



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103874510 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201280041829. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 08. 24

A61K 39/39 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/00 (2006. 01)

2011-0167 2011. 08. 26 CU

A61K 39/002 (2006. 01)

A61K 39/12 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/205 (2006. 01)

2014. 02. 26

A61K 39/02 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CU2012/000004 2012. 08. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/029570 ES 2013. 03. 07

(71) 申请人 遗传工程与生物技术中心

地址 古巴哈瓦那

(72) 发明人 J·M·卢戈冈萨雷斯

Y·卡皮奥冈萨雷斯

M·P·埃斯特拉达加西亚

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 傅宇昌

权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

PACAP 作为用于疫苗的分子佐剂的用途

(57) 摘要

本发明涉及垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP) 作为用于疫苗的分子佐剂的用途。除了其他应用之外,所述疫苗尤其可以用于针对传染因子(例如,影响哺乳动物、鸟类和水生生物的病毒、细菌和外寄生物)的保护作用。与特定抗原相组合的 PACAP 显示出其作为用于增加宿主针对所述抗原的免疫应答的佐剂的效用。当通过口服途径、通过注射或者在水生生物的情况下通过浸浴来施用包含 PACAP 的疫苗组合物或疫苗组合时,可以观察到该类型的应答。

1. 垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) 作为疫苗抗原的分子佐剂的用途。
2. 权利要求 1 的用途,其特征在于,所述 PACAP 作为肽或者以核酸的形式来进行施用。
3. 权利要求 1 的用途,其特征在于,作为肽进行施用的 PACAP 以下列方式来获得:a) 通过从其天然来源中分离,b) 以合成方式,或者 c) 通过重组 DNA 技术。
4. 权利要求 1 的用途,其特征在于,所述疫苗抗原用于预防由传染因子引起的疾病。
5. 权利要求 4 的用途,其特征在于,所述疾病发生在哺乳动物、鸟类和鱼类中。
6. 权利要求 4 的用途,其特征在于,所述传染因子为病毒、细菌或外寄生物。
7. 疫苗组合物,其包含垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP)、至少一种疫苗抗原和药学上可接受的载体或稀释剂。
8. 权利要求 7 的组合物,其特征在于,所述组合物用于预防由传染因子引起的疾病。
9. 权利要求 7 的组合物,其特征在于,所述组合物通过口服途径、通过注射或者通过浸浴来进行施用。
10. 权利要求 7 的组合物,其特征在于,所述 PACAP 作为 a) 通过从其天然来源中分离,b) 以合成方式,或者 c) 通过重组 DNA 技术而获得的肽来进行施用;或者以核酸的形式来进行施用。
11. 权利要求 9 和 10 的组合物,其特征在于,如果作为配合饲料进行应用,那么以 $50-750 \mu\text{g} / \text{Kg}$ 饲料的浓度来使用所述 PACAP;如果通过注射进行应用,那么以 $0.1-10 \mu\text{g} / \text{克体重的浓度}$ 来使用所述 PACAP;或者如果通过浸浴进行应用,那么以 $50-1000 \mu\text{g} / \text{升水的浓度}$ 来使用所述 PACAP。
12. 疫苗组合,其包含垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) 和至少一种疫苗抗原。
13. 权利要求 12 的组合,其特征在于,所述 PACAP 和所述抗原在同一个免疫接种计划的过程中同时地、分开地或顺次地进行施用。
14. 权利要求 13 的组合,其特征在于,如果作为配合饲料进行应用,那么以 $50-750 \mu\text{g} / \text{Kg}$ 饲料的浓度来使用所述 PACAP;如果通过注射进行应用,那么以 $0.1-10 \mu\text{g} / \text{克体重的浓度}$ 来使用所述 PACAP;或者如果通过浸浴进行应用,那么以 $50-1000 \mu\text{g} / \text{升水的浓度}$ 来使用所述 PACAP。
15. 增加针对疫苗抗原的免疫应答的方法,其特征在于,所述方法包括使用包含作为所述抗原的佐剂的垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) 的组合物。
16. 权利要求 15 的方法,其特征在于,所述包含作为佐剂的 PACAP 的组合物和所述抗原在同一个免疫接种计划的过程中同时地、分开地或顺次地进行施用。
17. 权利要求 15 的方法,其特征在于,所述 PACAP 作为 a) 通过从其天然来源中分离,b) 以合成方式,或者 c) 通过重组 DNA 技术而获得的肽来进行使用;或者以核酸的形式来进行使用。

PACAP 作为用于疫苗的分子佐剂的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药、分子生物学和免疫学领域,特别地涉及开发疫苗和用于所述疫苗的佐剂。特别地,本发明揭示了垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)作为用于疫苗的分子佐剂的用途,所述疫苗在免疫接种策略中使用。

[0002] 发明背景

[0003] 疫苗接种的主要目的是诱导针对病原体的特异且有效的免疫应答,其产生针对感染和/或针对疾病的保护作用并且导致它们的根除。通过在疫苗制剂中添加确定化合物可以改进针对确定抗原的免疫应答这一概念在大约100年前已经被证实,当时铝盐被引入到制剂中并被称为“佐剂”(G. Leroux-Roels(2010)Vaccine28S C25-C36)。

[0004] 传统的疫苗由灭活或减毒的病原微生物组成,或者由源自这些微生物的毒素组成。尽管使用灭活或减毒的病原微生物具有高的免疫原性,但是其目前在疫苗学中具有很少的吸引力,这是由于这些制备物所具有的高毒性。因此,在关于开发基于重组蛋白亚基、合成肽和质粒脱氧核糖核酸(DNA)的新一代疫苗的研究中,对于佐剂存在着日益增长的兴趣。这些新型变化形式尽管毒性较小,但是当在没有免疫刺激佐剂的情况下进行施用,其免疫原性大大降低。正是由于这个原因,近年来对于获得安全且更强有力的佐剂的需求已经增加(Saenz 等人,(2010)Vaccine28(47):7556-7562)。

[0005] 尽管佐剂的使用是熟知的,但是它们作用的方式还较不清楚。认为,它们通常通过数种机制来提高疫苗的效力,这些机制包括:1)提高树突细胞对于抗原的加工和呈递;2)通过由识别与病原体相关的模式的受体(例如“To11”型受体)所介导的信号传导途径来诱导“危险”信号;和3)通过激活可激活淋巴细胞的共刺激信号。这些机制通过诱导细胞因子以及上调合适的共刺激信号的表达而引发(Secombes(2010)Fish&Shellfish Immunology, 409-416)。

[0006] 作为佐剂,已经研究了数种内源性分子和蛋白质(Ying 和 Kwang(2000)Fish&Shellfish Immunology10,375-378;Lingnau 等人,(2007)Expert Rev Vaccines6(5):741-6;Zhang 等人,(2010)Vaccine28:5114-5127),并且已经证明,某些具有免疫刺激特性的肽可以在体内作为佐剂起作用,从而刺激肽或蛋白质性质的抗原的免疫应答(Saenz 等人,(2010)Vaccine28(47):7556-7562)。

