

USO DEL PACAP COMO ADYUVANTE MOLECULAR PARA VACUNAS

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina, la biología molecular y la inmunología, específicamente, con el desarrollo de las vacunas y de adyuvantes para las mismas. En particular, la presente invención revela el uso del péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) como adyuvante molecular para vacunas, las que se emplean en estrategias de inmunización.

Estado de la técnica anterior

El objetivo fundamental de la vacunación es la inducción de una respuesta inmune específica y efectiva contra un patógeno, que produzca la protección contra una infección y/o contra una enfermedad y que resulte en su erradicación. El concepto de que la respuesta inmune contra un determinado antígeno puede ser mejorada por la adición de determinados compuestos en la formulación vacunal fue demostrado hace aproximadamente 100 años, cuando las sales de aluminio se introdujeron en las formulaciones y se les denominó “adyuvantes” (G. Leroux-Roels (2010) Vaccine 28S C25–C36).

Las vacunas tradicionales consisten en microorganismos patógenos inactivados o atenuados, o en toxinas derivadas de estos microorganismos. A pesar de que el uso de microorganismos patógenos inactivados o atenuados presenta una elevada inmunogenicidad, actualmente es poco atractivo en la vacunología, por la alta toxicidad que presentan estas preparaciones. Por tanto, existe un interés creciente en los adyuvantes en las investigaciones relacionadas con el desarrollo de nuevas generaciones de vacunas basadas en subunidades proteicas recombinantes, péptidos sintéticos y ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico. Estas nuevas variantes, aunque menos tóxicas, son en su mayoría menos inmunogénicas cuando se administran sin un adyuvante inmunoestimulador. Esta es la razón por la cual, en los últimos años, se ha incrementado la necesidad de obtener adyuvantes seguros y más potentes (Saenz et al. (2010) Vaccine 28 (47): 7556-7562).

Aunque el uso de los adyuvantes es bien conocido, la manera en que estos actúan está menos clara. Se considera que, de manera general, estos incrementan la eficacia de las vacunas a través de varios mecanismos que incluyen: 1) el incremento del procesamiento y presentación del antígeno por las células dendríticas, 2) la inducción de una señal de “peligro” mediante las vías de señalización mediadas por los receptores que reconocen los patrones asociados a

patógenos, como los receptores tipo “Toll” y 3) mediante la activación de una señal co-estimuladora que activa los linfocitos. Estos mecanismos se desencadenan a través de la inducción de citoquinas y la sobrerregulación de la expresión de las señales co-estimuladoras apropiadas (Secombes (2010) Fish & Shellfish Immunology, 409-416).

Como adyuvantes se han estudiado varias moléculas endógenas y proteínas (Ying y 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), y se ha demostrado que algunos péptidos con propiedades inmunoestimulantes pueden actuar como adyuvantes *in vivo*, al estimular la respuesta inmune de antígenos de naturaleza peptídica y proteica (Saenz et al. (2010) Vaccine 28 (47): 7556-7562).

El PACAP pertenece a la superfamilia de la secretina/glucagón/péptido intestinal vasoactivo (Miyata et al (1989) Biochem Biophys Res Commun 164: 567-574). Es un neuropéptido multifuncional, que desempeña importantes funciones como factor hipofisiotrópico y neurotrópico, como neurotransmisor, neuromodulador y vasodilatador en los mamíferos (Arimura A. (1998) Japanese Journal of Physiology 48: 301-31). Además, ha sido demostrada su función en la regulación de la división celular, la diferenciación y la muerte celular (Sherwood et al. (2000) Endocrine Review 21: 619-670). Este péptido existe biológicamente en dos formas moleculares, de 38 (PACAP38) y de 27 (PACAP27) aminoácidos, respectivamente (Miyata et al. (1990) Biochemical and Biophysical Research Communications 170:643-8). Las acciones biológicas del PACAP están mediadas por la interacción del péptido con dos tipos de receptores que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la adenilato ciclasa: el receptor de tipo I, que es altamente específico para el PACAP y se nombra como PAC-1, y los receptores de tipo II, que presentan la misma afinidad por el PACAP que por el péptido intestinal vasoactivo (VIP), y que se conocen como VPAC-1 y VPAC-2 (Vaudry et al. (2000) Pharmacol Rev 52: 269-324).

El PACAP tiene una amplia distribución en los diferentes tejidos, incluyendo aquellos relacionados con el sistema inmune, aunque la presencia de este péptido y de sus receptores en las células del sistema inmune en los mamíferos solo ha sido parcialmente esclarecida (Gaytan et al. (1994) Cell Tissue Res 276:223-7; Abad et al. (2002) NeuroImmunoModulation 10:177-86).

El PACAP modula la respuesta inflamatoria, mediante la regulación de la interleuquina-6 (IL-6) y de la interleuquina-10 (IL-10) (Martínez et al. (1996) J Immunol 156(11):4128-36; Martínez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2):155-67; Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol 63(5):591-601).

- 5 En los macrófagos activados, el PACAP inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias y estimula la producción de citoquinas anti-inflamatorias, permitiendo de esta forma la homeostasis del sistema inmune. Adicionalmente, se conoce que el PACAP reduce la expresión de las moléculas coestimuladoras B7.1/B7.2 y la subsiguiente activación de las células T auxiliaadoras (Th, del inglés *T helper*). Por
- 10 otra parte, en los macrófagos previamente estimulados el PACAP inhibe, a través de sus receptores PAC-1, la producción de IL-6, suprimiendo así la inflamación (Martínez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2):155-67; Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998; 63(5):591-601). La acción inhibidora del PACAP sobre la transcripción de la IL-6 ante una intensa estimulación inflamatoria o una intoxicación
- 15 ayuda a la protección tisular y a la homeostasis del sistema inmune (Martínez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2):155-67; Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998 May;63(5):591-601). En contraste, en los macrófagos no estimulados, el PACAP induce la expresión de B7.2 y promueve la diferenciación celular hacia un fenotipo Th2 (Delgado y Ganea (2001) Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 49(2):101-10). Se ha
- 20 informado la presencia de PACAP en los órganos linfoides de patos (Squillacioti et al. (2005) Anatomia, Histologia, Embryologia. Volume 34, Issue Supplement s1, page 49).

