

［９］上記［８］記載のベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌。

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

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

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

［１３］上記［１２］記載の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ。

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

［１５］配列番号１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１

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

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

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

発明の効果

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

図面の簡単な説明

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

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

[図3]各種シグナルペプチドーリンカー連結体を用いた場合の抗ＰＤ－１－１

一本鎖抗体分泌プラスミドの作製概要を示す図である。

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

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

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

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

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

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

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

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

[図12]ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された抗ＰＤ－１－２一本鎖抗

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

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

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

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

[図16]フローサイトメトリー解析による図を示す。ＣＤ４陽性Ｔ細胞へのＣＤ３／ＣＤ２８刺激によるｍＰＤ－１の発現誘導において、Ａでは、未刺激ＣＤ４陽性細胞に抗マウスＰＤ－１抗体を反応させＦＩＴＣで検出した。Ｂでは、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激ＣＤ陽性細胞に抗マウスＰＤ－１抗体を反応させＦＩＴＣで検出した。フローサイトメトリー解析による抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体のＣＤ３及びＣＤ２８刺激ＣＤ４陽性細胞への結合において、Ｃでは、未刺激ＣＤ４陽性細胞に抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体を反応させそのＨｉｓに対してＡｌｅｘａ ４８８－抗Ｈｉｓ－ｔａｇ抗体を反応させ検出した。Ｄでは、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激ＣＤ陽性細胞に抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体を反応させそのＨｉｓに対してＡｌｅｘａ ４８８－抗Ｈｉｓ－ｔａｇ抗体を反応させ検出した。

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

[図18]単剤投与群と無処理群のＣＴ２６腫瘍体積推移を示すグラフである。

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

[図20]単剤投与群と２剤併用群のＣＴ２６腫瘍体積推移を示すグラフである。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の発現カセットとしては、（１）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターＤＮＡ、（２）分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ、（３）リンカーペプチドをコードするＤＮＡ、（４）異種ポリペプチドをコードするＤＮＡ、及び（５）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターＤＮＡの各ＤＮＡを順次含み、上記分泌シグナルペプチドが、ａ）配列番号６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、及び１６のいずれかに示されるアミノ酸配列；又はｂ）配列番号６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、及び１６のいずれかに示されるアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列からなるペプチドがビフィドバクテリウム属細菌において分泌シグナルペプチドとして機能するアミノ酸配列；からなる、異種ポリペプチドのビフィドバクテリウム属細菌内での発現に使用するための発現カセットであれば特に制限されず、上記各ＤＮＡ断片の３’末端と、その下流の各ＤＮＡの５’末端とは、本発明の効果が得られる限り、直接連結していなくてもよいが、直接連結していることが好ましい。

[0012] 上記プロモーターＤＮＡとしては、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターＤＮＡであれば特に制限されず、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のヒストン様ＤＮＡ結合タンパク質をコードする遺伝子の発現に係るプロモーターであるＨｕプロモーターＤＮＡや、ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来Ｇａｐ遺伝子のプロモーターＤＮＡ（Biotechnol. Lett. 2008 30:1983-1988）や、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来ＡｍｙＢ遺伝子のプロモーターＤＮＡ（Biotechnol. Lett. 2006 28:163-168）や、１６ＳｒＲＮＡプロモーターＤＮＡ（Biotechnol. Lett. 2008 30:165-172）、ＧＡＰＤＨ（ｐｒ－ＢＬ1363）遺伝子のプロモーターＤＮＡ（Appl Environ Microbiol. 2006 72(11):7401-7405）、P_RP_LプロモーターＤＮＡ（Cancer Gene Ther. 2007 14:151-157）、ｐ５７２（β-glycosidase from B. animalis subsp lactis）遺伝子のプロモーターＤＮＡ（J Microbiol Biotechnol. 2012 Dec;22(12):1714-23）、ｐ９１９(rplM promoter)ＤＮＡ（J Microbiol. 2012

Aug;50(4):638-43）、ｐ８９５(rplR promoter)ＤＮＡ（JMicrobiol. 2012 Aug;50(4):638-43）を例示することができる。

[0013] 上記分泌シグナルペプチドとしては、前記のように、ａ）配列番号６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、及び１６のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチド、すなわちそれぞれＳＰ７、ＳＰ４５、ＳＰ５０、ＳＰ５２、ＳＰ５５、ＳＰ５８、ＳＰ６４、ＳＰ６６、ＳＰ６７、ＳＰ６８、ＳＰ６９を挙げることができ、また、ｂ）配列番号６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、及び１６のいずれかに示されるアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであって、該ペプチドが、ビフィドバクテリウム属細菌において分泌シグナルペプチドとして機能するペプチド（変異分泌シグナルペプチド）を挙げることができる。上記「１又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」とは、例えば１～５個、好ましくは１～３個、より好ましくは１～２個、さらに好ましくは１個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味し、上記変異分泌シグナルペプチドのアミノ酸配列としては、配列番号６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、及び１６に示されるアミノ酸配列のいずれかとの配列同一性が９０％以上であることが好ましく、９５％以上であることがより好ましく、９８％以上であることがさらに好ましい。

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

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

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

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

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

２）配列番号２６に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ４５の下流）；

３）配列番号２７に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ５０の下流）；

４）配列番号２８に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ５２の下流）；

５）配列番号２９に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ５５の下流）；

６）配列番号３０に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ５８の下流）；

７）配列番号３１に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ６４の下流）；

８）配列番号３２に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ６６の下流）；

９）配列番号３３に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ６７の下流）；

１０）配列番号３４に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ６８の下流）；

１１）配列番号３５に示されるリンカーペプチド配列（ＳＰ６９の下流）；

[0018] 本発明の分泌シグナルペプチド－リンカー連結体をコードするＤＮＡとしては、前記（２）分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの５’末端から、前記（３）リンカーペプチドをコードするＤＮＡの３’末端までを含むＤＮＡ領域をいい、（２）分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの３’末端と、（３）リンカーペプチドをコードするＤＮＡの５’末端とが連結しているので、分泌シグナルペプチド－リンカー連結体を以下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。かかる分泌シグナルペプチド－リンカー連結体として、以下に示す１１種類を具体的に挙げることができる。

[0019] １）配列番号１０５に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰ７Ｌ３０）；

２）配列番号１０６に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰ４５Ｌ３０）；

３）配列番号１０７に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰ５０Ｌ３０）；

４）配列番号１０８に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰ５２Ｌ３０）；

５）配列番号１０９に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（Ｓ

ＰＳＰ５５Ｌ３０）；

６）配列番号１１０に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰＳＰ５８Ｌ３０）；

７）配列番号１１１に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰＳＰ６４Ｌ３０）；

８）配列番号１１２に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰＳＰ６６Ｌ３０）；

９）配列番号１１３に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰＳＰ６７Ｌ３０）；

１０）配列番号１１４に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰＳＰ６８Ｌ３０）；

１１）配列番号１１５に示される分泌シグナルペプチド－リンカー連結体（ＳＰＳＰ６９Ｌ３０）；

[0020] また、例えば、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなるリンカーペプチドのＣ末端のアミノ酸残基が０～２９、例えば１０～２９、１５～２９、２０～２９、又は２５～２９欠損したリンカーペプチドをコードするＤＮＡの５’末端は、配列番号６に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの３’末端に連結され、同様に、配列番号２６～３５のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるリンカーペプチドのＣ末端のアミノ酸残基が０～２９、例えば１０～２９、１５～２９、２０～２９、又は２５～２９欠損したリンカーペプチドをコードする各ＤＮＡの５’末端は、配列番号７～１６のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードする各ＤＮＡの３’末端にそれぞれ連結される。

[0021] かかる分泌シグナルペプチド－リンカー連結体をコードするＤＮＡは、例えば、配列番号１１６＋配列番号１２７（ＳＰ７Ｌ３０）、配列番号１１７＋配列番号１２８（ＳＰ４５Ｌ３０）、配列番号１１８＋配列番号１２９（ＳＰ５０Ｌ３０）、配列番号１１９＋配列番号１３０（ＳＰ５２Ｌ３０）、配列番号１２０＋配列番号１３１（ＳＰ５５Ｌ３０）、配列番号１２１＋配

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

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

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

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

[0024] 本発明の分泌シグナルペプチドや分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の下流に抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３が組み込まれた発現カセットを含むベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株において、抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の分泌が確認された分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の具体例として、ＳＰ６９Ｌ１、ＳＰ６９Ｌ２、ＳＰ６９Ｌ３、ＳＰ６９Ｌ４、ＳＰ６９Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ６、ＳＰ６９Ｌ７、ＳＰ６９Ｌ８、ＳＰ６９Ｌ９、ＳＰ６９Ｌ１０、ＳＰ６９Ｌ１５、ＳＰ６９Ｌ２０や、ＳＰ７Ｌ２０、ＳＰ４５Ｌ２０、ＳＰ５０Ｌ２０、ＳＰ５２Ｌ２０、ＳＰ５５Ｌ２０、ＳＰ５８Ｌ２０、ＳＰ６４Ｌ２０、ＳＰ６６Ｌ２０、ＳＰ６７Ｌ２０、ＳＰ６８Ｌ２０や、ＳＰ７Ｌ５、ＳＰ７Ｌ１０、ＳＰ７Ｌ１５、ＳＰ４５Ｌ５、ＳＰ４５Ｌ１０、ＳＰ４５Ｌ１５、ＳＰ５０Ｌ５、ＳＰ５０Ｌ１０、ＳＰ５０Ｌ１５、ＳＰ５２Ｌ５、ＳＰ５２Ｌ１０、ＳＰ５２Ｌ１５、ＳＰ５５Ｌ５、ＳＰ５５Ｌ１０、ＳＰ５５Ｌ１５、ＳＰ５８Ｌ１５、ＳＰ６４Ｌ５、ＳＰ６４Ｌ１０、ＳＰ６４Ｌ１５、ＳＰ６６Ｌ５、ＳＰ６６Ｌ１０、ＳＰ６６Ｌ１５、ＳＰ６７Ｌ５、ＳＰ６７Ｌ１０、ＳＰ６７Ｌ１５、ＳＰ６８Ｌ５、ＳＰ６８Ｌ１０、ＳＰ６８Ｌ１５、ＳＰ６９Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ１０、ＳＰ６９Ｌ１５や、ＳＰ４５Ｌ０、ＳＰ４５Ｌ１、ＳＰ４５Ｌ２、ＳＰ４５Ｌ３、ＳＰ５０Ｌ０、ＳＰ５０Ｌ１、ＳＰ５０Ｌ２、ＳＰ５０Ｌ３、ＳＰ５０Ｌ４、ＳＰ６４Ｌ０、ＳＰ６４Ｌ１、ＳＰ６４Ｌ２、ＳＰ６４Ｌ３、ＳＰ６４Ｌ４、ＳＰ６８Ｌ０、ＳＰ６８Ｌ１、ＳＰ６８Ｌ２、ＳＰ６８Ｌ３、ＳＰ６８Ｌ４や、ＳＰ６７Ｌ１０、ＳＰ６９Ｌ７などを挙げることができ、とりわけ抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の分泌量の多かった、ＳＰＳＰ５０Ｌ０、ＳＰ５０Ｌ１、ＳＰ５０Ｌ２、ＳＰ５０Ｌ３、ＳＰ５０Ｌ４、ＳＰ５０Ｌ５、ＳＰ５０Ｌ１０、ＳＰ５０Ｌ１５、ＳＰ５０Ｌ２０、ＳＰ６４Ｌ０、ＳＰ６４Ｌ１、ＳＰ６４Ｌ２、ＳＰ６４Ｌ３、ＳＰ６４Ｌ４、ＳＰ６４Ｌ５、ＳＰ６４Ｌ１０、ＳＰ６４Ｌ１５、ＳＰ６４Ｌ２０、ＳＰ６８Ｌ１、ＳＰ

