(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103298452 B
(45)授权公告日 2016.08.10

(21)申请号 201180064517.1

(22)申请日 2011.11.30

(30)优先权数据
2010-0233 2010.12.01 CU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.07.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CU2011/000008 2011.11.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/072055 ES 2012.06.07

(73)专利权人 遗传工程与生物技术中心
地址 古巴哈瓦那

(72)发明人 M·P·埃斯特拉达加西亚
J·M·卢戈冈萨雷斯
Y·卡普里奥冈萨雷斯
C·塔法拉皮奈罗

(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

(51)Int.Cl.
A61K 9/08(2006.01)
A61K 38/22(2006.01)
A61K 31/7056(2006.01)

(56)对比文件
EP 1956031 A1,2008.08.13,
J. Moya et al..In vivo effect of EICAR (5-ethynyl-1-i-D-ribofuranosylimidazole-carboxamide) on.《Antiviral Research》.2000,第48卷

审查员 杨云云

权利要求书1页 说明书18页 附图6页

(54)发明名称

PACAP用于在水生生物中治疗病毒感染的用途

(57)摘要

本发明涉及垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)用于在水生生物中治疗病毒感染和由病毒引起的感染性疾病的用途。单独地或与抗病毒分子相组合地通过口服途径、通过注射或通过浸浴进行施用的PACAP显示出其提高被病毒感染的鱼类或甲壳类的存活率的功效。此外,在其应用后,观察到这些生物的体重相比于被感染但未用所述制剂进行治疗的生物的体重而言保持相同或者增加。通过对于病毒感染易感的组织和器官的反转录-聚合酶链式反应,证明了PACAP或包含PACAP的组合降低在被感染生物中的病毒载量。

CN 103298452 B

1.垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)在制备组合物中的用途,所述组合物用于在鱼类、甲壳类和双壳类中治疗病毒感染,其中所述病毒选自下列科的病毒:疱疹病毒科、乳多空病毒科、披膜病毒科、反转录病毒科、呼肠病毒科、双RNA病毒科和小RNA病毒科。

2.权利要求1的用途,其特征在于,所述PACAP以下述方式来获得:a)通过从其天然来源中分离;b)合成地;或者c)通过重组DNA技术。

3.权利要求2的用途,其特征在于,所述PACAP是源自鱼类的多肽。

4.权利要求1至3中任一项的用途,其特征在于,所述组合物用于在鲑类中治疗病毒感染。

5.权利要求1至3中任一项的用途,其特征在于,所述甲壳类是对虾。

6.权利要求1的用途,其特征在于,所述病毒选自IPNV、VHSV、ISAV、IHNV和WSSV。

7.兽医学组合,其特征在于,该组合包含垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)和抗病毒分子,其中所述抗病毒分子选自利巴韦林和金刚烷胺。

8.权利要求7的组合,其中所述PACAP以下述方式来获得:a)通过从其天然来源中分离;b)合成地;或者c)通过重组DNA技术。

9.权利要求7的组合,其中所述PACAP和所述抗病毒分子在同一治疗过程中同时地、分开地或顺次地进行施用。

10.权利要求7至9中任一项的组合,其特征在于,该组合用于在鱼类、甲壳类和双壳类中的病毒感染的治疗。

11.权利要求7的组合,其特征在于,所述PACAP和所述抗病毒分子通过口服途径、通过注射或通过浸浴来进行施用。

12.权利要求11的组合,其特征在于,将所述PACAP以50-750μg/Kg饲料的浓度和将所述抗病毒分子以100-2000μg/Kg饲料的浓度作为配合饲料来进行应用。

13.权利要求11的组合,其特征在于,将所述PACAP以0.1-10μg/克体重的浓度和将所述抗病毒分子以1-50μg/g体重的浓度通过注射应用于鱼类。

14.权利要求11的组合,其特征在于,将所述PACAP以50-1000μg/升水的浓度和将所述抗病毒分子以100-2000μg/L水的浓度通过浸浴应用于鱼类或甲壳类。

PACAP用于在水生生物中治疗病毒感染的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及水生生物技术领域，特别地涉及PACAP和包含PACAP的组合物用于在水生生物中治疗病毒感染或由病毒引起的感染性疾病的用途。本发明还涉及与抗病毒药相组合的PACAP用于治疗所述感染的用途。

现有技术

[0002] 在近些时期，水生物种的养殖对于鱼类、软体动物和甲壳类的总产量的年贡献已经增加。然而，养殖物的高密度暗示，这些动物生活在压力条件下，并且通常对于感染更易感。在水产业中由病原体引起的疾病的爆发导致巨大的经济损失，和甚至有时造成特定地区中养殖的终止。

[0003] 在鲑类中，由传染性胰腺坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus，IPNV)、病毒性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus，VHSV)、感染性鲑鱼贫血病毒(infectious salmon anemia virus，ISAV)和传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus，IHNV)引起的感染是在其养殖中最重要的疾病原因中的一些(Marroquí等人，(2008)Antiviral Research80:332-338)。例如，已估计，作为由ISAV造成的死亡率的结果，智利的鲑鱼产量在2010年结束时将下跌38.7%(从2009年的403000吨至2010年的245000吨)(http://www.aqua.cl)。

[0004] 另一方面，甲壳类是全球水产业中最重要的经济成份之一，每年提供超过100亿美元。养殖中的虾类对于各种各样的病原体(包括病毒)易感。据估计，在90年代中期，世界产量的大约40%(等价于30亿美元)由于疾病而损失。主要贡献者是病毒疾病，其中存在五种特别重要的：白斑综合征病毒(white spot syndrome virus，WSSV)、黄头病毒(yellow head virus，YHV)、Taura综合征病毒(Taura syndrome virus，TSV)、传染性皮下和造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus，IHNNV)和斑节对虾杆状病毒(monodon baculovirus，MBV)(由Johnson等人，(2008)Vaccine26:4885-4992进行了综述)。

[0005] 双壳类构成了软体动物总产量的重要部分。这些具有作为滤食生物的特征的生物构成了重要的病毒储库，因此其养殖可能面对威胁产量的动物流行病。在文献中已报道了角巨牡蛎(Crassostrea angulata)这一物种的成年牡蛎的巨大死亡率，其与由类似于虹彩病毒的病毒引起的感染相关。另外，已经描述了能够感染双壳类养殖物的下列科的其他病毒：疱疹病毒科(Herpesviridae)、乳多空病毒科(Papovaviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、反转录病毒科(Retroviridae)、呼肠病毒科(Reoviridae)、双RNA病毒科(Birnaviridae)和小RNA病毒科(Picornaviridae)。然而，由于缺乏来源于软体动物的细胞系和由于有限的现有的用于这些生物的分子工具，双壳类的病毒学仍然是一门主要基于形态学研究和少量实验研究的原始科学(由T.Renault和B.Novoa(2004)Aquat.Living Resour.17:397-409进行了综述)。

[0006] 抗病毒药是用于治疗由病毒产生的感染的化学化合物。最初的实验性抗病毒药发

现于60年代。这些通过“试验”和“错误”的方法而开发出来。但是，在80年代中期之后，情景引人注目地发生改变。近年来已经注册了许多新型的抗病毒药物，大多数用于人免疫缺陷病毒(HIV)的治疗。然而，还存在很多应当改善的方面，因为这些化合物并不总是有效的或者被充分地耐受。另一方面，关于改进这些药物的设计和应用的主要理由中的一些是病毒抗性的出现或者与其相关的副作用(De Clercq(2002)Nature Reviews Drug Discovery1:13-25)。抗病毒药物的设计将病毒蛋白质或宿主细胞的蛋白质作为靶标。第一种策略导致更特异的和更小毒性的化合物，但具有较窄的抗病毒活性谱和较大的形成抗性的可能性。第二种策略使得能够获得具有较宽的活性谱和较小的形成抗性的可能性的抗病毒化合物，但是作为缺点，具有较大的细胞毒性的可能性。选择策略取决于病毒的性质和在病毒或宿主细胞中存在的可能靶标(De Clercq(2002)Nature Reviews Drug Discovery1:13-25)。

[0007] 利巴韦林是广谱抗病毒试剂，其具有针对宽范围的DNA和RNA基因组病毒的活性。它是一种核苷类似物，其在细胞内被磷酸化之后，转变为细胞的肌苷一磷酸脱氢酶(IMPDH)的竞争性抑制剂，所述肌苷一磷酸脱氢酶是参与鸟苷一磷酸(GMP)合成的酶(Graci和Cameron,(2006)Reviews in Medical Virology16:49-63;Parker,(2005)Virus Research107:165-171)。除了该酶IMPDH的抑制之外，还提出了其他三种机制以解释该化合物的抗病毒活性：通过直接抑制病毒的RNA聚合酶(Toltzis等人,(1988)Antimicrobial Agents and Chemotherapy32:492-497)，通过抑制在病毒的信使RNA(mRNA)的5’末端处的加帽(Goswami等人,(1979)Biochemical and Biophysical Research Communications89:830-836)，和通过突变的积累(Graci和Cameron,(2002)Virology298:175-180)。

[0008] 迄今为止，还不存在被批准用于在水生生物中治疗病毒疾病的特异性抗病毒药物。在智利，一家名为Andrómaco的Diagnotec S.A.的子公司开发出了称为VIROTOP的用于在鱼类中使用的抗病毒药。该抗病毒药正在等待国家农业与畜牧业部门(Servicio Agrícola y Ganadero)(SAG)的批准(http://www.aqua.cl)。然而，大量的化合物已经在体外和在体内进行了评价(Hudson等人,(1988)Antiviral Research9:379-385;Jashés等人,(2000)Antiviral Research45:9-17;Kamei和Aoki,(2007)Archives of Virology152:861-869;LaPatra等人,(1998)Fish and Shellfish Immunology8:435-446;Mas等人,(2006)Antiviral Research72:107-115;Micol等人,(2005)Antiviral Research66:129-136;Moya等人,(2000)Antiviral Research48:125-130)，它们显示出了各种不同程度的效力。

[0009] 已在实验性地用IPNV感染的银鲑(银大麻哈鱼(Oncorhynchus kisutch))和虹鳟(裂喉大麻哈鱼(Oncorhynchus mykiss))的幼体中在体内评价了利巴韦林的类似物(5-乙炔基-1-β-D-呋喃核糖基咪唑-甲酰胺(EICAR))的施用(Moya等人,(2000)Antiviral Research48:125-130)。该治疗在于，在20天内在0.4和0.8μg/mL的EICAR溶液中每日浸浴两小时。结果显示，被感染并用EICAR进行治疗的组的存活率与在未被该病毒感染的组中的存活率相似。通过反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术进行了在肾和脾中的病毒载量的分析。该分析证明了在用该抗病毒药进行治疗的动物中病毒载量的降低。从该研究中得出结论：EICAR是IPNV复制的抑制剂，因此将其用于降低病毒载量和避免鱼类死亡率是用于提高养殖物的生产率的有益手段。但是，用抗病毒药进行的治疗对于种鱼的选择来说不是有用的，因为被感染且经治疗的鱼仍然携带病毒并且可以将其传播给后代。然而，抗病毒药的使

