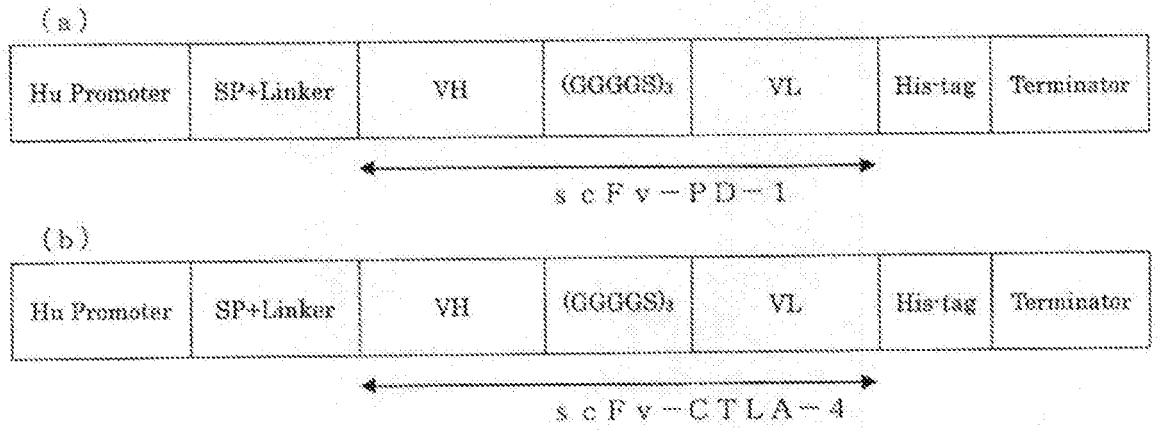
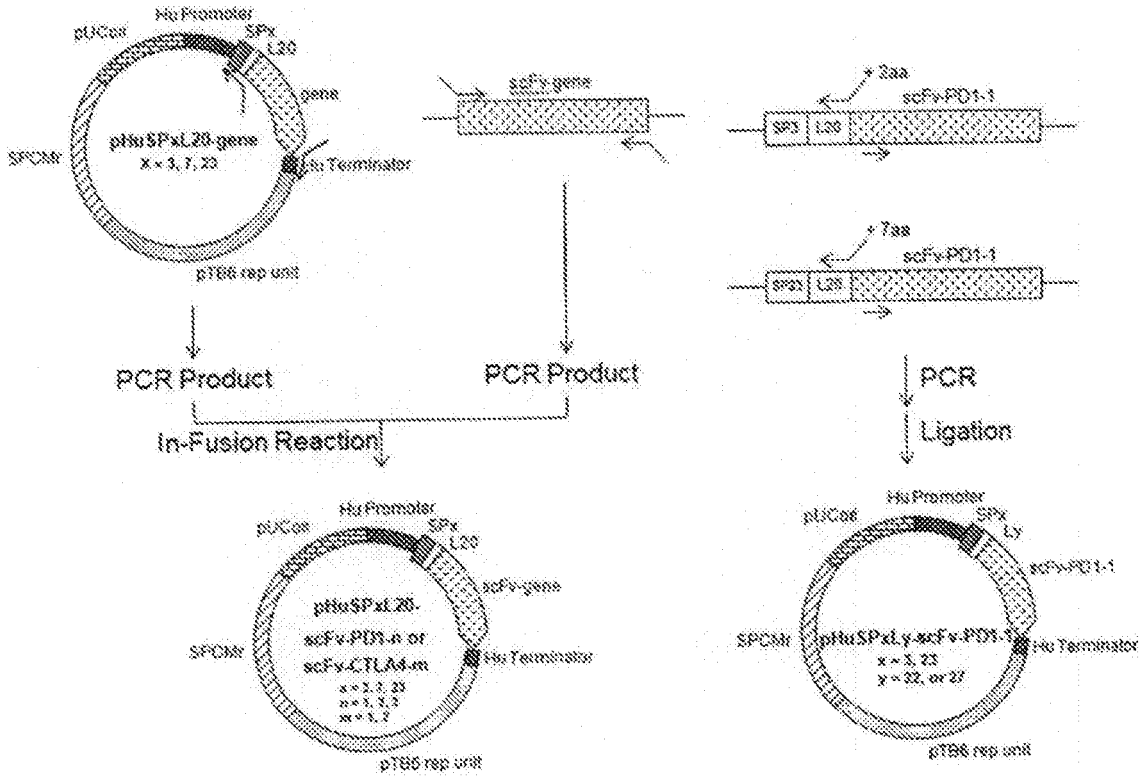
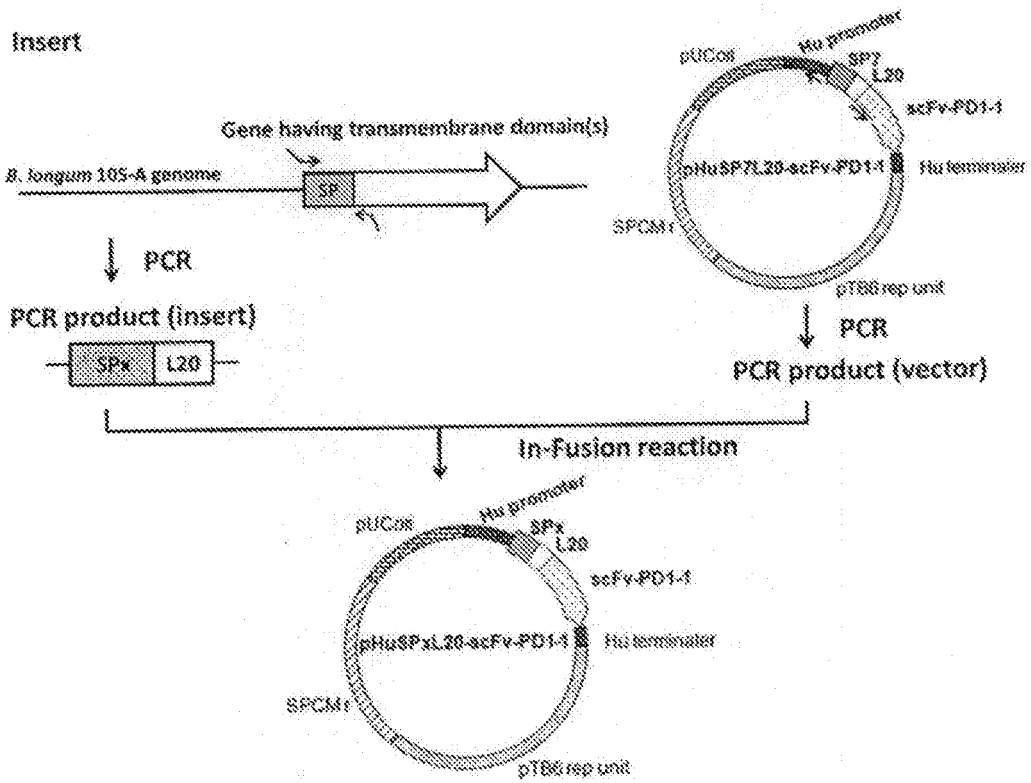
[図1]


(a)
Hu Promoter
SP+Linker
VH
(GGGGS)3
VL
His-tag
Terminator
scFv-PD-1
(b)
Hu Promoter
SP+Linker
VH
(GGGGS)3
VL
His-tag
Terminator
scFv-CTLA-4

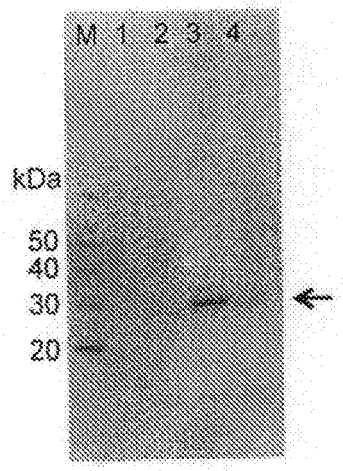
[図2]


pUCori
Hu Promoter
SPx
L20
gene
pHuSPxL20-gene
x = 3, 7, 23
SPCMr
Hu Terminator
pTB6 rep unit
scFv-gene
+ 2aa
scFv-PD1-1
SP3
L20
+ 7aa
scFv-PD1-1
PCR Product
PCR Product
In-Fusion Reaction
PCR
Ligation
pHuSPxL20-
scFv-PD1-n or
scFv-CTLA4-m
Ly
pHuSPxLy-scFv-PD1-1
x = 3, 23
y = 22, or 27

[図3]

