(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-535271
(P2018-535271A)
(43)公表日　平成30年11月29日(2018.11.29)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 39/385	*(2006.01)*	A61K	39/385	4C085
A61K 39/39	*(2006.01)*	A61K	39/39	4H045
A61P 37/04	*(2006.01)*	A61P	37/04	
C12N 15/117	*(2010.01)*	C12N	15/117 ZNAZ	
C07K 7/06	*(2006.01)*	C07K	7/06	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 49 頁）

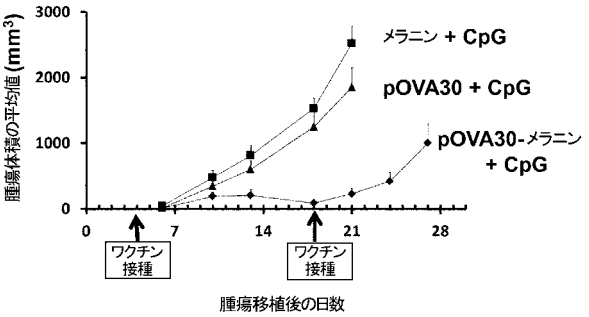
(21)出願番号　特願2018-546753 (P2018-546753)
(86)(22)出願日　平成28年11月25日 (2016.11.25)
(85)翻訳文提出日　平成30年7月5日 (2018.7.5)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/078794
(87)国際公開番号　WO2017/089529
(87)国際公開日　平成29年6月1日 (2017.6.1)
(31)優先権主張番号　15306887.9
(32)優先日　平成27年11月27日 (2015.11.27)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　504006434
アシスタンス　パブリック－ホピトー　デ　パリ
フランス国　パリ　アベニュー　ビクトリア　３
(71)出願人　518184225
ユニベルシテ　パリ　１３
フランス共和国　９３４３０　ヴィルタヌーズ　アヴニュー　ジャン－バティスト　クレマン　９９
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫賦活組成物

(57)【要約】
本発明は、免疫賦活組成物としての、抗原と複合体を形成した、メラニンの使用に関する。



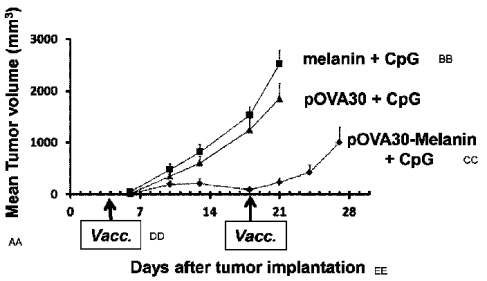


Figure 15

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原と複合体を形成したメラニン高分子を含む、免疫賦活組成物。
【請求項２】
メラニンが可溶性メラニンである、請求項1記載の免疫賦活組成物。
【請求項３】
抗原の存在下で、メラニン前駆体を重合することによって得られやすい、請求項1または2記載の免疫賦活組成物。
【請求項４】
重合が、メラニン前駆体および抗原を酸化剤に曝露することによって実施される、請求項3記載の免疫賦活組成物。
【請求項５】
抗原およびメラニン前駆体が、重合前に共有結合している、請求項3または4記載の免疫賦活組成物。
【請求項６】
抗原およびメラニン前駆体が、重合前に共有結合していない、請求項3または4記載の免疫賦活組成物。
【請求項７】
メラニン前駆体が、L-ドパ、L-チロシン、D-ドパ、6－ヒドロキシ-ドパ、ドパキノン、シクロドパ、ドパクロム、DHICA、DHI、ドパミン-o-キノン、ドパミン、ロイコドパミノクロム（leukodopaminochrome）およびドパミノクロム（dopaminochrome）からなる群において選ばれる、請求項3～6のいずれか一項記載の免疫賦活組成物。
【請求項８】
アジュバントをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項記載の免疫賦活組成物。
【請求項９】
アジュバントが、抗原と複合体を形成したメラニン高分子と複合体を形成している、請求項8項記載の免疫賦活組成物。
【請求項１０】
アジュバントが、抗原と複合体を形成したメラニン高分子と複合体を形成していない、請求項8項記載の免疫賦活組成物。
【請求項１１】
アジュバントが、ミョウバン、エマルジョンPRRリガンド、TLR3およびRLRリガンド、TLR4リガンド、TLR5リガンド、TLR7/8リガンド、TLR9リガンド、特にポリI:CおよびCpG ODNからなる群において選択される、請求項8～10のいずれか一項記載の免疫賦活組成物。
【請求項１２】
抗原が、MHCエピトープおよびB細胞エピトープからなる群において選ばれる少なくとも1つのエピトープを含む、請求項1～11のいずれか一項記載の免疫賦活組成物。
【請求項１３】
宿主に投与されたときに、抗原に対する免疫応答を引き起こすための免疫賦活組成物の調製のための、メラニンまたはメラニン前駆体の使用。
【請求項１４】
インビボまたはインビトロで標的抗原に対する免疫応答を増加させるまたは引き起こすための使用のための、メラニンまたはメラニン前駆体。
【請求項１５】
標的抗原を発現している細胞に関係する疾患から動物を保護するためのワクチンとしての使用のためのメラニンおよび標的抗原を含む、免疫賦活組成物。
【請求項１６】
以下の工程：
(a)メラニン前駆体および抗原を含む組成物を提供する工程；
(b)メラニン前駆体の重合を誘導する工程

を含む、免疫賦活組成物を得るための方法であって、それによって、患者に投与した場合またはインビトロで細胞を培養した場合に、抗原に対する免疫応答を引き起こし得る免疫賦活組成物を得る、方法。

【請求項１７】

重合が、酸化重合である、請求項16記載の方法。

【請求項１８】

工程(a)の組成物における抗原およびメラニン前駆体が共有結合している、請求項16または17記載の方法。

【請求項１９】

工程(a)の組成物における抗原およびメラニン前駆体が共有結合していない、請求項16または17記載の方法。

【請求項２０】

メラニン前駆体が、L-ドパ、L-チロシン、D-ドパ、6－ヒドロキシ-ドパ、ドパキノン、シクロドパ、ドパクロム、DHICA、DHI、ドパミン-o-キノン、ドパミン、ロイコドパミノクロム（leukodopaminochrome）およびドパミノクロム（dopaminochrome）からなる群において選ばれる、請求項16～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項２１】

(a)の組成物が、アジュバントをさらに含有する、請求項16～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項２２】

アジュバントが、工程(b)の後に得られた組成物に添加される、請求項16～20のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、免疫学の分野に関し、特に、アジュバント、すなわち抗原の免疫原性特性を増強する成分の分野に関し、予防または治療にかかわらず、特にワクチンの分野において有益である。

【背景技術】

【０００２】

これまでのワクチンは、弱毒化した生病原体、全不活性化生物、または改変された毒素に基づいていた。潜在的副作用を制限するため、最近の開発では、概して30～60個のアミノ酸で構成されているが、8個のアミノ酸と同様の短さの１つのエピトープに限定され得るサブユニットワクチンに焦点が当てられている。抗原のごく一部分の使用は、抗原の所望の部分に反した免疫応答に焦点を当てることによる潜在的な交差反応のリスクを制限する。しかしながら、サブユニットワクチン、および特にペプチドサブユニットワクチンは、危険信号としてふるまう病原体由来分子の欠如のため、しばしば免疫原性が乏しい。サブユニットワクチンは、したがって、効果があるように追加のアジュバントを必要とする(Fujita et al, Chem Cent J. 2011;5(1):48; Azmi et al, Hum Vaccin Immunother. 2014;10(3):778-96)。

【０００３】

アジュバントが免疫増強効果を発揮するメカニズムは多様であり(Siegrist 2007, Vaccines, Plotkin, Orenstein & Offit, Elsevier; Azmi et al 2014, op. cit.)、特に、下記の活動に依存し得る：

－ 最適な方法における免疫システムへの抗原の提示；たとえば、リンパ節への抗原の移行によるもの、分解に対する抗原への物理的防護および／または抗原の長期送達を許容する貯蔵効果を提供することによるもの、または免疫細胞内への抗原の取込みを増加させることによるもの

－ 免疫システム活性化；たとえば、免疫細胞上または免疫細胞内で発現するパターン認識受容体（PRR）を活性化することによるもの。先天性免疫機構のパターン認識受容体（P

RR）は、保存された病原体関連分子パターンおよび危険関連分子パターンを認識する。Toll様受容体（TLR）、ヌクレオチド結合オリゴマー化領域（NOD）様受容体(NLR)、レチノイン酸誘導型遺伝子（RIG）様受容体(RLR)、DNA受容体、スカベンジャー受容体、およびC型レクチン受容体（CLR）といった、いくつかのPRRが同定されている(Siegrist 2007 op. cit.; Conniot et al, Front Chem 2014;2:105)。PRRの活性化は、炎症性サイトカインの産生をもたらすが、適応免疫応答を引き起こす樹状細胞(DC)およびマクロファージといった抗原提示細胞(APC)もまた活性化する(Maisonneuve et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111(34):12294-9)。

【０００４】

いくつかのアジュバントは、Bリンパ球（体液性応答）による抗体分泌、または細胞傷害性Tリンパ球（CTL;CD8 T細胞とも呼ばれる）応答（細胞応答）のいずれか、または両方を活性化する。Bリンパ球は、主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラスII分子によって抗原提示細胞(APC)の表面上に提示された、約15個のアミノ酸から始まるより長いペプチドを認識する。細胞傷害性Tリンパ球は、MHCクラスI分子によって、APC、または標的細胞の表面上に提示された、8～10アミノ酸残基の短いペプチドを認識する。MHCクラスI提示のための主要なプロセシング経路は、細胞質でのタンパク質の分解を伴う。いくつかのケースにおいて、通常MHCクラスIIにより提示される細胞外可溶性抗原またはペプチドがMHCクラスIによって提示され、これは交差提示と呼ばれるプロセスである(Foged et al., Eur J Pharm Sci. 2012 Mar 12;45(4):482-91)。DCによる交差提示のライセンシングは、TLR(主にTLR3、TLR7/8またはTLR9)といった先天的PPRの連結反応を介して、CD4+T細胞(CD40:CD40L 連結反応)によって、または、CD4+T細胞に依存しない方法で開始され得る(Foged et al., op.cit.)。細胞性および体液性免疫応答はいずれも、抗原提示細胞を活性化するために、ヘルパーT細胞(TH細胞;CD4T細胞とも呼ばれる)も必要とする（いわゆる「第2シグナル」）。したがって、ワクチン成分は、通常、少なくとも2つの抗原性のエピトープを含む：抗原特異的B細胞またはCTL応答を引き起こす標的抗原、およびTHエピトープ。集団におけるMHCクラスII遺伝子における数多くの多型を考えると、数多くのMHCクラスIIに結合するいくつかの「遍在する」THエピトープが、ワクチンに含まれるように設計されている(P25、ptt-30、PADRE)。TH細胞は、Bおよび細胞障害性CD8応答を調節するそれらのサイトカインプロファイルおよびそれらの能力にしたがって、系統（Th1、Th2、Th17、…）にさらに細分化される。アジュバントは、Th1またはTh2応答の方へ免疫応答を偏らせることができ、制御性Tリンパ球(Treg)を調節することもできる。たとえば、ヒトのワクチン接種で広く用いられているアルミニウム塩(ミョウバン)は、Th2免疫応答を主に誘導する。対照的に、完全フロイントアジュバント（CFA）、IC31またはポリアルギニンといったカチオン性ペプチド(Schellack et al, Vaccine 24 (2006) 5461-5472; Mitsui et al, J Invest Dermatol. 2006;126(8):1804-12)、熱ショックタンパク質(Moroi et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(7):3485-90)、TLR9アゴニスト、抗原をISCOMS（免疫刺激複合体）またはリポソームに合体したもの(Taneichi et al, J Immunol 2006; 177:2324-2330)との組合せは、Th1プロファイルの方へ免疫応答を偏らせることができる。

【０００５】

あらゆる進展があったにもかかわらず、最新のワクチンはいくつかの制限に直面している。サブユニット抗原は、しばしば免疫原性に乏しい。免疫を引き起こすのに必要とされる抗原の投与量（通常、10～100μgの範囲内）は、特に抗原を製造するのが困難なとき、あるいは需要が生産能力を超えるときは、制限因子となり得る。さらに、細胞外分子は通常、MHCクラスIではなく、MHCクラスIIによって提示されるため、CD8+応答の誘導は、依然として困難な課題のままである。最後に、エマルション、リポソーム、融合分子といったワクチン製剤は、不安定であるか合成が困難であり得、製造コストが法外なものとなることがある。理想的なアジュバントは、したがって、Ag特異的な免疫応答（体液性および細胞性応答の両方）を引き起こすまたは促進するのに効力があり、製造が容易で、毒性がなく、安定であるべきである。

【０００６】

カテコール（ピロカテコールまたはo-ヒドロキシフェノールまたは1,2-ジヒドロキシベンゼンとしても知られる）は、生命において主要な役割を果たしており、神経伝達、メラニン形成、海洋生物学、昆虫におけるメラニン化(Eleftherianos et al, J Innate Immun 2011;3:28-33; Viljakainen, Brief Funct Genomics. 2015;14(6):407-12)、または節足動物の表皮の硬化(Andersen, Insect Biochem Mol Biol. 2010;40(3):166-78)といった、様々な生物学的過程に関与している。

【０００７】

カテコールアミンは、一連の酵素経路によりL-チロシンから合成される神経伝達物質である。最初に、チロシンヒドロキシラーゼが水酸基を除去し、L-ドパ（3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン）を生成する。L-ドパは、L-芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(LADCC)により脱カルボニル化されドパミンを形成する；次いで、ドパミンβヒドロキシラーゼ（DB）およびフェニルエタノールアミン-N-メチル-トランスフェラーゼ(PNMT)というヒドロキシラーゼによって、ノルアドレナリンおよびアドレナリンに異化される(Eisenhofer 2003, FASEB J. 2003;17(10):1248-55)。

【０００８】

カテコールアミンの前駆体としてのそれらの役割に加えて、カテコールは、酸化され得、共有結合または非共有結合のいずれかによって基質／他の分子に強い接着性を有する化合物を生じる。このような酸化過程は、メラニン形成、海洋生物学、昆虫におけるメラニン化、または節足動物の表皮の硬化といった様々な生物学的過程において主要な役割を果たしている。

【０００９】

メラニン合成は、有害で変異原性の紫外線から動物を防護するために、動物において主要な役割を果たしている。昆虫においては、フェノールオキシダーゼ(PO)の活性化は、メラニン化と呼ばれる過程である、外来粒子の封入を可能にする侵入微生物を囲むメラニンの形成も導く(Eleftherianos, 2011, op.cit.; Viljakainen 2015, op. cit.)。一般に、メラニンは、一連の酵素反応および非酵素反応を介したフェノール化合物またはインドール化合物の酸化重合により形成される高分子である(Slominski et al, Physiol Rev. 2004;84(4):1155-228)。L-ドパはメラニンの既知の前駆体である（図1）。しかしながら、メラニンは、異種混交的な化合物であり、4つのタイプのメラニンが類型化されている：

(1)L-ドパの連続的酸化、およびジヒドロキシインドールカルボン酸(DHICA)と5,6-ジヒドロキシインドール(DHI)の共重合体へと主に導かれることにより生成される、ユーメラニン；

(2)グルタチオンまたはシステインとの接合によりL-ドパがシステイン化され、ベンゾチアジンおよびベンゾチアゾールを含むポリマーへと導かれた、フェオメラニン；

(3)脳のカテコールアミン作動性ニューロンの特定の集団において生成される、ニューロメラニン(NM)；

(4)および、数多くの菌類および植物において主に発見され、ジまたはテトラ-ヒドロキシナフタレン、ホモゲンチジン酸、γ-グルタミニル-4-ヒドロキシベンゼン、カテコール、6－ヒドロキシ-ドパ、ジヒドロカフェー酸、カフェー酸、カテキン、ロイコアントシアニジン、3－アミノ-チロシン、4－ヒドロキシフェニル酢酸または他のカテコールといった様々な化合物の酸化または重合によりもたらされる、アロメラニンまたはカテコールメラニン(US Patent 6,576,268; Langfelder et al, Fungal Genet Biol. 2003;38(2):143-58, Sugumaran et al, FEBS Lett. 1989;255(2):345-9)。

【００１０】

メラニンは、したがって、大部分の生物（クモ類はメラニンが検出されていない数少ないグループの1つである）で見られる天然色素群を指すための広範囲で包括的な用語であり、通常、アミノ酸のチロシンの酸化、続いて重合によって生成される。

【００１１】

ウィキペディア(https://en.wikipedia.org/wiki/Melanin)は、メラニンについて、天然色素（すなわち着色物質）であり、アミノ酸チロシンの酸化、続いて重合により生成さ