[0007] PACAP 属于肠促胰液素/胰高血糖素/血管活性肠肽超家族(Miyata 等人,(1989)Biochem Biophys Res Commun164:567-574)。PACAP 是一种多功能的神经肽,其在哺乳动物中作为亲垂体和亲神经的因子例如神经递质、神经调质和血管舒张剂而履行重要的功能(Arimura A.(1998)Japanese Journal of Physiology48:301-31)。此外,还证明了其在细胞分裂、分化和细胞死亡的调节中的功能(Sherwood 等人,(2000)Endocrine Review21:619-670)。在生物学上,该肽分别以38个氨基酸(PACAP38)和27个氨基酸(PACAP27)的两种分子形式存在(Miyata 等人,(1990)Biochemical and Biophysical Research Communications170:643-8)。PACAP 的生物学作用通过该肽与属于腺苷酸环化酶偶联受体家族的两种受体类型的相互作用来介导:I型受体,其高度特异于PACAP并被命名

为 PAC-1 ;和 II 型受体,其具有与对于血管活性肠肽 (VIP) 的亲合力相同的对于 PACAP 的亲合力,并被称为 VPAC-1 和 VPAC-2 (Vaudry 等人, (2000) *Pharmacol Rev* 52 :269-324)。

[0008] PACAP 广泛分布在各种不同的组织中,包括那些与免疫系统相关的组织,尽管该肽及其受体在哺乳动物免疫系统的细胞中的存在只是部分地得到了阐明 (Gaytan 等人, (1994) *Cell Tissue Res* 276 :223-7 ;Abad 等人, (2002) *NeuroImmunoModulation* 10 :177-86)。

[0009] PACAP 通过调控白介素-6 (IL-6) 和白介素-10 (IL-10) 来调节炎症反应 (Martínez 等人, (1996) *J Immunol* 156 (11) :4128-36 ;Martínez 等人, (1998) *J Neuroimmunol* 85 (2) :155-67 ;Martínez 等人, (1998) *J Leukoc Biol* 63 (5) :591-601)。

[0010] 在经激活的巨噬细胞中, PACAP 抑制促炎细胞因子的产生并刺激抗炎细胞因子的产生,从而以这种方式允许实现免疫系统的内环境稳定。另外,还已知 PACAP 降低共刺激分子 B7.1 / B7.2 的表达和随后的辅助性 T 细胞 (Th) 的激活。另一方面,在先前经刺激的巨噬细胞中, PACAP 通过其受体 PAC-1 来抑制 IL-6 的产生,从而抑制炎症 (Martínez 等人, (1998) *J Neuroimmunol* 85 (2) :155-67 ;Martínez 等人, (1998) *J Leukoc Biol* 1998, 63 (5) :591-601)。面对强烈的炎症刺激或中毒, PACAP 对于 IL-6 转录的抑制作用有助于组织保护和免疫系统的内环境稳定 (Martínez 等人, (1998) *J Neuroimmunol* 85 (2) :155-67 ;Martínez 等人, (1998) *J Leukoc Biol* 1998 May, 63 (5) :591-601)。相反地,在未经刺激的巨噬细胞中, PACAP 诱导 B7.2 的表达并促进向 Th2 表型的细胞分化 (Delgado 和 Ganea (2001) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49 (2) :101-10)。已经报道了在鸭的淋巴器官中 PACAP 的存在 (Squillaciotti 等人, (2005) *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 第 34 卷, Issue Supplement s1, 第 49 页)。

[0011] 已经提出了在哺乳动物中使用 PACAP 作为治疗剂以治疗自身免疫疾病,例如败血症性休克、类风湿性关节炎和克罗恩病 (Gomariz 等人, (2006) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070 :51-74)。已知在自身免疫疾病中存在有不受控的针对机体自身物质和组织的免疫应答。在这方面,通过适当地平衡细胞因子和趋化因子与其受体、通过募集免疫系统的细胞和通过调节 Th1 细胞和这些细胞所分泌的细胞因子的产生和激活, PACAP 在自身免疫疾病的动物模型中预防炎症。

[0012] 此外,已知在免疫系统内环境稳定中所牵涉的分子 (例如“Toll”型受体) 对于先天免疫应答的激活来说是必不可少的,所述先天免疫应答增强了适应性免疫应答。然而,这种类型的应答可以导致急性和 / 或慢性炎症的发病、自身免疫和癌症 (Gomariz 等人, (2010) *Current Pharmaceutical Design* 16 :1063-1080)。在这方面,已知 VIP-PACAP 系统参与编码这些“Toll”型受体的基因的表达的调节 (Gomariz 等人, (2006) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070 :51-74), 其中这两种肽都可能引起在这些受体的产生的调节途径中的紊乱。

[0013] PACAP 减小细胞因子的循环水平并抑制由内源分子 HMGB1 (高速泳动族盒 (high mobility group box) 1) 所介导的细胞因子释放 (Tang 等人, (2008) *International Immunopharmacology* 8 (12) :1646-1651)。已知 HMGB1 分子及其衍生肽能够作为佐剂起作用,从而增加针对肽和蛋白质性质的抗原的免疫应答 (Saenz 等人, (2010) *Vaccine* 28 (47) :7556-7562)。

[0014] 关于 PACAP 在鱼类免疫系统的调控中的功能的知识局限于由我们的工作组所

进行的研究,在所述研究中证明了,通过浸浴或腹膜内注射来进行的尖齿胡鲶 (*Clarias gariepinus*) 的 PACAP 的施用在上述鱼类的幼体和青年体中刺激了先天免疫的参数,例如溶菌酶、衍生自氧化氮合酶活性的代谢物和免疫球蛋白 M 的产生,以及增加了抗氧化防御的各种不同的参数 (Carpio 等人, (2008) *Fish and Shellfish Immunology* 25 :439-45 ; Lugo 等人, (2010) *Fish and Shellfish Immunology* 29 :513-520)。该肽的这些特性公开在具有国际公开号 W02007 / 059714 的专利申请“*Neuropéptidos para el cultivo de organismos acuáticos*”中。

[0015] 目前,在人类医学和兽医学领域中,仍然有兴趣鉴定出这样的化合物,其可以用作安全且更强有力的佐剂,并且可以掺入到现有的疫苗和正在开发的疫苗中。

[0016] 发明描述

[0017] 本发明通过提供新的佐剂备选方案而解决了上述问题,所述佐剂能够大大地增强对于共同施用的抗原的免疫应答,并因而成为高度有效的佐剂。本发明的目标是“垂体腺苷酸环化酶激活肽”(PACAP) 作为存在于在各种不同免疫接种策略中所使用的疫苗之中的抗原的分子佐剂的用途。在本发明一个实施方案中,所述包含作为佐剂的 PACAP 的疫苗被设计成用于针对传染因子的免疫接种。这些传染因子尤其可以为病毒、细菌和外寄生物。在一个特别的实施方案中,所述传染因子影响哺乳动物、鸟类和鱼类。

[0018] 本发明中所使用的术语“垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP)”包括以任何其变体 (PACAP27 或 PACAP38) 形式的该分子,其分离自其天然来源、具有合成来源或者通过重组 DNA 技术产生;并且包括其作为肽或者以核酸的形式进行的使用。

[0019] 在本发明的情形中,术语“分子佐剂”是指能够调控针对疫苗抗原的免疫应答从而使其增加的任何具有蛋白质性质的分子。

[0020] 迄今为止尚没有证明了 PACAP 作为分子佐剂的用途的研究。如上面所述的,已经提出了在哺乳动物中使用该肽作为治疗剂以治疗自身免疫疾病,例如败血症性休克、类风湿性关节炎和克罗恩病 (Gomariz 等人, (2006) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070 :51-74)。在这方面,通过适当地平衡细胞因子和趋化因子与其受体、通过募集免疫系统的细胞和通过调节 Th1 细胞和这些细胞所分泌的细胞因子的产生和激活, PACAP 在自身免疫疾病的动物模型中预防炎症。鉴于这些发现,作为我们的研究的一部分而发现的该效果经证明是出人意料的,我们的研究证明 PACAP 与抗原相联合的施用通过促刺激细胞因子的刺激和体液免疫应答的其他要素的增长而增加了针对所述抗原的免疫应答。