- Se ha propuesto el uso del PACAP en los mamíferos como agente terapéutico para tratar enfermedades autoinmunes tales como el choque séptico, la artritis
- 25 reumatoide y la enfermedad de Crohn (Gomariz et al. (2006) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1070: 51-74). Se conoce que en las enfermedades autoinmunes existe una respuesta inmune descontrolada contra sustancias y tejidos propios de los organismos. En este sentido, el PACAP previene la inflamación en modelos animales de enfermedades autoinmunes mediante un balance adecuado de
- 30 citoquinas y quimioquinas y sus receptores, a través del reclutamiento de células del sistema inmune y mediante la regulación de la generación y de la activación de células Th1 y de las citoquinas que estas células secretan.

Por otra parte, se conoce que moléculas involucradas en la homeostasis del sistema inmune tales como los receptores tipo “Toll” son esenciales para la activación de la respuesta inmune innata, lo que potencia la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, este tipo de respuesta puede conducir a la patogénesis de la inflamación aguda y/o crónica, a la autoinmunidad y al cáncer (Gomariz et al. (2010) Current Pharmaceutical Design 16: 1063-1080). En este sentido, se conoce que el sistema VIP-PACAP interviene en la regulación de la expresión de los genes que codifican estos receptores tipo “Toll” (Gomariz et al. (2006) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1070: 51–74), pudiendo provocar ambos péptidos desórdenes en las vías de regulación de la producción de estos receptores.

El PACAP atenúa los niveles circulantes e inhibe la liberación de citoquinas mediada por la molécula endógena HMGB1 (del inglés, *high mobility group box 1*) (Tang et al. (2008) International Immunopharmacology 8(12): 1646-1651). Se conoce que la molécula HMGB1 y los péptidos derivados de la misma son capaces de actuar como adyuvantes al incrementar la respuesta inmune contra antígenos de naturaleza peptídica y proteica (Saenz et al. (2010) Vaccine 28 (47): 7556-7562).

El conocimiento sobre la función del PACAP en la modulación del sistema inmune en los peces se limita a estudios realizados por nuestro grupo de trabajo en los que se demuestra que la administración del PACAP de *Clarias gariepinus*, mediante baños de inmersión o inyección intraperitoneal, estimula parámetros de la inmunidad innata, tales como la producción de lisozima, de metabolitos derivados de la actividad de la óxido nítrico sintasa y de inmunoglobulina M, así como incrementa diferentes parámetros de las defensas antioxidantes en larvas y en juveniles de los peces (Carpio et al. (2008) Fish and Shellfish Immunology 25:439-45; Lugo et al. (2010) Fish and Shellfish Immunology 29:513-520). Estas propiedades del péptido se revelaron en la solicitud de patente “Neuropéptidos para el cultivo de organismos acuáticos”, con número de publicación internacional WO2007/059714.

En la actualidad se mantiene el interés en la identificación de compuestos que puedan emplearse como adyuvantes seguros y más potentes, y que puedan ser incorporados a las vacunas existentes y a las que se encuentran en desarrollo, tanto en el campo de la medicina humana como la veterinaria.

Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, al proveer de una nueva alternativa de adyuvante capaz de potenciar fuertemente la respuesta inmune hacia un antígeno administrado conjuntamente y por lo tanto, constituir un adyuvante altamente eficaz. Es objeto de la presente invención el uso del “péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria” (PACAP) como adyuvante molecular de antígenos que se encuentran presentes en vacunas, las que se emplean en diferentes estrategias de inmunización. En una realización de la invención dichas vacunas, que comprenden PACAP como adyuvante, están diseñadas para la inmunización contra agentes infecciosos. Estos agentes infecciosos pueden ser virus, bacterias y ectoparásitos, entre otros. En una realización particular, dichos agentes infecciosos afectan a mamíferos, aves y peces.

El término “péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP)”, como se utiliza en la presente invención, incluye esta molécula en cualquiera de sus variantes (PACAP27 o PACAP38), ya sea aislada de su fuente natural, de origen sintético o producida mediante la tecnología del ADN recombinante; y abarca su empleo como péptido o en forma de ácidos nucleicos.

En el contexto de esta invención el término “adyuvante molecular” se refiere a cualquier molécula de naturaleza proteica capaz de modular la respuesta inmune contra un antígeno vacunal, produciendo un incremento de la misma.

No existen investigaciones hasta el presente que demuestren el uso del PACAP como adyuvante molecular. Como se dijo anteriormente, se ha propuesto el uso del péptido en los mamíferos como agente terapéutico para tratar enfermedades autoinmunes tales como el choque séptico, la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (Gomariz et al. (2006) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1070: 51–74). En este sentido, el PACAP previene la inflamación en modelos animales de enfermedades autoinmunes mediante un balance adecuado de citoquinas y quimioquinas y sus receptores, a través del reclutamiento de células del sistema inmune y mediante la regulación de la generación y de la activación de células Th1 y de las citoquinas que estas células secretan. Teniendo en cuenta estos hallazgos, resulta inesperado el efecto encontrado como parte de nuestros estudios que demuestran que la administración del PACAP en combinación con un antígeno incrementa la respuesta inmunitaria contra dicho antígeno, mediante la estimulación de citoquinas pro-estimuladoras y del aumento de otros elementos de la respuesta inmune humoral.

Por otra parte, se conoce que el sistema VIP-PACAP interviene en la regulación de la expresión de los genes que codifican los receptores tipo "Toll" (Gomariz et al. (2006) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1070: 51–74), pudiendo provocar ambos péptidos desórdenes en las vías de regulación de la producción de estos receptores, lo que hace que su uso como adyuvante para vacunas no sea obvio. Otro elemento contrapuesto al nuevo uso del PACAP, revelado en esta invención, es la demostración de que este péptido atenúa los niveles circulantes e inhibe la liberación de citoquinas mediada por la molécula endógena HMGB1 (Tang et al. (2008) International Immunopharmacology 8(12): 1646-1651).