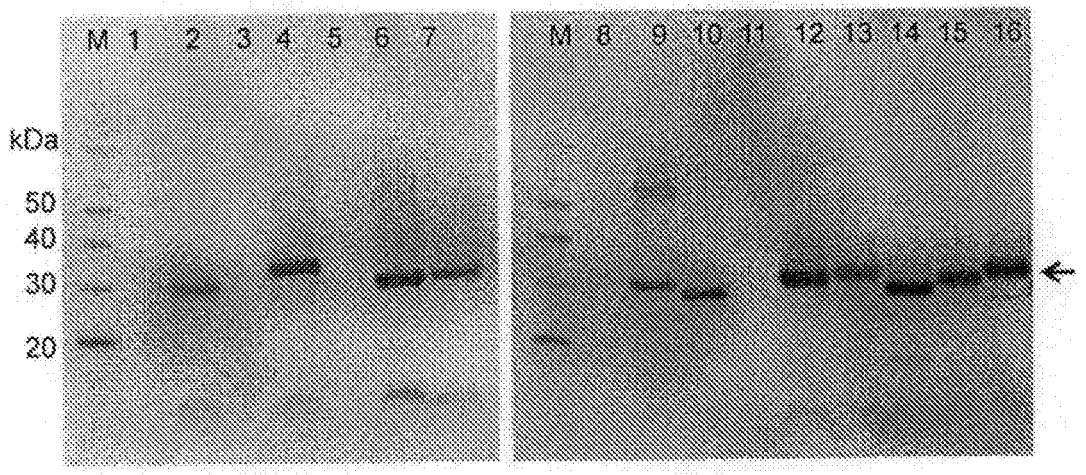


[図4]



レーンM：マーカー
レーン１：陰性コントロール
レーン２：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ３Ｌ３２－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株
レーン３：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株
レーン４：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ２３Ｌ２７－ｓｃＦｖ－ＰＤ－１－１株

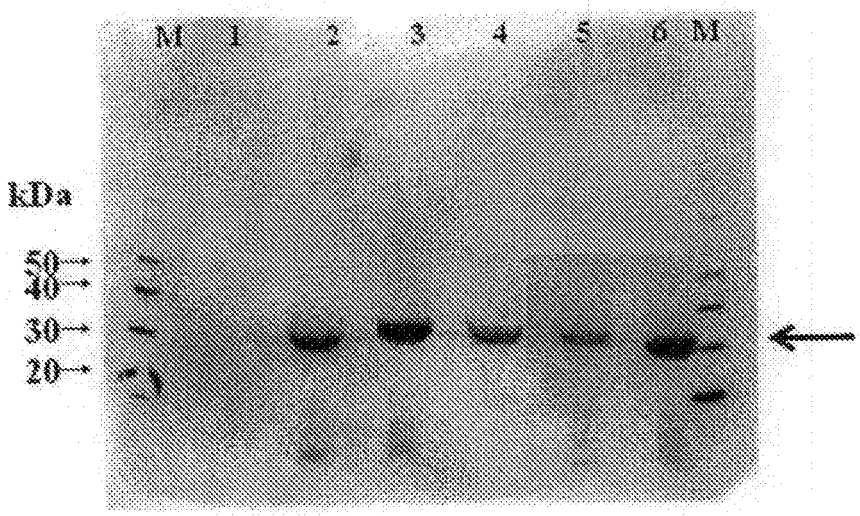
[図5]



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

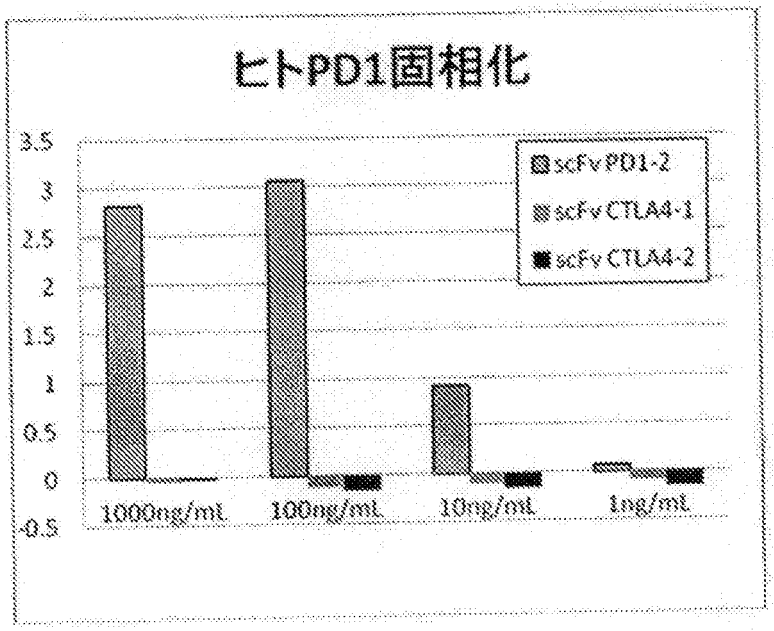
レーン１、８：陰性コントロール（ｐＢＥシャトル）
レーン２：ＳＰ７Ｌ２０
レーン３：ＳＰ４２Ｌ２０
レーン４：ＳＰ４５Ｌ２０
レーン５：ＳＰ４８Ｌ２０
レーン６：ＳＰ５０Ｌ２０
レーン７：ＳＰ５２Ｌ２０
レーン９：ＳＰ５５Ｌ２０
レーン１０：ＳＰ５８Ｌ２０
レーン１１：ＳＰ６２Ｌ２０
レーン１２：ＳＰ６４Ｌ２０
レーン１３：ＳＰ６６Ｌ２０
レーン１４：ＳＰ６７Ｌ２０
レーン１５：ＳＰ６８Ｌ２０
レーン１６：ＳＰ６９Ｌ２０

[図6]

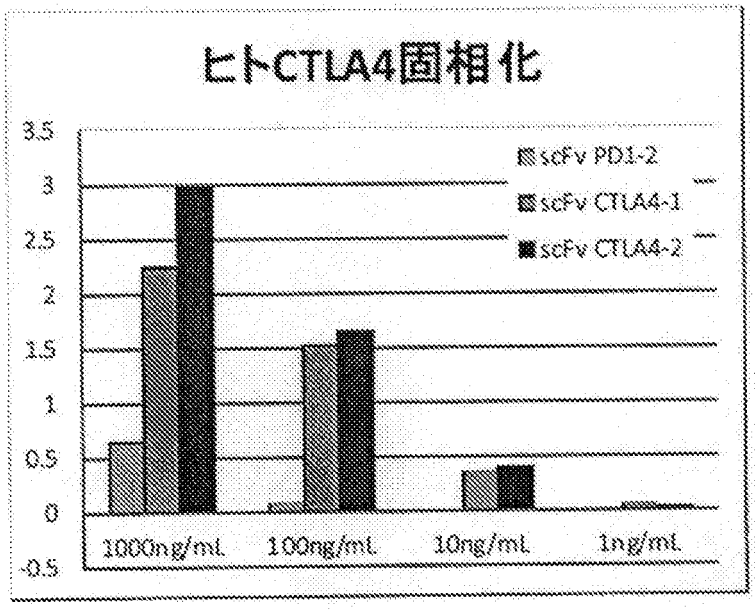


レーン１：陰性コントロール（ｐＢＥシャトル株）
レーン２：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ＰＤ－１－１株
レーン３：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ＰＤ－１－２株
レーン４：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ＰＤ－１－３株
レーン５：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ＣＴＬＡ－４－１株
レーン６：ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＨｕＳＰ７Ｌ２０－ＣＴＬＡ－４－２株
Ｍ　　：分子量マーカー

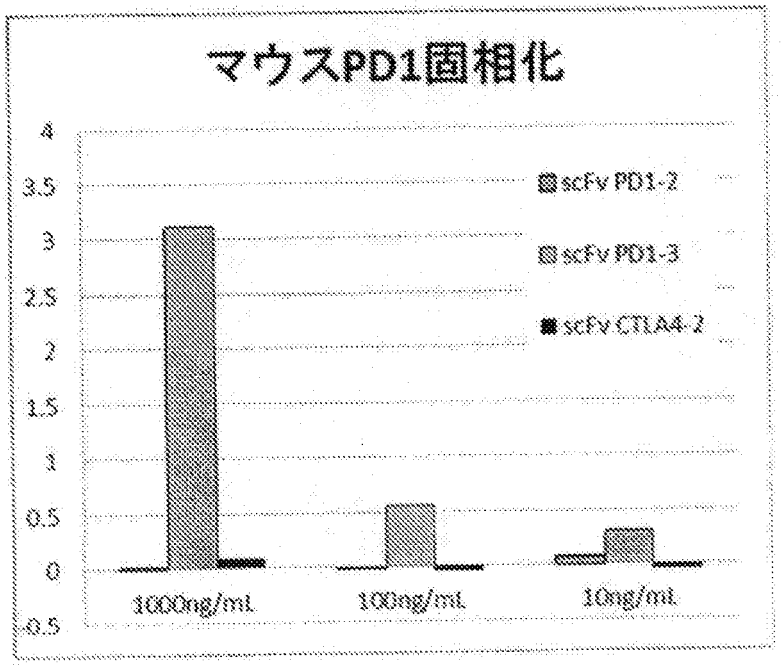
[図7]