[0021] 此外,已知 VIP-PACAP 系统参与编码“Toll”型受体的基因的表达的调节 (Gomariz 等人, (2006) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070 :51-74), 其中这两种肽都可能引起在这些受体的产生的调节途径中的紊乱,这使得其作为用于疫苗的佐剂的用途不是显而易见的。与本发明中所揭示的 PACAP 的新用途相反的另一要素是显示了该肽减小细胞因子的循环水平并抑制由内源分子 HMGB1 所介导的细胞因子释放 (Tang 等人, (2008) *International Immunopharmacology* 8(12) :1646-1651)。

[0022] 在本发明中首次证明了,在体液应答水平上和细胞应答水平上均观察到针对与 PACAP 共施用的疫苗抗原的特异性免疫应答的增加。

[0023] 本发明的目标还为疫苗组合物,其包含作为佐剂的 PACAP、至少一种疫苗目的抗原和药学上可接受的载体或稀释剂。该包含作为佐剂的 PACAP 和至少一种目的抗原的疫苗组

合物引起局部或全身的针对所述目的抗原的免疫应答。本发明的疫苗组合物或疫苗可以基于,例如重组蛋白、减毒的微生物株系或核酸。在本发明的一个实施方案中,所述疫苗组合物可以通过口服途径、通过注射或者通过浸浴来进行施用。

[0024] 在本发明的情形中,在所述疫苗组合物中,所述 PACAP 作为通过从其天然来源中分离、以合成方式或者通过重组 DNA 技术而获得的肽来进行施用。其还可以以核酸的形式来进行使用。

[0025] 在本发明的各种不同的实施方案中,将包含与数种抗原相联合的 PACAP 的疫苗施用给哺乳动物、鸟类和鱼类,其中首次证明了 PACAP 的佐剂效应。出人意料地,观察到在哺乳动物、鸟类和鱼类中与抗原相联合的神经肽 PACAP 的施用增加了针对所述抗原的特异性抗体的水平。另外,首次在体外证明了, PACAP 的施用显著地增加在鱼类白细胞中白介素 1 β (IL1 β) 和白介素 15 (IL15) 的转录物。

[0026] 在公开了包含作为佐剂的 PACAP 的疫苗组合物或疫苗组合的本发明的各种不同的实施方案中,使用了各种各样的抗原,例如卵清蛋白 (OVA)、典型猪瘟病毒 (CSFV) 的包膜的糖蛋白 E2、禽流感病毒的血凝素 (HA)、Caligus rogercresseyi 的多肽 my32、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的经灭活的细胞、传染性胰腺坏死病毒 (IPNV) 的 106kDa 的多蛋白 (NH2-VP2-VP4VP3-COOH)、病毒性出血性败血症病毒 (VHSV) 的糖蛋白 G 和纤毛寄生虫多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*)。

[0027] 在本发明的一个特别的实施方案中,所述疫苗组合物的特征在于,如果作为配合饲料进行应用,那么以 50-750 μg / Kg 饲料的浓度来使用所述 PACAP ;如果通过注射进行应用,那么以 0.1-10 μg / 克体重的浓度来使用所述 PACAP ;或者如果通过浸浴进行应用,那么以 50-1000 μg / 升水的浓度来使用所述 PACAP。当所述组合物用作鱼类的疫苗时,最后的那种是特别合适的。

[0028] 在本发明的另一个实施方案中,所述抗原和所述佐剂 PACAP 可以构成疫苗组合的一部分,所述疫苗组合的要素可以在同一个免疫接种方案的过程中同时地、分开地或顺次地进行施用。在本发明的一个特别的实施方案中,所述组合用于预防病毒、细菌和寄生物感染。为此,在本发明的一个实施方案中,所述 PACAP 和所述抗原通过口服途径、通过注射或者通过浸浴来进行施用。

[0029] 在一个特别的实施方案中,将所述 PACAP 作为配合饲料进行应用,以 50-750 μg / Kg 饲料的浓度。在本发明的第二个实施方案中,所述 PACAP 通过注射进行应用,以 0.1-10 μg 肽 / 克体重的浓度。在本发明的另一个实施方案中,将所述 PACAP 通过浸浴应用给鱼类,以 50-1000 μg PACAP / 升水的浓度。

[0030] 本发明的目标还为增加针对疫苗抗原的免疫应答的方法,其中使用包含作为所述抗原的佐剂的“垂体腺苷酸环化酶激活肽”(PACAP) 的组合物。根据本发明中所公开的方法,所述作为佐剂的 PACAP 和所述抗原可以在同一个免疫接种计划的过程中同时地、分开地或顺次地进行施用。在本发明的方法中,将 PACAP 作为佐剂进行使用,作为通过从其天然来源中分离、通过化学合成或者通过重组 DNA 技术而获得的肽。本发明还包括其中将用作佐剂的 PACAP 以核酸的形式进行施用的方法。根据本发明的方法,在体液应答水平上和细胞应答水平上均观察到针对目的疫苗抗原的特异性免疫应答的增加。

[0031] 根据在本发明的数个实施方案中所证明的,针对目的抗原的免疫应答的提高或增

加最终变为更高水平的针对各种不同传染因子（其中包括病毒、细菌和外寄生物实体）的保护作用。

[0032] 附图简述

[0033] 图 1. 通过用与神经肽 PACAP38 共施用的 OVA 对小鼠进行免疫接种而诱导的总免疫球蛋白 (IgG) (A)、IgG1 (B) 和 IgG2a (C) 的滴度。设立了两个试验组, 每组 6 只动物。在第 0 和 7 天, 以在 0.2mL PBS 中的 6 μ gOVA 的剂量, 通过腹膜内途径对阴性对照组 (磷酸盐缓冲盐水 (PBS) / OVA) 进行接种。在第 0 和 7 天, 以在 0.2mL PBS 中的 6 μ gOVA+0.5 μ gPACAP38 的剂量, 通过腹膜内途径对还接受 PACAP38 的组 (PBS / OVA+ 肽) 进行接种。不同的字母指明了在统计学上显著的差异。

[0034] 图 2. 在用基于 E2-PACAP 的疫苗组合物进行疫苗接种的猪中细胞应答的评价, 测量了在用 E2 (组 1)、E2+PACAP (组 2) 和安慰剂 (组 3) 进行疫苗接种后第 5 天分离的猪淋巴细胞。(A) 淋巴细胞增殖测定法: 将结果表示为刺激指数 (SI), 其被定义为经刺激的培养物的每分钟计数 (cpm) 与未经处理的对照组的 cpm 之间的比率。SI>2 的淋巴细胞增殖应答被认为是阳性的。(B) IFN- γ 分泌应答: 其通过实时聚合酶链反应 (PCR) 来测定。将值表示为 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 的算数平均值。(**) $p<0.01$ 。

