

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014111465/15, 24.08.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
24.08.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
26.08.2011 CU 2011-0167

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2015 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 10.04.2016 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO2006/064378 A2 22.06.2006. WO2005/110379 A2 24.11.2005. LUGO JM et al.  
*Differential expression pattern of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) alternative splicing variants and its receptors in the immune system of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Shellfish Immunol. 2011 Feb;30(2):734-8 Реферат [он-лайн] [найдено (см. прод.)]*

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 26.03.2014

(86) Заявка РСТ:  
CU 2012/000004 (24.08.2012)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2013/029570 (07.03.2013)Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

## (54) ПРИМЕНЕНИЕ PACAP В КАЧЕСТВЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО АДЬЮВАНТА ДЛЯ ВАКЦИН

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к применению питуитарного активирующего аденилатциклазу пептида (PACAP) в качестве молекулярного адьюванта для вакцин для профилактики заболеваний, вызываемых инфекционными антигенами у рыб, к соответствующим вакциновой композиции, вакциновой комбинации, обе того же назначения, и к способу повышения иммунного

(72) Автор(ы):

ЛУГО ГОНСАЛЕС Хуана Мария (CU),  
КАРПИО ГОНСАЛЕС Ямила (CU),  
ЭСТРАДА ГАРСИЯ Марио Пабло (CU)

(73) Патентообладатель(и):

СЕНТРО ДЕ ИНХЕНЬЕРИЯ ХЕНЕТИКА  
И БИОТЕКНОЛОХИЯ (CU)

RU 2 580 294 C2

RU 2 580 294 C2

ответа на вакциновый антиген при профилактике инфекционных заболеваний у рыб от инфекционных агентов, таких как вирусы, бактерии и эктопаразиты. Технический результат состоит в повышении иммунного ответа рыб против этого инфекционного агента. 4 н. и 8 з.п. ф-лы, 8 ил., 2 табл.

(56) (продолжение):  
20.04.2015] (Найдено из Интернет: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21168508). EP1956031 A1 13.08.2008.  
RU2269354 C2 10.02.2006. WO03/030931 A2 17.04.2003. CN103255089 A 21.08.2013.

R U 2 5 8 0 2 9 4 C 2

R U 2 5 8 0 2 9 4 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU<sup>(11)</sup> 2 580 294<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
*A61K 38/17 (2006.01)*  
*A61K 39/39 (2006.01)*  
*A61P 39/04 (2006.01)*

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014111465/15, 24.08.2012

(24) Effective date for property rights:  
24.08.2012

Priority:

(30) Convention priority:  
26.08.2011 CU 2011-0167

(43) Application published: 10.10.2015 Bull. № 28

(45) Date of publication: 10.04.2016 Bull. № 10

(85) Commencement of national phase: 26.03.2014

(86) PCT application:  
CU 2012/000004 (24.08.2012)

(87) PCT publication:  
WO 2013/029570 (07.03.2013)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "JUridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

LUGO GONSALES KHUANA Marija (CU),  
KARPIO GONSALES JAMILA (CU),  
ESTRADA GARIJA Mario Pablo (CU)

(73) Proprietor(s):

SENTRO DE INKHENERIJA KHENETIKA  
I BIOTEKNOLOKHIJA (CU)

R U 2 5 8 0 2 9 4 C 2

(54) APPLICATION OF PACAP AS MOLECULAR ADJUVANT FOR VACCINES

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to application of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) as molecular adjuvant for vaccines for prevention of diseases, caused by infectious antigens in fish, to respective vaccine composition, vaccine combination, both used for the same purpose, and to

method for increasing immune response to vaccine antigen in prevention of infectious diseases in fish from infectious agents, such as viruses, bacteria and ectoparasites.

EFFECT: increase of immune response in fish against said infectious agent.

12 cl, 8 dwg, 2 tbl

## Область техники

Настоящее изобретение относится к области медицины, молекулярной биологии, иммунологии, в частности к разработке вакцин и адьюванта для вакцин. В частности, в настоящем изобретении раскрыто применение питуитарного пептида, активирующего 5 аденилатциклазу (PACAP), в качестве молекулярного адьюванта для вакцин, которые используются в стратегиях иммунизации.

### Предпосылки изобретения

Основная цель вакцинации состоит в том, чтобы индуцировать специфический и эффективный иммунный ответ против патогена, который также вызывает защиту от 10 инфекций и/или заболевания и приводит к ее ликвидации. Концепция о том, что иммунный ответ против специфического антигена может быть усилен путем добавления определенных соединений в состав вакцины, была показана около 100 лет назад, когда соли алюминия вводили в составы и были названы «адьювантом» (G. Leroux-Roels (2010) Vaccine 28S C25-C36).

15 Традиционные вакцины состоят из инактивированных или ослабленных патогенов или токсинов, полученных из этих микроорганизмов. Несмотря на то что применение инактивированных или ослабленных возбудителей обладает высокой иммуногенностью, в настоящее время оно является непривлекательным в области вакцинологии из-за высокой токсичности этих препаратов.

20 Следовательно, растет интерес к адьювантам в исследованиях, связанных с разработкой новых поколений вакцин на основе рекомбинантных белковых субъединиц, синтетических пептидов и плазмид дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Эти новые вакцинныe варианты, несмотря на меньшую токсичность, в основном являются менее 25 иммуногенными при введении без иммуностимулирующего адьюванта. По этой причине в последние годы возросла потребность в более безопасных и более эффективных адьювантах (Saenz et al. (2010) Vaccine 28 (47): 7556-7562).

Хотя применение адьювантов хорошо известно, механизм их действия остается менее 30 понятными. Считается, что, как правило, они повышают эффективность вакцин посредством нескольких механизмов, в том числе: 1) усиление процессинга антигена и представления дендритными клетками, 2) индукция сигнала «опасности» через сигнальные пути, опосредованные рецепторами, которые узнают структуры, связанные с патогенами, такими как «Toll»-рецепторы, и 3) путем активации костимуляторных сигналов, которые активируют лимфоциты. Эти механизмы запускаются с помощью 35 индукции цитокинов и регуляции экспрессии соответствующих костимуляторных сигналов (Secombes (2010) Fish & Shellfish Immunology, 409-416).

Несколько эндогенных молекул и белков (Yin and Kwang (2000) Fish & Shellfish Immunology 10, 375-378; Lingnau et al. (2007) Expert Rev Vaccines 6 (5): 741-6; Zhang et al. (2010) Vaccine 28: 5114-5127) были изучены в качестве адьювантов. Кроме того, известно, что некоторые иммуностимулирующие пептиды могут выступать в качестве адьюванта 40 *in vivo*, стимулируя иммунный ответ белковых или пептидных антигенов (Saenz et al. (2010) Vaccine 28 (47): 7556-7562).

PACAP принадлежит к суперсемейству секретин/глюкагон/вазоактивный кишечный пептид (Miyata et al (1989) Biochem Biophys Res Commun. 164: 567-574). Он представляет собой многофункциональный нейропептид, который играет важные роли в качестве 45 нейротрофического фактора и тропного гормона гипофиза, в качестве нейромедиатора, нейромодулятора и сосудорасширяющей молекулы у млекопитающих (Arimura A. (1998) Japanese Journal of Physiology 48: 301-31). Показана его роль в делении и дифференцировке клеток, а также в гибели клеток (Sherwood et al. (2000) Endocrine Review 21: 619-670).

