



(21) 申請案號：111145092

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 24 日

(51) Int. Cl. :

*C12N1/20 (2006.01)**C12N5/0781 (2010.01)**C07K14/005 (2006.01)**C07K14/195 (2006.01)**C07K14/37 (2006.01)**A61K39/02 (2006.01)**A61K39/12 (2006.01)**A61P31/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2021/12/02 日本

2021-196561

(71) 申請人：新藏礼子 (日本) SHINKURA, REIKO (JP)

日本

(72) 發明人：新藏礼子 SHINKURA, REIKO (JP)；高鵬 GAO, PENG (CN)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：15 共 99 頁

(54) 名稱

免疫賦活化組合物

(57) 摘要

本發明係關於一種包含誘導 B 細胞中之 CD11b 之表現之物質且用以誘導活化 B 細胞之生發中心(germinal center)移行之組合物、其製造方法、或其用途。於一態樣中，本發明係與使用誘導 B 細胞中之 CD11b 之表現之物質進行免疫賦活化、維持或改善黏膜菌群相關。

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

免疫賦活化組合物

### 【中文】

本發明係關於一種包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以誘導活化B細胞之生發中心(germinal center)移行之組合物、其製造方法、或其用途。於一態樣中，本發明係與使用誘導B細胞中之CD11b之表現之物質進行免疫賦活化、維持或改善黏膜菌群相關。

### 【指定代表圖】

無

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

免疫賦活化組合物

### 【技術領域】

#### 【0001】

本發明係關於一種包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以誘導活化B細胞之生發中心移行之組合物、其製造方法、或其用途。於一態樣中，本發明係與使用誘導B細胞中之CD11b之表現之物質進行免疫賦活化、維持或改善黏膜菌群相關。

### 【先前技術】

#### 【0002】

關於B細胞或生發中心(GC)於免疫反應中之行為之研究的動機在於其有可能有助於疫苗開發(非專利文獻1、2)。在評價疫苗之有效性之方面的重要基準之一是該疫苗是否可有效率地誘導生發中心(GC)反應，生成高親和性之長壽命漿細胞(PC)或記憶B細胞，以保護宿主免受病原體入侵(非專利文獻1、2)。GC反應之期間，B細胞會經歷如下3個階段，即前GC、GC、後GC(非專利文獻3~5)。若受到抗原刺激，則新活化之初始B細胞與活化之記憶型B細胞直接分化為濾泡外之短壽命PC，或者轉移至濾泡間(IF)區域，與活化之T細胞建立穩定之相互作用(非專利文獻3~8)。T-B細胞間之相互作用後，一部分B細胞分化為低親和性PC，其他B細胞(前GC B細胞)轉移至GC(非專利文獻3、4)。該等前GC B細胞首先轉移至GC之暗區(DZ)，成長為GC之B細胞。B細胞急速地生長，引起體細胞超突變(SHM)而使B細胞受體(BCR)之親和性變化，與其特異性抗原結合(非專利

文獻3、4)。其後，免疫球蛋白(Ig)基因產生了變異之B細胞自DZ轉移至亮區(LZ)，於是憑藉T濾泡輔助( $T_{FH}$ )細胞之幫助進行親和性之選擇(非專利文獻3、4、8)。對抗原具有高親和性之BCR之B細胞被選作後GC B細胞，從GC出來而最終分化成長壽命之PC或記憶型B細胞，但未被選擇之B細胞回到GC之DZ，可進一步積累用於更高親和性之BCR之SHM(非專利文獻7)。

### 【0003】

據報告，樹狀細胞(DC)有效率地活化對於引起GC反應是不可或缺的(非專利文獻3)。因此，迄今為止之研究中均集中在用以刺激DC之最佳佐劑之選擇上。但是，Lycke等人發現，於DC耗盡之小鼠中，B細胞自微皺褶(M)細胞中採集抗原，進而移行至GC(非專利文獻9)，表明侵入至GC無需活化DC。即便DC被適當地激活，被活化之B細胞中，只有極少數之集群能夠成長為前GC B細胞並進入GC(非專利文獻4、6)。最近之研究中有報告，irf4是GC形成所必需之轉錄因子，於前GC B細胞中高表現(非專利文獻10、11)。但是，前GC B細胞之特異性表面標記物並不為人所知。因此，人們對前GC B細胞之基準、及哪些種類之活化B細胞進入GC，是否產生對特定抗原之高親和性BCR，都不是很清楚。

### 【0004】

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

[非專利文獻1]Turner, J. S. et al. Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination. *Nature*. 586, 127-132 (2020).

[非專利文獻2]Andersen, T. K. et al. Enhanced germinal center reaction by targeting vaccine antigen to major histocompatibility complex class II molecules. *npj Vaccines*. 4, 9 (2019).

[非專利文獻3]Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. Germinal center B cell dynamics. *Immunity*. 45.3, 471-482 (2016).

[非專利文獻4]Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*. 15.3, 149-159 (2015).

[非專利文獻5]Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K. & Cerutti, A. Rethinking mucosal antibody responses : IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews Immunology*. 20, 427-441 (2020).

[非專利文獻6]Mesin, L. et al. Restricted clonality and limited germinal center reentry characterize memory B cell reactivation by boosting. *Cell*. 180.1, 92-106 (2020).

[非專利文獻7]Chen, H. et al. BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. *Nature*. 582, 421-425 (2020).

[非專利文獻8]Ise, W. et al. T follicular helper cell-germinal center B cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling germinal center cell fate. *Immunity*. 48.4, 702-715 (2018).

[非專利文獻9]Komban, R.J. et al. Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nat Commun*. 10, 2423 (2019).

[非專利文獻10]Song, S. & Matthias, P. D. The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation. *Front Immunol*. 10.3389

(2018).

[非專利文獻11]Willis, SN. et al. Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Immunol.* 192(7), 3200-6 (2014).

### 【發明內容】

#### 【0005】

被活化之B細胞可進入生發中心(GC)，進行親和性成熟，從而產生高親和性之抗體。但是，目前仍不清楚何種活化B細胞進入GC。此處，發明人等發現了位於GC之外側之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之小集群。若將該CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞注入小鼠，則於40小時後進入GC。由此提示，CD11b係前GC IgA<sup>+</sup> B細胞之新穎表面標記物。進而可知，B細胞上之CD11b之表現係於試管內由pam3CSK4或熱死大腸桿菌等細菌抗原誘導，與樹狀細胞之活化並無關係。又，若經口投予pam3CSK4或熱死大腸桿菌，則於2天以內GC B細胞之數量增加，黏膜抗原特異性IgA反應得到增強。本發明所示之結果表明，B細胞之CD11b之誘導係用於選擇有效黏膜疫苗佐劑的一種有前途之標記物。

#### 【0006】

基於上述見解，本發明之發明人等發現，誘導CD11b於B細胞中表現之物質作為黏膜疫苗之有效佐劑發揮作用，而可誘導高親和性黏膜IgA抗體之產生；又，藉由該作用，黏膜等之免疫被賦活化，而可誘導對於各種來自體外之抗原之免疫；又，藉由該效果，而適當維持黏膜菌群或改善黏膜菌群，從而完成本發明。

#### 【0007】

於一態樣中，本發明係提供一種包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以誘導活化B細胞之生發中心移行之組合物。

#### 【0008】

於一態樣中，本發明係提供一種誘導B細胞中之CD11b之表現，誘導該B細胞與T細胞及樹狀細胞之接觸，而誘導活化B細胞之生發中心移行的方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，使該物質與B細胞接觸。

#### 【0009】

更具體而言，本發明提供以下。

##### [項目1]

一種組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以誘導活化B細胞之生發中心移行。

##### [項目2]

如項目1記載之組合物，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為細菌。

##### [項目3]

如項目2記載之組合物，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為 $\gamma$ 變形菌綱或擬桿菌綱之細菌。

##### [項目4]

如項目3記載之組合物，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為大腸桿菌(*Escherichia coli*)、腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)、肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)或其等之組合。

## [項目5]

如項目1至4中任一項記載之組合物，其用以治療具有要藉由活化B細胞之生發中心移行之活化來治療之疾病、障礙或狀態的對象。

## [項目6]

如項目1至4中任一項記載之組合物，其用於免疫賦活、健康維持或促進、黏膜菌群之維持或改善、或者感染症治療。

## [項目7]

如項目1至4中任一項記載之組合物，其係疫苗佐劑。

## [項目8]

如項目1至7中任一項記載之組合物，其係黏膜投予。

## [項目9]

如項目1至6中任一項記載之組合物，其係選自由醫藥、食品、飼料、食品添加物、飼料添加物、其等之原料組合物所組成之群中之形態。

## [項目10]

如項目1記載之組合物，其係與抗原一同投予。

## [項目11]

如項目10記載之組合物，其係與抗原同時投予。

## [項目12]

如項目10記載之組合物，其係與抗原分開投予。

## [項目13]

如項目1記載之組合物，其係包含抗原之疫苗組合物。

## [項目14]

如項目10至13記載之組合物，其中抗原為病毒抗原、細菌抗原、寄

生蟲抗原或其等之組合。

[項目15]

一種誘導B細胞中之CD11b之表現，誘導該B細胞與T細胞及樹狀細胞之接觸，而誘導活化B細胞之生發中心移行的方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，使該物質與B細胞接觸。

【0010】

又，於另一態樣中，本發明提供下述者。

[項目16]

一種用以治療具有要藉由活化B細胞之生發中心移行之活化來治療之疾病、障礙或狀態之對象的方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

[項目17]

如項目16記載之方法，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為細菌。

[項目18]

如項目16記載之方法，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為 $\gamma$ 變形菌綱或擬桿菌綱之細菌。

[項目19]

如項目16記載之方法，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為大腸桿菌(*Escherichia coli*)、腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)、肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)或其等之組合。

[項目20]

如項目16記載之方法，其中要藉由活化B細胞之生發中心移行之活化來治療之疾病、障礙或狀態之治療為免疫賦活化、健康維持或促進、黏膜菌群之維持或改善、或者感染症治療。

[項目21]

如項目16記載之方法，其中上述組合物被製劑化成疫苗佐劑。

[項目22]

如項目16記載之方法，其係將上述組合物進行黏膜投予。

[項目23]

如項目16記載之方法，其中上述組合物為選自由醫藥、食品、飼料、食品添加物、飼料添加物、其等之原料組合物所組成之群中之形態。

[項目24]

如項目16記載之方法，其中上述組合物係與抗原一同投予。

[項目25]

如項目16記載之方法，其中上述組合物係與抗原同時投予。

[項目26]

如項目16記載之方法，其中上述組合物之投予係與抗原之投予分開。

[項目27]

如項目16記載之方法，其中上述組合物為包含抗原之疫苗組合物。

[項目28]

如項目24至27記載之方法，其中上述抗原為病毒、細菌、真菌、寄生蟲抗原。

**【圖式簡單說明】**

## 【0011】

圖1係表示僅一部分B細胞侵入生發中心之模式圖。

圖2係表示CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞位於GC之外側並向GC轉移之圖。a係表示WT小鼠之PP B220<sup>+</sup> B細胞中之IgA及CD11b之表現之代表性流動式細胞測量術資料。b、c係經B220及PNA(b)或B220及Fas(c)染色之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞中之GC B細胞之流動式細胞測量術資料。a-c中，數字表示細胞之比率。d係經PNA、CD11b、IgA、DAPI染色之PP剖面之顯微鏡照片。於GC(虛線之圓)之外側可見2個CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>二重陽性細胞(黃色箭頭)。e係SED、IF、GC區域經ICAM-1、CD11c、CD4(左邊之照片)、MAdCAM-1(右邊之照片)、DAPI染色之圖像。各區域在中央略圖中標註。比例尺為500 μm。f中，圖像表示CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞(標記為箭頭1至7)存在於所示區域中。GC及IF區域用虛線表示。g係將CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞分別直接注入至IgA<sup>-</sup>Cre/YC3.60<sup>fllox</sup>小鼠之PP，注入1小時後，示出移植至IgA<sup>-</sup>Cre/YC3.60<sup>fllox</sup>小鼠之PP之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞(上)或CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞(下)之位置的代表圖像。GC邊界(虛線)係IgA<sup>-</sup>YC3.60濃縮之區域。比例尺為200 μm。h係注入40小時後，利用顯微鏡對具有注入之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之PP進行觀察。比例尺為200 μm。資料係3次獨立之實驗之代表。

圖3係表示CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞為與CD4<sup>+</sup> T細胞相互作用之前GC B細胞之圖。a係表示基於微陣列分析之示出基因之表現量之對數倍變化(CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞/CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞)之熱圖。b係利用qPCR對示出之GC特異性基因、非GC特異性基因及前GC基因之表現水準進行分析，並相對於β肌動蛋白基因之表現水準進行標準化。將CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之相

對表現水準之平均值設為1。各點表示3次技術重複之平均值。條形圖表示3~4次獨立測定之平均值( $\pm$ SD)。c係表示CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞中之CXCR4及CD86之表面標記物之表現的流動式細胞測量術之柱狀圖。d係與單態IgA<sup>+</sup> B細胞結合之CD4<sup>+</sup> IgA<sup>+</sup>細胞之流動式細胞測量術資料。e係與CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞結合之CD4<sup>+</sup> T細胞之流動式細胞測量術資料。f係與CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞結合之CD4<sup>+</sup> T細胞之比率。條形圖表示6次獨立測定之平均值( $\pm$ SD)。g係對CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與CD4<sup>+</sup> T細胞結合之情況進行拍攝所得者。比例尺為20  $\mu$ m。

圖4-1係表示細菌之抗原誘導B細胞之CD11b表現之圖。a、f係利用流動式細胞測量術對給與所指示之刺激3天後之脾臟初始B細胞之CD11b之表現進行分析所得的資料。b、g係各刺激時CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率。c、h係利用qPCR對給與所指示之刺激後單離之B細胞之整合素 $\alpha$ M(itgam)進行分析所得的資料。d係40LB細胞上培養1天後單離之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之流動式細胞測量術資料。e中，基於Pam3CSK4之CD11b表現因40LB細胞上之培養而消失。i係藉由所指示之抑制劑進行各刺激時之CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率。b、c、g、h、i中，條形圖係表示至少3次獨立測定之平均值( $\pm$ SD)。b、c、g、h中，資料係利用單因子變異數分析及Tukey之多重比較進行分析所得。

圖4-2係表示經加熱殺菌之變形菌綱之細菌肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)及擬桿菌綱之細菌普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)誘導B細胞之CD11b表現的圖。

圖5係表示CD11b誘導性細菌抗原增強PP中之既有GC反應之圖。a係

受所指示之刺激3天刺激後之脾臟初始B細胞之CD11b表現之流動式細胞測量術資料。b係各刺激時CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率。c-e中，對Balb/c小鼠經口投予所指示之經加熱殺菌之細菌、pam3CSK4或PBS(對照組)。2天後，算出各小鼠之PNA<sup>hi</sup>B220<sup>+</sup> GC B細胞之流動式細胞測量術資料(c)、PNA<sup>high</sup>B220<sup>+</sup> PP GC B細胞之比率(d)及絕對數(e)。f中，將示出之iGB細胞進行單離，加以標記後，獨立地靜脈內注射至小鼠。比例尺為500 μm。g係免疫化之排程。h係免疫化後之OVA-特異性IgA。b、d、e、h中，條形圖表示至少3個獨立測定之平均值(±SD)。d、e中，資料係利用單因子變異數分析及Tukey之多重比較進行分析所得。h中，資料係利用雙因子變異數分析及Tukey之多重比較進行分析所得。

圖6係表示小鼠之PP中存在CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之圖。a中，使用8-12週齡之WT Balb/c小鼠進行流動式細胞測量術分析。雙聯細胞係由FSC-H/FSC-W門識別。死細胞係藉由碘化丙啶(PI)染色來除外。對B220<sup>+</sup> B細胞中之IgA及CD11b之表現進行分析。為了確認CD11b之表現，準備螢光減一(FMO)樣本作為陰性對照。活細胞中，GC B細胞表示PNA<sup>high</sup>B220<sup>+</sup>細胞，非GC B細胞表示PNA<sup>low</sup>B220<sup>+</sup>細胞。代表性資料係由至少20次實驗所獲得。b中，確認到分選之純度為至少90%。c中，CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞中之CD86表現及CXCR4表現之代表平均螢光強度(Average mean fluorescence intensity)(MFI)分析。條形圖係表示使用WT小鼠之5次獨立測定之平均值(±SD)。資料係利用司徒頓之兩側t檢定進行比較。

圖7係表示確認CD11b及IgA之表現之免疫組織化學共聚焦圖像之圖。將選擇出之PP剖面利用DAPI、CD11b、IgA染色。對顯示部分(虛線

之四角)進行放大，對CD11b與IgA之重疊進行分析。又，為了確認CD11b與IgA之訊號重疊，而進行Z堆疊分析。比例尺為20  $\mu\text{m}$ 。

圖8係表示ICAM-1於HEV中表現之圖。使用抗ICAM-1、抗CD4(T cell標記物)、抗CD11c(DC標記物)、抗MAdCAM-1(HEV標記物)分別對PP之切片進行染色。SED於富含CD11c<sup>+</sup> DC之區域被識別。IF區域於CD4<sup>+</sup>T細胞被濃縮之區域被識別。表現MAdCAM-1之HEV於IF區域被發現。為了對ICAM-1之表現進行分析，而示出整體圖像及放大之顯示區域。

圖9係表示CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞與CD4<sup>+</sup> T之結合分析之結果的圖。使用8-12週齡之WT Balb/c小鼠進行流動式細胞測量術分析。死細胞係藉由PI染色來除外。單態細胞及結合細胞係利用FSC-H/FSC-W門來選擇。對於單態細胞及結合細胞，使用IgA<sup>+</sup>細胞對與CD4<sup>+</sup>T細胞之結合進行分析。單態活細胞及結合活細胞中，B細胞門係於B220<sup>+</sup>細胞中選擇。對B220<sup>+</sup>細胞中之IgA及CD11b之表現進行分析。於結合CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞及CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞中，對CD4<sup>+</sup>T細胞之接合進行分析。使用單態CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞及CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞作為用以分析CD4<sup>+</sup> T細胞之接合的陰性對照。資料係由6次獨立實驗所獲得者。

圖10係表示具有SHM之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞係來自新產生之活化記憶型B細胞的圖。a中，對藉由PCR擴增之再構建之VDJ區域及下游之內含子序列的SHM頻度進行分析。b中，對自26隻WT小鼠之PP單離之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>之B細胞的重排VDJH<sub>3</sub>與JH<sub>3</sub>下游之內含子序列(JH3-I)及重排VDJH<sub>4</sub>與JH<sub>4</sub>下游之內含子序列(JH4-I)的SHM頻度進行分析。餅狀圖之片段尺寸係與具有在各純系中觀察到之變異數之序列的數成比例。

餅狀圖中央之數字表示經過分析之純系之數量。

圖11-1係表示基於試管內刺激之B細胞生長及CD11b表現之圖。a係經過排序之脾臟初始B細胞之純度及其CD11b表現。b係經過培養之脾臟初始B細胞之淋巴細胞門及數量(右)。代表性資料係由至少3個獨立之實驗獲得者。c係對於所培養之脾臟初始B細胞之淋巴細胞門施加所顯示之經加熱殺菌之細菌刺激後所得者。d係經過培養之脾臟初始B細胞之淋巴細胞門及CD11b表現。代表性資料係由3個獨立之實驗獲得者。

圖11-2係表示基於試管內刺激之B細胞生長及CD11b表現之圖。e係以各刺激之指示濃度刺激之脾臟B細胞之CD11b表現。將為了圖4-1及5之實驗而選擇之條件以淺灰色表示。