En la presente invención se demuestra, por primera vez, que el incremento en la respuesta inmune específica contra el antígeno vacunal que se co-administra con el PACAP, se observa tanto al nivel de la respuesta humoral como a nivel de respuesta celular.

Es también objeto de la presente invención una composición vacunal que comprende el péptido PACAP como adyuvante, al menos un antígeno de interés vacunal, y vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Esta composición vacunal que contiene el PACAP como adyuvante y al menos un antígeno de interés provoca una respuesta inmunológica contra el antígeno o antígenos de interés, local o sistémica. Las composiciones vacunales o vacunas, de la presente invención, pueden estar basadas, por ejemplo, en proteínas recombinantes, cepas microbianas atenuadas o ácidos nucleicos. En una materialización de la invención dichas composiciones vacunales se administran por la vía oral, por inyección, o por baños de inmersión.

En el contexto de la invención, en dichas composiciones vacunales, el PACAP se administra como péptido obtenido por aislamiento de su fuente natural, de forma sintética, o mediante la tecnología del ADN recombinante. También puede emplearse en forma de ácidos nucleicos.

En diferentes materializaciones de la presente invención las vacunas que comprenden PACAP en combinación con varios antígenos se administran a mamíferos, aves y peces, demostrándose por primera vez un efecto adyuvante para el PACAP. Inesperadamente, se observó que la administración del neuropéptido PACAP combinado con un antígeno incrementa los niveles de anticuerpos específicos contra dicho antígeno en mamíferos, aves y peces. Adicionalmente, se demostró por primera vez *in vitro* que la administración del PACAP incrementa

significativamente los transcriptos de interleuquina 1 beta (IL 1 β) e interleuquina 15 (IL15) en leucocitos de peces.

En diferentes realizaciones de la presente invención, que revela composiciones o combinaciones vacunales que comprenden el PACAP como adyuvante, se utilizan diversos antígenos, tales como ovoalbúmina (OVA), la glicoproteína E2 de la envoltura del virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza aviar, el polipéptido my32 de *Caligus rogercresseyi*, células inactivadas de *Aeromonas hydrophila*, la poliproteína de 106 kDa (NH₂-VP2-VP4VP3-COOH) del virus de la necrosis pancreática infecciosa (del inglés: *infectious pancreatic necrosis virus*, abreviado IPNV), la glicoproteína G del virus de la septicemia hemorrágica viral (del inglés: *viral hemorrhagic septicemia virus*, abreviado VHSV) y el parásito ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*.

En una realización particular de la invención, las composiciones vacunales se caracterizan porque el PACAP se emplea en una concentración de 50 - 750 μ g/ Kg de pienso si se aplica como alimento formulado, en una concentración de 0.1-10 μ g por gramo del peso corporal si se aplica por inyección; o en una concentración de 50-1000 μ g por Litro de agua si se aplica mediante baños de inmersión. Esto último es particularmente apropiado cuando las composiciones se emplean como vacunas de peces.

En otra realización de la invención, los antígenos y el adyuvante PACAP pueden formar parte de una combinación vacunal cuyos elementos se administran de forma simultánea, separada o secuencial en el curso de un mismo protocolo de inmunización. En una realización particular de la invención, la combinación se emplea en la prevención de infecciones virales, bacterianas y parasitarias. Para ello, el PACAP y el antígeno o antígenos se administran por la vía oral, por inyección, o por baños de inmersión, en una materialización de la invención.

En una realización particular, el PACAP se aplica como alimento formulado, a una concentración de entre 50 y 750 μ g/Kg de pienso. En una segunda realización de la invención, el PACAP se aplica por inyección, en una concentración de entre 0,1 y 10 μ g de péptido por gramo del peso corporal. En otra realización de la invención, el PACAP se aplica a los peces por baños de inmersión, en una concentración de 50-1000 μ g de PACAP por litro de agua.

También es objeto de esta invención un método para incrementar la respuesta inmune contra un antígeno vacunal donde se emplea una composición que comprende el "péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP) como adyuvante de dicho antígeno. De acuerdo al método revelado en la invención, el PACAP como adyuvante y el antígeno se pueden administrar de forma simultánea, separada o secuencial en el curso de un mismo esquema de inmunización. El PACAP se emplea como adyuvante en el método de la invención como péptido que ha sido obtenido por aislamiento de su fuente natural, por síntesis química o mediante la tecnología del ADN recombinante. También la invención comprende un método donde el PACAP que se emplea como adyuvante se administra en forma de ácidos nucleicos. De acuerdo al método de la invención, el incremento en la respuesta inmune, específica contra el antígeno vacunal de interés, se observa tanto a nivel de la respuesta humoral como a nivel de respuesta celular.

Según se demuestra en varias materializaciones de la invención, el aumento o incremento en la respuesta inmune contra el antígeno de interés se revierte en mayores niveles de protección frente a diversos agentes infecciosos, entre los que se encuentran entidades virales, bacterianas y ectoparásitos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Títulos de inmunoglobulinas (IgG) totales (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) inducidos por la inmunización de ratones con OVA co-administrada con el neuropéptido PACAP38. Se establecieron 2 grupos de ensayo, de 6 animales cada uno. El Grupo control negativo (tampón fosfato salino (PBS)/OVA) fue inoculado por vía intraperitoneal, a los días 0 y 7 con una dosis de 6 µg de OVA en 0,2 mL de PBS. El Grupo que además recibió PACAP38 (PBS/OVA+péptido) fue inoculado por vía intraperitoneal, a los días 0 y 7 con una dosis de 6 µg de OVA + 0,5 µg de PACAP38 en 0,2 mL de PBS. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Figura 2. Evaluación de respuesta celular en cerdos vacunados con la composición vacunal basada en E2-PACAP, medida en linfocitos de cerdo aislados en el día 5 posterior a la vacunación con E2 (grupo 1), E2+PACAP (grupo 2) y placebo (grupo 3). (A) Ensayo de linfoproliferación: Los resultados se expresan en índices de estimulación (IE), definido como la relación entre los conteos por minuto (cpm) del cultivo estimulado y los cpm del cultivo control no tratado. La respuesta

linfoproliferativa con un $IE \geq 2$ fue considerada como positiva; (B) Respuesta de secreción $IFN-\gamma$: se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Los valores se expresan como la media aritmética de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (**)
 $p < 0.01$.