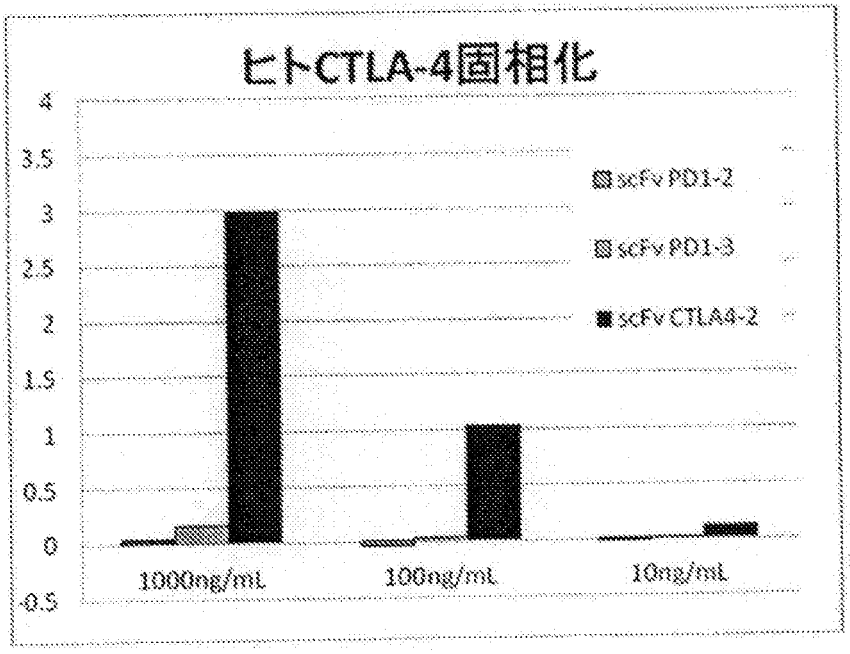
[図8]


ヒトCTLA4固相化
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
scFv PD1-2
scFv CTLA4-1
scFv CTLA4-2
1000ng/mL
100ng/mL
10ng/mL
1ng/mL

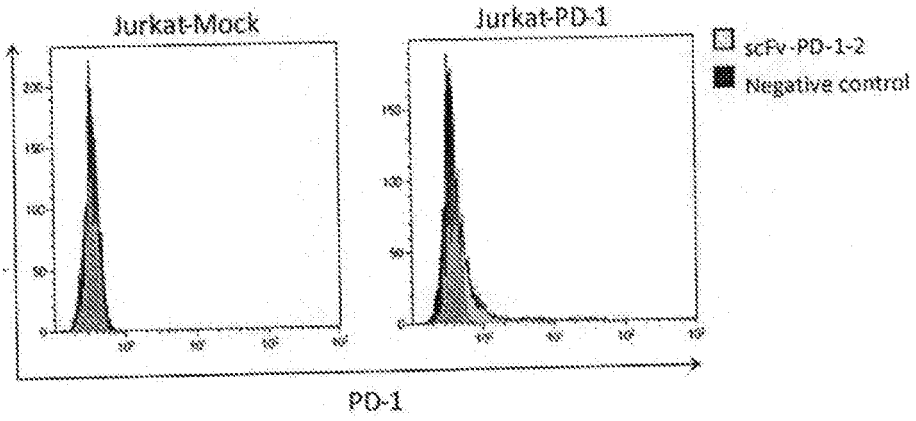
[図9]


マウスPD1固相化
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
scFv PD1-2
scFv PD1-3
scFv CTLA4-2
1000ng/mL
100ng/mL
10ng/mL

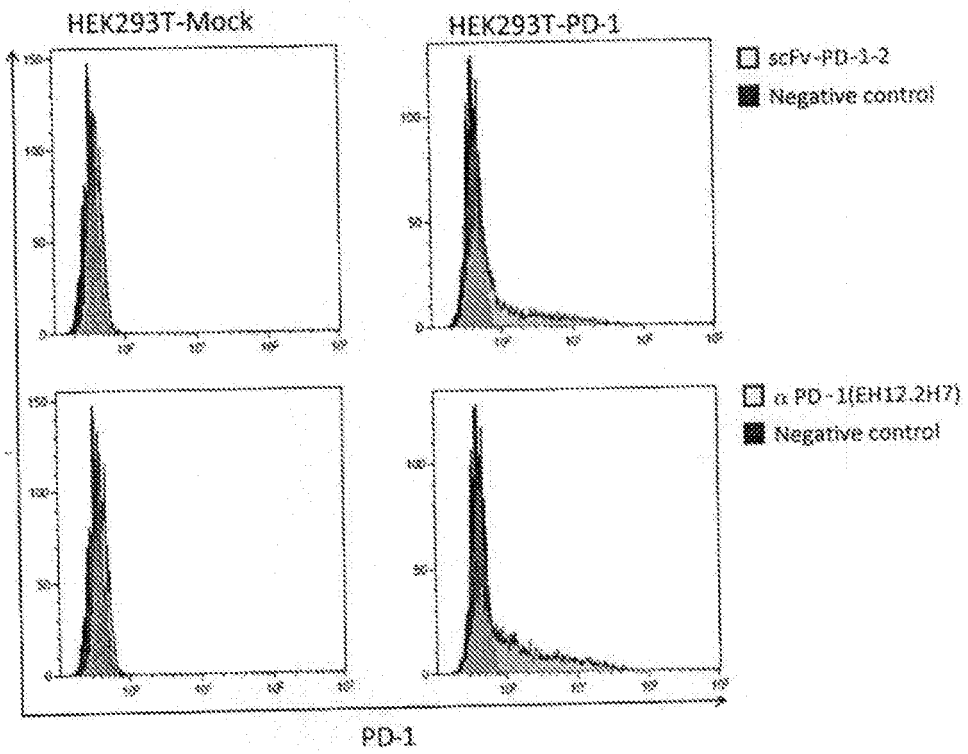
[図10]


ヒトCTLA-4固相化
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
scFv PD1-2
scFv PD1-3
scFv CTLA4-2
1000ng/mL
100ng/mL
10ng/mL

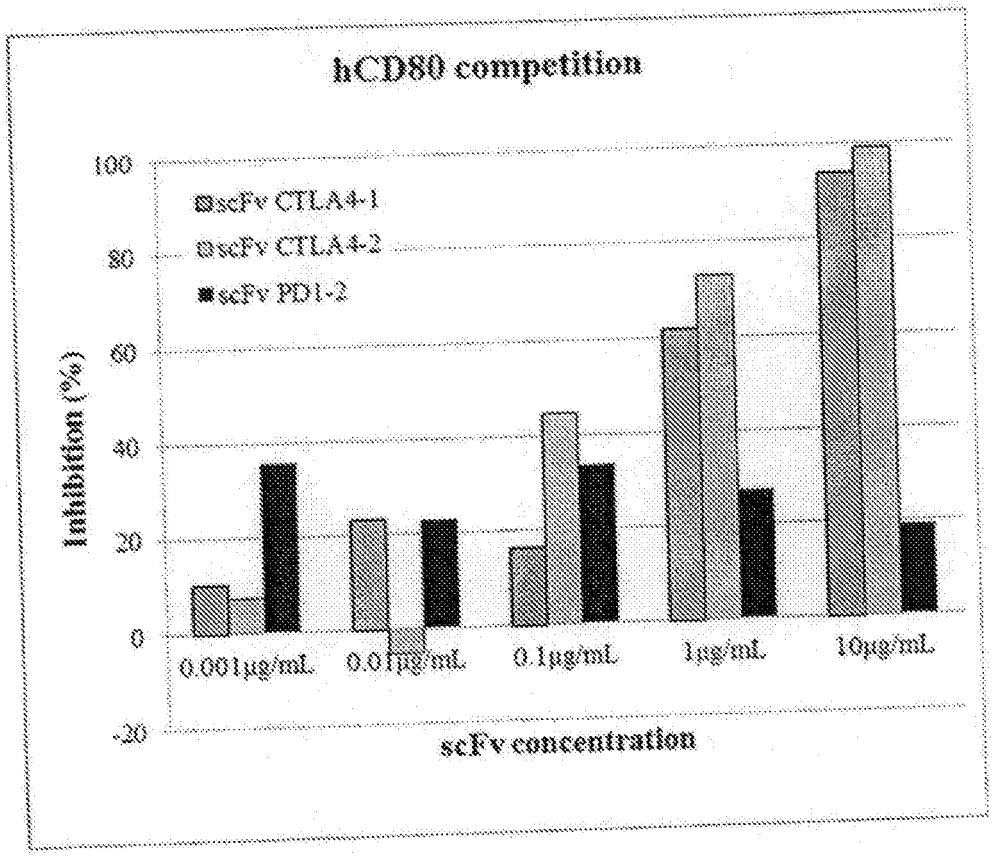
[図11]