れると定義している。この酸化は、重要なステップであり、一般に、酵素のチロシナーゼによって仲介され、チロシンをドパに変換する。

【００１２】

News Medical Life Science (http://www.news-medical.net/health/What-is-Melanin.aspx)は、メラニンについて、チロシナーゼによるL-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンの触媒反応を含む様々なステップによる、アミノ酸であるチロシンに由来する複合高分子と定義している。

【００１３】

EP313380においては、メラニンを「種々の野菜（キノコ類）に、動物界（イカ、タコ等）に、そして非常に重要なことにはヒトの皮膚に天然に見い出される広範なスペクトルの紫外線吸収性有機ポリマーの主要な部類に属するものである。これらは、L-チロシンのL-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン（通常、L-ドパと称される）への酵素転化を介して表皮で形成される。文献周知の生物学的経路を通してL-ドパはさらにメラニンへ転化される。」とも定義し、主張している。

【００１４】

http://www.skinwhiteningscience.com/melanin_synthesis_pathways.htmlから、メラニンは、メラニン前駆体の酸化およびそれらのその後の重合の両方を組み合わせた複雑なプロセス（図1にあるとおり）を通して得られることが明らかである。この組合せられたプロセスは、したがって、たとえば、ポリチロシンといったメラニン前駆体の単なる重合とは異なる。

【００１５】

メラニンは、合成的に製造可能であり、チロシンを過酸化水素で酸化して調製されて、たとえばSigma Aldrichにより、販売されている。（http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8631?lang=fr&region=FR）

【００１６】

上記から、メラニンは、メラニン前駆体であるアミノ酸の単なるポリペプチドとは区別され得る、本技術分野で知られ認識されているポリマー色素を意味するものとなる。特に、酸化重合を要せずに得られるポリチロシルは、当業者においてメラニン分子として考えられていない。

【００１７】

メラニン合成は、いくつかの中間化合物、いくつかの酵素を伴い、またpH、カチオン金属の存在、温度により修飾され得る。

【００１８】

中間化合物としては、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-ドパ、ドパキノン、シクロドパ(cyclodopa)、ドパクロム(dopachrome)、キノンメチド、ベンゾチアゾール、ベンゾチアジン、ジヒドロエスクレチン、ジヒドロキシインドールカルボン酸(DHICA)、5,6-ジヒドロキシインドール(DHI)、ドパミン-o-キノン、ドパミンロイコオパミノクロム(Dopamine Leukoopaminochrome)、ドパミノイクロム(dopaminoichrome)、ノルエピネフリン、ノルアデノクロム(noradenochrome)、エピネフリン、アデノクロム(adenochrome)、3-アミノ-チロシン、およびその他が挙げられる。

【００１９】

合成に伴う酵素としては、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、チロシナーゼ(EC 1.14.18.1およびEC1.10.3.1)、キノコチロシナーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノール-オキシダーゼ、ドパクロムトートメラーゼ(E.C.5.3.2.3, DCT/Trp2); DHICAオキシダーゼ(Trp1) DHIオキシダーゼが挙げられる。

【００２０】

メラニンの合成および主たるメラニンのタイプは、システイン残基の存在（上述のとおりフェオメラニンにつながる）、pH（アルカリ性のpHはカテコールの自動酸化を促進する）、金属イオン（たとえばCU2+、Ni2+、Fe3+、Fe2+、Co2+…）(Palumbo et al, Biochim Biophys Acta. 1987; 13;925(2):203-9; Palumbo et al, Biochim Biophys Acta. 1991;1

115(1):1-5 ; WO 1995009629 A1)、およびインキュベーションにおいて添加された酵素に強く影響を受ける。たとえば、Pawelek(1993、1995)は、ドパクロムおよび適切な酵素を組み合わせることによって、または5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸を単独でもしくは5,6-ジヒドロキシインドールと共にもしくは3－アミノ-チロシンと共にインキュベートすることによって、溶解性の合成メラニンを生成する方法を記述した(US Patent 5225435; US Patent 5384116)。

【００２１】

海洋生物学において、イガイ接着タンパク質(MAP)は、湿潤環境でさまざまな基質と強力な接着性の結合を形成する能力を有する。これらの接着タンパク質は、L-ドパを通常高い割合で含み、酸化重合（したがって、メラニン様化合物に至る）の後、その接着強度に大きく関与する(Lee et al, Biomacromolecules 2002, 3, 1038-1047; Wang et al, Biomaterials 28 (2007) 3456-3468)。ノルエピネフリン、ドパミン、またはドパ含有ポリマーといったいくつかの主要なカテコールアミンは、固体材料の表面に接着膜を作り上げることができる類似の酸化重合を受けることができる(Lee, op. cit.; Wang, op.cit.; Guvendiren et al, Adhes. 2009 ; 85(9): 631-645; Wei et al, Colloids Surf B Biointerfaces. 2013;110:22-8)。

【００２２】

節足動物においては、クチクラ硬化はメラニン化に密接に関係するプロセスであり、それによりクチクラはフェノール化合物の取り込みにより安定化される。硬化は、チロシナーゼまたはラッカーゼによりオルトキノンにまず酸化される3つのカテコール（N-アセチルドパミン(NADA)、デヒドロ-NADAおよびN-b-アラニルドパミン(NBAD)）を主に伴う。対応するオルトキノンは、パラキノンメチドに再変換され得、不飽和キノイド誘導体およびデヒドロベンゾジオキシン誘導体に更に酸化され得る。オルトキノンおよびパラキノンメチドは、高い反応性の化合物であり、求核化合物（たとえば、システイン、ヒスチジン、メチオニン、リジン、アラニン、チロシン）との反応により付加物を形成して、芳香環の6位が置換された（主にオルトキノンの場合）または側鎖のベータ位が置換された（主にパラキノンメチドの場合）アシルドパミンを与え得る(Andersen 2010, op. cit.)。

【００２３】

一部の研究者は、メラニン形成は、先天性免疫における役割を果たすこともできるという仮説を提唱した(Mackintosh et al, J. theor. Biol. (2001) 211, 101-113)。この仮説は、フェノールオキシダーゼ(PO)を活性化する昆虫の能力により主に支持されており、メラニン化という名前のプロセスである、侵入微生物周囲におけるメラニンの形成につながり、外来粒子の封入を可能にする(Eleftherianos et al, J Innate Immun 2011;3:28-33; Viljakainen 2015, op. cit.)。

【００２４】

状況は哺乳動物においては反対かもしれず、これは、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）（だけでなく、病原性細菌および蠕虫のいくつかの種）によるメラニン合成が、宿主による貪食および食作用殺傷に対して菌類を保護することによりその病原性を実際に増加させることがよく認識されていることによる(Casadevall et al, 2000, Curr Opin Microbiol. 2000 Aug;3(4):354-8)。菌類メラニンは補体第二経路を活性化することができるが(Rosas et al, Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(1):144-8)、合成メラニンは、リポ多糖類で刺激されたマクロファージにおけるサイトカイン産生を抑制する(Mohagheghpour et al, Cell Immunol. 2000;199(1):25-36)。メラニン合成における重要な酵素であるチロシナーゼをコードする遺伝子においてのみ相違するC57BL/6マウスは、マラリア感染の臨床経過において、相違を示さなかった(Waisberg et al, PLoS One. 2012;7(1):e29493)。

【００２５】

L-ドパまたはメラニンが、抗体または細胞傷害性Tリンパ球といった適応免疫応答を促進できることは文献には言及はない。特に、免疫学的研究は、ドパ含有ポリマーが不十分な抗原であることを明らかにしている(Lee et al, Adv Mater. 2009; 21(4): 431-434; W

ei, 2013, op. cit.; Ball et al, J Colloid Interface Sci. 2012 15;386(1):366-72)。

【００２６】

前部ブドウ膜炎のマウスモデルにおいては、ウシの不溶性網膜色素上皮(RPE)画分に対する免疫付与が記載されている(Boral et al, Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995;36(6):1056-66)。興味深いことに、まだ分かっていない病原性抗原が、巨大な紡錘状の成熟メラニン粒子（おおよそ、2～3μmの長さ）と結合する(Broekhuyse et al, Exp Eye Res. 1992;55(3):401-11)。しかしながら、V8プロテアーゼによる抗原の可溶化の後であっても抗原が病原性を維持していることから、メラニンは、精製プロセスの間共に現れるが(表5, Bora 1995)、疾患の生理病理学におけるメラニンの役割を果たせそうではない。そのような関係の他の例は、文献にはない。

【００２７】

自己分泌／傍分泌様式を通じた神経伝達物質ドパミンによる免疫システムの直接の調節が示唆されている。ドパミンは免疫システムに矛盾する作用を示す。ドパミンは、ヒトナイーブCD4 T細胞によるTh2サイトカインの生成、活性化CD4 T細胞によるTh1サイトカインの生成；またはDCによるTh17サイトカイン(IL-23)の生成を促進することができる。ドパミンは、制御性T細胞(Treg)の抑制活性を阻害し、T細胞の遊走を促進することができるが、ヒトT細胞増殖を阻害することもできる(Sarkar et al, Brain Behav Immun. 2010; 24(4): 525-528; Pacheco et al, Front Immunol. 2014;5:117)。要するに、免疫システムにおけるドパミンの効力は複雑で、単純ではない。これらの効力は、抗原特異的免疫応答を直接引き起こすのではなく、DARにより仲介され、抗原とドパミンの間がごく近接することを必要としない。

【００２８】

5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸(DHICA)-メラニンが、DHICA媒介抗酸化を経由したメラノソームタンパク質に対する免疫低応答性の維持において役割を果たすことが報告されている(Liu et al, Free Radic Biol Med. 2011 May 1;50(9):1177-85)。

【００２９】

他の研究者は、ブドウのメラニンについて、いくつかの抗炎症特性および免疫調節特性を報告している。足浮腫およびアジュバント誘発疾患に対する阻害作用(Avramidis et al; Arzneimittelforschung. 1998 Jul;48(7):764-71)。特に、当該研究者は、他の炎症により引き起こされた浮腫だけでなく、カラギーナン誘発浮腫へのメラニンの阻害作用を報告するとともに、ブドウのメラニンがラットにおけるアジュバント誘発疾患（AID）への強力な阻害効果を示すことを報告した。当該研究者は、観察結果が、リンパ球亜集団Th1（T4+またはT8+）によって媒介される細胞性免疫反応の、メラニンによる阻害の可能性に起因するかもしれないことを示唆した。

【００３０】

要約すれば、免疫におけるメラニンまたはその前駆体の役割は、捉えどころがないままである。

【００３１】

Arnonら(1960 - Biochem. J., 75: 103-109)は、中でも、メラニンIではないポリチロシル（polytyrosyl）に結合した、抗原タンパク質、すなわちゼラチン、卵アルブミンまたはエデスチンを開示している。

【００３２】

Selaら(Biochem. J., vol. 75, 1 January 1960 (1960-01-01), p.91-102)は、ポリペプチドゼラチンを得るための作業プロセスを開示している。酸化重合はなく、得られた生成物はメラニンを含まず、メラニンと見なされ得ない。

【００３３】

Akagiら("Bioactive Surfaces", 1 January 2011 (2011-01-01), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Adv Polym Sci, vol. 247, p.31-64内)は、ワクチンアジュバントおよび送達システムとしての生分解性ナノ粒子を開示している。ポリアミノ酸ナ

ノ粒子は、チロシンで調製されているが、この文献は、メラニンについて、または重合が最終生成物としてメラニンを与えることについては、開示も言及もしていない。

【００３４】

US 2004/057958は、ポリアミノ酸ポリマーであり得る免疫原性担体を開示している。この文献は、免疫原としてメラニンを用いることについては、全く言及も示唆もしていない。

【００３５】

Fujitaら(Chemistry Central Journal, Biomed Central Ltd, vol. 5, no. 1, 23 August 2011 (2011-08-23), p.48)は、ナノ粒子を用いる、複合的な抗原提示ペプチドワクチンシステムの状況をレビューしている。この文献は、抗原の免疫原性を増加させるためのメラニンおよび抗原の複合体を調製することについては言及も示唆もしていない。

【００３６】

Cuiら(Biomacromolecules, vol. 13, no. 8, 13 August 2012 (2012-08-13), p.2225-2228)は、細胞内薬物送達を行うためのカプセルにおける（メラニンとは異なる）ポリドパミンフィルムの使用を記載している。粒子は、免疫原性組成物を得るために使用されていない。

【００３７】

Cuiら(NANO, vol. 10, no. 05, 1 July 2015 (2015-07-01), p.1530003-1 to 1530003-23)は、ポリドパミンカプセルを更に開示している。粒子は、免疫原性組成物を得るために使用されていない。

【００３８】

Leeら(Advanced Materials, vol. 21, no. 4, 26 January 2009 (2009-01-26), p.431-434)は、ポリドパミンフィルムが、様々な基質と生体共役反応され得ることを開示しているが、これらのフィルムが免疫原性特性を示すことは示していない。

【００３９】

Parkら(ACS Nano, vol. 8, no. 4, 22 April 2014 (2014-04-22), p.3347-3356)は、薬物を運ぶために用いられるポリドパミンナノ粒子を開示している。この文献は、免疫原性組成物としてのメラニン-抗原複合体については言及も示唆もしていない。

【００４０】

US 2012/237605は、ポリドパミンベースの表面を有するナノ粒子を開示しているが、免疫原性組成物としてのそれらの使用については示唆も開示もしていない。

【００４１】

Liuら(Small. 2016 Apr 6;12(13):1744-57)は、ワクチンアジュバントが、強い体液性および細胞性免疫反応を誘導することから、ドパミン重合に基づく、病原体を模倣するポリマーナノ粒子を開示している。抗原は、メラニンの形成後に添加されている。

【発明の概要】

【００４２】

本発明は、メラニンが、抗原と一緒に投与された場合に、当該抗原に対する免疫を誘導するための強力なアジュバントとして使用され得るという事実に基づく。メラニンおよび抗原が複合体を形成する場合、特に抗原がメラニン中に捕捉された場合が好ましい。

【発明を実施するための形態】

【００４３】

定義

本発明の文脈において、下記の用語は下記の意味を有する。

【００４４】

メラニン

「メラニン」は、インドールまたはカテコールに関連する前駆体の酸化重合から得られた高分子である色素である。図1は、メラニンの1つの種類（ユーメラニン）の合成を記載している。本発明に係るメラニンは、図1に記載されるように前駆体の重合から得られるユーメラニンといった、自然界で発見され得る「天然」メラニン、（メラニン前駆体を高

い割合で含有する）MAP様ポリマー、または下記に記載されるものといった前駆体誘導体の重合から得られるメラニン様分子であってよい。

【００４５】

アミノ酸チロシンの酸化、続いて重合によって生成される多様なメラニンがある：ユーメラニン、フェオメラニン、およびニューロメラニンおよび植物メラニン。

【００４６】

本願の文脈において、好ましいメラニンは、ユーメラニンである。しかしながら、下記に記載される組成物であって、本発明の組成物において使用される組成物は、メラニン前駆体の誘導体の重合を通して得られる非天然メラニンだけではなく、フェオメラニン、ニューロメラニン、植物メラニン、メラニン様分子として考え得る（L-ドパといったメラニン前駆体を高い割合で含有するポリマーの酸化から得られる）MAP様ポリマー、といった他の種類のメラニンも用いることができる。

【００４７】

ユーメラニンおよびフェオメラニンのいずれのための生合成経路の第一の段階は、その基質の酸化を促進するチロシナーゼによる触媒作用を行うことである（図1）。

チロシン→ドパ→ドパキノン

【００４８】

ドパキノンは、2つの経路でシステインと結合し得、ベンゾチアジンおよびフェオメラニンへ至る。

ドパキノン＋システイン→5-S-システイニルドパ→ベンゾチアジン中間体→フェオメラニン

ドパキノン＋システイン→2-S-システイニルドパ→ベンゾチアジン中間体→フェオメラニン

【００４９】

また、ドパキノンは、ロイコドパクロムに変換され得、2つ以上の経路が続き、ユーメラニンへ至る。

ドパキノン→ロイコドパクロム→ドパクロム→5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸（DHICA）→キノン→ユーメラニン

ドパキノン→ロイコドパクロム→ドパクロム→5,6-ジヒドロキシインドール（DHI）→キノン→ユーメラニン

【００５０】

メラニン前駆体

「メラニン前駆体」は、メラニン合成の間に使用または合成される分子である。特に、下記を挙げることができる：L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-ドパ、ドパキノン、シクロドパ、ドパクロム、ジヒドロキシインドールカルボン酸または5,6-ジヒドロキシインドール-2カルボン酸（DHICA）、インドール5,6キノン、5,6-ジヒドロキシインドール（DHI）、ドパミン-o-キノン、ドパミン　ロイコドパミノクロム、ロイコドパクロム（シクロドパ）、ドパミノクロム、ノルエピネフリン、ノルアデキノン（noradequinone）、ノルアデノクロム（noradenochrome）、エピネフリン、エピネフリン-o-キノン、アデノクロム（adenochrome）、3-アミノ-チロシン、6-ヒドロキシ-ドパ、ジヒドロカフェー酸、カフェー酸およびその他。