[0035] 图 3. 在用 20 μ gHA 或 HA-PACAP 进行免疫接种的鸡中的血凝抑制的滴度 (A)。将抗体滴度的算数平均值表示为产生血凝抑制的最高血清稀释度的倒数值 $\log_2$ 。在经免疫接种的鸡中的细胞应答 (B)。通过实时 PCR 来测定 IFN- γ 分泌应答。将值表示为 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 的算数平均值。(**) $p<0.01$ 。

[0036] 图 4. 通过实时 PCR 来分析 PACAP38 对于在健康鳟鱼的外周血白细胞 (A) 和头肾白细胞 (B) 中 IL1 β 转录的体外效应。在处理 48 小时之时, 评价了浓度为 10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} M 的 PACAP38 的效应。该实验重复 4 次。将白细胞培养物以两次重复进行处理, 并且以三次重复来进行 PCR 反应。将数据表示为相对于组成型表达的内源基因延伸因子 1 α (EF1 α) 而言的目的基因 (IL1 β) 的相对表达的平均值 $\pm$ 平均值的标准差 (SD)。* ($p<0.05$) 指明, 目的基因的相对表达在统计学上高于在未经处理的白细胞培养物 (阴性对照) 中的其相对表达。

[0037] 图 5. 通过实时 PCR 来分析 PACAP38 对于在健康鳟鱼的外周血白细胞 (A) 和头肾白细胞 (B) 中白介素 15 (IL15) 转录的体外效应。在处理 48 小时之时, 评价了浓度为 10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} M 的 PACAP38 的效应。该实验重复 4 次。将白细胞培养物以两次重复进行处理, 并且以三次重复来进行 PCR 反应。将数据表示为相对于组成型表达的内源基因 EF1 α 而言的目的基因 (IL15) 的相对表达的平均值 $\pm$ 平均值的标准差 (SD)。* ($p<0.05$) 指明, 目的基因的相对表达在统计学上高于在未经处理的白细胞培养物 (阴性对照) 中的其相对表达。

[0038] 图 6. 在普通鲤鱼中针对嗜水气单胞菌的凝集抗体的滴度。y 轴的值表示平均值 $\pm$ 标准误差。(*) $p<0.05$, (**) $p<0.01$ 。组 1: 用 PBS 进行注射; 组 2: 用经福尔马林灭活的嗜水气单胞菌细胞进行注射; 组 3: 用经福尔马林灭活的嗜水气单胞菌细胞和 PACAP (1 μ g / 鱼) 进行注射。

[0039] 图 7. 通过肌肉途径共施用剂量为 1 μ g / 鱼的 DNA 疫苗 (pP-IPNV) 与质粒的效应, 所述质粒具有在人巨细胞病毒即时早期启动子控制下的尖齿胡鲈 PACAP 的互补 DNA 序列 (pCMV-PACAP)。在疫苗接种后 30 天, 通过腹膜内注射 100 μ L IPNV (1×10^7 半数组织培养感

染量 (TCID₅₀) / mL / 每鱼) 来将鱼暴露于病毒。在感染后 7 天, 每组处死 10 条鱼并通过实时反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 来评价在头肾中的病毒载量。所述值表示平均值 ± 标准差。不同的上标字母表示组之间的在统计学上显著的差异。组 1: 用 PBS 进行注射的鱼; 组 2: 用剂量为 1 μg / 鱼的 pP-IPNV 进行注射的鱼; 组 3: 共施用 pP-IPNV (1 μg / 鱼) 和 pCMV-PACAP (剂量为 0.5 μg pCMV-PACAP / 鱼) 的组; 组 4: 共施用 pP-IPNV 疫苗 (1 μg / 鱼) 和 pCMV (剂量为 0.5 μg pCMV / 鱼) 的组; 组 5: 共施用 pP-IPNV (剂量为 1 μg / 鱼) 和 pCMV-PACAP (剂量为 0.05 μg pCMV-PACAP / 鱼) 的组; 组 6: 共施用 pP-IPNV (1 μg / 鱼) 和 pCMV (剂量为 0.05 μg pCMV / 鱼) 的组。

[0040] 图 8. 在通过肌肉途径用基于编码 VHSV 糖蛋白 G 的 DNA 疫苗 (pG-VHSV) 和肽 PACAP 进行免疫接种的 10g 的虹鳟中的累积死亡率百分比。在疫苗接种后 4 周, 通过浸浴来将鱼暴露于病毒 (1 × 10⁵ TCID₅₀ / mL / 鱼)。在攻击后 4 周期间, 评价累积死亡率。组 1: 用 PBS 进行注射的鱼; 组 2: pG-VHSV (0.01 μg / 鱼); 组 3: pG-VHSV (0.01 μg / 鱼) 和 PACAP (0.1 μg PACAP / 鱼); 组 4: pG-VHSV (0.01 μg / 鱼) 和 PACAP (0.5 μg PACAP / 鱼)。

实施例

[0041] 实施例 1. 在小鼠中 OVA 和 PACAP 的共免疫接种对于体液免疫应答的效应

[0042] 选择 12 只体重为 20g 的雌性 BALB / c 小鼠, 并将其分成 2 个试验组 (每组 6 只动物)。在第 0 和 7 天, 以在 0.2mL PBS 中的 6 μg OVA 的剂量, 通过腹膜内途径对阴性对照组 (PBS / OVA) 进行接种。在第 0 和 7 天, 以在 0.2mL PBS 中的 6 μg OVA + 0.5 μg PACAP38 的剂量, 通过腹膜内 (IP) 途径对用 PACAP38 进行处理的组 (PBS / OVA + 肽) 进行接种。在免疫接种方案的第 15 天, 从动物中抽取血液并评价总 IgG、IgG1 和 IgG2a 的滴度。

[0043] 在图 1A、B 和 C 中, 分别显示了通过用与 PACAP38 共同施的 OVA 对小鼠进行免疫接种而诱导的总 IgG、IgG1 和 IgG2a 的滴度。“PBS / OVA + 肽”组的动物显示出在统计学上高于对照组的对于 OVA 的特异性总 IgG 的滴度 (图 1A)。同样地, 观察到, 在用 OVA + PACAP 进行免疫接种的组中对于 OVA 的特异性 IgG1 和 IgG2a 的滴度显著地高于在仅用 OVA 进行免疫接种的组中所观察到的那些。

[0044] 实施例 2. 在用基于 E2-PACAP 的疫苗组合物进行疫苗接种的猪中细胞应答的评价

[0045] 抗原 E2 是 CSFV 的包膜的主要糖蛋白。为了评价在用基于 E2-PACAP 的疫苗组合物进行疫苗接种的猪中的细胞应答并将该细胞应答与由抗原 E2 所产生的细胞应答相比较, 选择出 18 只平均体重为 20Kg 且在血清学上 CSFV 阴性的健康猪, 它们来自没有该疾病既往史并且在先前的 3 年中未进行疫苗接种的单位。将所述猪分配到 3 个组中, 每组 6 只动物, 水和饲料随意取用。向每只动物应用具有下列抗原量的疫苗组合物: 25 μg 的重组 E2 (组 1); 和 25 μg 的与相似量的 PACAP38 共施用的 E2 (组 2)。设立组 3 作为安慰剂组。将免疫原配制成油性佐剂的乳液, 并且通过经由肌肉 (IM) 途径注射 2mL 来进行接种。进行单次免疫接种。在免疫接种后第 8 天, 通过 IM 途径用 CSFV (10⁵ 半数致死量 (LD₅₀) 的“Margarita”分离物) 攻击动物。进行临床体征的每天分析, 并且在第 3 和 5 天取血样以评价淋巴细胞增殖和 IFN-γ 表达 (作为细胞应答的指示物)。相比于其他组而言, 在用 E2-PACAP 进行疫苗接种的动物中, 在第 5 天检测到在增殖测定法期间淋巴细胞应答的增加 (图 2A) 和升高的 IFN-γ 水平 (图 2B)。这证明, 抗原 E2 与 PACAP 的共施用产生了针对 CSFV 的细胞免疫