Jurkat-Mock
Jurkat-PD-1
scFv-PD-1-2
Negative control
PD-1

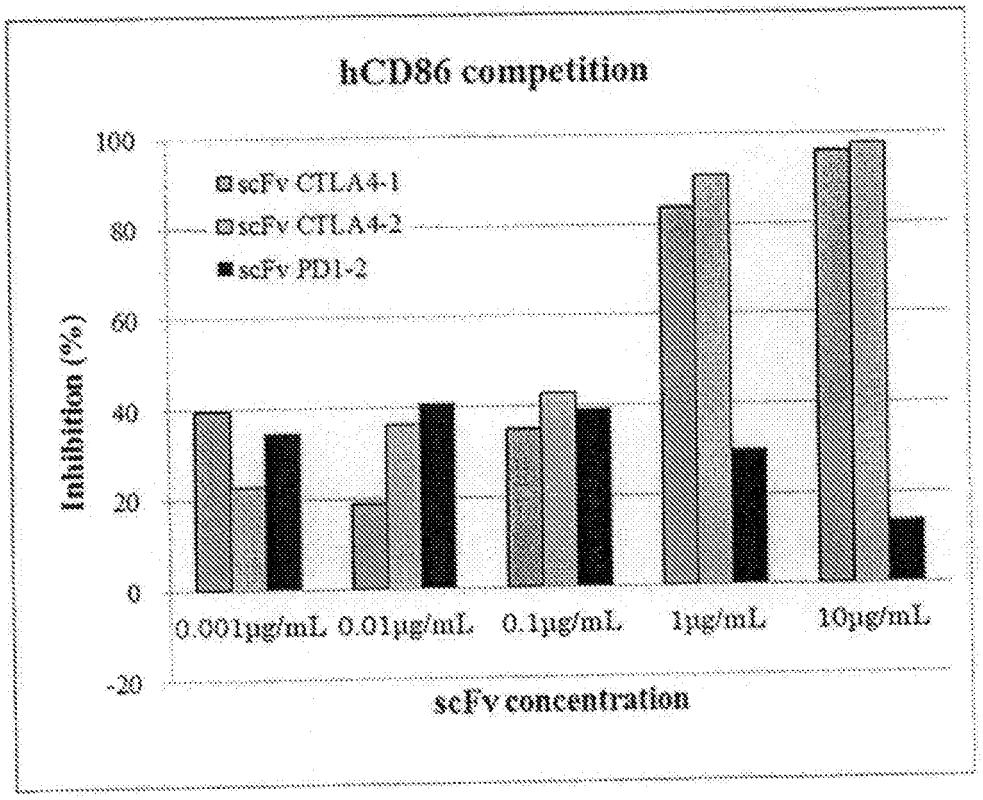
[図12]


HEK293T-Mock
HEK293T-PD-1
scFv-PD-1-2
Negative control
α PD-1(EH12.2H7)
Negative control
PD-1

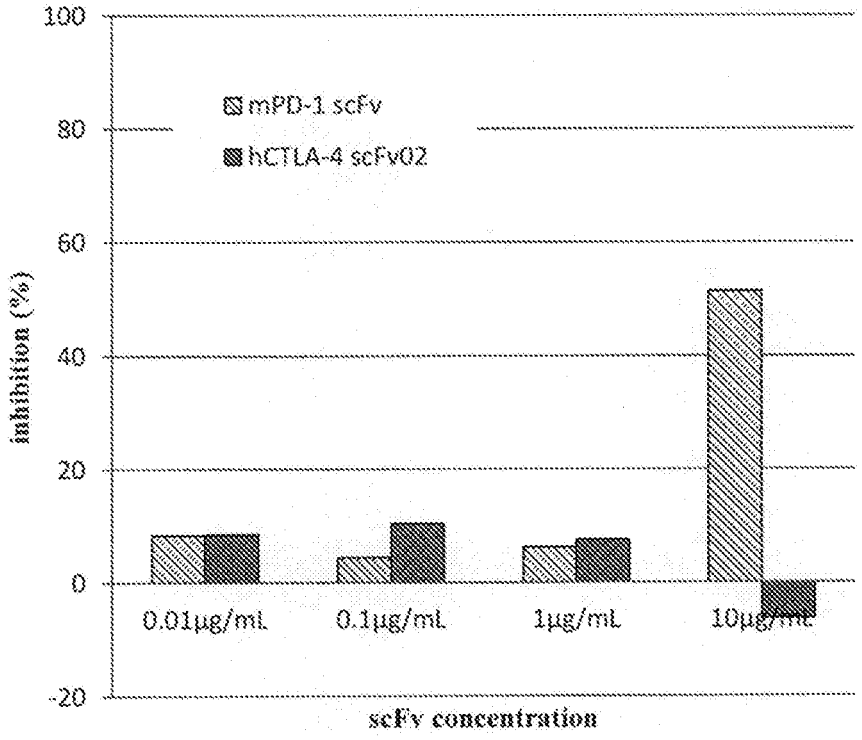
[図13]


hCD80 competition
scFv CTLA4-1
scFv CTLA4-2
scFv PD1-2
Inhibition (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0.001μg/mL
0.01μg/mL
0.1μg/mL
1μg/mL
10μg/mL
scFv concentration

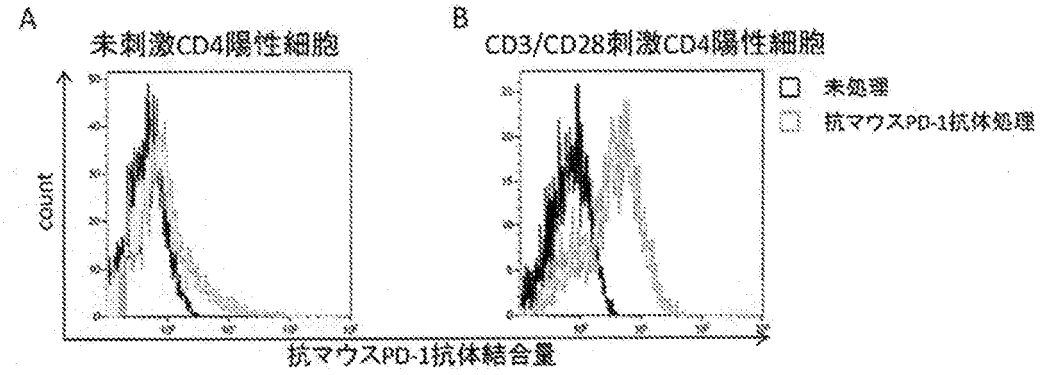
[図14]


hCD86 competition
100
80
60
40
20
0
-20
Inhibition (%)
scFv CTLA4-1
scFv CTLA4-2
scFv PD1-2
0.001μg/mL
0.01μg/mL
0.1μg/mL
1μg/mL
10μg/mL
scFv concentration

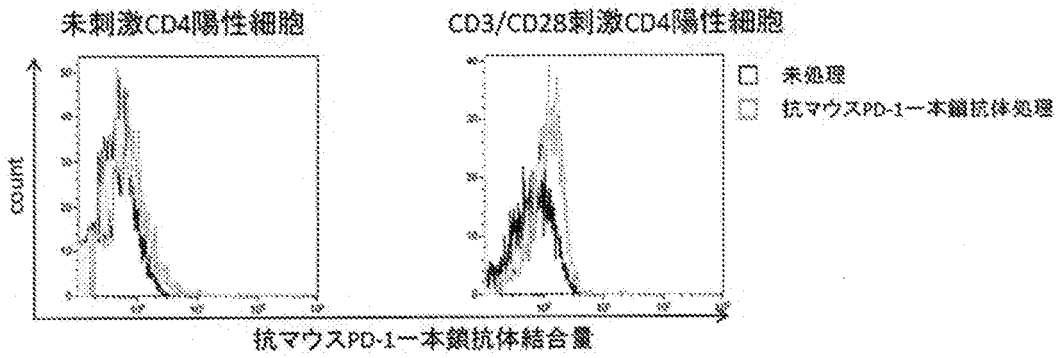
[図15]


100
80
60
40
20
0
-20
inhibition (%)
mPD-1 scFv
hCTLA-4 scFv02
0.01μg/mL
0.1μg/mL
1μg/mL
10μg/mL
scFv concentration

[図16]