圖11-3係表示基於試管內刺激之B細胞生長及CD11b表現之圖。f係以各刺激之指示濃度刺激之純化脾臟B細胞之CD11b表現。g係於所示濃度之TLR1/2、TLR4、NOD2抑制劑之存在下經pam3CSK4(1  $\mu$ g/ml)刺激之脾臟B細胞的CD11b表現。將為了圖4-1及5之實驗而選擇之條件以淺灰色表示。

圖12-1係表示單離之CD11b<sup>+</sup> B細胞於iGB培養系統中失去CD11b表現之圖。a中，將經CellTrace Violet標記之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞，使用IL-21於iGB培養系統中加以培養。CD11b之表現係於第0天及第1天利用流動式細胞測量術進行分析。b中，作為陽性對照，準備約50,000個初始脾臟B細胞、及經CellTrace Violet標記之5,000個分選出之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞。製備800個單離之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞以觀察其等之生長。代表性資料係由3個獨立之實驗獲得者。

圖12-2係表示單離之CD11b<sup>+</sup> B細胞於iGB培養系統中失去CD11b表現之圖。c中，對於脾臟之初始B細胞，為了誘導CD11b<sup>+</sup> B細胞而與pam3CSK4一同培養3天。其後，將由pam3CSK4誘導之CD11b<sup>+</sup> B細胞與CD11b<sup>-</sup> B細胞單離。將約 $1.5 \times 10^5$ 個單離之CD11b<sup>+</sup> B細胞及CD11b<sup>-</sup> B細胞分別接種至添加有1 ng/ml之IL-4之40LB細胞。作為對照組，使用分選為陰性之脾臟初始B細胞。於D0及D4，對接種至40LB細胞之B細胞之CD11b表現進行分析。代表性資料係由3個獨立之實驗所獲得者。

圖13係表示經IgM-40LB或CpG-40LB刺激之B細胞在對小鼠靜脈注射後未進入PP GC的圖。將所示之包含CpG-40LB細胞(上)及IgM-40LB細胞(下)之iGB細胞單離，附上標籤後，獨立地靜脈注射至小鼠。將抗MAdCAM-1抗體與標記之iGB細胞一同進行靜脈注射，而鑑定HEV。將抗IgA抗體直接注入至PP，對IgA<sup>+</sup>細胞染色而識別GC(虛線之圓)。比例尺為500  $\mu\text{m}$ 。

圖14係表示本發明之佐劑組合物完全未提昇血清TNF $\alpha$ 之濃度之圖。

圖15係表示B細胞與DC或T細胞無關係地感知細菌之抗原，而可於前GC細胞中決定自身細胞命運之模式圖。

### 【實施方式】

#### 【0012】

為了鑑定前GC之B細胞，我們著眼於黏膜免疫相關免疫誘導組織。其原因在於：由於黏膜免疫相關免疫誘導組織之GC在結構上活化，故能夠在任何時點找到進入既有GC之前GC的B細胞<sup>7</sup>。我們認為，整合素CD11b可以成為黏膜免疫相關免疫誘導組織中之前GC IgA<sup>+</sup> B細胞之標記物候補。作為165kDa之整合素 $\alpha\text{M}$ 之CD11b與CD18結合，形成作為巨噬

細胞1抗原(Mac-1)為人所知之異型二聚物整合素<sup>12</sup>。CD11b作為骨髓系細胞之標記物廣為人知，並已知與細胞轉移或接著相關<sup>12</sup>。進而，以前之研究中，B細胞中之CD11b顯示出複雜之功能<sup>13、14</sup>。Ding等人發現，CD11b將BCR訊號控制為負，維持自反應性B細胞之耐受性<sup>13</sup>。Kunisawa等人發現，CD11b為小鼠腸管黏膜固有層(LP)中之IgA<sup>+</sup> PC之初期階段之標記物，CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PC之產生需要PP之結構<sup>15</sup>。該等研究之動機在於調查黏膜免疫相關免疫誘導組織之B細胞中之CD11b之表現。

### 【0013】

本發明中，將表現整合素CD11b之IgA<sup>+</sup> B細胞之小集群鑑定為前GC B細胞。該細胞位於GC之外側，並高度表現irf4。將該CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞注入至IgA<sup>-</sup>Cre/YC3.60<sup>fl<sup>o</sup></sup>報導小鼠之黏膜免疫相關免疫誘導組織中時，可知所注入之細胞未直接進入既有GC，而位於GC之周圍，於40小時後進入GC，因此，於老鼠之黏膜免疫相關免疫誘導組織中為前GC IgA<sup>+</sup> B細胞。進而發現，包括pam3CSK4、脂多醣(LPS)、經加熱殺菌之大腸桿菌(E. coli)或腸道沙門氏菌(S. enterica)而並非雙叉桿菌之若干細菌抗原於試管內誘導CD11b於初始B細胞中表現。若與T-B或DC-B之相互作用之前於B細胞中表現CD11b，則靜脈內注射之B細胞進入到黏膜免疫相關免疫誘導組織之既有GC。如此，B細胞控制自己之細胞命運而成為前GC B細胞，與DC之活化並無關係。進而，若將pam3CSK4或經加熱殺菌之大腸桿菌經口投予至小鼠，則會於2天以內進入黏膜免疫相關免疫誘導組織之GC之B細胞之數量增加，黏膜抗原特異性IgA反應得到增強。於活化之B細胞中誘導CD11b被認為是前GC B細胞之有前途之標記物，同時為用以選擇有效黏膜疫苗佐劑之有用基準。

**【0014】**

(本發明之組合物)

本發明之組合物包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質，具有誘導活化B細胞之生發中心移行之作用。

本發明之組合物可期待發揮上述效果，而適宜地用於醫藥品、食品、飼料之領域等。因此，本發明之組合物可製成醫藥、食品組合物、食品原料組合物、飼料組合物或飼料原料組合物。

**【0015】**

(誘導B細胞中之CD11b之表現之物質)

本發明之組合物中所使用之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質可藉由以本案說明書中所示之實施例為參考，由業者基於公知之方法取得。例如，可將自動物單離之初始脾臟B細胞與候補物質加以培養後，將B細胞中之CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率增加之候補化合物，用作誘導B細胞中之CD11b之表現之物質。

**【0016】**

於一態樣中，該誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之非限定性例示為細菌。於一態樣中，較佳為使用革蘭氏陰性細菌。於一態樣中，較佳為使用變形菌門或擬桿菌門細菌。於一態樣中，作為變形菌門之細菌，較佳為使用 $\gamma$ 變形菌綱之細菌。於一態樣中，較佳為使用腸桿菌目之細菌。於一態樣中，更佳為使用大腸桿菌(*Escherichia coli*)、腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)或肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)。於另一態樣中，作為擬桿菌門之細菌，較佳為使用擬桿菌綱之細菌。於一態樣中，較佳為使用擬桿菌目之細菌。於一態樣中，較佳為使用擬桿菌目之細菌。

菌。於一態樣中，較佳為使用普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)。可使用特定種類之各種血清型細菌作為該等變形菌門或擬桿菌門之細菌。

#### 【0017】

於一態樣中，可用作該誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的細菌係具有與大腸桿菌(*Escherichia coli*)、腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)、肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)之代表性血清型所具有的16S rDNA序列有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、98%以上、99%以上或99.5%以上之鹼基序列同一性之16S rDNA序列的細菌。

#### 【0018】

於一態樣中，可用作該誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的細菌係具有與下述16S rDNA序列有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、98%以上、99%以上或99.5%以上之鹼基序列同一性之16S rDNA序列的細菌。

大腸桿菌(*Escherichia coli*)16S rDNA序列：編碼基因庫登記號CP003278.1(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP017100>)之16S核糖體RNA之DNA序列(包含位置225107~226662之鹼基之序列)。

腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)16S rDNA序列：編碼基因庫登記號CP003278.1(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP003278.1>)之16S核糖體RNA之DNA序列(包含位置287486~289015之鹼基之序列之互補鏈、或包含位置3396200~3397729之鹼基之序列之互補鏈)。

肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)16S rDNA序列：編碼基因庫登記號CP018306.1(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP018306>)

之16S核糖體RNA之DNA序列(包含位置503553~505106之鹼基之序列之互補鏈、包含位置1312903~1314456之鹼基之序列之互補鏈、包含位置1818027~1819580、1926864~1928417之鹼基之序列、包含位置2018746~2020299之鹼基之序列、包含位置2444117~2445670之鹼基之序列、或者包含位置2799428~2800981之鹼基之序列)。

普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)16S rDNA序列：編碼基因庫登記號AP025232.1(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AP025232>)之16S核糖體RNA之DNA序列(包含位置294690~296214之鹼基之序列之互補鏈、包含位置626688~628212之鹼基之序列之互補鏈、包含位置1871179~1872703之鹼基之序列、包含位置1957949~1959473之鹼基之序列、包含位置2375844~2377368之鹼基之序列、包含位置4187249~4188773之鹼基之序列之互補鏈或者包含位置4496890~4498414之鹼基之序列之互補鏈)。

### 【0019】

本發明之組合物具有誘導活化B細胞之生發中心移行之作用。於一態樣中，本發明之組合物具有誘導活化B細胞向黏膜免疫相關免疫誘導組織之生發中心之移行的作用。上述黏膜免疫相關免疫誘導組織並無特別限定，包含帶來活化B細胞之親和性成熟之黏膜免疫相關免疫誘導組織。例如，黏膜免疫相關免疫誘導組織包含消化道內(腸內、口腔內等)、鼻腔內等黏膜免疫相關免疫誘導組織。於一態樣中，上述黏膜免疫相關免疫誘導組織係派亞氏淋巴叢，本發明之組合物具有誘導活化B細胞向派亞氏淋巴叢之生發中心之移行的作用。

### 【0020】

於使用細菌作為誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之情形時，可使用經加熱殺菌之狀態之細菌或生菌。

### 【0021】

於本發明之組合物中，誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之量並無特別限定，只要為可發揮誘導活化B細胞之生發中心移行之作用之量即可。例如誘導B細胞中之CD11b之表現之物質係調配於組合物中以達到0.001~99.99重量%之範圍。

### 【0022】

(醫藥組合物)

於一態樣中，本發明之包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物係以醫藥組合物之形式提供。本發明之醫藥組合物典型而言，用於免疫賦活化。於一態樣中，本發明之醫藥組合物可用於誘導IgA產生B細胞之生發中心移行活化與親和性成熟及高親和性之抗體產生，對於該黏膜組織或遠端之黏膜組織等提供抗原特異性防禦。於一態樣中，本發明之醫藥組合物可用以使IgA產生B細胞之黏膜免疫相關免疫誘導組織之生發中心移行活化。上述黏膜免疫相關免疫誘導組織並無特別限定，包含帶來活化B細胞之親和性成熟之黏膜免疫相關免疫誘導組織。例如，黏膜免疫相關免疫誘導組織包含消化道內(腸內、口腔內等)、鼻腔內等黏膜免疫相關免疫誘導組織。於一態樣中，上述黏膜免疫相關免疫誘導組織為派亞氏淋巴叢，本發明之組合物可用於誘導活化B細胞向派亞氏淋巴叢之生發中心移行。

### 【0023】

由本發明之醫藥組合物賦活化之免疫靶向抗原可預先存在於活體內

黏膜組織內，又，亦可與本發明之醫藥組合物一起投予。於一態樣中，本發明之醫藥組合物可用於免疫賦活化。於一態樣中，本發明之醫藥組合物可較佳地用於黏膜免疫賦活化，於一態樣中，可用於消化道內(腸內、口腔內等)或鼻腔內之免疫賦活化。

#### 【0024】

於一態樣中，本發明之醫藥組合物係以不包含抗原之佐劑組合物之形式提供。於一態樣中，本發明之醫藥組合物係與抗原一同投予。於一態樣中，本發明之醫藥組合物係與抗原同時投予。於一態樣中，本發明之醫藥組合物係與抗原分開投予。於將本發明之醫藥組合物與抗原分開投予之情形時，各自之投予間隔可適當選擇，例如可將各自之投予期間設為5分鐘、10分鐘、20分鐘、30分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、24小時、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天等，但並不限定於其等。本發明之醫藥組合物與抗原之投予頻度可相同亦可不同。本發明之醫藥組合物與包含抗原之組合物之形態可相同亦可不同，例如可將本發明之醫藥組合物與食品形態之包含抗原之組合物組合。於一態樣中，本發明之醫藥組合物係以包含抗原之疫苗組合物之形式提供。上述抗原並無特別限定，例如選擇病毒、細菌、真菌、寄生蟲抗原。

#### 【0025】

於一態樣中，本發明之醫藥組合物係用以治療具有要藉由活化B細胞之生發中心移行之活化來治療之疾病、障礙或狀態的對象。於一態樣中，本發明之組合物用於經由免疫賦活化(例如黏膜免疫賦活化、腸內免疫賦活化)，來進行伴隨免疫賦活化之健康維持或促進、黏膜菌群(例如腸內菌

群)之維持或改善、或者感染抑制(例如病毒、細菌、真菌或寄生蟲之感染抑制)。

**【0026】**

因此，本發明於一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以誘導活化B細胞之生發中心移行。

**【0027】**

又，本發明於一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以治療具有要藉由活化B細胞之生發中心移行之活化來治療之疾病、障礙或狀態之對象。

**【0028】**

又，本發明於一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以免疫賦活化。上述黏膜免疫之賦活化包含消化道免疫(例如腸內免疫及口腔內免疫)及鼻腔內免疫之賦活化，但並不限定於其等。

**【0029】**

又，本發明於一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以黏膜之抗原特異性免疫之賦活化。上述黏膜包含消化道(例如腸道黏膜及口腔內黏膜)及鼻腔內黏膜，但並不限定於其等。

**【0030】**

於一態樣中，上述免疫賦活包含伴隨著免疫賦活化(例如黏膜免疫賦活化、腸內免疫賦活化)之健康維持或促進效果、伴隨著黏膜菌群(例如腸內菌群)之維持或改善之健康維持或促進效果、或者感染症之治療(例如病

毒感染症、細菌感染症、真菌感染症或寄生蟲感染症之治療)，但並不限定於其等。

#### 【0031】

又，於一態樣中，需要在上述黏膜中將抗原特異性免疫賦活化之對象係指如下對象：需要免疫賦活化(例如黏膜免疫賦活化、腸內免疫賦活化)之對象、需要伴隨著免疫賦活化之健康維持或促進之對象、需要黏膜菌群(例如腸內菌群)之維持或改善之對象、需要伴隨著黏膜菌群之健康維持或促進之對象、需要感染症之治療(例如病毒感染症、細菌感染症、真菌感染症或寄生蟲感染症之治療)之對象。

#### 【0032】

又，於一態樣中，本發明提供一種組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以經由免疫賦活化來進行健康維持或促進。

#### 【0033】

又，於一態樣中，本發明提供一種組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以經由免疫賦活化來維持或改善黏膜菌群(例如腸內菌群)。

#### 【0034】

又，本發明於一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以治療感染症(例如治療病毒感染症、細菌感染症、真菌感染症或寄生蟲感染症)。

#### 【0035】

本發明中「治療」具有該技術領域中之普通含義，意指出於以下目的而將本發明之組合物投予至對象，即緩解、根除、治癒一些障礙或疾病

狀態；防止該等障礙或疾病狀態之產生於未然或推遲該等障礙或疾病狀態之產生(預防)；防止該等障礙或疾病狀態之復發或減少該等障礙或疾病狀態之復發可能性(復發抑制)。

### 【0036】

於一態樣中，本發明之醫藥組合物係用以黏膜免疫賦活化之醫藥組合物。於一態樣中，本發明之醫藥組合物係用作要黏膜投予之疫苗佐劑之組合物。於一態樣中，本發明之醫藥組合物係用以促進高親和性黏膜IgA抗體之表現之組合物。

### 【0037】

本發明之醫藥組合物只要包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質即可。例如可以醫藥組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率達到0.001~99.99重量%之範圍的方式，考慮對象疾病之種類、劑型、投予方法、投予對象、投予對象者之症狀嚴重程度、以及藉由投予會發揮之效果之程度等來適當設定。於一態樣中，醫藥組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率亦可為0.001~99.99重量%、0.01~99.99重量%、0.1~99.99重量%、0.2~99.99重量%、0.3~99.99重量%、0.4~99.99重量%、0.5~99.99重量%、0.6~99.99重量%、0.7~99.99重量%、0.8~99.99重量%、0.9~99.99重量%、1.0~99.99重量%、2.0~99.99重量%、3.0~99.99重量%、4.0~99.99重量%、5.0~99.99重量%、6.0~99.99重量%、7.0~99.99重量%、8.0~99.99重量%、9.0~99.99重量%、10~99.99重量%、20~99.99重量%、30~99.99重量%、40~99.99重量%、50~99.99重量%、60~99.99重量%、70~99.99重量%、80~99.99重量%或90~99.99重量

%。於一態樣中，醫藥組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率亦可為0.001~90重量%、0.001~80重量%、0.001~70重量%、0.001~60重量%、0.001~50重量%、0.001~40重量%、0.001~30重量%、0.001~20重量%、0.001~10重量%、0.001~9.0重量%、0.001~8.0重量%、0.001~7.0重量%、0.001~6.0重量%、0.001~5.0重量%、0.001~4.0重量%、0.001~3.0重量%、0.001~2.0重量%、0.001~1.0重量%。於一態樣中，醫藥組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率較佳為1.0~80重量%、5.0~70重量%、10~60重量%、20~50重量%、30~40重量%，但並不限定於其等。

#### 【0038】

本發明中所謂「有效量」係指本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質於活體中可誘導活化B細胞之生發中心移行的量。

#### 【0039】

本發明之醫藥組合物中，可將誘導B細胞中之CD11b之表現之物質與藥學上可容許之載體或添加物一同調配。藥學上可容許之載體或添加物意指任意之載體、稀釋劑、賦形劑、懸浮劑、潤滑劑、佐劑、介質、傳遞系統、乳化劑、錠劑分解物質、吸收劑、保存劑、界面活性劑、著色劑、香料、或甜味料，採用公知者即可。

#### 【0040】

投予對象並無特別限定，作為非限定性例，例如可例舉：人類、小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、倉鼠、犬、貓、鼩、牛、豬、馬、鹿、野豬、綿羊、山羊等哺乳類；雞、鴨、火雞、鵪鶉等家禽等鳥類；蛇、龜等爬蟲

類；蛙等兩栖類；鮭科魚類、鱒魚、海鱸類、淡水鱒魚、香魚、鱸魚、鯛魚、黃姑魚類、比目魚、河豚、幼鱒魚、高體鱒、黑鮪、真鱈、縞鱈、虎河豚、黃尾鱒、石鯛、絲背細鱗鮭、無備平鮎、褐菖鮎、黑棘鯛、許氏平鮎、鱸魚、血鯛、三線磯鱈、斑魷、鮐魚、七帶石斑魚、褐石斑魚、鰻魚、鯰魚、泥鰍、鱖魚、熱帶魚類、羅非魚、巨鯰、青魚、鱮魚、鱧魚、草魚、鯉魚等魚類；雙殼類(牡蠣、扇貝、花蛤、貽貝、馬氏珍珠貝)；鮑魚；蝦；海藻。