Этот пептид существует в двух молекулярных формах в 38 (PACAP38) и 27 (PACAP27) аминокислот (Miyata et al. (1990) Biochemical and Biophysical Research Communications 170: 643-8). Биологические действия PACAP проявляются посредством семейства трех VIP/PACAP рецепторов, которые принадлежат к секретин G-белок связанному рецептору:

5 рецептору I типа, который высоко специфичен для PACAP и называется PAC-1; и рецепторам II типа, которые проявляют такую же активность к PACAP, что и к вазоактивному кишечному пептиду (VIP), которые известны как VPAC-1 и VPAC-2 (Vaudry et al. (2000) Pharmacol. Rev 52: 269-324).

PACAP широко распространен в различных тканях, в том числе связанных с иммунной 10 системой, хотя присутствие этого пептида и его рецепторов в клетках иммунной системы млекопитающих лишь частично выявлено (Gaytan et al. (1994) Cell Tissue Res 276: 223-7, Abad et al. (2002) Neuroimmunomodulation 10: 177-86). PACAP модулирует воспалительную реакцию посредством регулирования интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-10 (ИЛ-10) (Martinez et al. (1996) J Immunol. 156 30(11): 4128-36; Martinez 15 et al. (1998) J Neuroimmunol. 85(2): 155-67, Martinez et al. (1998) J Leukoc Biol. 63 (5): 591-601).

В активированных макрофагах PACAP ингибирует выработку провоспалительных цитокинов и стимулирует выработку противовоспалительных цитокинов, обеспечивая, таким образом, гомеостаз иммунной системы. Кроме того, известно, что PACAP снижает 20 экспрессию костимуляторных молекул B7.2/B7.1 и последующую активацию Т-хелперов (Th). С другой стороны, PACAP ингибирует в активированных макрофагах продукцию IL-6 через его PAC-1 receptor, подавляя воспаление (Martinez et al. (1998) J Neuroimmunol. 85(2): 155-67, Martinez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998, 63(5): 591-601). Ингибирующее действие PACAP на транскрипцию IL-6 в ответ на интенсивные воспалительные стимулы 25 помогает защите тканей и иммунной системы гомеостаза (Martinez et al. (1998) J Neuroimmunol. 85(2): 155-67; Martinez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998 года; 63(5): 591-601). В отличие от этого, PACAP индуцируют экспрессию B7.2 и способствует клеточной 30 дифференциации в Th2 в нестимулированных макрофагах (Delgado and Ganea (2001) Arch Immunol. Ther Exp. (Warsz) 49(2): 101-10). Сообщалось о наличии PACAP в лимфоидных органах уток (Squillaciotti et al. (2005) Anatoma, Histologia, Embryologia. Vol.34, Issue Supplements 1, p.49). Было выдвинуто предположение о применении PACAP у 35 млекопитающих в качестве терапевтического агента для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как септический шок, ревматоидный артрит и болезнь Крона (Gomariz et al. (2006) Ann. NY Acad. Sci 1070: 51-74). Известно, что при аутоиммунных заболеваниях происходит бесконтрольный иммунный ответ против веществ и тканей организма. В связи с этим PACAP предотвращает воспалительные процессы в животных 40 моделях аутоиммунных заболеваний через правильный баланс цитокинов и хемокинов и их рецепторов, посредством привлечения иммунных клеток и путем регулирования образования и активации Th1-клеток и цитокинов, которые эти клетки секреируют.

Кроме того, известно, что молекулы, участвующие в гомеостазе иммунной системы, такие как «Toll»-рецепторы, необходимы для активации врожденного иммунного ответа, который повышает адаптивный иммунный ответ. Однако эта реакция может привести к патогенезу острого и/или хронического воспаления, аутоиммунного заболевания и рака (Gomariz et al. (2010) Current Pharmaceutical. Design 16: 1063-1080). В связи с этим 45 известно, что система VIP-PACAP участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих эти рецепторы (Gomariz et al. (2006) Ann. NY Acad. Sci 1070: 51-74). Таким образом, оба пептида могут вызывать нарушения в регуляции путей продуцирования этих рецепторов.

PACAP уменьшает уровни циркулирующих цитокинов, опосредованных эндогенной

молекулой HMGB1 (high mobility group box 1) (Tang et al. (2008) International Immunopharmacology 8 (12): 1646-1651) и ингибитирует их высвобождение. Известно, что молекула HMGB1 и производные от нее пептиды способны выступать в качестве адьюванта, усиливая иммунный ответ против пептидного антигена и белка (Saenz et al. (2010) Vaccine 28 (47): 7556-7562).

Знания о функции PACAP в модуляции иммунного ответа у рыб ограничены исследованиями, выполненными нашей исследовательской группой. Мы показали, что рекомбинантный PACAP Clarias gariepinus, введенный путем иммерсионных ванн или путем инъекции, не только способствует росту, но также стимулирует врожденные

иммунные параметры (лизоцим, метаболиты-производные оксида азота и антиоксидантные защиты) и приобретенный иммунитет (IgM) у личинок и молоди рыб (Carpio et al. (2008) Fish and Shellfish Immunology 25: 439-45; Lugo et al. (2010) Fish and Shellfish Immunology 29: 513-520). Эти свойства PACAP были описаны в международной патентной заявке WO 2007/059714, «Neuropeptides para el cultivo de organismos acuaticos».

В настоящее время в сфере медицины и ветеринарии по-прежнему существует интерес к идентификации соединений, которые могут быть использованы в качестве безопасных и более эффективных адьювантов, которые могут быть включены в существующие вакцины и в те, которые находятся в стадии разработки.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение разрешает описанные выше проблемы, предоставляя новую альтернативу адьюванта, способного значительно усиливать иммунный ответ на антиген, который вводится совместно, и, следовательно, она представляет собой весьма эффективный адьюvant. Применение «питуитарного активирующего аденилатциклазу пептида» (PACAP) в качестве молекулярного адьюванта для антигенов, которые

присутствуют в вакцинах, используемых в различных стратегиях иммунизации, является предметом настоящего изобретения. В одном варианте осуществления изобретения указанные вакцины, содержащие PACAP в качестве адьюванта, предназначены для иммунизации против инфекционных агентов. Такие инфекционные агенты могут представлять собой, среди прочих, вирусы, бактерии и эктопаразиты. В конкретном

варианте осуществления эти инфекционные агенты влияют на млекопитающих, птиц и рыб. Термин «питуитарного активирующего аденилатциклазу пептида (PACAP)», используемый в настоящем изобретении, включает эту молекулу в любом варианте (PACAP27 или PACAP38), либо изолированную из своего естественного источника, произведенную путем химического синтеза или произведенную с помощью технологии

рекомбинантной ДНК, а также его применение в качестве пептида или в виде нукleinовых кислот.

В контексте этого изобретения термин «молекулярный адьювант» относится к любой молекуле белковой природы, способной модулировать иммунный ответ вакцины против антигена, увеличивая его.