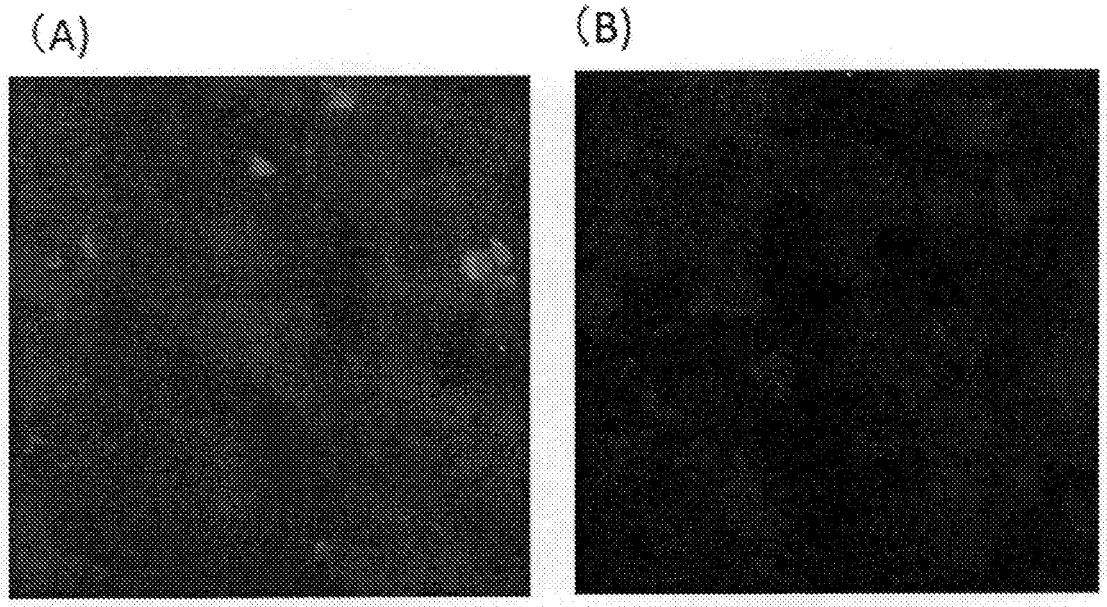


CD4 陽性 T 細胞への CD3/CD28 刺激による mPD-1 の発現誘導
(フローサイトメトリー解析)
A. 未刺激 CD4 陽性細胞に抗マウス PD-1 抗体(□)を反応させ FITC で検出した。
B. CD3/CD28 刺激 CD 陽性細胞に抗マウス PD-1 抗体(□)を反応させ FITC で検出した。



抗マウス PD-1 一本鎖抗体の CD3 及び CD28 刺激 CD4 陽性細胞への結合
(フローサイトメトリー解析)
C. 未刺激 CD4 陽性細胞に抗マウス PD-1 一本鎖抗体(□)を反応させその His に対して Alexa 488-抗 His-tag 抗体を反応させ検出した。
D. CD3/CD28 刺激 CD 陽性細胞に抗マウス PD-1 一本鎖抗体(□)を反応させその His に対して Alexa 488-抗 His-tag 抗体を反応させ検出した

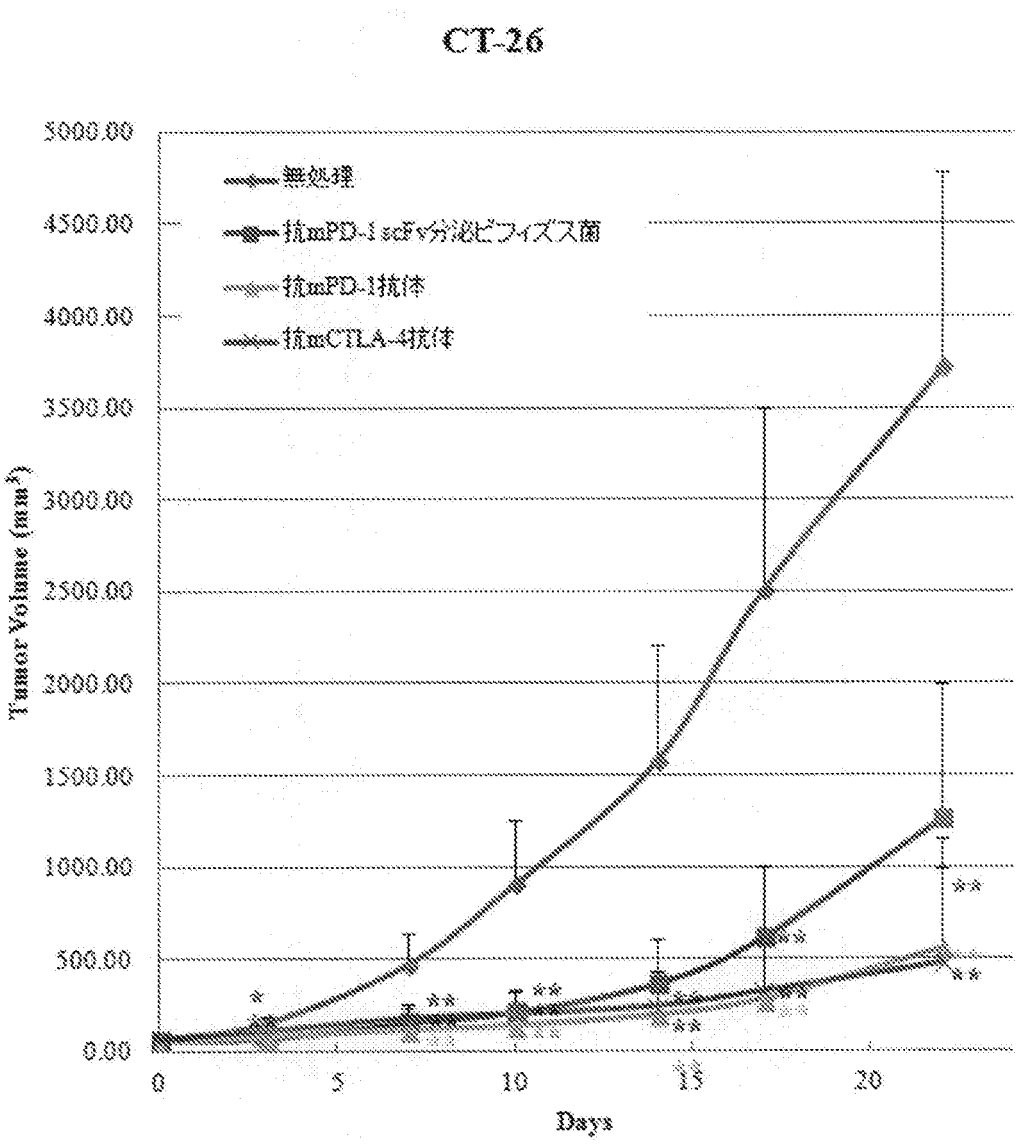
[図17]



A: 抗マウス PD-1 一本鎖抗体分泌ビフィズス菌投与マウスの腫瘍組織

B: 無処理マウスの腫瘍組織

[図18]

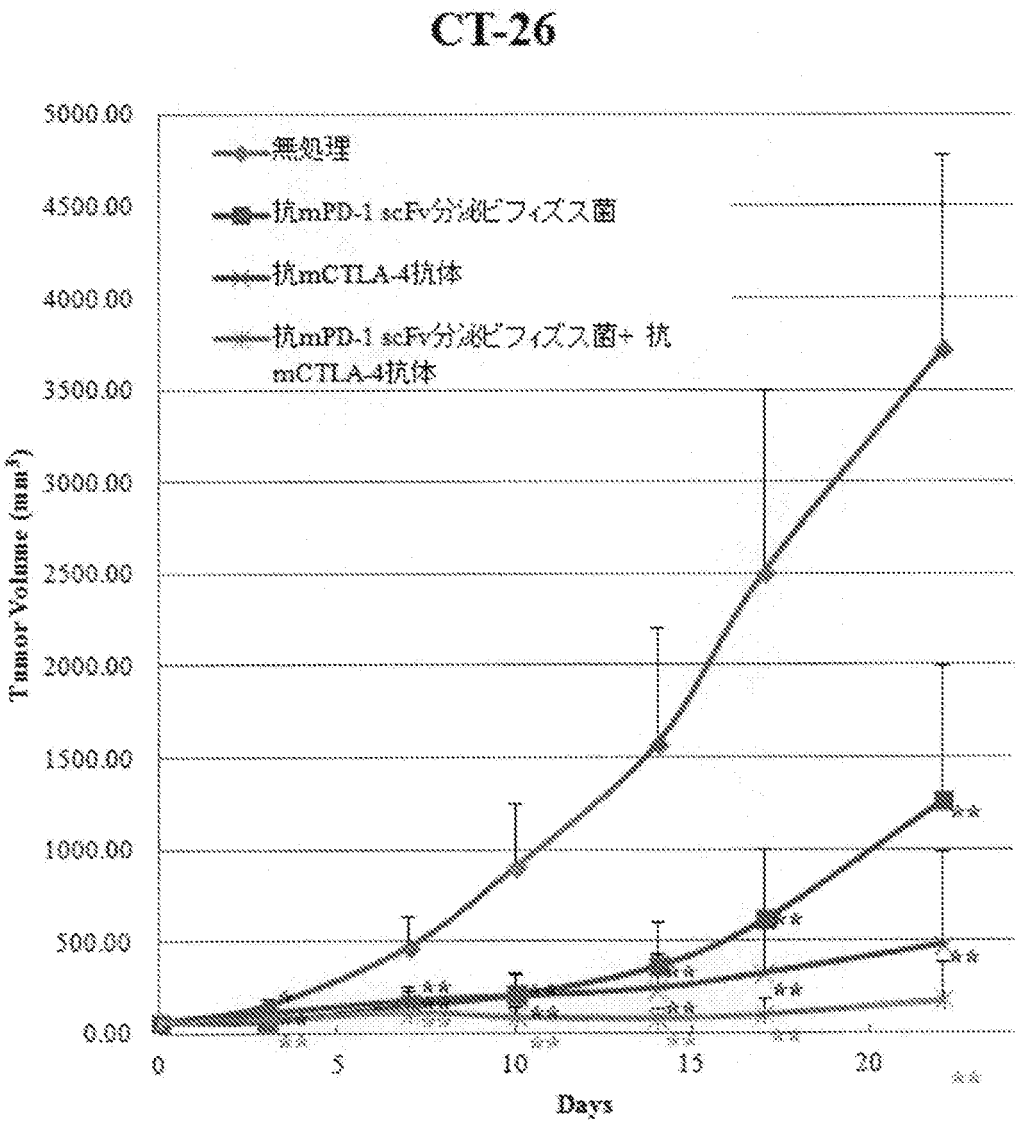


The mean values + S.D. of seven mice.