#### 【0041】

本發明之醫藥組合物之投予量以及投予方法係根據作為投予對象之個體所罹患之疾病之種類、性別、種類、年齡、全身狀態、疾病之嚴重程度、所需效果之程度等來適當選擇。作為投予量，通常於0.001~100 mg/kg/天之範圍內適當設定即可。例如於使用細菌作為誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之情形時，基於細菌量，例如若為體重20 g之小鼠，則可於 $10^6$  CFU/次以上、 $10^7$  CFU/次以上、 $10^8$  CFU/次以上、 $10^9$  CFU/次以上、 $10^{10}$  CFU/次以上等範圍內適當設定，若為體重60 kg之人類，則可於 $3 \times 10^9$  CFU/次以上、 $3 \times 10^{10}$  CFU/次以上、 $3 \times 10^{11}$  CFU/次以上、 $3 \times 10^{12}$  CFU/次以上、 $3 \times 10^{13}$  CFU/次以上等範圍內適當設定，但並不限定於此。關於上述每一次之投予量，例如可一天投予1次~3次。於一態樣中，於用於體重60 kg之人類之情形時，較佳為於 $3 \times 10^{10}$  CFU/天~ $3 \times 10^{13}$  CFU/天、 $3 \times 10^{11}$  CFU/天~ $3 \times 10^{12}$  CFU/天等範圍內投予，但並不限定於其等。

#### 【0042】

本發明之醫藥組合物之投予可將上述量1天投予1次，亦可分數次進行投予。又，於對於上述疾病具有治療效果之範圍內，投予間隔可為每

天、隔天、每週、隔週、每2~3週、每月、隔月或每2~3個月。

#### 【0043】

本發明之醫藥組合物之投予方法並無特別限定，較佳為對消化道等黏膜組織直接投予，作為此種經黏膜投予，例如可使用經口投予、經鼻投予、經陰道投予、經腸投予等。通過該等各種器官之黏膜來投予之本發明之組合物於黏膜免疫相關免疫誘導組織中誘導IgA分泌B細胞之親和性成熟及高親和性之IgA抗體之產生，而給該得到投予之黏膜組織及遠端黏膜等組織帶來抗原特異性防禦。

#### 【0044】

其中，經腸投予並不限於經由肛門之投予，亦包括例如如胃癩等般自個體外將管體等插入消化道中，而經由此進行投予。插入消化道之位置並不限於腸，可例舉食道、胃、小腸(包含十二指腸、空腸、回腸等)、大腸(包含盲腸、結腸、直腸等)等。又，例如亦能夠將本發明之組合物與公知之成分一同調配而用作腸內洗淨液。

#### 【0045】

於一態樣中，本發明之醫藥組合物可於不損害其功能之範圍內與其他治療劑、例如包含抗原之疫苗組合使用。

#### 【0046】

於將本發明之醫藥組合物複數種組合使用之情形時，或者與其他治療藥組合使用之情形時，該等藥劑可包含單一製劑中，又，亦可包含於不同製劑中。於其等藉由不同製劑來提供之情形時，可以包含其製劑之組合之套組的形態提供，又，亦可分別以用以與其他製劑組合之單劑之形式提供。該等製劑可同時投予，又，亦可連續地投予。於一態樣中，本發明之

醫藥組合物係以最終提供之醫藥組合物之原材料組合物之態樣提供。

#### 【0047】

(食品組合物)

於一態樣中，本發明之包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物係以食品組合物之形式提供。食品組合物係適宜將本發明之免疫賦活化組合物專門用於食品領域的組合物。

#### 【0048】

本發明之食品組合物之形態並無特別限制，例如可以補充品、固體食品、流質食品、飲料等飲食品之形式提供。本發明之食品組合物可以特定保健用食品等特別用途食品或功能性標示食品、營養功能食品之形式提供。本發明之食品組合物可以保健功能食品、患者用食品、乳製品、醃酵乳、調製乳粉、乳酸菌飲料、酸性飲料、酸乳酪、乳酪、麵包、餅乾、脆餅、餅皮披薩、調製乳粉、流質食品、患者用食品、營養食品、冷凍食品、食品組合物、加工食品、其他市售食品等之形式提供。

#### 【0049】

本發明之食品組合物包含一般食品、以及包括附帶條件之特定保健用食品之特定保健用食品、營養輔助食品、功能性食品、患者用食品等。於一態樣中，本發明之食品組合物可以例如免疫賦活用、黏膜免疫賦活用、腸內免疫賦活用、健康維持或促進用、黏膜菌群之維持或改善用、腸內菌群之維持或改善用、病毒感染症對策用、細菌感染症對策用、真菌感染症對策用、或附歸類於其等之標示之食品組合物、或者用於該等用途之食品組合物之形式提供。

#### 【0050】

於一態樣中，本發明之食品組合物係與抗原一同投予。於一態樣中，本發明之食品組合物係與抗原同時投予。於一態樣中，本發明之食品組合物係與抗原分開投予。於將本發明之食品組合物與抗原分開進行投予之情形時，各自之投予間隔可適當選擇，例如可將各自之投予期間設為5分鐘、10分鐘、20分鐘、30分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、24小時、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天等，但並不限定於其等。本發明之食品組合物與抗原之投予頻度可相同亦可不同。本發明之食品組合物與包含抗原之組合物之形態可相同亦可不同，例如可將本發明之食品組合物與包含抗原之醫藥品組合物組合。於一態樣中，本發明之食品組合物係以包含抗原之組合物之形式提供。上述抗原並無特別限定，例如選擇病毒、細菌、真菌、寄生蟲抗原。

### 【0051】

本發明之食品組合物之具體形態並無特別限定，例如可例示：清涼飲料、碳酸飲料、營養飲料、果汁、乳酸飲料、乳飲料等飲料；冰淇淋、冰雪酪、刨冰等冷飲；飴糖、糖果、口香糖、巧克力、模壓點心、點心、餅乾、果凍、果醬、奶油、烘烤糕點等甜食類；蕎麥麵、烏龍麵、冬粉、中華麵、即食麵等麵類；日式魚糕、火腿、香腸等水產·畜產加工食品；加工乳、醃酵乳等乳製品；沙拉油、天婦羅油、人造奶油、蛋黃醬、起酥油、稠奶油、調味醬等油脂及油脂加工食品；醬料、調味汁等調味料；湯、燉菜、沙拉、預加工食品、香松、醃菜、麵包、穀類食品等。又，於特定保健用食品、營養輔助食品、功能性食品等之情形時，例如可以粉末、顆粒、膠囊、口含錠、錠劑、糖漿等形態來提供。

**【0052】**

於一態樣中，本發明之組合物係以食品素材之形式提供。本發明之食品素材之形狀並無特別限制，例如為液狀、膏狀、粉末、固形狀等，可以根據所使用之食品之種類來適當設定。本發明之食品素材可進而視需要，藉由破碎、粉碎、整粒等處理而成形為所需形狀。

**【0053】**

本發明之食品組合物只要包含本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質即可。例如，可以組合物100重量%中之本發明之抗體之含有比率達到0.001~99.99重量%之範圍的方式，考慮要發揮之效果之程度等來適當設定。於一態樣中，食品組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率亦可為0.001~99.99重量%、0.01~99.99重量%、0.1~99.99重量%、0.2~99.99重量%、0.3~99.99重量%、0.4~99.99重量%、0.5~99.99重量%、0.6~99.99重量%、0.7~99.99重量%、0.8~99.99重量%、0.9~99.99重量%、1.0~99.99重量%、2.0~99.99重量%、3.0~99.99重量%、4.0~99.99重量%、5.0~99.99重量%、6.0~99.99重量%、7.0~99.99重量%、8.0~99.99重量%、9.0~99.99重量%、10~99.99重量%、20~99.99重量%、30~99.99重量%、40~99.99重量%、50~99.99重量%、60~99.99重量%、70~99.99重量%、80~99.99重量%或90~99.99重量%。於一態樣中，食品組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率亦可為0.001~90重量%、0.001~80重量%、0.001~70重量%、0.001~60重量%、0.001~50重量%、0.001~40重量%、0.001~30重量%、0.001~20重量%、0.001~10重量%、0.001~9.0重量%、0.001~8.0重量%、0.001

~7.0重量%、0.001~6.0重量%、0.001~5.0重量%、0.001~4.0重量%、0.001~3.0重量%、0.001~2.0重量%、0.001~1.0重量%。於一態樣中，食品組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率較佳為1.0~80重量%、5.0~70重量%、10~60重量%、20~50重量%、30~40重量%，但並不限定於其等。

#### 【0054】

於一態樣中，本發明之組合物係以攝取上述食品時所添加之食品添加物或者用以製造上述食品或食品添加物之原料組合物的形式提供。

#### 【0055】

(飼料組合物)

於一態樣中，本發明之包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物係以飼料組合物之形式提供。飼料組合物係將本發明之飼料組合物專門用於飼料領域之組合物。

#### 【0056】

上述飼料組合物之具體形態並無特別限定，例如只要於無損上述本發明之飼料組合物所發揮之效果之範圍內，混合於通常之飼料中或視需要與能夠調配於通常之飼料中之成分混合而製成飼料組合物即可，亦可將飼料組合物其本身作為飼料。

#### 【0057】

本發明之飼料組合物可以例如免疫賦活用、黏膜免疫賦活用、腸內免疫賦活用、黏膜菌群之維持或改善用、腸內菌群之維持或改善用、健康維持或促進用、腸內菌群之維持或改善用、病毒感染症對策用、細菌感染症對策用、真菌感染症對策用、或附歸類於其等之標示之飼料組合物、或

者用於該等用途之飼料組合物之形式提供。

### 【0058】

於一態樣中，本發明之飼料組合物係與抗原一同投予。於一態樣中，本發明之飼料組合物係與抗原同時投予。於一態樣中，本發明之飼料組合物係與抗原分開投予。於將本發明之飼料組合物與抗原分開投予之情形時，各自之投予間隔可適當選擇，例如可將各自之投予期間設為5分鐘、10分鐘、20分鐘、30分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、24小時、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天等，但並不限定於其等。本發明之飼料組合物與抗原之投予頻度可相同亦可不同。本發明之飼料組合物與包含抗原之組合物之形態可相同亦可不同，例如可將本發明之飼料組合物與包含抗原之醫藥品組合物組合。於一態樣中，本發明之飼料組合物係以包含抗原之組合物之形式提供。上述抗原並無特別限定，例如選擇病毒、細菌、真菌、寄生蟲抗原。

### 【0059】

本發明之飼料組合物只要包含本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質即可。例如可以組合物100重量%中之本發明之抗體之含有比率達到0.001~99.99重量%之範圍的方式，考慮要發揮之效果之程度等來適當設定。於一態樣中，飼料組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率亦可為0.001~99.99重量%、0.01~99.99重量%、0.1~99.99重量%、0.2~99.99重量%、0.3~99.99重量%、0.4~99.99重量%、0.5~99.99重量%、0.6~99.99重量%、0.7~99.99重量%、0.8~99.99重量%、0.9~99.99重量%、1.0~99.99重量%、2.0~

99.99重量%、3.0~99.99重量%、4.0~99.99重量%、5.0~99.99重量%、6.0~99.99重量%、7.0~99.99重量%、8.0~99.99重量%、9.0~99.99重量%、10~99.99重量%、20~99.99重量%、30~99.99重量%、40~99.99重量%、50~99.99重量%、60~99.99重量%、70~99.99重量%、80~99.99重量%或90~99.99重量%。於一態樣中，飼料組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率亦可為0.001~90重量%、0.001~80重量%、0.001~70重量%、0.001~60重量%、0.001~50重量%、0.001~40重量%、0.001~30重量%、0.001~20重量%、0.001~10重量%、0.001~9.0重量%、0.001~8.0重量%、0.001~7.0重量%、0.001~6.0重量%、0.001~5.0重量%、0.001~4.0重量%、0.001~3.0重量%、0.001~2.0重量%、0.001~1.0重量%。於一態樣中，飼料組合物100重量%中之本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的含有比率較佳為1.0~80重量%、5.0~70重量%、10~60重量%、20~50重量%、30~40重量%，但並不限定於其等。

#### 【0060】

於一態樣中，本發明之組合物係以攝取上述飼料時所添加之飼料添加物、或用以製造上述飼料或飼料添加物之原料組合物之形式提供。

#### 【0061】

本發明之食品組合物或飼料組合物之投予對象並無特別限定，作為非限定性例，例如可例舉：人類、小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、倉鼠、犬、貓、鼩、牛、豬、馬、鹿、野豬、綿羊、山羊等哺乳類；雞、鴨、火雞、鵝、鶉等家禽等鳥類；蛇、龜等爬蟲類；蛙等兩栖類；鮭科魚類、鱒魚、海鱸類、淡水鱒魚、香魚、鱸魚、鯛魚、黃姑魚類、比目魚、河豚、幼鱒

魚、高體鰱、黑魴、真魴、縞魴、虎河豚、黃尾鰱、石鯛、絲背細鱗魴、無備平魴、褐菖魴、黑棘鯛、許氏平魴、鱸魚、血鯛、三線磯鱈、斑魴、鮐魚、七帶石斑魚、褐石斑魚、鰻魚、鮫魚、泥鰍、鱖魚、熱帶魚類、羅非魚、巨鯰、青魚、鱖魚、鯉魚、草魚、鯉魚等魚類；雙殼類(牡蠣、扇貝、花蛤、貽貝、馬氏珍珠貝)；鮑魚；蝦；海藻。

### 【0062】

(治療或者健康維持・增進方法)

於一態樣中，本發明包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質、包含其之醫藥組合物、使用食品組合物或飼料組合物之治療方法或者健康維持或促進方法。本發明中之治療或者健康維持或促進方法包括：將本發明之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質、或者上述本發明之「組合物」「醫藥組合物」、「食品組合物」或「飼料組合物」投予至對象。關於作為具體之預防或治療對象之障礙或者疾病、投予對象、投予方法、投予量等，亦只要設為上述「組合物」「醫藥組合物」、「食品組合物」、或「飼料組合物」中所說明者即可。又，藉由本發明之方法獲得之健康維持或促進效果只要因活化B細胞之生發中心移行產生即可，並無特別限定。

### 【0063】

於一態樣中，本發明提供一種用以於需要活化B細胞之生發中心移行之活化的對象中進行活化B細胞之生發中心移行的方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

### 【0064】

又，於一態樣中，本發明提供一種用以治療具有要藉由活化B細胞之生發中心移行之活化來治療之疾病、障礙或狀態之對象的方法，其包括：

向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

#### 【0065】

又，於一態樣中，本發明提供一種用以於需要免疫賦活之對象中進行免疫賦活之方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

#### 【0066】

又，於一態樣中，上述免疫賦活較佳為黏膜免疫之賦活化。因此，本發明提供一種用以於對象中將黏膜免疫賦活化之方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。上述黏膜免疫之賦活化包含消化道免疫(例如腸內免疫及口腔內免疫)及鼻腔內免疫之賦活化，但並不限定於其等。

#### 【0067】

又，於一態樣中，上述免疫賦活係黏膜中之抗原特異性免疫之賦活化。因此，本發明係提供一種用以於需要黏膜中之抗原特異性免疫之賦活化之對象中進行黏膜中之抗原特異性免疫之賦活化的方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。上述黏膜包含消化道(例如腸道黏膜及口腔內黏膜)及鼻腔內黏膜，但並不限定於其等。

#### 【0068】

於一態樣中，上述免疫賦活包含伴隨著免疫賦活化(例如黏膜免疫賦活化、腸內免疫賦活化)之健康維持或促進效果、伴隨著黏膜菌群(例如腸內菌群)之維持或改善之健康維持或促進效果、或者感染症之治療(例如病毒感染症、細菌感染症、真菌感染症或寄生蟲感染症之治療)，但並不限

定於其等。

### 【0069】

又，於一態樣中，需要於上述黏膜中將抗原特異性免疫賦活化之對象係如下對象：需要免疫賦活化(例如黏膜免疫賦活化、腸內免疫賦活化)之對象、需要伴隨著免疫賦活化之健康維持或促進之對象、需要黏膜菌群(例如腸內菌群)之維持或改善之對象、需要伴隨著黏膜菌群之健康維持或促進之對象、需要感染症之治療(例如病毒感染症、細菌感染症、真菌感染症或寄生蟲感染症之治療)之對象。

### 【0070】

因此，於一態樣中，本發明提供一種於需要免疫賦活化(例如黏膜免疫賦活化、腸內免疫賦活化)之對象中將免疫賦活化之方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

### 【0071】

又，於一態樣中，本發明提供一種於需要健康維持或促進之對象中通過免疫賦活化來維持或增進健康增進之方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

### 【0072】

又，於一態樣中，本發明提供一種於需要維持或改善黏膜菌群(例如腸內菌群)之對象中通過免疫賦活化來維持或改善黏膜菌群之方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

### 【0073】

又，於一態樣中，本發明提供一種於需要感染症之治療(例如病毒感染症、細菌感染症、真菌感染症或寄生蟲感染症之治療)之對象中治療感

染症之方法，其包括：向該對象投予包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物。

**【0074】**

於一態樣中，本發明之治療或者健康維持或促進方法包括誘導活化B細胞之生發中心移行之方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，向需要或期望治療或者健康維持或促進之對象投予該組合物。

**【0075】**

於一態樣中，本發明之治療或者健康維持或促進方法包括將免疫賦活化之方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，向需要或期望治療或者健康維持或促進之對象投予該組合物。於一態樣中，該免疫賦活化較佳為黏膜免疫之賦活化，包含腸內免疫之賦活化。

**【0076】**

於一態樣中，本發明之治療或者健康維持或促進方法包括維持或改善黏膜菌群之方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，向需要或期望治療或者健康維持或促進之對象投予該組合物。於一態樣中，維持或改善該黏膜菌群之方法較佳為維持或改善腸內菌群之方法。

**【0077】**

於一態樣中，本發明之治療或者健康維持或促進方法包括促進高親和性IgA抗體表現之方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，向需要或期望治療或者健康維持或促進之對象投予該

組合物。

#### 【0078】

於一態樣中，本發明之治療或者健康維持或促進方法包括獲得疫苗佐劑活性之方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，向需要或期望治療或者健康維持或促進之對象投予該組合物。

#### 【0079】

作為本發明之治療或者健康維持或促進方法中所使用之誘導B細胞中之CD11b之表現之物質，可使用上述(誘導B細胞中之CD11b之表現之物質)中所記載之任意物質。

#### 【0080】

本發明之治療或者健康維持或促進方法中所使用之包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質的組合物可藉由業者公知之方法來準備。可將誘導B細胞中之CD11b之表現之物質與賦形劑、載體等一起混合來準備，此外，可藉由預先獲取誘導B細胞中之CD11b之表現之物質與賦形劑、載體等混合而成之組合物來準備。

[實施例]

#### 【0081】

以下，藉由實施例對本發明進一步詳細地進行說明，但其等只不過是例示，並非限定本發明。

#### 【0082】

方法

小鼠動物

Balb/c小鼠(8-12週齡)係自日本CLEA獲取。小鼠係於東京大學定量

生物學研究所(IQB)之動物實驗設施中，在不包含特定病原體之條件下飼養。所有實驗係依據東京大學IQB之動物實驗委員會之準則來進行。B細胞之移入實驗中，使用由東京醫科齒科大學之安達貴弘博士提供之IgA-Cre/YC3.60<sup>flox</sup>小鼠(8~12週齡)。IgA-Cre小鼠係基於Cris Allen之引用文獻38來設計。與YC3.60<sup>flox</sup>小鼠<sup>39、40</sup>交配後，IgA<sup>+</sup>細胞被鑑定為YC3.60<sup>+</sup>細胞。