用是有利的，因为如果没有治疗，鱼类就会死亡，并且在没有抗病毒治疗的情况下存活的鱼类依然还是病毒的携带者。

[0010] 另一方面，观察到，由某些病毒感染产生的损害之一是在被感染的鱼中的体重减轻(Wolf(1986)The fish viruses.In:Espinosa de los Monteros,J.,Labarta,U.(编辑),Patología en Acuicultura.Industrias gráficas,España,SL,pp.93-95;Moya等人,(2000)Antiviral Research48:125-130)。该体重减轻在用抗病毒药进行治疗的鱼中则小得多，这是使用抗病毒药的额外优点。该效应在鳟鱼中比在银鲑中更明显(Moya等人,(2000)Antiviral Research48:125-130)。

[0011] 垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)属于肠促胰液素/胰高血糖素/血管活性肠肽超家族。该肽于1989年首次从牛的下丘脑中分离出来，并且证明了其通过激活腺苷酸环化酶和随后刺激环腺苷酸(cAMP)的产生来刺激生长激素分泌的能力(Miyata等人,(1989)Biochem Biophys Res Commun164567-574)。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，其展现出与对于血管活性肠肽(VIP)的亲和力相同的对于PACAP的亲和力，并被称为VPAC-1和VPAC-2(Vaudry等人,(2000)Pharmacol Rev52:269-324)。

[0012] PACAP广泛分布在哺乳动物的大脑中，主要在下丘脑中，在丘脑的室旁核和背内侧核中，在间隔中，在大脑皮质中，在杏仁核中，在海马中，和在小脑中(Montero等人,(2000)Journal of Molecular Endocrinology25:157-168)。在外周组织中以及在中枢神经系统的组织中，最丰富的PACAP的分子形式为38个氨基酸的那种。在不同的哺乳动物物种中进行的研究显示了PACAP在性腺(Shioda等人,(1994)Endocrinology135:818-825)、肾上腺(Arimura等人,(1991)Endocrinology129:2787-2789)、甲状旁腺(Vaudry等人,(2000)Pharmacol Rev2000,52:269-324)、内分泌胰腺(Arimura和Shioda(1995)Neuroendocrinology16:53-88)和胃肠道(Arimura等人,(1991)Endocrinology129:2787-2789;Vaudry等人,(2000)Pharmacol Rev52:269-324;Hannibal等人,(1998)Cell.Tissue.Res.291:65-79)中的存在。此外，还已描述了在免疫细胞中PACAP的表达，尽管该肽及其受体在哺乳动物免疫系统的细胞中的表达只是部分地得到了阐明(Gaytan等人,(1994)Cell Tissue Res276:223-7;Abad等人,(2002)NeuroImmunoModulation10:177-86)。

[0013] 在哺乳动物中，在造血组织之中，观察到受体VPAC-1在人的外周血淋巴细胞中和在鼠类淋巴细胞和巨噬细胞中的组成型表达，而VPAC-2的表达在所述细胞中是诱导型的。另一方面，观察到受体PAC-1在大鼠的腹腔巨噬细胞中和在人骨髓单核细胞细胞系THP-1中的组成型表达。另外，还报道了PACAP在大鼠中在胸腺细胞中、在不同的T细胞亚型中、在B细胞中、在脾细胞中和在淋巴结中的表达(Delgado等人,(2001)J Biol Chem276:369-80;

Pozo等人,(2003)Trends Mol Med9:211-7)。

[0014] 在鱼类中,主要在中枢神经系统中(尤其是在下丘脑、大脑和脊髓中)和在支配眼睛、垂体腺、呼吸道、唾液腺、胃肠道、生殖道、胰腺和泌尿道的周围神经系统中报道了PACAP的存在和其信使核糖核酸(mRNA)的表达(Sherwood等人,(2000)Endocrine Review21:619-670)。

[0015] 在大鼠中,PACAP抑制胸腺细胞的自发凋亡(Delgado,(1996)Blood87:5152-5161)。PACAP可以控制胸腺细胞增殖这一事实暗示,其是这些免疫系统细胞的成熟过程的重要调节者(Delgado,(1996)Blood87:5152-5161)。

[0016] 该肽通过刺激由垂体滤泡细胞进行的白介素6(IL-6)的释放而间接地介入淋巴细胞的成熟。IL-6刺激B细胞的生长和分化,并且促进由这些细胞进行的免疫球蛋白的合成和分泌(Tatsuno等人,(1991)Endocrinology129:1797-1804;Yada等人,(1993)Peptides14:235-239)。

[0017] 该肽还通过调节IL-6和白介素-10(IL-10)而激活和抑制炎症反应(Martínez等人,(1996)J Immunol156(11):4128-36;Martínez等人,(1998)J Neuroimmunol85(2):155-67;Martínez等人,(1998)J Leukoc Biol63(5):591-601)。

[0018] 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,从而允许实现免疫系统的内环境稳定。另外,PACAP还降低共刺激分子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 Neuroimmunol85(2):155-67;Martínez等人,(1998)JLeukoc Biol.1998May,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 Neuroimmunol85(2):155-67;Martínez等人,(1998)J Leukoc Biol.1998May,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)。

[0019] 总的来说,近些年来已经部分地阐明了PACAP在调节哺乳动物免疫系统中的功能,其中证明PACAP调节先天免疫系统及获得性免疫系统,并且调节在这些生物中的促炎和抗炎免疫应答。但是,现有的关于在这些生物中PACAP对于抗病毒应答的可能的调节的信息是稀少的。最近,证明了,在慢性乙型肝炎患者中,一旦通过用拉米夫定进行治疗来去除病毒血症,血浆中PACAP-38的水平就会增加(Elefsiniotis等人,(2003)European Journal of Gastroenterology and Hepatology15:1209-1216),这暗示了由该肽诱导的T细胞免疫应答的改变,其导致在患者的肝脏中疾病的生物化学和组织学缓解。

[0020] 在鱼类中,迄今为止发表的关于PACAP的生物学功能的体内研究主要与生殖(Canosa等人,(2008)American Journal of Physiology(Regul Integr Comp Physiol)295:1815-21)、大脑发育(Sherwood等人,(2007)Peptides28:1680-7)和食欲(Matsuda等人,(2005)Peptides26:1611-6;Maruyama等人,(2006)Peptides27:1820-6)有关。最近,证明了该神经肽在处于幼体阶段的不同硬骨鱼物种的生长和发育中的生物学功能(Lugo等人,(2008)Journal of Endocrinology197:583-97)。

[0021] 关于PACAP在调节鱼类免疫系统中的功能的认识限于由我们的工作小组进行的研

究，其中证明了，通过分离自尖齿胡鲇(Clarias gariepinus)的重组PACAP的浸浴或注射来进行的施用在经治疗的鱼的幼体和青年体中不仅促进生长，而且刺激先天免疫(溶菌酶、衍生自氧化氮的代谢物和抗氧化防御物的产生)和获得性免疫(IgM)的参数(Carpio等人，(2008)Fish and Shellfish Immunology25:439-45;Lugo等人，(2010)Fish and Shellfish Immunology29:513-520)。该肽的这些特性公开在具有国际公开号WO2007/059714的专利申请“Neuropéptidos para el cultivo de organismos acuáticos”中。

[0022] 在脊椎动物中，针对病毒感染的一个重要的首要防线是I型干扰素(IFN)系统。该系统经由通过IFN-α/β受体的I型IFN(IFNα和IFNβ)的病毒诱导而被激活，所述IFN-α/β受体通过JAK-STAT途径来引发信号转导。这些细胞因子通过诱导具有抗病毒活性的蛋白质(例如，2',5'-寡腺苷酸合成酶、蛋白激酶R和称为Mx蛋白的GTP酶组)的表达而在细胞中产生抗病毒状态(Goodbourn等人，(2000)Journal of General Virology81:2341-2364)。从最近研究的结果中确立了，硬骨鱼具有与哺乳动物相似的先天IFN系统(Robertsen(2006)Fish and Shellfish Immunology20:172-191;Robertsen(2008)Fish and Shellfish Immunology25:351-357)。已从不同鱼类物种中克隆出了IFN，在所述鱼类物种中包括斑马鱼(斑马鱼丹(Danio rerio))、美洲鲶鱼(斑鱼回(Ictalurus punctatus))和大西洋鲑鱼(大西洋鲑(Salmo salar))(Altmann等人，(2003)Journal of Virology77:1992-2002;Lutfalla等人，(2003)BMC Genomics4:29;Robertsen等人，(2003)Journal of Interferon and Citokine Research23:601-612;Long等人，(2006)Fish and Shellfish Immunology21:42-59)。另外，还已在各种不同的鱼类物种中鉴定出了各种不同的IFN的调节因子和JAK-STAT信号传导途径的分子，以及Mx蛋白和其他由IFN刺激的基因。还在大西洋鲑鱼中和在日本鳎(牙鲆(Paralichtys olivaceus))中证明了Mx蛋白的抗病毒活性(由Robertsen(2006)Fish and Shellfish Immunology20:172-191进行了综述)。

[0023] 尽管在甲壳类中还未找到与干扰素类似的基因，但已观察到诸如STAT(其是在脊椎动物中在对于干扰素作出应答期间被激活的分子)的分子作为对于WSSV感染的应答而被负调节。在哺乳动物中在病毒感染期间STAT的负调节拮抗I型IFN的应答(由Johnson等人，(2008)Vaccine26:4885-4992进行了综述)。在双壳类中，关于抗病毒应答的认识更为稀少。存在有一些关于在血淋巴中的抗病毒活性的证据，并且暗示了IFN类型机制的存在(Olicarda等人，(2005)Antiviral Research66(2-3):147-152;Defer等人，(2009)Aquaculture293(1-2):1-7)。

[0024] 在水产业的发展中，由于这些感染带给该生产活动的损害，令人感兴趣的是获得可以用于控制病毒感染的新的化合物或组合物。

[0025] 发明描述

[0026] 本发明通过以下述方式提供用于在水产业中控制病毒感染的新的备选方案而解决了前面提及的问题：将PACAP用于制备用于在水生生物中治疗病毒感染和由病毒引起的感染性疾病的组合物。

[0027] 在本发明的范围内，术语“治疗”是指在疾病的消退方面任何有益的效应，其包括在疾病开始后病理学发展的减弱、减少、降低或消减。

[0028] 如在本发明中所使用的，术语“抗病毒药”包括任何在文献中被定义为抗病毒药的分子，以及任何类似物、功能性衍生物或活性片段。

[0029] 如在本发明中所使用的，术语“垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)”包括以其任何一种变体(PACAP27或PACAP38)的该分子，其是分离自其天然来源的，或者是合成来源的，或者是通过重组DNA技术产生的。

[0030] 在本发明的一个实施方案中，将神经肽PACAP的变体单独地(或者与已知的具有抗病毒活性的分子相组合地)通过间隔为2-3天的浸浴应用于鱼类、甲壳类和双壳类。作为配合饲料，将PACAP以仅化合物自身或者与已知的具有抗病毒活性的分子相组合地应用于这些生物。作为主要结果，发现通过浸浴、通过注射或通过口服途径施用的制剂对于提高被病毒感染并用所述制剂进行治疗的水生生物的存活率来说是有效的。此外，还观察到这些生物的体重相比于被感染但未经治疗的生物的体重而言保持相同或者增加。此外，通过RT-PCR来进行的对于病毒感染易感的组织和器官的样品的分析证明了在被感染且经治疗的生物中病毒载量的下降。