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

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

[図19]

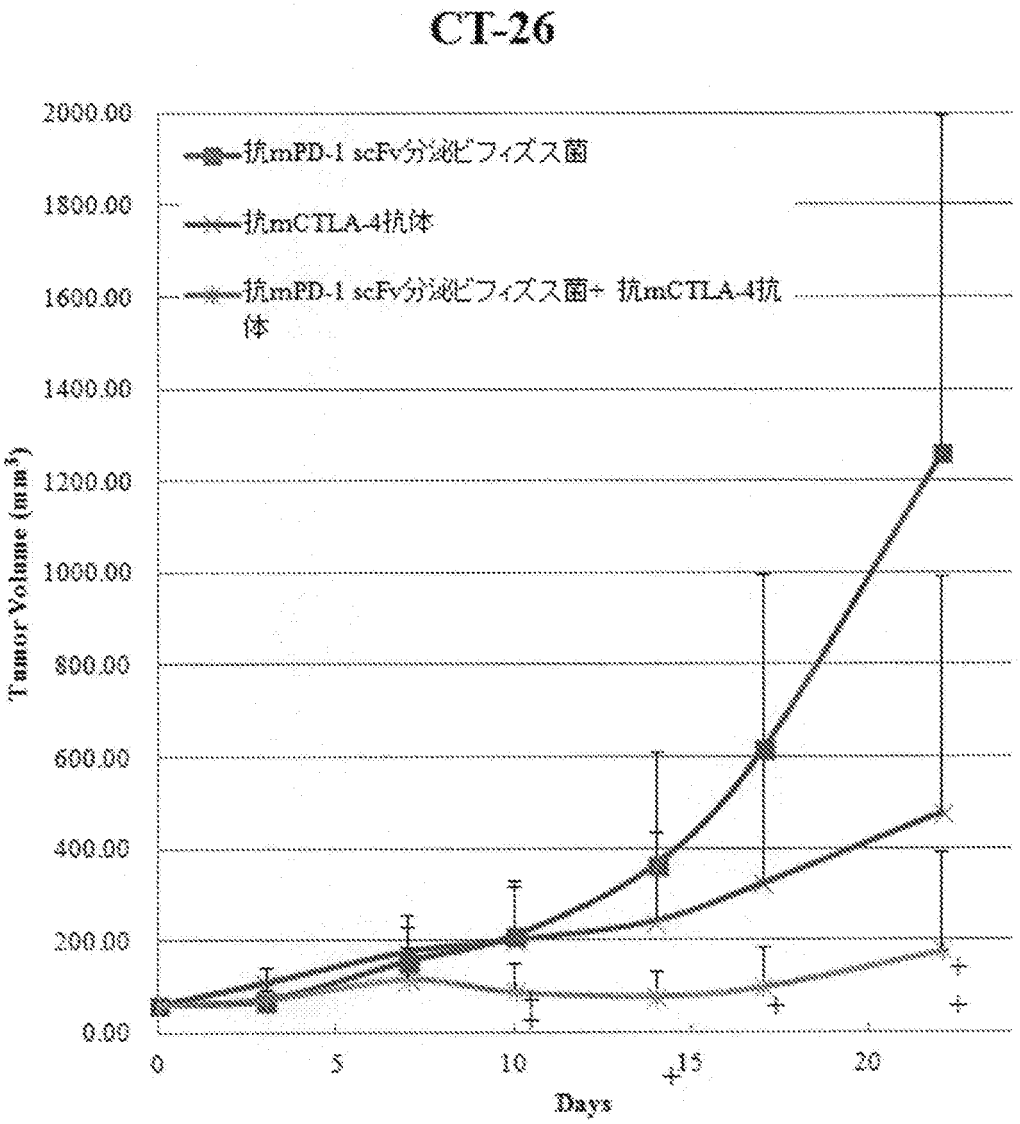


The mean values + S.D. of seven or six mice.

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

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

[図20]



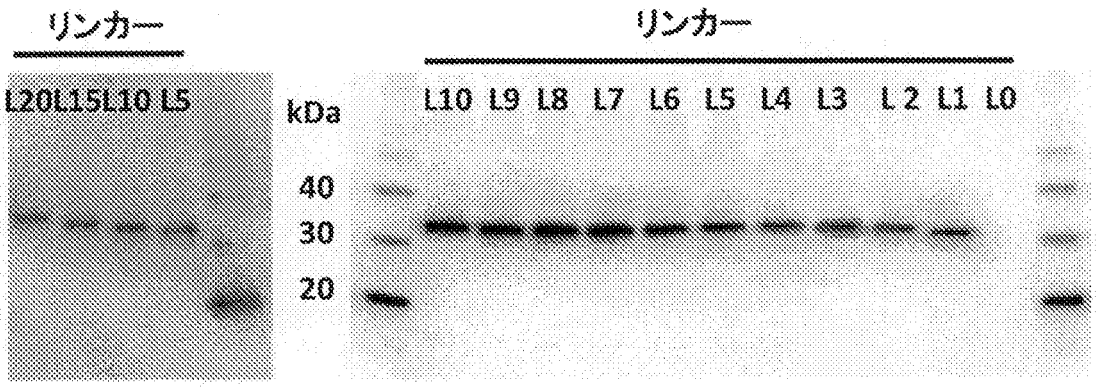
The mean values + S.D. of seven or six animals

+: P value < 0.05 (vs combination treatment)

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

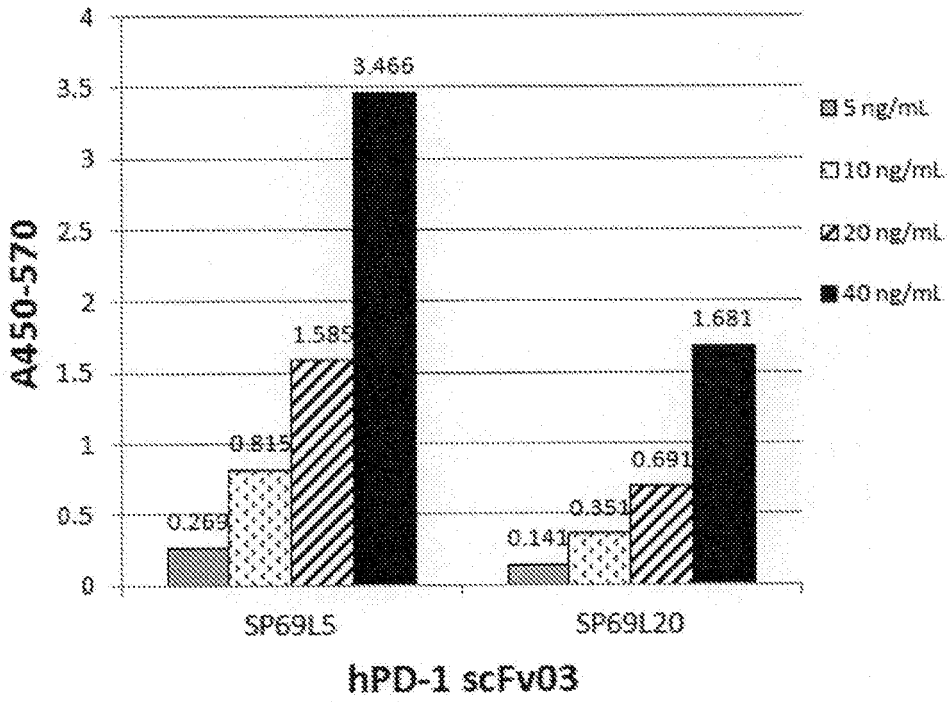
[図21]