### 【0083】

#### 流動式細胞測量術分析及細胞分選

將派亞氏淋巴叢(PP)自Balb/c小鼠之小腸中小心地摘除。將自PP製備之單細胞懸浮液於以下之抗體之組合下培養。藻紅蛋白-Cy7(PE-cy7)抗小鼠/人B220(eBioscience mAb RA3-6B2), PE抗小鼠/人B220(Biolegend mAb RA3-6B2), FITC抗小鼠/人B220(Biolegend mAb RA3-6B2), PE抗小鼠IgA( $\alpha$ 鏈特異性)(Southern Biotech公司)、Alexa Fluor(AF)647抗小鼠IgA(Southern Biotech公司)、FITC抗小鼠CD11b(Biolegend mAb M1/70)、PE抗小鼠CD11b(Biolegend mAb M1/70)。PE-cy7抗小鼠CD11b(eBioscience mAb M1/70)、生物素化PNA(Vector Laboratories)、APC-R700倉鼠抗小鼠CD95(Fas)(BD Biosciences mAb Jo2)。AF488抗小鼠CD86(Biolegend mAb GL-1)、APC抗小鼠CD184(CXCR4)(Biolegend mAb L236F12)、PE抗小鼠IgM(eBiosciences mAb eB121-15F9)、AF647抗小鼠CD4(Biolegend mAb GK1.5)、抗生蛋白鏈菌素PE(Biolegend公司)、抗生蛋白鏈菌素APC(Biolegend公司)、抗生蛋白鏈菌素AF488(Lifetechnologies公司)。選擇單態細胞時，使用FSC-H/FSC-W門。為了將死細胞除外，而使用碘化丙錠(PI)(Nacalai)。流動式細胞測量

術分析係藉由Spectral Cell Analyzer SA3800(SONY)來進行。細胞分選係藉由Cell Sorter SH800(SONY)來進行。

#### 【0084】

##### 免疫組織化學分析

將分離之派亞氏淋巴叢利用最佳切割溫度(OCT)複合物(Sakura Finetek)瞬時冷凍，於-80°C下進行保存。製作厚度6 μm之PP切片，並乾燥一夜。第二天，將PP切片利用丙酮(Nacalai)於-20°C下固定10分鐘。利用磷酸緩衝生理鹽水(PBS)洗淨5次後，將PP切片利用封閉緩衝液(PBS/5%FCS(NICHIREI BIOSCIENCES INC.))培養30分鐘。其後，將PP切片於以下之抗體之組合下，在暗箱中利用RT培養30分鐘以上。AF488抗小鼠/人CD11b(Biolegend mAb M1/70)、PE抗小鼠/人CD11b(Biolegend mAb M1/70)、AF488抗小鼠CD4(Biolegend mAb GK1.5)、AF647抗小鼠CD4(Biolegend mAb GK1.5)、DAPI溶液(BD Bioscience)、AF488抗小鼠CD54(ICAM-1)(Biolegend mAb YN1/1.7.4)、AF647抗小鼠CD54(ICAM-1 mAb YN1/1.7.4)(Biolegend公司)、生物素抗小鼠CD11c(eBioscience公司 mAb N418)、AF488抗小鼠MAdCAM-1(Biolegend公司 mAb MECA-367)、PE抗小鼠MAdCAM-1(Biolegend公司 mAb MECA-367)。生物素化之PNA、AF647抗小鼠IgA(α鏈特異性)(Southern Biotech公司)、PE抗小鼠IgA(α鏈特異性)(Southern Biotech公司)、抗生蛋白鏈菌素AF488(Lifetechnologies公司)。利用顯微鏡LSM880(Carl Zeiss)進行觀察。圖像係利用ZEN2009(Carl Zeiss)之軟體加以分析。

#### 【0085】

## 微陣列分析

使用NucleoSpin RNA XS (Takara)，自25,000個之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞及100,000個之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞中提取RNA。使用SurePrint G3 Mouse GE v2 8x60K Microarray Chip(Affymetrix)進行微陣列分析，檢測到基因之表現。

### 【0086】

## RNA之純化與即時PCR

分別分選約 $1 \times 10^4$ 個PP GC B細胞(PNA<sup>hi</sup>B220<sup>+</sup>細胞)與約 $1 \times 10^4$ 個非GC PP B細胞(PNA<sup>lo</sup>B220<sup>+</sup>)。使用NucleoSpin RNA XS(Takara)，自單離之細胞提取RNA，使用GoScript™逆轉錄酶(Promega)合成cDNA。使用KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix(2X)Kit(KAPA Biosystems)，於384孔光學式PCR板(Roche)上使用LightCycler 480(Roche)進行3次即時PCR。基因之表現量係利用管家基因β肌動蛋白之表現量標準化。分析中使用以下之引子。

β肌動蛋白 fw : 5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3' ,

β肌動蛋白 rv : 5'-CCAGAGGCATACAGGGACAG-3' ,

整合素αM(CD11b) fw : 5'-CAGATCAACAATGTGACCGTATGGG-3'、

整合素αM(CD11b) rv : 5'-CATCATCATGTCCTTGTACTGCCGCTTG-3'、

aicda(AID) fw : 5'-CCTACGCTACATCTCAGACT-3'、

AICDA(AID) rv : 5'-CTTTGAAGGTCATGATCCCG-3'、

BCL6(BCL6) fw : 5'-TCCTCACGGTGCCTTTTTTACA-3'、

bcl6(BCL6) rv : 5'-TAACGACAAGCATGACGCAG-3'、

irf4(IRF4) fw : 5'-AGGTCTGCTGAAGCCTTGGC-3'、

irf4 (IRF4) rv : 5'-CTTCAGGGCTCGTCGTGGTC-3'、  
s1pr2 (S1PR2) fw : 5'-GTGACGGGACGCAGAGGT-3'、  
s1pr2(S1PR2) rv : 5'-AAATGTCGGTGATGTAGGCATG-3'、  
bcl2(BCL2) fw : 5'-TGAGTACCTGAACCGGCATCT-3'、  
bcl2(BCL2) rv : 5'-GCATCCCAGCCTCCGTTAT-3'、  
gpr183(EBI2) fw : 5'-GACATCCTGTTTACCACAGCT-3'、  
gpr183 (EBI2) rv : 5'-AGACCAGAATCCAGACGGACA-3'

### 【0087】

#### 活體內成像

為了轉移之成像，將IgA-Cre/YC3.60<sup>fl<sup>o</sup>x</sup>小鼠(8-12週齡)利用參考文獻41中所記載之3種麻醉藥之混合物進行麻醉。謹慎地切開腹壁，而使小腸露出。用肉眼識別PP。將約8,000個單離之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與約30,000個CD11b-IgA<sup>+</sup> PP B細胞利用CellTracker Orange CMTMR螢光色素(Invitrogen公司)標記後，使用25 μL注射器(Trajan Scientific and Medical公司)直接注入至IgA-Cre/YC3.60<sup>fl<sup>o</sup>x</sup>基因轉殖小鼠之PP。對於移植有細胞之PP，利用LSM880顯微鏡(Carl Zeiss公司)進行觀察。圖像係利用ZEN2009軟體(Carl Zeiss公司)進行分析。利用顯微鏡對PP進行1小時觀察後，將腹部之切開部利用ELP皮膚縫合器(Akiyama股份有限公司)謹慎地閉合。在移植40小時後，於麻醉下，再次利用LSM880顯微鏡(Carl Zeiss)對包含所移植之細胞之PP進行觀察，確認所移植之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之存在，利用ZEN2009軟體(Carl Zeiss)加以分析。

### 【0088】

#### 結合分析

CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與CD4<sup>+</sup> PP T細胞之間之結合係利用使用Cell Sorter SH800(SONY)之流動式細胞測量術進行分析。單態細胞係利用FSCH/FSC-W門來選擇。單態細胞係利用FSCH/FSC-W門進行選擇，結合細胞係利用單態細胞門之判別來負向選擇。成像時，自PP結合之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>單離結合細胞，利用顯微鏡LSM880(Carl Zeiss)及ZEN2009(Carl Zeiss)之分析軟體進行觀察。

### 【0089】

#### 利用iGB培養系統單離CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞

將約800個所分選之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞及800個所分選之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞利用CellTrace Violet Proliferation Kit(Invitrogen公司)染色。由於單離之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之數量非常少，故準備5,000個CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞及5×10<sup>4</sup>個初始脾臟B細胞(藉由B細胞隔離套組(Miltenyi Biotec)單離成陰性)作為陽性對照。為了觀察細胞生長，將所排序之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞、CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞及初始脾臟B細胞於為了抑制成長而經絲裂黴素C預處理之40LB細胞的存在下接種至6孔組織培養皿中。細胞係使用RPMI-1640培養基(和光)(包含10%FCS、5.5×10<sup>-5</sup>M 2-巰基乙醇(ME)(Nacalai)、10 mM HEPES(Nacalai))，於37°C、5%CO<sub>2</sub>下培養3天。將單離之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞利用rIL-21(10 ng/ml；PeproTech公司)進行培養，將初始脾臟B細胞利用rIL-4(1 ng/ml；Biolegend公司)進行培養。使用iGB培養系統，自第0天至第3天利用流動式細胞測量術進行分析，以檢測CellTrace Violet。培養細胞之CD11b表現係使用Cell Sorter SH800(SONY)及Spectral Cell Analyzer SA3800(SONY)，於第0天及第1天利用流動式細胞測量術進行

分析。

#### 【0090】

##### **iGB培養系統上之Pam3CSK4刺激脾臟CD11b<sup>+</sup>B細胞**

利用iGB培養系統培養脾臟CD11b<sup>+</sup> B細胞時，將脾臟初始B細胞利用pam3CSK4(Invivogen公司)培養3天，而誘導CD11b之表現。其後，利用流動式細胞測量術，將 $1.5 \times 10^5$ 個CD11b<sup>+</sup>脾臟B細胞與 $1.5 \times 10^5$ 個CD11b<sup>-</sup>脾臟B細胞單離，利用CellTrace Violet(Invitrogen)染色後，利用40LB系統並使用IL-4(1 ng/ml; Biolegend)培養4天。其後，使用Cell Sorter SH800(SONY)及Spectral Cell Analyzer SA3800(SONY)，藉由流動式細胞測量術對CD11b之表現進行分析。

#### 【0091】

##### **用以刺激B細胞之菌之準備**

將大腸桿菌(DH5 $\alpha$ )及腸道沙門氏菌自甘油原料接種至5 ml之LB培養基中，以180 rpm在37°C下振盪培養一夜。於第2天使細胞懸浮液之0.5 ml於10 ml之LB培養基中再懸浮。將該培養液於37°C下振盪培養3小時，每隔30分鐘，於所檢測到之波長600 nm之光學濃度(OD)(OD600)下對培養液之生長曲線進行觀察。將細胞懸浮液之連續稀釋液100  $\mu$ l散佈於LB培養板上，算出CFU。基於成長曲線，培養、收穫大腸桿菌及腸道沙門氏菌，並利用高壓蒸氣滅菌器(121°C、15分鐘)進行熱死。

#### 【0092】

同樣地，兩歧雙歧桿菌及短雙歧桿菌係於Difco Lactobacilli MRS broth(Becton, Dickinson and Company)培養基中以37°C進行厭氧培養，利用高壓蒸氣滅菌器進行加熱殺菌。

**【0093】****脾臟B細胞之刺激(試管內)**

脾臟B細胞係自8週齡之Balb/c小鼠之脾臟，使用B細胞隔離套組(Miltenyi Biotec)進行陰性排序。將脾臟B細胞(濃度： $5 \times 10^5/\text{ml}$ )於RPMI1640培養基中進行培養，分別給予13種獨立之刺激。為了選擇各刺激之適當濃度，將對各刺激進行滴定所得之結果示於圖11e-g。

**【0094】**

1. 抗小鼠IgM(15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；Jackson Immuno Research Laboratories)
2. 抗小鼠-CD40(HM40-3，500  $\text{ng}/\text{ml}$ ；Biolegend公司製造)
3. BAFF (50  $\text{ng}/\text{ml}$ ；Biolegend)
4. Pam3CSK4(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，Invivogen公司)
5. 聚肌胞苷酸(25  $\text{ng}/\text{ml}$ ，Invivogen公司)
6. LPS(50  $\text{ng}/\text{ml}$ ，Sigma Aldrich公司)
7. 鞭毛蛋白(20  $\text{ng}/\text{ml}$ ，Sigma Aldrich公司)
8. 咪喹莫特(R837，5  $\text{ng}/\text{ml}$ ；Invivogen公司)
9. CpG(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，GeneDsign Inc.)
10. 經加熱殺菌之大腸桿菌( $10^7$  CFU/ml)
11. 經加熱殺菌之腸道沙門氏菌( $10^8$  CFU/ml)
12. 經加熱殺菌之兩歧雙歧桿菌( $10^7$  CFU/ml)
13. 經加熱殺菌之短雙歧桿菌( $10^7$  CFU/ml)

對於得到刺激之B細胞之CD11b表現，使用Cell Sorter SH800(SONY)及Spectral Cell Analyzer SA3800(SONY)，於第0天及第3天進行分析。

**【0095】**

於MDP刺激時，將經純化之脾臟B細胞( $5 \times 10^5$ /ml)於添加有N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸水合物( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；Sigma-Aldrich公司)之RPMI1640培養基中進行培養。

**【0096】**

為了分析TLR抑制劑及NOD2抑制劑，將經純化之脾臟B細胞( $5 \times 10^5$ /ml)於pam3CSK4( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，Invivogen)、LPS( $50 \text{ ng}/\text{ml}$ ；Sigma-Aldrich)、CpG( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，GeneDsign Inc)、熱殺大腸桿菌( $10^7 \text{ CFU}/\text{ml}$ )之存在下，在包含TLR1/2拮抗劑、CU-CPT( $1 \mu\text{M}$ ；Sigma-Aldrich)、TLR4抑制劑、TAK-242( $1 \mu\text{M}$ ；Sigma-Aldrich)或NOD2訊號抑制劑II、GSK717( $30 \mu\text{M}$ ；Sigma-Aldrich)之RPMI1640培養基中進行培養。

**【0097】****免疫化**

於第0天及第16天，向小鼠經口投予OVA( $1 \text{ mg}$ )、OVA( $1 \text{ mg}$ ) + pam3CSK4( $10 \mu\text{g}$ ，Invivogen公司)或OVA( $1 \text{ mg}$ ) + 熱殺大腸桿菌( $100 \mu\text{l}$  中  $10^9 \text{ CFU}$ )。於第21天採集糞便，藉由酵素結合免疫吸附法(ELISA)來進行OVA特異性抗體之測定。

**【0098】****OVA特異性IgA ELISA之檢測**

使糞便於10倍重量/體積(w/v)之PBS中懸浮。進行遠心分離( $8,000 \text{ g}$ 、15分鐘)後，將上清液以糞便萃取液之形式進行回收。將培養板以 $1 \text{ mg}/\text{ml}$  OVA預覆一夜，繼而，利用包含1%(w/v)之牛血清白蛋白之PBS於室溫下封閉1小時。其後，加入經連續稀釋之糞便萃取物，於室溫下培養1小時。

IgA之相對結合力係藉由鹼性磷酸酶標識山羊抗小鼠IgA(Southern Biotech公司製造)檢測。於4°C下培養一夜後，使用TriStar Multimode Reader LB 942(BERTHOLD公司製造)，測定405 nm之光學密度(OD)值。

### 【0099】

#### 經加熱殺菌之細菌向WT小鼠之經口投予

向Balb/c小鼠(8-12週齡)經口投予經加熱殺菌之大腸桿菌(將 $10^9$ CFU利用100  $\mu$ l PBS稀釋所得者)、腸道沙門氏菌(將 $10^9$ CFU利用100  $\mu$ l PBS稀釋所得者)、兩歧雙歧桿菌(將 $10^9$ CFU利用100  $\mu$ l PBS稀釋所得者)、短雙歧桿菌(將 $10^9$ CFU利用100  $\mu$ l PBS稀釋所得者)、pam3CSK4(將10  $\mu$ g利用100  $\mu$ l PBS稀釋所得者)。作為對照組，準備經口投予有100  $\mu$ l之PBS之小鼠。2天後，將該等小鼠之PP摘除，以上述方式使用Spectral Cell Analyzer SA3800(SONY)，對GC之B細胞進行分析。

### 【0100】

#### 以OVA作為抗原之經口佐劑投予

以OVA 1 mg作為抗原，於其中混合各佐劑(CpG-K3(GeneDsign Inc.)10  $\mu$ g、CpG-ODN1826(Invirogen tlr1-1826)10  $\mu$ g、或經加熱殺菌之大腸桿菌 $10^9$  c.f.u.)，每隔2週對C57BL/6小鼠進行經口免疫計3次，在第3次之免疫後之第2天實施採血。血清中之TNF- $\alpha$ 值係依據小鼠TNF- $\alpha$  ELISA套組(Invitrogen，BMS607-3)之操作說明來進行測定。

### 【0101】

#### 由事前刺激誘導之移植之iGB細胞之活體內成像

如上所述，對於脾臟初始B細胞，使用pam3CSK4(1  $\mu$ g/ml，Invivogen公司)、經加熱殺菌之大腸桿菌( $10^7$ CFU/ml)、CpG(20  $\mu$ g/ml，

GeneDsign Inc公司)或抗IgM-Ab(15 µg/ml, Jackson Immuno Research Laboratories公司), 分別於試管內培養3天。其後, 自刺激細胞單離 $1 \times 10^5$ 個B220<sup>+</sup> B細胞, 繼而, 接種至添加有rIL-4(1 ng/ml; Biolegend公司)之40LB餵養細胞, 而誘導iGB細胞。作為對照組, 將未受到刺激之脾臟之初始B細胞接種至添加有rIL-4(1 ng/ml; Biolegend公司)之40LB餵養細胞。培養4天後, 單離 $3 \times 10^5$ 個iGB細胞(B220<sup>+</sup>)之初始B-40LB細胞、pam3CSK4-40LB細胞、大腸桿菌-40LB、IgM-40LB及CpG-40LB細胞, 利用CellTracker Orange CMTMR螢光色素(Invitrogen公司)標記後, 與用以識別HEV之AF488抗小鼠MAdCAM-1(Biolegend mAb MECA-367)10 µg一起分開靜脈內注射至小鼠(Balb/c, 8-12週齡)。於麻醉下, 為了對IgA<sup>+</sup>細胞進行染色以鑑定GC, 將AF647抗小鼠IgA(Southern Biotech)1 µg直接注入至與移入有iGB細胞者相同之小鼠的PP。利用顯微鏡LSM880(Carl Zeiss)及ZEN2009(Carl Zeiss)之分析軟體, 對所靜注之標記iGB細胞之存在進行觀察。

## 【0102】

### 再構建之VDJ區域及下游之內含子之DNA擴增

具有下游之內含子序列之再構建之VDJ序列係藉由使用若干不同之上游引子(此處, 「S」為C或G, 「R」為A或G, 「N」為A、G、C或T, 「M」為A或C, 「W」為A或T)之2次巢式PCR來擴增。將MH1, 5'-SARGTNMAGCTGSAGSAGTC-3'; MH2, 5'-SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG-3'; MH3, 5'-CAGGTTACTCTGAAAGWGTSTG-3'。MH4, 5'-GAGGTCCARCTGCAACARTC-3'; MH5, 5'-

CAGGTCCAAC TVCAGCARCC-3' ; MH6 , 5'-  
GAGGTGAASSTGGTGG AATC-3' 。 MH7 , 5'-  
GATGTGAACTTGGAAGTGTC-3'與同位於IgH內含子・增強子之5'末端  
之 序 列 互 補 之JH4R引 子(5'-  
GACTAGTCCTCTCCAGTTTCGGCTGAATCC-3')<sup>16`42</sup>一起使用。第2次  
之PCR係將同樣上游之引子與同JH4R引子之上游序列互補之JH4R-2引子  
(5'-CAGGTGGTGT TTTTGCTCA-3')一起使用。擴增係使用PrimeSTAR  
Max DNA聚合酶(TaKaRa公司製造)，將首次PCR進行20個循環，將第二  
次PCR進行30個循環(95°C 15秒、58°C 10秒、72°C 30秒)。將PCR產物選  
殖至pGEM T載體(Promega公司)後，使用EmeraldAmp® PCR Master  
Mix(TAKARA公司)，利用JH4F引子(5'-TAT GCT ATG GAC TAC TGG-  
3')及JH4R-2引子進行菌落PCR，選擇包含內含子序列之純系。