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

[0025] また、同様に形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株において、分泌された抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３のＰＤ-１へ結合能が確認された分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の具体例として、ＳＰ７Ｌ５、ＳＰ７Ｌ２０、ＳＰ６８Ｌ５、ＳＰ６８Ｌ２０、ＳＰ６９Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ２０、ＳＰ４５Ｌ２０、ＳＰ５０Ｌ２０、ＳＰ５２Ｌ２０、ＳＰ５５Ｌ２０、ＳＰ５８Ｌ２０、ＳＰ６４Ｌ２０、ＳＰ６６Ｌ２０、ＳＰ６７Ｌ２０を挙げることができ、分泌された抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３のＰＤ－１への結合量がより多い、ＳＰ７Ｌ５、ＳＰ６８Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ５を好適に挙げることができる。

[0026] さらに、同様に形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株において、分泌された抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３が、ｈＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の結合を阻害することが確認された分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の具体例として、ＳＰ６９Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ２０、ＳＰ５０Ｌ５、ＳＰ６４Ｌ５、ＳＰ６７Ｌ１０、ＳＰ６８Ｌ１、ＳＰ６８Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ１、ＳＰ６９Ｌ７を挙げることができ、ＳＰ５０Ｌ５、ＳＰ６８Ｌ１、ＳＰ６９Ｌ１が好ましく、とりわけ、ｈＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の結合を５０％阻害する抗体濃度（ＩＣ５０）が低かったＳＰ５０Ｌ５が特に好ましい。

[0027] 本発明の分泌シグナルペプチドや分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の下流に抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２が組み込まれた発現カセットを含むベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株において、抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２の分泌が確認された分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の具体例として、ＳＰ７Ｌ２０、ＳＰ４５Ｌ２０、ＳＰ５０Ｌ２０、ＳＰ５２Ｌ２０、ＳＰ５５Ｌ２０、ＳＰ５８Ｌ２０、ＳＰ６４Ｌ２０、ＳＰ６６Ｌ２０、ＳＰ６７Ｌ２０、ＳＰ６８Ｌ２０、ＳＰ６９

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

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

[0029] 上記抗体としては、インターロイキン－６（ＩＬ－６）受容体を標的分子とするリウマチ治療薬に用いられる抗体や、α４－インテグリンを標的分子とする多発性硬化症治療薬に用いられる抗体や、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＰＤ

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

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

[0031] 上記抗体ポリペプチドをコードするＤＮＡとしては、キメラ抗体、ヒト化抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、一本鎖抗体等をコードするＤＮＡを挙げることができるが、それ自身で標的物質を認識・結合することができ、分子量が大きすぎず、ビフィドバクテリウム属細菌内に導入された場合にも発現可能である一本鎖抗体をコードするＤＮＡが好ましい。これら抗体を含む異種ポリペプチドをコードするＤＮＡは、その配列情報を、公知の文献やＧｅｎＢａｎｋ等のデータベースから適宜入手して、化学合成、遺伝子工学的手法等の公知の方法により作製することができる。

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

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

（１）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターＤＮＡ；

（２）以下のａ）又はｂ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペ

プチドをコードするＤＮＡ；

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

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

（３）リンカーペプチドをコードするＤＮＡ；

（４）異種ポリペプチドをコードするＤＮＡ；

（５）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターＤＮＡ；

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

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

ポスター発表 プログラム - 日本分子生物学会、１９９４）、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（Appl Environ Microbiol. 2006 Jan;72(1):527-35）、ＰＫＪ５０（Microbiology 1999 Mar;145(Pt):585-92）の複製ユニットを例示することができ、ｐＴＢ６由来のＯｒｉＶ領域及びＲｅｐＢ遺伝子からなるｐＴＢ６ｒｅｐユニットを好適に挙げることができる。また、上記ベクターには、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を含めることもできる。

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

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

[0037] 本発明におけるビフィドバクテリウム属細菌としては、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（B. breve）、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス（B. adolescentis）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（B. bifidum）、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム（B. pseudolongum）、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム（B. 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）などを例示することができる。中でも、年齢に関係なくヒトの腸内に常在していることが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティスを宿主細胞として用いることが好ましく、ビフィドバクテリウム・ロンガムを用いることがより好ましい。これらの菌は、いずれも市販されているか、又は寄託機関から容易に入手することができる。

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

しい。ビフィドバクテリウム・ブレーベについては、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株（ＪＣＭ１１９２）、ビフィドバクテリウム・ブレーベ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る。ビフィドバクテリウム・ラクテンティスについては、例えば、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス標準株（ＪＣＭ１２１０）を挙げることができる。ビフィドバクテリウム・ビフィダムの株については、例えば、ビフィドバクテリウム・ビフィダムＡＴＣＣ－１１８６３株を挙げることができる。

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

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

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

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

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

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

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

て分注するか、又は適当な補液で希釈して持続注入することが好ましい。例えば、成人の場合、本発明のビフィドバクテリウム属細菌の菌体を、体重１ｋｇ当たり10^4～10^{12}ｃｆｕ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10^4～10^{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。

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

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

[0047] ［実施例１］

［ｐＨｕＳＰ３Ｌ２２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１、ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１、ｐＨｕＳＰ２３Ｌ２７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１の作製］

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

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

[0049]

[表1]

インサート及びベクター増幅時に用いたＰＣＲプライマー

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

[0050] [表2]

インサート及びベクター増幅時のプライマー配列

プライマー名	配列 (5 -> 3)
Ins_PD-1-1_F1	CAGGTCCAGCTGGTCCAGAGCGGCAGCGAA （配列番号３６）
Ins_PD-1-2_F1	CAGGTCCAGCTGCAGGAATCGGGCCCGGGC （配列番号３７）
Ins_PD-1-3_F1	GAAGTGCGTCTGCTGGAATCGGGCGGCGGC （配列番号３８）
Ins_CTLA-4-1_F1	CAGGTCCAGCTGGTCGAATCGGGCGGCGGC （配列番号３９）
Ins_PD-1-1_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGGTGGTGATGATGGTGCTT （配列番号４０）
vec-SP3L20-PD-1-1_R1	GACCAGCTGGACCTGGGTCAGCTTGCCCCGGCTTGTA （配列番号４１）
vec-SP7L20-PD-1-1_R1	GACCAGCTGGACCTGCACCGAACTCGCCTTCGGGAA （配列番号４２）
vec-SP23L20-PD-1-1_R1	GACCAGCTGGACCTGACGAATCTTCTTCTCCTGCGC （配列番号４３）
Ins_PD-1-2_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGATGATGATGGTGGTGACG （配列番号４４）
vec-SP7L20-PD-1-2_R1	CTGCAGCTGGACCTGCACCGAACTCGCCTTCGGGAA （配列番号４５）
Ins_PD-1-3_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGATGATGGTGGTGATGGCC （配列番号４６）
vec-SP7L20-PD-1-3_R1	CAGCAGACGCACTTCCACCGAACTCGCCTTCGGGAA （配列番号４７）
Ins_CTLA-4-1_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGATGATGGTGATGATGCTT （配列番号４８）
Ins_CTLA-4-2_R1	ACGAGCAGAAGGTCAGTGATGATGATGATGATGCTT （配列番号４９）
SP3L22_R1	GGCGATGGTCAGCTTGCCCGGCTTGTACGT （配列番号５０）
SP23L27_R1	GATCGTCTTGAGAATCTTCAGACGAATCTTCTTCTCCTGCGC （配列番号５１）
TGA_Hu_Terminator_F	TGACCTTCTGCTCGTAGCGATTAC （配列番号５２）

[0051] ［抗ＰＤ－１一本鎖抗体発現カセット］

抗ＰＤ－１一本鎖抗体の発現カセットは図１（ａ）に示されるとおり、Ｈｕプロモーターｄｎａ（ビフィドバクテリウム・ロンガム由来）、分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡと前記分泌シグナルペプチドに続くリンカーペプチドをコードするＤＮＡ、抗ＰＤ－１一本鎖抗体（重鎖配列、リンカー（$(GGGGS)_3$）、軽鎖配列を含む）をコードするＤＮＡ、Ｈｉｓタグ配列、及びＨｕターミネーター（ビフィドバクテリウム・ロンガム由来）で構成した。各発現カセット中の抗ＰＤ－１一本鎖抗体（重鎖配列、リンカー（（ＧＧＧＧＳ）$_3$）、軽鎖配列を含む塩基配列を含む）は、以下に示すとおり、以下の表３に示される文献を参照し、二種類の抗ヒトＰＤ－１一本鎖抗体と一種類の抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体を使用した。

[0052] [表3]

抗体	配列	参照文献
ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１ （抗ヒトＰＤ－１抗体）	配列番号１（７３８塩基） 配列番号１３８（２４５アミノ酸） 重鎖配列（１～３５４塩基） $(GGGGS)_3$リンカー（３５５～３９９塩基） 軽鎖配列（４００～７１７塩基） ヒスチジンタグ（７１８～７３５塩基）	ＵＳ特許７３３２５８２Ｂ２
ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－２ （抗ヒトＰＤ－１抗体）	配列番号２（７５０塩基） 配列番号１３９（２４９アミノ酸） 重鎖配列（１～３６０塩基） $(GGGGS)_3$リンカー（３６１～４０５塩基） 軽鎖配列（４０６～７２９塩基） ヒスチジンタグ（７３０～７４７塩基）	日本国特許４５３２４０９号
ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－３ （抗マウスＰＤ－１抗体）	配列番号３（７６２塩基配列） 配列番号１４０（２５３アミノ酸） 重鎖配列（１～３６６塩基） $(GGGGS)_3$リンカー（３６７～４１１塩基） 軽鎖配列（４１２～７４１塩基） ヒスチジンタグ（７４２～７５９塩基）	日本国特許４２４９０１３号

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

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

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

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

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

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

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

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

（抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体インサート調製）

プラスミドｐＵＣ５７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１　５００ｐｇを鋳型として、表１及び表２記載のＩｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｆ１プライマー及びＩｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｒ１プライマーセットを用いてＰＣＲ増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端１５ｂｐが重複するように設計された。各プライマー０．２μＭ、反応容量３０μＬとして、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ(Ｐｒｅｍｉｘ)（タカラバイオ株式会社製)キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて６０秒を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を２％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いて精製し、抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体インサートを調製した。

[0059] （ベクター断片調製）

配列番号２０に記載されているベクター直鎖化断片５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、ＴＧＡ＿Ｈｕ＿Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ＿Ｆプライマー及びｖｅｃ－ＳＰ３Ｌ２０－ＰＤ－１－１＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いて、プライマー０．２μＭ、反応容量３０μＬとして、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて５分を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いて精製し、５’－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ　ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ

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

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

Ｈｕターミネーター:配列番号２０の第４番から第１１７番までの塩基配列

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

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

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

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

[0061] （インフュージョン反応）

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

[0062] （大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

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

[0063] [ｐＨｕＳＰ３Ｌ２２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１の作製]

（リン酸化プライマーの調製）

表１及び表２記載のＩｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｆ１プライマー、ＳＰ３Ｌ２２＿Ｒ１プライマーを、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラバイオ株式会社製）を用いて、製品説明書にしたがい、各プライマーをリン酸化した。Ｉｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｆ１リン酸化プライマー及びＳＰ３Ｌ２２＿Ｒ１リン酸化プライマーを、それぞれ０．１×ＴＥバッファー（１ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）で終濃度２０μＭに調整した。

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

上記プラスミドｐＨｕＳＰ３Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１ ５００ｐｇを鋳型として、上記Ｉｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｆ１リン酸化プライマー及びＳＰ３Ｌ２２＿Ｒ１リン酸化プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度０．２μＭ、反応容量３０μＬにて、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて５分を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔを用いて精製し、ｐＨｕＳＰ３Ｌ２２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１ベクター直鎖化断片を調製した。

[0065] （ライゲーション反応）

上記ベクター直鎖化断片について、Ｔ４ ＤＮＡ Ｌｉｇａｓｅ（サーモフ

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

[0066]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

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

[0067]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

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

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

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

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

[0070] ［ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１の作製］

（抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体インサート調製）

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

[0071] （ベクター断片調製）

配列番号２１に記載されているベクター直鎖化断片５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、ＴＧＡ＿Ｈｕ＿Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ＿Ｆプライマー及びｖｅｃ－ＳＰ７Ｌ２０－ＰＤ－１－１＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度０．２μＭ、反応容量３０μＬとして、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ)キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて５分を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔを用いて精製し、5’－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ－ｐＵＣｏｒｉ－Ｈ