[0031] 直至本发明为止，还没有关于PACAP是否在鱼类、甲壳类和双壳类中调节抗病毒应答以及关于所牵涉的机制的知识。在本发明中，首次在体外和在体内证明了PACAP与在鱼类、甲壳类和双壳类中的对于病毒的应答之间的关系。另外，还首次描述了PACAP对于参与抗病毒应答的分子(例如，Mx蛋白、干扰素γ(IFNγ)和TLR9(Toll-样受体9))的出人意料的正效应，以及该肽及其受体于在体外和在体内用病毒和/或poly I:C进行处理的鱼类免疫系统细胞中的差异调节。

[0032] 以前在现有技术中既未揭示也未暗示通过施用PACAP或者PACAP与已知在鱼类中具有作用的抗病毒分子的组合来在鱼类、甲壳类和双壳类中治疗病毒感染。

[0033] 在本发明的范围中，PACAP与抗病毒分子的施用可以在时间上同时地(以单一配制剂)、顺次地或分开地来进行。所述制剂通过口服途径、通过注射或通过浸浴来施用给水生生物。

[0034] 在本发明中，用PACAP和用包含与PACAP相组合的抗病毒分子的制剂来治疗鱼类、甲壳类和双壳类。出人意料地，观察到神经肽PACAP在鱼类、甲壳类和双壳类中具有抗病毒活性。另一方面，证明了PACAP与已知的具有抗病毒活性的物质的组合在体外和在体内均产生比单独的PACAP高的(协同的)抗病毒应答。在鱼类中，迄今为止还未在抗病毒应答方面给PACAP分派生物学功能。另一方面，迄今为止还未在虾类和双壳类中分离出PACAP，也未分离出其他属于肠促胰液素和胰高血糖素超家族的肽。仅仅存在有据报道的通过外源性施用重组鱼类PACAP来刺激虾类生长的实验证据(国际公开号为WO2007/059714的专利申请)。因此，直至本发明为止，还没有关于其与在甲壳类和双壳类中的对于病毒的应答的可能关系的任何知识。

[0035] 本发明的另一个目标是用于在水生生物中治疗病毒感染和由病毒引起的感染性疾病的组合物，其特征在于，该组合物包含“垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)”。在本发明的一个实施方案中，构成所述组合物的一部分的PACAP以下述方式来获得：通过从其天然来源中分离；合成地；或者，通过重组DNA技术。所述组合物通过口服途径、通过注射或通过浸浴来进行施用。在本发明的一个实施方案中，所述PACAP是源自鱼类的多肽。

[0036] 本发明还涉及兽医学组合，其特征在于，该组合包含“垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)”和抗病毒分子。在本发明的一个实施方案中，所述抗病毒分子为利巴韦林或利巴韦林的类似物。构成所述组合的一部分的组成成分即PACAP和抗病毒分子，在同一治疗过程

中同时地、分开地或顺次地进行施用。在本发明的一个实施方案中，所述组合用于在水生生物中的病毒感染和由病毒引起的感染性疾病的治疗。在这些之中，所述PACAP和所述抗病毒分子通过口服途径、通过注射或通过浸浴来进行施用。

[0037] 在本发明的一个实施方案中，在所述组合中，将所述PACAP以50-750μg/Kg饲料的浓度和将所述抗病毒分子以100-2000mg/Kg饲料的浓度作为配合饲料来进行应用。在本发明的第二个实施方案中，作为所述兽医学组合的一部分，将所述PACAP以0.1-10μg/克体重的浓度和将所述抗病毒分子以1-50μg/g体重的浓度通过注射应用于鱼类。在本发明的另一个实施方案中，在所述组合中，将所述PACAP以50-1000μg/升水的浓度和将所述抗病毒分子以100-2000μg/L水的浓度通过浸浴应用于鱼类或甲壳类。

[0038] 在本发明中，将PACAP(当作为抗病毒药进行使用时)以及所述肽与已知的抗病毒实体的组合应用于多种多样的水生生物。例如，在它们之中，包括鲑类、对虾类和双壳类。

[0039] 包含PACAP的组合物以及所述肽与抗病毒药的组合在由下列科的病毒引起的病毒感染的治疗性治疗中是有用的：疱疹病毒科、乳多空病毒科、披膜病毒科、反转录病毒科、呼肠病毒科、双RNA病毒科和小RNA病毒科。

[0040] 在本发明中，将PACAP(当作为抗病毒药进行使用时)以及所述肽与已知的抗病毒实体的组合用于控制由IPNV、VHSV和ISAV引起的感染。还在由WSSV、YHV、TSV、IHNNV和MBV引起的病毒感染的治疗性治疗中使用它们。

[0041] 用于在水产业中控制病毒感染的方法也是本发明的一部分，所述方法包括向养殖中的水生生物施用PACAP或包含PACAP的兽医学组合。

附图简述

[0042] 图1.在从开始实验起4、24和48小时之时，在用poly I:C(30μg/mL)在体外进行处理或者用IPNV(0.1的感染复数(m.o.i))进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的头肾白细胞中受体PAC-1的通过实时PCR来进行的表达分析。将白细胞培养物以两次重复进行处理，并且以三次重复通过定量PCR来分析受体PAC-1的表达水平。将数据表示为相对于组成型表达的内源基因EF1α而言的PAC-1的相对表达的平均值±平均值的标准差(SD)。*($p<0.05$)指明，PAC-1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。

[0043] 图2.在从开始实验起第1、4和8天之时，在用VHSV(0.1的m.o.i)在体外进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的巨噬细胞细胞系RTS-11中受体PAC-1的通过实时PCR来进行的表达分析。该实验以两次重复来进行，并且以三次重复通过定量PCR来分析受体PAC-1的表达水平。将数据显示为相对于组成型表达的内源基因EF1α而言的PAC-1的相对表达的平均值±平均值的标准差(SD)。*($p<0.05$)指明，PAC-1的相对表达在统计学上低于在未经处理的白细胞培养物(阴性对照)中的其相对表达。

[0044] 图3.在从开始实验起4、24和48小时之时，在用poly I:C(30μg/mL)在体外进行处理或者用VHSV(0.1的m.o.i)进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的头肾白细胞中受体VPAC-1的通过实时PCR来进行的表达分析。该实验以两次重复来进行，并且以三次重复通过定量PCR来分析受体PAC-1的表达水平。将数据显示为相对于组成型表达的内源基因EF1α而言的VPAC-1的相对表达的平均值±平均值的标准差(SD)。*($p<0.05$)指明，VPAC-1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。

[0045] 图4.在用VHSV(每条鱼100μL的$1\times10^{7}TCID_{50}$(培养物上清液的病毒滴度)/mL)在体内实验性地进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的头肾白细胞(A)和脾白细胞(B)中受体PAC-1的通过实时PCR来进行的表达分析。在病毒感染的第3、7和10天,制备五个头肾总RNA和五个脾总RNA(其相应于5条随机地从每个实验组中获取的鱼)的混合物。以三次重复通过定量PCR来分析受体PAC-1的表达水平。将数据表示为相对于组成型表达的内源基因EF1α而言的PAC-1的相对表达的平均值±平均值的标准差(SD)。*($p<0.05$)。

[0046] 图5.在用VHSV(每条鱼100μL的$1\times10^{7}TCID_{50}$/mL)在体内实验性地进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的头肾白细胞(A)和脾白细胞(B)中受体VPAC-1的通过实时PCR来进行的表达分析。在病毒感染的第3、7和10天,制备五个头肾总RNA和五个脾总RNA(其相应于5条随机地从每个实验组中获取的鱼)的混合物。以三次重复通过定量PCR来分析受体VPAC-1的表达水平。将数据表示为相对于组成型表达的内源基因EF1α而言的VPAC-1的相对表达的平均值±平均值的标准差(SD)。*($p<0.05$)。

[0047] 图6.在用VHSV(每条鱼100μL的$1\times10^{7}TCID_{50}$/mL)在体内实验性地进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的脾白细胞中PACAP的通过实时PCR来进行的表达分析。在病毒感染的第3、7和10天,制备五个脾总RNA(其相应于5条随机地从每个实验组中获取的鱼)的混合物。以三次重复通过定量PCR来分析PACAP的表达水平。将数据表示为相对于组成型表达的内源基因EF1α而言的PACAP的相对表达的平均值±平均值的标准差(SD)。*($p<0.05$)。

[0048] 图7.通过实时PCR来分析PACAP38在体外对于在健康鳟鱼的外周血白细胞(A)和头肾白细胞(B)中Mx蛋白转录的效应。在处理48小时之时,评价了浓度为10^{-10}、0^{-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EF1α而言的目的基因(Mx)的相对表达的平均值±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。

[0049] 图8.通过实时PCR来分析PACAP38在体外对于在健康鳟鱼的外周血白细胞(A)和头肾白细胞(B)中IFNγ转录的效应。在处理48小时之时,评价了浓度为10^{-10}、0^{-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EF1α而言的目的基因(IFNγ)的相对表达的平均值±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。

[0050] 图9.通过实时PCR来分析PACAP38在体外对于在健康鳟鱼的外周血白细胞(A)和头肾白细胞(B)中TLR9转录的效应。在处理48小时之时,评价了浓度为10^{-10}、0^{-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EF1α而言的目的基因(TLR9)的相对表达的平均值±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。

[0051] 图10.用于测定PACAP-利巴韦林组合(Rib-PACAP)的抗病毒活性的体外试验。在感染前24小时,将细胞用抗病毒药或PACAP-抗病毒药组合进行处理。建立了用病毒进行感染但没有抗病毒处理的细胞(C^{+})(作为阳性对照),以及未感染且未用抗病毒药进行处理的细

胞和用抗病毒药(Cn-Av)或不同剂量的PACAP进行处理的细胞(C⁻)(作为阴性对照)。将细胞用病毒接种物感染经过30分钟的吸附时间段。然后,用PBS进行洗涤,并再次添加不同的处理。通过使用结晶紫染色法(读取550nm处的吸光度)来评价致细胞病变效应(CPE)的抑制。

[0052] 实施方式/实施例的详细描述

[0053] 实施例1.在用Poly I:C和IPNV在体外进行处理的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的头肾白细胞中和在用VHSV在体外进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的巨噬细胞细胞系RTS-11中受体PAC-1的表达

[0054] 使用没有VHSV和IPNV的体重为9-12克的7月龄的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的青年体。将鱼在14℃下进行维持,其中具有水环流。每天两次随意给予食物。使病毒VHSV(毒株0771)和IPNV(毒株Sp.)在虹鳟的生殖腺细胞系RTG-2中进行繁殖(Sena和Rio(1975)Infect Immun11:815-22)。将细胞在包含100IU/mL青霉素和100μg/mL链霉素的补充有10%胎牛血清(FCS,Invitrogen)的极限必需培养基(MEM,Invitrogen,USA)中进行培养。将病毒接种于在14℃下在具有抗生素和2%FCS的MEM中生长的RTG-2细胞之中。当观察到广泛的致细胞病变效应时,收获培养物上清液并进行离心以去除细胞碎片。为了进行实验,使用经澄清的培养物上清液。根据由Reed和Muench(Reed和Muench(1998)J Hyg27:280-9)所报道的,在96-孔平板中测定病毒滴度。