【００５１】

L-チロシンは好ましい前駆体であり、酸化重合を必要とする。L-ドパは好ましい前駆体である。

【００５２】

D-ドパは好ましい前駆体である。

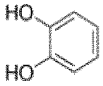
【００５３】

6-ヒドロキシ-ドパは好ましい前駆体である。

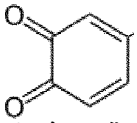
【００５４】

DHICAは好ましい前駆体である。

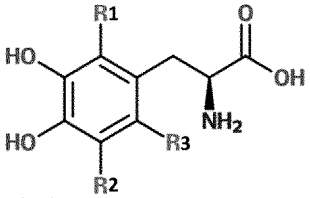
【００５５】
DHIは好ましい前駆体である。
【００５６】
DHICAとDHIの混合物は好ましい前駆体である。
【００５７】
ドパミンは好ましい前駆体である。
【００５８】
「メラニン前駆体」なる用語は、そのような前駆体の誘導体および／またはそのような前駆体を高い割合で含むポリマーをさらに含む（たとえばイガイ接着タンパク質）。
【００５９】
特に下記から選択することができる：
- カテコール部分



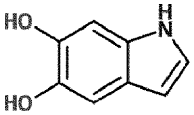
またはその類縁体のオルトベンゾキノン部分



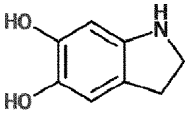
を含む化合物。
【００６０】
たとえば以下：L-ドパ、D-ドパ、ドパミン、ノルエピネフリン（ノルアドレナリン）、エピネフリン（アドレナリン）、6－ヒドロキシドパ、カテキン、ジヒドロカフェー酸、カフェー酸、（3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸）DOPAC；3,4-ジヒドロキシマンデル酸、アシルドパミン、N-アセチルドパミン、デヒドロ-N-アセチルドパミンおよびN-b-アラニルドパミン、ドパキノン、ドパミン-o-キノン、ノルエピネフリン-o-キノン、エピネフリン-o-キノン。
【００６１】
特に好ましい物質は、L-ドパ（L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン）、D-ドパ（D-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン）、6-ヒドロキシドパ、またはそれらの置換された誘導体である。



式中、R1、R2およびR3は、独立して水素、-OHまたはC1～C6アルキル基である。
【００６２】
- カテコール部分の前駆体、たとえば：フェニルアラニン、チロシン、トリプタミン。
【００６３】
- インドール-5,6-ジオール部分



またはその類縁体のインドリン-5,6-ジオール部分



を含む化合物。
【００６４】
たとえば以下：ドパクロム、ドパミノクロム、ノルアドレノクロム、アドレノクロム、

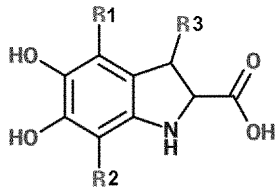
DHICA、インドール5,6キノン、ロイコドパクロム（シクロドパ）、ロイコドパミネクロム（Leucodopaminechrome）；ロイコノルアドレノクロム、5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸（5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique）（DHICA）、5,6-ジヒドロキシインドール（DHI）。

【００６５】

特に好ましい物質はDHICAである。

【００６６】

- 下記式のインドール部分を含む化合物



式中、R1、R2およびR3は、同一または異なっていてよく、独立して水素、-OHまたはC1～C6アルキル基である。

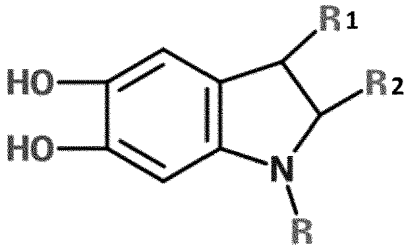
【００６７】

他の誘導体は、公知である。実例として、下記を挙げることができる。

【００６８】

6－ジヒドロキシインドール（DHI）誘導体

本発明の方法で用いることができるDHI誘導体の例は、WO 98051269に記載のものが挙げられ、特に、下記式（I）で表されるジヒドロキシインドールが挙げられる：



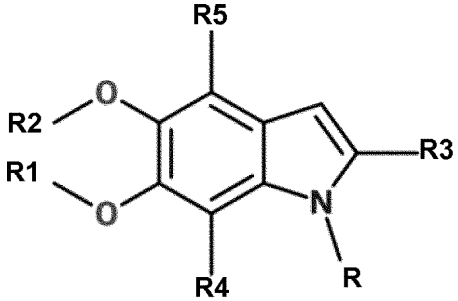
(I)

式中、

- Rは、水素、1～6個の炭素原子を有するアルキル基、1～6個の炭素原子を有するヒドロキシアルキル基、1～6個の炭素原子を有するアミノアルキル基、アリール、および最大3つの反応不活性置換基を含む置換アリールからなる群において選ばれ；
- R1およびR2は、同一または異なっていてもよく、水素、1～6個の炭素原子を含むアルキルからなる群において選ばれ、または、R2が水素であるとき、R1はCOOR3であってもよく、R3はHまたは1～6個の炭素を有するアルキルである。

【００６９】

あるいは、EP441689に記載される化合物も使用でき、たとえば式（II）のものが挙げられる。



(II)

式中、

Rは、水素原子、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシアルキル、アミノアルキル、SiR6R

7R8（式中、R6、R7、R8はアルキルを示す）、アルキルは1～8個の炭素原子を含み、または非置換のアリールもしくは基OH、NH_2、アルキル、アルコキシもしくはNO_2で置換されたアリールを表し；

R1およびR2は、同一または異なり、C_1～C_3アルキルを表し、または1つまたはそれ以上のC_1～C_3アルキルで置換されていてもよいメチレンまたはエチレン基を一緒になって形成し、

R3は、水素またはCOOHであり、

R4およびR5は、同一または異なり、水素原子、ヒドロキシ基、メチルまたはC_2～C_6アルキルを表す。

【００７０】

特に、5,6-ジメトキシインドール、5,6-メチレンジオキシインドールおよび1-メチル-5,6-ジメトキシインドールを挙げることができる。

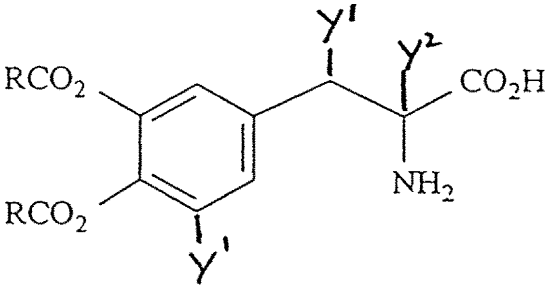
【００７１】

ドパ誘導体

EP58040に開示されるような、ドパ誘導体を使用することができ、特に下記から選ばれ得る。

【００７２】

(a)下記式（III）を有する、ドパのモノおよび／またはジ置換エステルおよびギ酸誘導体：



(III)

式中、

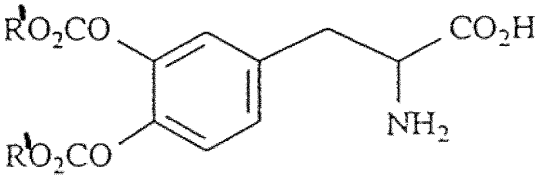
Rは、-H、1～20個（好ましくは1～6個）の炭素原子を有する分岐または非分岐の、アルキルまたはアルケニル基、またはアミノ酸もしくはペプチド断片であり、

Y^1は、-Hまたは-OH、または-CH3またはその他のC2～C6アルキル基であり、および、

Y^2は、-Hまたは-CH_3である。

【００７３】

(b)下記式を有する、ドパのモノおよび／またはジ置換炭酸誘導体：



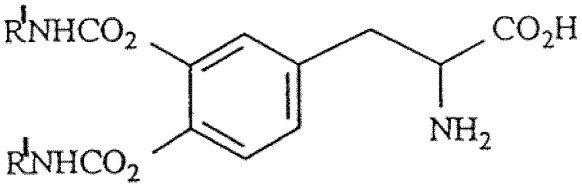
(IV)

式中、

R^1は、1～20個の炭素原子を有する、分岐または非分岐の、アルキルまたはアルケニル基である。

【００７４】

(c)下記式(V)を有する、ドパのモノおよび／またはジ置換ウレタン誘導体：

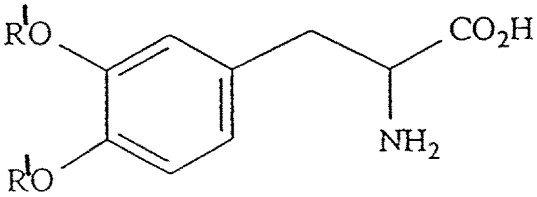


(V)

式中、R1は、酸素またはC1～C3アルキル基である。

【００７５】

(d)下記構造(VI)を有する、ドパのモノおよび／またはジ置換エーテル誘導体：

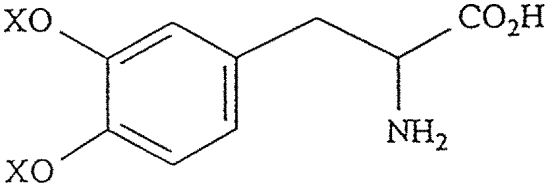


(VI)

式中、R1は酸素またはC1～C3アルキル基である。

【００７６】

(e)下記構造(VII)を有する、ドパのモノおよび／またはジ置換リン酸および／または硫酸誘導体：

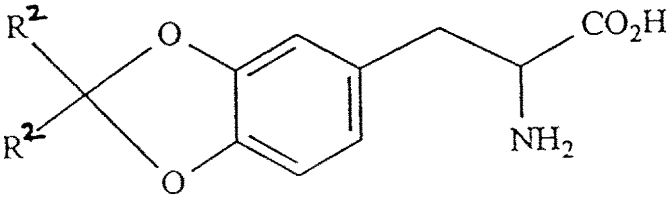


(VII)

式中、1つのXは、-PO□H□または-SO□Hであり、他のXは、-H、-PO_3H_2または-SO_3Hである。

【００７７】

(f)下記構造(VIII)を有する、ドパのアセタールおよびケタール誘導体：

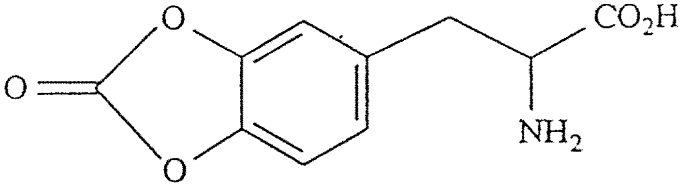


(VII)

式中、R^2は、-H、アルキルおよびフェニルから選ばれる。

【００７８】

(g)下記構造(IX)を有する、ドパの環状カーボネート誘導体：

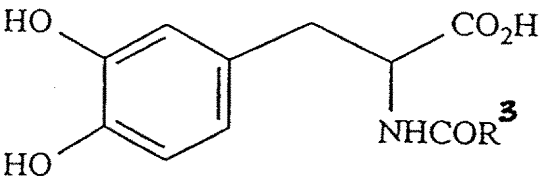


(IX)

。

【００７９】

(h)下記構造(X)を有する、ドパのアミノ置換誘導体：

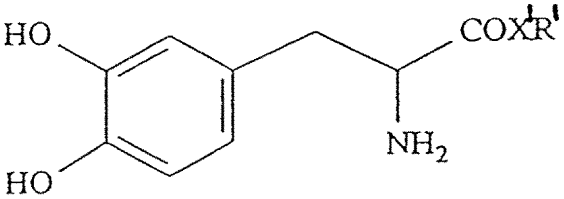


(X)

式中、R^3は、上記記載のR^1であるか、またはアミノ酸残基である。

【００８０】

(i)下記構造(XI)を有する、ドパのカルボキシレート置換誘導体：

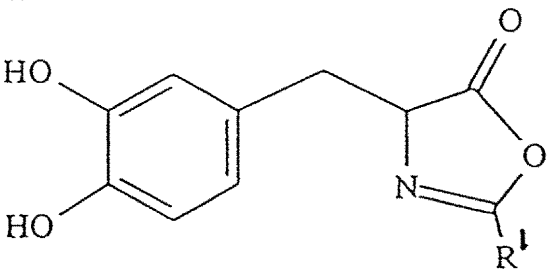


(XI)

式中、X^1は、NHアミド(特にアミノ酸またはペプチド)結合である。

【００８１】

(j)下記構造(XII)を有する、ドパの結合されたアミノおよびカルボキシレート置換誘導体：

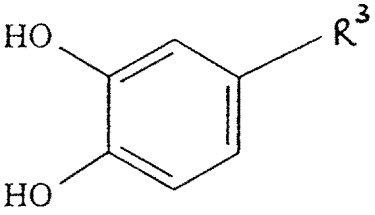


(XII)

式中、R^1は、上記記載のとおりである。

【００８２】

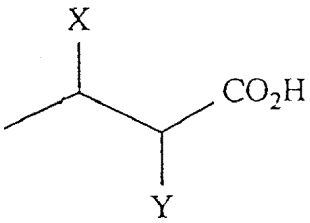
(k)下記構造(XIII)を有する、ドパの構造類縁体：



(XIII)

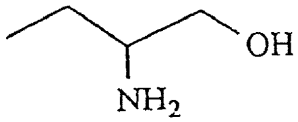
式中、R^3は、下記から選ばれる；

(i)

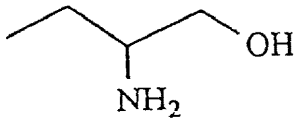


式中、X^2は同一または異なり、-H、-OH、$-NH_2$または-SHから選ばれる；

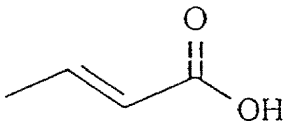
(ii)



(iii)



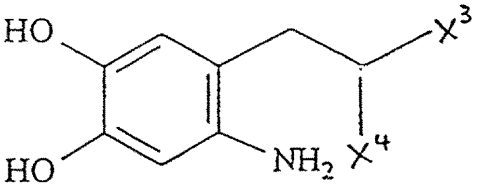
(iv)



。

【００８３】

(l)下記構造(XIV)を有する、ドパの構造類縁体：

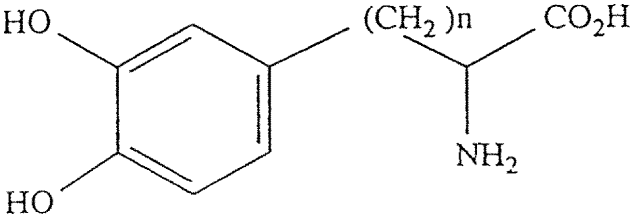


(XIV)

式中、X^3は-OHまたはOR^1であり、X^4は=OまたはOR^1である。

【００８４】

(m)下記構造(XV)を有する、ドパのC-同族体：

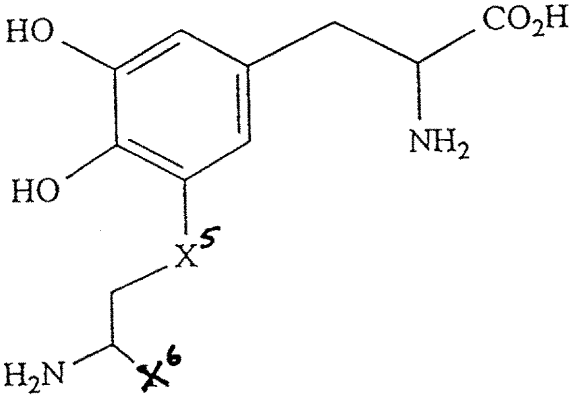


(XV)

式中、nは1～3の整数である。

【００８５】

(n)下記構造(XVI)を有する、ドパの短鎖およびヘテロ原子類縁体：

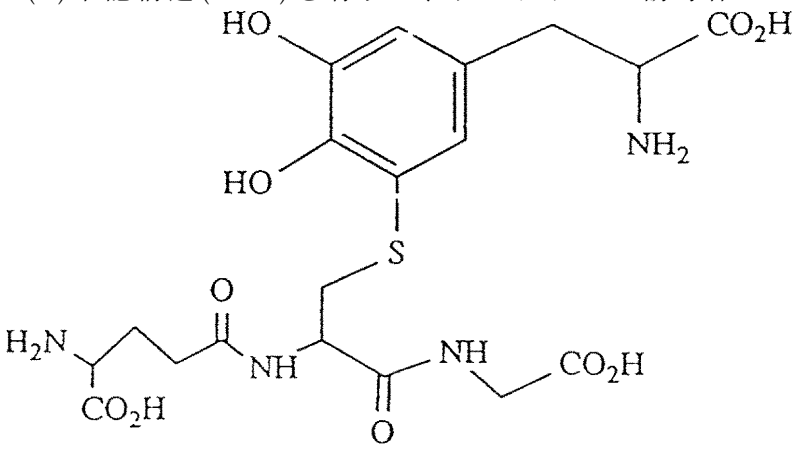


(XVI)