5 **Figura 3.** Títulos de inhibición de la hemaglutinación en pollos inmunizados con 20 μg de HA o HA-PACAP (A). Las medias aritméticas de los títulos de anticuerpos se expresan como el $\log_2$ del valor del recíproco de la dilución más alta del suero a la cual se produce la inhibición de la hemaglutinación. Respuesta celular en los pollos inmunizados (B). La respuesta de secreción $IFN-\gamma$ se determinó mediante
10 PCR en tiempo real. Los valores están expresados como la media aritmética de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (**)
 $p < 0.01$.

Figura 4. Análisis por PCR a tiempo real del efecto *in vitro* del PACAP38 sobre la transcripción de la IL 1 β en leucocitos de sangre periférica (A) y de riñón anterior (B) de truchas sanas. Se evaluó el efecto del PACAP38 a las concentraciones de 10^{-10} ,
15 10^{-9} y 10^{-8} M, a las 48 horas de tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del gen de interés (IL 1 β) respecto al gen endógeno de expresión constitutiva factor de elongación 1 α (EF1 α) $\pm$ desviación estándar de la media (DS).
20 * ($p < 0.05$) indica que la expresión relativa del gen de interés fue estadísticamente superior con respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 5. Análisis por PCR a tiempo real del efecto *in vitro* del PACAP38 sobre la transcripción de la interleuquina 15 (IL 15) en leucocitos de sangre periférica (A) y
25 de riñón anterior (B) de truchas sanas. Se evaluó el efecto del PACAP38 a las concentraciones de 10^{-10} , 10^{-9} y 10^{-8} M, a las 48 horas de tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del gen de interés (IL 15) respecto al gen endógeno
30 de expresión constitutiva EF1 $\alpha \pm$ desviación estándar de la media (DS). * ($p < 0.05$) indica que la expresión relativa del gen de interés fue estadísticamente superior con respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 6. Título de anticuerpos aglutinantes contra *A. hydrophila* en carpa común. Los valores del eje y representan la media $\pm$ error estándar. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$. Grupo 1: Inyectados con PBS, Grupo 2: Inyectados con células de *A. hydrophila* inactivadas con formalina, Grupo 3: Inyectados con células de *A. hydrophila* inactivadas con formalina y PACAP (1 μ g por pez).

Figura 7. Efecto de la co-administración por vía intramuscular de la vacuna de ADN (pP-IPNV) a una dosis de 1 μ g/pez, con un plásmido que presenta la secuencia de ADN complementario del PACAP de *Clarias gariepinus*, bajo el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (pCMV-PACAP). A los 30 días post-vacunación, los peces fueron expuestos al virus mediante inyección intraperitoneal de 100 μ L de IPNV (1×10^7 Dosis infectiva media en cultivo de tejido (TCID₅₀) mL⁻¹ por pez). A los 7 días post-infección, se sacrificaron 10 peces por grupo y se evaluó la carga viral en riñón anterior por transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar. Las letras diferentes en supraíndices representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Grupo 1: Peces inyectados con PBS, Grupo 2: Peces inyectados con pP-IPNV, a una dosis de 1 μ g/pez, Grupo 3: Grupo al que se le co-administró pP-IPNV 1 μ g/pez y pCMV-PACAP a una dosis de 0,5 μ g de pCMV-PACAP/pez, Grupo 4: Grupo al que se le co-administró la vacuna pP-IPNV (1 μ g/pez) y pCMV a una dosis de 0,5 μ g de pCMV/pez, Grupo 5: Grupo al que se le co-administró pP-IPNV a una dosis de 1 μ g/pez y pCMV-PACAP a una dosis de 0,05 μ g de pCMV-PACAP/pez, Grupo 6: Grupo al que se le co-administró pP-IPNV (1 μ g/pez) y pCMV a una dosis de 0,05 μ g de pCMV/pez.

Figura 8. Porcentaje de mortalidad acumulada en truchas arcoiris de 10 g inmunizadas por vía intramuscular con una vacuna de ADN basada en el gen que codifica la glicoproteína G del VHSV (pG-VHSV) y el péptido PACAP. A las 4 semanas post-vacunación los peces fueron expuestos al virus (1×10^5 TCID₅₀ mL⁻¹ por pez) mediante baños de inmersión. Se evaluó la mortalidad acumulada durante 4 semanas post-reto. Grupo 1: Peces inyectados con PBS. Grupo 2: pG-VHSV (0,01 μ g/pez), Grupo 3: pG-VHSV 0,01 μ g/pez y PACAP 0,1 μ g PACAP/pez, Grupo 4: pG-VHSV 0,01 μ g/pez y PACAP 0,5 μ g de PACAP/pez.

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Efecto de la co-inmunización de la OVA y el PACAP sobre la respuesta inmune humoral en ratones

Se seleccionaron 12 ratones BALB/c hembra, con un peso corporal de 20 g, y se separaron en 2 grupos de ensayo, de 6 animales cada uno. El Grupo control negativo (PBS/OVA) fue inoculado por vía intraperitoneal, a los días 0 y 7 con una dosis de 6 µg de OVA en 0,2 mL de PBS. El Grupo tratado con PACAP38 (PBS/OVA+péptido) fue inoculado por vía intraperitoneal (IP), a los días 0 y 7 con una dosis de 6 µg de OVA + 0,5 µg de PACAP38 en 0,2 mL de PBS. En el día 15 del protocolo de inmunización, se les extrajo sangre a los animales y se evaluaron los títulos de IgG totales, IgG1 e IgG2a.

En la Figura 1A, B y C se presentan los títulos de IgG totales, IgG1 e IgG2a, respectivamente, inducidos por la inmunización de ratones con OVA co-administrada con el PACAP38. Los animales del grupo PBS/OVA+péptido mostraron un título de IgG totales específicas a OVA estadísticamente superior al grupo control (Figura 1A). De igual forma, se observó que los títulos de IgG1 e IgG2a específicos a OVA en el grupo inmunizado con OVA+PACAP fueron significativamente superiores a los observados en el grupo inmunizado sólo con OVA.