[0055] 根据由Graham和Secombes(Graham和Secombes(1998)Immunology65:293-7)所描述的方法,从4条鳟鱼中分离头肾白细胞。简而言之,无菌地取出头肾,并使其通过100μm的尼龙网,其中使用补充有青霉素(100IU/mL)、链霉素(100μg/mL)、肝素(10个单位/mL)和2%FCS的Leibovitz培养基(L-15,Gibco,UK)。将得到的细胞悬浮液小心地置于51%的Percoll梯度上。小心地抽取相应于白细胞的细胞环,并在包含0.1%FCS的L-15中洗涤两次。将细胞以5×10^6个细胞/mL的浓度重悬浮在具有5%FCS的L-15中,并且以1mL/孔分配在24-孔平板中。将白细胞暴露于30μg/mL的poly I:C(Sigma)或者将其用m.o.i为0.1的IPNV进行感染,并且在14℃下温育4小时、24小时和48小时。

[0056] 最后,通过由Chomczynski和Sacchi(Chomczynski和Sacchi(1987)Anal.Biochem.162:156-9)所描述的方法来纯化白细胞培养物的总RNA,以评价在未经处理的和用poly I:C进行处理或用病毒进行感染的白细胞中受体PAC-1的表达水平。用脱氧核糖核酸(DNA)的核酸酶,特别是用RQ1无RNA酶的DNA酶(Promega)处理样品,目的是去除可能存在于样品中的基因组DNA。为了合成互补DNA(cDNA),使用一套采用反转录酶SuperScript III(Invitrogen)的商业试剂。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(特别是针对延伸因子1α(EF1α))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Ct值减去标准化者基因(EF1α)的Ct值所得的余额。

[0057] 作为结果,获得在该实验的4、24和48小时之时,PAC-1的水平在用poly I:C进行处理的白细胞培养物中过表达,这暗示受体PAC-1参与在鱼类中对于病毒的应答,其中考虑到poly I:C是由于在结构上与双链RNA相同而产生与病毒感染相似的效应(许多病毒具有RNA基因组)的分子。在图1中可观察到这些结果。poly I:C与在B细胞和树突细胞的细胞内区室中表达的Toll型受体-3(TLR3)相互作用。在自然界中,TLR-3由病毒来刺激。

[0058] 另一方面,在感染后4、24和48小时之时,PAC-1的表达水平从在未经处理的白细胞

培养物中的可检测值到在用IPNV进行感染的白细胞培养物中的不可检测值，这确认了特异性地结合PACAP的该受体参与了在鱼类中的抗病毒应答(图1)。在病毒模拟物poly I:C的效应和IPNV的效应之间所观察到的差异可能与在被感染的细胞中病毒的特殊效应(很可能有利于其)相关。

[0059] 另外，还评价了在用VHSV进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的巨噬细胞细胞系RTS-11中PAC-1的表达水平，细胞系RTS-11的病毒感染过程与在前面对于细胞系RTG-2所描述的相似。同样地，在用VHSV进行感染后第4和8天，观察到PAC-1的表达水平的负调节(图2)。

[0060] 实施例2.在用Poly I:C和VHSV在体外进行处理的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的头肾白细胞中受体VPAC-1的表达

[0061] 为了评价受体VPAC-1的表达水平，施行与在实施例1中所描述的相同的实验设计。

[0062] 作为结果，获得在该实验的4、24和48小时之时，VPAC-1的水平在用poly I:C进行处理的白细胞培养物中过表达，这暗示受体VPAC-1如PAC-1那样，参与在鱼类中对于病毒的应答，其中考虑到polyI:C被认为是病毒模拟分子(图3)。

[0063] 另一方面，在感染后4、24和48小时之时，VPAC-1的表达水平在用VHSV进行感染的白细胞培养物中是不可检测的，这确认了以相同亲和力结合VIP和PACAP的该受体参与了在鱼类中的抗病毒应答(图3)。

[0064] 如对于在用IPNV进行感染的头肾白细胞的培养物中的受体PAC-1所观察到的一样，在通过用poly I:C在体外对白细胞进行处理和通过用VHSV进行感染而发生的VPAC-1的调节中所观察到的差异可能与在被感染的细胞中作为完整生物学实体的病毒的特殊效应(很可能有利于其)相关。

[0065] 实施例3.在用VHSV在体内进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的脾和头肾的白细胞中PACAP以及受体PAC-1和VPAC-1的表达

[0066] 使VHSV(毒株0771)在RTG-2细胞系中进行繁殖(Sena和Rio(1975)Infect Immun11:815-22)。简而言之，将病毒接种于在14℃下在具有抗生素(100IU/mL青霉素和100μg/mL链霉素)和2%FCS的MEM中生长的RTG-2细胞系之中。当观察到广泛的致细胞病变效应时，收获培养物上清液并进行离心以去除细胞碎片。为了进行鳟鱼的感染，使用经澄清的培养物上清液。根据由Reed和Muench(Reed和Muench(1998)J Hyg27:280-9)所报道的，在96-孔平板中测定病毒滴度。

[0067] 使用没有VHSV和IPNV的体重为9-12克的7月龄的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的青年体。将鱼在14℃下进行维持，其中具有水环流。每天两次随意给予食物。制定两个实验组，每组20条鳟鱼，其中一组注射以病毒溶液(每条鱼100μL的$1\times10^{7}TCID_{50}/mL$)，和另一组(用作阴性对照)注射以未用VHSV进行感染的RTG-2的培养基。

[0068] 在感染后第1、3、7和10天，随机地获取5条鳟鱼并通过过量暴露于麻醉剂MS-22来处死。然后，取出头肾和脾以进行这些器官的总RNA的纯化，根据由Chomczynski和Sacchi(Chomczynski和Sacchi(1987)Anal.Biochem.162:156-9)所描述的方法。cDNA的合成和定量PCR反应如在实施例1中描述的那样来进行。

[0069] 关于反转录(RT)反应，制备每个所选择的器官的五个总RNA(其相应于在该实验的第1、3、7和10天随机地获取的每个实验组的五个个体)的混合物。

[0070] 作为结果，获得在脾中在注射后第3天，受体PAC-1和VPAC-1相对于阴性对照而言

过表达。在注射后第10天，表达水平低于对照组。在头肾中，受体PAC-1和VPAC-1在第1和3天具有低于对照组的表达水平，VPAC-1的值在第10天是不可检测的。在第7天，相对于阴性对照组而言，这两种受体均增加了其表达水平。还观察到，这两种受体在病毒感染后的时间中具有相似的表达模式(图4和5)。

[0071] PACAP的表达值在第1天低于其阴性对照，并且在第7天高于其阴性对照。这些结果与其两种受体PAC-1和VPAC-1的结果相关，在受体的表达水平显示出低于(在第1天)和高于(在第7天)阴性对照组的倾向的意义上。在第10天，PACAP的表达值低于阴性对照组(图4、5和6)。

[0072] 在用VHSV和IPNV实验性地进行感染的鱼的脾和头肾中PACAP及其受体PAC-1和VPAC-1的表达水平的变化证明了这两种受体均在体内参与了在鱼类中的抗病毒应答。这在攻击实验中得到确证，其中观察到PACAP在鲑类中在抗病毒应答中的正效应，这通过提高被感染的鱼的存活率，增强对于病毒感染的免疫应答，和清除对于病毒感染易感的器官和流体中的病毒来达到。

[0073] 实施例4.PACAP对于在健康虹鳟(裂喉大麻哈鱼)的外周血和头肾的白细胞中Mx蛋白、IFNγ和TLR9的转录的效应

[0074] 使用没有VHSV和IPNV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。

[0075] 根据由Graham和Secombes(Graham和Secombes(1998)Immunology65:293-7)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。

[0076] 将每条鱼的外周血在补充有青霉素(100IU/mL)、链霉素(100μg/mL)、肝素(10个单位/mL)和2%FCS的Leibovitz培养基(L-15,Gibco,UK)中稀释4倍，并小心地置于51%的Percoll梯度上。小心地抽取相应于白细胞的细胞环，并在包含0.1%FCS的L-15中洗涤两次。

[0077] 使头肾通过100μm的尼龙网，其中使用补充有青霉素(100IU/mL)、链霉素(100μg/mL)、肝素(10个单位/mL)和2%FCS的Leibovitz培养基(L-15,Gibco,UK)。使得到的细胞悬浮液在相同的经补充的L-15培养基中进行1:4稀释，并小心地置于51%的Percoll梯度上。小心地抽取相应于白细胞的细胞环，并在包含0.1%FCS的L-15中洗涤两次。

[0078] 将细胞以5×10^{6}个细胞/mL的浓度重悬浮在具有5%FCS的L-15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个剂量的通过化学合成获得的尖齿胡鲇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作为阴性对照。

[0079] 在处理后48小时，评价Mx、IFNγ和TLR9的水平。为此，在前面提及的时间处，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RNA，通过由Chomczynski和Sacchi(Chomczynski和Sacchi(1987)Anal.Biochem.162:156-9)所描述的方法。

[0080] 考虑到为扩增Mx、IFNγ和TLR9而设计的引物在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。

[0081] 为了合成cDNA，使用一套采用反转录酶SuperScript III(Invitrogen)的商业试剂。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(特别是针对延伸因子1α(EF1α))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Ct值减去标准化者基因(EF1α)的Ct值所得的余额。

[0082] 在用10^{-10}M的PACAP38进行处理的外周血白细胞培养物中,Mx蛋白的水平在处理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Mx蛋白的转录的刺激效应,但检测到的表达水平低于用10^{-10}M的剂量所获得的水平。在10^{-8}M的剂量下,相对于阴性对照而言,在Mx蛋白的表达水平方面没有差异。这些结果显示了以在10^{-9}-10^{-10}M的范围内的低浓度,PACAP38对于Mx蛋白的转录的正效应(图7A)。在头肾白细胞中,PACAP38对于Mx蛋白的效应比在外周血白细胞中更温和,其中在10^{-9}M的剂量下观察到刺激效应(图7B)。

[0083] 另外,观察到PACAP38对于TLR9的表达的刺激效应,从在未用PACAP进行刺激的外周血白细胞培养物中TLR9的不可检测值到在用10^{-10}-10^{-8}M范围内的PACAP38进行刺激的培养物中的可检测值。在10^{-10}M的剂量下获得最高的值(图8A)。在头肾白细胞中,如关于Mx蛋白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TLR9的表达水平(图8B)。

[0084] IFNγ的水平从在阴性对照外周血白细胞培养物中的不可检测值到在用3个剂量的PACAP38进行处理的培养物中的可检测值,其中在10^{-9}M的中间剂量下获得最高的表达水平(图9A)。另一方面,观察到PACAP38在头肾白细胞培养物中刺激IFNγ的转录。在10^{-9}-10^{-8}M的剂量下,IFNγ的表达水平在统计学上高于对照组,其中在10^{-8}M的最高剂量下获得最好的结果(图9B)。