式中、X^5は、S、OまたはNHであり、X^6は、HまたはCOOHである。

【００８６】

(o)下記構造(XVII)を有する、グルタチオン誘導体：



(XVII)

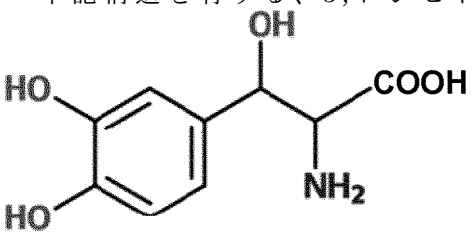
。

【００８７】

置換ドパは、また下記から選ばれてもよい。

【００８８】

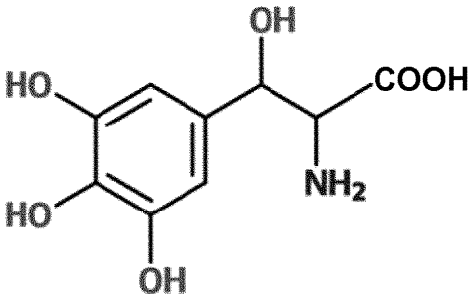
下記構造を有する、3,4-ジヒドロキシフェニルセリン：



。

【００８９】

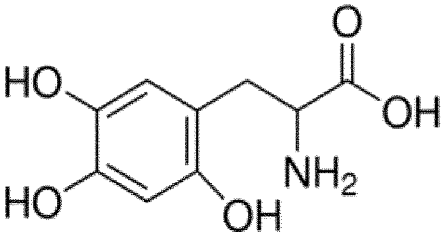
下記構造を有する、2,4,5,-トリヒドロキシフェニルアラニン：



。

【００９０】

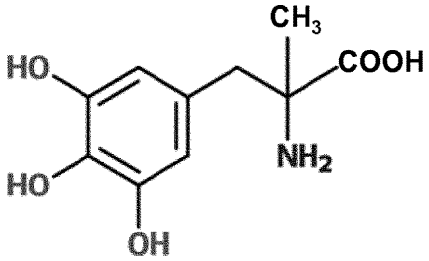
下記構造を有する、6ヒドロキシドパ：



。

【００９１】

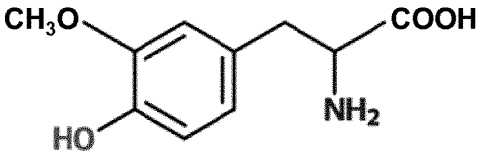
下記構造を有する、2-メチル-3-(3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン)：



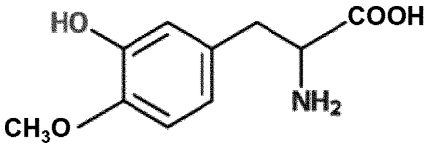
。

【００９２】

他の可能性は、下記構造を有するメトキシチロシン：



および、その異性体である、下記構造の3-ヒドロキシ-4-メトキシフェニルアラニン：

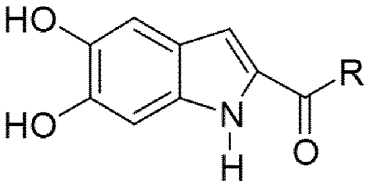


であり、たとえばEP 580409に記載される。

【００９３】

DHICA誘導体

そのような誘導体の例示として、下記を用いることができる：



式中、Rは、水素、1～6個の炭素原子を有するアルキル基、1～6個の炭素原子を有するヒドロキシアルキル基、1～6個の炭素原子を有するアミノアルキル基、アリール、および最大3つの反応不活性置換基、COOH、NH_2を含む置換アリールからなる群において選ばれる。

【００９４】

他のメラニン前駆体またはその誘導体は、公知のものが挙げられ、たとえばWO 93/021898に記載される生成物が挙げられる。

【００９５】

用語「メラニン前駆体」はまた、ポリマー酸化を受け得る上述したとおりのメラニン前駆体を高い割合で含むポリマー分子を含む。たとえば、ポリ-ドパペプチド、ポリ-チロシンペプチド、または、メラニン前駆体を高い割合で含むより一般的なポリマーが挙げられる（たとえばイガイ接着タンパク質の前駆体）。

【００９６】

酸化剤

「酸化剤」または「酸化性分子」は、メラニン前駆体を含む溶液に酸素を提供し、その重合およびメラニン高分子の形成を促進することができる化合物である。

【００９７】

この目標を達成できる酸化剤は、酸素、過酸化水素、過硫酸アンモニウム、鉄イオン、過酸化水素と一緒のヨウ化ナトリウム、および空気酸化のための触媒としての硫酸銅などの遷移金属カチオンの塩処理を含む。

【００９８】

酸化剤は、酸素、過酸化水素、過硫酸アンモニウム、および鉄イオンからなる群において選ばれる場合が、したがって好ましい。

【００９９】
免疫原性または免疫賦活組成物
「免疫原性または免疫賦活組成物」は、動物に投与されたときに、当該動物において免疫応答を起こすことができる組成物である。好ましくは、前記動物は哺乳動物であり、しかし、特に組成物が鳥類の家畜で用いられるときは、鳥類であってもよい（たとえば、鶏、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、ウズラ）。免疫原性組成物は魚の養殖で用い得ることから、動物は魚であってもよい。
【０１００】
しかしながら、本発明に係る免疫原性組成物は、哺乳動物において好ましく用いられる。そのような哺乳動物は、好ましくはヒトであるが、組成物が獣医学領域で用いられるとき、特に畜牛（乳牛）、ヒツジ、ヤギまたは馬などの家畜、またイヌまたはネコといったペットにおいて免疫を誘導するために、他の哺乳動物であってもよい。
【０１０１】
免疫原性組成物は、したがって、抗原を含む組成物であり、かつそのような抗原に対する免疫応答を起こすことができる組成物である。発生した免疫応答は、細胞性（T細胞媒介）のまたは体液性（B細胞媒介、抗体の産生）の免疫応答であり得る。免疫原性組成物は、細胞性および体液性免疫応答のいずれをも誘導してもよい。
【０１０２】
細胞性免疫応答は、CD8 Tリンパ球媒介応答（すなわち、細胞傷害反応）、またはCD4 Tリンパ球媒介応答（すなわち、ヘルパー応答）であり得る。細胞傷害およびヘルパー細胞性免疫応答を組み合わせることもできる。ヘルパー応答は、Th1、Th2またはTh17リンパ球を含んでもよい（本分野で知られているように、そのようなリンパ球は、異なるサイトカイン反応を引き起こすことができる）。
【０１０３】
免疫原性組成物は、MHC1またはMHC2経路を介して、そこに存在する抗原のよりよい提示を許容してよい。
【０１０４】
アジュバント
「アジュバント」は、抗原に対する免疫応答を改善あるいは増強する能力を有する物質である。換言すれば、抗原に対する免疫応答は、アジュバントが存在しないときよりも、アジュバントの存在下でより高くまたは異なっていてよい（これは、応答が改善されるとき、たとえば、アジュバントの存在下で活性化されたT細胞のサブセットが、アジュバントの不在下で活性化されたサブセットとは異なる場合を含む）。アジュバントは、本分野で知られており、ワクチン分野で広く用いられてきている。
【０１０５】
ミョウバン、エマルジョン（水中油型または油中水型のいずれか、たとえば不完全フロイントアジュバント(IFA)およびMF59（登録商標））、PRR（パターン認識受容体）リガンド、TLR3（Toll様受容体3）およびRLR（RIG-I様受容体）リガンドたとえば二本鎖RNA(dsRNA)、またはdsRNAの合成類縁体、たとえばpoly(I:C)、TLR4リガンドたとえば細菌性リポ多糖(LPS)、MPLA（モノホスホリルリピドA）、特にミョウバンとともに形成されたもの、TLR5リガンドたとえば細菌フラジェリン、TLR7/8リガンドたとえばイミダゾキノリン（すなわち、イミキモド、ガーディキモドおよびR848）、TLR9リガンドたとえば特定のCpGモチーフ(CpG ODN)、またはNOD2（ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン含有タンパク質2）リガンドを含むオリゴデオキシヌクレオチドを挙げることができる。上記のリガンドなる用語は、好ましくは受容体のアゴニスト、すなわち、受容体、特にTLR3およびTLR9受容体、に結合して、受容体を活性化する物質をいう。
【０１０６】
抗原
本発明の文脈において、「抗原」は、それを認識する生きている動物の免疫システムのためにそれに対して免疫応答を引き起こすことが求められる、分子または分子の組合せで

ある。そのような抗原は、免疫応答が求められる宿主の体に対して外来であってよい。この場合、抗原は、細菌またはウイルスにより発現されたタンパク質であってよい。抗原は、自己抗原、すなわち、腫瘍抗原といった、宿主の細胞により発現されたタンパク質であってもよい。

【０１０７】

抗原は、全生物（ウイルスまたは細菌、菌類、原生動物、またはたとえがん細胞であっても）、死んでいるものまたは死んでいないもの、細胞（放射線照射されたものまたはされていないもの、遺伝子操作されているものまたはされていないもの）、あるいは細胞抽出物または細胞溶解物のようなこれら生物／細胞の小断片からなることができる。抗原は、また、タンパク質、ペプチド、多糖類、脂質、糖脂質、糖ペプチドのような単一分子またはこれらの混合物からなってもよい。抗原は、また、化学修飾または化学的安定化を通して改変された上記に挙げた分子の一つであってもよい。特に、抗原の正味電荷は、適切なアミノ酸の置換または抗原の化学修飾を用いて改変することができる。

【０１０８】

抗原は、完全なタンパク質、またはタンパク質のエピトープといったタンパク質のある一部分であってよい。本発明の文脈において、抗原は、互いに結合した複数のエピトープを含む合成タンパク質または分子にあってもよい。

【０１０９】

特に、抗原は、同じ抗原の複数のエピトープを含むタンパク質であってよく、これらエピトープは、特定のMHCハプロタイプである。この場合、異なる遺伝的（MHC）状況において免疫応答を得るために、ここに記載されるような特有の免疫賦活分子を用いることができる。

【０１１０】

他の態様において、抗原は、同じ病原体（病原体なる用語は、好ましくは、細菌、ウイルス、寄生生物または菌類といった、外来の病原体を意味するが、腫瘍細胞にまで及んでもよい）の様々な抗原から得られた複数のエピトープを含むタンパク質であってよい。この場合、この病原体に対する強い免疫応答を得るために免疫賦活分子を使用することができる。

【０１１１】

開示された組成物においてメラニン高分子とともに使用し得る抗原は、それに対する免疫応答が調べられた任意の抗原である。

【０１１２】

この抗原は、自然界で見られる全タンパク質であるか、あるいは自然界で見られるタンパク質の一部分のみであることができる。

【０１１３】

ここに記載される免疫原性組成物において意図される抗原は、抗原の混合物とすることもできる。

【０１１４】

抗原は、タンパク質、ペプチド、多糖、または脂質であってよい。抗原は、細菌、ウイルス、または他の微生物の部分（被膜、カプセル、細胞壁、鞭毛、線毛および毒素）であってよい。抗原は、タンパク質および／または多糖と結合した脂質といったような、より複雑な分子であってよい。

【０１１５】

エピトープ

特定の態様において、免疫原性組成物において使用される抗原は、一つまたは複数のMHCエピトープを含む。

【０１１６】

特定の態様において、免疫原性組成物において使用される抗原は、MHCエピトープにある。

【０１１７】

他の態様において、免疫原性組成物において使用される抗原は、MHCエピトープにあり、これはそのN末端および／またはC末端で、少数のアミノ酸（1～10アミノ酸、好ましくは1～6アミノ酸の、C末端およびN末端終端の一つまたは両方）によって隣接されている。

【０１１８】

MHCエピトープ（またはT細胞エピトープ）は、抗原提示細胞の表面上に提示され、それらはMHC分子に結合している。MHCクラスI分子により提示されたT細胞エピトープは、典型的には、8～11アミノ酸長のペプチドであるのに対し、MHCクラスII分子は、13～17アミノ酸長である、より長いペプチドを提示する(https://en.wikipedia.org/wiki/Epitope#T_cell_epitopes)。

【０１１９】

MHCエピトープは、（そのC末端および／またはN末端先端でアミノ酸を付加してまたは付加なしで）インビトロで合成されてもよい。MHC結合ペプチドは、特に塩酸を用いた、酸処理といった、本分野で知られた任意の方法により、生細胞、特に腫瘍細胞から抽出されてもよい。

【０１２０】

他の態様は、抗原は、抗原由来のアミノ酸の連続配列により形成される、一つまたは複数のB細胞エピトープ、すなわち、抗体により認識されるタンパク質の一部分、好ましくは、リニアエピトープを含む。

【０１２１】

特定の態様において、免疫原性組成物において使用される抗原は、B細胞エピトープにある。

【０１２２】

他の態様において、免疫原性組成物において使用される抗原は、B細胞エピトープにあり、これはそのN末端および／またはC末端で、少数のアミノ酸（1～10アミノ酸、好ましくは1～6アミノ酸の、C末端およびN末端終端の一つまたは両方）によって隣接されている。

【０１２３】

エピトープマッピングに関連する文献における異なる方法により、所定の抗原からT細胞またはB細胞エピトープを同定することが可能である。

【０１２４】

しかしながら、ここに開示される組成物は、全タンパク質ではなく、公知の抗原からの既に知られたエピトープの使用だけを可能にするものである（したがって、これら公知の抗原はよく特徴付けられている）。免疫応答を引き起こすためにエピトープ（すなわち、小さな抗原性の部分）だけを使用するという事実は、大きなサイズのタンパク質の使用に関連し得る何らかの悪影響を制限する上で、特に興味深い。

【０１２５】

他の合成抗原

特に、抗原は、アミノ酸のストレッチ、またはデンドリマー構造で用いられるポリエーテル化合物または他のリンカーといった他の許容されるリンカーによって隔てられた、複数のエピトープを含む合成分子であってもよい(Tam, Proc Natl Acad Sci USA. 1988, 85(15):5409-13; Seelbach et al, Acta Biomater. 2014 10(10):4340-50; Sadler and Tam, Reviews in Molecular Biotechnology 90, 3-4, pp195-229; Bolhassani et al, Mol Cancer. 2011 Jan 7;10:3)。

【０１２６】

（患者の広範な集団において所定の抗原または病原体に対する免疫応答を引き起こすことができる、単一の免疫原性または免疫賦活組成物を生成するためには、）複数のエピトープは、異なるHLA遺伝子型に特異的なエピトープであってよい。

【０１２７】

他の態様においては、複数のエピトープを有する該病原体に対する強い免疫応答を引き起こすためには、エピトープは、同じ病原体の同じまたは複数の抗原に由来してもよい。

【０１２８】
他の態様においては、免疫原性組成物を用いて一度に様々な病原体に対する免疫応答を引き起こすためには、エピトープは、異なる病原体に由来してもよい。
【０１２９】
抗原は、pan-DRエピトープ（PADRE）およびPol_{711}エピトープといったユニバーサルTヘルパーエピトープを含んでもよい。他のユニバーサルTヘルペーエピトープが文献に広く開示されている。
【０１３０】
抗原の供給源
本発明で使用され得る抗原は、特に下記の中から選ぶことができる：
- 外来性抗原（たとえば、吸入、摂取または注射により、外部から体内に入った抗原；これらの抗原は一般にMHC II分子により提示される）。
- 内在性抗原（正常細胞の代謝の結果、またはウイルスまたは細胞内細菌感染が理由で、正常細胞内で生じた抗原；これらの抗原は一般にMHC I分子により提示される）。
- 新抗原（たとえば、腫瘍抗原、たとえば、ウイルス関連腫瘍におけるウイルスのオープンリーディングフレームに由来するエピトープ、または、腫瘍細胞の表面上にMHC IまたはMHC II分子により提示される他の腫瘍抗原）。
- アレルゲン（アトピー性の個体における免疫グロブリンE（IgE）応答を通したタイプI過敏性反応を刺激することができる抗原）。
【０１３１】
腫瘍抗原の例としては、下記を挙げることができる。胚細胞腫瘍および肝細胞がんで見られるαフェトプロテイン(AFP)、大腸がんで見られるがん胎児性抗原(CEA)、卵巣がんで見られるCA-125、乳がんで見られるMUC-1、乳がんで見られる上皮腫瘍抗原(ETA)、悪性黒色腫で見られるチロシナーゼまたはメラノーマ関連抗原(MAGE)、rasの異常生成物、様々な腫瘍で見られるp53、gp100（メラニン細胞タンパク質PMEL、メラノソームに富むタイプI膜貫通糖タンパク質）、TRP2（チロシナーゼ関連タンパク質2）、EPHA2（神経膠腫といった多様な進行がんでしばしば過剰発現される、受容体チロシンキナーゼ）、サバイビン（特に乳がんおよび肺がんで発現する、apoptosis repeat-containing 5またはBIRC5のバキュロウイルス阻害剤）、EGFRvIII（特に膠芽細胞腫で発現する上皮細胞増殖因子受容体突然変異体）。
【０１３２】
免疫原性組成物において病原体からの抗原が使用され得る、該病原体の例としては、感染症に関わる病原体が挙げられる（ウイルス、細菌、寄生生物、真菌症）。
【０１３３】
感染症に関して、好ましい病原体は、下記から選択される；
ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、A型肝炎およびB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス(HCV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、エボラウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス、麻疹および風疹ウイルス、天然痘ウイルス、スタフィロコッカス属（Staphylococcus）、クラミジア（Chlamydiae）、結核菌（Mycobacterium tuberculosis）、肺炎連鎖球菌（Streptococcus pneumoniae）、炭疽菌（Bacillus anthracis）、コレラ菌（Vibrio cholerae）、ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter Pilorii）、サルモネラ属（Salmonella）、プラスモジウム属の菌種（Plasmodium sp.）（熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum)、三日熱マラリア原虫（P. vivax）など）、ニューモシスティス・カリニ（Pneumocystis carinii）、ランブル鞭毛虫（Giardia duodenalis）（ジアルジオス(Giardiose)）、住血吸虫属（Schistosoma）（ビルハルジアス(Bilharziose)）、アスペルギルス属（Aspergillus）、クリプトコッカス属（Cryptococcus）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、リステリア菌（Listeria monocytogenes）、またはトキソプラズマ原虫（Toxoplasma gondii）。
【０１３４】