Ejemplo 2. Evaluación de la respuesta celular en cerdos vacunados con la composición vacunal basada en E2-PACAP

El antígeno E2 es la glicoproteína mayoritaria de la envoltura del VPPC. Con el objetivo de evaluar la respuesta celular en cerdos vacunados con la composición vacunal basada en E2-PACAP, y compararla con la producida por el antígeno E2, se seleccionaron 18 cerdos sanos, de 20 Kg de peso promedio, y serológicamente negativos al VPPC, procedentes de una unidad sin antecedentes de la enfermedad y sin vacunar en los 3 años precedentes. Los cerdos se distribuyeron en 3 grupos de 6 animales cada uno, con agua y pienso *ad libitum*. A cada animal se aplicó la composición vacunal con las siguientes cantidades de antígeno: 25 µg de E2 recombinante (Grupo 1) y 25 µg de E2 co-administrado con similar cantidad de PACAP38 (Grupo 2). Se estableció como Grupo 3 un grupo placebo. Los inmunógenos se formularon en una emulsión de adyuvante oleoso y se inocularon

mediante inyección de 2 mL por vía intramuscular (IM). Se realizó una sola inmunización. Los animales fueron confrontados en el día 8 pos-inmunización con el VPPC por vía IM (10^5 dosis letal media (DL50) del aislamiento "Margarita"). Se realizó un análisis diario de signos clínicos y se tomaron muestras de sangre en los días 3 y 5 para evaluar linfoproliferación y expresión de IFN- γ , como indicadores de respuesta celular. En los animales vacunados con E2-PACAP se detectó un aumento de la respuesta de los linfocitos durante el ensayo de proliferación (Fig. 2A) y niveles elevados de IFN- γ en el día 5 (Fig. 2B), en comparación con los otros grupos. Esto demuestra que la co-administración del antígeno E2 con PACAP produce una respuesta inmune celular contra el VPPC.

Ejemplo 3. Efecto de la co-inmunización en pollos de la HA del virus de la influenza aviar (virus A/VietNam1203/2004) y el PACAP sobre la respuesta inmune humoral y celular.

Para la inmunización se utilizaron pollos Leghorn blancos, de 3 semanas de edad. Se distribuyeron 10 pollos por grupo experimental. Se establecieron 3 grupos experimentales:

Grupo 1: 20 μ g de HA

Grupo 2: 20 μ g de HA+ 0,5 μ g de PACAP27

Grupo 3: 20 μ g de seroalbúmina bovina

La HA se obtuvo por vía recombinante, expresada en células de mamíferos. Las distintas formulaciones se adyuvaron en Montanide 888 y se administraron en un volumen final de 0,5 mL por vía subcutánea. Los animales se re-inmunizaron al día 28 post-inmunización. Se tomaron muestras de sangre a los días 0, 14, 28, 35, 42 y 49, para obtener los sueros necesarios para la detección de anticuerpos protectivos, mediante un ensayo de inhibición de la hemaglutinación, y para la extracción de leucocitos, con el objetivo de evaluar la respuesta celular producida por los diferentes inmunógenos.

Los resultados mostraron que los pollos inmunizados con HA-PACAP mostraron una respuesta humoral superior a los pollos inmunizados con HA, a partir del día 35, posterior a la administración de la dosis de re-inmunización (Fig. 3A). La respuesta celular, medida por la estimulación de IFN- γ , mostró un incremento en el grupo

tratado con HA-PACAP en comparación a los grupos inmunizados con HA o el grupo control (Fig. 3B).

Ejemplo 4. Efecto del PACAP sobre la expresión de la IL1- β e IL15 en leucocitos de sangre periférica y de riñón anterior de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) sanas.

Se utilizaron juveniles de trucha arcoiris (*O. mykiss*), de aproximadamente 50 gramos de peso, libres de VHSV, IPNV y de virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV). Los peces ($n=5$) se anestesiaron con la sal del ácido metanosulfónico (Sigma, USA) y se les extrajo asépticamente, primero sangre periférica de la vena caudal y, posteriormente, el riñón anterior. Se aislaron leucocitos de la sangre periférica y del riñón anterior a partir de 5 truchas, de forma independiente, siguiendo el método descrito por Graham y Secombes (Graham y Secombes (1998) Immunology 65:293-7).

Las células se resuspendieron en medio L-15 con 5% de suero fetal bovino, a una concentración de 5×10^6 células por mL, y se dispensaron en placas de 24 pocillos a 1 mL por pocillo. Los leucocitos fueron tratados con 3 concentraciones de PACAP38 de *C. gariepinus*, obtenido por síntesis química (10^{-10} M, 10^{-9} M y 10^{-8} M), por duplicado, y se utilizó como control negativo una suspensión de leucocitos no tratados dispensados por duplicado.

Los niveles de IL1 β e IL15 se evaluaron 48 horas después de los tratamientos. Para ello, se purificó ácido ribonucleico (ARN) total de los cultivos de leucocitos controles y los tratados con PACAP, mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162:156-9). Teniendo en cuenta que los cebadores diseñados para amplificar IL1 β e IL15 no discriminan entre ADN complementario (ADNc) y ADN genómico, se trataron los ARN total purificados a partir de los diferentes tejidos con una nucleasa de ADN, específicamente con la RQ1 RNase-free DNase (Promega), con el propósito de eliminar el ADN genómico que pudiera estar presente en las muestras.

Para la síntesis de los ADNc se utilizó un juego comercial de reactivos que emplea la reverso transcriptasa SuperScript III (Invitrogen). Finalmente, para las reacciones de PCR cuantitativas (qPCR) se utilizó una mezcla de PCR de origen comercial: Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). Los resultados de las

qPCR se normalizaron contra un gen endógeno de expresión constitutiva, específicamente el EF 1 α , y se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct}$, donde el ΔCt equivale a la resta del valor de ciclo umbral (Ct) del gen evaluado menos el valor de Ct del gen normalizador (EF 1 α).