До сих пор ни в одном исследовании не было показано использование PACAP в качестве молекулярного адьюванта. Как указано выше, было предложено использовать этот пептид млекопитающих в качестве терапевтического агента для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как септический шок, ревматоидный артрит и болезнь Крона (Gomariz et al. (2006) Ann. NY Acad. Sci. 1070: 51-74). В связи с этим PACAP

предотвращает воспалительные процессы в животных моделях аутоиммунных заболеваний с помощью надлежащего баланса цитокинов и хемокинов и их рецепторов, путем привлечения иммунокомпетентных клеток, а также путем регулирования образования и активации Th1-клеток и цитокинов, которые эти клетки секретируют.

Учитывая эти результаты, неожиданным является эффект PACAP, обнаруженный как часть наших исследований, показывающий, что его введение в сочетании с антигеном повышает иммунный ответ против указанного антигена через стимулирование простимулирующих цитокинов и других элементов гуморального иммунного ответа.

- 5 Кроме того, известно, что система VIP-PACAP участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих рецепторы «Toll» (Gomariz et al. (2006) Ann. NY Acad. Sci 1070: 51-74). В этом смысле оба пептида могут вызывать нарушения в путях регуляции производства этих рецепторов, что делает неочевидным их использование в качестве вакцинного адьюванта. Еще один элемент, контрастирующий с новым использованием  
10 PACAP, раскрытым в данном изобретении, является демонстрацией того, что этот пептид ослабляет циркулирующие уровни и ингибитирует высвобождение цитокинов, опосредуемых эндогенной молекулой HMGB1 (Tang et al. (2008) International Immunopharmacology 8 (12): 1646-1651).

В настоящем изобретении впервые показано, что усиление иммунного ответа, 15 специфического к вакциальному антигену, совместно вводимому с PACAP, наблюдается на уровне как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.

Другой объект настоящего изобретения представляет собой вакциновую композицию, содержащую PACAP в качестве адьюванта, по меньшей мере вакцинового антигена, и фармацевтически приемлемые носители или разбавители. Эта вакциновая композиция, 20 содержащая PACAP в качестве адьюванта и по меньшей мере один представляющий интерес антиген, вызывает иммунный ответ против антигена или антигенов, который является либо местным, или системным. Вакцины и вакциновые композиции по настоящему изобретению могут быть основаны, например, на рекомбинантных белках, аттенюированных микроорганизмах или нуклеиновых кислотах. В одном варианте 25 осуществления изобретения упомянутые вакциновые композиции вводят перорально, при помощи инъекции или при помощи иммерсионных ванн.

В контексте настоящего изобретения в таких вакциновых композициях PACAP вводят в качестве пептида, изолированного из своего естественного источника, полученного путем химического синтеза или с помощью технологии рекомбинантной ДНК. PACAP 30 может также использоваться в качестве нуклеиновых кислот.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения вакцины, содержащие PACAP в комбинации с несколькими антигенами, вводят млекопитающим, птицам или рыбам, впервые демонстрируя адьювантный эффект для PACAP. Неожиданно было отмечено, что введение нейропептида PACAP в комбинации с антигеном повышало 35 уровень специфических антител против указанного антигена у млекопитающих, птиц или рыб. Кроме того, впервые было показано *in vitro*, что PACAP значительно увеличивает транскрипты интерлейкина-1 бета (IL-1 $\beta$ ) и интерлейкина 15 (IL-15) в лейкоцитах рыб.

В разных вариантах осуществления настоящего изобретения, которые раскрывают 40 вакциновые композиции или комбинации, включающие PACAP в качестве адьюванта, используются разнообразные антигены, такие как овальбумин (OVA), E2-гликопротеин вируса классической чумы свиней (CSFV), гемагглютинин (HA) вируса птичьего гриппа, полипептид my32 Caligus rogercresseyi, инактивированные клетки Aeromonas hydrophila, 45 106 кДа белок (NH<sub>2</sub>-VP2-VP4VP3-COOH) вируса инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV), гликопротеин вируса вирусной геморрагической септицемии (VHSV) и реснитчатый паразитарный Ichthyophthirius multifiliis.

В специфическом варианте осуществления изобретения в вакциновых композициях PACAP применяют в качестве комбикорма, в концентрации 50-750 мкг/кг корма. Во

втором варианте осуществления изобретения PACAP применяется путем инъекции, в концентрации 0,1-10 мкг на грамм массы тела. В другом варианте осуществления изобретения, PACAP применяется для водных организмов способом погружения в ванну, в концентрации 50-1000 мкг на литр воды.

- 5 В другом варианте осуществления изобретения антиген и адьювант PACAP может быть частью вакцинной комбинации, элементы которой вводят одновременно, по отдельности или последовательно во время одного и того же протокола иммунизации. В определенном варианте осуществления изобретения комбинация используется для профилактики вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. Для этой
- 10 вакцинной комбинации PACAP и антиген или антигены вводят перорально, путем инъекции или способом погружения в ванну. В определенном варианте осуществления PACAP применяется как комбикорма в концентрации 50-750 мкг/кг корма. Во втором варианте осуществления PACAP-5 применяется путем инъекции в концентрации 0,1-10 мкг пептида на грамм массы тела. В другом варианте осуществления изобретения
- 15 PACAP применяется для рыб способом погружения в ванну в концентрации 50-1000 мкг PACAP на литр воды.

Другой аспект этого изобретения представляет собой способ повышения иммунного ответа против антигена, в котором используется вакцинальная композиция, содержащая «питуитарный активирующий аденилатциклазу пептид» (PACAP) в качестве

- 20 вспомогательного средства для указанного антигена. В соответствии со способом, раскрытым в изобретении, PACAP в качестве адьюванта и антиген можно вводить одновременно, раздельно или последовательно в течение одного и того же графика иммунизации. PACAP используется в качестве вспомогательного способа изобретения как пептид, который был получен из своего естественного источника, путем химического
- 25 синтеза или с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Также изобретение включает в себя способ, в котором PACAP, используемый как адьювант, вводят в виде нуклеиновых кислот. В соответствии со способом по изобретению увеличение иммунного ответа, специфического для вакцинированного антигена, вводимого одновременно с PACAP, имеет место как при гуморальном, так и при клеточном специфическом иммунном
- 30 ответе.

Как продемонстрировано в нескольких вариантах осуществления изобретения, повышение или увеличение иммунного ответа против представляющего интерес антигена выражается в виде более высокого уровня защиты против различных инфекционных агентов, в том числе вирусных, бактериальных и эктопаразитарных сущностей.

- 35 Краткое описание чертежей
- Фиг.1. Титры общего иммуноглобулина G (IgG) (A), IgG1 (B) и IgG2a (C), индуцированные у мышей путем иммунизации OVA при совместном введении с нейропептидом PACAP38. Использовали две экспериментальные группы по 6 животных в каждой. Группа отрицательного контроля (буферизованный фосфатом солевой раствор (PBS)/OVA) была инокулирована внутрибрюшинно в день 0 и 7 в дозе 6 мкг OVA в 0,2 мл PBS. Группа, которая также получила PACAP38 (PBS/OVA+пептид), была инокулирована внутрибрюшинно в день 0 и 7 в дозе 6 мкг OVA + 0,5 мкг PACAP38 в 0,2 мл PBS. Разные буквы указывают на значительные различия.