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

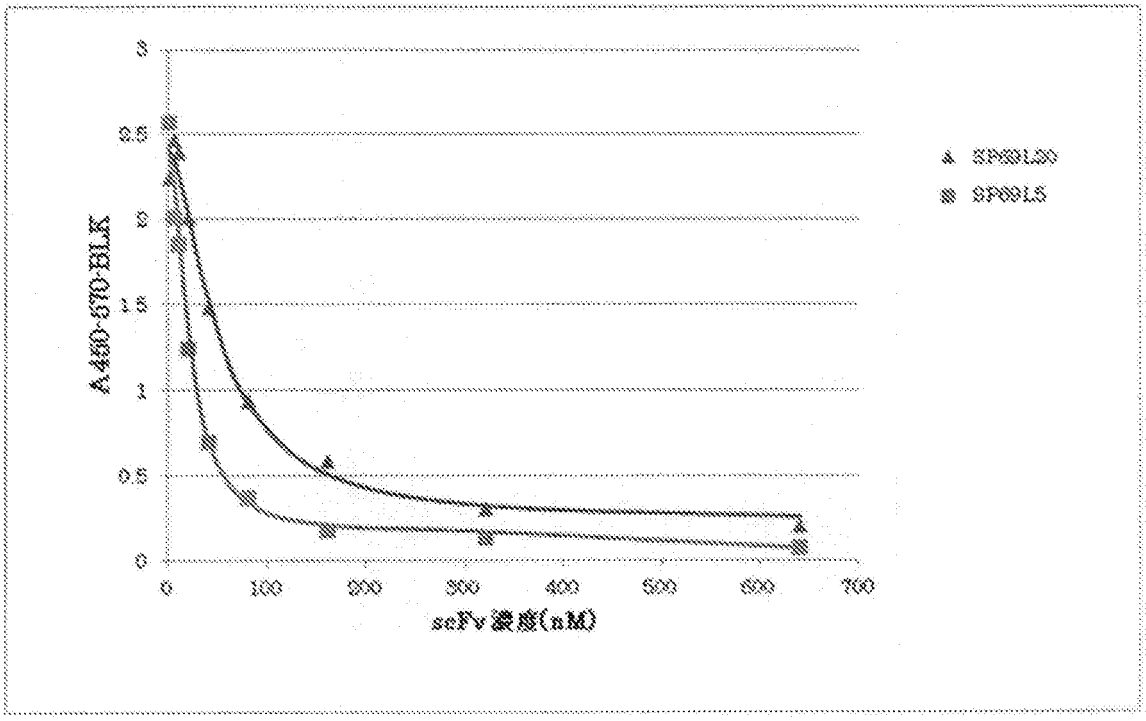


ビフィドバクテリウム属細菌培養上清中に分泌された各リンカー長の抗 hPD-1 scFv03 抗体のウェスタン解析

[図22]



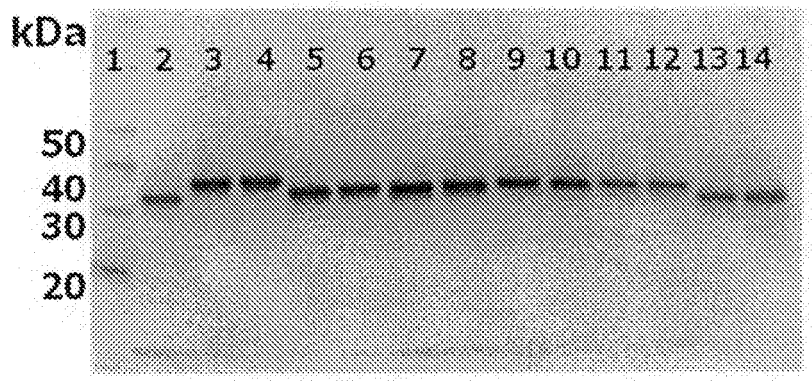
[図23]


A460-670-BLK
scFv濃度(nM)
0
100
200
300
400
500
600
700
0.5
SPG0L50
SPG0L5

[図24]

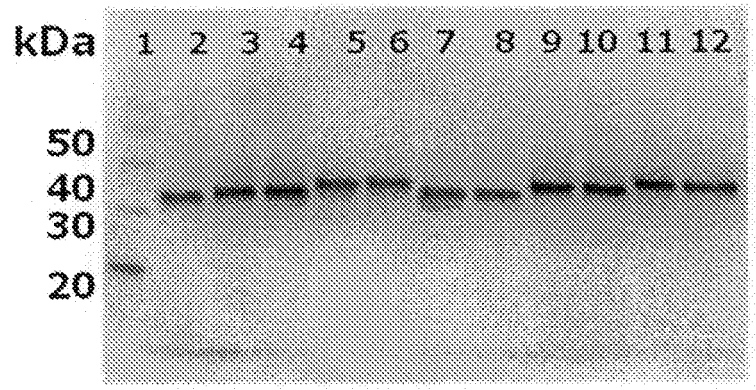
(a)

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



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

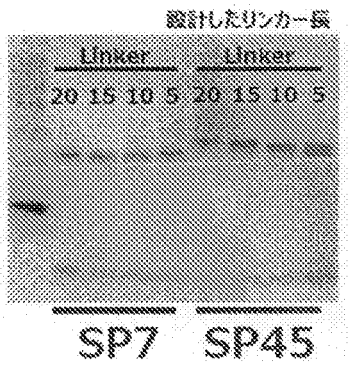
(b)



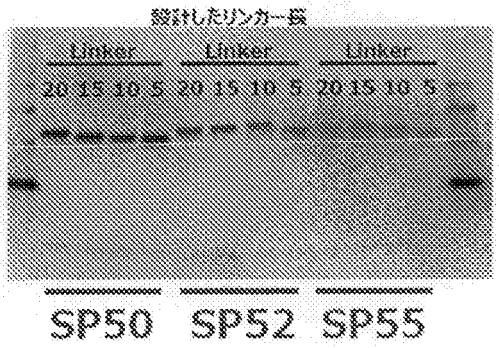
1: Marker
2: SP7
3: SP64 #1
4: SP64 #2
5: SP66 #1
6: SP66 #2
7: SP67 #1
8: SP67 #2
9: SP68 #1
10: SP68 #2
11: SP69 #1
12: SP69 #2

[図25]

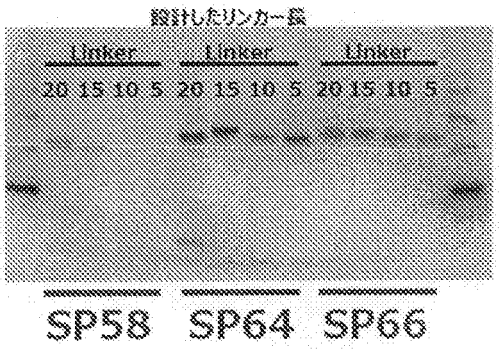
(a)


設計したリンカー長
Linker
Linker
20 15 10 5 20 15 10 5
SP7
SP45

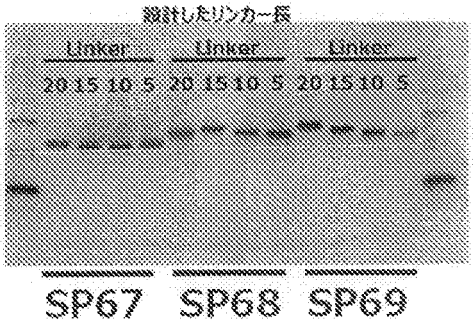
(b)


設計したリンカー長
Linker
Linker
Linker
20 15 10 5 20 15 10 5 20 15 10 5
SP50
SP52
SP55

(c)

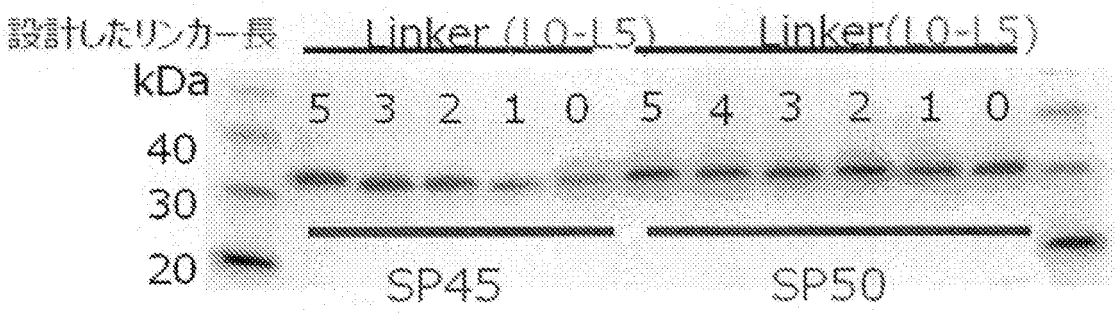

設計したリンカー長
Linker
Linker
Linker
20 15 10 5 20 15 10 5 20 15 10 5
SP58
SP64
SP66

(d)