- 5 Los niveles de la IL 1 β aumentaron después de las 48 horas de tratamiento en los cultivos de leucocitos de sangre periférica tratados con 10^{-10} M de PACAP38. A la dosis de 10^{-9} M se observó también un efecto estimulador de PACAP38 sobre la transcripción de este gen, con respecto al control negativo, pero los niveles de expresión detectados fueron inferiores a los niveles obtenidos con la dosis de 10^{-10}
- 10 M. Estos resultados demuestran un efecto positivo de PACAP38 sobre la transcripción de la IL1 β , a concentraciones bajas (en el rango de 10^{-9} - 10^{-10} M) (Figura 4A). En leucocitos de riñón anterior, el efecto del PACAP 38 sobre la transcripción de la IL1 β es más moderado que en leucocitos de sangre periférica, observándose un efecto estimulador a la dosis de 10^{-9} M y 10^{-8} M (Figura 4B).
- 15 Adicionalmente, se observó un efecto estimulador del PACAP38 sobre la expresión de la IL15 en los cultivos de leucocitos estimulados con PACAP38 a las dosis de 10^{-10} y 10^{-9} M. Se obtuvieron los mayores valores de expresión a la dosis de 10^{-9} M (Figura 5A). En leucocitos de riñón anterior, al igual que lo observado con la expresión de la IL 1 β , el efecto fue más moderado observándose niveles de
- 20 expresión de la IL15 estadísticamente superiores al control negativo, a la dosis intermedia de 10^{-9} M (Figura 5B).

Ejemplo 5. Ensayo de reto controlado, con infestación por *Caligus rogercresseyi* en salmones (*Salmo salar*) previamente inmunizados por vía intraperitoneal con el antígeno my32, y my32 co-administrado con PACAP.

25 La proteína my32 se obtuvo de forma recombinante, en el precipitado de ruptura de *E. coli*. Se conoce que esta proteína, administrada por vía intraperitoneal (IP), produjo un 57% de inhibición de la infestación en la segunda generación de parásitos en un ensayo de reto con *C. rogercresseyi* en *S. salar* (Carpio et al. (2011) Vaccine. 2011 29(15):2810-20).

30 Para demostrar el efecto adyuvante del PACAP sobre esta proteína, se diseñó un experimento de vacunación y reto en *S. salar*, en condiciones controladas, en el cual

se establecieron 6 grupos experimentales de 25 animales (80 g de peso promedio) cada uno:

Grupo 1: Inyectados IP con PBS

Grupo 2: Inyectados IP con PACAP38 a una dosis de 1 μ g/pez

5 Grupo 3: Inyectados IP con my32 a una dosis de 3 μ g/gramo peso corporal (gpc)

Grupo 4: Co-administración mediante inyección IP de my32 a una dosis de 3 μ g/gpc y PACAP a una dosis de 1 μ g/pez

Grupo 5: Peces inyectados IP con my32, a una dosis de 3 μ g/gpc, y alimentados con pienso formulado con 250 μ g de PACAP/ Kg de pienso diariamente, durante
10 una semana pre y post-inmunización con my32.

Durante el transcurso del experimento los peces se alimentaron dos veces al día con una fórmula comercial balanceada no medicada, a razón de 1% de su peso corporal, con excepción del grupo 5, al que se le suministró una semana pre y post-inmunización la misma fórmula comercial formulada con PACAP, según se describió
15 por Adelman et al. ((2008) Vaccine 26, 837—844) para la administración oral de una cepa atenuada del virus VHSV.

Después de 500 unidades térmicas arbitrarias, los peces se adaptaron a agua de mar por dos semanas. Posteriormente, se añadió a cada tanque 2000 $\pm$ 200 copepoditos. Los peces se mantuvieron sin flujo de agua, en la oscuridad y en
20 las condiciones de temperatura, salinidad y oxígeno sugeridas por Stone et al. (Dis Aquat Organ, 2000, 41: 141-149) por 24 días. El recambio y filtrado de agua se realizó de forma manual cada 48 horas.

A los 24 días, se anestesiaron y sacrificaron los peces, y se realizó el conteo de parásitos en un estereomicroscopio. Los resultados que se muestran en la Tabla 1
25 evidencian una reducción en los niveles de infestación en los grupos tratados con PACAP, my32 y PACAP+my32. La mayor reducción ocurrió en los grupos 4 y 5, lo que evidencia el efecto adyuvante del PACAP sobre el antígeno co-administrado.

Tabla 1. Conteo de parásitos a los 24 días post-reto en experimentos de vacunación y reto con *C. rogrecesseyi*

Grupos experimentales	Número de parásitos/pez	Inhibición de la infestación (%)
PBS	37 ± 3^a	-
PACAP	29 ± 5^b	22
my32	17 ± 8^c	55
PACAP-IP +my32-IP	8 ± 3^d	79
PACAP-oral +my32-IP	5 ± 2^e	86

Las letras indican diferencias estadísticamente significativas

- 5 El porcentaje de inhibición de la infestación se calcula como $1 - (\text{número de parásitos en el grupo experimental} / \text{número de parásitos en el control de PBS}) \times 100$

Ejemplo 6. Efecto adyuvante del PACAP en la respuesta inmune humoral de carpa común (*Cyprinus carpio*) versus *Aeromonas hydrophila*

- 10 El experimento se realizó con carpas (*C. carpio*) de 40 ± 10 g. Estas se mantuvieron en acuarios de 600 L a una temperatura de 28 ± 2 °C. Se establecieron 3 grupos experimentales de 10 carpas cada uno, a los cuales se inyectó por vía intraperitoneal los siguientes inmunógenos:

Grupo 1: PBS

- 15 Grupo 2: Células de *A. hydrophila* inactivadas

Grupo 3: Células de *A. hydrophila* inactivadas y 1 µg de PACAP38 por pez.