適切な抗原による免疫付与から恩恵を受ける疾患の例として、以下が挙げられる：がん（良性または悪性腫瘍）；悪性血液疾患、アレルギー、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症といった慢性疾患、またはアルツハイマー病。

【０１３５】

抗原は、したがって、細菌性またはウイルス性の抗原（または細菌性もしくはウイルス性の抗原から単離された1種または複数種のエピトープを含む、ポリペプチドもしくはポリマー（たとえばデンドリマーにおいて使用可能なもの））が好ましい。

【０１３６】

他の態様において、抗原は、自己抗原（内因性または新抗原）、特に腫瘍特異性抗原（またはそのような抗原から単離された1種または複数種のエピトープを含む、ポリペプチド）である。

【０１３７】

他の態様において、抗原は、アレルゲンであるか、またはそのような抗原から単離された1種または複数種のエピトープを含む、ポリペプチドである。

【０１３８】

抗原の修飾

メラニン前駆体は、一般に荷電している。特に、そのような前駆体のカルボキシル基の存在は負電荷を提供するであろう。したがって、DHICA (5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸)は負に帯電している。反対に、DHI（5,6-ジヒドロキシインドール）といった他の前駆体は、中性または正に帯電している。

【０１３９】

開示される組成物の免疫賦活特性を向上させるため、したがって、抗原は中性電荷またはメラニンの電荷と反対の電荷を示す場合が好ましい。

【０１４０】

したがって、メラニン前駆体としてドパまたはDHICAを用いる場合、正に帯電した抗原を有利に用いることができる。この態様においては、しかしながら、抗原の全体の電荷が正である必要はなく、抗原は少なくとも正に帯電した領域を示すものであることに留意することが重要である。これは、正に帯電したアミノ酸のテールを抗原に添加することによって得ることができるが、他の方法（正の部分を抗原に接合すること）を用いてもよい。

【０１４１】

ドパミンまたはDHIを用いる場合、抗原は中性または負に帯電していてよい。

【０１４２】

この態様の目的は、酸化重合の前に電荷引力（静電気引力）を通して抗原およびメラニン前駆体が互いに接近することを許容することによって、免疫賦活組成物におけるメラニン－抗原複合体の形成を向上させることである。

【０１４３】

ワクチン

本発明の文脈において、ワクチンは、特定の抗原に対する免疫を作るまたは人工的に免疫を高めるために投与される組成物である。したがって、「免疫原性組成物」、「免疫賦活組成物」および「ワクチン」なる用語は、同義と理解される。

【０１４４】

発明の詳細な説明

本発明は、したがって、抗原およびメラニン高分子を含む免疫賦活組成物に関する。下記に述べるように、該組成物は、ワクチンとして使用することができる。

【０１４５】

抗原およびメラニンが互いに複合体を形成している場合が好ましい。組成物の薄層クロマトグラフィーを実施し、抗原が検出されないこと、あるいは、組成物中に当初存在した抗原の大部分（50％超、より好ましくは60％超、さらに好ましくは70％超、またさらに好ましくは80％超、特に好ましくは90％超）が消失したことを確認することによって、抗原がメラニンと複合体を形成していることを容易に試験することができる。メラニンと抗原

は、したがって、2つの物体が、薄層クロマトグラフィー上で、離れて移動していないというより、一緒につながっている場合に、複合体を形成している。換言すれば、組成物中で2つの物体を区別または分離することはできない。抗原とメラニンが複合体を形成していることを確認するために、HPLCまたはポリアクリルアミドゲルなどの、他の方法を用いることができる。

【０１４６】

メラニンと複合体を形成している抗原の割合は、それらの重合前に存在するメラニン前駆体の量に依存することに留意すべきである。特に、抗原が、前駆体と比べて大過剰である場合、メラニン高分子と複合体を形成する抗原は低い割合となるであろう。いずれの場合においても、HPLCなどの定量的分析方法は、形成されたメラニン内で抗原が複合体を形成していることを決定することを可能にし、本出願の文脈で使用し得る。

【０１４７】

組成物が、抗原とメラニン前駆体の重合により得られた場合、この理論に縛られることなく、抗原は、そのようにして得られたメラニン高分子内に捕捉されていると考えられる。

【０１４８】

上述のとおり、メラニンは、メラニン前駆体の酸化重合後に得られる高分子である。メラニンは、免疫賦活組成物中で溶解性メラニンである場合が好ましい。溶解性メラニンは、小さい粒径、すなわち、500nm未満、好ましくは250nm未満または200nm未満の粒子の形態のメラニンである。

【０１４９】

適合した孔の大きさを有するフィルターで、重合の後に得られた組成物のろ過によって溶解性メラニン組成物を得ることが可能である。

【０１５０】

酸素の存在下では、DHICAが琥珀色溶液を形成するのに対して、DHIは自発的に黒色沈殿物を形成すること(Pawelek, Pigment Cell Res. 1991 Mar;4(2):53-62)、ならびに、溶解性メラニン－抗原複合体を含む組成物は、したがって、メラニン前駆体として、DHICA、ドパクロム（かなり不安定ではあるが）、シクロドパ、ドパキノン、またはドパを使用することにより好ましく得られることに留意すべきである。

【０１５１】

免疫原性組成物の取得

上記に開示した組成物は、抗原の存在下で、メラニン前駆体の重合後に得られやすい。

【０１５２】

組成物は、抗原の存在下で、メラニン前駆体の重合後、特に酸化重合後に好ましく得られる。

【０１５３】

抗原は、メラニン前駆体とともに溶液中に存在していてもよく、または、メラニン前駆体に結合してもよく、特に共有結合してもよい。そのような態様は、メラニン前駆体を抗原に結合させて得ることができる。抗原がペプチドの場合、特に、メラニン前駆体を、ペプチドのN末端またはC末端に結合させることが可能である。メラニン前駆体がチロシンまたはドパである場合、そのようにすることは極めて簡単である。

【０１５４】

上述したとおり、本明細書に開示される、免疫原性である組成物は、そこから溶液中で抗原が遊離体としてほとんど検出できず、かつ抗原に対する免疫応答を誘導することができる、可溶性メラニン組成物として特徴付けられる。溶液中で遊離の抗原を添加することが可能であるが、本願に記載される組成物は、溶液中でそのような遊離の抗原なしに免疫原性特性を有するというようなものである。換言すれば、免疫応答は、溶液中の遊離の抗原が存在しない場合においても、抗原に対して得られてもよい。したがって、抗原と複合体を形成したメラニン高分子を含む組成物、および溶液中の抗原は、本発明の範囲内でもある。

【０１５５】
メラニン高分子は、本分野で公知のいずれかの方法により、分解されてもよいこと（たとえば、Schraermeyer and Dohms, Pigment Cell Res. 1996 Oct;9(5):248-54に開示されている方法）、および、そこで複合体化されている抗原は、したがって、質量分析などの本分野で公知のいずれかの方法によって、切り離され、同定され、かつ分析され得ることに留意することができる。
【０１５６】
抗原の存在下におけるメラニン前駆体の重合は、本分野で開示される方法によって実施される。
【０１５７】
特に、メラニン前駆体および抗原は、バッファーとともにまたはバッファーなしで、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、チロシナーゼ、キノコチロシナーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノール－オキシダーゼ、ドパクロムトートメラーゼ、DHICAオキシダーゼ、DHIオキシダーゼといった酵素とインキュベートされてよい。酵素の選択は、重合前に抗原とともに溶液中に存在する前駆体の特質に応じて当業者により行われ得る。
【０１５８】
混合物は、メラニンへの重合を促進するために、上述した酸化剤に曝露される。この重合が抗原の存在下で行われる場合、このようにして形成された高分子が抗原を捕捉する、および／または抗原とメラニンの間に複合体が形成されると推定される。そのような複合体は、抗原とメラニンとの間の共有結合を含んでも、含まなくてもよい。
【０１５９】
抗原の電荷が修飾される場合、複合体の特性も修飾され得る。
【０１６０】
一般的に言えば、いくつかの点が、各抗原ベースで最適化されてよい。なかでも、当業者は、カテコール（メラニン前駆体）／抗原の比率；カテコールの酸化度（特に、酸化剤の種類、pH、バッファー、もしくはインキュベーションの長さの最適化による）、または反応温度といった様々なパラメータを最適化できる。
【０１６１】
開示される免疫賦活組成物は、他の免疫賦活分子、すなわち、上記のアジュバントを含んでもよい。
【０１６２】
このアジュバントは、TLR3アゴニストおよびTLR9アゴニストからなる群において選ばれる場合が好ましく、特に、さらに添加されるこのアジュバントは、ポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリI:C）およびCpGオリゴヌクレオチドの中から選ばれる場合が好ましい。
【０１６３】
アジュバントは、メラニン前駆体の重合の開始前に抗原と共に添加することができる。この場合、メラニン／抗原高分子内で、抗原と複合体を形成することも可能である。
【０１６４】
あるいは、アジュバントは、重合が起こった後、メラニン－抗原複合体免疫原性組成物に添加してもよい。この場合、アジュバントは、メラニン／抗原高分子と複合体を形成していないと推定される。
【０１６５】
免疫原性組成物の用途
本発明は、また、動物（上記のとおり、ヒトを含む）に投与された場合に、抗原に対して免疫応答を引き起こすことを目的とした免疫賦活組成物またはワクチンの調製のためのメラニンまたはメラニン前駆体の使用に関する。あるいは、免疫賦活組成物は、ヒトまたは動物に投与（好ましくは注射）する前に、生細胞（たとえば、マクロファージ、樹状細胞またはリンパ球）を感作するために、該生細胞の存在下でインビトロで使用することができる。得られる組成物は、したがって、レシピエントにおける抗原に対する免疫応答を

引き起こす。特に、US 6210662は、抗原複合体との接触により活性化された抗原提示細胞からなる治療または免疫原性組成物を形成するためのそのような原理を開示している。本発明の場合においては、抗原－メラニン複合体は、ここに記載された方法にしたがって得られたものである。

【０１６６】

メラニン前駆体は、抗原に曝露され、溶液は、次いで重合条件（重合を誘導する酵素または化学物質といった物質への曝露）に供され、それによって免疫賦活組成物に導かれる。

【０１６７】

本発明は、また、標的抗原に対する免疫応答を増加または引き起こすためのアジュバントとしてのメラニンのまたはメラニン前駆体の使用に関する。これは、標的抗原が、それ単独で免疫原性ではない（すなわち、抗原が投与された場合に免疫応答が得られない）場合に、特に有用である。

【０１６８】

本発明は、また、免疫賦活分子としてのメラニンまたはメラニン前駆体に関する。特に、メラニンまたはメラニン前駆体は、抗原に提示された場合に、この抗原に対する免疫応答を増加させるように作用する。メラニン前駆体と抗原のインビボ投与は、メラニン前駆体のメラニンへのインビボ重合および上記の免疫賦活組成物の形成に導くことができることに留意されるべきである。これは、メラニン前駆体および抗原が反対の電荷を有している場合に、これらが、静電気結合により結合している場合に特に当てはまる。

【０１６９】

本発明は、また、免疫賦活組成物として、抗原と複合体を形成したメラニン高分子を含む複合体に関する。

【０１７０】

本発明は、また、免疫賦活組成物として、抗原と複合体を形成したメラニン高分子からなる複合体に関する。

【０１７１】

本発明は、また、標的抗原に対する免疫応答を増加させるまたは引き起こすためのその使用のためのメラニンまたはメラニン前駆体に関する。

【０１７２】

本発明は、また、標的抗原またはそのエピトープを、細胞内、細胞の表面で発現する、または分泌する、細胞に関連する（すなわち、関与するおよび／または関係する）疾患から動物を保護するためのワクチンとしてのその使用のためのメラニンおよび標的抗原を含む免疫賦活組成物に関する。

【０１７３】

ワクチンは、予防（すなわち、疾患の進行に対してレシピエントを保護することを目的とするもの）または治療（すなわち、既に存在する疾患とレシピエントが戦うのを助けることを目的とするもの）用のワクチンとすることができる。

【０１７４】

保護される動物は上記で開示されており、ヒトであってよい。

【０１７５】

疾患は、免疫賦活組成物に使用される標的抗原に関連する。その結果、抗原またはそのエピトープは、疾患の過程において動物の細胞により（または病原体により）発現または提示される。疾患は、したがって、標的抗原を発現している細胞に関係または関与する。そのような発現は、抗原の分泌（実例としては、抗原が細菌毒素であり得る場合）、または、抗原またはそのエピトープの表面発現（抗原が、ウイルスの表面タンパク質、または、腫瘍細胞の表面で発現する腫瘍特異的抗原またはそのエピトープであり得る場合）、または、細胞の表面での抗原またはそのエピトープの提示（たとえば、標的細胞による抗原またはそのエピトープのMHC提示）であってよい。

【０１７６】

本発明は、また、以下の工程：
(a)メラニン前駆体および抗原を含む組成物を提供する工程；
(b)メラニン－抗原複合体を形成するために、メラニン前駆体の重合を誘導する工程
を含む、免疫賦活組成物を得るための方法に関し、それによって、患者に投与した場合またはインビトロで細胞を培養した場合に、抗原に対する免疫応答を引き起こし得る免疫賦活組成物を得る（これは、その後患者または動物に投与され得る初回抗原刺激を細胞に与えるものである）。

【０１７７】

この方法で用いられる抗原は、レシピエントにおいて抗原に対する免疫応答が求められている抗原である。

【０１７８】

重合は、上記で示したように誘導される。したがって、酸化重合が好ましい。上記で示したように、インビトロで好ましく誘導されるが、インビボでも誘導され得る。

【０１７９】

特定の態様において、(a)の組成物は、アジュバントもまた含む。該アジュバントは、メラニン前駆体以外のものであり、好ましくは、ポリI:CおよびCpG-オリゴヌクレオチドからなる群において選ばれるアジュバントといった、TLR3またはTLR9アゴニストである。

【図面の簡単な説明】

【０１８０】

（図１）フェニルアラニンから出発したユーメラニンの合成スキームの説明。

（図２）１μgのオボアルブミンエピトープSIINFEKL (pOVA、SEQ ID NO: 2)または10μgまたはヒトgp100エピトープKVPRNQDWL (hgp100、SEQ ID NO: 3)を用いた免疫付与後のCTL応答。エピトープ ＋ CpG-28 (SEQ ID NO: 1)；エピトープ ＋ ドパ(D) ＋ CpG-28；または[エピトープ ＋ ドパ、18時間の共インキュベート（Dインキュベーション）] ＋ 10μgのCpG-28（pOVAに対して10μgのドパ; hgp100に対して100μgのドパ）を、C57-Bl6マウスに、2回注射（0日および7日）した。14日目に免疫応答を評価した。インビトロで、対応するMHCクラスI－制限ペプチドで脾細胞を再刺激し、IFNg-SFCの数（スポット形成細胞）を測定した。（代表的実験　n＝4マウス／群）