- 40 Фиг.2. Оценка клеточного иммунного ответа у свиней, вакцинированных вакцинной композицией на основе E2-PACAP. Клеточный иммунный ответ измеряли в свиных лимфоцитах, выделенных на 5 день после вакцинации E2 (1-я группа), E2+PACAP (2-я группа) и плацебо (группа 3). (A) анализ лимфопролиферации: результаты выражаются в виде индекса стимуляции (SI), определяемого как отношение импульсов в минуту

(срм) стимулированной культуры (срм) к срм необработанной контрольной группы. Лимфопролиферативный ответ с  $SI > 2$  считался положительным (В). Определение IFN- $\gamma$  секреции методом ПЦР в реальном времени. Значения выражены как среднеарифметическое от  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (\*\*) $p < 0,01$ .

<sup>5</sup> Фиг.3. Титры ингибиования гемагглютинации у кур, иммунизированных НА или НА-PACAP (А). Среднее арифметическое титров антител было выражено как  $\log_2$  реципрокного значения наибольшего разбавления сыворотки, которая производила ингибиование гемагглютинации. (В) Клеточный иммунный ответ у вакцинированных кур. Секрецию IFN- $\gamma$  определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Значения выражены как среднеарифметическое  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (\*\*) $p < 0,01$ .

<sup>10</sup> Фиг.4. Анализ экспрессии ПЦР в реальном времени эффекта PACAP38 *in vitro* на транскрипцию IL-1 $\beta$  в лейкоцитах периферической крови (А) и головных почек (В) у наивной радужной форели. Эффект введения PACAP в концентрации  $10^{-10}$  М,  $10^{-9}$  М и  $10^{-8}$  М оценивали через 48 ч после лечения. Эксперимент был повторен 4 раза. Культуру лейкоцитов обрабатывали в повторностях, и ПЦР проводились в трех повторностях. Данные представлены в виде среднего относительной экспрессии IL-1 $\beta$  относительно эндогенного фактора элонгации EF1 $\alpha \pm$  стандартное отклонение (SD). (\*)  $p < 0,05$ . \*  
<sup>15</sup> ( $p < 0,05$ ) указывает на то, что относительная экспрессия представляющего интерес гена была статистически значимо выше, чем его относительная экспрессия в необработанной культуре лейкоцитов (отрицательный контроль)

<sup>20</sup> Фиг.5. Анализ экспрессии путем ПЦР в реальном времени эффекта PACAP38 *in vitro* на транскрипцию IL-15 в лейкоцитах периферической крови (А) и головных почек (В) у наивной радужной форели. Последствия PACAP введения в концентрации  $10^{-10}$  М,  $10^{-9}$  М и  $10^{-8}$  М оценивалась через 48 ч после лечения. Эксперимент был повторен 4 раза. Культуру лейкоцитов обрабатывали в повторностях, и ПЦР проводились в трех повторностях. Данные представлены в виде среднего относительной экспрессии IL-15 относительно эндогенного фактора элонгации EF1 $\alpha \pm$  стандартное отклонение (SD).  
<sup>25</sup> (\*)  $p < 0,05$ .

<sup>30</sup> Фиг.6. Титры агглютинирующих антител против *A. hydrophila* у канального карпа. Значения на оси Y представляют собой среднее арифметическое титров антител  $\pm$  стандартная ошибка. (\*)  $p < 0,05$  (\*\*) $p < 0,01$ . Группа 1: инъецирована PBS, группа 2: инъецирована инактивированными формалином клетками *A. hydrophila*, группа 3: инъецирована инактивированными формалином клетками *A. hydrophila* и PACAP (1 мкг/рыбу).

<sup>35</sup> Фиг.7. Эффект совместного введения при помощи внутримышечной инъекции ДНК-вакцины (pP-IPNV) в дозе 1 мкг/рыба с плазмидной ДНК, содержащей кДНК PACAP *Clarias gariepinus*, под контролем быстрого раннего промотора цитомегаловируса человека (pCMV-PACAP). В день 30 после вакцинации рыбы подверглись воздействию вируса путем внутрибрюшинного введения 100 мкл IPNV ( $1 \times 10^7$  (TCID<sub>50</sub>) мл<sup>-1</sup> на рыбку). В 7 день после заражения 10 рыб из группы были забиты для того, чтобы оценить вирусную нагрузку в головных почках с помощью ПЦР в реальном времени. Значения представляют среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Разные надстрочные буквы представляют собой статистически значимые различия между группами. Группа 1: инъецирована PBS, группа 2: инъецирована pP-IPNV в дозе 1 мкг/рыбу, группа 3: совместно инъецирована pP-IPNV (1 мкг/рыбу) и pCMV-PACAP (0,5 мкг/рыбу), группа 4: совместно инъецирована pP-IPNV (1 мкг/рыбу) и pCMV (0,5 мкг/рыбу), группа 5:

совместно инъецирована pP-IPNV (1 мкг/рыбу) и 20 pCMV-PACAP (0,05 мкг/рыбу),  
группа 6: совместно инъецирована pP-IPNV (1 мкг/рыбу) и pCMV (0,05 мкг/рыбу).

Фиг.8. Суммарная смертность радужной форели, иммунизированной внутримышечно  
ДНК-вакциной на основе гена, кодирующего гликопротеин G VHSV (pG-VHSV) и  
пептид PACAP. Через 4 недели после вакцинации рыб подвергали воздействию вируса  
 $(1 \times 10^5 \text{ TCID}_{50} \text{ мл}^{-1}$  на рыбу) способом погружения в ванну. Суммарную смертность  
оценивали в течение 4 недель после заражения. Группа 1: инъецирована PBS. Группа  
2: инъецирована pG-VHSV (0,01 мкг/рыбу), группа 3: инъецирована pG-VHSV (0,01 мкг/  
рыбу) и PACAP (0,1 мкг/рыбу), группа 4: инъецирована pG-VHSV (0,01 мкг/рыбу) и  
PACAP (0,5 мкг/рыбу).

Примеры

Пример 1

Эффект совместной иммунизации с OVA и PACAP на гуморальный иммунный ответ  
у мышей

Мыши BALB/c ( $n=12$ ) с массой тела 20 г были разделены на две экспериментальные  
группы по 6 животных в каждой. Группе отрицательного контроля (PBS/OVA)  
внутрибрюшинно инъецировали на 0 и 7 день дозой 6 мкг OVA в 0,2 мл PBS. Группе,  
получавшей PACAP38 (PBS/OVA+пептид), внутрибрюшинно вводили на 0-й и 7-й день  
дозу 6 мкг OVA + 0,5 мкг PACAP38 в 0,2 мл PBS. На 15-й день протокола иммунизации  
кровь из каждой рыбы была взята с целью оценки общих титров IgG, IgG1 и IgG2a.

Фиг.1А, В и С показывают общие титры IgG, IgG1 и IgG2a, соответственно, вызванные  
иммунизацией мышей OVA при совместном введении с PACAP38. Животные в группе  
PBS/OVA+пептид показали специфический общий титр IgG против OVA, статистически  
более высокий по сравнению с контрольной группой (фиг.1А). Аналогичным образом,  
заметили, что титры IgG1 и IgG2a, специфических против OVA, в группе иммунизации  
OVA+PACAP были значительно выше, чем те, которые наблюдались в группе  
иммунизации только OVA (фиг.1В и С).