ｕプロモーター－ＳＰ７Ｌ２０－３’ベクター断片（１）を調製した。

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

Ｈｕターミネーター:配列番号２１の第４番から第１１７番までの塩基配列

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

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

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

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

[0073] （インフュージョン反応）

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

[0074] （大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

[0075] （ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミドｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓ

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

[0076] ［ｐＨｕＳＰ２３Ｌ２７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１の作製］

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

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

（抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体インサート調製）

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

[0078] （ベクター断片調製）

配列番号２２に記載されているベクター直鎖化断片５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、ＴＧＡ_Ｈｕ_Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ_Ｆプライマー及びｖｅｃ－ＳＰ２３Ｌ２０－ＰＤ－１－１_Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度０．２μＭ、反応容量３０μＬとして、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ)キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて５分を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔを用いて精製し、5’－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ－ｐＵＣｏｒｉ－Ｈｕプロモーター－ＳＰ２３Ｌ２０－3’ベクター断片を調製した。

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

Ｈｕターミネーター:配列番号２２の第４番から第１１７番までの塩基配列

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

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

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

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

[0080]（インフュージョン反応）

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

[0081]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

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

（リン酸化プライマーの調製）

表１及び表２記載のＩｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｆ１プライマー、ＳＰ２３Ｌ２７＿Ｒ１プライマーを、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、製品説明書にしたがい、各プライマーをリン酸化した。Ｉｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｆ

１リン酸化プライマー及びＳＰ２３Ｌ２７＿Ｒ１リン酸化プライマーを、それぞれ０．１×ＴＥバッファー（１ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）で終濃度２０μＭに調整した。

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

上記プラスミドｐＨｕＳＰ２３Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１ ５００ｐｇを鋳型として、上記Ｉｎｓ＿ＰＤ－１－１＿Ｆ１リン酸化プライマー及びＳＰ２３Ｌ２７＿Ｒ１リン酸化プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度０．２μＭ、反応容量３０μＬにて、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて５分を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＰＣＲ産物をＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ ＥｘｔｒａｃｔｉｏｎＫｉｔを用いて精製し、ｐＨｕＳＰ２３Ｌ２７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１ベクター直鎖
化断片を調製した。

[0084] （ライゲーション反応）

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

[0085] （大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

[0086] （ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

上記形質転換した大腸菌より抽出した１０００ｎｇのプラスミドｐＨｕＳ

ＰＨｕＳＰ３Ｌ２２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１のＤＮＡを用いて、上記［プラスミドＰＨｕＳＰ３Ｌ２２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１の作製］における（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）と同様の手順にて、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株の形質転換を行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ＰＨｕＳＰ２３Ｌ２７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株を取得した。

[0087] ［実施例２］

（組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討１）

上記実施例１にて作製した三種類の抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体分泌プラスミドによる３種類の組換えビフィドバクテリウム属細菌（ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ＰＨｕＳＰ３Ｌ２２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ＰＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ＰＨｕＳＰ２３Ｌ２７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株）のそれぞれについて、抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体の分泌確認をウェスタン解析により以下のとおり実施した。

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

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

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

[0091]（結果）

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

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

[0092] ［実施例３］

［３３種類の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体についての検討］

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

[0093] [表4]

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

[0094]

[表5]

プライマー名	配列 (5 -> 3)
PD-1-scFv_vec_F1	CAGGTCCAGCTGGTCCAGAG (配列番号５３)
Hu_Vec_R1	AAAGCATCCTTCTTGGGTCAGG (配列番号５４)
SP42-ins_F1	caagaaggatgctttGTGCCCGTGACTACGCG (配列番号５５)
SP42-ins_R1	gaccagctggacctgTGCCAGCAAGGTGCAGAG (配列番号５６)
SP45-ins_F1	caagaaggatgctttATGAAGCACCTCTCCCACCG (配列番号５７)
SP45-ins_R1	gaccagctggacctgATCGCCGTCGCTTCCCT (配列番号５８)
SP48-ins_F1	caagaaggatgctttGTGCTGATTCTCATCGTTCTCG (配列番号５９)
SP48-ins_R1	gaccagctggacctgGAGCGCGTTCAAAGTGTCG (配列番号６０)
SP50-ins_F1	caagaaggatgctttATGATCGTGGCCTACCCG (配列番号６１)
SP50-ins_R1	gaccagctggacctgTTCCATATCGTTGTATGGAAACGC (配列番号６２)
SP52-ins_F1	caagaaggatgctttATGAGTTTCCATGTATCCGCG (配列番号６３)
SP52-ins_R1	gaccagctggacctgCAGTTCGTTATACGCGTGACCG (配列番号６４)
SP55-ins_F1	caagaaggatgctttATGGTTCGTCGCGCCCA (配列番号６５)
SP55-ins_R1	gaccagctggacctgCCAGGTGGCGTAGTCAACG (配列番号６６)
SP58-ins_F1	caagaaggatgctttATGGCAATGGCACGGC (配列番号６７)
SP58-ins_R1	gaccagctggacctgGGTGGTTTGCCCGTTGATG (配列番号６８)
SP62-ins_F1	caagaaggatgctttATGACTCGTTCGGACGACGT (配列番号６９)
SP62-ins_R1	gaccagctggacctgCATGTTGAACATCGAACGTTTGG (配列番号７０)
SP64-ins_F1	caagaaggatgctttATGAAGTCACTAATCAGGAATGTAGCG (配列番号７１)
SP64-ins_R1	gaccagctggacctgCTTCTTGCCGTTGAACGCG (配列番号７２)
SP66-ins_F1	caagaaggatgctttGTGAAGCATTGGAAGAAGATGGC (配列番号７３)
SP66-ins_R1	gaccagctggacctgCTTAGTAGTCTGCACTGTCGCGG (配列番号７４)
SP67-ins_F1	caagaaggatgctttATGAAGATAAACAATAAGGGCAAGG (配列番号７５)
SP67-ins_R1	gaccagctggacctgGGGCTGGAACTTGGTGTATGTC (配列番号７６)
SP68-ins_F1	caagaaggatgctttATGGTTTATAACATTCACATATTGCAAAC (配列番号７７)
SP68-ins_R1	gaccagctggacctgCTTCCAACCATTAAGATCGTCTTCG (配列番号７８)
SP69-ins_F1	caagaaggatgctttATGAATTATTTACGACAAAAAATTTCGG (配列番号７９)
SP69-ins_R1	gaccagctggacctgACCGCTATCAGTCGTGGTGTAAC (配列番号８０)

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

ＮＣＢＩのゲノムデータベース(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/)に登録されているビフィドバクテリウム・ロンガムＮＣＣ２７０５株由来タンパクの全アミノ酸配列を分泌シグナルの有無を予測するシグナル配列予測プログラムＳｉｇｎａｌＰ ４．１ ｓｅｒｖｅｒ (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)で解析した。この解析により、タンパクのＮ末端に分泌シグナルペプチド配列を有すると予測されたタンパクの一部のアミノ酸配列に

対し、膜貫通領域（ＴＭ）を推定するプログラムTMHMM Server v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)にてトポロジー解析を行った。このトポロジー解析結果より、タンパク質のＮ末端にＴＭが存在すると推定されたタンパク質として３３種のタンパク質を選定した。この３３種のタンパク質を、ＴＭを有すると予想されるビフィドバクテリウム・ロンガムＮＣＣ２７０５株由来の分泌シグナルペプチドとして選定した。選定した３３種のペプチドのアミノ酸配列に対応するビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａ株のアミノ酸配列において、各タンパク質のアミノ酸配列Ｎ末端からＳｉｇｎａｌＰ解析によってプロテアーゼ切断推定部位と推定されたアミノ酸配列までを各分泌シグナルペプチド配列とした。また、リンカーペプチド配列は、各シグナル配列のＣ末端より続く２０アミノ酸残基とした。

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

（ＳＰｘＬ２０インサート調製）

ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株１２０ｐｇを鋳型として、表４及び表５に記載されている各プライマーセットを用いてＰＣＲ増幅を行った。各プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端１５ｂｐが重複するように設計した。プライマー濃度０．２ μＭ、反応容量２０μＬにて、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、６５℃にて５秒、７２℃にて２０秒を１サイクルとして、３０サイクル行った後、７２℃にて３０秒伸長反応を行い、上記３３種類の分泌シグナルペプチドーリンカー連結体インサートが増幅された。

[0097] （ベクター調製）

上記ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１ ２．５ｎｇを鋳型として、上記表４及び表５に記載されているＰＤ－１－ｓｃＦｖ＿ｖｅｃ＿Ｆ１プライマー及びＨｕ＿Ｖｅｃ＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度０．２μＭ、反応容量５０μＬにて、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラ

ムとしては、９８℃にて１０秒、６５℃にて５秒、７２℃にて４分４５秒を１サイクルとして、３０サイクル行った後、７２℃にて３０秒伸長反応を行った。かかる処理により、５’－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ－ｐＵＣｏｒｉ－Ｈｕプロモーター－３’のベクター断片が調製された。

[0098]（インフュージョン反応）

上記で調製したベクター断片と３３種類の各分泌シグナルペプチド－リンカー連結体インサートをＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて連結した。即ち、マイクロチューブに、ベクターとインサートを１：２のモル比にて添加し、キット内の５ｘＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｅｎｚｙｍｅ ｐｒｅｍｉｘ ２μＬを添加、０．１×ＴＥバッファー（１ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、 ０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、 ｐＨ７．５）にて１０μＬに調整した。これを、３７℃にて１５分間保温した後、さらに５０℃にて１５分間保温した。その他の手順は、キットの製品説明書にしたがい、３３種類のインフュージョン反応液を調製した。

[0099]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

上記３３種類のインフュージョン反応液０．８μＬを用いて大腸菌ＨＳＴ１６ＣＲコンピテント細胞(タカラバイオ株式会社製)の形質転換をそれぞれ行った。形質転換後の菌懸濁液は、７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有ＬＢ寒天培地に塗布し、３７℃にて一晩静置培養した。形質転換条件は、大腸菌ＨＳＴ１６ＣＲコンピテント細胞についての製品説明書にしたがったが、以下に概要を記載する。上記寒天培地上に形成した大腸菌コロニーを７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有ＬＢ液体培地にて３７℃にて一晩培養し、これよりＱＩＡｐｒｅｐ Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔを用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドの抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体発現カセット（Ｈｕプロモーターから Ｈｕターミネーターまでを含む）配列を決定するため、ＢｉｇＤｙｅ（登録商標） Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｖ３．１ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｋｉｔを用いてシーケンス反応を行った。抽

出したプラスミドをｐＨｕＳＰｘＬ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１（但し、ｘ＝４２～４６、４８～７５）とした。

[0100]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミドｐＨｕＳＰｘＬ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１（但し、ｘ＝４２～４６、４８～７５）について、各々５００ｎｇのＤＮＡを用いて、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株の形質転換を、上記［プラスミドｐＨｕＳＰ３Ｌ２２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１の作製］における（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）と同様の方法で行い、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰｘＬ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１（但し、ｘ＝４２～４６、４８～７５）のそれぞれの株を取得した。

[0101]［実施例４］

（組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討２）

上記実施例３で取得した組換えビフィドバクテリウム属細菌である、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰｘＬ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株（但し、ｘ＝４２～４６、４８～７５）のそれぞれについて、上記（組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討１）と同様の方法にて抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体の分泌確認をウェスタン解析により実施した。結果を図５に示す。

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

８Ｌ２０、ＳＰ６２Ｌ２０の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されているプラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌においては、抗ＰＤ－１－１一本鎖抗体の分泌は認められなかった。