### 【0103】

#### DNA序列及SHM分析

分離質體DNA後，使用T7引子及SP6引子進行DNA序列分析。IgH  
之內含子DNA序列之一致序列係根據寄存編號AJ 851868.3取得。再構建  
之VDJ係藉由IgBLAST進行分析。

### 【0104】

#### 統計分析

除非另有說明，否則統計分析係使用GraphPad Prism version 8.4.2  
for Mac(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)來進行。2個組之間之  
差係使用兩側司徒頓t檢定來比較。於有3個以上之組之情形時，單因子或  
雙因子變異數分析(ANOVA)後，進行Tukey之多重比較檢定。與統計檢

定、組數及複製相關之詳細內容係在圖之圖例中示出。將 $p$ 值 $<0.05$ 視為顯著。

### 【0105】

#### 實施例1：於小鼠之PP中表現CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之小集群

藉由流動式細胞測量術，確認到於PP中存在CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之小集群(PP B細胞之約0.1%~0.2%)(圖2a、圖6a)。CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>與CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>之PP B細胞均呈現為花生凝集素(PNA)<sup>high</sup>或Fas<sup>+16</sup>等典型之GC B細胞之表現型(圖2b、c)。

### 【0106】

繼而，前GC B細胞由於存在於進入GC前之IF區域(GC外)，故調查CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之存在<sup>3、4</sup>。在免疫組織學上，藉由PNA及IgA這兩者之表現而特定出GC區域(圖2d)。其結果可知，於切片之GC外之區域中僅存在2個CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞(黃色之細胞)(圖2d、圖7)。繼而，對CD11b配位子之存在進行分析。細胞間接著分子1(ICAM-1)作為介導細胞之接著與轉移之CD11b/CD18之配位子廣為人知<sup>17</sup>。如既有報告<sup>8、18</sup>所示，IF區域之GC B細胞與高內皮靜脈(HEV)均表現ICAM-1。又，HEV亦表現黏膜尋址細胞黏著分子-1(MAdCAM-1)<sup>19</sup>(圖2e、圖8)。雖未確認到CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與HEV直接結合，但可知，於PP之切片之IF區域中，7個CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞中之6個位於HEV之附近(圖2f)。又，另一個CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞(No.7)位於GC之附近(圖2f)，但由於在GC內不存在，故提示有可能自IF轉移至GC。

### 【0107】

繼而，CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞其後是否自GC外轉移至GC內成為問

題。將CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>之PP B細胞單離，附上標籤後，將其等分開注入至不同之IgA-Cre/YC3.60<sup>fl<sup>o</sup>x</sup>報導小鼠之PP。PP之GC可於IgA<sup>+</sup>B細胞得到濃縮之區域中鑑定(圖2d)，因此，IgA<sup>+</sup>細胞中發出YC3.60之螢光之該等報導小鼠可容易地鑑定PP之GC。注入1小時後，所注入之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞位於GC之內部(圖2g)，提示CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞為GC之B細胞。另一方面，注入之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞未進入GC，而包圍GC(圖2g)。注入40小時後，所注入之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞亦進入GC(圖2h)。如上所述，原本存在於IF區域之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞轉移至GC。

### 【0108】

#### 實施例2：CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之基因表現

為了進一步確認前GC B細胞之表現型，將CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>之PP B細胞單離，藉由微陣列分析來比較基因表現(圖3a及圖6b)。CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞與CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞相比，相對較低地表現GC基因，相對較高地表現非GC基因，表明CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞係與CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞不同之集群。為了確認微陣列之結果，進而進行定量PCR(qPCR)(圖3b及圖6b)，將CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>B細胞之基因表現、與GC(PNA<sup>high</sup>B220<sup>+</sup>)及非GC(PNA<sup>low</sup>B220<sup>+</sup>)之PP B細胞之基因表現加以比較。我們選擇了包含**bcl6**(受GC之B細胞限制之主要轉錄因子)、**aicda**(編碼活化誘導胞嘧啶核苷去胺酶(AID)並誘導體細胞超突變(SHM)及類型轉變重組之酵素)、及**s1pr2**(於GC之內外控制B細胞之位置之受體)<sup>10、20-22</sup>之於GC之B細胞中高表現的3個基因、以及2個非GC基因、**gpr183**(於濾泡之外控制B細胞之位置之受體)及**bcl2**(於GC以外之B細胞中高表現之轉錄因子)<sup>10、23、24</sup>。CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之該等基因之表現水準與非GC B細

胞之該等基因之表現水準有所不同(圖3b)，表明該2個集群均很可能為GC B細胞。前GC B細胞由於被實證為GC反應之開始所需要之轉錄因子irf4之表現增加<sup>10、11、25</sup>，進而對irf4之表現進行分析。CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞較CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞，較高地表現irf4(圖3b)，而可知為前GC B細胞。但是，考慮一部分GC亮區(LZ)B細胞亦較高地表現irf4<sup>8、25</sup>，繼而利用流動式細胞測量術對CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之CXCR4及CD86之表現進行分析。GC LZ B細胞由於被鑑定為CD86<sup>high</sup>CXCR4<sup>low</sup> B細胞<sup>3、8</sup>，故與CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞相比，CD86之表現較低，CXCR4之表現較高(圖3c、圖6c)，因此表明，CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞為前GC B細胞而非GC LZ B細胞。

### 【0109】

#### 實施例3：CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞於進入GC之前與T細胞相互作用

為了進入GC，而如以前報告所示，前GC之B細胞需要與T細胞或DC進行相互作用<sup>3、26</sup>。因此，調查CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞於進入GC之前是否與CD4<sup>+</sup> T細胞進行相互作用。IgA<sup>+</sup> PP B細胞於基於流動式細胞測量術之單態B細胞門中並非CD4<sup>+</sup>陽性(圖3d、圖9)。但是，結合B細胞存在IgA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>二重陽性之PP細胞之明顯集群(圖3d、圖9)，表明該等IgA<sup>+</sup> PP B細胞與CD4<sup>+</sup> T細胞進行相互作用。尤其是CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之40%以上顯示與CD4<sup>+</sup> T細胞之結合(圖3e、f、圖9)，表明CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與CD4<sup>+</sup> T細胞進行相互作用。另一方面，約14.5%之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與CD4<sup>+</sup> T細胞進行相互作用，GC LZ有可能與CD4<sup>+</sup> T濾泡輔助(T<sub>FH</sub>)細胞進行相互作用(圖3e、f)<sup>4、8</sup>。若利用共聚焦顯微鏡對自PP分離之結合細胞進行攝影，則進一步確認到CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與CD4<sup>+</sup> T細胞之相互作用(圖3g)。如此，此次之結果明確表明，CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞為前

GCPP B細胞。

### 【0110】

#### 實施例4：CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞係於Ig基因中累積SHM

為了確認CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞是否源自新活化之初始B細胞，對CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之IgH之再構建之VDJ區域與下游之內含子序列這兩者進行序列測定，此時於GC反應中導入了SHM(圖10a，b)<sup>16</sup>。CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞(25個純系中21個純系)及CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞(39個純系中32個純系)之序列之80%以上出現變異(圖10b)。此情況表明，CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞不僅源自新活化之初始B細胞，還如以前報告所示，源自再浸入至GC之記憶型B細胞<sup>6、7</sup>。

### 【0111】

#### 實施例5：細菌抗原誘導初始脾臟B細胞中CD11b之表現

我們關於CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞之發現提出另一問題，即，前GC B細胞之CD11b表現是由什麼引起的。B細胞不僅受抗原刺激，亦與DC或T細胞進行相互作用，而變為前GC B細胞<sup>3、4、26</sup>。為了調查何種訊號誘導CD11b之表現，我們將未經免疫之小鼠之初始脾臟B細胞單離，使用抗IgM來進行BCR之橋接，使用B細胞活化因子(BAFF)來與DC進行相互作用，使用抗CD40來與T細胞進行相互作用，於試管內進行培養。但是，模擬了T-B及DC-B相互作用之該等刺激並未對初始B細胞誘導CD11b。繼而，TLR2使用pam3CSK4，TLR3使用聚肌胞苷酸，TLR4使用脂多醣(LPS)，TLR5使用鞭毛蛋白，TLR7使用咪喹莫特，TLR9使用CpG這種不同之鐸樣受體(TLR)配位子，而刺激初始B細胞。培養3天後，經pam3CSK4、LPS、CpG刺激之B細胞之數量較經抗IgM、抗CD40、

BAFF、聚肌胞苷酸、鞭毛蛋白、咪喹莫特刺激之B細胞顯著地增加(圖11a、b)。經pam3CSK4及LPS刺激之B細胞中之CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率分別為27.6%及8%，但經其他刺激刺激之B細胞中之CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率為5%以下(圖4-1a、b)。出乎意料地是，CpG雖活化B細胞之生長，但未誘導CD11b之表現。進而，僅於經已知為細菌抗原之pam3CSK4或LPS刺激之情形時，確認到B細胞之整合素 $\alpha$ M(CD11b)之表現增加(圖4-1c)。繼而，準備對TLR2及(或)TLR4<sup>27、28</sup>兩者給予了強刺激之經加熱殺菌之大腸桿菌，結果經加熱殺菌之大腸桿菌顯著地誘導了脾臟B細胞之CD11b表現(圖4-1a)。根據該等結果可知，作為TLR2及TLR4之配位子之細菌抗原誘導B細胞之CD11b。

#### 【0112】

PP GC內部之B細胞未表現CD11b(圖2d)，因此認為B細胞之CD11b表現為暫時性，會通過T-B或DC-B之相互作用而收斂。因此，將表現CD40L及BAFF<sup>26</sup>之40LB細胞作為餵養層，使用模擬T細胞及DC細胞之作用來誘導GC樣B細胞之試管內誘導GC B細胞(iGB)培養系統，來追蹤表面表現型。若利用iGB系統來培養細胞，則單離之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞與單離之CD11b<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞或初始脾臟B細胞相同之等級生長(圖12a、b)。實際上，單離之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞若於iGB系統中培養1天，則失去了CD11b之表現(圖4-1d、圖12a)。同樣地，由pam3CSK4誘導之CD11b<sup>+</sup>脾臟B細胞若於iGB系統中培養4天，則失去了CD11b之表現(圖4-1e、圖12c)。經抗CD40 Ab及抗IgM Ab處理之脾臟初始B細胞於pam3CSK4之存在下亦顯著地抑制了CD11b之表現(圖4-1f-h)。此情況表明，T-B細胞間之相互作用及BCR交聯降低B細胞之CD11b表現。因此，

於活體內僅發現極少數之CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> PP B細胞，故而較為妥當(圖2)。

### 【0113】

為了進而確認TLR2與TLR4是否參與脾臟B細胞之CD11b表現誘導，而於TLR1/2抑制劑、TLR4抑制劑、NOD2抑制劑之存在下利用pam3CSK4、LPS、CpG、熱殺之大腸桿菌來刺激脾臟B細胞。已知NOD2參與TLR2之下游之訊號傳遞<sup>29</sup>。有趣的是，於使用TLR1/2抑制劑之情形時，pam3CSK4及經加熱殺菌之大腸桿菌增加了CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率，但TLR4抑制劑並未增加(圖4-1i)。另一方面，作為NOD2之配位子之胞壁醯二肽(MDP)未誘導CD11b之表現，但NOD2抑制劑較強地抑制了經pam3CSK4及經加熱殺菌之大腸桿菌刺激之B細胞之CD11b的表現(圖11d)。該結果強烈地提示，CD11b之表現並非由TLR2或TLR4之活化直接誘導，而是由經由NOD2之來自細菌之刺激而局部誘導(圖4-1i)。

### 【0114】

將屬於經加熱殺菌之變形菌門之肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)與屬於擬桿菌門之普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)與大腸桿菌同樣地進行試驗，結果確認到該等細菌亦誘導CD11b之表現。將經各細菌刺激後之B細胞中之CD11b<sup>+</sup> B細胞之比率示於圖4-2。本結果表明，屬於變形菌門之細菌及屬於擬桿菌門之細菌誘導初始脾臟B細胞中CD11b之表現。

### 【0115】

**實施例6：利用經熱處理之CD11b誘導性細菌之經口投予來促進GC反應**

繼而，將何種細菌可經由CD11b之表現來誘導前GC B細胞作為問

題。有害菌選擇大腸桿菌及腸道沙門氏菌，代表性之有益菌選擇兩歧雙歧桿菌(*B. bifidum*)及短雙歧桿菌。藉由試管內之刺激，大腸桿菌及腸道沙門氏菌誘導了CD11b之表現，但兩歧雙歧桿菌及短雙歧桿菌未誘導CD11b之表現(圖5a, b)。將pam3CSK4或經加熱殺菌之菌經口投予至小鼠，結果，於2天內PP GC B細胞之數量及比率增加(圖5c-e)。根據此情況提示，活體內可增強進行中之GC反應僅為有害細菌。

### 【0116】

**實施例7：藉由CD11b之短暫性表現，而培養B細胞可能侵入至GC。**

繼而，確認試管內所誘導之CD11b<sup>+</sup> B細胞能夠侵入既有之GC。為了於試管內誘導GC之B細胞，而於試管內利用pam3CSK4或經加熱殺菌之大腸桿菌對脾臟之初始B細胞進行刺激，而誘導CD11b，其後於40LB細胞上培養4天。事先經作為誘導CD11b之刺激之pam3CSK4或經加熱處理之大腸桿菌刺激的iGB細胞若靜脈內注射至小鼠，則基本上進入GC，但事先利用CpG或抗IgM等進行刺激而未表現CD11b之iGB細胞未進入GC(圖5f、圖13)。根據以上之結果表明，為了使前GC之B細胞進入GC，必須在與T-B或DC-B之相互作用前於B細胞中表現CD11b。此情況過去之報告一致<sup>30</sup>，即，作為非自身抗原之細菌抗原對於引起GC反應較為重要。

### 【0117】

**實施例8：CD11b誘導性之經加熱殺菌之細菌作為有效之黏膜佐劑發揮功能，而誘導抗原特異性黏膜IgA**

基於TLR2或TLR9配位子之佐劑已廣泛用於疫苗接種，以有效率地刺激DC<sup>31、32</sup>。但是，我們之結果表明，B細胞可以在接受DC或T細胞之幫助之前決定自己的細胞命運而成為前GC B細胞。因此，我們認為，

pam3CSK4與經加熱處理之大腸桿菌作為黏膜疫苗之佐劑發揮功能。我們向小鼠經口投予作為抗原之卵白蛋白(OVA)，此外，將pam3CSK4或經加熱殺菌之大腸桿菌作為佐劑經口投予(圖5g)。正如預想那樣，同時投予有OVA及經加熱殺菌之大腸桿菌或pam3CSK4之小鼠中，糞便中之OVA特異性IgA增加，而於僅投予有OVA之小鼠中未增加(圖5h)。如上所述，於本研究中可知，B細胞上之作為前GC表面標記物之CD11b係用以選擇有效之黏膜疫苗佐劑之有前途之標記物，尤其是增強來自GC之高親和性黏膜IgA。

### 【0118】

另一方面，對第3次免疫後之細胞激素之濃度進行測定所得之結果為，本發明之佐劑組合物完全不使血清TNF $\alpha$ 之濃度上升。另一方面，認為作為既有疫苗佐劑為人所知之CpG-K3及CpG-ODN1826引起血清TNF $\alpha$ 之濃度之上升，而誘發炎症反應(圖14)。

根據本結果確認到，本發明之佐劑組合物於不誘導炎症反應而具有較高之抗原特異性結合性IgA誘導能力之方面上，具有極有益之特性。

### 【0119】

#### (探討)

本研究，藉由調查CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之不同集群，表示CD11b為前GC IgA<sup>+</sup> B細胞之新穎表面標記物。向B細胞之CD11b之誘導依賴於有害細菌抗原之刺激，但與活化DC並無關係。將該等CD11b誘導性細菌抗原經口投予至小鼠，結果於活體內黏膜抗原特異性IgA反應得到增強。該等結果表明，在進入GC之前於活化B細胞中使CD11b短暫性表現係用以選擇適合GC應答之活化B細胞的重要步驟。

**【0120】**

關於B細胞中之CD11b之功能，可知Yan之組對於CD11b經由Lyn-CD22-SHP-1之陰性反饋路徑來控制BCR訊號較為重要<sup>13</sup>。CD11b<sup>-/-</sup>小鼠中，抗體產生亢進，出現了由自反應性B細胞引起之GC反應<sup>13、14</sup>。又，編碼CD11b之ITGAM基因之變異作為使全身性紅斑狼瘡(SLE)等自體免疫疾病發病之高風險因素被報告<sup>33</sup>。本發明中，確認到CD11b之表現為進入GC前之B細胞之標記物。據推測，CD11b之短暫性表現足以進入GC，但並非必需。若B細胞被細菌之刺激活化，則B細胞表現CD11b，而防止生長並產生自反應性之抗體。其後，B細胞於IF區域開始與T細胞之相互作用。T-B相互作用後，活化之B細胞失去CD11b之表現，進入GC DZ，急速地生長，並為了獲得得高親和性而遭受SHM。認為CD11b在控制活化B細胞引起有益之GC反應之方面上發揮重要作用，但亦控制避免有害之自反應。

**【0121】**

人類之B細胞是否亦可能藉由微生物抗原來表現CD11b，Dutra之組實證了如下情況：若利用來自克氏錐蟲之富含蛋白質之部分來刺激卻格司氏病患者之B細胞，則CD11b<sup>+</sup>B細胞之頻度變高<sup>34</sup>。

**【0122】**

又，亦明確了何種訊號誘導CD11b之表現。首先，由於作為TLR2配位子之pam3CSK4及熱死之大腸桿菌於試管內較強地誘導B細胞之CD11b，故預想到藉由TLR2刺激而誘導CD11b。大腸桿菌具有作為細胞壁之構成成分之肽聚糖(PGN)，其成為TLR2之配位子<sup>35</sup>。但是，予預料之外，藉由pam3CSK4與TLR1/2抑制劑之併用而促進了B細胞之CD11b之表

現。另一方面，由pam3CSK4與經加熱殺菌之大腸桿菌誘導之CD11b之表現被NOD2抑制劑抑制(圖4-1i)，因此提示NOD2控制了CD11b。該結果之一部分與以前之研究結果一致，即，NOD2作為TLR2之負調控因子發揮作用<sup>35</sup>。進而，NOD2抑制經由TLR2/4之與克隆氏病(CD)密切相關之炎症性細胞激素產生的誘導，藉此有助於免疫耐受性及恆常性之維持<sup>36</sup>。如上所述，提示TLR2-NOD2路徑不僅經由CD11b控制炎症反應，亦有可能控制GC反應。但是，其他研究表明，TLR1/2訊號傳遞路徑係獨立於NOD2<sup>37</sup>。結合藉由TLR2抑制劑而促進CD11b之誘導，期待進一步之研究明確詳情。

#### 【0123】

關於CD11b誘導性之細菌刺激，已表明作為有害菌之例之腸道沙門氏菌、大腸桿菌於試管內誘導CD11b之表現，而於活體內增強GC反應，且已表明，肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)與擬桿菌綱之細菌即普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)於試管內誘導CD11b之表現，但雙叉桿菌屬並非如此。

#### 【0124】

綜上所述，根據本發明之實驗明確了以下情況。

1. CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞表現作為GC B細胞之表面標記物之PNA及FAS。CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞高表現GC B特異性基因，但未表現非GC基因。
2. CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞高表現作為前GC基因之irf4。
3. CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞位於GC之外側，正準備進入GC。
4. CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞於GC之外與CD4<sup>+</sup> T細胞發生相互作用。
5. 藉由利用細菌抗原進行試管內刺激而誘導於脾臟B細胞中CD11b之