[0085] 实施例5.与利巴韦林相组合的PACAP的施用对于IPNV的体外效应

[0086] 作为分离的病毒,使用从细胞培养物获得的IPNV的上清液(ATCC VR-299毒株)。病毒确认通过特异的PCR来进行。使用细胞系CHSE-214(大鳞大麻哈鱼胚胎)(ECACC No.00/F/031)。将其在18℃下在补充有Eagle盐、10%胎牛血清(FBS)、2mM谷氨酰胺和抗生素的MEM培养基中进行维持。

[0087] 使接种物在15℃和2%FBS下进行生长,并且在试验之前通过Reed和Muench(Reed和Muench(1938)The American Journal of Hygiene27:493-497)的技术测定滴度,其中测定培养物上清液的病毒滴度($TCID_{50}$)。从病毒接种物制备0.1m.o.i.的稀释物用于该试验。制备用CHSE-214接种的96-孔平板,所述CHSE-214在18℃下在补充有10%FBS、2mM谷氨酰胺和抗生素的MEM(具有Eagle盐)中进行维持。评价了不同浓度的利巴韦林和3种不同浓度的PACAP(0.1、1和10mM)。在感染前24小时,将细胞用抗病毒药或PACAP-抗病毒药组合进行处理,其中建立了阳性对照(用病毒进行感染但没有抗病毒处理的细胞)和阴性对照(未感染且未用抗病毒药进行处理的细胞,和用抗病毒药或不同剂量的PACAP进行处理但未感染的细胞)。将细胞用病毒接种物感染经过30分钟的吸附时间段。然后,用PBS进行洗涤,并再次添加在补充有2%FBS和抗生素的MEM中进行稀释的不同处理。一旦在阳性对照中观察到致细胞病变效应(CPE),就结束该试验。通过显微术和结晶紫染色(读取550nm处的吸光度)来进行评价。在感染后3天在阳性对照中观察到CPE,因此认为该试验结束。将从结晶紫染色的吸光度值获得的相对于被感染且未经处理的对照而言的CPE的抑制结果显示在图10中。通过使用用于Windows的Calcusyn程序(Biosoft)来进行与PACAP相组合的利巴韦林的抗病毒活性的分析。关于所测试的浓度值,所获得的Chou联合指数(combination index)的值显示了

这两种药物之间的协同作用。

[0088] 实施例6.向用IPNV实验性地进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)施用PACAP和PACAP+利巴韦林组合的效应

[0089] 进行实验以评价向用IPNV实验性地进行感染的虹鳟施用PACAP和PACAP-利巴韦林组合的效应。制定8个具有50条鱼(每条1.6±0.4g)的实验组,并将其在10-12℃的水中进行维持:

[0090] 组1:未暴露于病毒的、未经治疗的鱼;

[0091] 组2:暴露于病毒的、未经治疗的鱼;

[0092] 组3:暴露于病毒的、以400μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组;

[0093] 组4:暴露于病毒的、以800μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组;

[0094] 组5:暴露于病毒的、以100μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0095] 组6:暴露于病毒的、以200μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0096] 组7:暴露于病毒的、用组合1(400μg/L利巴韦林-100μg/L PACAP)进行治疗的组;

[0097] 组8:暴露于病毒的、用组合2(800μg/L利巴韦林-200μg/L PACAP)进行治疗的组。

[0098] 以等价于3%的总生物量/组的饲料量,一天两次对鱼进行饲喂。通过将其置于包含大约10^5个噬斑形成单位(pfu)/mL的IPNV(ATCC VR-299毒株)的处于10-12℃的水中2小时来使鱼暴露于病毒。使组1和组2的鱼经历没有抗病毒化合物或PACAP-抗病毒药组合的相同的治疗压力。使组1的鱼经历相同的过程,其中用细胞培养基代替病毒。从肾和脾开始通过RT-PCR来进行病毒的鉴定,按照由López-Lastra等人,(1994)Journal of Fish Diseases17:269-282所描述的方法。用PACAP或PACAP-抗病毒药组合进行的治疗在20天期间每周进行3次。第一次在病毒感染后2小时进行。在治疗的20天和此后的25天的时间段期间进行实验观察。在该实验的45天期间,记录鱼的死亡和异常行为。

[0099] 作为实验结果,观察到用IPNV进行感染且未经治疗的鱼从感染后第6天开始显示出传染性胰腺坏死的特征性的征候。第一例死亡出现在感染后第7天,伴随着在所有鱼中疾病征候的加重和高的死亡率(在感染后第11、12和13天)。在被感染并用利巴韦林或PACAP进行治疗的鱼中,在第8天检测到疾病的征候。用利巴韦林-PACAP组合进行治疗并暴露于病毒的组在实验进行的时间期间未记录到疾病征候。未经治疗且未感染的鱼在感染后第15天恢复食欲。用抗病毒药进行治疗的鱼在第13天恢复食欲,而用PACAP和PACAP-利巴韦林组合进行治疗的鱼在实验的第9天产生食欲。在实验进行的时间期间,未感染的对照鱼显示出正常行为,并且在该组中未记录到死亡率。在未经治疗并用IPNV进行感染的鱼中累积死亡率为总共50条鱼中的40条鱼(20%的存活率)。在用利巴韦林进行治疗且被感染的鱼中,对于组3和组4,存活率分别为68%和70%。在用PACAP进行治疗且被感染的鱼中,对于组5和组6,存活率分别为50%和55%。在用PACAP-利巴韦林组合进行治疗的组中,存活率在组7和组8中分别为97%和99%。在死亡的鱼的组织样品中检测到IPNV的存在。在取自未经治疗的组和未感染的组的样品中未检测到该病毒。

[0100] 在表1中,显示了在感染后45天之时的平均重量。被感染且未经治疗的鱼具有相比于未感染的鱼而言更少的体重增益。该体重减轻在经治疗的组中和以更大程度在用PACAP-利巴韦林组合进行治疗的组中得到补偿。

[0101] 表1.在感染后45天期间虹鳟鱼苗的体重增加

[0102]

实验组	初始重量（g）	最终重量（g）	相对于初始重量而言的增加（%）
1	1.6±0.4	4.5±1.1 [a]	181
2	1.6±0.4	2.7±1.2 [b]	69
3	1.6±0.4	3.8±1.1 [c]	137
4	1.6±0.4	3.7±1.0 [c]	131
5	1.6±0.4	5.0±0.5 [d]	212
6	1.6±0.4	5.2±0.6 [d]	225
7	1.6±0.4	5.5±0.4 [d]	343
8	1.6±0.4	5.6±0.5 [d]	350

[0103] 进行ANOVA，随后为Tukey后验检验。不同的字母表示在统计学上显著的差异。

[0104] 实施例7.向用IPNV实验性地进行感染的虹鳟（裂喉大麻哈鱼）施用在聚乳酸-乙醇酸共聚物中配制的PACAP和PACAP+利巴韦林组合的效应

[0105] 进行实验以评价向用IPNV实验性地进行感染的虹鳟施用在聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)(Sigma)中配制的PACAP和PACAP-利巴韦林组合的效应。制定8个具有30条鱼（每条30±4g)的实验组，并将其在10-12℃的水中进行维持：

[0106] 组1：未暴露于病毒的、用PLGA进行注射的鱼；

[0107] 组2：暴露于病毒的、用PLGA进行注射的鱼；

[0108] 组3：暴露于病毒的、以4μg/g水的剂量用利巴韦林进行注射的组；

[0109] 组4：暴露于病毒的、以8μg/g水的剂量用利巴韦林进行注射的组；

[0110] 组5：暴露于病毒的、以0.1μg/g水的剂量用PACAP进行注射的组；

[0111] 组6：暴露于病毒的、以0.2μg/g水的剂量用PACAP进行注射的组；

[0112] 组7：暴露于病毒的、用组合1(4μg/g利巴韦林-0.1μg/g PACAP)进行注射的组；

[0113] 组8：暴露于病毒的、用组合2(8μg/g利巴韦林-0.2μg/g PACAP)进行注射的组。

[0114] 通过在病毒感染后2小时进行腹膜内注射来施用包含PACAP或PACAP+利巴韦林组合的纳米颗粒。在30天期间进行实验观察。获得了与在实施例6中所描述的那些相似的存活率结果。

[0115] 实施例8.向用IPNV实验性地进行感染的大西洋鲑鱼（大西洋鲑）施用PACAP和PACAP+利巴韦林组合的效应

[0116] 进行实验以评价向用IPNV实验性地进行感染的鲑鱼（大西洋鲑）施用PACAP和PACAP-利巴韦林组合的效应。制定8个具有50条鱼（每条1.2±0.3g)的实验组，并将其在10-12℃的水中进行维持：

[0117] 组1：未暴露于病毒的、未经治疗的鱼；

[0118] 组2：暴露于病毒的、未经治疗的鱼；

[0119] 组3：暴露于病毒的、以400μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组；

[0120] 组4：暴露于病毒的、以800μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组；

[0121] 组5：暴露于病毒的、以100μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组；

[0122] 组6:暴露于病毒的、以200μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0123] 组7:暴露于病毒的、用400μg/L利巴韦林-100μg/L PACAP组合进行治疗的组;

[0124] 组8:暴露于病毒的、用800μg/L利巴韦林-200μg/L PACAP组合进行治疗的组。

[0125] 以等价于3%的总生物量/组的饲料量,一天两次对鱼进行饲喂。通过将其置于包含大约10^5pfu/mL的IPNV(ATCC VR-299毒株)的处于10-12℃的水中2小时来使鱼暴露于病毒。治疗在20天期间每周进行3次。在该时间段和治疗后的25天期间进行实验观察。在该实验的45天期间,记录鱼的死亡和异常行为。使组1和组2的鱼经历没有抗病毒化合物或PACAP-抗病毒药组合的相同的治疗压力。使组1的鱼经历相同的过程,其中用细胞培养基代替病毒。从肾和脾开始通过RT-PCR来进行病毒的鉴定,按照由López-Lastra等人,(1994)Journal of Fish Diseases17:269-282所描述的方法。

[0126] 作为实验结果,观察到用IPNV进行感染且未经治疗的鱼从感染后第6天开始显示出传染性胰腺坏死的特征性的征候。第一例死亡出现在感染后第8天,伴随着在所有鱼中疾病征候的加重和高的死亡率(在感染后第11-15天)。在该组中存活率百分比为30%。在第10和11天在所有用病毒进行感染的组中都观察到食欲丧失,除了用PACAP、PACAP-利巴韦林组合进行治疗的组和未感染的组之外。在被感染并用所述两种剂量的利巴林韦进行治疗的鱼中,在第10天检测到疾病的初期征候,并且对于较小剂量和较大剂量分别记录到70%和76%的存活率。在被感染并用PACAP进行治疗的鱼中,对于较小剂量和较大剂量分别记录到56%和60%的存活率。在用利巴韦林-PACAP组合进行治疗并暴露于病毒的组中记录到96%和98%的存活率。在未感染且未经治疗的组中,存活率百分比为98%。在死亡的鱼的组织样品中检测到IPNV的存在。

[0127] 在表2中,显示了在感染后45天之时的平均重量。被感染且未经治疗的鱼具有相比于未感染的鱼而言更少的体重增益。该体重减轻在经治疗的组中和以更大程度在用PACAP和用PACAP-利巴韦林组合进行治疗的组中得到补偿。

[0128] 表2.在感染后45天期间大西洋鲑鱼鱼苗的体重增加

[0129]