[0103] 上記検討により、一本鎖抗体を分泌することができたビフィドバクテリウム属細菌は、ＳＰ４５Ｌ２０、ＳＰ５０Ｌ２０、ＳＰ５２Ｌ２０、ＳＰ５５Ｌ２０、ＳＰ５８Ｌ２０、ＳＰ６４Ｌ２０、ＳＰ６６Ｌ２０、ＳＰ６７Ｌ２０、ＳＰ６８Ｌ２０、ＳＰ６９Ｌ２０を含む発現カセットを用いて形質転換した細菌のみであった。その他の２３種の配列については、分泌しない、もしくは分泌が不十分であったことを確認した。分泌しない、もしくは分泌が不十分であった分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の例として、ＳＰ４２Ｌ２０、ＳＰ４８Ｌ２０、ＳＰ６２Ｌ２０の配列を、配列番号１７、１８、１９にそれぞれ示す。

[0104] ［実施例５］

［ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－２の作製］

異種ペプチドとして上記抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体を用い、分泌シグナルペプチドーリンカー連結体ＳＰ７Ｌ２０を有する抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体分泌プラスミドｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－２を構築した。詳細は以下のとおりである。

[0105] （抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体インサート調製）

前記人工的に合成されたプラスミドｐＵＣ５７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－２５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、Ｉｎｓ＿ＰＤ－１－２＿Ｆ１プライマー及びＩｎｓ＿ＰＤ－１－２＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いてＰＣＲ増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端１５ｂｐが重複するように設計された。ＰＣＲ反応液は、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いて、プライマー０．２μＭ、反応容量３０μＬとした。増幅のプログラムは、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて６０秒を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を２％アガロースゲルにて

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

[0106] （ベクター断片調製）

配列番号２３に記載されているベクター直鎖化断片５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、ＴＧＡ＿Ｈｕ＿Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ＿Ｆプライマー及びｖｅｃ－ＳＰ７Ｌ２０－ＰＤ－１－２＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いて、最終濃度０．２μＭ、反応容量３０μＬにて、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムは、９８℃で１０秒、５５℃で５秒、７２℃で５分を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔを用いて精製し、５’－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ－ｐＵＣｏｒｉ－Ｈｕプロモーター－ＳＰ７Ｌ２０－３’ベクター断片（２）を調製した。

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

Ｈｕターミネーター:配列番号２３の第４番から第１１７番までの塩基配列

ビフィドバクテリウム属細菌複製起点ｐＴＢ６ ｒｅｐ ｕｎｉｔ： 配列番号２３の第１２４番から第１７１９番までの塩基配列

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

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

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

[0108] （インフュージョン反応）

上記で調製されたベクター断片と抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体インサートと

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

[0109]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

[0110]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

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

[0111]［実施例６］

［ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－３の作製］

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

[0112]（抗ＰＤ－１－３一本鎖抗体インサート調製）

前記人工的に合成されたプラスミドｐＵＣ５７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－３

５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、Ｉｎｓ＿ＰＤ－１－３＿Ｆ１プライマー及びＩｎｓ＿ＰＤ－１－３＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いたことの他は、上記［ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－２の作製］の（抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体インサート調製）と同様の手順にて、抗ＰＤ－１－３一本鎖抗体インサートを調製した。

[0113]（ベクター断片調製）

配列番号２４に記載されているベクター直鎖化断片５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、ＴＧＡ＿Ｈｕ＿Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ＿Ｆプライマー及びｖｅｃ－ＳＰ７Ｌ２０－ＰＤ－１－３＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いたことの他は、ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－２の作製］の（ベクター断片調製）と同様の手順で、５’－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ－ｐＵＣｏｒｉ－Ｈｕプロモーター－ＳＰ７Ｌ２０－３’ベクター断片（３）を調製した。

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

Ｈｕターミネーター:配列番号２４の第４番から第１１７番までの塩基配列

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

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

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

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

[0115]（インフュージョン反応）

上記で調製したベクター断片と抗ＰＤ－１－３一本鎖抗体インサートとを

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

[0116]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

[0117]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

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

[0118]［実施例７］

［ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－１の作製］

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

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

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

詳細は以下のとおりである。

[0119] ［抗ＣＴＬＡ－４一本鎖抗体の発現カセット］

抗ＣＴＬＡ－４一本鎖抗体の発現カセットは図１（ｂ）に示されるとおり、Ｈｕプロモーターｄｎａ（ビフィドバクテリウム・ロンガム由来）、分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡと前記分泌シグナルペプチドに続くリンカーペプチドをコードするＤＮＡ、抗ＣＴＬＡ－４一本鎖抗体（重鎖配列、リンカー（$(GGGGS)_3$）、軽鎖配列を含む）をコードするＤＮＡ、Ｈｉｓタグ配列、及びＨｕターミネーター（ビフィドバクテリウム・ロンガム由来）で構成した。各発現カセット中の抗ＣＴＬＡ－４一本鎖抗体（重鎖配列、リンカー（（ＧＧＧＧＳ）$_3$）、軽鎖配列を含む塩基配列を含む）は、以下に示すとおり、以下の表６に示される文献を参照し、二種類の抗ヒトＣＴＬＡ－４一本鎖抗体を使用した。

[0120] [表6]

抗体		参照文献
scFv-CTLA-4-1	配列番号４（７６５塩基配列） 配列番号１４１（２５４アミノ酸） 重鎖配列（１～３７８塩基） $(GGGGS)_3$リンカー（３７９～４２３塩基） 軽鎖配列（４２４～７４４塩基） ヒスチジンタグ（７４５～７６２塩基）	日本国特許３７９３６９３号
scFv-CTLA-4-2	配列番号５（７４７塩基配列） 配列番号１４２（２４８アミノ酸） 重鎖配列（１～３５７塩基） $(GGGGS)_3$リンカー（３５８～４０２塩基） 軽鎖配列（４０３～７２６塩基） ヒスチジンタグ（７２７～７４４塩基）	日本国特許４０９３７５７号

[0121] 配列番号４に示されたｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－１及び配列番号５に示されたｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－２の各一本鎖抗体遺伝子については、ジェンスクリプトジャパン株式会社にて、大腸菌用プラスミドｐＵＣ５７にサブクローニングされ、プラスミドｐＵＣ５７－ｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－１及びｐＵＣ５７－ｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－２として人工遺伝子合成された。

[0122] （抗ＣＴＬＡ－４－１一本鎖抗体インサート調製）

プラスミドｐＵＣ５７－ｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－１　５００ｐｇを鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、Ｉｎｓ＿ＣＴＬＡ－４－１＿Ｆ１プライマー及びＩｎｓ＿ＣＴＬＡ－４－１＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いてＰＣＲ増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端１５ｂｐが重複するように設計した。ＰＣＲ反応液は、プライマー０．２ μＭ、反応容量３０μＬとし、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ　（Ｐｒｅｍｉｘ）（タカラバイオ株式会社)キットを用いて増幅をおこなった。増幅のプログラムは、９８℃で１０秒、５５℃で５秒、７２℃で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　Ｋｉｔを用いて精製し、抗ＣＴＬＡ－４－１一本鎖抗体インサートを調製した。

[0123] （ベクター断片調製）

前記［ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１の作製］の（ベクター断片調製）と同様の手順にて、５’－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ－ｐＵＣｏｒｉ－Ｈｕプロモーター－ＳＰ７Ｌ２０－３’ベクター断片（１）を調製した。

[0124] （インフュージョン反応）

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

[0125]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

[0126]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

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

[0127]［実施例８］

［ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－２の作製］

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

[0128]（抗ＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体インサート調製）

上記プラスミドｐＵＣ５７－ｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ－４－２を鋳型として、上記表１及び表２に記載されている、Ｉｎｓ＿ＣＴＬＡ－４－１＿Ｆ１プライマー及びＩｎｓ＿ＣＴＬＡ－４－２＿Ｒ１プライマーセットからなるプライマーセットを用いたことの他は、上記（抗ＣＴＬＡ－４－１一本鎖抗体インサート調製）と同様に手順にて、抗ＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体インサー

トを精製した。

[0129]（ベクター調製）

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

[0130]（インフュージョン反応）

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

[0131]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

[0132]（ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換）

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

[0133]［実施例９］

（組換えビフィドバクテリウム属細菌における一本鎖抗体の分泌の有無の検討３）

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

[0134] （結果）

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

[0135] ［実施例１０］

［組換えビフィドバクテリウム属細菌株からの抗ＰＤ－１及び抗ＣＴＬＡ－

４一本鎖抗体の精製］

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

[0136] 上記各組換えビフィドバクテリウム属細菌株を、スペクチノマイシン(終濃度７５μｇ／ｍＬ)及びビタミンＣ添加液１００μＬを添加したＭＲＳ培地１０ｍＬに植菌し、３７℃にて２４時間嫌気培養を行った。ＤＭＥＭ：ＭＲＳ（９：１）培地に、スペクチノマイシン（終濃度７５μｇ／ｍＬ）、ビタミンＣ添加液（培地１００ｍＬあたり５００μＬ）を添加して調整し、これに上記培養液を培地量の０．５％量植菌し、３７℃にて１８時間嫌気培養をした。

上記嫌気培養後の培養液を遠心分離して得た培養上清を撹拌しながら、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、タカラバイオ株式会社製）にてヒスチジンタグ融合タンパクを精製した。この精製溶液を限外ろ過（アミコンウルトラ－０．５、メルクミリポア社製）にて濃縮した。精製タンパク質の濃度は、Ｂｒａｄｆｏｒｄ法にて測定した（Coomassie Plus Protein Assay、Thermo Scientific社製）。上記精製一本鎖抗体の一部を用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、クーマシーブリリアントブルー染色（SimplyBlue（登録商標） Safe Stain、ライフテクノロジーズ社製）を行い、約９割の純度でｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１、ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－２、ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－３、ｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ４－１、及びｓｃＦｖ－ＣＴＬＡ４－２の各一本鎖抗体が精製され

ていることを確認した。

[0137] ［実施例１１］

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

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

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

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

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

、液を除いた。これを３回繰り返し洗浄した。

[0141] 三次抗体（Biotin anti-mouse IgG、Biolegend社製）をシグナル増強試薬で２０，０００倍に薄め、これを１００μＬずつ分注した。プレートにシールをし、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。アビジン－ビオチン標識酵素複合体（Vectastain ABC Kit, Vector社製）としてＡ液及びＢ液を３滴ずつシグナル増強試薬７．５ｍＬに添加した。これを１００μＬずつ分注後、プレートにシールをし、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。

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

[0143] [表7]

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

[0144] （結果）

表７及び図７から明らかなとおり、ビフィドバクテリウム属細菌より精製

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

[0145] ［実施例１２］

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

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

[0146] [表8]

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

[0147] （結果）

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

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

[0148] ［実施例１３］

（マウスＰＤ－１と抗ＰＤ－１－３一本鎖抗体の結合の有無の確認１）

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

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

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

洗浄した。

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

[0152] 前記アビジン－ビオチン標識酵素複合体を用いて、キットのＡ液及びＢ液を３滴ずつシグナル増強試薬７．５ｍＬに添加した。これを１００μＬずつ分注後、プレートにシールをし、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。

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

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

[0155] [表9]

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

[0156] （結果）

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

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

[0157] ［実施例１４］

（マウスＰＤ－１と抗ＰＤ－１－３一本鎖抗体との結合の有無の確認２）

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

[0158] （結果）

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

[0159] [表10]