Пример 2

Оценка клеточного иммунного ответа на вакцинацию свиней в состав вакцины на  
основе E2-PACAP

Антиген E2 является основным гликопротеином оболочки CSFV. В целях оценки  
клеточного иммунного ответа у свиней, вакцинированных вакцинной композицией на  
основе E2-PACAP, и сравнения этого ответа с ответом, произведенным E2-антителом,  
выбрали 18 здоровых свиней со средней массой 20 кг и серологически отрицательных  
по CSFV, на ферме без истории этого заболевания и не вакцинированных против CSFV  
в 3 предыдущих года. Свиньи были распределены в 3 различные группы по 6 животных  
в каждой, с водой и кормом ad libitum. Каждую вакцинную композицию применяли как  
однократную иммунизацию следующим образом: 25 мкг рекомбинантного E2 (группа  
1) и 25 мкг E2 совместно вводили с аналогичным количеством PACAP38 (группа 2). 3  
группу использовали в качестве плацебо-группы. Иммуногены составляли в виде  
эмulsionии масляного адьюванта и инокулировали путем внутримышечной инъекции в  
конечном объеме 2 мл. Животные были заражены на 8-й день после иммунизации путем  
внутримышечной инъекции CSFV ( $10^5 \text{ LD}_{50}$  изоляции «Маргарита»). Проводили  
ежедневный анализ клинических признаков, и образцы крови были взяты в дни 3 и 5  
для оценки пролиферации лимфоцитов и экспрессии IFN- $\gamma$  в качестве индикаторов  
клеточного иммунного ответа. У животных, иммунизированных E2-PACAP, было  
обнаружено увеличение в лимфоцитном ответе (фиг.2А) и высочайшие уровни IFN- $\gamma$

на 5-й день, по сравнению с другими группами (фиг.2В). Эти результаты показывают, что одновременное введение E2-антигена с PACAP производит клеточный иммунный ответ против CSFV у свиней.

### Пример 3

5 Эффект совместной иммунизации НА вируса птичьего гриппа (вирус A/VietNam1203/2004) и PACAP на гуморальный и клеточный иммунный ответ у кур

Для иммунизации были использованы куры белый леггорн 3-недельного возраста. Были использованы три экспериментальные группы по десять цыплят.

Группа 1: инъецированы 20 мкг НА.

10 Группа 2: инъецированы 20 мкг НА + 0,5 мкг из PACAP27.

Группа 3: инъецированы 20 мкг бычьего сывороточного альбумина.

НА был получен путем рекомбинантной экспрессии в клетках млекопитающих.

Вакцины составляли с Montanide 888 и вводили в окончательном объеме 0,5 мл способом подкожно. Животных повторно иммунизировали в день 28 после иммунизации. Образцы 15 крови были взяты в дни 0, 14, 28, 35, 42 и 49 для того, чтобы оценить титры защитных антител с помощью теста ингибирования гемагглютинации, а также для изолирования лейкоцитов для оценки клеточного иммунного ответа, произведенного вакцинами *in vitro*.

20 Куры, иммунизированные НА-ПАСАР, показали превосходную реакцию антител в сравнении с группой, иммунизированной НА, от дня 35 повторной иммунизации (фиг.3А). Группа, получавшая НА-ПАСАР, показала рост в клеточном иммунном ответе, измеренном как стимуляция IFN- $\gamma$ , в сравнении с группами, иммунизированными НА или контрольной группой (фиг.3В).

### Пример 4

25 Эффект PACAP на экспрессию IL1- $\beta$  и IL-15 в периферической крови и лейкоцитов головных почек наивной радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*)

Использовали мальков радужной форели (*O. mykiss*) приблизительно по 50 г, не зараженных VHSV и IPNV. Рыбы (n=5) были анестезированы солью метансульфоновой кислоты (Sigma, USA), и асептически отбирали периферическую кровь из хвостовой 30 вены от каждой рыбы, а затем собирали головную почку.

Периферическая кровь и лейкоциты головной почки выделяли, следуя способу, описанному Graham и Secombes (Graham and Secombes (1998) *Immunology* 65: 293-7).

Клетки ресусPENDИРОвали в L-15 с 5% FCS в концентрации  $5 \times 10^6$  35 5 клеток/мл и раскалывали в 24-луночные планшеты по 1 мл на лунку. Лейкоциты обрабатывали 3 дозами *Clarias gariepinus* PACAP38 ( $10^{-10}$  М,  $10^{-9}$  М и  $10^{-8}$  М), полученным путем химического синтеза, в двух повторностях. Необработанные лейкоциты, раскопанные в двух повторностях, были использованы в качестве отрицательного контроля.

Уровни IL-1 $\beta$  и IL-15 оценивали через 48 часов после обработки. Для достижения 40 этой цели тотальную РНК очищали от культуры лейкоцитов, обработанных PACAP при помощи способа, описанного Chomczynski и Sacchi (Chomczynski and Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-9).

45 Из-за того, что спроектированные праймеры для амплификации IL-1 $\beta$  и IL-15 не различают кДНК и геномной ДНК, суммарную РНК, очищенную из различных тканей, обрабатывали ДНК-нуклеазой, в частности свободной от РНКаз ДНКазой RQ1 (Promega).

Для кДНК-синтеза применяли коммерческий набор, в котором используется обратная транскриптаза SuperScript III (Invitrogen). Наконец, для количественного PCR (qPCR) была использована коммерческая смесь для ПЦР: Power SYBR Green PCR Master Mix

(Applied 20 Biosystems). Результаты qPCR нормализовали против эндогенного гена с конститутивной экспрессией, в частности против элонгации фактора 1α (EF 1a), и выполняли в трех повторностях. Результаты выражали как  $2^{-\Delta Ct}$ , где  $\Delta Ct$  равно остатку значения Ct гена-мишени минус значение Ct нормированного гена EF 1a.

<sup>5</sup> Уровни белка IL-1β увеличивались через 48 после обработки лейкоцитов периферической крови, обработанной  $10^{-10}$  М PACAP38. В дозе  $10^{-9}$  М также есть стимулирующий эффект PACAP38 на транскрипцию IL-1β, по сравнению с группой отрицательного контроля, но уровни экспрессии, обнаруженные в данном случае, были <sup>10</sup> ниже тех, полученных при дозе  $10^{-10}$  М. Эти результаты показывают положительный эффект PACAP38 на транскрипцию IL-1β при низких концентрациях ( $10^{-9}$  М и  $10^{-10}$  М) (фиг.4А). В лейкоцитах головных почек эффект PACAP 38 на транскрипцию IL-1β был умеренным, по сравнению с таковым, полученным в лейкоцитах периферической крови, <sup>15</sup> показывая стимулирующий эффект только в дозе  $10^{-9}$  (фиг.4В).

<sup>20</sup> Кроме того, наблюдался стимулирующий эффект PACAP38 на экспрессию IL-15 в лейкоцитах периферической крови, стимулированных PACAP при дозах ( $10^{-10}$  М и  $10^{-9}$  М). Наиболее высокие значения были получены в дозе  $10^{-10}$  М (фиг.5А). В лейкоцитах головных почек, как раньше наблюдалось с транскрипцией IL-1β, эффект был умеренным. Уровни экспрессии IL-15 в группе, получавшей PACAP, были статистически выше, чем в группе отрицательного контроля в дозе  $10^{-9}$  М (фиг.5В).