应答。

[0046] 实施例 3. 在鸡中用禽流感病毒 (A / VietNam1203 / 2004 病毒) 的 HA 和 PACAP 进行共免疫接种对于体液和细胞免疫应答的效应

[0047] 为了免疫接种, 使用 3 周龄的白色来亨鸡。分配成 10 只鸡 / 实验组。设立 3 个实验组:

[0048] 组 1 : 20 μ g HA

[0049] 组 2 : 20 μ g HA + 0.5 μ g PACAP27

[0050] 组 3 : 20 μ g 牛血清白蛋白。

[0051] 以重组方式获得 HA, 在哺乳动物细胞中表达。将各种制剂佐以 Montanide888, 并且以 0.5mL 的终体积通过皮下途径进行施用。在免疫接种后第 28 天对动物进行再次免疫接种。在第 0、14、28、35、42 和 49 天取血样, 以便获得血清以用于通过血凝抑制测定法来检测保护性抗体, 和以便提取出白细胞以评价由各种不同免疫原产生的细胞应答。

[0052] 结果显示, 从在施用再次免疫接种剂量后的第 35 天开始, 用 HA-PACAP 进行免疫接种的鸡显示出比用 HA 进行免疫接种的鸡优异的抗体应答 (图 3A)。相比于用 HA 进行免疫接种的组或对照组而言, 通过 IFN- γ 的刺激来测量的细胞应答在用 HA-PACAP 进行处理的组中显示出增加 (图 3B)。

[0053] 实施例 4. PACAP 对于在健康虹鳟 (裂喉大麻哈鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)) 的外周血和头肾的白细胞中 IL1 β 和 IL15 的表达的效应

[0054] 使用没有 VHSV、IPNV 和感染性鲑鱼贫血病毒 (ISAV) 的体重为大约 50 克的虹鳟 (裂喉大麻哈鱼) 的青年体。将鱼 (n=5) 用甲磺酸盐 (Sigma, USA) 进行麻醉, 并且无菌地首先从尾静脉获取外周血, 然后获取头肾。根据由 Graham 和 Secombes (Graham 和 Secombes (1998) *Immunology* 65 : 293-7) 所描述的方法, 独立地从 5 条鳟鱼中分离外周血和头肾的白细胞。

[0055] 将细胞以 5×10^6 个细胞 / mL 的浓度重悬浮在具有 5% 胎牛血清的 L-15 培养基中, 并且以 1mL / 孔分配在 24- 孔平板中。以两次重复, 将白细胞用 3 个浓度的通过化学合成获得的尖齿胡鲈 PACAP38 (10^{-10} M、 10^{-9} M 和 10^{-8} M) 进行处理, 并且使用以两次重复进行分配的未经处理的白细胞的悬浮液作为阴性对照。

[0056] 在处理 48 小时, 评价 IL1 β 和 IL15 的水平。为此, 从对照白细胞培养物和用 PACAP 进行处理的白细胞培养物中纯化总核糖核酸 (RNA), 通过由 Chomczynski 和 Sacchi (Chomczynski 和 Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162 : 156-9) 所描述的方法。考虑到为扩增 IL1 β 和 IL15 而设计的引物在互补 DNA (cDNA) 和基因组 DNA 之间没有区别, 用 DNA 的核酸酶, 特别是用 RQ1 无 RNA 酶的 DNA 酶 (Promega) 处理从各种不同组织中纯化出的总 RNA, 目的是去除可能存在于样品中的基因组 DNA。

[0057] 为了合成 cDNA, 使用一套商业的采用反转录酶 SuperScript III (Invitrogen) 的试剂。最后, 关于定量 PCR (qPCR) 反应, 使用商业来源的 PCR 混合物: Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem)。将 qPCR 的结果针对组成型表达的内源基因 (特别是 EF1 α) 进行标准化, 并且以三次重复来施行。将结果表示为 $2^{-\Delta Ct}$, 其中 ΔCt 等价于所评价的基因的阈值循环 (Ct) 值减去标准化者基因 (EF1 α) 的 Ct 值所得的余额。

[0058] 在用 10^{-10} M 的 PACAP38 进行处理的外周血白细胞培养物中, IL1 β 的水平在处理

48 小时后增加。在 10^{-9}M 的剂量下,也观察到相对于阴性对照而言 PACAP38 对于该基因的转录的刺激效应,但检测到的表达水平低于用 10^{-10}M 的剂量所获得的水平。这些结果显示了以低浓度(在 10^{-9} – 10^{-10}M 的范围内),PACAP38 对于 IL1 β 的转录的正效应(图 4A)。在头肾白细胞中,PACAP38 对于 IL1 β 的转录的效应比在外周血白细胞中更温和,其中在 10^{-9}M 和 10^{-8}M 的剂量下观察到刺激效应(图 4B)。

[0059] 另外,在以 10^{-10} 和 10^{-9}M 的剂量用 PACAP38 进行刺激的白细胞培养物中,观察到 PACAP38 对于 IL15 的表达的刺激效应。在 10^{-9}M 的剂量下获得最高的表达值(图 5A)。在头肾白细胞中,如关于 IL1 β 的表达所观察到的一样,效应是更温和的,其中在 10^{-9}M 的中间剂量下观察到在统计学上高于阴性对照的 IL15 的表达水平(图 5B)。

[0060] 实施例 5. 受控攻击测定法,其中在事先通过腹膜内途径用抗原 my32 和用与 PACAP 共施用的 my32 进行免疫接种的鲑鱼(大西洋鲑(*Salmo salar*))中用 *Caligus rogercresseyi* 进行侵染

[0061] 在大肠杆菌(*E. coli*)破裂沉淀物中以重组形式获得蛋白 my32。已知,在大西洋鲑中的 *C. rogercresseyi* 攻击测定法之中,通过腹膜内(IP)途径施用的该蛋白质在第二代寄生物中产生 57% 的侵染抑制(Carpio 等人,(2011)Vaccine. 201129(15):2810–20)。

[0062] 为了证明 PACAP 对于该蛋白质的佐剂效用,设计了在受控条件下的在大西洋鲑中的疫苗接种和攻击实验,在该实验中设立 6 个实验组,每组 25 只动物(平均体重为 80g):

[0063] 组 1:用 PBS 进行 IP 注射;

[0064] 组 2:用剂量为 $1\mu\text{g}$ / 鱼的 PACAP38 进行 IP 注射;

[0065] 组 3:用剂量为 $3\mu\text{g}$ / 克体重(gbw) 的 my32 进行 IP 注射;

[0066] 组 4:通过 IP 注射剂量为 $3\mu\text{g}$ / gbw 的 my32 和剂量为 $1\mu\text{g}$ / 鱼的 PACAP38 来进行共施用;