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

[0160] ［実施例１５］

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

抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体のヒトＰＤ－１過剰発現細胞との結合

ヒトＰＤ－１を過剰発現したＪｕｒｋａｔ細胞(信州大学分子腫瘍学講座谷口俊一郎教授より供与)、及びヒトＰＤ－１を過剰発現したＨＥＫ２９３Ｔ細胞(信州大学分子腫瘍学講座谷口俊一郎教授より供与)を使用して検討した。ヒトＰＤ－１過剰発現Ｊｕｒｋａｔ細胞は１００ｍｍペトリディッシュ(イナ・オプティカ社)に５×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／１０ｍＬ培地(非働化した１０％ウシ胎児血清、５０μＭの２－メルカプトエタノール及び８ｍＭ ＨＥＰＥＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地)/ｄｉｓｈに播き、ヒトＰＤ－１過剰発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は１００ｍｍディッシュ(グライナー・ジャパン社製)に２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／１０ｍＬ培地(非働化した１０％ウシ胎児血清を含むＤＭＥＭ培地)に播いた。翌日、ヒトＰＤ－１過剰発現Ｊｕｒｋａｔ細胞は、１５ｍＬファルコンチューブ(ベクトン・ディッキンソン社製)に回収後、細胞数を血球計算盤にて計測し、１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ／チューブになるよう１．５ｍＬチューブ(イナ・オプティカ社製)に分注した。ヒトＰＤ－１過剰発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、培養上清を除去し、ＰＢＳ（Ca^{2+}、Mg^{2+}フリー・リン酸緩衝液）にて２度洗浄し、ＰＢＳで１０倍に希釈したトリプシン・ＥＤＴＡ溶液（Ｗａｋｏ社製）１ｍＬを加え１分間室温で静置後、１０ｍＬの非働化した１０％ウシ胎児血清を含むＤＭＥＭ培地を加え、１５ｍＬファルコンチューブに移した。低速遠心機（トミー精工社製）で１０００ｒｐｍ、５分間遠心後、上清を除去し１ｍＬの非働化した１０％ウシ胎児血清を含むＤＭＥＭ培地を加え、細胞数を計測した。さらにＤＭＥＭ培地を添加し、１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに細胞懸濁液を調製し、１．５ｍＬチューブ（イナ・オプティカ社）に１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ／ｔｕｂｅになるように分注した。

[0161] １．５ｍＬチューブに分注したＰＤ－１過剰発現Ｊｕｒｋａｔ細胞及びＨＥＫ２９３Ｔ細胞を微量冷却遠心機（トミー精工社製）にて５０００ｒｐｍ、４℃にて１分間遠心し、遠心後上清を除去した。チューブに残った細胞のペレットを０．５ｍＬのＰＢＳにて２度洗浄後、抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体

及び、陽性コントロールとしてＬＥＡＦ ｐｕｒｉｆｉｅｄ ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ ＰＤ－１抗体（クローン：ＥＨ１２．２Ｈ７）（BioLegend社製）を１０μｇ／ｍＬの濃度で５０μＬ添加し、氷上にて３０分間静置した。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、上記微量冷却遠心機にて５０００ｒｐｍ、４℃にて１分間遠心し、遠心後上清を除去した。１μｇ／ｍＬに滅菌超純水にて希釈したビオチン化プロテインＬ（Pierce社製）５０μＬを１．５ｍＬチューブに加え、ピペッ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（１％ＢＳＡ、０．１％NaN_3を含むＰＢＳ）５００μＬをチューブに加え、微量冷却遠心機にて５０００ｒｐｍ、４℃にて１分間遠心し、遠心後上清を除去した。ＦＡＣＳバッファーにて５μｇ／ｍＬに希釈したｂｒｉｌｌｉａｎｔ ｖｉｏｌｅｔ ４２１ ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ（BioLegend社製）５０μＬを１．５ｍＬチューブに添加後、ピペッティングにてよく混合し、氷上にて１５分間静置した。１５分後、微量冷却遠心機にて５０００ｒｐｍ、４℃にて１分間遠心後上清を除去し、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。５μｇ／ｍＬにＦＡＣＳバッファーにて希釈したヨウ化プロピジウム溶液を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１１及び図１２に示す。

[0162] （結果）

図１１から明らかなとおり、ＰＤ－１を過剰発現するＪｕｒｋａｔ細胞に抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体が結合していることが確認された。一方、ＰＤ－１を発現していないＪｕｒｋａｔ－Ｍｏｃｋ細胞においては、抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体の結合は認められなかった。また、図１２から明らかなとおり、ヒトＰＤ－１を過剰発現したＨＥＫ２９３Ｔ－ＰＤ－１細胞へ、抗ＰＤ－

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

[0163] ［実施例１６］

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

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

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

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

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

Ｌに調整し、１１０μＬずつ調整したｈＣＤ８０及びｈＣＤ８６と等量混合後、１００μＬずつ上記ブロッキング終了後プレートに分注した。陰性コントロールとして、ビフィドバクテリウム属細菌より精製した抗ＰＤ－１－２一本鎖抗体についても上記と同様に調整した。ブランクのウェルにはシグナル増強試薬のみを１００μＬ分注した。プレートにシールをし、室温で２時間静置後、固相化したｈＣＴＬＡ－４に対して抗ＣＴＬＡ－４一本鎖抗体及び抗ＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体と混合したｈＣＤ８０及びｈＣＤ８６を反応した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。ｈＣＤ８０に対する二次抗体（Human B7-1/CD 80 Biotinylated Antibody、R&D Systems社製）及びｈＣＤ８６に対する二次抗体（Biotinylated Anti-human B7-2 Antibody、R&D Systems社製）をシグナル増強試薬で２．５μｇ／ｍＬ及び０．５μｇ／ｍＬに調整し、これを１００μＬずつ分注した。プレートにシールをし、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除いた。これを３回繰り返し洗浄した。

[0167] 前記アビジン-ビオチン標識酵素複合体としてＡ液及びＢ液を３滴ずつシグナル増強試薬７．５ｍＬに添加した。これを１００μＬずつ分注後、プレートにシールをし、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。

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

[0169]

[表11]

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

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

[0170] [表12]

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

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

[0171] （結果）

ｈＣＤ８０のｈＣＴＬＡ－４への結合に対する阻害率は、１μｇ／ｍＬの

抗ＣＴＬＡ－４－１一本鎖抗体及び抗ＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体でそれぞれ６１．７％及び７３．１％、１０μｇ／ｍＬではそれぞれ９４．１％及び９９．３％であった。またｈＣＤ８６のｈＣＴＬＡ－４への結合に対する阻害率は、１μｇ／ｍＬの抗ＣＴＬＡ－４－１一本鎖抗体及び抗ＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体でそれぞれ８３．７％及び９０．９％、１０μｇ／ｍＬではそれぞれ９６．０％及び９７．７％であった。以上の結果より、１μｇ／ｍＬのｈＣＤ８０及びｈＣＤ８６のｈＣＴＬＡ－４への結合に対して、抗ＣＴＬＡ－４－１一本鎖抗体及び抗ＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体はいずれも１μｇ／ｍＬ以上の濃度で競合的に結合阻害することが示された。

[0172] ［実施例１７］

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

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

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

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

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

[0174] ｍＰＤ－Ｌ１に対する二次抗体(Biotin anti-mouse CD274, Biolegend社製)をシグナル増強試薬で１０ｎｇ／ｍＬに調整し、これを１００μＬずつ分注した。プレートにシールを貼り、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。前記アビジン－ビオチン標識酵素複合体（Vectastain ABC Kit, Vector社製）としてＡ液及びＢ液を１滴ずつシグナル増強試薬２．５ｍＬに添加した。これを１００μＬずつ分注し、プレートにシールを貼り、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。

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

[0176]

[表13]

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

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

[0177] （結果）

表１３及び図１５から明らかなとおり、固相化したｍＰＤ－１に１μｇ／ｍＬのｍＰＤ－Ｌ１を添加した場合その結合反応に対する一本鎖抗体の競合的阻害率は、１０μｇ／ｍＬの抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体で５１．４％であった。対照とした抗ヒトＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体では競合阻害は見られなかった（－６．４％）。以上の結果より、１μｇ／ｍＬのｍＰＤ－Ｌ１に対して１０μｇ／ｍＬ以上の抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体が競合阻害活性を示すことが確認された。

[0178] ［実施例１８］

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

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

[0179] （ＣＤ３／ＣＤ２８刺激ＣＤ４陽性細胞の調製）

Ｂａｌｂ／ｃマウスより脾臓を摘出し脾細胞を回収した後、Ｂｉｏｔｉｎ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＣＤ４ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）でＣＤ４陽性細胞をラベルした。余剰の抗体を洗浄により除いた後、Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ Ｐｌｕｓ－ＤＭ（日本ベクトン・ディッキンソン社製）を加え、ＣＤ４陽性細胞に磁気ビーズを結合させた。これをマグネットにより分離し、磁石に引き寄せられた細胞をＣＤ４陽性細胞として回収し、１０％ウシ胎児血清、８ｍＭ ＨＥＰＥＳ、５０μＭ ２－メルカプトエタノールを含むＲＰＭＩ－１６４０培地に懸濁し、２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬのＣＤ４陽性細胞を調製した。

[0180] ２μｇ／ｍＬに調整したＰｕｒｉｆｉｅｄ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＣＤ３ε抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社製、以下「抗ＣＤ３抗体」ともいう）を、４８ウェルプレートに１１０μＬ／ウェルずつ分注し、４℃にて一晩静置し固相化した。上記ＣＤ４陽性細胞を、固相化プレートに５００μＬ／ウェルずつ分注した。さらに１ｍｇ／ｍＬに調整したＦｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇｒａｄｅ Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ ＣＤ２８（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、以下「抗ＣＤ２８抗体」ともいう）を１μＬ／ウェルずつ添加し、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激ＣＤ４陽性細胞とした。同様に、抗ＣＤ３抗体を固相化していないウェルにもＣＤ４陽性細胞を分注し、未刺激ＣＤ４陽性細胞とした。このプレートを３７℃にて$CO_2$５％の条件で２日間培養した。

[0181] 上記２日間培養した細胞をピペッティングにて剥がし１．５ｍＬチューブに移し、４℃にて、５０００ｒｐｍで１分間遠心分離後上清を除去した。ＰＢＳを１ｍＬ添加後遠心分離し、上清を除去する操作を２回繰り返し洗浄した後、ＦＡＣＳバッファー（１％ＢＳＡを含むＰＢＳ）０．９ｍＬを加え同様に遠心分離、上清除去を行った。Ｓｏｒｔｉｎｇバッファー（０．５％ＢＳＡを含むＰＢＳ）で５０倍希釈したＴｒｕＳｔａｉｎ ｆｃＸ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社製）を２０μＬ加え撹拌後、氷上で１０分間静置した。これにＦＡＣＳバッファーで２００倍希釈したＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＣＤ４ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社製）を２

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

[0182] （抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体の細胞への結合確認）

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

Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＭＢＬ社）を２０μＬ添加し、撹拌後氷上で２０分間静置した。ＦＡＣＳバッファーを１ｍＬ加え遠心分離し、上清を除去する操作を、２回繰り返し洗浄を行った。１ｍＬのＦＡＣＳバッファーを添加後、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。

[0183] （細胞のＰＤ－１発現確認）

使用した細胞にＰＤ－１が発現しているか否かの確認は、マウス脾細胞から得られた未刺激ＣＤ４陽性細胞とＣＤ３／ＣＤ２８刺激ＣＤ４陽性細胞を、ＣＤ４とＣＤ６９を抗体で蛍光ラベル処理したものを使用した。この細胞にＦＡＣＳバッファーで１００倍希釈したＦＩＴＣ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＣＤ２７９（ＰＤ－１）抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社製）２０μＬを添加し撹拌後氷上で２０分間静置した。これに、ＦＡＣＳバッファー１ｍＬを加え遠心分離し、上清を除去する操作を２回繰り返して洗浄を行った。１ｍＬのＦＡＣＳバッファーを添加後、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。

[0184] 上記蛍光ラベルした細胞懸濁液に、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５μＬを添加し、ＢＤ ＦＡＣＳ ｃａｎｔｏ ＩＩフローサイトメーター（ベクトン・ディッキンソン社）及びフローサイトメトリ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。細胞懸濁液をフローサイトメーターにて前方散乱（ＦＳＣ）及び（側方散乱）ＳＳＣを調べ、細胞集団を細胞の大きさと細胞の形態によってゲーティングした。次にその集団をＰＩによるゲーティングを行い、死細胞を除いた細胞集団とした。さらに波長６４７ｎｍでＣＤ４陽性細胞をゲーティングし、ＰＥでその細胞がＣＤ６９を発現しＣＤ３／ＣＤ２８によって刺激された状態にあるかを確認した。ｍＰＤ－１の発現確認及びｍＰＤ－１への抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体の結合はＣＤ４陽性細胞の集団のうち、ＦＩＴＣ陽性（＝ｍＰＤ－１発現若しくは抗マウスＰ