#### Пример 5

<sup>25</sup> Контролируемый тест на заражение *Caligus rogercresseyi* у *Salmo salar*, ранее иммунизированных внутрибрюшинно антигеном my32, и my32, вводимым совместно с PACAP

<sup>30</sup> Белок my32 был получен в рекомбинантной форме, в осадке разрушенных клеток BL21(DE3) *E. coli*, трансформированных pET28a-my32. Известно, что этот белок, введенный в брюшную полость (IP), производил 57% случаев ингибирования инфекции во втором поколении паразитов в teste заражения *C. rogercresseyi* у *S. salar* (Carpio et al. (2011) Vaccine. 29 (15): 2810-20).

<sup>35</sup> Чтобы продемонстрировать адьювантный эффект PACAP на этот белок, разработали эксперимент по вакцинации-заражению у *S. salar* в контролируемых условиях. В этом эксперименте были использованы шесть экспериментальных групп по 25 животных (средняя масса 80 г) в каждой из них:

Группа 1: Инъецированная IP с PBS.

Группа 2: Инъецированная IP с PACAP38 в дозе 1 мкг/рыбу.

Группа 3: Инъецированная IP с my32 в дозе 3 мкг/г массы тела (гмт).

<sup>40</sup> Группа 4: Совместное введение с помощью IP-инъекции my32 3 мкг/гмт и PACAP в дозе 1 мкг/рыбу.

<sup>45</sup> Группа 5: Рыба, инъецированная IP с my32 в дозе 3 мкг/гмт и получавшая питание 250 мкг из PACAP/кг корма в день, в течение одной недели до и после иммунизации my32. В ходе эксперимента рыб кормили два раза в день коммерческой формулой без PACAP в количестве 1% от массы их тела, за исключением группы 5, которой предоставлялась в течение одной недели до и после иммунизации та же коммерческая формула с PACAP, которая описана в Adelmann et al. ((2008) Vaccine 26, 837-844) для перорального введения ослабленного штамма вируса VHSV.

После 500 произвольных термических емкостей рыбы адаптировались к морской воде в течение двух недель. Впоследствии они были заражены  $2000 \pm 200$  веслоногих на

каждую емкость. Рыб держали без потока воды в темноте и в условиях температуры, солености и кислорода, предложенных в Stone et al. (Dis Aquat Organ, 2000, 41: 141-149) в течение 24 дней. Оборот воды и фильтрацию выполняли вручную каждые 48 часов. Через 24 дня рыбы были анестезированы и убиты для подсчета паразитов под 5 стереомикроскопом. Результаты в таблице 1 показывают снижение уровней заражения в группах, получавших PACAP, my32 и PACAP + my32. Наибольшее сокращение произошло в группах 4 и 5, что показывает адьювантный эффект PACAP на антиген.

Таблица 1

Количество паразитов через 24 дня после заражения *C. rogregresseyi*

Экспериментальные группы	Число паразитов на рыбу	Ингибирование инвазии (%)
PBS	37 ± 3 <sup>a</sup>	-
PACAP	29 ± 5 <sup>b</sup>	22
my32	17 ± 8 <sup>c</sup>	55
PACAP-IP +my32-IP	8 ± 3 <sup>d</sup>	79
PACAP-oral +my32-IP	5± 2 <sup>e</sup>	86

Буквы указывают на статистически значимую разницу.

Процент ингибирования заражения рассчитывается по формуле:  $(1-T/C) \times 100$  (T: число паразитов на рыбу в вакцинированной группе, C: число паразитов на рыбу в группе плацебо).

## Пример 6

Адьювантный эффект PACAP на гуморальный иммунный ответ у карпа (*Cyprinus carpio*) в сравнении с *Aeromonas hydrophila*

Эксперимент проводился с карпом (*C. carpio*) 40±10 г. Эти аквариумы поддерживали с 600 л при температуре 28±2°C. Использовали три экспериментальные группы по 10 карпов в каждой, и им вводили внутрибрюшинно следующие иммуногены:

Группа 1: PBS.

Группа 2: Инактивированные клетки *A. hydrophila*.

Группа 3: Инактивированные клетки *A. hydrophila* плюс 1 мкг на рыбу PACAP38.

Рыб инъецировали в день 0 и 14, и кровь собирали из хвостовой вены в дни 0 и 21.

Результаты показали, что титры агглютинирующих антител были значительно выше в группе, иммунизированной бактерией плюс PACAP, по сравнению с группой, иммунизированной только бактерией (фиг.6). Эти результаты демонстрируют эффект PACAP в качестве молекулярного адьюванта. Препарат клеток *A. hydrophila* и измерения титров антител были сделаны в соответствии с Yin et al. ((1996) Fish & Shellfish Immunology 6, 57-69).

## Пример 7

Контролируемый тест на заражение *A. hydrophila* у карпа (*C. carpio*), ранее иммунизированного внутрибрюшинно инактивированными бактериями и инактивированными бактериями, введенными совместно с PACAP

Эксперимент проводился с карпом (*C. carpio*) 30±5 г. Рыб поддерживали в 250 л аквариумах при температуре 30±2°C. Использовали три экспериментальные группы по 20 карпов в каждой, которых инъецировали внутрибрюшинно. Группа 1: PBS.

Группа 2: Инактивированные клетки *A. hydrophila*.

Группа 3: Инактивированные клетки *A. hydrophila* плюс 1 мкг PACAP38 на рыбу.

Рыб инъецировали в день 0 и 14. В 21-й день заражение было выполнено путем инъекции

IP LD<sub>50</sub> бактерий и смертность была зафиксирована в течение 7 дней. Рассчитали относительный процент выживания (RPS) как:

RPS (%) = (% контролей на смертность - % смертности у подвергнутых лечению) / (% контролей на смертность) × 100.

<sup>5</sup> Результат составил 65% в группе 2 и 95% в группе 3, что свидетельствует о том, что введение PACAP увеличивает степень устойчивости к патогену вакцинированных и зараженных рыб.

#### Пример 8

<sup>10</sup> Эффект совместного введения PACAP с ДНК-вакциной на основе гена, кодирующего 106 кДа полипротеин (VP2-VP4VP3-NH2-COOH) IPNV, у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), экспериментально зараженной этим вирусом

<sup>15</sup> Был проведен эксперимент по оценке эффекта внутримышечного совместного введения PACAP с ДНК-вакциной на основе гена, кодирующего 106 кДа полипротеин (VP2-VP4VP3-NH2-COOH) IPNV, у радужной форели, экспериментально зараженной этим вирусом. Было составлено шесть экспериментальных групп по 15 рыб в каждой из них (12±1 г), и рыб держали в воде при 10-12°C:

Группа 1: Рыбы, инъецированные PBS.

Группа 2: Рыбы, инъецированные ДНК-вакциной (pP-IPNV) в дозе 1 мкг/рыбу.