[0067] 组 5:用剂量为 $3\mu\text{g}$ / gbw 的 my32 进行 IP 注射并且在用 my32 实施免疫接种之前和之后一周期间每天用配制有 $250\mu\text{gPACAP}$ / Kg 饲料的饲料进行饲喂的鱼。

[0068] 在该实验过程中,将鱼依照 1% 的其体重每天两次用不含药用成分的平衡商业配方进行饲喂,除了组 5 之外,对于组 5 在免疫接种之前和之后一周供给配制有 PACAP 的相同的商用配方,根据 Adelman 等人((2008)Vaccine26,837–844) 对于口服施用病毒 VHSV 的减毒株所描述的。

[0069] 在 500 个任意热单位后,使鱼适应海水两周。然后,向每个槽中添加 2000 ± 200 只桡足幼体。在无水流的情况下,在黑暗中,和在由 Stone 等人(Dis Aquat Organ,2000,41:141–149) 所建议的温度、盐度和氧的条件下,将鱼维持 24 天。每 48 小时手工进行水的更换和过滤。

[0070] 在 24 天时,将鱼麻醉并处死,并且在立体显微镜下进行寄生物的计数。表 1 中所呈现的结果表明在用 PACAP、my32 和 PACAP+my32 进行处理的组中侵染水平降低。最大的降低发生在组 4 和 5 中,这证明了 PACAP 对于共施用的抗原的佐剂效应。

[0071] 表 1. 在疫苗接种和 *C. rogercresseyi* 攻击实验中,

[0072] 在攻击后 24 天时的寄生物的计数

[0073]

实验组	寄生物数目 / 鱼	侵染抑制 (%)
PBS	37 ± 3^a	—
PACAP	29 ± 5^b	22
my32	17 ± 8^c	55
PACAP-IP+my32-IP	8 ± 3^d	79
PACAP- 口服 +my32-IP	5 ± 2^e	86

[0074] 字母指明了在统计学上显著的差异。

[0075] 将侵染抑制百分比计算为“(1- 在实验组中的寄生物数目 / 在 PBS 对照中的寄生物数目) × 100”。

[0076] 实施例 6. 在普通鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 针对嗜水气单胞菌的体液免疫应答中 PACAP 的佐剂效应

[0077] 该实验用 40 ± 10 g 的鲤鱼 (普通鲤鱼) 来进行。将这些鱼维持在处于 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度的 600L 的水族槽中。设立 3 个实验组, 每组 10 条鲤鱼, 向这些鲤鱼通过腹膜内途径注射下列免疫原:

[0078] 组 1: PBS;

[0079] 组 2: 灭活的嗜水气单胞菌细胞;

[0080] 组 3: 灭活的嗜水气单胞菌细胞和 $1 \mu\text{g}$ PACAP38 / 鱼。

[0081] 在第 0 和 14 天对鱼进行注射, 并且在第 0 和 21 天从鱼的尾静脉收集血液。结果显示, 相比于仅用该细菌进行免疫接种的组而言, 在用该细菌加上 PACAP 进行免疫接种的组中凝集抗体的滴度显著更高 (图 6)。这些结果证明了 PACAP 在鱼中作为分子佐剂的效应。嗜水气单胞菌细胞的制备以及抗体滴度的测定根据 Yin 等人 ((1996) *Fish&Shellfish Immunology* 6, 57-69) 来进行。

[0082] 实施例 7. 受控攻击测定法, 其中在事先通过腹膜内途径用灭活的细菌和用与 PACAP 共施用的灭活的细菌进行免疫接种的普通鲤鱼中用嗜水气单胞菌进行侵染

[0083] 该实验用 30 ± 5 g 的普通鲤鱼来进行。将这些鱼维持在处于 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度的 250L 的水族槽中。设立 3 个实验组, 每组 20 条鲤鱼, 对这些鲤鱼以腹膜内方式进行注射:

[0084] 组 1: PBS;

[0085] 组 2: 灭活的嗜水气单胞菌细胞;

[0086] 组 3: 灭活的嗜水气单胞菌细胞和 $1 \mu\text{g}$ PACAP38 / 鱼。

[0087] 在第 0 和 14 天对鱼进行注射。在第 21 天, 通过 IP 注射 LD_{50} 的该细菌来进行攻击, 并且在 7 天期间记录死亡率。将相对存活百分比 (RPS) 计算为:

[0088] $\text{RPS}(\%) = (\text{对照的鱼的死亡率的}\% - \text{经处理的鱼的死亡率的}\%) / (\text{对照的鱼的死亡率的}\%) \times 100$ 。

[0089] 作为结果, 在组 2 中获得 65% 的 RPS 而在组 3 中获得 95% 的 RPS, 这证明了 PACAP 的施用增加了经免疫接种并受攻击的鱼针对该病原体的存活率。

[0090] 实施例 8. PACAP 与基于编码 IPNV 的 106kDa 多蛋白 (NH₂-VP₂-VP₄VP₃-COOH) 的基因的 DNA 疫苗的共施用在用该病毒实验性地进行攻击的虹鳟 (裂喉大麻哈鱼) 中的效应

[0091] 进行实验以评价通过肌肉途径共施用 PACAP 与基于编码 IPNV 的 106kDa 多蛋白 (NH₂-VP₂-VP₄VP₃-COOH) 的基因的 DNA 疫苗在用所述病毒实验性地进行攻击的虹鳟中的效应。设定 6 个实验组, 每组 15 条鱼 (12±1g), 并且将其维持在 10-12℃ 的水中。

[0092] 组 1 : 用 PBS 进行注射的鱼 ;

[0093] 组 2 : 用剂量为 1 μg / 鱼的 DNA 疫苗 (pP-IPNV) 进行注射的鱼 ;

[0094] 组 3 : 向其共注射剂量为 1 μg / 鱼的 DNA 疫苗 (pP-IPNV) 与剂量为 0.5 μg gpCMV-PACAP / 鱼的具有在人巨细胞病毒立即早期启动子控制下的尖齿胡鲈 PACAP 的 cDNA 序列 (pCMV-PACAP) 的质粒的组 ;

[0095] 组 4 : 向其共注射 pP-IPNV 疫苗 (1 μg / 鱼) 与剂量为 0.5 μg gpCMV / 鱼的不携带在 CMV 启动子 (pCMV) 控制下的 PACAP 的互补 DNA 序列的阴性对照质粒的组 ;

[0096] 组 5 : 向其共注射剂量为 1 μg / 鱼的 DNA 疫苗 (pP-IPNV) 与剂量为 0.05 μg gpCMV-PACAP / 鱼的具有在人巨细胞病毒立即早期启动子控制下的尖齿胡鲈 PACAP 的互补 DNA 序列 (pCMV-PACAP) 的质粒的组 ;

[0097] 组 6 : 向其共注射 pP-IPNV 疫苗 (1 μg / 鱼) 与剂量为 0.05 μg gpCMV / 鱼的不携带在 CMV 启动子 (pCMV) 控制下的 PACAP 的互补 DNA 序列的阴性对照质粒的组。

[0098] 在疫苗接种后 30 天, 通过腹膜内注射 100 μL IPNV (1×10⁷TCID₅₀ / mL / 鱼) 来将鱼暴露于病毒。在感染后 7 天, 每组处死 10 条鱼并评价头肾中的病毒载量。

[0099] 为了测定病毒载量, 从各个样品中分离出 RNA 并且从 1 μgRNA 开始进行反转录反应。通过实时 PCR 来评价 VP1 基因的表达的检测。结果显示在图 7 中。