（図３）10μgのペプチドKVPRNQDWL (hgp100、SEQ ID NO: 3)または1μgのSIINFEKL (pOVA、SEQ ID NO: 2)で、ドパと組合せ（hgp100に対して100μg、pOVAに対して1μg）、および、それぞれ対して、H_2O_2で4時間または過硫酸アンモニウム（APS）で2時間、様々なモル比（酸化剤／ドパ）でのインキュベーションしたもの、による2回の免疫付与後のCTL応答。それぞれの処方において、免疫付与前に、マウスあたり10μgのCpG-28(SEQ ID NO: 1)を添加した。14日目に免疫応答を評価した。インビトロで、対応するMHCクラスI－制限ペプチドで脾細胞を再刺激し、IFNg-SFCの数（スポット形成細胞）を測定した。（n＝4マウス／群）。

（図４）１μgのpOVA(SIINFEKL、SEQ ID NO: 2)による免疫付与後のCTL応答。ペプチド ＋ CpG-28(SEQ ID NO: 1)、4時間インキュベートした[ペプチド ＋ １μgのドパ ＋ APS] ＋ CpG-28;または[ペプチド ＋ １μgのドパミン（Dn） ＋ APS] ＋ CpG-28を、C57-Bl6マウスに、2回注射（0日および7日）した。14日目に免疫応答を評価した。インビトロで、対応するMHCクラスI－制限エピトープSIINFEKLで脾細胞を再刺激し、IFNg-SFCの数（スポット形成細胞）を測定した。（代表的実験　n＝4マウス／群）

（図５）3．6μgすなわち長いOVAペプチド(pOVAl、SEQ ID NO: 4)による免疫付与後のCTL応答。ペプチド ＋ CpG-28(SEQ ID NO: 1)、または[ペプチド ＋ 100μgのドパミン(Dn) ＋ APS] ＋ CpG-28を、C57-Bl6マウスに、2回注射（0日および7日）した。14日目に免疫応答を評価した。インビトロで、対応するMHCクラスI－制限エピトープSIINFEKLで脾細胞を再刺激し、IFNg-SFCの数（スポット形成細胞）を測定した。（代表的実験　n＝4マウス／群）

（図６）10μgのヒトgp100エピトープ(hgp100、SEQ ID NO: 3)による免疫付与後のCTL応答。pH 8.5で、100μgのドパと18時間共インキュベートされたエピトープ(Agその後D)

；または、エピトープが加えられる前に酸素の存在下で事前にインキュベートされた100μgのドパ（Dその後Ag）を、C57-Bl6マウスに、2回注射（0日および7日）した。それぞれの処方において、免疫付与前に、マウスあたり10μgのCpG-28(SEQ ID NO: 1)を添加した。14日目に免疫応答を評価した。インビトロで、対応するMHCクラスI－制限ペプチドで脾細胞を再刺激し、IFNg-SFCの数（スポット形成細胞）を測定した。（代表的実験　n＝4マウス／群）

（図７）1μgのオボアルブミンエピトープ(SIINFEKL=pOVA、SEQ ID NO: 2)、または、ペプチドの始端(D-pOVA)または終端(pOVA-D)でドパと合成された1μgのエピトープによる免疫付与後のCTL応答。ペプチド ＋ 10μgのCpG-28(SEQ ID NO: 1)を、C57-Bl6マウスに、2回注射（0日および7日）した。14日目に免疫応答を評価した。インビトロで、SIINFEKL(SEQ ID NO: 2)ペプチドで脾細胞を再刺激し、IFNg-SFCの数（スポット形成細胞）を測定した。（n＝4マウス／群）。

（図８）pH8.5(トリス緩衝液)での72時間のインキュベーション後の薄層クロマトグラフィー（TLC）。左：hgp100 (SEQ ID NO: 3)のみ；中央：酸素と共インキュベーションした、hgp100 (1mg/ml)およびドパ(10mg/ml)；右：ドパ(10mg/ml)を酸素とインキュベートした後、hgp100 (1mg/ml)を添加。ドパとペプチドの両方を共インキュベートした場合、ペプチドは酸化したドパに捕捉され、もはや見られない。（固定相としてシリカゲルの薄層で被覆した、アルミニウム箔上でTLCを実施した。サンプルを載せた後、移動相として、1-ブタノール／酢酸／H_2O（2/1/1）の混合物を用いた。その後、TLCプレートをニンヒドリン試薬で噴霧した。）

（図９）pH8.5(トリス緩衝液)での72時間のインキュベーション後の薄層クロマトグラフィー（TLC）。左：hgp100(SEQ ID NO: 3)のみ；他のレーン：様々な用量のドパ（ドパ／hgp100の重量比：1／5～10／1）とインキュベートしたhgp100 (1mg/ml)。比が2を超えると、ペプチドはメラニン（酸化したドパ）と複合体を形成し、もはや見られない。（TLC：図8と同様の条件）

（図１０）3.6μgの異なるOVAペプチド：
SEQ ID NO: 5 (SMLVLLPKSVSGLSQLESIINFEKLTSWTS、中性) または
SEQ ID NO: 6 (SMLVLLPKKVSGLKQLESIINFEKLTKWTS、プラスに帯電)
による、免疫付与後のCTL応答。pH8.5で、100μgのドパと18時間共インキュベートしたエピトープを、C57-Bl6マウスに、2回注射（0日および7日）した。それぞれの処方において、マウス当たり10μgのCpG-28(SEQ ID NO: 1)を、免疫付与前に添加した。14日目に免疫応答を評価した。インビトロで、対応するMHCクラスI－制限エピトープSIINFEKLで脾細胞を再刺激し、IFNg-SFCの数（スポット形成細胞）を測定した。（n＝4マウス／群）

（図１１）様々な製剤のSDS-PAGE（16%ポリアクリルアミドゲル）：レーンMW：分子量マーカー；レーン「対照　EphA2」：対照ペプチドEphA2単独(SEQ ID NO: 9)；レーン「ろ液」：10kDフィルターでのろ過後のメラニン-EphA2複合体のろ液；レーン「保持液」：10kDフィルターでのろ過、再懸濁、溶解およびSDSを含むローディングバッファーにおける加熱後のメラニン-EphA2複合体の保持液。（メラニン－EphA2は、通気条件でEphA2ペプチドをL-ドパ（重量比1:10）と共インキュベートすることにより得られた。）

（図１２）gp100結合メラニンの物理化学的特性：UV-可視スペクトル（合成の間の時間経過における漸進的変化）。JASCO V630分光光度計（JASCO、Lisses、France）を用いてUV可視スペクトルを得た。L-ドパを重合した溶液を1/20に希釈し、異なるインキュベーション時間の後、経路長1cmの石英キュベットを用いてスペクトルを記録した。

（図１３）様々な処方で免疫付与した後の、脾細胞10^5個当たりのIFNγ分泌リンパ球の数。A. gp100(SEQ ID NO: 3)およびメラニンを有する特定の組成物におけるTLR9アゴニストの影響。B.gp100-メラニンを調製するためのインキュベーション培地における、免疫応答に関する抗原／L-ドパの比の影響。C.異なるgp100-メラニン組成物（様々な抗原用量）と、gp100、標準的アジュバント（フロイント不完全アジュバント、IFA）およびTLR9アゴニストに関連する組成物との比較。

（図１４）CD4およびCD8オボアルブミンエピトープの両方を含む合成ペプチド(pOVALs)(SEQ ID NO: 12)、単独またはメラニンを含む組成物でのいずれかによるマウスの免疫付与の後の、CD4またはCD8エピトープで刺激したときの細胞（脾細胞）10^5個当たりのIFNγ分泌細胞の数。マウスに対するこの結果は、0および14日目に免疫を付与して21日目に屠殺したもの(A)、または0および21日目に免疫を付与して42日目に屠殺したもの(B)、である。

（図１５）異なるワクチン製剤の時間経過における腫瘍体積の平均値。

【実施例】

【０１８１】

方法

全ての実施例において、H-2Kb(マウスMHC I)で示されるエピトープを用いた（マウスMHC-IIエピトープも用いる実施例18を除く）。

【０１８２】

5週齢のC57-Bl6マウスに、Toll様受容体9(TLR-9)アゴニスト（10μgのCpG-28オリゴヌクレオチド：
TAAACGTTATAACGTTACGACGTCAT (SEQ ID NO:1)
）と組み合わせた、異なる製剤で2回免疫付与した（1日目および7日目）。2回の免疫付与の後、関連するMHCクラス-Iエピトープ（オボアルブミンのSIINFEKL(SEQ ID NO: 2)またはヒトgp100のKVPRNQDWL（SEQ ID NO: 3)）による総脾細胞の再刺激の後に、ガンマインータフェロン（IFNg）分泌物エリスポットアッセイを用いて14日目にCD8+免疫応答を評価した。

【０１８３】

実施例1－酸化剤の存在下での抗原およびメラニン前駆体のインキュベーションが免疫応答を誘導する

オボアルブミンエピトープ(SIINFEKL、SEQ ID NO: 2)単独、または10μgのドパとの混合、またはドパと混合しさらに酸化を促進するために酸素の存在下で18時間インキュベートしたものを、ワクチン製剤に用いた。エピトープ単独のものは何ら顕著なCD8免疫応答を引き起こさなかった一方、ドパとの組合せ、特にインキュベーション後のものは、IFNgスポットを誘導することができた。不十分な免疫原性のヒトgp100エピトープ(KVPRNQDWL、SEQ ID NO: 3)で同様のデータが得られた。極めて少量のエピトープを用いることができる。

【０１８４】

これらの結果を図2に示す。

【０１８５】

特に、このモデルでは、10ngというわずかなSIINEFKL (SEQ ID NO: 2)で、免疫応答を検出するのに十分であった（データは示さず）。

【０１８６】

実施例2－免疫応答は使用される酸化剤に依存しない（化学的または酵素的酸化のいずれか）

過酸化水素（H_2O_2）または過硫酸アンモニウム（APS）といった他の酸化剤を使用することができる（図3）。

【０１８７】

それぞれのケースにおいて、使用される抗原および酸化剤に応じて、最適な濃度が容易に決められる。

【０１８８】

前述したとおり、CTL応答は、酸化剤を何ら添加しなくても見られたが、ワクチンの有効性は、酸化によって概して増進し、酸化剤／ドパの最適なモル比は約1／4であった。

【０１８９】

塩化第二鉄といった他の酸化剤も用いることができ、同様の結果につながる。

【０１９０】

表1に示すように、キノコチロシナーゼを用いた酵素酸化も、強い免疫応答の獲得につながった。

【０１９１】

【表１】

酸化手順	免疫付与 プロトコール	マウスの 数	IFNγ分泌リンパ球の数 平均値+/−SD	陰性対照 （無関係の エピトープ） 平均値+/−SD
L−ドパ + Cu^{2+} 5mM (+O_2), インキュベーション時間: 18h	0日目および8日目、 屠殺14日目	4	47+/-47	1+/-1
L−ドパ + Fe^{3+}5mM (+O_2), インキュベーション時間: 18h	0日目および8日目、 屠殺14日目	4	160+/-52	0+/-1
L−ドパ + Fe^{3+}20nM (+O_2), インキュベーション時間: 18h	0日目および8日目、 屠殺14日目	4	162+/-118	1+/-2
L−ドパ + キノコチロシナーゼ (+O_2), インキュベーション時間: 18h	0日目および8日目、 屠殺14日目	8	246+/-164	1+/-1

【０１９２】

実施例3－免疫応答は他のメラニン前駆体で観察される

本実施例は、ドパミンをドパの代わりに用い得ることを示す（図4）。本実験では、1μgのドパまたは1μgのドパミンを、1μgのSIINFEKL（pOVA、SEQ ID NO: 2)と混合し、過硫酸アンモニウム（APS）酸化剤と4時間インキュベートし、次いで10μgのCpG-28とともにワクチン製剤として用いた。

【０１９３】

実施例4－エピトープを含む長い抗原の使用もなお、エピトープを処理し、適切に提示することを可能にする

長いペプチドといった他の抗原が同じ手順でCTL応答を誘導することができることを示すために実験を実施した。SIINFEKLエピトープ(SEQ ID NO: 2)を含む、長いOVAペプチド：

(SMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTS (SEQ ID NO: 4)

を単独で試験するか、またはこれをドパミンと組み合わせAPSと4時間インキュベートしたもののいずれかを用い、次いで10μgのCpG-28とともにワクチン製剤として使用した。ドパミンを含む製剤だけが免疫応答を引き起こした（図5）。

【０１９４】

実施例5－様々なアジュバントを組成物で使用できる

この実験では、様々なアジュバントが製剤［抗原＋ドパ］に有利に添加可能であることが示された。

【０１９５】

この実験では、上記方法で記載したものと同じプロトコールにしたがって、使用したアジュバントをCpG-ODNに置換した。

【０１９６】

SIINFEKLエピトープ(SEQ ID NO: 2)を、100μgのドパと組み合わせて（または組み合わせずに）、さらに酸化を促進するために酸素の存在下で18時間インキュベートし、次いで、10μgのCpG-28(TLR9アゴニスト)、10μgのポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリI:C）(TLR3アゴニスト)とともに、またはフロイントアジュバントまたはアルミニウム塩（ミョウバン）（体積/体積 1/1）と混合して、ワクチンとして使用した。

【０１９７】

14日目でのCD8免疫応答は、ドパなしの抗原で観察されるものより、［ドパ－抗原］組成物において顕著に高く、特にTLR3またはTLR9リガンドを用いた場合に、高かった。

【０１９８】

実施例6－免疫応答は体液性応答を含む

メラニン／抗原の組成物を用いる免疫付与は、体液性応答を誘導する（循環抗体）。

【０１９９】

オボアルブミンタンパク質（1μg）をpH7.4でドパ（1μg）と混合し、APS（0.3μg)と4時間インキュベートし、0日目および7日目にC57/Bml6マウスに10μgを皮下注射した。

【０２００】

14日目に、IgG1（1/8000)およびIgG2b（1/5250)サブタイプの両方に抗オボアルブミン抗体の顕著な力価が見られ、混合したTh1およびTh2免疫応答を示した。

【０２０１】

実施例7－共インキュベーションを介した複合体の形成が好ましい

抗原とカテコール部分とのその酸化の間の共インキュベーションにより、
引き起こされた免疫を強化することができることが示された。

【０２０２】

10μgのhgp100エピトープ(KVPRNQDWL、SEQ ID NO: 3)を、pH8.5で100μgのドパと混合し、次いで酸化を促進するための酸素の存在下で18時間インキュベートするか、または、エピトープを添加する前に、酸化を促進するために酸素の存在下で予めインキュベートしたドパの溶液と混合した。

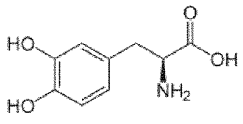
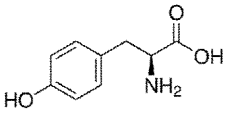
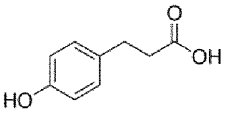
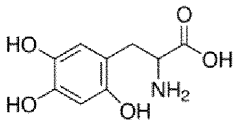
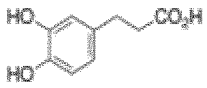
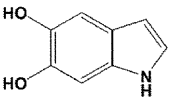
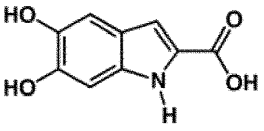
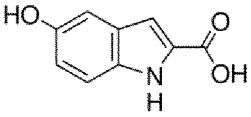
【０２０３】

エピトープをドパと共インキュベートした場合、著しいCD8免疫応答が見られた（図6）。

【０２０４】

実施例8：免疫応答を様々なメラニン前駆体の誘導体で得ることができる

L-ドパは、使用に便利なカテコールであり、溶解性メラニンに至る。しかしながら、他のメラニン前駆体を使用することができる。本実験では、トリス緩衝液中pH8.5で、10μgのhgp100エピトープ(KVPRNQDWL、SEQ ID NO: 3)を、下記：

- 100μgドパ、
- 100μg L-チロシン、
- 100μg 3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、
- 100μg 6-ヒドロキシ-ドパ、
- 100μg ジヒドロカフェー、
- 100μg DHI、
- 100μg DHICA、
- 50μg DHI+50μg DHICA、または
- 100μg HICA、

のいずれかと混合した。

【０２０５】

溶液を、その後、酸化を促進するための酸素の存在下で18時間インキュベートした。

【０２０６】

それぞれの製剤において、様々なメラニン前駆体での皮下免疫の前に、マウスあたり10μgのCpG-28が添加された。マウスに、0日目および8日目に免疫を付与して14日目に屠殺、または、0日目に1回免疫付与して8日目に屠殺した。

【０２０７】

特に、エピトープを、ドパ（L-ドパまたはD-ドパ）、または6－ヒドロキシドパ、またはジヒドロキシナフタレンと共インキュベートした場合に、著しいCD8免疫応答が見られた。ドパミンおよびBoc-ドパ（N-(tert-ブチロキシカルボニル)-L-ドパ）でも、減少した大きさで、免疫応答が見られた。