<sup>20</sup> Группа 3: Рыбы, совместно инъецированные ДНК-вакциной (pP-IPNV) в дозе 1 мкг/рыбу и плазмидой, содержащей последовательность кДНК PACAP *C. gariepinus* под контролем быстродействующего раннего промотора цитомегаловируса (pCMV-PACAP) человека в дозе 0,5 мкг pCMV-PACAP/рыбу.

Группа 4: Рыбы, совместно инъецированные вакциной pP-IPNV (1 мкг/рыбу) с плазмидой негативного контроля в дозе 0,5 мкг pCMV/рыбу.

<sup>25</sup> Группа 5: Рыбы, совместно инъецированные вакциной pP-IPNV (1 мкг/рыбу) с плазмидой, обладающей последовательностью кДНК PACAP *C. gariepinus* (pCMV-PACAP) в дозе 0,05 мкг pCMV-PACAP/рыбу.

Группа 6: Рыбы, совместно инъецированные вакциной pP-IPNV (1 мкг/рыбу) с плазмидой негативного контроля в дозе 0,05 мкг pCMV/рыбу.

<sup>30</sup> Через 30 дней после вакцинации рыбы подверглись воздействию вируса путем внутрибрюшинного введения 100 мкл IPNV (1×10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> мл<sup>-1</sup>/рыбу).

Через 7 дней после заражения 10 рыб в группе забивали и вирусную нагрузку оценивали в головных почках.

<sup>35</sup> Для определения вирусной нагрузки РНК выделяли из отдельных образцов, и был проведен RT-PCR с 1 мкг РНК. Детекцию экспрессии гена VP1 оценивали способом ПЦР в реальном времени. Результаты показаны на фиг. 7.

<sup>40</sup> Совместное введение pP-IPNV и pCMV-PACAP значительно снижало вирусную нагрузку, по сравнению с группой, которая была совместно инъецирована pP-IPNV и пустым вектором. Не было никаких различий между проверенными дозами pCMV-PACAP.

#### Пример 9

<sup>45</sup> Эффект совместного введения PACAP с ДНК-вакциной на основе гена, кодирующего G гликопротеин VHSV, у радужной форели (*O. mykiss*), экспериментально зараженной указанным вирусом

Был проведен эксперимент по оценке влияния совместного введения с помощью внутримышечной инъекции PACAP *C. gariepinus* с ДНК-вакцины на основе гена, кодирующего G гликопротеин VHSV (pG-VHSV) у радужной форели, экспериментально

зараженной этим вирусом. Четыре экспериментальные группы были сформированы, по 20 рыб в каждой ( $10\pm2$  г) и держали в воде при  $10-12^{\circ}\text{C}$ :

Группа 1: Рыбы, инъецированные PBS.

Группа 2: Рыбы, инъецированные ДНК-вакциной pG-VHSV (0,01 мкг/рыбу).

Группа 3: Рыбы, совместно инъецированные ДНК-вакциной pG-VHSV в дозе 0,01 мкг/рыбу и PACAP C. gariepinus в дозе 0,1 мкг PACAP/рыбу.

Группа 4: Рыбы, совместно инъецированные ДНК-вакциной pG-VHSV в дозе 0,01 мкг/рыбу и PACAP C. gariepinus в дозе 0,5 мкг PACAP/рыбу.

Через 4 недели после вакцинации рыб подвергали воздействию вируса методом

погружения в ванну. Введение осуществляли в течение 2 ч в воде, содержащей инфицирующую дозу VHSV ( $1\times10^5 \text{ TCID}_{50}$  на рыбу  $\text{мл}^{-1}$ ). Суммарная смертность была оценена через 4 недели после заражения и результаты показаны на фиг.8.

Совместное введение пептида с ДНК-вакциной снижало смертность на 15% и 29% по сравнению с введением только ДНК-вакцины, в дозах 0,1 и 0,5 мкг PACAP/рыбу, соответственно.

#### Пример 10

Эффект введения PACAP на выживание канального сома (*Ictalurus punctatus*) после иммунизации теронтами реснитчатого паразита *Ichthyophthirius multifiliis*

Был проведен эксперимент по оценке эффекта введения PACAP, после иммунизации теронтами реснитчатого паразита *I. multifiliis*, на выживание канального сома (*I. punctatus*). Вакцинацию и процедуру заражения выполняли, как предложено Wang and Dickerson ((2002) Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9 (1), 176-181). Четыре экспериментальные группы по 25 рыб ( $12\pm5$  г) были созданы:

Группа 1: Рыбы, иммунизированные в дни 1 и 35 PBS.

Группа 2: Рыбы, иммунизированные в 1 день 8000 живыми теронтами *I. multifiliis* и в день 35 с 10000 живых теронтов паразита.

Группа 3: Рыба, иммунизированные в 1 день 8000 живыми теронтами *I. multifiliis* и в день 35 10000 живых теронтов паразита. Эти рыбы также получали методом погружения в ванну нейропептид PACAP в дозе 100 мкг PACAP/л воды. Лечение проводили в течение 1 часа, через день, в течение двух недель, предшествующих заражению (шесть иммерсионных ванн).

Группа 4: Рыбы, иммунизированные в 1 день 8000 живых теронтов *I. multifiliis* и в день 35 10000 живых теронтов паразита. Эти рыбы были также подвергнуты погружению в ванну в течение 1 часа без PACA, с помощью процедуры, похожей на таковую у группы 3. Перед иммунизацией рыбы были обработаны формалином, чтобы удалить существующих эктопаразитов. Рыбы поддерживались при  $23\pm2^{\circ}\text{C}$  и в непрерывном потоке воды. В день 84 рыбы столкнулись с 15000 теронтов. Данные о смертности были получены в течение 30 дней после заражения. Результаты приведены в таблице 2. Эти результаты показывают увеличение на 27% выживаемости иммунизированных рыб, которые одновременно получали PACAP.

Таблица 2  
Выживание *I. Punctatus*, иммунизированных и зараженных живыми теронтами *I. multifiliis*, после лечения PACAP способом погружения в ванну

Экспериментальные группы	Зараженные рыбы/выжившие рыбы	Живые теронты
PBS	25/0	0
Выживаемость	25/15	60
Выживаемость + PACAP ib	25/22	87
Выживаемость + ib	25/14	56

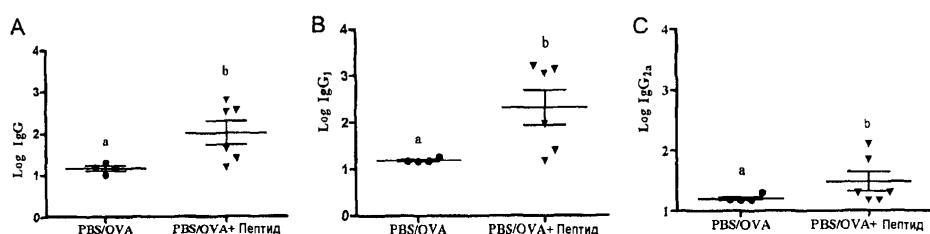
ib: Эти рыбы были подвергнуты погружению в банный контейнер за 1 час, через день, в течение двух недель, предшествующих заражению.