[0100] 相比于共注射 pP-IPNV 和空载体的组而言, pP-IPNV 与 pCMV-PACAP 的共施用显著地降低了病毒载量。在所测试的 pCMV-PACAP 剂量之间没有差异。

[0101] 实施例 9. 肽 PACAP 与基于编码 VHSV 糖蛋白 G 的基因的 DNA 疫苗的共施用在用该病毒实验性地进行攻击的虹鳟 (裂喉大麻哈鱼) 中的效应

[0102] 进行实验以评价通过肌肉途径共施用尖齿胡鲈 PACAP 与基于编码 VHSV 糖蛋白 G 的基因的 DNA 疫苗 (pG-VHSV) 在用所述病毒实验性地进行攻击的虹鳟中的效应。设定 4 个实验组, 每组 20 条鱼 (10±2g), 并且将其维持在 10-12℃ 的水中。

[0103] 组 1 : 用 PBS 进行注射的鱼 ;

[0104] 组 2 : 向其注射 DNA 疫苗 pG-VHSV 的组 (0.01 μg / 鱼) ;

[0105] 组 3 : 向其共注射剂量为 0.01 μg / 鱼的 DNA 疫苗 pG-VHSV 与剂量为 0.1 μg PACAP / 鱼的尖齿胡鲈 PACAP 的组 ;

[0106] 组 4 : 向其共注射剂量为 0.01 μg / 鱼的 DNA 疫苗 pG-VHSV 与剂量为 0.5 μg PACAP / 鱼的尖齿胡鲈 PACAP 的组。

[0107] 在疫苗接种后 4 周, 通过在包含 (1×10⁵TCID₅₀ / mL / 鱼) 的感染剂量的 VHSV 的水中浸浴 2 小时来将鱼暴露于病毒。在攻击后 4 周期间评价累积死亡率, 并且结果显示在图 8 中。

[0108] 相比于施用单独的 DNA 疫苗而言, 对于 0.1 和 0.5 μg PACAP / 鱼的肽剂量, 该肽与 DNA 疫苗的共施用将死亡率分别降低了 15% 和 29%。

[0109] 实施例 10. 在用纤毛寄生虫多子小瓜虫的掠食体进行免疫接种后, PACAP 的施用对于斑鲷 (*Ictalurus punctatus*) 存活率的效应

[0110] 进行实验以评价在用纤毛寄生虫多子小瓜虫的掠食体进行免疫接种后, PACAP 的施用对于斑鲷存活率的效应, 根据由 Wang 和 Dickerson ((2002) Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9(1), 176-181) 所建议的疫苗接种和攻击程序。为此, 使用 $12 \pm 5\text{g}$ 的鱼。设立 4 个实验组, 每组 25 条鱼:

[0111] 组 1: 在第 1 和 35 天用 PBS 进行免疫接种的鱼。

[0112] 组 2: 在第 1 天用 8000 只多子小瓜虫的活掠食体和在第 35 天用 10000 只该寄生虫的活掠食体进行免疫接种的鱼。

[0113] 组 3: 在第 1 天用 8000 只多子小瓜虫的活掠食体和在第 35 天用 10000 只该寄生虫的活掠食体进行免疫接种的鱼。还在攻击前两周内, 以每隔一天一次, 通过 6 次浸浴 (以 $100 \mu\text{g}$ 肽 / L 水的剂量, 1 小时) 向这些鱼施用 PACAP38。

[0114] 组 4: 在第 1 天用 8000 只多子小瓜虫的活掠食体和在第 35 天用 10000 只该寄生虫的活掠食体进行免疫接种的鱼。这些鱼通过与组 3 相似的程序而经历浸浴 1 小时, 但没有肽 PACAP。

[0115] 在免疫接种之前, 用福尔马林处理鱼以去除存在的外寄生虫。将鱼维持在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 下和连续水流中。

[0116] 在第 84 天, 用 15000 只掠食体对鱼进行攻击。在攻击后 30 天期间获取死亡率数据。结果显示在表 2 中。这些结果显示了经免疫接种并同时用 PACAP 进行处理的鱼的存活率的 27% 的增加。

[0117] 表 2. 用多子小瓜虫的活掠食体进行免疫接种的、通过浸浴用 PACAP 进行处理或未用其进行处理的并用该寄生虫进行攻击的斑鲷的存活率

[0118]

实验组	经攻击的鱼的数目/ 存活的鱼的数目	存活率百分比 (%)
PBS	25/0	0
活掠食体	25/15	60
活掠食体 + PACAP ib	25/22	87
活掠食体 + ib	25/14	56