【０２０８】

メラニン前駆体の側鎖上のアミノ基、およびフェノール環上の2-ヒドロキシル部分の存在が、生物活性に極めて有利と考えられ、したがって、好ましい。

【０２０９】

実施例9：複合体は重合したメラニンと抗原との間で形成される

薄層クロマトグラフィー（TLC）によるインビトロ試験は、カテコールが酸化される間のペプチドのインキュベーションが、最終的な製剤の特性を改変することおよび複合体が2つの物体の間で形成されるという仮説を支持している（図8）。

【０２１０】

ドパが酸化された後にhgp100が添加された場合のみ、遊離のペプチドがTLC上に見られたが、ドパとhgp100が酸化剤と共インキュベートされた場合は遊離のペプチドは見られなかった。

【０２１１】

酸化剤の存在下でのペプチドの安定性が確認され、ペプチドの消失がしたがって、酸化剤に起因するものではないことに留意すべきである。

【０２１２】

薄層クロマトグラフィー（TLC）を使用することにより、所定の量のペプチドの投入に必要なカテコールの最小投与量を、容易かつ定型的に規定することができる。たとえば、hgp100を用いる場合に、ドパ／ペプチドの重量比は、2超が好ましい（図9）。

【０２１３】

実施例10－免疫応答は、抗原に共有結合したドパの重合の後に得られる

１μgのオボアルブミンエピトープ（pOVA，SIINFEKL、SEQ ID NO: 2）、または、ペプチドの始端(D-SIINFEKL、D-pOVA)または終端(SIINFEKL-D、pOVA-D)でドパと合成された1μgのエピトープのいずれかで、マウスに免疫付与した。エピトープ単独では、著しいCD8免疫応答を何ら引き起こさなかった一方、修飾ペプチド、特にC末端ドパのものは、強いCTL免疫応答を誘導した（図7）。

【０２１４】

実施例11－他のアジュバントを酸化の前または後に添加してもよい

CpG-28オリゴヌクレオチドの存在下、hgp100エピトープ(KVPRNQDWL、SEQ ID NO: 3)とともにL-ドパ(100μg)をインキュベートし、次いで、酸化を促進するための酸素の存在下で18時間インキュベートした。

【０２１５】

別法として、L-ドパとhgp100エピトープの酸化の後に、CpG-28オリゴヌクレオチドを添加した。

【０２１６】

得られた組成物によるマウスの免疫付与の後に得られた免疫応答は同じであり、したがって、このことは、酸化（重合）反応の前または後に他のアジュバントを添加してもよいことを示している。

【０２１７】

実施例12－複合体を形成したメラニン－抗原組成物は、溶解性メラニン溶液として得ることができる

pH7.4または8.5で、pOVA(0.1mg/ml)を用いてまたは用いないで、および異なる酸化剤（O_2、過硫酸アンモニウム）を用いて、20時間、ドパ(2mg/ml)またはドパミン(2mg/ml)溶液をインキュベートした。全ての溶液は、数時間以内に黒ずんだ。光学顕微鏡の下で、ドパミンとともに、大きな凝集体が見られた。遠心分離により、ドパミン溶液は沈澱し、いくらかの暗色物質が管に付着したままであった。

【０２１８】

反対に、ある条件では（たとえば、pH8.5で酸素とインキュベートした場合）、遠心分離の後（16000gで30分間）でさえ、ドパ溶液は、沈澱せず、管への付着もなかった。これらのドパ溶液は数週間安定したままであり、光学顕微鏡で凝集体は見られない。この溶液は、0.2μmフィルターを通してろ過できるが、100kダルトン-カットオフフィルター(おおよそ0.01μm)ではろ過できない。

【０２１９】

結論として、いずれの化合物も、ワクチン製剤において成功裏に使用できるが、それらの特性は異なる。この理論に縛られることなく、これはそれぞれの製剤におけるDHIとDHICAの異なる割合によるかもしれない。

【０２２０】

出発組成物において様々な割合のドパとドパミンを使用することにより、（特に、抗原の特性および特に抗原の電荷にしたがって）、様々な生薬製剤に有利に至ることができる

。

【０２２１】

実施例13－複合体を形成したメラニン－抗原組成物は着色溶液である

製剤を調製するため、L-ドパの溶液がペプチドの溶液と混合され（L-ドパ：エピトープの重量比が、エピトープに応じて、1：100～1：1、好ましくは1：10～1：2）、混合物が次いで通気条件でpH8.5で酸化されることが好ましい。

【０２２２】

工程は紫外分光法を用いて観察することができ、これらの条件の下、無色のL-ドパ溶液は黒色に変化し、合成メラニンを生成した（図12）。L-ドパ酸化の反応速度論は、350/280nmの割合で評価し得る。これらの条件の下、10kDaフィルターを通してろ過した場合、黒色物質が上部チャンバーに保持され、食塩水で容易に再懸濁できた。得られる生成物（メラニンとペプチドの両方を含む）は、フーリエ変換赤外分光光度計（FITR）、核磁気共鳴（NMR）、または透過型電子顕微鏡を用いてさらに特徴付けることができる。

【０２２３】

実施例14-抗原電荷の修飾により組成物の免疫応答および免疫原性を向上させることができる

ペプチドpOVA1 (SEQ ID NO: 4)の電荷は負であり、したがってその配列を、

中性：

(SMLVLLPKSVSGLSQLESIINFEKLTSWTS、SEQ ID NO: 5)

または、正：

(SMLVLLPKKVSGLKQLESIINFEKLTKWTS、SEQ ID NO: 6)

に改変した。これらのペプチドを、メラニン前駆体としてのドパ（負に帯電したCOO-部分を示している）と共に用いた場合、2回の免疫付与の後に得られた免疫応答は、正に帯電したペプチドでは強く、中性のペプチドでは中程度であった（図10）。

【０２２４】

これらのペプチドと、メラニン前駆体としてのドパミン（生理学的pHで正に帯電している）で免疫付与した後得られた結果は、正反対であった（すなわち、最も高い免疫応答は、SEQ ID NO:4(負に帯電したペプチド)で観察され、最も低いのはSEQ ID NO: 6(正に帯電)で観察され、SEQ ID NO: 5での応答は中程度であった）。

【０２２５】

要するに、これらの結果は、得られるメラニンの電荷と同じでない電荷にするために抗原を修飾することが有利であることを示している。

【０２２６】

正に帯電したアミノ酸を何ら含まないTrp2(VYDFFVWL、SEQ ID NO: 7)のMHC Iエピトープで、同様のデータが得られた。

【０２２７】

ペプチドのNH2-端末側終端へのアルギニン(R)またはリジン(K)の添加により、非修飾Trp2と比較して、免疫応答が増加した。（L-ドパ（100μg／マウス）と共インキュベートし、次いでCpG-28 (10μg／マウス)と混合した、ペプチド（10μg／マウス）からなる製剤で、動物は1回免疫付与された。CD8免疫応答を、8日目に評価した。）

【０２２８】

Balb/cマウスにおいてウイルスエピトープで同様のデータが得られた(gPr73: SFAVATTAL、SEQ ID NO: 8)。NH2-端末側終端でのリジンの添加により、免疫応答が著しく増加した。両ケースにおいて、リジンの次にグルタミン酸塩（E）を添加した場合、有効性が減少した（表2）。

【０２２９】

【表２】

エピトープ構造	マウスの数	IFNγ分泌リンパ球の数 平均値+/-SD	スチューデントのt検定 (天然のエピトープと比較)
Trp2	7	30 +/- 34	/
K-Trp2	7	226 +/- 79	p<0.001
R-Trp2	7	220 +/- 56	p<0.001
KAR-Trp2	8	210 +/- 78	p<0.001
KE-Trp2	7	30 +/- 9	p=n.s.
gPr73	8	5 +/- 4	/
K-gPr73	8	21 +/- 16	p=0.02
KE-gPr73	8	14 +/- 22	p=n.s.

【０２３０】

実施例15－流入領域リンパ節におけるメラニンの分布

10μgのhgp100エピトープ(KVPRNQDWL、SEQ ID NO: 3)を、pH8.5で100μgのドパと混合し、次に、酸化を促進してgp100結合メラニン(gp100-メラニン)を生成するため、酸素の存在下で18時間インキュベートした。

【０２３１】

インビボでこの製剤の分布を評価するため、マウスに[gp100-メラニン ＋ CpG-28]または生理食塩水を皮下注射し、2または7日目に屠殺した（n=3／群）。天然メラニンに起因する如何なるバイアスも避けるため、これらの実験は、生まれつきメラニンを持っていないBalb/cマウスで実施した。gp100-メラニンを注射した動物において、注射から2日後に、鼠径部流入領域リンパ節の黒色色素沈着が肉眼で見えた。フォンタナ・マッソン染色により、洞、およびそれほどではないにせよT細胞領域である副皮質領域に、無数のメラニンを含んだマクロファージを確認した。メラニン分布のパターンは、注射後2および7日目と同様であった。生理食塩水だけを受けたマウスにはメラニンは観察されなかった。これらの結果は、ワクチン製剤が、インビボで流入領域リンパ節に有効に到達したことを示している。この発見は、抗原特異的免疫の導入が、リンパ節のT細胞領域に存在するナイーブT細胞とDCの直接の相互作用に依存するという事実と一致している。

【０２３２】

実施例16－ワクチン組成物の改良

遊離のgp100ペプチドおよびgp100-メラニンをワクチン製剤として単独で使用、またはTLR9アゴニストCpG-28(CpG)と混合して使用した（n=8　マウス／群）。

【０２３３】

CpGと組み合わせた場合、gp100ではなく、gp100-メラニンは、著しい数のIFNγ分泌リンパ球を誘導した(p<0.001)(図13A)。

【０２３４】

gp100エピトープが、L-ドパを酸化した後（前ではなく）にワクチン製剤に添加された場合には、CTL応答の減少が観察された(p<0.01)。

【０２３５】

L-ドパ：エピトープの重量比が1：1から著しい免疫が得られ、比が4：1で最大の応答が観察された（図13B）。CTLを誘導するのに必要となるgp100エピトープの最小の用量は、0.5μgであった（p<0.01、試験した最も低い濃度と比較した場合）（図3c）。10および50μgのgp100エピトープの両方において、我々のワクチン製剤は、CTL応答を引き起こすのに通常使用される組合せである、フロイント不完全アジュバント（IFA）およびTLR9アゴニストの組合せと比較して、有利であった(p<0.01)（図13C）。

【０２３６】

実施例17－メラニン－抗原複合体

メラニン内にペプチドが含まれることの証拠が得られた。

【０２３７】

L-ドパの溶液を、EPHA2ペプチド(FSHHNIIRL、SEQ ID NO: 9)と、L-ドパ：エピトープ＝1:4の重量比で混合した。混合物を、その後、通気条件でpH8.5で酸化した。

【０２３８】

当該製剤を、10kDフィルターでろ過した場合、メラニンはフィルターに保持され、ろ液にペプチドは検出できず（図11、レーンろ液）、このことは、EPHA2ペプチドがメラニンに結合したことを示唆している。実際、この保持液を、強力な界面活性剤（SDS）を含むローディングバッファー中で再懸濁し、溶解し、加熱した場合、EPHA2ペプチドがメラニンから解離し、SDS-page（16%ポリアクリルアミドゲル)上に個別化することができた（図11、レーン保持液）。

【０２３９】

実施例18－免疫応答の分析

我々の製剤の、CD4免疫応答(MHCクラスIIエピトープ)を引き起こす能力を評価した。

【０２４０】

この目的のため、CD4：
(ISQAVHAAHAEINEA、SEQ ID NO: 10)
およびCD8(SIINFEKL、SEQ ID NO: 11)オボアルブミンエピトープを両方とも含む合成ペプチド(pOVALs)を合成した。このペプチドは、配列：
SLKISQAVHAAHAEINEAGRLRGSIINFEKLTKWR、SEQ ID NO: 12)
を有している。このペプチド（10μg／マウス）を、L-ドパの溶液（40μg／マウス）と混合し、通気条件で18時間インキュベートして、pOVAs-メラニンを生成し、ワクチンとして使用した（任意のTLR9アゴニストまたは任意の更なるアジュバントなしで）。

【０２４１】

マウスに、0および14日目に免疫付与して21日目に屠殺、または0および21日目に免疫付与して42日目に屠殺した。

【０２４２】

CD4またはCD8エピトープによるインビトロ刺激の後、脾細胞によるエピトープ特異的IFNγ産生が明らかになった。

【０２４３】

いずれのケースにおいても、メラニンを有する製剤は、著しいCD4免疫応答を引き起こした。さらに、CD8免疫応答も見られ、TLR9アゴニストの製剤への付加が必要ないことを示している（図14）。

【０２４４】

実施例19－様々なアジュバントの使用

メラニン／抗原複合体により、マウスにおける免疫応答を引き起こしかつ向上させる、CpG-28以外の、よく説明されているTLR9アゴニストの能力を評価した。

【０２４５】

gp100ペプチド(10μg／マウス)を、L-ドパ(40μg／マウス)と混合し、通気条件で18時間インキュベートし、様々なTLR9アゴニスト：CpG-28、ODN-1826
(TCCATGACGTTCCTGACGTT、 SEQ ID NO: 13
またはISS
(TGACTGTGAACGTTCGAGATGA、SEQ ID NO: 14)
と混合し、次いでワクチン製剤として使用した。

【０２４６】

免疫応答の大きさは、全てのTLR9アゴニストに対して同様であった。

【０２４７】

【表３】

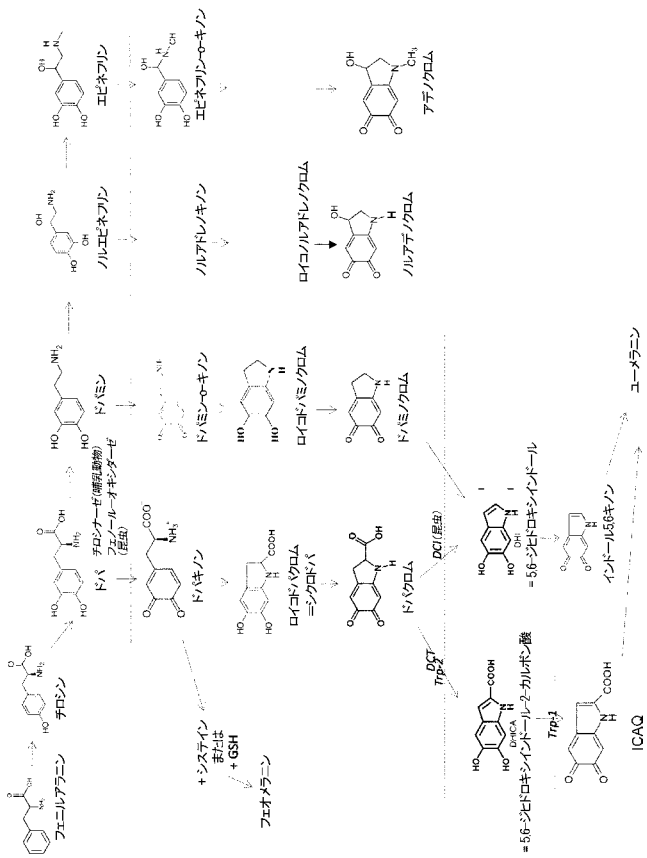
TLR9アゴニスト	マウスの数	IFNγ分泌リンパ球の数 平均値+/-SD	スチューデントの t検定 (CpG-28と比較)
CpG-28 (TLR9アゴニスト)	4	211 +/- 83	/
1826 (TLR9アゴニスト)	4	134 +/- 54	p=n.s.
ISS (TLR9アゴニスト)	4	147 +/- 63	p=n.s.