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

[0185] （結果）

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

[0186] ［実施例１９］

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

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

[0187] マウス大腸癌細胞株ＣＴ－２６（ＡＴＣＣ）を、ＦＢＳ（ＥＱＵＩＴＥＣＨ－ＢＩＯ，ＩＮＣ．社製）を１０％含有するＲＰＭＩ１６４０培地（和光純薬工業社製）で培養し、６週齢のメスのＢＡＬＢ／ｃマウス（日本エスエルシー社製）に移植して担癌マウスを作製した。腫瘍サイズが３０．１８～１３８．１６ｍｍ^{3}の担癌マウスを下記表のように３群（各群３匹）に分けた（Ｄａｙ１）。第１群及び第２群は、腫瘍組織における組換えビフィドバクテリウム属細菌からの抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌確認用、第３群は、腫瘍組織での組換えビフィドバクテリウム属細菌の生着確認用とした。第２群及び第３群には、抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム

属細菌であるビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－３株の簡易凍結製剤を尾静脈から１．０×10^9ｃｆｕ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。ビフィドバクテリウム属細菌投与７日後に腫瘍を摘出した。第３群の腫瘍は、凍結保存した後、生菌数を測定した。第１群及び第２群の腫瘍は、Ｏ．Ｃ．Ｔ．コンパウンド（サクラファインテック社製）で凍結包埋した。これより凍結ミクロトームＬｅｉｃａ ＣＭ１９００（Ｌｅｉｃａ社製）を用いて薄切スライド標本を作製し、組織染色に供した。

[0188] （生菌数測定）

凍結した腫瘍組織に嫌気性希釈液を添加し、ホモジナイズ処理をした。このホモジネートを嫌気性希釈液にて適宜希釈した後、ＢＬＦＳ寒天培地（２５０μｇ／ｍＬ５－フルオロウラシル、３０μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有ＢＬ寒天培地）に塗布し、嫌気条件下で３７℃にて３日間培養した。ＢＬＦＳ寒天培地上に形成されたコロニー数を数え、腫瘍中の組換えビフィドバクテリウム属細菌の生菌数を算出した。結果を以下の表１４に示す。

[0189] [表14]

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

[0190] （結果）

表１４から明らかなとおり、腫瘍１ｇあたり２．７×10^6ｃｆｕの生菌が認められた。

[0191]（免疫組織染色）

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

[0192]（結果）

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

[0193]［実施例２０］

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

ＣＴ２６担癌モデルマウスを実施例１９と同様の方法にて作製した。腫瘍サイズが４０．５１から８８．０３ｍｍ^{3}の担癌マウスを下記表１５のとおり５群（各群７匹）に分けた（Ｄａｙ０）。第１群は無処理対照群、第２群は抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌株（ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－３株）単剤（ｉ．ｖ．）投与群、第３群は抗ｍＰＤ－１抗体（ＢｉｏＸｃｅｌｌ社製、Ｃｌｏｎｅ：ＲＰＭ１－１４）単剤投与（ｉ．ｔ．）群、第４群は抗ｍＣＴＬＡ－４抗体（ＢｉｏＸｃｅｌｌ社製、Ｃｌｏｎｅ：９Ｄ９）単剤（ｉ．ｔ．）投与群

、第５群は、抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌（ｉ．ｖ．）と抗ｍＣＴＬＡ－４抗体（ｉ．ｔ．）の２剤併用投与群とした。薬剤の投与日、投与量及び投与経路は以下の表１５のとおりである。また、第２群及び第５群については、１０％マルトース溶液を１ｍＬずつ１日２回の頻度でＤａｙ１からＤａｙ５及びＤａｙ８からＤａｙ１２に腹腔内投与した。各群共に定期的に腫瘍径を測定（Ｄａｙ０，３，７，１０，１４，１７，２２）し、Ｄａｙ２２に腫瘍を摘出して腫瘍重量を測定した。腫瘍体積の推移を表１６に、ＣＴ２６担癌マウスにおける腫瘍体積の統計学的検定を表１７に、単剤投与群と無処理群のＣＴ２６腫瘍体積推移を図１８に示した。

[0194] [表15]

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

i.v.: 静脈内投与、i.t.: 腫瘍局所投与

[0195]

[0196]

[表16]

単剤及び２剤併用投与したＣＴ２６担癌マウスの平均腫瘍体積

Day	Tumor volume (mm^3)				
	無処理	抗マウスPD-1一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌	抗mPD-1 抗体	抗mCTLA-4 抗体	抗マウスPD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌＋抗mCTLA-4 抗体
0	60.30 ± 13.46	60.59 ± 13.86	61.31 ± 13.74	61.08 ± 13.84	61.21 ± 14.94
3	148.48 ± 36.43	69.96 ± 25.13	78.88 ± 21.81	108.99 ± 30.86	72.87 ± 34.89
7	466.83 ± 167.61	153.42 ± 77.79	115.71 ± 49.80	175.70 ± 79.77	116.26 ± 67.78
10	902.05 ± 352.64	209.58 ± 119.71	138.55 ± 86.62	200.04 ± 118.46	88.04 ± 61.75
14	1571.61 ± 636.62	364.42 ± 246.94	195.31 ± 202.52	241.99 ± 192.36	78.58 ± 54.86*
17	2506.78 ± 993.48	615.38 ± 380.16	282.07 ± 328.92	322.65 ± 296.33	98.33 ± 85.98*
22	3718.65 ± 1064.17	1259.90 ± 737.04	556.60 ± 599.70	475.74 ± 516.73	175.93 ± 215.91*

The mean values ± S.D. of seven mice.

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

[表17]

ＣＴ２６担癌マウスにおける腫瘍体積の統計学的検定

	T-test P (T<=f)									
Day	第１群 vs 第２群		第１群 vs 第３群		第１群 vs 第４群		第１群 vs 第５群		第２群 vs 第５群		第４群 vs 第５群	
3	0.000	**	0.000	**	0.049	*	0.002	**	0.861		0.063	
7	0.002	**	0.001	**	0.002	**	0.001	**	0.359		0.159	
10	0.002	**	0.001	**	0.002	**	0.001	**	0.034	*	0.047	*
14	0.002	**	0.001	**	0.001	**	0.001	**	0.021	*	0.069	
17	0.002	**	0.001	**	0.001	**	0.001	**	0.010	*	0.098	
22	0.000	**	0.000	**	0.000	**	0.000	**	0.007	**	0.199	

*: P value < 0.05

**: P value < 0.01

第１群: 無処理

第２群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群#

第３群: 抗 mPD-1 抗体投与群

第４群:抗 mCTLA-4 抗体投与群

第５群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌#・抗 mCTLA-4 抗体　２剤併用投与群

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

[0197]

[表18]

単剤及び２剤併用投与したＣＴ２６担癌マウスの平均腫瘍体積のＴ／Ｃ

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

[0198] （結果）

表１７、図１８から明らかなとおり、抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群（第２群）では、無処理群（第１群）と比較して全ての時点で低い腫瘍体積推移を示しており、全ての時点で有意差のある増殖抑制効果が認められた（表１７）。また、その腫瘍増殖抑制は無処理対照に対する処理群の比（Ｔ／Ｃ）で見るとＤａｙ１０以降で０．３４以下であった。

抗ｍＰＤ－１抗体単剤投与群（第３群）では、無処理群（第１群）と比較して腫瘍体積において全ての時点で有意差のある抑制作用が認められ、Ｔ／ＣはＤａｙ１０以降で０．１５以下であった。なお腫瘍内に投与した抗ｍＣＴＬＡ－４抗体単剤投与群（第４群）は、無処理群と比較して腫瘍体積において全ての時点で有意差のある抑制作用が認められ、Ｔ／ＣはＤａｙ１０以降で０．２２以下であった。

[0199] 一方、抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌と抗ｍＣＴＬＡ－４抗体の２剤併用群（第５群）では、無処理群と比較して腫瘍体積において全ての時点で有意差が認められ、Ｔ／ＣはＤａｙ１０以降で０．１０以下と最も強い抗腫瘍作用であった。２剤併用群と単剤の群を比較す

ると、Ｄａｙ１０では各単剤投与群に対して、またＤａｙ１４以降では抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群に対して有意差のある強い抑制作用が認められた（表１６、表１７、表１８、図１９、図２０参照）。なお抗ｍＣＴＬＡ－４抗体投与群と２剤併用群において各１例のマウスに腫瘍の完全退縮が認められた。

[0200] 腫瘍重量においても腫瘍体積と同様の結果であり、無処理群に対して全ての群で有意差が認められ、Ｔ／Ｃは抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群、抗ｍＰＤ－１抗体投与群、抗ｍＣＴＬＡ－４抗体投与群及び２剤併用群でそれぞれ０．３１、０．１２、０．１０及び０．０４であり、２剤併用群が腫瘍重量で最も低い値であった（表１９、表２０参照）。

[0201] [表19]

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

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

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

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

T/C ratios =薬剤投与群の平均腫瘍重量/ 無処理群の平均腫瘍重量

-: Not determined

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

[0202]

[表20]

ＣＴ２６担癌マウスにおける腫瘍重量の統計学的検定

VS	Day 22 T-test P (T<=f)	
第1群 vs 第2群	0.004	**
第1群 vs 第3群	0.001	**
第1群 vs 第4群	0.001	**
第1群 vs 第5群	0.001	**
第2群 vs 第5群	0.006	**
第4群 vs 第5群	0.231	

**: P value < 0.01
第1群: 無処理
第2群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌投与群#
第3群: 抗 mPD-1 抗体投与群
第4群:抗 mCTLA-4 抗体投与群
第5群: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌#・抗 mCTLA-4 抗体 2剤併用投与群
#：ビフィドバクテリウム・ロンガム 105A/pHuSP7L20-mPD-1scFv

[0203] （結果）

以上の結果より、抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌は静脈内投与でＣＴ－２６担癌マウスの腫瘍内に生着し（実施例１９）、抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体を分泌して腫瘍増殖抑制効果を発揮し、その効果は試薬抗体である抗ｍＰＤ－１抗体を腫瘍内に直接投与した場合とほぼ同程度であった。ビフィドバクテリウム属細菌から分泌された抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体は、ｉｎ ｖｉｔｒｏの試験にてｍＰＤ－１とｍＰＤ－Ｌ１との結合を競合的に阻害する活性を有しており（実施例１７）、腫瘍内でも同様な機序でＴ細胞上のＰＤ－１と腫瘍細胞上のＰＤ－Ｌ１間の負のシグナル伝達を遮断することによりＴｃｅｌｌが活性化した結果、抗腫瘍効果が発揮されたものと推定された。また抗マウスＰＤ－１一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌と抗ｍＣＴＬＡ－４抗体との併用効果が確認されたことから、ＣＴＬＡ－４を阻害する一本鎖抗体とＰＤ－１を阻害する一本鎖抗体とを同時に分泌する共発現ビフィドバクテリウム属細菌の有用性が示唆された。

[0204] ［実施例２１］

［各種リンカー長の抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３一本鎖抗体分泌ビフィドバクテリウム属細菌の作製］

（概要）

分泌シグナルがＳＰ７、分泌シグナルに続くリンカー長が２０アミノ酸残基である抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌プラスミドｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３を構築した。このプラスミドの分泌シグナル及び分泌シグナルに続くリンカーを、ＳＰ６９及びＳＰ６９に対応するリンカー（２０アミノ酸残基）に置換した抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌プラスミドｐＨｕＳＰ６９Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３を構築した。さらにリンカーの長さを２０から、Ｌ０～１０、１５（Ｌ０、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、Ｌ５、Ｌ６、Ｌ７、Ｌ８、Ｌ９、Ｌ１０及びＬ１５）に変更したプラスミドも構築した。