实验组	初始体重(g)	最终体重(g)	增加(%)
1	1.2±0.3	2.5±0.8 [a]	108
2	1.2±0.3	2.0±0.4 [b]	67
3	1.2±0.3	2.2±0.4 [c]	83
4	1.2±0.3	2.3±0.5 [c]	92
5	1.2±0.3	2.4±0.3 [a]	200
6	1.2±0.3	2.8±0.3	233
7	1.2±0.3	3.1±0.2	258
8	1.2±0.3	3.4±0.1	283

[0130] 进行ANOVA,随后为Tukey后验检验。不同的字母表示在统计学上显著的差异。

[0131] 实施例9.向用ISAV实验性地进行感染的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)施用PACAP和PACAP+利巴韦林组合的效应

[0132] 进行实验以评价向用ISAV实验性地进行感染的鲑鱼(大西洋鲑)施用PACAP和PACAP-利巴韦林组合的效应。制定8个具有25条鱼(每条50±10g)的实验组,并将其在10-12℃的海水中进行维持:

[0133] 组1:未暴露于ISA病毒的、未经治疗的鱼;

[0134] 组2:暴露于ISA病毒的、未经治疗的鱼;

[0135] 组3:暴露于病毒的、以400μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组;

[0136] 组4:暴露于病毒的、以800μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组;

[0137] 组5:暴露于病毒的、以100μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0138] 组6:暴露于病毒的、以200μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0139] 组7:暴露于病毒的、用400μg/L利巴韦林-100μg/L PACAP组合进行治疗的组;

[0140] 组8:暴露于病毒的、用800μg/L利巴韦林-200μg/L PACAP组合进行治疗的组。

[0141] 为了获得足够的病毒用于攻击实验,将用毒株Glesvaer(登录号AJ012285,Krossøy等人,(1999)Journal of Virology73:2136-2142)进行感染的SHK-1细胞在175cm^2的瓶中培养5天。

[0142] 将鱼通过与用0.3mL的包含大约10^4pfu/mL的ISAV的培养基以腹膜内方式进行注射的鱼共处生活而暴露于病毒。组1的鱼接受相同体积的培养基。在组1(未暴露于ISA病毒、未经治疗)中死亡率的%为4%,和在组2(暴露于病毒、未经治疗)中死亡率的%为92%。在组3和组4中,死亡率分别为52%和36%;而在组5和组6中,死亡率分别为60%和72%。在用PACAP-利巴韦林组合进行治疗的组7和组8中,死亡率的%分别为8%和4%。在死亡的鱼的组织样品中检测到ISAV的存在。在取自未经治疗和未感染的组的样品中未检测到该病毒。

[0143] 实施例10.向用IHNV实验性地进行感染的虹鳟(裂喉大麻哈鱼)施用PACAP和PACAP+金刚烷胺组合的效应

[0144] 进行实验以评价向用IHNV实验性地进行感染的虹鳟施用PACAP和PACAP-金刚烷胺组合的效应。制定8个具有50条鱼(每条50±5g)的实验组,并将其在10-12℃的水中进行维持:

[0145] 组1:未暴露于病毒的、未经治疗的鱼;

[0146] 组2:暴露于病毒的、未经治疗的鱼;

[0147] 组3:暴露于病毒的、以400μg/L水的剂量用金刚烷胺进行治疗的组;

[0148] 组4:暴露于病毒的、以800μg/L水的剂量用金刚烷胺进行治疗的组;

[0149] 组5:暴露于病毒的、以100μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0150] 组6:暴露于病毒的、以200μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0151] 组7:暴露于病毒的、用组合1(400μg/L金刚烷胺-100μg/L PACAP)进行治疗的组;

[0152] 组8:暴露于病毒的、用组合2(800μg/L金刚烷胺-200μg/L PACAP)进行治疗的组。

[0153] 实验条件与在前面的实施例中所描述的实验相似。通过用5.9×10^3pfu/ml的病毒在20L具有通气的水中浸没1小时来对鱼进行攻击。作为实验结果,获得未经治疗并用IHNV进行感染的鱼的26%的存活率。在用金刚烷胺进行治疗且被感染的鱼中,存活率为46%。在用PACAP进行治疗且被感染的鱼中,存活率为36%。在用PACAP-金刚烷胺组合进行治疗的组中,存活率为96%和98%。

[0154] 实施例11.向用白斑综合征病毒(WSSV)实验性地进行感染的太平洋白虾(凡纳滨

对虾(Litopenaeus vannamei))施用PACAP和PACAP+利巴韦林组合的效应

[0155] 进行实验以评价向用WSSV实验性地进行感染的太平洋白虾(凡纳滨对虾)施用PACAP和PACAP-利巴韦林组合的效应。制定4个具有50只虾(每只5±0.5g)的实验组,并将其在28℃的海水中进行维持:

[0156] 以等价于8%的总生物量/组的食物量,一天两次对虾进行饲喂。实验组为下列那些:

[0157] 组1:未暴露于病毒WSSV、未经治疗;

[0158] 组2:暴露于病毒WSSV、未经治疗;

[0159] 组3:暴露于病毒WSSV、用利巴韦林进行治疗;

[0160] 组4:暴露于病毒WSSV、用PACAP进行治疗;

[0161] 组5:暴露于病毒WSSV、用利巴韦林-PACAP组合进行治疗。

[0162] 为了进行病毒的分离和繁殖,使用利莫斯螯虾(Orconectes limosus)这种螯虾。通过在蔗糖梯度中进行离心,从刚抽取的血淋巴中纯化WSSV,如由Van Hulten等人在2001年所描述的那样(Van Hulten等人,(2001)Virology285:228-33)。将病毒样品储存于-80℃直至使用。

[0163] 为了使WSSV感染的天然途径最小化和达到可重复的实验方案,使用浸没方式以引起实验性病毒感染。在病毒感染之前,进行病毒滴度测定,并确定对于引起75%的死亡率来说所需要的量。为此,将虾用不同稀释度的病毒实验性地进行感染经过7小时的温育时间段。

[0164] 在病毒感染之后,将虾用没有病毒的海水进行清洗,并放置在新的容器中以用于根据上面所描述的实验组的设计来进行实验。

[0165] 在感染后,在30天期间每周3次,通过以单独的(500μg/L水)或与PACAP相组合的抗病毒药的剂量进行浸浴来实施治疗。在用PACAP和用利巴韦林-PACAP组合进行治疗的组的情况下,使用200μg/L水的PACAP的剂量。使组1和组2的虾经历相同的治疗压力。在该实验的30天期间,记录每个实验组中的死亡。

[0166] 在组2(暴露于病毒、未经治疗)中,死亡率的%为60%;在组1(未暴露于病毒、未经治疗)中,死亡率的%为0%;在组3(暴露于病毒、用利巴韦林进行治疗)中,死亡率为16%;而在用PACAP进行治疗的组中,死亡率为26%。在PACAP-利巴韦林组合进行治疗的组中,死亡率的%为2%。在死亡的虾的组织样品中,通过RT-PCR检测到WSSV的存在。

[0167] 实施例12.向用IPNV实验性地进行感染的欧洲大扇贝(Pecten maximus)这一物种的大牡蛎施用PACAP和PACAP+利巴韦林组合的效应

[0168] 进行实验以评价向用IPNV实验性地进行感染的欧洲大扇贝这一物种的大牡蛎施用PACAP和PACAP-利巴韦林组合的效应。制定8个实验组(每组30只成年大牡蛎),并将其在10℃的温度下在250L的具有经过滤的海水流的水族池中进行维持。在实验开始前收集的肝胰脏的样品中未检测到病毒。实验组为:

[0169] 组1:未暴露于病毒、未经治疗;

[0170] 组2:暴露于病毒、未经治疗;

[0171] 组3:暴露于病毒的、以400μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组;

[0172] 组4:暴露于病毒的、以800μg/L水的剂量用利巴韦林进行治疗的组;

[0173] 组5:暴露于病毒的、以100μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0174] 组6:暴露于病毒的、以200μg/L水的剂量用PACAP进行治疗的组;

[0175] 组7:暴露于病毒的、用组合1(400μg/L利巴韦林-100μg/L PACAP)进行治疗的组;

[0176] 组8:暴露于病毒的、用组合2(800μg/L利巴韦林-200μg/L PACAP)进行治疗的组。

[0177] 治疗在20天期间每周进行3次。通过在80L的水族池中暴露于25L的包含$10^{7}TCID_{50}mL^{-1}$的水来对大牡蛎进行攻击。6小时后,以1L/分钟的缓慢流动开始水的更换,并在12小时之时使流动增加至3L/分钟。

[0178] 在攻击后两周,获取肝胰脏样品并测定病毒滴度。结果显示出在用利巴韦林和PACAP进行治疗的动物中病毒载量的下降。该下降在用该组合进行治疗的组中是更大的(表3)。

[0179] 表3.在攻击后两周,在大牡蛎的肝胰脏中IPNV的平均病毒滴度($log_{10}TCID50g^{-1}$)。不同的字母指明了在统计学上显著的差异。

[0180]

组	病毒滴度
1	0
2	8.1^{a}
3	5.4^{b}
4	4.3^{b}
5	6.5^{c}
6	5.8^{c}
7	2.0^{d}
8	1.5^{d}

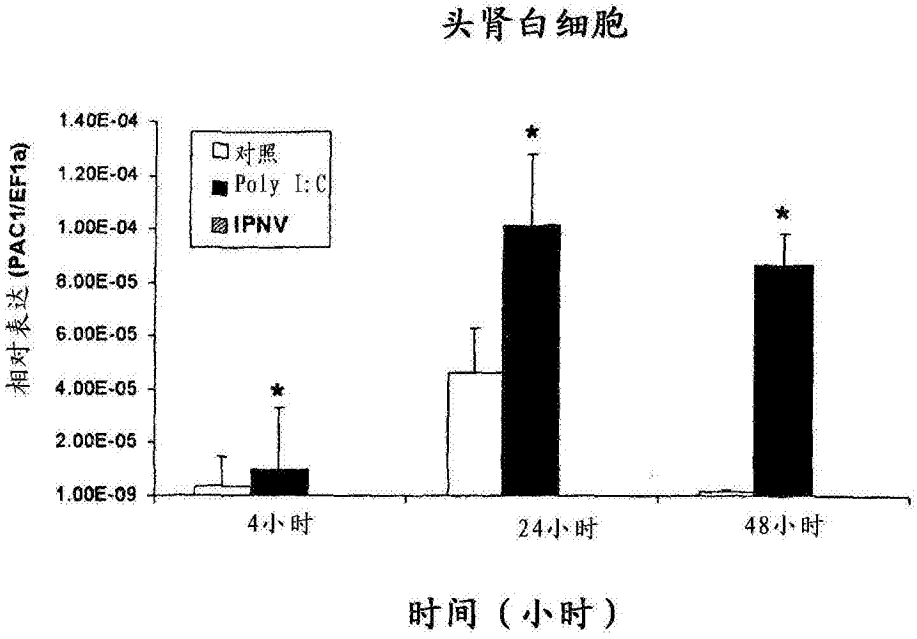

头肾白细胞
1.40E-04
1.20E-04
1.00E-04
8.00E-05
6.00E-05
4.00E-05
2.00E-05
1.00E-09
相对表达 (PAC1/EF1a)
对照
Poly I:C
IPNV
*
*
*
4小时
24小时
48小时
时间（小时）