- Los peces se inyectaron en el día 0 y 14 y se colectó sangre de la vena caudal de los mismos en los días 0 y 21. Los resultados mostraron que los títulos de anticuerpos aglutinantes fueron significativamente mayores en el grupo inmunizado con la bacteria más el PACAP en comparación al grupo inmunizado con la bacteria solamente (Fig. 6). Estos resultados demuestran el efecto de PACAP como adyuvante molecular en peces. La preparación de las células de *A. hydrophila* y la determinación de los títulos de anticuerpos se realizaron según Yin et al. ((1996) Fish & Shellfish Immunology 6, 57–69).
- 20

Ejemplo 7. Ensayo de reto controlado, con infestación por *A. hydrophila* en carpa común (*C. carpio*) previamente inmunizadas por vía intraperitoneal con la bacteria inactivada y la bacteria inactivada co-administrada con PACAP.

El experimento se realizó con carpa común (*C. carpio*) de 30 ± 5 g. Estas se mantuvieron en acuarios de 250 L a una temperatura de 30 ± 2 °C. Se establecieron 3 grupos experimentales, de 20 carpas cada uno, a los cuales se inyectó intraperitonealmente:

Grupo 1: PBS

Grupo 2: Células de *A. hydrophila* inactivadas

Grupo 3: Células de *A. hydrophila* inactivadas y 1 µg de PACAP38 por pez.

Los peces se inyectaron en el día 0 y 14. En el día 21 se realizó el reto mediante la inyección IP de la DL50 de la bacteria y se registró la mortalidad durante 7 días. Se calculó el porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS) como:

$$RPS (\%) = \frac{(\% \text{ de mortalidad de controles} - \% \text{ mortalidad de tratados})}{(\% \text{ de mortalidad controles})} \times 100$$

Como resultado se obtuvo un 65% de RPS en el Grupo 2 y un 95% en el Grupo 3, lo que demuestra que la administración del PACAP incrementa la tasa de sobrevivencia de los peces vacunados y retados contra el patógeno.

Ejemplo 8. Efecto de la co-administración del PACAP con una vacuna de ADN basada en el gen que codifica la poliproteína de 106 kDa (NH₂-VP₂-VP₄VP₃-COOH) del IPNV en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) desafiadas experimentalmente con el virus.

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la co-administración por vía intramuscular del PACAP con una vacuna de ADN basada en el gen que codifica la poliproteína de 106 kDa (NH₂-VP₂-VP₄VP₃-COOH) del IPNV en truchas arcoiris desafiadas experimentalmente con dicho virus. Se conformaron 6 grupos experimentales de 15 peces cada uno (12 ± 1 g), y se mantuvieron en agua a 10-12 °C:

Grupo 1: Peces inyectados con PBS

Grupo 2: Peces inyectados con la vacuna de ADN (pP-IPNV) a una dosis de 1 µg/pez

Grupo 3: Grupo al que se le co-inyectó la vacuna de ADN (pP-IPNV) a una dosis de 1 µg/pez con un plásmido que presenta la secuencia de ADNc del PACAP de *C. gariepinus*, bajo el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (pCMV-PACAP), a una dosis de 0,5 µg de pCMV-PACAP/pez.

5 Grupo 4: Grupo al que se le co-inyectó la vacuna pP-IPNV (1 µg/pez) con un plásmido control negativo que no porta la secuencia de ADN complementario de PACAP bajo el promotor CMV (pCMV) a una dosis de 0,5 µg de pCMV-PACAP/pez.

Grupo 5: Grupo al que se le co-inyectó la vacuna de ADN (pP-IPNV) a una dosis de 1 µg/pez con un plásmido que presenta la secuencia de ADN complementario del
10 PACAP de *Clarias gariepinus* bajo el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (pCMV-PACAP) a una dosis de 0,05 µg de pCMV-PACAP/pez.

Grupo 6: Grupo al que se le co-inyectó la vacuna pP-IPNV (1 µg/pez) con un plásmido control negativo que no porta la secuencia de ADN complementario de
15 PACAP bajo el promotor CMV (pCMV) a una dosis de 0,05 µg de pCMV-PACAP/pez.

A los 30 días post-vacunación, los peces fueron expuestos al virus, mediante inyección intraperitoneal de 100 µL de IPNV (1×10^7 TCID₅₀ mL⁻¹ por pez). A los 7 días post-infección, se sacrificaron 10 peces por grupo y se evaluó la carga viral en
20 riñón anterior.

Para determinar la carga viral, se aisló el ARN de las muestras individuales y se realizó la reacción de reverso-transcripción a partir de 1 µg de ARN. La detección de la expresión del gen VP1 se evaluó mediante PCR a tiempo real. Los resultados se muestran en la Figura 7.

25 La co-administración de pP-IPNV y pCMV-PACAP disminuyó significativamente la carga viral, en comparación con el grupo al que se le co-inyectó pP-IPNV y los vectores vacíos. No hubo diferencias entre las dosis de pCMV-PACAP ensayadas.

Ejemplo 9. Efecto de la co-administración del péptido PACAP con una vacuna de ADN basada en el gen que codifica la glicoproteína G del VHSV en truchas arcoiris (*O. mykiss*) desafiadas experimentalmente con el virus.
30

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la co-administración por vía intramuscular del PACAP de *Clarias gariepinus* con una vacuna de ADN basada en

el gen que codifica la glicoproteína G del VHSV (pG-VHSV) en truchas arcoiris desafiadas experimentalmente con dicho virus. Se conformaron 4 grupos experimentales, de 20 peces cada uno (10 ± 2 g), y se mantuvieron en agua a 10-12 °C:

5 Grupo 1: Peces inyectados con PBS.

Grupo 2: Grupo al que se le inyectó la vacuna de ADN pG-VHSV (0,01 µg/pez).

Grupo 3: Grupo al que se le co-inyectó la vacuna de ADN pG-VHSV a una dosis de 0,01 µg/pez con el PACAP de *C. gariepinus* a una dosis de 0,1 µg de PACAP/pez.

10 Grupo 4: Grupo al que se le co-inyectó la vacuna de ADN pG-VHSV a una dosis de 0,01 µg/pez con el PACAP de *C. gariepinus* a una dosis de 0,5 µg de PACAP/pez.