[0119] ib: 这些鱼在攻击前两周内, 以每隔一天一次, 经历 6 次浸浴 (1 小时)。

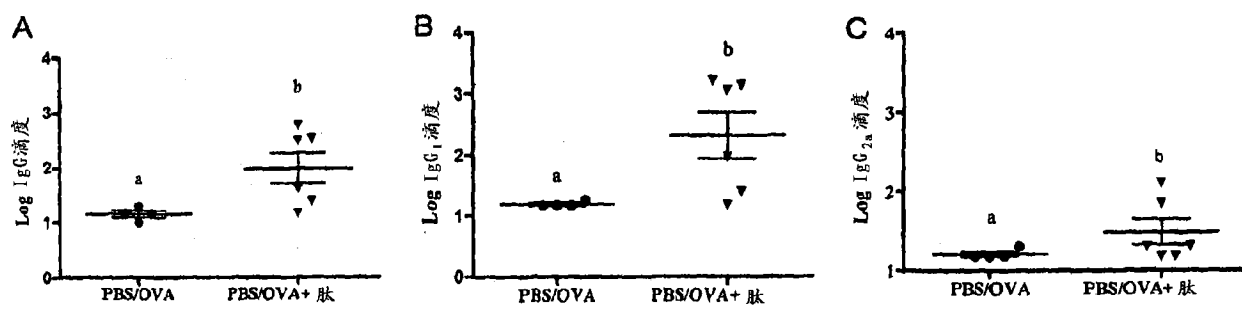


图 1

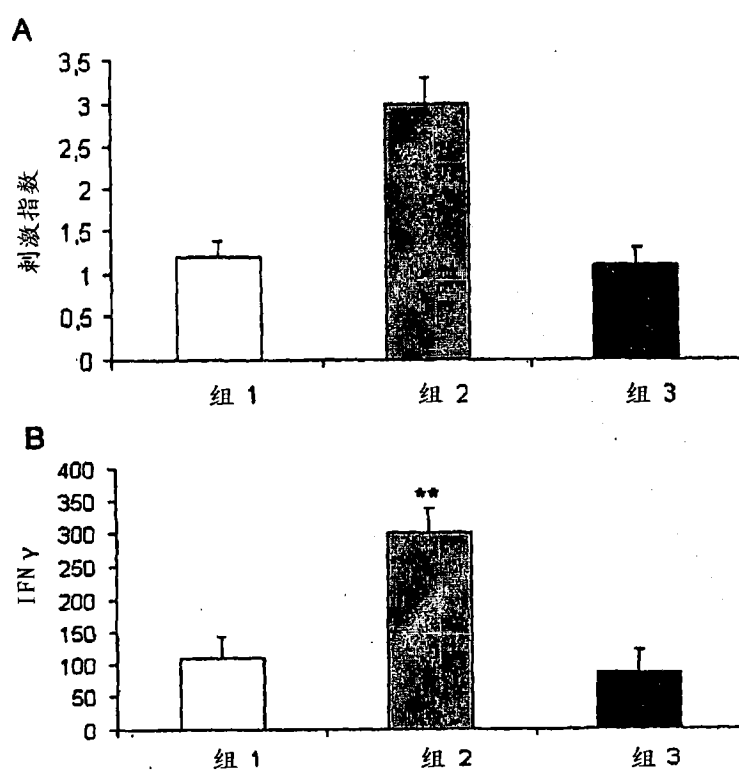


图 2

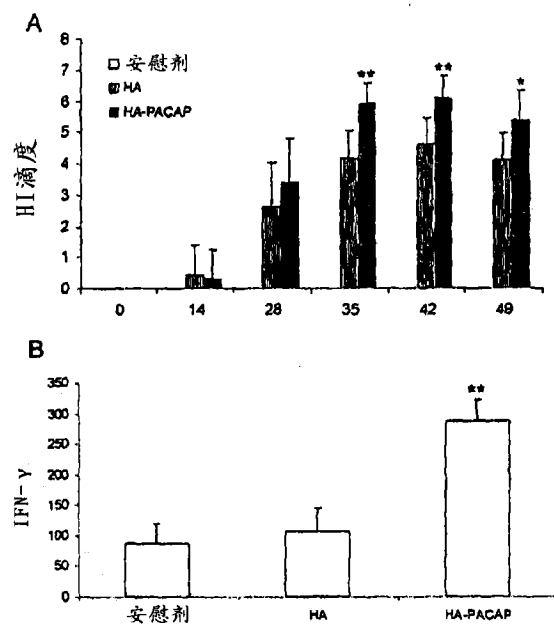


图 3

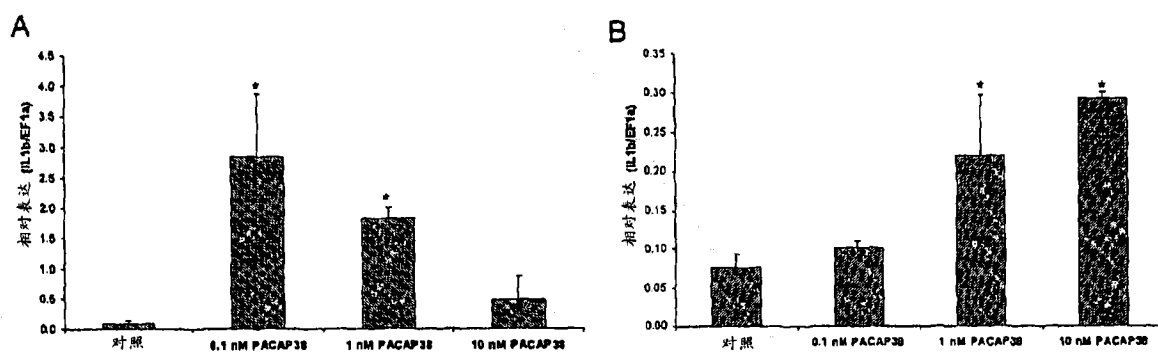


图 4

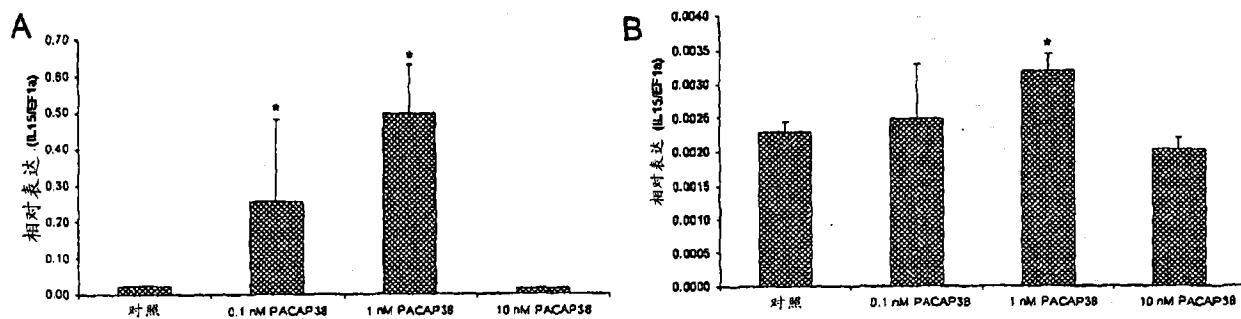


图 5

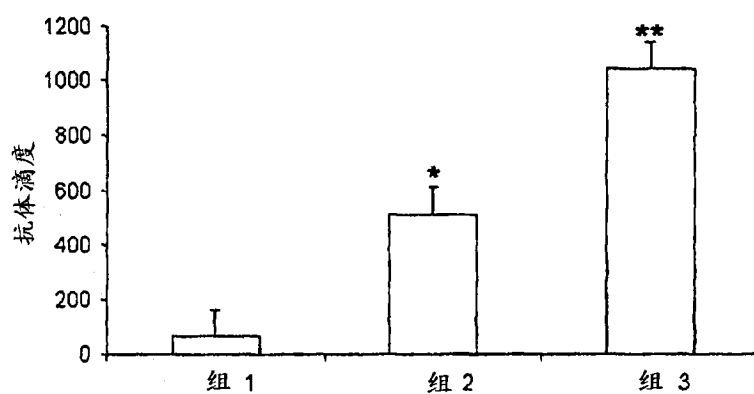


图 6

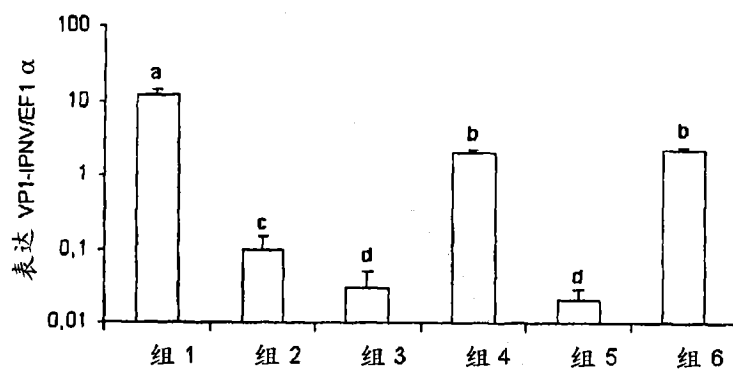


图 7

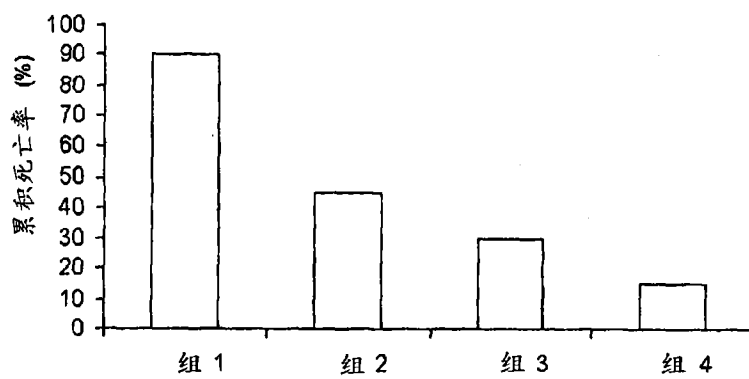


图 8