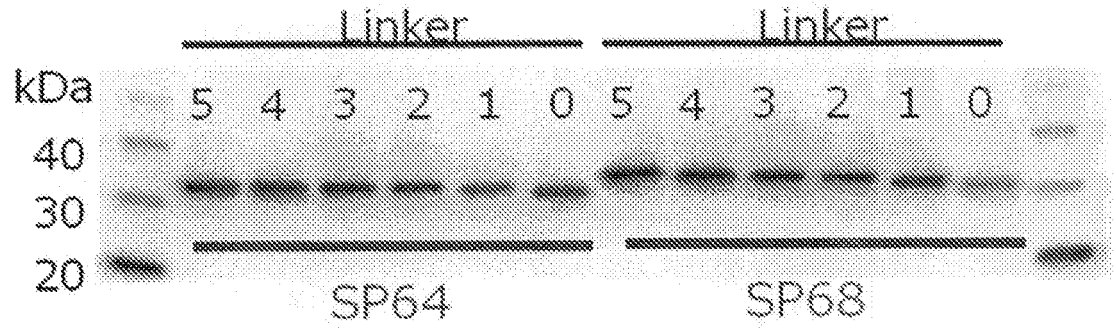

設計したリンカー長
Linker
Linker
Linker
20 15 10 5 20 15 10 5 20 15 10 5
SP67
SP68
SP69

[図26]

(a)


設計したリンカー長
Linker (L0-L5)
Linker(L0-L5)
kDa
5 3 2 1 0 5 4 3 2 1 0
40
30
20
SP45
SP50

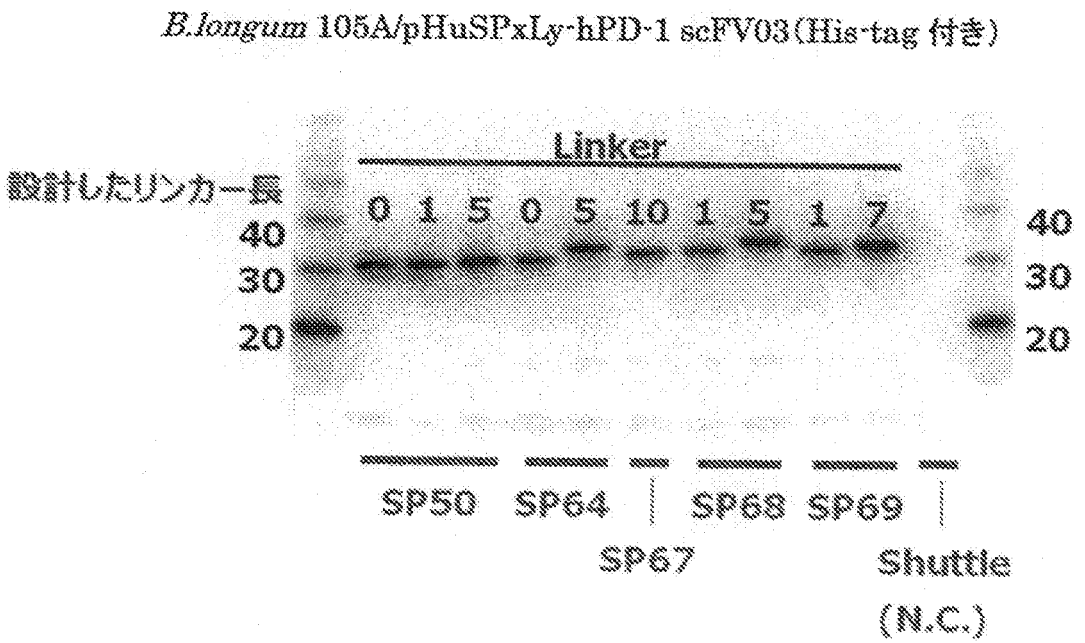
(b)


Linker
Linker
kDa
5 4 3 2 1 0 5 4 3 2 1 0
40
30
20
SP64
SP68

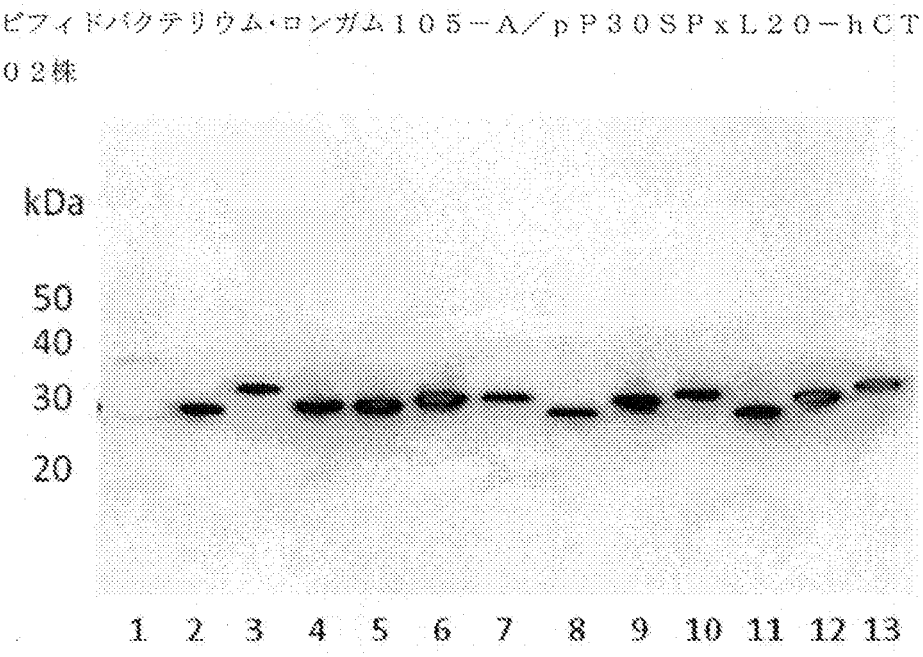
(c)


Linker(L0-L10)
kDa
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
40
30
20
SP69

[図27]


B.longum 105A/pHuSPxLy-hPD-1 scFV03(His-tag 付き)
Linker
設計したリンカー長
0 1 5 0 5 10 1 5 1 7
40
30
20
SP50
SP64
SP67
SP68
SP69
Shuttle
(N.C.)

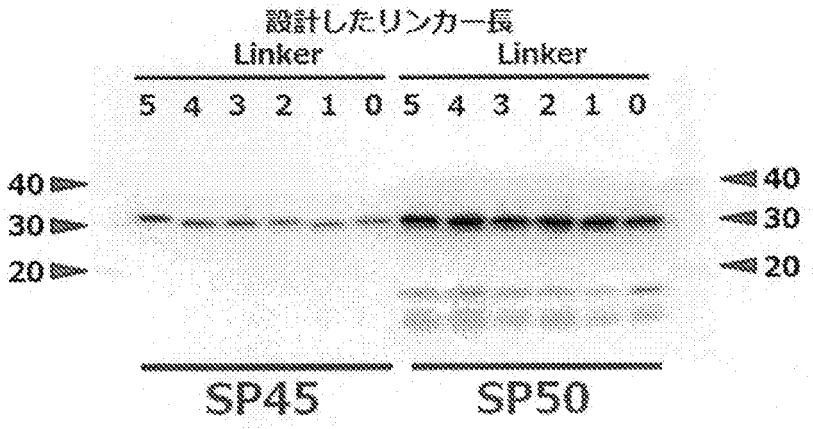
[図28]


ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＰ３０ＳＰｘＬ２０－ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２株
kDa
50
40
30
20
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
1: Marker
2: SP7
3: SP45
4:
5: SP50
6: SP52
7: SP55
8: SP58
9: SP64
10: SP66
11: SP67
12: SP68
13: SP69

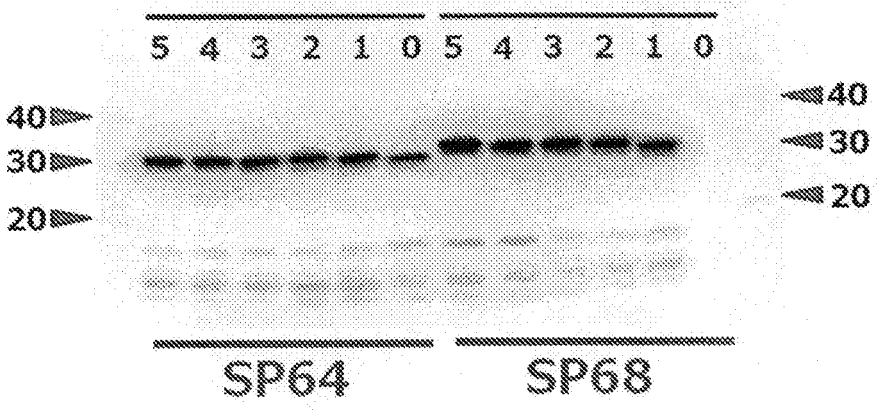
[図29]

ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ／ｐＰ３０ＳＰｘＬｙ－ｈＣＴＬＡ－４ｓｃＦｖ０２株(FLAG-tag付き)

(a)



(b)



(c)