【０２４８】
ポリI:C（ポリI:C＝ポリイノシン酸：ポリシチジル酸）、TLR3アゴニストの有効性も評価した。
【０２４９】
C57BL/6マウスを、gp100(10μg／マウス）＋ ポリI:C（10μg／マウス)、またはL-ドパ（40μg／マウス）と混合したgp100ペプチド(10μg／マウス)を通気条件で18時間インキュベートしポリI:C（10μg／マウス)と混合したもので免疫付与した。
【０２５０】
TLR9アゴニストで見られたのと同様に、ポリI:Cを組み合わせた場合、メラニン形成は、遊離ペプチドの場合を上回った（IFNγ分泌リンパ球の平均数+/-SD：それぞれ20+/-18対1+/-1、p=0.02）。
【０２５１】
実施例20－pOVA30-メラニンの皮下注射は樹立同系腫瘍を防ぐ
これらのCD8+T細胞がインビボで機能するかどうかを次に調べた。
【０２５２】
C57BL/6マウスに、オボアルブミン－トランスフェクト細胞(E.G7-OVA)を皮下注射し、マウス（n=10/群）を、[メラニン + CpG-28]、[pOVA30-メラニン + CpG-28]、[pOVA30 + CpG-28]で、4および18日目に免疫付与した。全てのマウスが測定可能な腫瘍を発達させた。
【０２５３】
pOVA30ペプチド：
(SMLVLLPKKVSGLKQLESIINFEKLTKWTS、SEQ ID NO: 15)
は、オボアルブミンタンパク質のCD8エピトープ(SIINFEKL、SEQ ID NO: 11)を含む。上述したように、通気条件でのペプチドとL-ドパの共インキュベーションにより、pOVA30-メラニンが生成した。
【０２５４】
[pOVA30-メラニン + CpG-28]による免疫付与の後だけ、コントロール群におけるものと比較して腫瘍成長の著しい減少が観察された(p<0.001)(図15)。2/10のマウスで完全な腫瘍退縮が起こった。
【０２５５】
考察およびコメント
上記実施例は、メラニンと抗原の複合体による免疫付与により、宿主における免疫応答を得ることが可能になることを示している。この免疫応答は、抗原を単独で用いる場合よりも高い。抗原の電荷と、複合体において重合しているメラニン前駆体の電荷が互いに適合した場合（好ましくはこれらが同じ符号ではない場合）に、免疫応答が強化され得る。
【０２５６】
これらの実験で使用された大部分のペプチドは、単一のMHCエピトープを含んでいることにも留意すべきである。したがって、アジュバントは、見られるべき最適な免疫応答のために通常好ましかった。

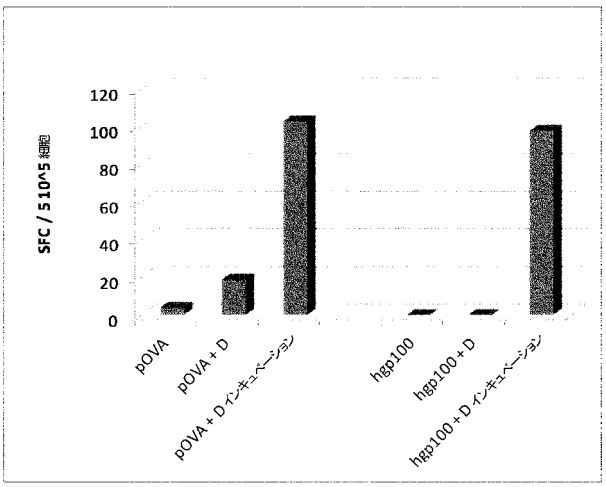
【０２５７】

しかしながら、T-ヘルパーおよびMHCクラス-Iエピトープを組み合わせることにより、おそらくT-ヘルパーエピトープが、ヘルパーT細胞の補強およびMHCクラス-Iエピトープにリンクした細胞傷害反応の増強を与え、アジュバントの必要なく、著しい免疫応答を誘導する本発明にしたがう免疫原性組成物を与えることも示された。

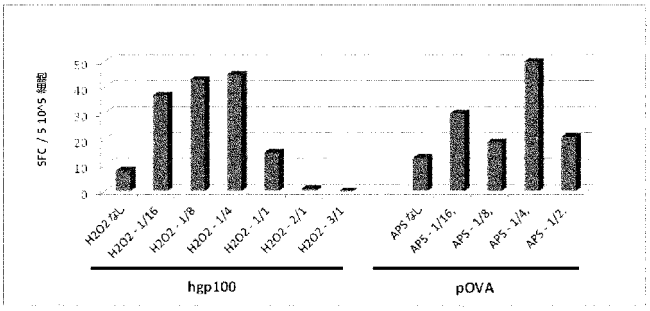
【図１】



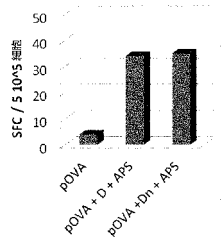
【図２】



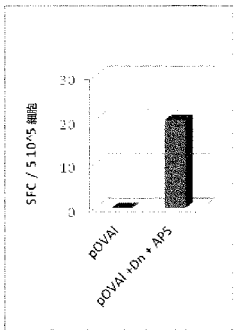
【図３】



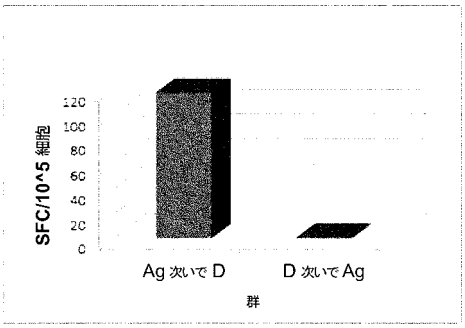
【図４】



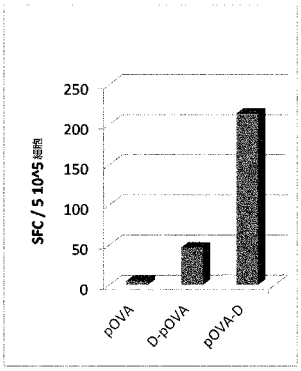
【図５】



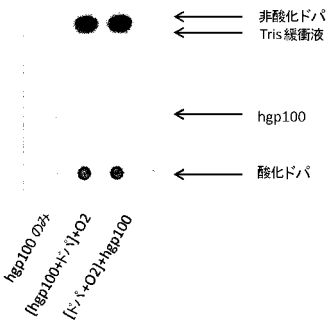
【図６】



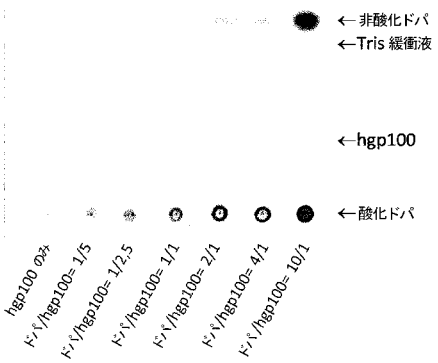
【図７】



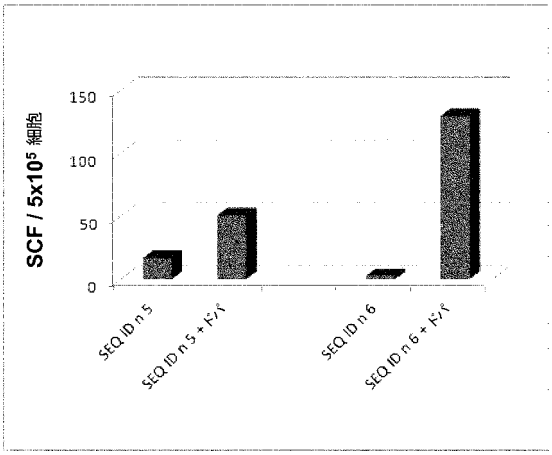
【図８】



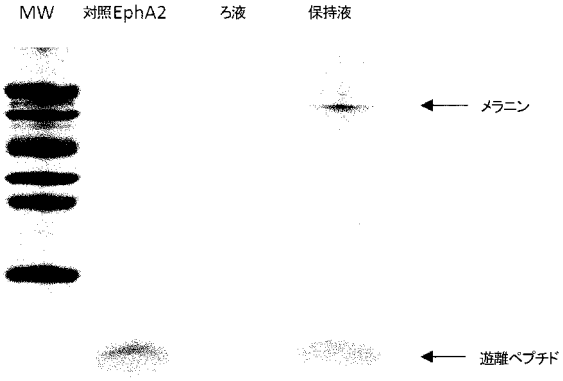
【図９】



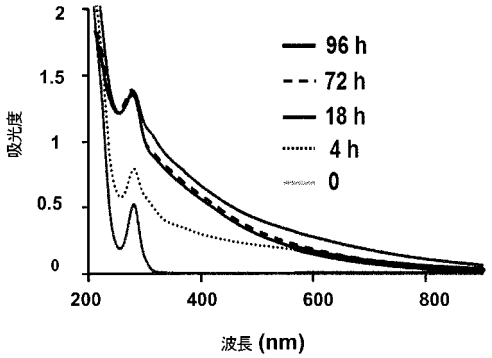
【図１０】



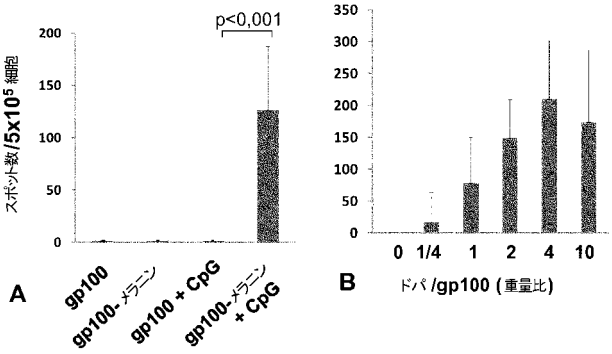
【図１１】

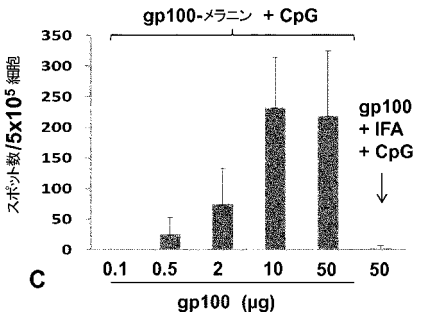


【図１２】

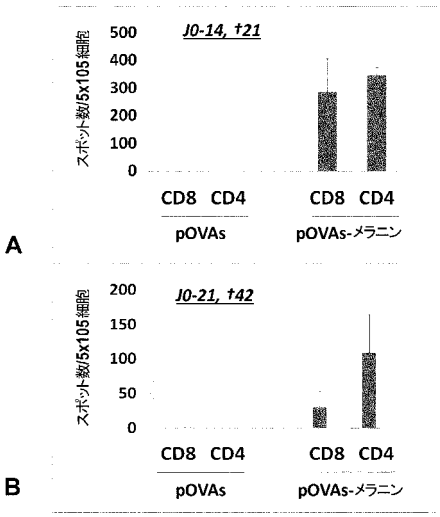


【図１３】

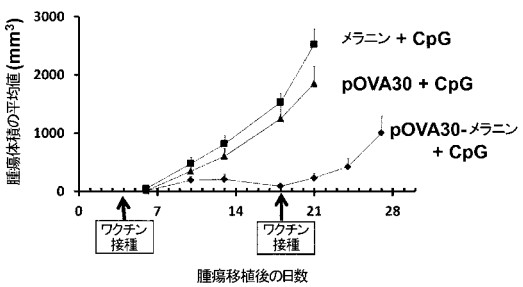




【図１４】



【図１５】



【配列表】
2018535271000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/078794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/385 A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUTH ARNON ET AL: "Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. 2. Antigenic specificity of polytyrosyl gelatins", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 75, no. 1, 1 April 1960 (1960-04-01), pages 103-109, XP055261072, GB ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/bj0750103 p. 103 left-hand column first full paragraph, p. 103 left-hand column last 2 lines - right-hand column 6th full paragraph, p. 104 left-hand column 3rd full paragraph, and paragraph bridging the left- to the right-hand column, p. 105 right-hand column first full paragraph - p. 107 left-hand column last full paragraph, p. 108 right-hand column second full paragraph - p. 109 right-hand column -/--	1-22

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 January 2017	17/03/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hermann, Patrice

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/078794

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	fifth full paragraph -----	
X	M. SELA ET AL: "Studies on the Chemical Basis of the Antigenicity of Proteins 1. ANTIGENICITY OF POLYPEPTIDYL GELATINS", BIOCHEM. J., vol. 75, 1 January 1960 (1960-01-01), pages 91-102, XP055261301, p. 95 left-hand column first full paragraph - right-hand column third full paragraph, p. 96 left-hand column third full paragraph p. 100 right-hand column last 4 lines - p. 102 left-hand column second full paragraph, Tables 1-9 and Fig. 1-4 -----	1-22
X	Takami Akagi ET AL: "Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine" In: "Bioactive Surfaces", 1 January 2011 (2011-01-01), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, XP055215260, ISSN: 0065-3195 ISBN: 978-3-64-220155-4 vol. 247, pages 31-64, DOI: 10.1007/12_2011_150, abstract, p. 37 first full paragraph - p. 40 line 2, p. 45 last paragraph - p. 49 first full paragraph, p. 53 first paragraph - p. 54 line 7 p. 55 last paragraph - p. 56 second full paragraph, fig. 3-6 and 10-15 -----	1-22
X	US 2004/057958 A1 (WAGGONER DAVID W [US] ET AL) 25 March 2004 (2004-03-25) abstract, [0009]-[0029], [0064]-[0079], [0109]-[[0151], examples 1-3 and claims -----	1-22
A	YOSHIO FUJITA ET AL: "Current status of multiple antigen-presenting peptide vaccine systems: Application of organic and inorganic nanoparticles", CHEMISTRY CENTRAL JOURNAL, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 5, no. 1, 23 August 2011 (2011-08-23) , page 48, XP021109507, ISSN: 1752-153X, DOI: 10.1186/1752-153X-5-48 the whole document -----	1-22
	-/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/078794

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JIWEI CUI ET AL: "Immobilization and Intracellular Delivery of an Anticancer Drug Using Mussel-Inspired Polydopamine Capsules", BIOMACROMOLECULES, vol. 13, no. 8, 13 August 2012 (2012-08-13), pages 2225-2228, XP055260822, US ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm300835r abstract, p. 2226 left-hand column first full paragraph - p. 2227 right-hand column first full paragraph and Fig. 1-4 -----	7-12, 20-22
Y	XINYU CUI ET AL: "Polydopamine used as Hollow Capsule and Core-Shell Structures for Multiple Applications", NANO, vol. 10, no. 05, 1 July 2015 (2015-07-01), page 1530003, XP055260886, SG ISSN: 1793-2920, DOI: 10.1142/S1793292015300030 the whole document -----	7-12, 20-22
Y	HAESHIN LEE ET AL: "FACILE CONJUGATION OF BIOMOLECULES ONTO SURFACE ADHESIVE PROTEIN INSPIRED COATINGS", ADVANCED MATERIALS, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 21, no. 4, 26 January 2009 (2009-01-26), pages 431-434, XP002664003, ISSN: 0935-9648, DOI: 10.1002/ADMA.200801222 [retrieved on 2008-11-25] the whole document -----	7-12, 20-22
Y	JOONYOUNG PARK ET AL: "Polydopamine-Based Simple and Versatile Surface Modification of Polymeric Nano Drug Carriers", ACS NANO, vol. 8, no. 4, 22 April 2014 (2014-04-22), pages 3347-3356, XP055281188, US ISSN: 1936-0851, DOI: 10.1021/nn405809c abstract, p. 3348 right-hand column first full paragraph, paragraph bridging p. 3350 to p. 3351 - p. 3352 left-handcolumn line 5, p. 3353 left-hand column first full paragraph ----- -/--	7-12, 20-22

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/078794

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/237605 A1 (MESSERSMITH PHILLIP B [US] ET AL) 20 September 2012 (2012-09-20) abstract, paragraphs [0008] - [0018], [0061] - [0064], [0197], [0200], examples and claims -----	7-12, 20-22
T	QI LIU ET AL: "Pathogen-Mimicking Polymeric Nanoparticles based on Dopamine Polymerization as Vaccines Adjuvants Induce Robust Humoral and Cellular Immune Responses", SMALL, 1 February 2016 (2016-02-01), pages n/a-n/a, XP055260724, DE ISSN: 1613-6810, DOI: 10.1002/smll.201503662 -----	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/078794

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-6, 13-19(completely); 7-12, 20-22(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/078794

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004057958 A1	25-03-2004	NONE	
US 2012237605 A1	20-09-2012	US 2012237605 A1	20-09-2012
		US 2014271889 A1	18-09-2014
		US 2016228549 A1	11-08-2016
		WO 2012125693 A2	20-09-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/ EP2016/ 078794

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6, 13-19(completely); 7-12, 20-22(partially)

Invention 1 relates to immunostimulatory composition comprising a melanin macromolecule complexed with an antigen, more specifically wherein the melanin precursor is L-tyrosine; method of using the same for eliciting an immune response and method for synthesizing such macromolecule.

1.1. claims: 7-12, 20-22(all partially)

Inventions 1.1 relates to an identical subject-matter as invention 1, wherein the melanin precursor is L-dopa.

2-12. claims: 7-12, 20-22(all partially)

Inventions 2-12 relates to an identical subject-matter as invention 1, wherein the melanin precursors are respectively D-dopa, 6-hydroxy-dopa, dopaquinone, cyclodopa, dopachrome, DHICA, DHI, dopamine-o-quinone, dopamine, leukodopaminochrome and dopaminochrome.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA

(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 カルパンティエ アントワーヌ
フランス共和国 ７５００７ パリ アヴニュー ボスケ ２８
(72)発明者 ベナッシ クレール
フランス共和国 ９４３００ ヴァンセンヌ リュ ルロワイエ ３３

Ｆターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA01 CC40 DD86 EE06 FF01 FF12 FF13 FF14
FF17 FF18 GG04
4H045 AA11 AA30 BA15 BA53 CA40 DA70 EA31