[0205] ［プラスミドｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の作製］

（概要）

抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３を分泌する発現カセット（抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌発現カセット）を含み、大腸菌－ビフィドバクテリウム属細菌シャトルベクターであるプラスミドｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３を作製した。使用したプライマーを以下の表２１に示す。

[0206] [表21]

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

[0207] （抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌発現カセットの構成）

抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３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－１ｓｃＦｖ０３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ターミネーターの塩基配列を、（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－１ｓｃＦｖ０３のアミノ酸配列における重鎖配列、リンカー（ＧＧＧＧＳ）$_3$、軽鎖配列を含む）をコードするＤＮＡの塩基配列は、以下の表２２に示される文献を参照した。

[0208] （抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の人工ＤＮＡ合成）

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

[0209] [表22]

抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３に関する文献

抗体		参照文献
抗 hPD-1 scFv03	配列番号 86 (729 塩基配列) 重鎖配列（1～342 塩基） （GGGGS）$_3$ リンカー（343～387 塩基） 軽鎖配列(388~708 塩基) ヒスチジンタグ（709～726 塩基）	日本国特許 5028700 号

[0210] （抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３インサート断片の調製１）

上記プラスミドｐＵＣ５７－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３（５００ｐｇ）を鋳型として、上記表２１に記載のＩｎｓ－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３－Ｆ１プライマー（フォワード）及びＩｎｓ－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３－Ｒ１プライマー（リバース）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０．２μＭ、反応容量３０μＬとして、前記ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キット（タカラバイオ社製）を用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムとしては、９８℃にて１０秒、

５５℃にて５秒、７２℃にて６０秒を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたインサートＰＣＲ産物を２％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎキット（キアゲン社製）を用いて精製し、約０．７ｋｂｐの抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３インサート断片（１）を調製した。

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

配列番号８７に記載されているベクター直鎖化断片（５００ｐｇ）を鋳型として、上記表２１に記載されている、ＴＧＡ－Ｈｕ－Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ－Ｆプライマー（フォワード）及びｖｅｃ－ＳＰ７Ｌ２０－Ｒ１プライマー（リバース）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０．２μＭ、反応容量３０μＬとして、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅のプログラムは、９８℃にて１０秒、５５℃にて５秒、７２℃にて５分を１サイクルとして、３０サイクル行った。増幅されたＰＣＲ産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎキットを用いて精製し、約４．０ｋｂｐの5’－Ｈｕターミネーター－ｐＴＢ６ｒｅｐ ｕｎｉｔ－ＳＰＣＭｒ－ｐＵＣｏｒｉ－Ｈｕプロモーター－ＳＰ７Ｌ２０－３’ベクター断片（１）を調製した。

[0212] （インフュージョン反応）

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

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

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

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

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

[0215]（ベクター断片及びインサート断片の調製）

ベクター断片の調製は、プラスミドｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３を鋳型として、下記表２３（Ｖ１）及び表２４に記載されているｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３＿Ｖｅｃ＿Ｆ１プライマー及びＨｕ－ｍＣＣＬ２１＿Ｖｅｃ＿Ｒ１プライマーからなるプライマーセットを用いて、プライマー濃度０．２μＭ、反応容量５０μＬとして、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ（Ｐｒｅ

ｍｉｘ）キットを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅プログラムは、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秒とした。増幅したＰＣＲ産物をベクター断片Ｖ１とした。

[0216] ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－ＡゲノムＤＮＡ８００ｐｇを鋳型として、下記表２３（Ｉｎｓ－１）及び表２４に記載されているＳＰ６９－ｉｎｓ＿Ｆ１プライマー及びＳＰ６９－ｉｎｓ＿Ｒ１＿ｈＰＤ１＿０３プライマーよりなるプライマーセットを用いてＰＣＲ増幅を行った。プライマー配列は、インサート断片とベクター断片の末端１５ｂｐが重複するように設計した。上記ベクターと同様にＰＣＲ増幅を行った。ただし７２℃での伸長反応時間は２０秒とした。増幅したＰＣＲ産物をインサート断片Ｉｎｓ－１とした。

[0217]

[表23]

ＰＣＲ増幅時の鋳型及びプライマー

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

[0218]

[表24]

ＰＣＲ増幅時のプライマー配列

プライマー名	配列　(5' → 3')	配列番号
Hu-mCCL21_Vec_R1	AAAGCATCCTTCTTGGGTCAGG	配列番号 89
hPD-1 scFv03_Vec_F1	CAGGTCCAGCTGGTCGAATC	配列番号 90
SP69-ins_F1	CAAGAAGGATGCTTTATGAATTATTTACGACAAAAAATTTCGG	配列番号 91
SP69-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGACCGCTATCAGTCGTGGTGTAAC	配列番号 92
SP69L5-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGGCGTTGAATCATCCGC	配列番号 93
SP69L10-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGATGGCGTTGAAGATGG	配列番号 94
SP69L15-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGGGTGTAACTGCCATCCGATG	配列番号 95
SP69L0-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGCAAAGACCGGCATTG	配列番号 96
SP69L1-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGATCCGCAAAGACCGGCAT	配列番号 97
SP69L2-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGATCATCCGCAAAGACCGG	配列番号 98
SP69L3-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGAATCATCCGCAAAGACCG	配列番号 99
SP69L4-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGTTGAATCATCCGCAAAGAC	配列番号 100
SP69L6-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGAGATGGCGTTGAATCATCCG	配列番号 101
SP69L7-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGAAGATGGCGTTGAATCATCC	配列番号 102
SP69L8-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGCGTTGAAGATGGCGTTGAATC	配列番号 103
SP69L9-ins_R1_hPD1_03	GACCAGCTGGACCTGTGGCGTTGAAGATGGCG	配列番号 104

[0219]（インフュージョン反応）

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

[0220]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

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

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

[0221] ［ｐＨｕＳＰ６９Ｌｙ－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３（ｙ＝０～１０，１５）の作製］

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

[0222] （ベクター断片及びインサート断片の調製）

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

[0223] （インフュージョン反応）

上記で調製したベクター断片Ｖ１及び各インサート断片Ｉｎｓ－Ｌｙ（ｙ＝０～１０，１５）を、上記ｐＨｕＳＰ６９Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３作製時と同様の方法にてインフュージョン反応にてつなげた。

[0224]（大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認）

上記インフュージョン反応液を用いてｐＨｕＳＰ６９Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３作製時と同様の方法にて大腸菌の形質転換及びプラスミドＤＮＡの配列確認を行った。

[0225]［ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換］

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

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

[0227]［実施例２２］

［各種リンカー長の抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌ビフィドバクテリウム属細菌のｓｃＦｖ発現解析］

実施例２１にて作製したビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ６９Ｌｙ－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３株（ｙ＝０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５及び２０）より分泌される抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３は、Ｃ末端にヒスチジンタグを融合しているため、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。

[0228] （ビフィドバクテリウム属細菌の培養）

上記各組換えビフィドバクテリウム属細菌株の７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有ＢＬ－ｂＳ寒天培地上の画線培養物を、スペクチノマイシン（終濃度７５μｇ／ｍＬ）及びビタミンＣ添加液（１００ｍＬあたりアスコルビン酸３５ｇ、Ｌ－システイン塩酸塩一水和物２ｇ及び炭酸ナトリウム１１ｇを含む溶液）１００μＬを添加したＭＲＳ（ベクトン・ディッキンソン社製）液体培地１０ｍＬに植菌し、３７℃にて２４時間嫌気培養し、活性化培養液とした。次に、ＤＭＥＭ（ＣａｔＮｏ．１２３２０－０３２：ライフテクノロジーズ社製）：ＭＲＳを９：１の割合で混合した培地２０ｍＬに、ビタミンＣ添加液１００μＬ、スペクチノマイシンを７５μｇ／ｍＬになるよう添加し、上記活性化培養液１００μＬを植菌した。これを３７℃にて１８時間嫌気培養した。

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

[0229] 上記培養上清濃縮物（培養液１ｍＬ相当）をミニプロティアン（登録商標）ＴＧＸ™ゲル（４～２０％）（バイオラッド社製）にて電気泳動し、ゲルをＰＶＤＦ膜（ｉＢｌｏｔ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｓｔａｃｋｓ、ライフテクノロジーズ社製）にＴｒａｎｓ－Ｂｌｏｔ Ｔｕｒｂｏ（バイオラッド社製）を

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

[0230] （結果）

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

[0231] ［実施例２３］

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

（抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の精製）

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

[0232] 上記嫌気培養後の培養液を遠心分離して得た培養上清を撹拌しながら、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（ＴＡＬＯＮｒｅｓｉｎ、タカラバイオ社製）にてヒスチジンタグ融合タンパクを精製した。この精製溶液を限外ろ過（アミコンウルトラ－０．５、ＮＭＷＬ：１０，０００、メルクミリポア社製）にて濃縮した。精製タンパク質の濃度は、Ｂｒａｄｆｏｒｄ法にて測定した（Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ Ｐｌｕｓ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）。濃度スタンダードはアルブミンとした。上記精製一本鎖抗体の一部を用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、クーマシーブリリアントブルー染色（ライフテクノロジーズ、ＳｉｍｐｌｙＢｌｕｅ™ Ｓａｆｅ Ｓｔａｉｎ）を行い、約９割の純度で抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の各一本鎖抗体が精製されていることを確認した。

[0233] （抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３のヒトＰＤ－１への結合確認）

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

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

[0235] 抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３をシグナル増強試薬（Signal Enhancer HIKARI、nacalai tesque社製）にて５ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬおよび４０ｎｇ／ｍＬに調整し、１００μＬ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１００μＬ分注した。プレートにシールをし、室温で２時間静置後、固相化したｈ

ＰＤ－１と各一本鎖抗体を反応した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。

[0236] 二次抗体（Ａｎｔｉ－Ｈｉｓ－ｔａｇ－Ｂｉｏｔｉｎ、ＭＢＬ社製）をシグナル増強試薬で２０００倍に薄め、これを１００μＬ分注した。プレートにシールを貼り、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除いた。これを３回繰り返し洗浄した。アビジン－ビオチン標識酵素複合体（Vectastain ABC Kit, Vector社製）としてＡ液及びＢ液を３滴ずつシグナル増強試薬７．５ｍＬに添加した。これを１００μＬずつ分注後、プレートシールにシールを貼り、室温で３０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。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、２００μＬずつ分注し、遮光して室温で２０分静置した。正確に２０分経過後Ｓｔｏｐ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（R&D Systems社製）を５０μＬずつ添加し呈色反応を停止した。測定は４５０ｎｍの吸光度を、５７０ｎｍを対照として測定した。

[0237] （結果）

抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の結合ＥＬＩＳＡの結果を図２２に示す。抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３は、Ｌ５、Ｌ２０のリンカー長に関わらずヒトＰＤ－１に結合し、結合量はｓｃＦｖ濃度に依存的であった。

[0238] ［実施例２４］

［リンカー長の異なる抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３のヒトＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との結合反応に対する競合的結合阻害活性の確認］

上記実施例２３にて精製したリンカー長の異なる抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３を用いて、ヒトＰＤ－１に対するヒトＰＤ－Ｌ１の結合に対する競合的結合阻害活性の確認をＥＬＩＳＡ法により行った。陰性コントロールとして抗ヒトＣＴＬＡ－４－２一本鎖抗体を用いた。

[0239] ９６ウェルプレートに、１×ＰＢＳにて１μｇ／ｍＬに調整したｈＰＤ－

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

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

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

０分間静置した。液を除去後、１×ＰＢＳを３５０μＬずつ分注し、液を除去した。これを３回繰り返し洗浄した。

[0242] 検出試薬としてＣｏｌｏｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ａ及びＣｏｌｏｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｂ（R&D Systems社製）を等量ずつ混ぜ、２００μＬずつ分注し、遮光して室温で２０分静置した。正確に２０分経過後Ｓｔｏｐ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（R&D Systems社製）を５０μＬずつ添加し呈色反応を停止した。

測定は４５０ｎｍの吸光度を、５７０ｎｍを対照として測定した。測定値をフリーソフトウェアＩｍａｇｅ Ｊを用いて回帰式を求め、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の結合を５０%阻害する抗体濃度（ＩＣ５０）を算出した。測定及び解析結果を以下の表２５及び図２３に示した。