A las 4 semanas post-vacunación los peces fueron expuestos al virus, mediante baños de inmersión durante 2h, en agua conteniendo una dosis infectiva de VHSV de (1×10^5 TCID₅₀ mL⁻¹ por pez). Se evaluó la mortalidad acumulada durante 4 semanas post-reto y los resultados se muestran en la Figura 8.

15 La co-administración del péptido con la vacuna de ADN redujo la mortalidad en un 15 y 29%, en comparación con la administración de la vacuna de ADN sola, para las dosis de péptido de 0,1 y 0,5 µg de PACAP/pez, respectivamente.

Ejemplo 10. Efecto de la administración del PACAP tras la inmunización con
20 **terontes del parásito ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* sobre la sobrevida de**
pez gato del canal (*Ictalurus punctatus*)

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP, posterior a la inmunización con terontes del parásito ciliado *I. multifiliis*, sobre la sobrevida del pez gato del canal (*I. punctatus*), siguiendo el procedimiento de
25 vacunación y reto propuesto por Wang y Dickerson ((2002) Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9(1), 176–181). Para esto se utilizaron peces de 12 ± 5 g. Se establecieron 4 grupos experimentales de 25 peces cada uno:

Grupo 1: Peces inmunizados en los días 1 y 35 con PBS.

30 Grupo 2: Peces inmunizados en el día 1 con 8000 terontes vivos de *I. multifiliis* y al día 35 con 10 000 terontes vivos del parásito.

Grupo 3: Peces inmunizados en el día 1 con 8000 de terontes vivos de *I. multifiliis* y al día 35 con 10 000 terontes vivos del parásito. A estos peces también se les administró el PACAP38 mediante 6 baños de inmersión a una dosis de 100 µg de

péptido/L de agua durante 1 hora, en días alternos en las dos semanas previas al reto.

Grupo 4: Peces inmunizados en el día 1 con 8000 de terontes vivos de *I. multifiliis* y al día 35 con 10 000 terontes vivos del parásito. Estos peces fueron sometidos a los baños de inmersión durante 1 hora pero sin el péptido PACAP, mediante un procedimiento similar al Grupo 3.

Previo a la inmunización los peces fueron tratados con formalina para remover los ectoparásitos existentes. Los peces se mantuvieron a 23 ± 2 °C, en flujo continuo de agua.

Al día 84, se retaron los peces con 15 000 terontes. Los datos de la mortalidad se obtuvieron durante los 30 días posteriores al reto. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Estos demuestran un incremento de un 27% en la sobrevida de los peces inmunizados y tratados a la vez con el PACAP.

Tabla 2. Sobrevida de *I. punctatus* inmunizados con terontes vivos de *I. multifiliis*, tratados o no con PACAP mediante baños de inmersión y retados con el parásito.

Grupos experimentales	Número de peces retados/Número de peces que sobrevivieron	Porcentaje de sobrevida (%)
PBS	25/0	0
Terontes vivos	25/15	60
Terontes vivos+PACAP Bi	25/22	87
Terontes vivos+ Bi	25/14	56

Bi: Estos peces fueron sometidos a 6 baños de inmersión durante 1 hora, en días alternos en las dos semanas previas al reto.

REIVINDICACIONES

USO DEL PACAP COMO ADYUVANTE MOLECULAR PARA VACUNAS

1. Uso del "péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP) como adyuvante molecular de antígenos vacunales.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1 caracterizado porque el PACAP se administra como péptido o en forma de ácidos nucleicos.
3. El uso de la reivindicación 1 caracterizado porque el PACAP que se administra como péptido se obtiene a) por aislamiento de su fuente natural, b) de forma sintética, o c) mediante la tecnología del ADN recombinante.
- 10 4. El uso de la reivindicación 1 caracterizado porque dichos antígenos vacunales se emplean en la prevención de enfermedades causadas por agentes infecciosos.
5. El uso de la reivindicación 4 caracterizado porque dichas enfermedades se producen en mamíferos, aves y peces.
- 15 6. El uso de la reivindicación 4 caracterizado porque el agente infeccioso es un virus, una bacteria o un ectoparásito.
7. Composición vacunal que comprende el "péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP), al menos un antígeno vacunal, y vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7 caracterizada porque se emplea para la prevención de enfermedades causadas por agentes infecciosos.
9. La composición de la reivindicación 7 caracterizada porque se administra por vía oral, por inyección, o por baños de inmersión.
- 25 10. La composición de la reivindicación 7 caracterizada porque el PACAP se administra como péptido obtenido a) por aislamiento de su fuente natural, b) de forma sintética, o c) mediante la tecnología del ADN recombinante; o en forma de ácidos nucleicos.
- 30 11. La composición de las reivindicaciones 9 y 10 caracterizada porque el PACAP se emplea en una concentración de 50 - 750 µg/ Kg de pienso si se aplica como alimento formulado, en una concentración de 0,1-10 µg por gramo del peso corporal si se aplica por inyección; o en una concentración de 50-1000 µg por Litro de agua si se aplica mediante baños de inmersión.

12. Combinación vacunal que comprende el "péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP) y al menos un antígeno vacunal.
13. La combinación de la reivindicación 12 caracterizada porque el PACAP y el antígeno se administran de forma simultánea, separada o secuencial en el curso de un mismo esquema de inmunización.
14. La combinación de la reivindicación 13 caracterizada porque el PACAP se emplea en una concentración de 50 - 750 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de pienso si se aplica como alimento formulado, en una concentración de 0,1-10 μg por gramo del peso corporal si se aplica por inyección; o en una concentración de 50-1000 μg por Litro de agua si se aplica mediante baños de inmersión.
15. Método para incrementar la respuesta inmune contra un antígeno vacunal que se caracteriza porque comprende el uso de una composición que comprende el "péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP) como adyuvante de dicho antígeno.
16. El método de la reivindicación 15 caracterizado porque la composición que comprende el PACAP como adyuvante y el antígeno se administran de forma simultánea, separada o secuencial en el curso de un mismo esquema de inmunización.
17. El método de la reivindicación 15 caracterizado porque el PACAP se emplea como péptido obtenido a) por aislamiento de su fuente natural, b) de forma sintética, o c) mediante la tecnología del ADN recombinante; o en forma de ácidos nucleicos.