表現。

6.所經口投予之細菌抗原於活體內在2天以內促進GC反應。

7.藉由使用經熱處理之大腸桿菌作為經口疫苗之佐劑，可藉由前GC之B細胞誘導而提高抗原特異性反應。

### 【0125】

即，本發明明確以下情況。

(1)CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞為前GC B細胞

(2)B細胞中之CD11b之誘導為在選擇有效之黏膜免疫疫苗佐劑之面上有前途之標記物。

並且提示，B細胞可感知細菌之抗原，在前GC細胞中決定自身之細胞命運，與DC或T細胞並無關係(圖15)。

### 【0126】

黏膜免疫相關免疫誘導組織進行識別自黏膜組織上皮等攝取之抗原分子之IgA<sup>+</sup> B細胞的親和性成熟，自黏膜上皮分泌高親和性之抗體，藉此在帶來黏膜組織上之抗原特異性防禦之方面上具有重要功能。黏膜免疫相關免疫誘導組織存在於腸道黏膜(派亞氏淋巴叢)、鼻腔黏膜等各種黏膜中，其等中經活化之免疫細胞於該黏膜或遠端之黏膜等組織中提供抗原特異性防禦(例如，日耳鼻114:843-850, 2011, Vaccine Vol. 30, pp.180-188, 2012, Frontiers in Immunology, 2021, Vol.12, Article 635471)。藉由本發明之各實施例，已明確，以作為黏膜免疫相關免疫誘導組織之派亞氏淋巴叢生發中心為模型，CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞進入生發中心(GC)而進行親和性成熟，而產生高親和性之抗體。並且已明確，可使用誘導於IgA<sup>+</sup> B細胞中CD11b之表現之加熱殺菌細菌作為炎症反應誘發得到抑制之極為有用之黏

膜免疫疫苗佐劑。

本發明表明，誘導CD11b<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> B細胞之佐劑對於各種黏膜免疫相關免疫誘導組織之生發中心中之B細胞之親和性成熟及高親和性之IgA抗體產生誘導極為有用，並且可利用加熱殺菌細菌作為該佐劑。

已知黏膜分泌IgA抗體對於細菌呈多反應性之反應性，與藉由一般疫苗等而產生誘導之IgG抗體等相比，可提供對於廣泛抗原之抗原特異性免疫防禦(例如，腸內細菌學雜誌31：151-157, 2017、Science.2017 Oct 20；358 (6361)：eaan6619.、Cell Reports 36, 109655，2021)。於一態樣中，本發明之佐劑在可抑制炎症應答，並且提供多反應性之抗原特異性免疫防禦之方面上極為有用，於醫藥、食品、飼料等領域中做出重大貢獻。

### 【0127】

(參考文獻)

1. Turner, J. S. et al. Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination. *Nature*. **586**, 127-132 (2020).
2. Andersen, T. K. et al. Enhanced germinal center reaction by targeting vaccine antigen to major histocompatibility complex class II molecules. *npj Vaccines*. **4**, 9 (2019).
3. Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. Germinal center B cell dynamics. *Immunity*. **45.3**, 471-482 (2016).
4. Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*. **15.3**, 149-159 (2015).
5. Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K. & Cerutti, A. Rethinking

mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews Immunology*. **20**, 427-441 (2020).

6. Mesin, L. et al. Restricted clonality and limited germinal center reentry characterize memory B cell reactivation by boosting. *Cell*. **180.1**, 92-106 (2020).

7. Chen, H. et al. BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. *Nature*. **582**, 421-425 (2020).

8. Ise, W. et al. T follicular helper cell-germinal center B cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling germinal center cell fate. *Immunity*. **48.4**, 702-715 (2018).

9. Komban, R.J. et al. Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nat Commun*. **10**, 2423 (2019).

10. Song, S. & Matthias, P. D. The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation. *Front Immunol*. **10**.3389 (2018).

11. Willis, SN. et al. Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Immunol*. **192(7)**, 3200-6 (2014).

12. Ahn, G. O. et al. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci*. **107**, 8363- 8368 (2010)

13. Ding, C. et al. Integrin CD11b negatively regulates BCR signalling to maintain autoreactive B cell tolerance. *Nat Commun*. **4:2813**

(2013).

14. Zhou, M. et al. Integrin CD11b Negatively Regulates B Cell Receptor Signaling to Shape Humoral Response during Immunization and Autoimmunity. *The Journal of Immunology*. **207.7**, 1785-1797 (2021).

15. Kunisawa, J. et al. Microbe-dependent CD11b<sup>+</sup> IgA<sup>+</sup> plasma cells mediate robust early-phase intestinal IgA responses in mice. *Nat Commun*, **4**, 1772 (2013)

16. Wei, M. et al. Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nature immunology*. **12.3**, 264-270 (2011).

17. Diamond, M. S. et al. ICAM-654 1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of cell biology*. **111(6)**, 3129-3139 (1990).

18. Figenschau, S. L. et al. ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokines and associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes. *Scientific Reports*. **8**, 11720 (2018).

19. Miyasaka, M., Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* **4**, 360-370 (2004).

20. Robinson, M. J. et al. The amount of BCL6 in B cells shortly after antigen engagement determines their representation in subsequent germinal centers. *Cell reports*. **30.5**, 1530-1541 (2020).

21. Green, J. A. & Cyster, J. G. S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunological reviews*. **247.1**, 36-51 (2012).
22. Shinkura, S. et al. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nature Immunology*. **5**, 707-712 (2004).
23. Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y. & Cyster, J. G. EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature*. **460**. 1122-1126 (2009).
24. Saito, M. et al. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106(27)**, 11294-11299 (2009).
25. Ochiai, K. et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*. **38.5**, 918-929 (2013).
26. Nojima, T. et al. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells n vivo. *Nature Communications*. **2**, 465 (2011)
27. Lee, H. K., Lee, J. & Tobias, P. S. Two lipoproteins extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. *The Journal of Immunology*. **168(8)**, 4012-4017 (2002).
28. Lachmandas, T. et al. Microbial stimulation of different Toll-like

receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nat Microbiol.* **2**, 16246 (2017).

29. Borm, M., van Bodegraven, A., Mulder, C. et al. The effect of NOD2 activation on TLR2-mediated cytokine responses is dependent on activation dose and NOD2 genotype. *Genes Immun.* **9**, 274-278 (2008).

30. Schwickert, T. A. et al. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med.* **208(6)**, 1243-1252 (2011).

31. Rammensee, H. G., Wiesmuller, K. H. & Loffler, M. W. A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *j. immunotherapy cancer.* **7**, 307 (2019).

32. List, C. et al. Toll-Like Receptor Ligand Based Adjuvant, PorB, Increases Antigen Deposition on Germinal Center Follicular Dendritic Cells While Enhancing the Follicular Dendritic Cells Network. *Frontiers in Immunology.* **11**, 1254 (2020).

33. FARIDI, M. H. et al. CD11b activation suppresses TLR-dependent inflammation and autoimmunity in systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, **127.4**: 1271-1283 (2017).

34. PASSOS, L. S. A. et al. Activation of human CD11b+ B1 B-cells by *Trypanosoma cruzi*-derived proteins is associated with protective immune response in human Chagas disease. *Frontiers in immunology.* **9**, 3015 (2019)

35. Watanabe, T. et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**, 800-808 (2004)
36. Caruso, R. et al. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* **41.6**, 898-908 (2014)
37. Takeda, K., Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*, **17(1)**, 1-14. (2005).
38. Yang, Z., Sullivan, B. M. & Allen, C. D. C. Fluorescent *n vivo* detection reveals that IgE<sup>+</sup> B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity*. **36(5)**, 857-872 (2012).
39. Nagai, T. et al. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101(29)**, 10554-10559, (2004).
40. Yoshikawa, S. et al. Intravital imaging of Ca<sup>2+</sup> signals in lymphocytes of Ca<sup>2+</sup> biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci Rep*. **6**, 18738 (2016).
41. Miwa, Y., Tsubota, K. & Kurihara, T. Effect of midazolam, medetomidine, and butorphanol tartrate combination anesthetic on electroretinograms of mice. *Molecular vision*. **25**, 645 (2019).
42. Jolly, C. J., Klix, N. & Neuberger, M. S. Rapid methods for the analysis of immunoglobulin gene hypermutation: application to transgenic and gene targeted mice. *Nucleic acids research*. **25.10**, 1913-1919 (1997).

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="ja"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="C252300SEQA.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0" productionDate="2023-02-
01">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>WO</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText></ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-11-24</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>U217-1394-TW</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>JP</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2021-196561</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-12-02</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">新藏 礼子(SHINKURA, REIKO)</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>SHINKURA, REIKO</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">免疫賦活化組合物</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>10</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```

    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q11">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q12">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>16</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q13">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q14">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>r denotes a or g</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>r表示a或g</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q15">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>n denotes a, g, c or t</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>n表示a、g、c或t</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q16">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>m denotes a or c</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>m表示a或c</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>sargtnmagctgsagsagtc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q17">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q18">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q19">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>r denotes a or g</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>r表示a或g</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q20">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>n denotes a, g, c or t</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>n表示a、g、c或t</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q21">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>m denotes a or c</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>m表示a或c</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q22">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>16</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q23">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>21</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>w denotes a or t</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>w表示a或t</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>sargtnmagctgsagsagtcwgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q25">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q26">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>w denotes a or t</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>w表示a或t</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q27">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggttactctgaaagwgtstg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q28">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q29">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>r denotes a or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>r表示a或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>18</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q30">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>r denotes a or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>r表示a或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggtccarctgcaacartc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>

```