图1

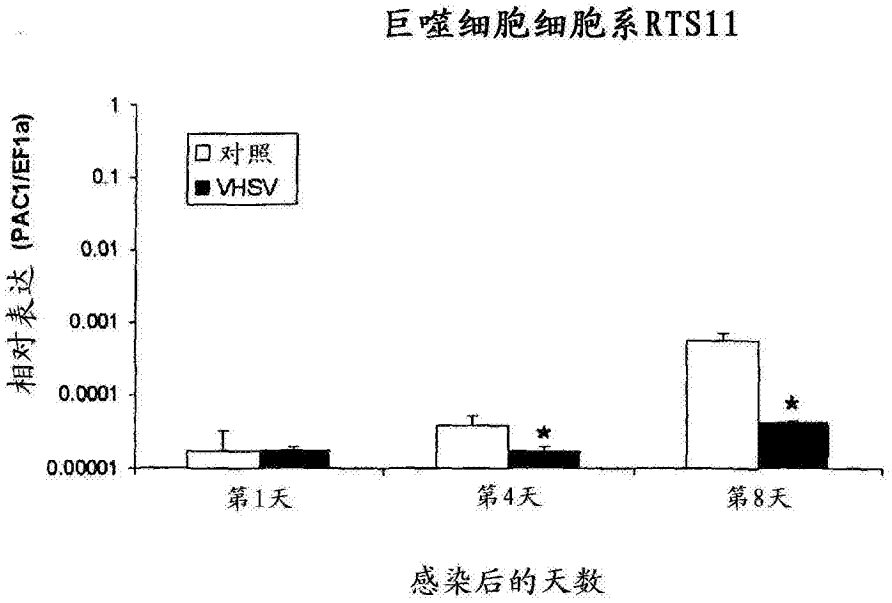

巨噬细胞细胞系RTS11
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
相对表达 (PAC1/EF1a)
对照
VHSV
*
*
第1天
第4天
第8天
感染后的天数

图2

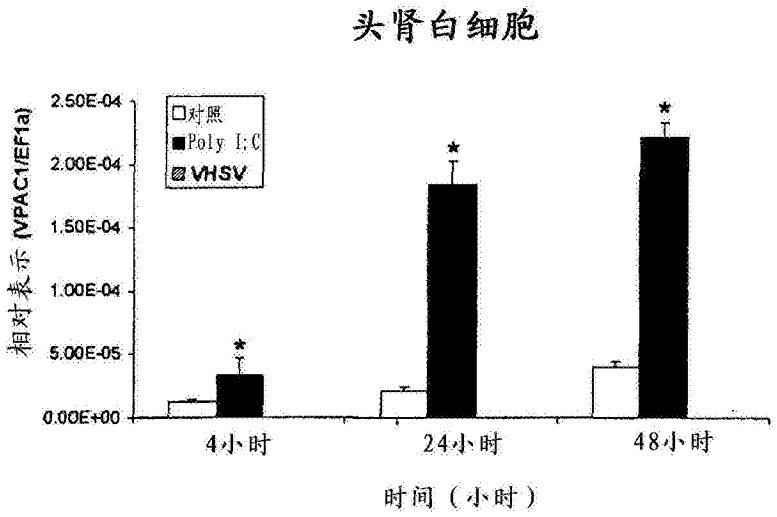

头肾白细胞
2.50E-04
2.00E-04
1.50E-04
1.00E-04
5.00E-05
0.00E+00
相对表示 (VPAC1/EF1a)
□对照
■Poly I:C
▨VHSV
*
4小时
24小时
48小时
时间（小时）

图3

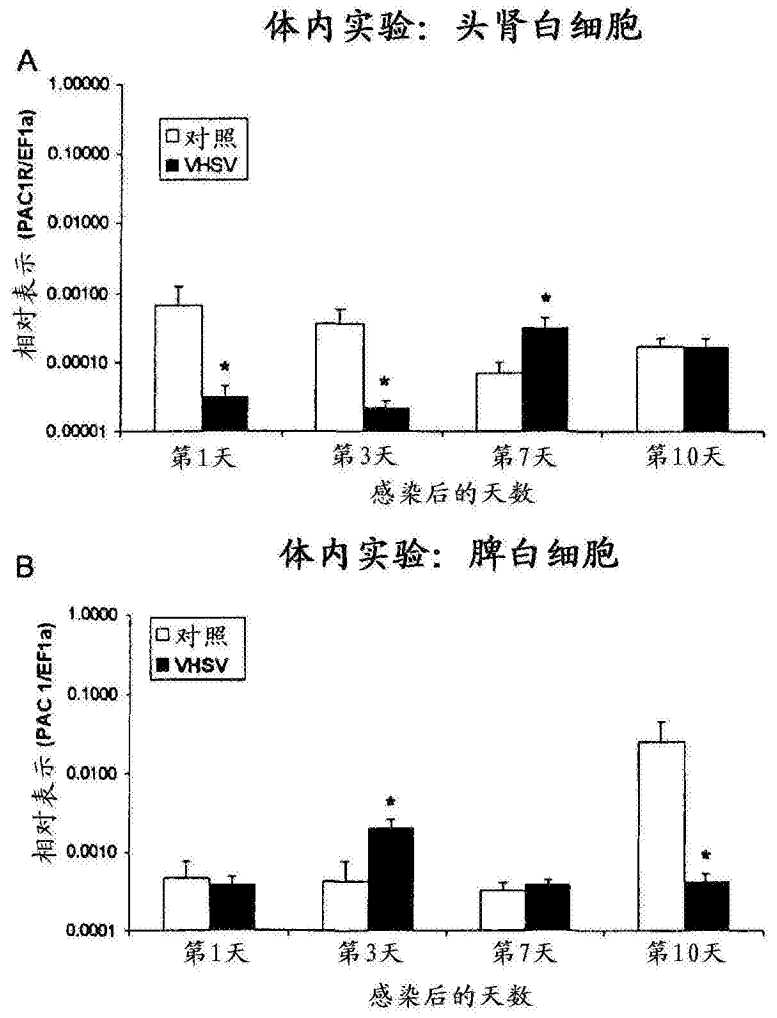

体内实验：头肾白细胞
A
1.00000
0.10000
0.01000
0.00100
0.00010
0.00001
相对表示 (PAC1R/EF1a)
□对照
■VHSV
*
第1天
第3天
第7天
第10天
感染后的天数
体内实验：脾白细胞
B
1.0000
0.1000
0.0100
0.0010
0.0001
相对表示 (PAC 1/EF1a)
□对照
■VHSV
*
第1天
第3天
第7天
第10天
感染后的天数

图4

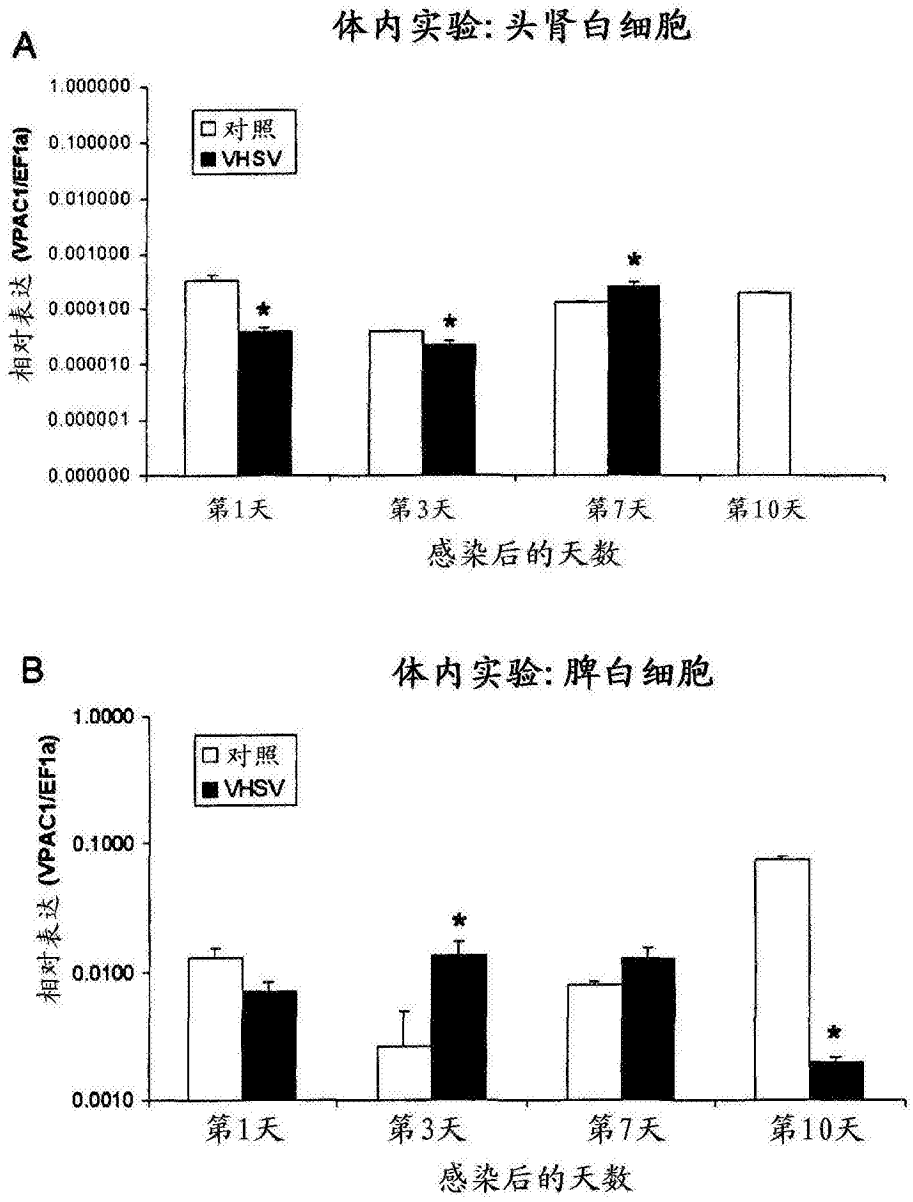

A
体内实验: 头肾白细胞
1.000000
0.100000
0.010000
0.001000
0.000100
0.000010
0.000001
0.000000
相对表达 (VPAC1/EF1a)
对照
VHSV
*
第1天
第3天
第7天
第10天
感染后的天数
B
体内实验: 脾白细胞
1.0000
0.1000
0.0100
0.0010
相对表达 (VPAC1/EF1a)
对照
VHSV
*
第1天
第3天
第7天
第10天
感染后的天数