[0243] [表25]

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

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

[0244] （結果）

表２５及び図２３から明らかなとおり、抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３は、Ｌ５、Ｌ２０のリンカー長に関わらずヒトＰＤ－Ｌ１のヒトＰＤ－１への結合に対して競合阻害活性を示した。ＳＰ６９Ｌ５及びＳＰ６９Ｌ２０の抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３のＩＣ$_{50}$はそれぞれ１８．７ｎＭ及び５１．７ｎＭであ

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

[0245] ［実施例２５］

［各種シグナルペプチドを組み込んだ抗ヒトＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌ビフィドバクテリウム属細菌のｓｃＦｖ発現解析］

実施例２１の「プラスミドｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の作製」と同様の方法で、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰｘＬ２０－ｈＰＤ－１－ｓｃＦｖ０３株（但し、ｘ＝７、４５、５０、５２、５５、５８、６４、６６、６７、６８、６９）のそれぞれについて、分泌される抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３は、Ｃ末端にヒスチジンタグを融合しているため、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図２４（ａ）及び（ｂ）に示す。

[0246] 図２４（ａ）及び（ｂ）から明らかなとおり、以下の１１種類（ＳＰ７Ｌ２０、ＳＰ４５Ｌ２０、ＳＰ５０Ｌ２０、ＳＰ５２Ｌ２０、ＳＰ５５Ｌ２０、ＳＰ５８Ｌ２０、ＳＰ６４Ｌ２０、ＳＰ６６Ｌ２０、ＳＰ６７Ｌ２０、ＳＰ６８Ｌ２０、ＳＰ６９Ｌ２０）の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体の下流に抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３が組み込まれた発現カセットを含むベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株において、抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３の分泌が確認された

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

[0248] ［実施例２６］

［抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３のヒトＰＤ－１へのＥＬＩＳＡによる結合確認］

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

[0249] [表26]

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

[0250] （結果）

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

ＳＰ５０、ＳＰ６４、ＳＰ６７の場合に結合量が多かった。

[0251] ［実施例２７］

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

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

[0252]

[表27]

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

[0253] （結果）

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

[0254] ［実施例２８］

［リンカー長の検討］

ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰｘＬｙ－ｈＰＤ

－１－ｓｃＦｖ０３株（但し、ｘ＝７、４５、５０、５２、５５、５８、６４、６６、６７、６８、６９）のそれぞれについて、様々なリンカー長（Ｌｙ）において検討を行った。

[0255] 抗ｈＰＤ－１－ｓｃＦｖ０３抗体について、１１種類（ＳＰ７、ＳＰ４５、ＳＰ５０、ＳＰ５２、ＳＰ５５、ＳＰ５８、ＳＰ６４、ＳＰ６６、ＳＰ６７、ＳＰ６８、ＳＰ６９）の各分泌シグナルペプチドについて、様々なリンカー長を有する、各分泌シグナルペプチド－リンカー連結体が挿入されている抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌プラスミドを構築し、かかるプラスミドで形質転換された各種ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株を作製した。

[0256] 上記検討用各種ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株それぞれについて、抗ｈＰＤ－１－ｓｃＦｖ０３抗体の分泌確認を、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図２５（ａ）～（ｄ）に示す。

[0257] （結果）

図２５（ａ）～（ｄ）から明らかなとおり、ＳＰ５８Ｌ５，ＳＰ５８Ｌ１０を除き、ＳＰ７Ｌ５、ＳＰ７Ｌ１０、ＳＰ７Ｌ１５，ＳＰ７Ｌ２０、ＳＰ４５Ｌ５、ＳＰ４５Ｌ１０、ＳＰ４５Ｌ１５，ＳＰ４５Ｌ２０、ＳＰ５０Ｌ５、ＳＰ５０Ｌ１０、ＳＰ５０Ｌ１５，ＳＰ５０Ｌ２０、ＳＰ５２Ｌ５、ＳＰ５２Ｌ１０、ＳＰ５２Ｌ１５，ＳＰ５２Ｌ２０、ＳＰ５５Ｌ５、ＳＰ５５Ｌ１０、ＳＰ５５Ｌ１５，ＳＰ５５Ｌ２０、ＳＰ５８Ｌ１５，ＳＰ５８Ｌ２０、ＳＰ６４Ｌ５、ＳＰ６４Ｌ１０、ＳＰ６４Ｌ１５，ＳＰ６４Ｌ２０、ＳＰ６６Ｌ５、ＳＰ６６Ｌ１０、ＳＰ６６Ｌ１５，ＳＰ６６Ｌ２０、ＳＰ６７Ｌ５、ＳＰ６７Ｌ１０、ＳＰ６７Ｌ１５，ＳＰ６７Ｌ２０、ＳＰ６８Ｌ５、ＳＰ６８Ｌ１０、ＳＰ６８Ｌ１５，ＳＰ６８Ｌ２０、ＳＰ６９Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ１０、ＳＰ６９Ｌ１５，ＳＰ６９Ｌ２０の各分泌シグナルペプチド－リンカー連結体が挿入されている抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌プラスミドで形質転換された各種ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株から一本鎖

抗体が分泌された。

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

[0259] ［実施例２９］

［抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３のヒトＰＤ－１へのＥＬＩＳＡによる結合確認］

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

[0260] [表28]

ＳＰｘ	Ｌｙ		結合量
			ＯＤ４５０－５７０
ＳＰ７	Ｌ２０	ＳＰ７Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３	１．７２８
ＳＰ７	Ｌ５	ＳＰ７Ｌ５－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３	２．８６１
ＳＰ６８	Ｌ２０	ＳＰ６８Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３	２．３５８
ＳＰ６８	Ｌ５	ＳＰ６８Ｌ５－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３	３．１１９
ＳＰ６９	Ｌ２０	ＳＰ６９Ｌ２０－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３	２．３３２
ＳＰ６９	Ｌ５	ＳＰ６９Ｌ５－ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３	３．６４３

[0261] （結果）

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

[0262] ［実施例３０］

（リンカー長の検討　Ｌ＝０～１０）

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

[0263] （結果）

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

挿入されている抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株において分泌が認められた。ＳＰ６８Ｌ０やＳＰ６８Ｌ１が分泌シグナルペプチドーリンカー連結体として用いられている場合は、分泌量が少なかった（図２６（ｂ）参照）。

[0264] [実施例３１]

ＳＰ５０Ｌｙ（ただしｙ＝０、１、５）、ＳＰ６４Ｌｙ（ただしｙ＝０、５）、ＳＰ６７Ｌｙ（ただしｙ＝１０）、ＳＰ６８Ｌｙ（ただしｙ＝１、５）、ＳＰ６９Ｌｙ（ただしｙ＝１、７）の各分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されている抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌プラスミドで形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株を作製し、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なった。結果を図２７に示す。

[0265] （結果）

図２７から明らかなとおり、ＳＰ５０Ｌ０、ＳＰ５０Ｌ１、ＳＰ５０Ｌ５、ＳＰ６４Ｌ０、ＳＰ６４Ｌ５、ＳＰ６７Ｌ１０、ＳＰ６８Ｌ１、ＳＰ６８Ｌ５、ＳＰ６９Ｌ１、ＳＰ６９Ｌ７のいずれの分泌シグナルペプチドーリンカー連結体が挿入されている抗ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌プラスミドで形質転換された株においても、抗ｈＰＤ－１－ｓｃＦｖ０３抗体の分泌が確認された。

[0266] [実施例３２]

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

実施例２４の手順と同様に、ｈＰＤ－１ｓｃＦｖ０３分泌各ビフィドバクテリウム属細菌より精製したｓｃＦｖによるＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１結合の競合的結合阻害活性の確認を行った。測定は４５０ｎｍの吸光度を、５７０ｎｍを対照として測定した。ｓｃＦｖ非添加時のＰＤ－Ｌ１の結合量を１００％とし、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の結合を５０％阻害するｓｃＦｖ濃度（ＩＣ５０）を算出した。測定結果を以下の表２９に示した。

[0267] [表29]

ＳＰ／Ｌｉｎｋｅｒ	ＩＣ５０＊（ｎＭ）
ＳＰ５０Ｌ５	１０．９
ＳＰ６４Ｌ５	２３．４
ＳＰ６７Ｌ１０	２６．９
ＳＰ６８Ｌ１	２１．７
ＳＰ６８Ｌ５	４１．１
ＳＰ６９Ｌ１	２１．８
ＳＰ６９Ｌ７	２８．８

[0268] （結果）

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

[0269] ［実施例３３］

（結合親和性）

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

Ｄ－１一本鎖抗体はＨＢＳ－ＥＰバッファー（ＧＥヘルスケア社製）にて１２．５、２５、５０、１００及び２００ｎＭに調製した。カイネティクス測定は、各アナライトを低濃度から添加時間６０秒、解離時間６０秒、流速３０μＬ／分の条件でシングルサイクル法にて実施した。測定後の試料の解離条件はＧｌｙｃｉｎ １．５（ＧＥヘルスケア社製）を添加時間６０秒、流速３０μＬ／分とした。本試験のランニング緩衝液はＨＢＳ－ＥＰバッファーとした。結果を以下の表３０に示す。

[0270] [表30]

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

[0271] （結果）

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

[0272] ［実施例３４］

［各種シグナルペプチドを組み込んだ抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２-ＦＬＡＧ分泌ビフィドバクテリウム属細菌のｓｃＦｖ発現解析］

ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＰ３０ＳＰｘＬ２０－ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２株（但し、ｘ＝７、４５、５０、５２、５５、５８、６４、６６、６７、６８、６９）のそれぞれについて、１８時間培養の培養液からサンプル調製し、培養上清８０μＬを用いて、抗ＦＬＡＧタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより一本鎖抗体分泌の解析を行なっ

た。結果を図２８に示す。

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

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

[0275] [実施例３５]

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

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

[0276]

[表31]

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

[0277]（結果）

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

[0278]［実施例３６］

［抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２のヒトＣＴＬＡ－４／ヒトＣＤ８０との結合反応又はヒトＣＴＬＡ－４／ヒトＣＤ８６との結合反応に対する競合的結合阻害活性の確認］

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

[0279]

[表32]

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

[0280] （結果）

リンカー長が２０の場合、シグナルペプチドによる大きな違いはなかった。

[0281] [実施例３７]

抗ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２抗体について、ＳＰ４５、ＳＰ５０、ＳＰ６４、ＳＰ６８、ＳＰ６９のシグナルペプチドについて、リンカー長につい

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

[0282]（結果）

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

産業上の利用可能性

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

請求の範囲

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

（１）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプロモーターＤＮＡ；

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

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

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

（３）異種ポリペプチドをコードするＤＮＡ；

（４）ビフィドバクテリウム属細菌で機能するターミネーターＤＮＡ；

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

[請求項3] リンカーペプチドが、配列番号２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、及び３５のいずれかに示されるアミノ酸配列のＣ末端からアミノ酸残基が０～２９欠損した各アミノ酸配列からなることを特徴とする請求項２記載の発現カセット。

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

[請求項5] 異種ポリペプチドが、一本鎖抗体であることを特徴とする請求項１～

４のいずれか記載の発現カセット。

[請求項6] 一本鎖抗体が、抗ＰＤ－１抗体であることを特徴とする請求項５記載の発現カセット。

[請求項7] 一本鎖抗体が、抗ＣＴＬＡ－４抗体であることを特徴とする請求項５記載の発現カセット。

[請求項8] 請求項１～７のいずれか記載の発現カセットを含むベクター。

[請求項9] 請求項８記載のベクターで形質転換されたビフィドバクテリウム属細菌。

[請求項10] ビフィドバクテリウム・ロンガムである請求項９記載のビフィドバクテリウム属細菌。

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

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

[請求項13] 請求項１２記載の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ。

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

[請求項15] 配列番号１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４及び１１５のいずれかに示されるアミノ酸配列のＣ末端からアミノ酸残基が１０～２９欠損した各アミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド－リンカー連結体。

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