Формула изобретения

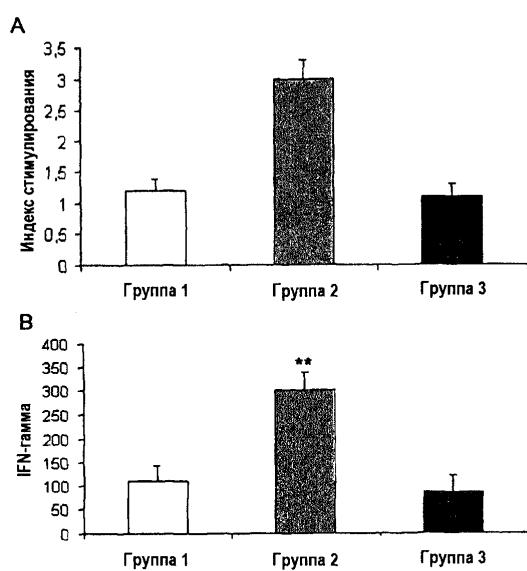
1. Применение «питуитарного активирующего аденилатцилазу пептида» (PACAP) или кДНК PACAP в качестве адьюванта для вакцинных антигенов, используемых в профилактике заболеваний, вызываемых инфекционными агентами у рыб.
2. Применение по п. 1, где пептид PACAP получают а) путем выделения из его природного источника, б) путем химического синтеза или с) с помощью технологии рекомбинантной ДНК.
3. Применение по п. 1, где инфекционный агент представляет собой вирус, бактерию или эктопаразита.
4. Вакцинальная композиция, содержащая «питуитарный активирующий аденилатцилазу пептид» (PACAP) или кДНК PACAP, по меньшей мере один вакцинный антиген, используемый в профилактике заболеваний, вызываемых инфекционными агентами у рыб, и фармацевтически приемлемые носители или разбавители.
5. Композиция по п. 4, где PACAP вводят в виде пептида, полученного а) путем выделения из природного источника, б) путем химического синтеза или с) с помощью технологии рекомбинантной ДНК.
6. Вакцинальная комбинация, содержащая «питуитарный активирующий аденилатцилазу пептид» (PACAP) или кДНК PACAP и по меньшей мере один вакцинный антиген, используемый в профилактике заболеваний, вызываемых инфекционными агентами у рыб.
7. Комбинация по п. 6, где PACAP и антиген вводят одновременно, раздельно или последовательно в течение одного и того же графика иммунизации.
8. Способ повышения иммунного ответа на вакцинский антиген, используемый в профилактике заболеваний, вызываемых инфекционными агентами у рыб, характеризующийся тем, что он включает применение композиции, которая содержит «питуитарный активирующий аденилатцилазу пептид» (PACAP) или кДНК PACAP в качестве адьюванта для указанного антигена.
9. Способ по п. 8, где композицию, содержащую PACAP в качестве адьюванта, и антиген вводят одновременно, раздельно или последовательно в течение одного и того же графика иммунизации.
10. Способ по п. 8, где пептид PACAP получают путем выделения из природного источника б) путем химического синтеза или с) с помощью технологии рекомбинантной ДНК.
11. Способ по п. 8, где композицию, содержащую PACAP, вводят перорально, путем инъекций или способом погружения в ванны.
12. Способ по п. 11, где PACAP используют в концентрации от 50 до 750 мкг/кг корма, если его используют в качестве комбикорма, в концентрации 0,1-10 мкг/г массы тела, если его используют при помощи инъекции, или в концентрации 50-1000 мкг на литр воды, если его используют способом погружения в ванны.

ФИГ.1

1/3

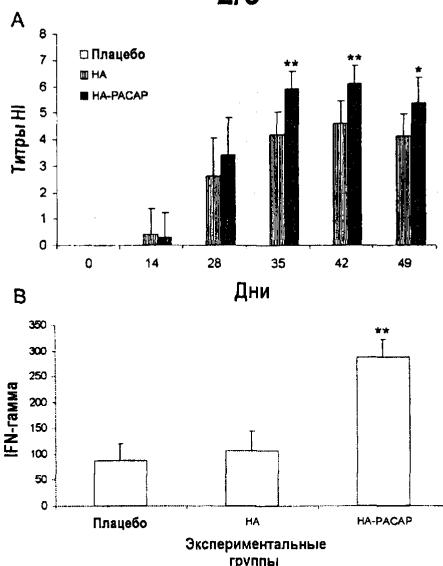


ФИГ.2

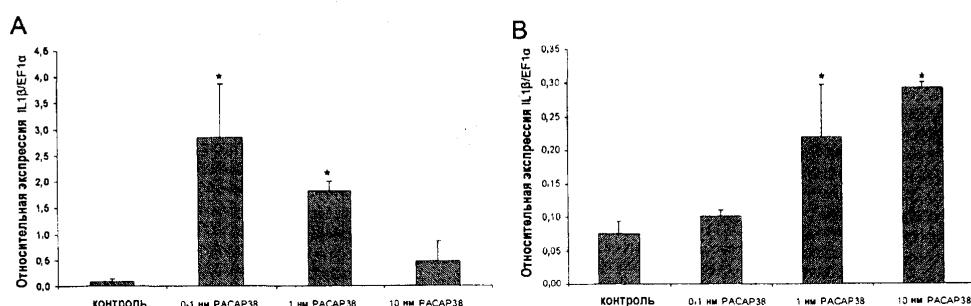


ФИГ.3

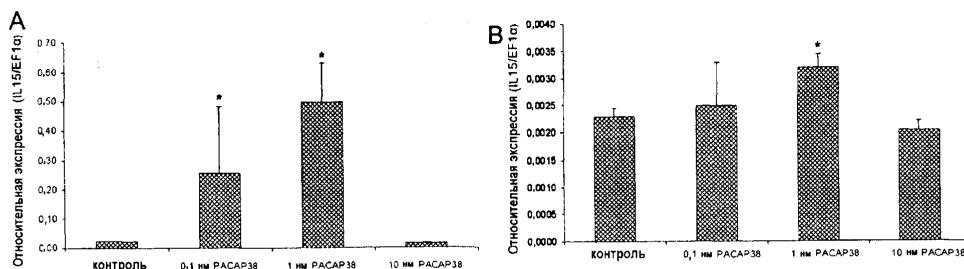
2/3



ФИГ.4

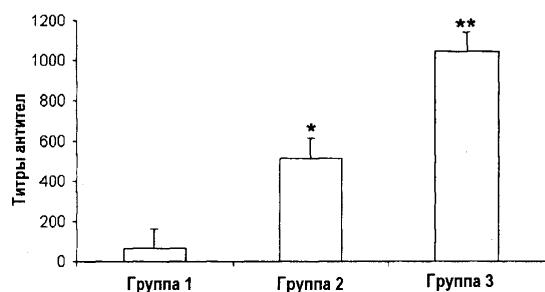


ФИГ.5

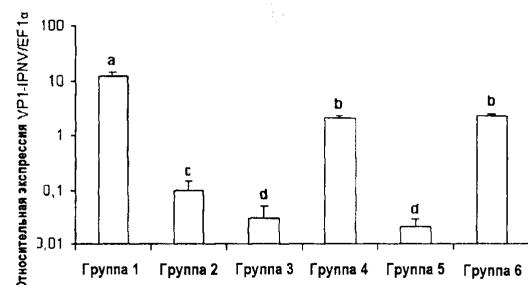


3/3

ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8