```

<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q31">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q32">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>r denotes a or g</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>r表示a或g</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggtccaactvcagcarcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q33">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q34">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>10</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q35">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>s denotes c or g</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>s表示c或g</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggtgaasstggtggaatc</INSDSeq_sequence>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 7" >
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q36">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gatgtgaacttgggaagtgtc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>30</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..30</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q37">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gactagtcctctccagtttcggctgaatcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q38">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cagtggtgttttgctca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">

```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q39">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tatgctatggactactgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種組合物，其包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質且用以誘導活化B細胞之生發中心移行。

### 【請求項2】

如請求項1之組合物，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為細菌。

### 【請求項3】

如請求項2之組合物，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為 $\gamma$ 變形菌綱或擬桿菌綱的細菌。

### 【請求項4】

如請求項3之組合物，其中上述誘導B細胞中之CD11b之表現之物質為大腸桿菌(*Escherichia coli*)、腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)、肺炎克雷伯氏桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)或其等之組合。

### 【請求項5】

如請求項1至4中任一項之組合物，其用以治療具有要藉由活化B細胞之生發中心移行之活化來治療之疾病、障礙或狀態的對象。

### 【請求項6】

如請求項1至4中任一項之組合物，其用於免疫賦活化、健康維持或促進、黏膜菌群之維持或改善、或者感染症治療。

### 【請求項7】

如請求項1至4中任一項之組合物，其係黏膜投予疫苗佐劑。

**【請求項8】**

如請求項1至6中任一項之組合物，其係選自由醫藥、食品、飼料、食品添加物、飼料添加物、其等之原料組合物所組成之群中之形態。

**【請求項9】**

如請求項1之組合物，其係與抗原一同投予。

**【請求項10】**

如請求項9之組合物，其係與抗原同時投予。

**【請求項11】**

如請求項9之組合物，其係與抗原分開投予。

**【請求項12】**

如請求項1之組合物，其係包含抗原之疫苗組合物。

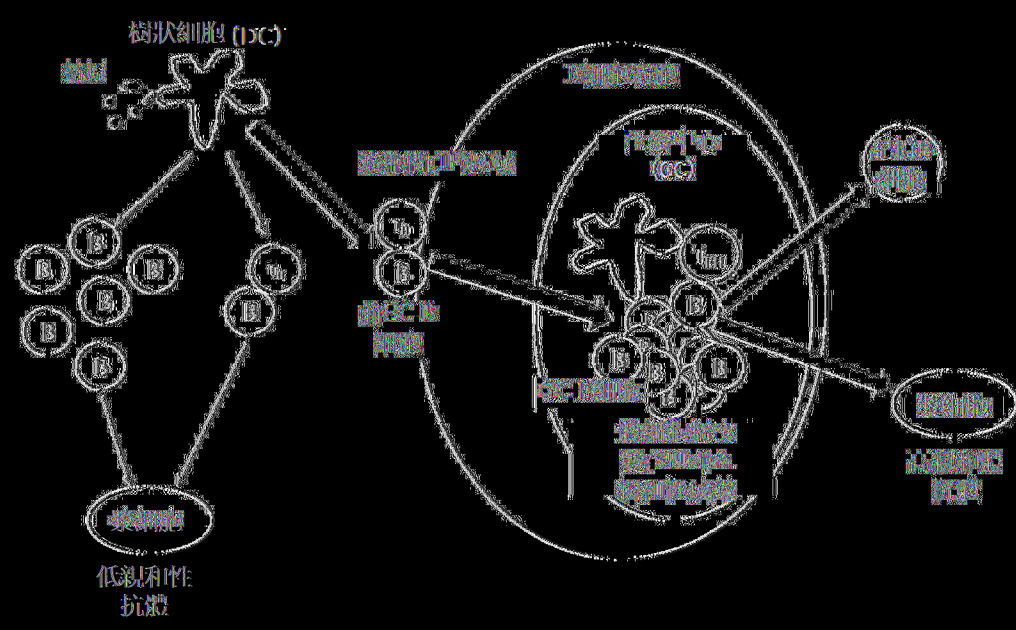
**【請求項13】**

如請求項9至12之組合物，其中抗原為病毒、細菌、真菌、寄生蟲抗原。

**【請求項14】**

一種誘導B細胞中之CD11b之表現、誘導該B細胞與T細胞及樹狀細胞之接觸而誘導活化B細胞之生發中心移行之方法，其包括：準備包含誘導B細胞中之CD11b之表現之物質之組合物，使該物質與B細胞接觸。

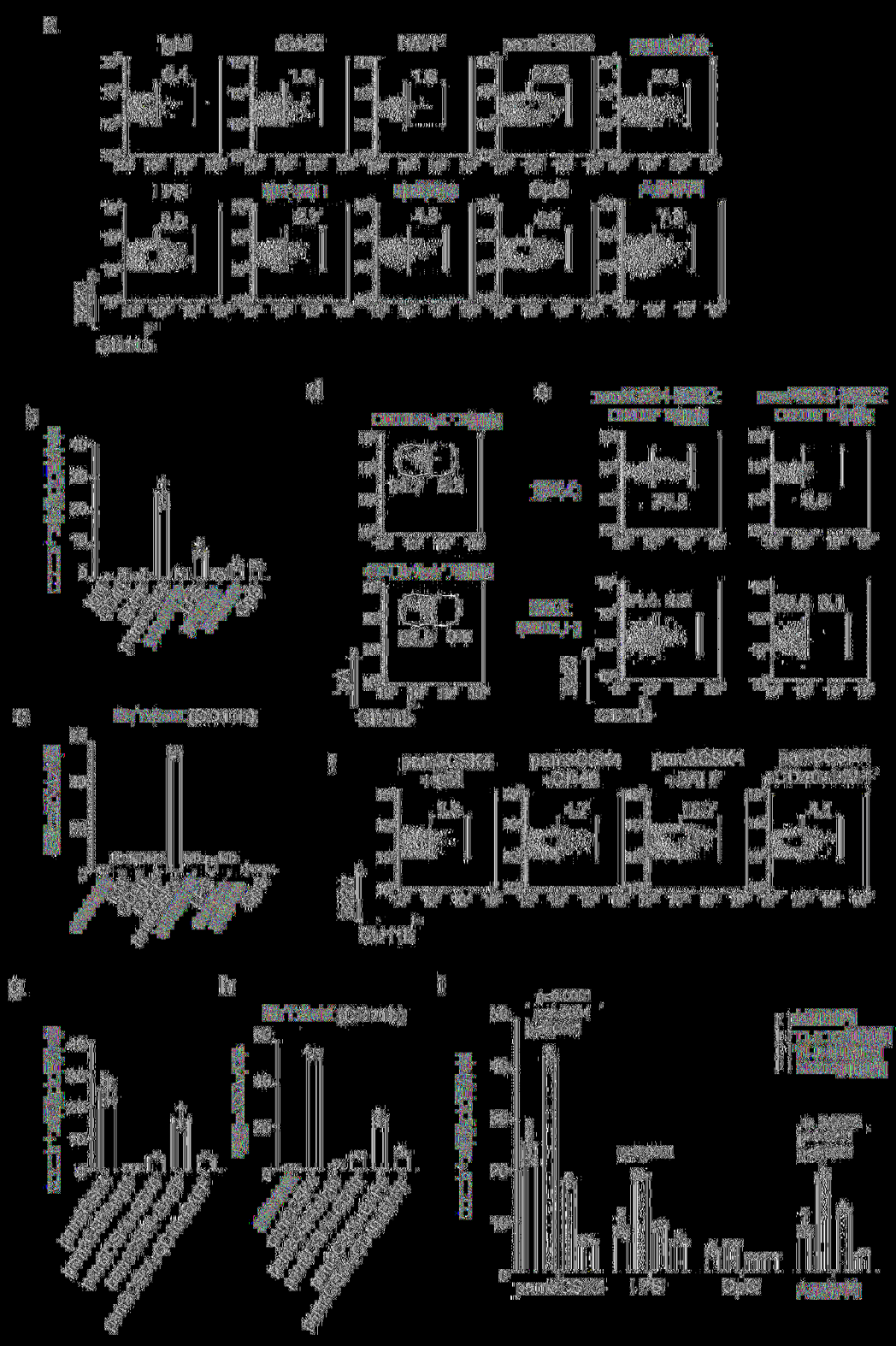
(發明圖式)



(圖1)



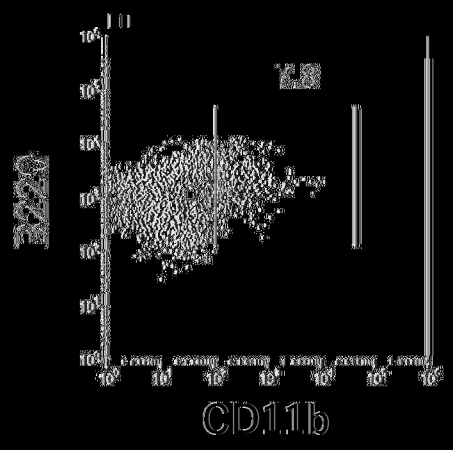




【圖4.1】

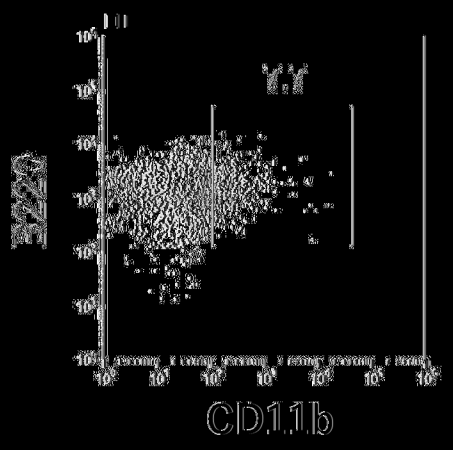
肺炎克雷伯氏桿菌

10<sup>8</sup> CFU/ml

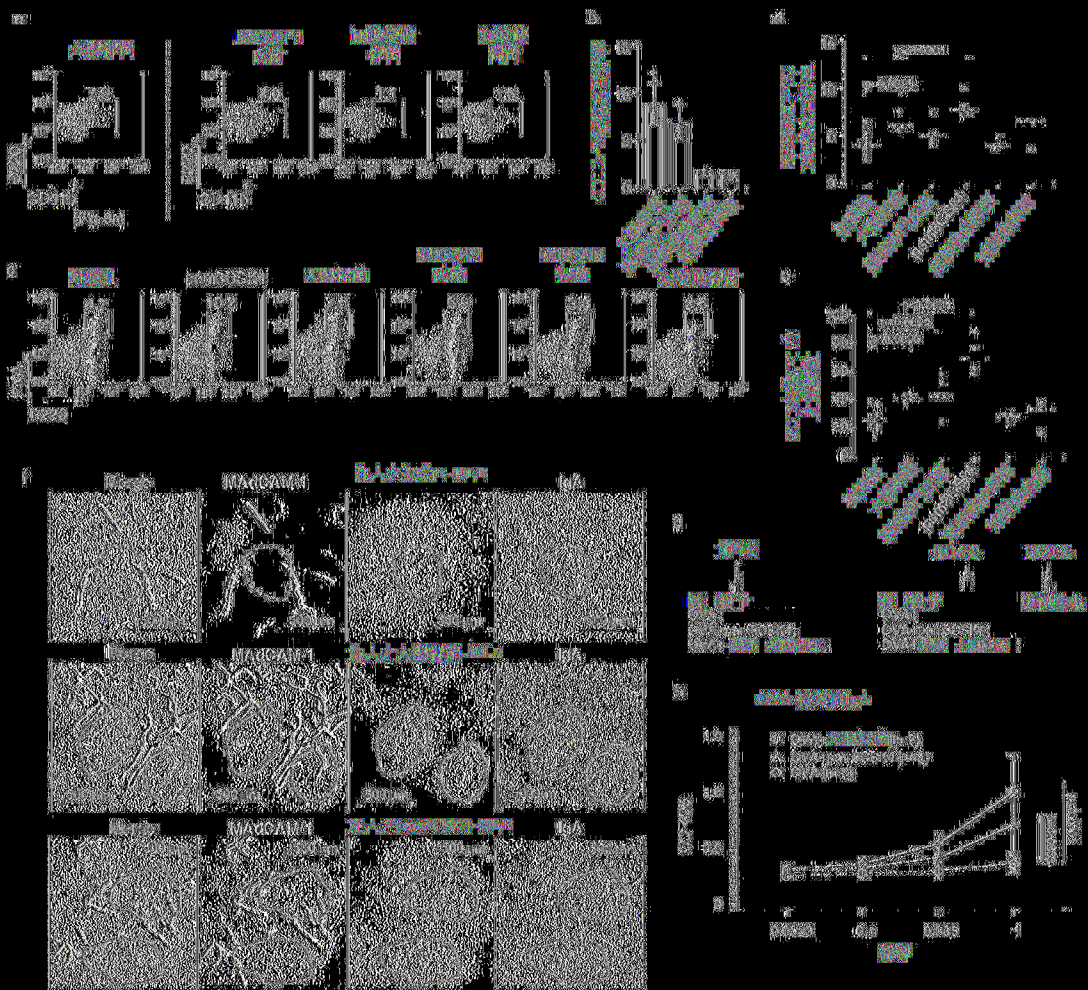


普通擬桿菌

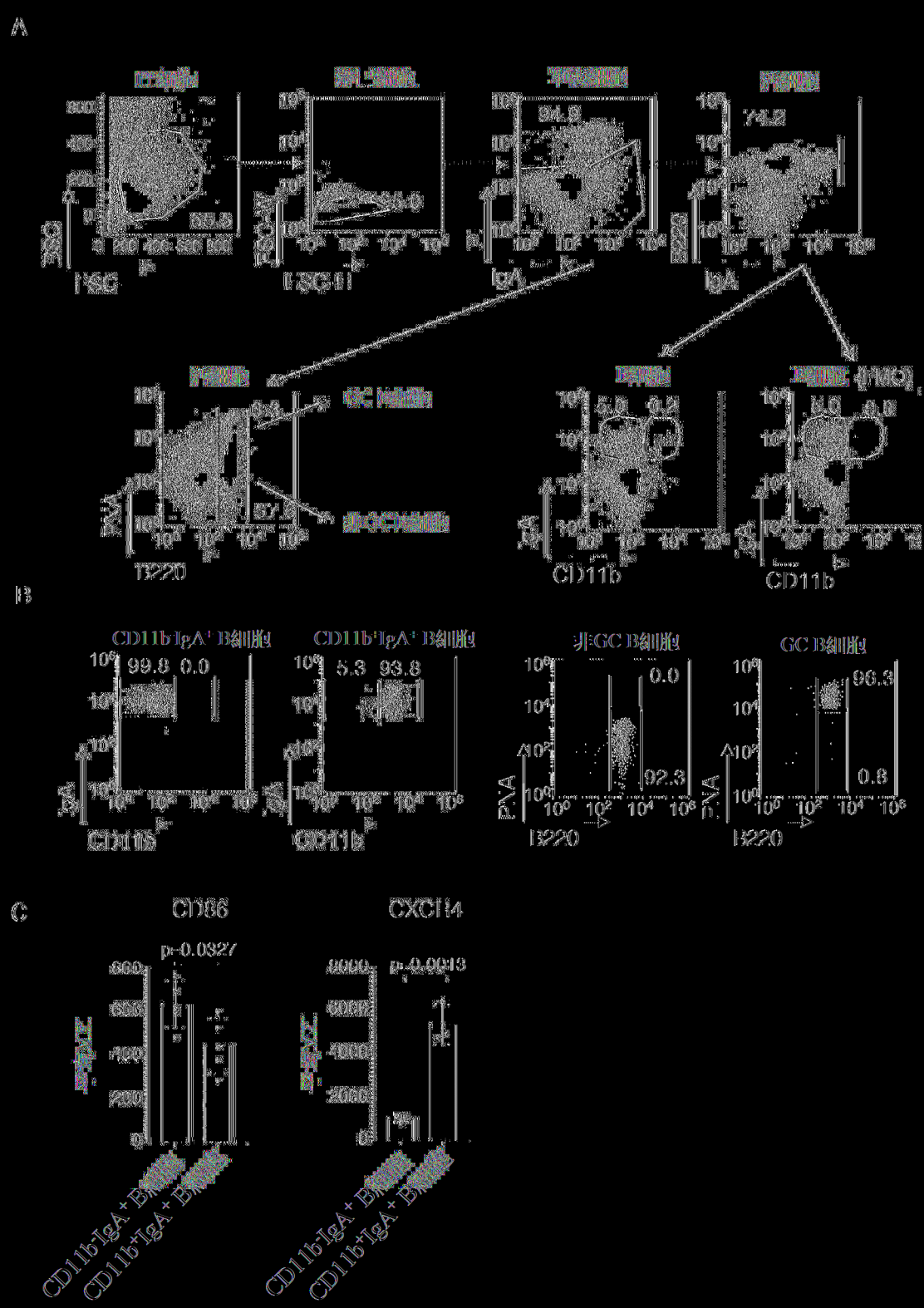
10<sup>8</sup> CFU/ml

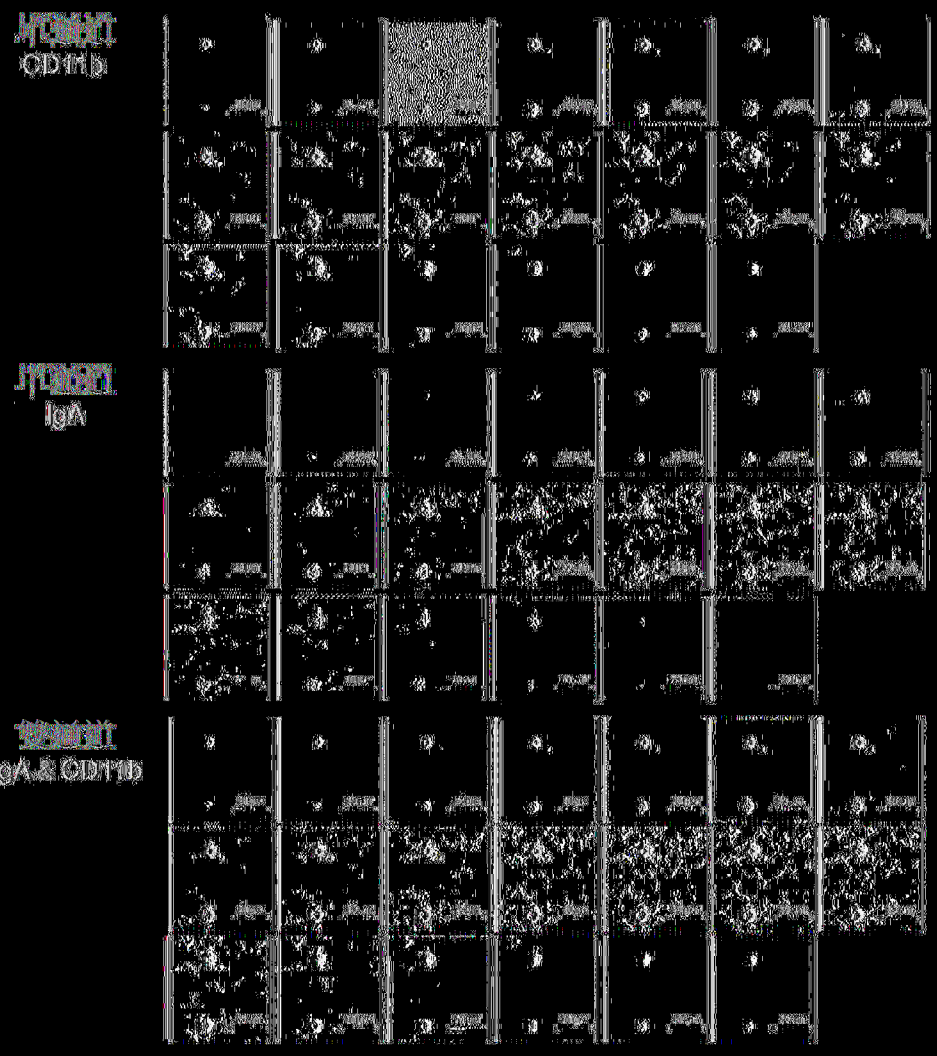
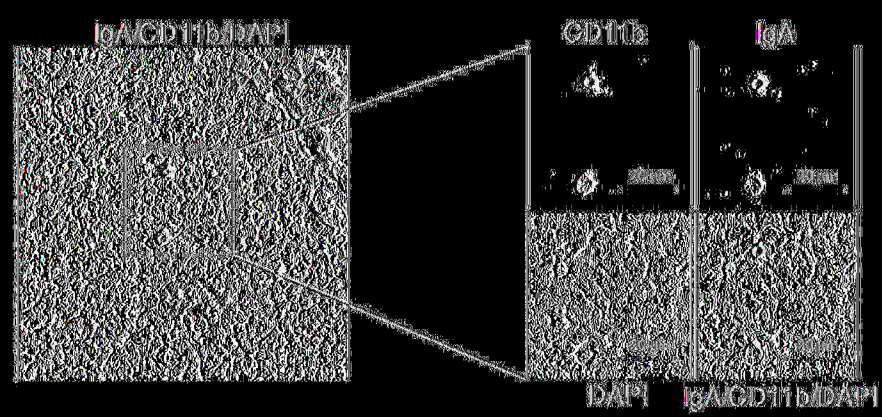


(圖4-2)

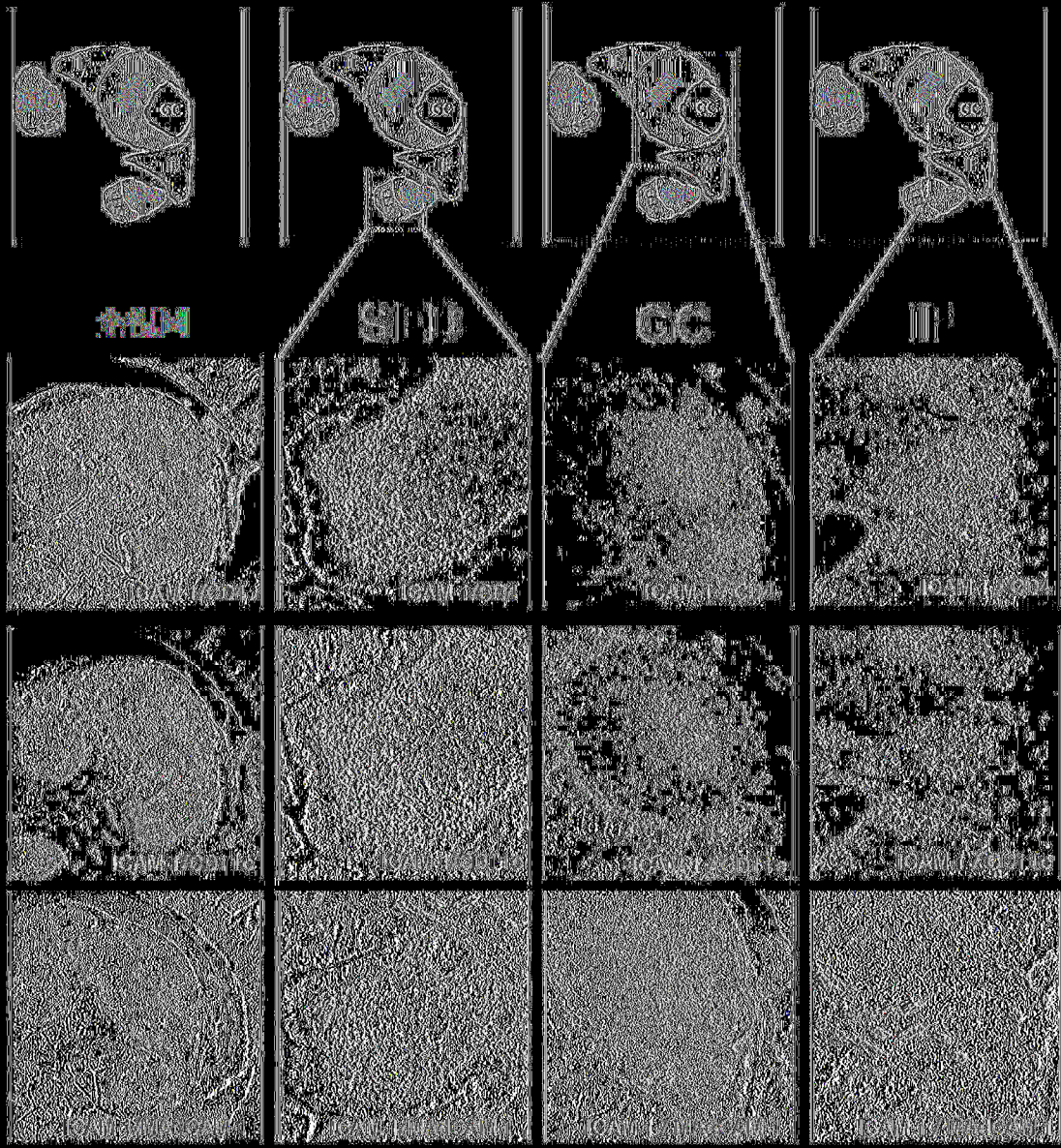


【圖14】

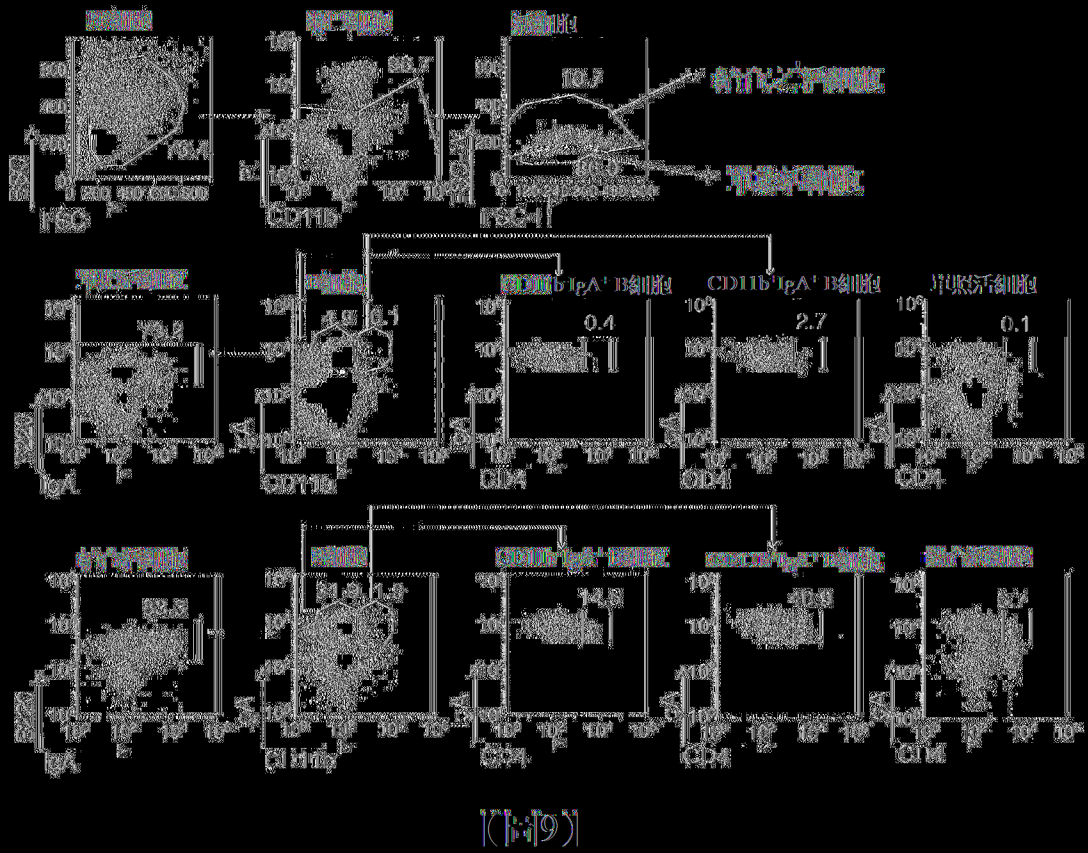


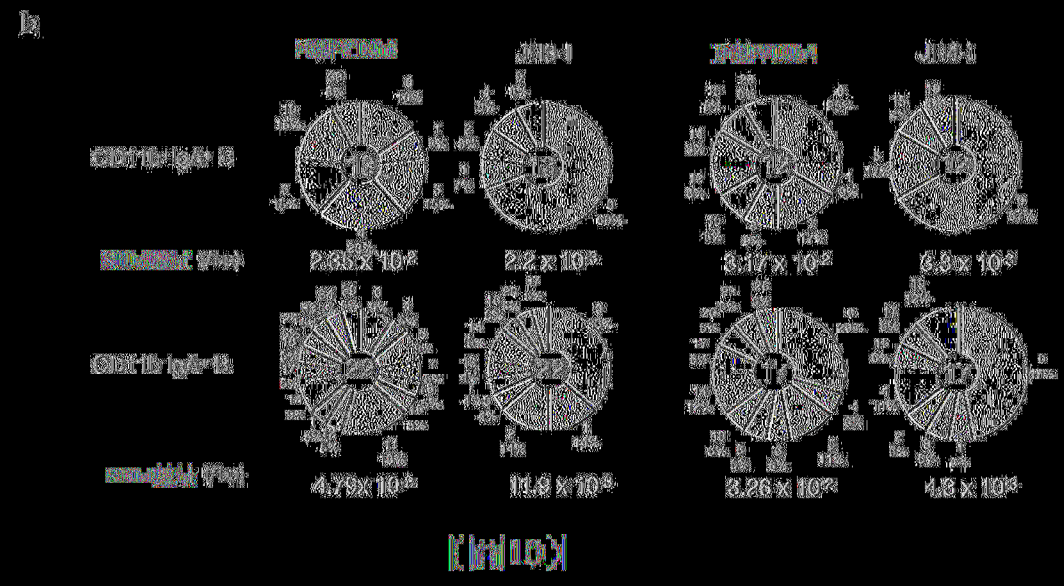


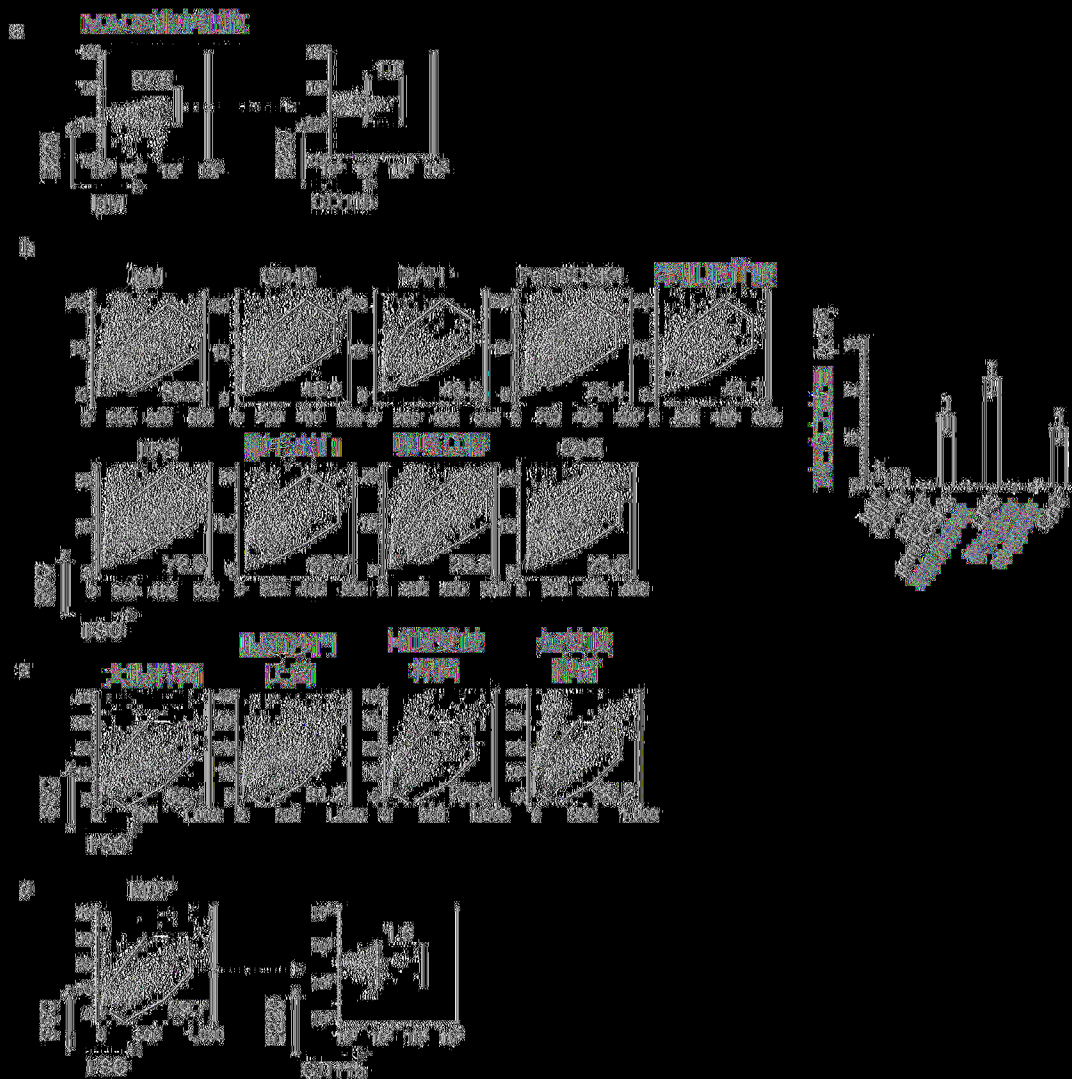
(147)



(a)

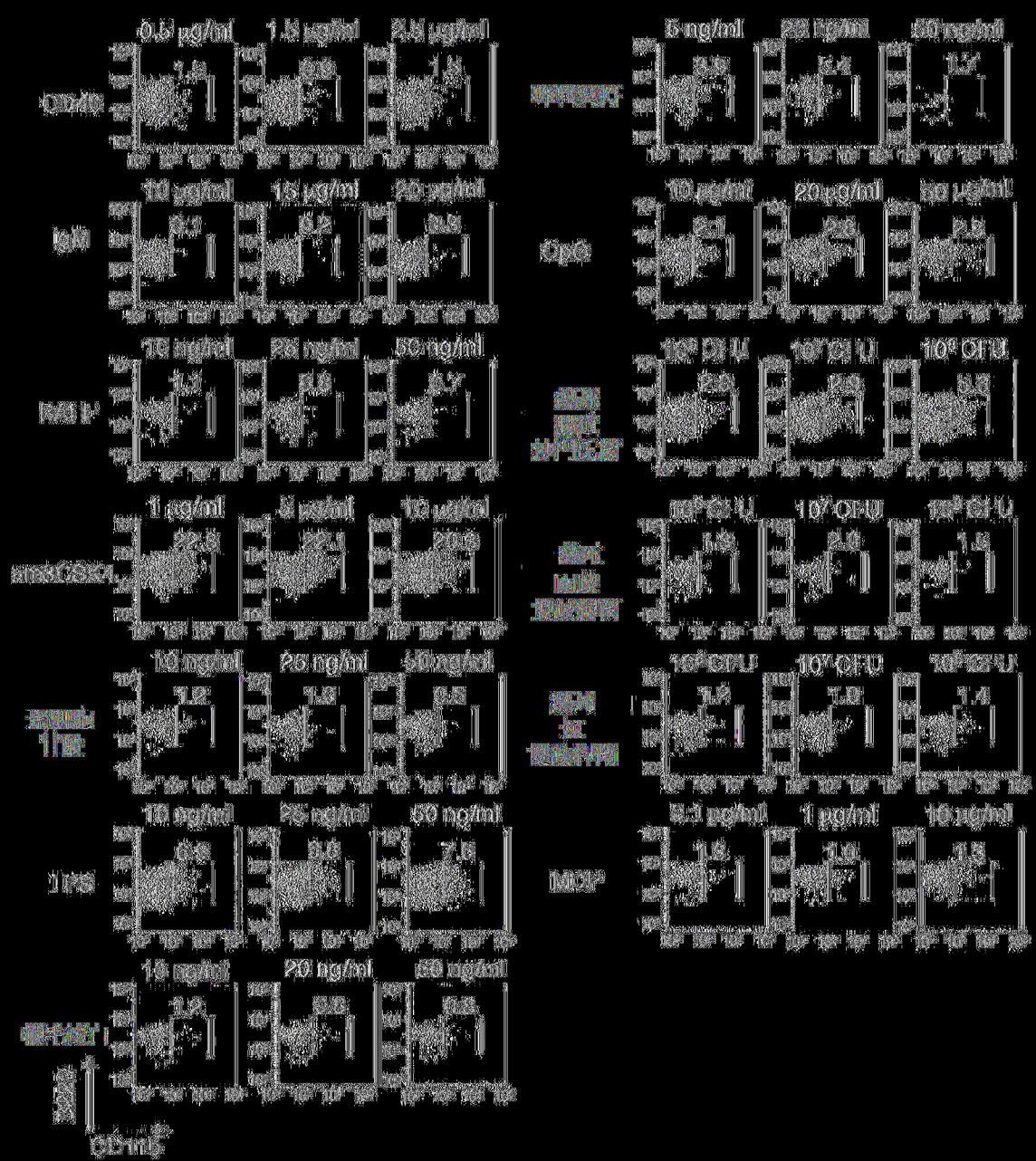






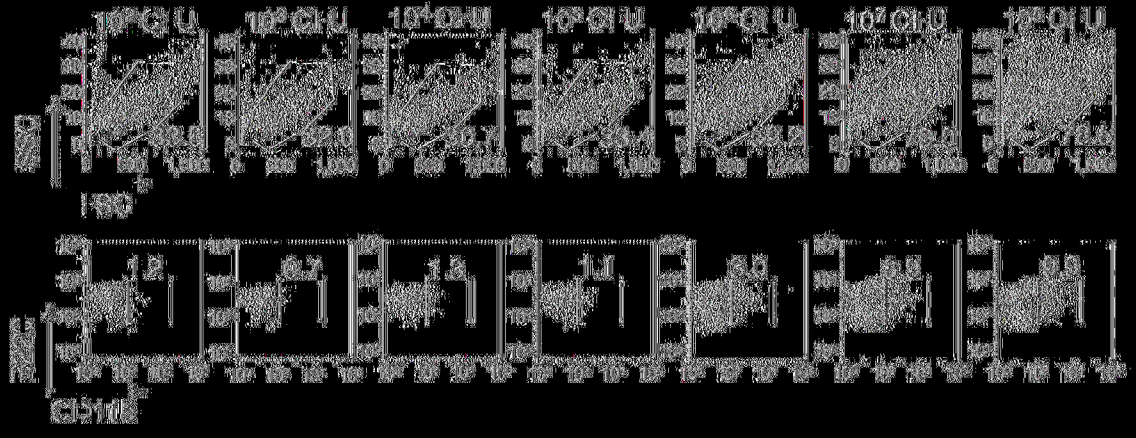
(圖 11.1)

圖

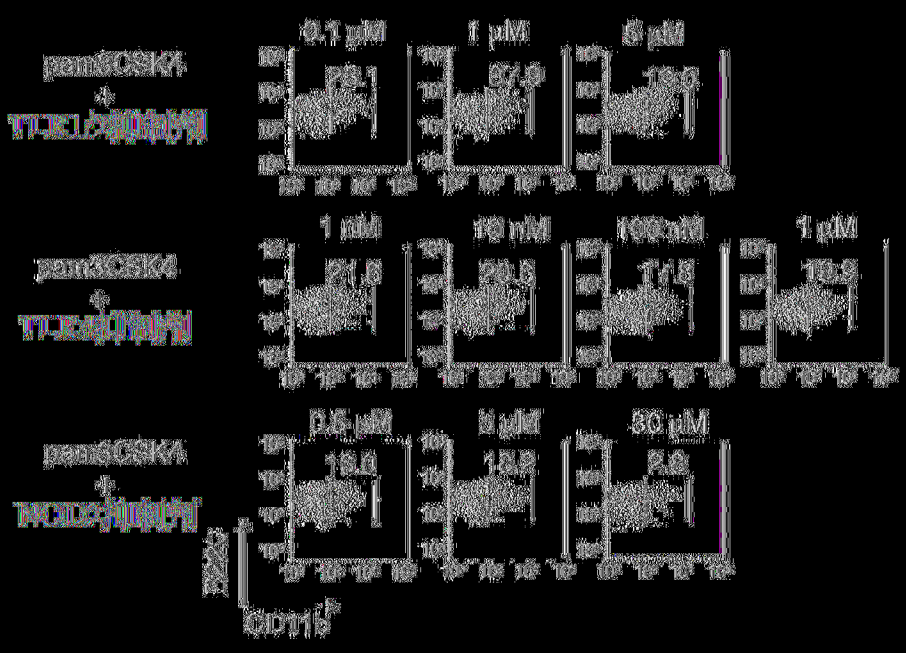


(圖11.2)

ii 熱死大腸桿菌

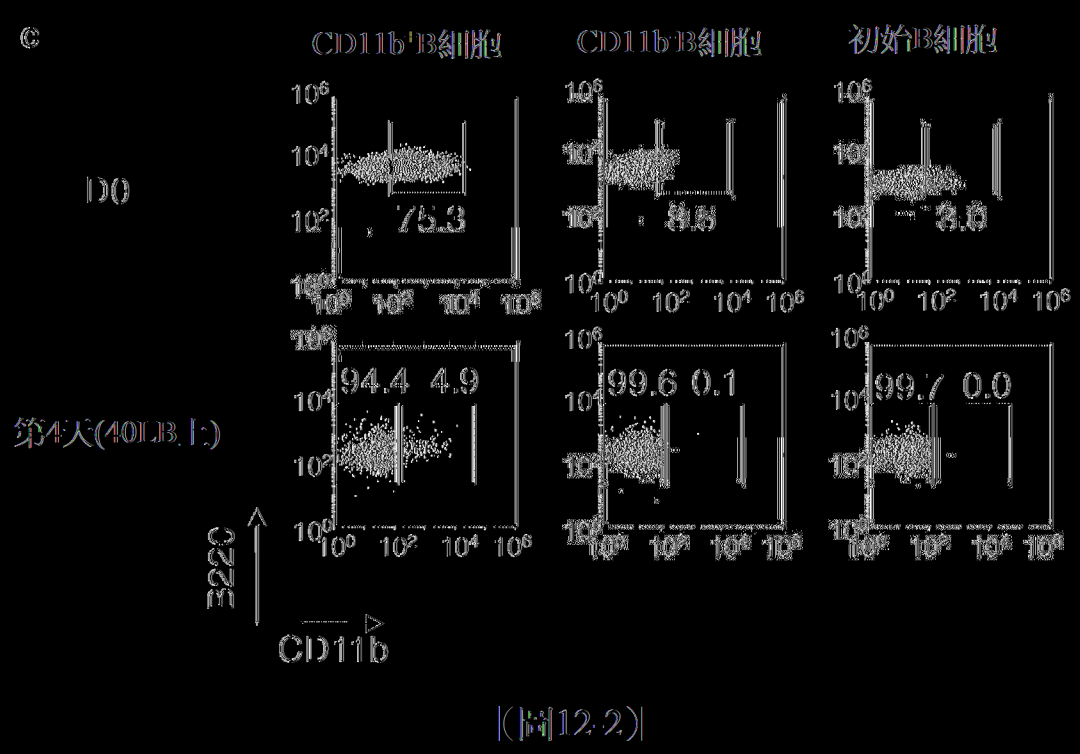


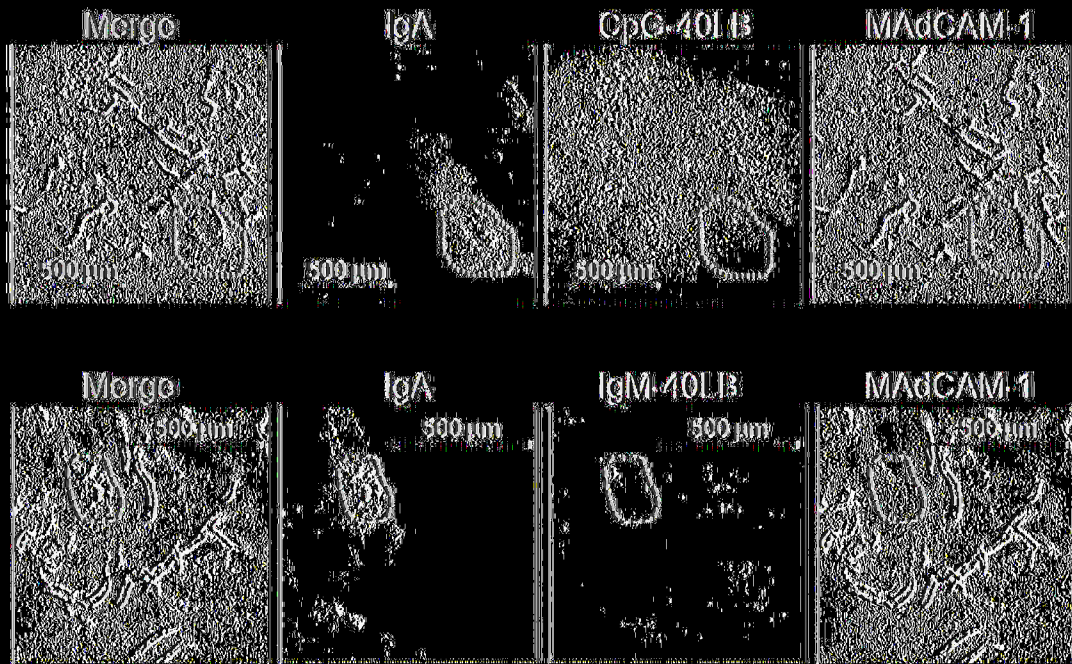
iii



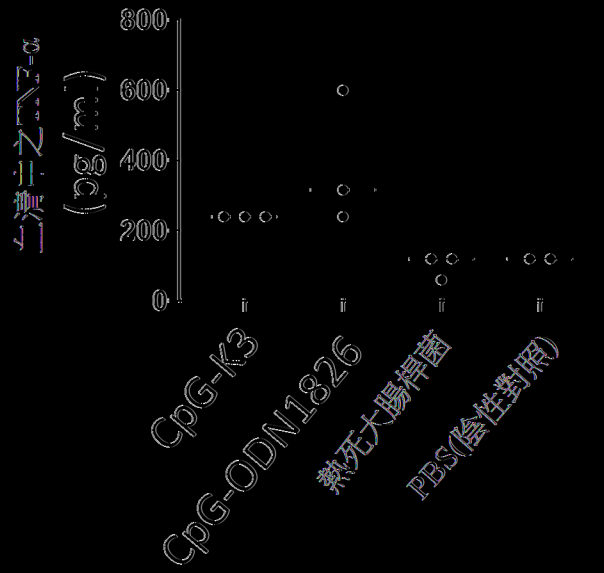
【表1.3】



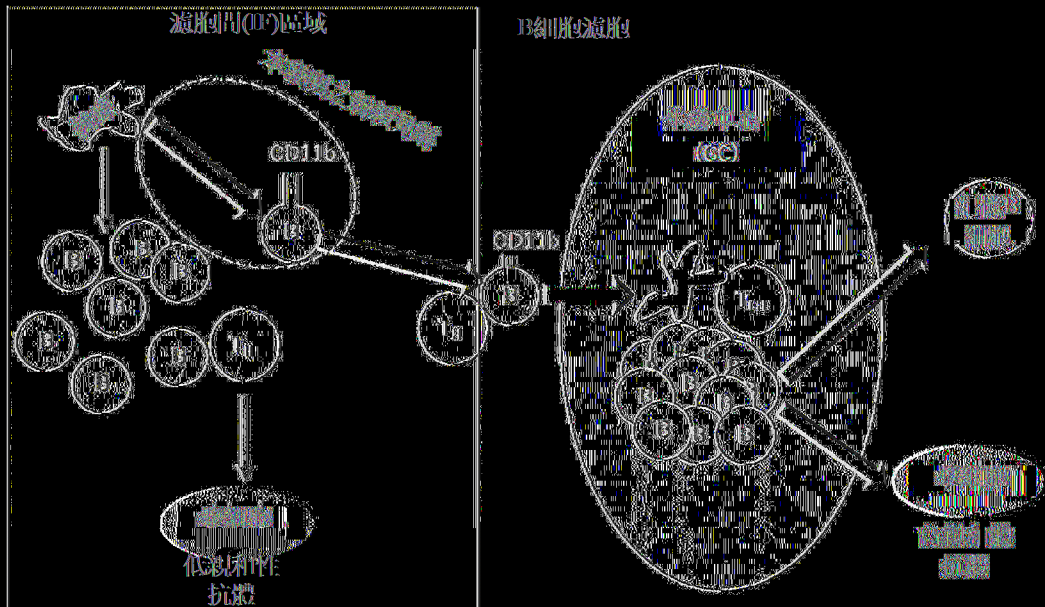




(圖13)



[(圖]14)



[(圖]15)