图5

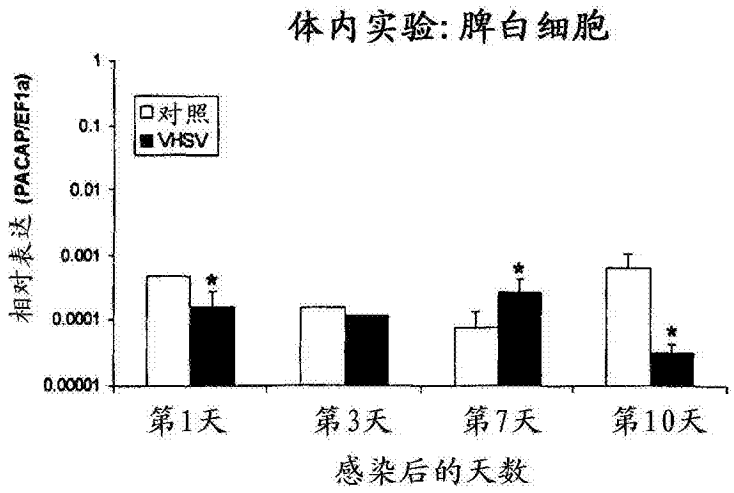

体内实验: 脾白细胞
相对表达 (PACAP/EF1a)
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
对照
VHSV
第1天
第3天
第7天
第10天
感染后的天数

图6

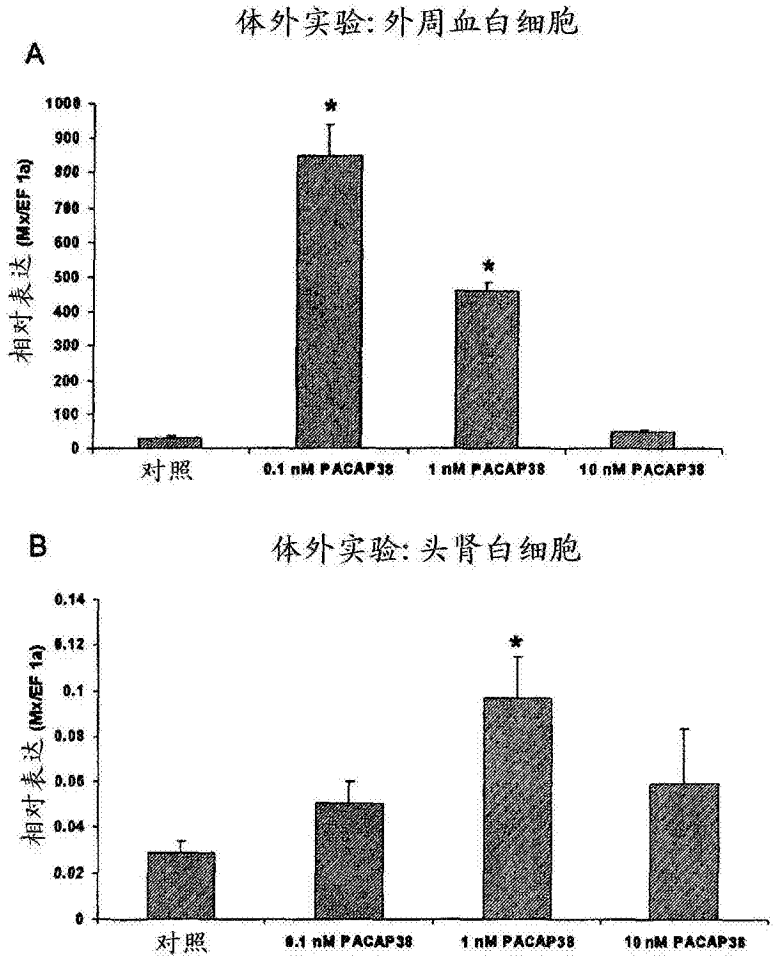
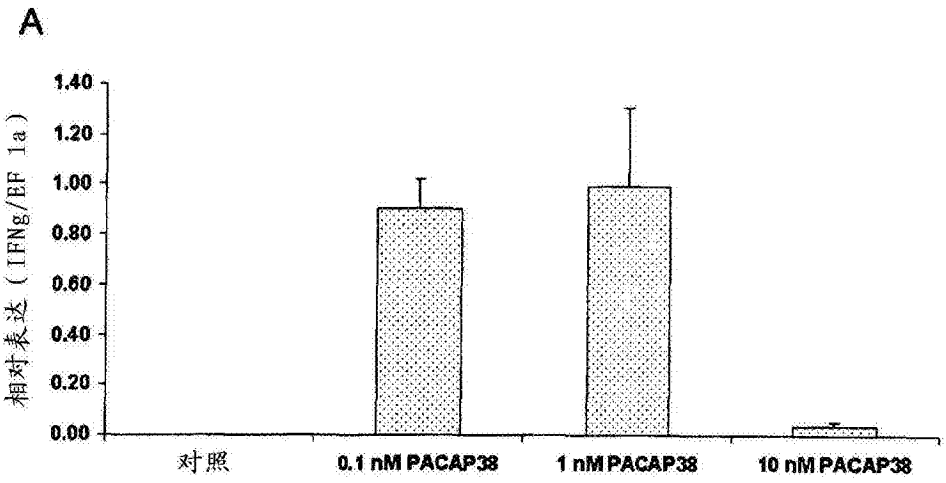

体外实验: 外周血白细胞
A
相对表达 (Mx/EF 1a)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
对照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38
B
体外实验: 头肾白细胞
相对表达 (Mx/EF 1a)
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
对照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38

图7

体外实验:外周血白细胞



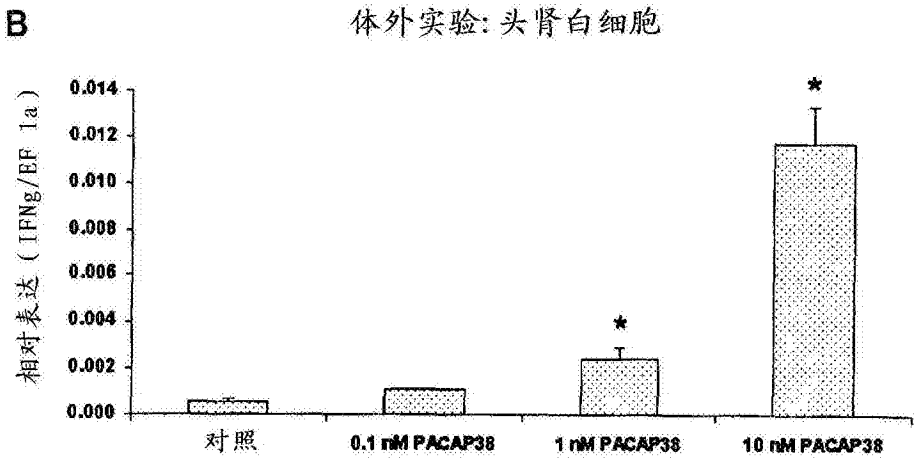


图8

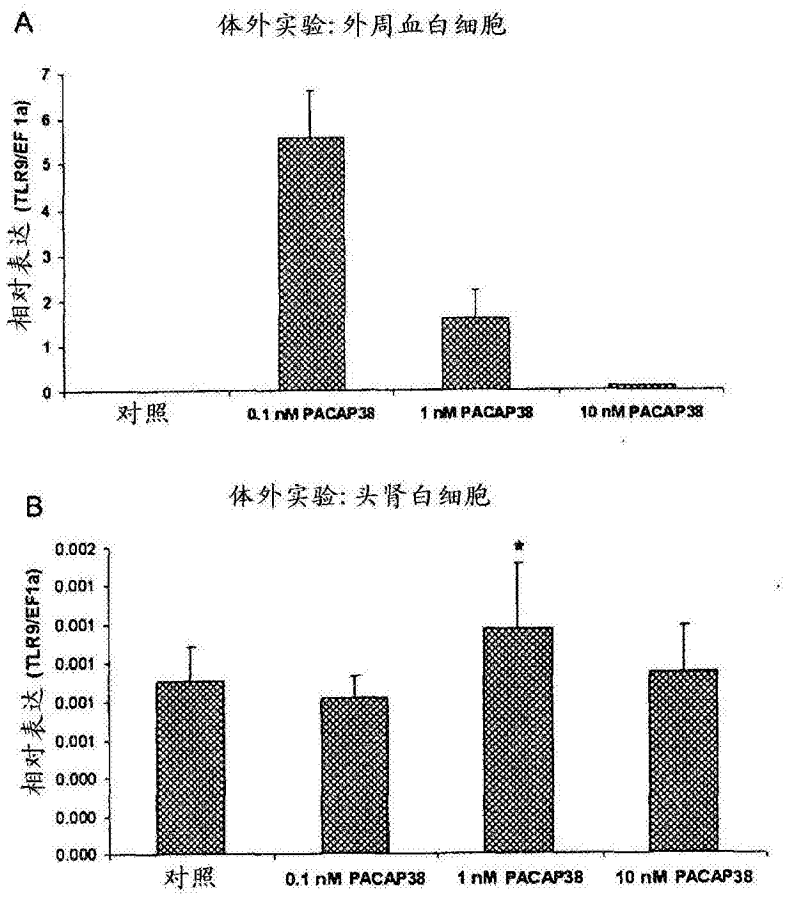

A
体外实验:外周血白细胞
相对表达 (TLR9/EF 1a)
0
1
2
3
4
5
6
7
对照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38
B
体外实验:头肾白细胞
相对表达 (TLR9/EF1a)
0.000
0.000
0.000
0.001
0.001
0.001
0.001
0.002
*
对照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38

图9

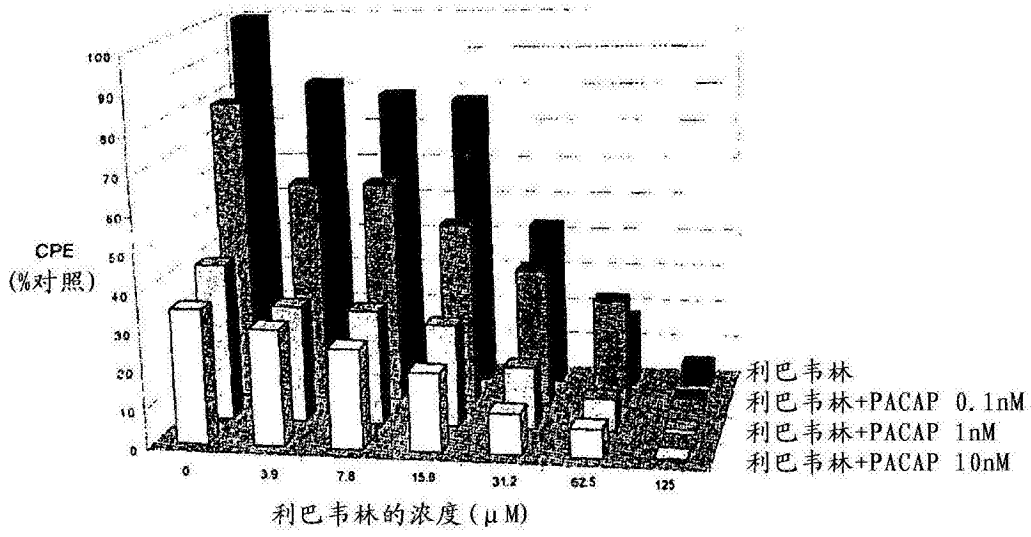

CPE
(%对照)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
3.9
7.8
15.6
31.2
62.5
125
利巴韦林的浓度(μM)
利巴韦林
利巴韦林+PACAP 0.1nM
利巴韦林+PACAP 1nM
利巴韦林+PACAP 10nM

图10