

用非特异性免疫促进剂开启抗病毒抗肿瘤治疗革命大门

——帕米卡®对几种荷瘤小白鼠的效果观察

林海祥^{1*}, 刘芳¹, 陈丽青², 孙晓林¹

¹信福(北京)医药科技有限公司, 北京

²中国医学科学院药物研究院, 北京

Email: *haixianglin510@163.com

收稿日期: 2020年11月1日; 录用日期: 2020年11月17日; 发布日期: 2020年11月24日

摘要

目的: 本文通过帕米卡®在治疗荷瘤小白鼠上的安全性和显著效果, 阐明了使用非特异性免疫促进剂作为广谱抗肿瘤抗病毒治疗的可行性。方法: 用肺癌、乳腺癌、黑色素瘤细胞造成荷瘤小白鼠模型, 再用帕米卡制剂隔天注射或喷鼻0.1~0.2 ml/次(3 mg/ml)治疗并设阳性对照药及溶媒阴性对照, 观察对小白鼠肿瘤抑制率及其瘤体重量、肿瘤转移、荷瘤小白鼠脾重, 体重、存活数等。结果: 帕米卡对几种荷瘤小白鼠有效性统计学测定效果与阴性对照比较 $p < 0.05 \sim 0.0001$, 甚至优于阳性对照PD1、紫杉醇(PTX)法定抗癌药。结论: 帕米卡非特异性免疫制剂对几种荷瘤小白鼠具有安全性良好和极其显著的治疗效果, 表明了这种新思路和新方法抗肿瘤抗病毒是可行的, 具有重大现实意义。

关键词

帕米卡, 抗肿瘤, 抗病毒, 双链RNA, 非特异性免疫

Open the Therapeutic Revolution Door of Antiviral Antitumor with Improving Body Systemic Nonspecific Immunity

—The Effectiveness of Pamica® to Mice Bearing Several Tumors

Haixiang Lin^{1*}, Fang Liu¹, Liqing Chen², Xiaolin Sun¹

¹XIN FU (Beijing) Pharmaceutical Technology Co. Ltd., Beijing

²Institute of Material Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

Email: *haixianglin510@163.com

*通讯作者。

Abstract

Purpose: This paper showed feasibility which has good safety and significant effectiveness of Pamica[®] with improving the body systemic nonspecific immunity to mice bearing several tumors to be antivirus antitumor. **Methods:** To set up the models of mice bearing non-small cell lung cancer, breast cancer, melanoma and then to inject or spray the Pamica 0.1 - 0.2 ml/mouse (3 mg/ml) one day apart and to test the tumors inhibition rate and its weight, metastasis, spleen weight, body weight, survival number compared with the positive and negative control groups. **Results:** In the mice bearing non-small cell lung cancer, breast cancer, and melanoma, the efficacy of Pamica showed significant difference ($p < 0.05 - 0.0001$) which even overmatched official anticancer drugs PD1 and PTX. **Conclusion:** Pamica, the non-specific immunity preparation, has good safety and very significant effectiveness to mice bearing several tumors and it points out its feasibility as broad-spectrum antivirus antitumor by this new idea and methods and it has great practical significance.

Keywords

Pamica, Anti-Viruses, Anti-Tumors, dsRNA, Non-Specific Immunity

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

前篇“帕米卡[®]制剂抗病毒抗肿瘤作用及展望”综述了帕米卡概况、有效性、作用机理及前景[1]，帕米卡是在类似物皮卡(PIKA)基础上发明的升级制剂。皮卡作为佐剂与狂犬病疫苗结合制备的皮卡狂犬病疫苗在新加坡已完成2期临床研究证明安全有效，正在进行多中心3期临床研究[2][3]。国内外双链RNA制剂PIC、PICLC、PIC12U、PIKA与Pamica的异同如表1所示，PIC不能用于灵长类以上动物，PICLC有较严重副作用等[4]。

Table 1. Difference of dsRNA preparations at home and abroad

表 1. 国内外双链 RNA 制剂的区别

名称	成分	作用特点
PIC (美国默克公司 1960s)	双链 RNA	不能用于灵长类、人体
PICLC (Levy 等 1970s)	双链 RNA + 赖氨酸 + 羧甲基纤维素	有效、严重副作用
PIC12U (美国约翰霍普金斯大学 1970s)	双链 RNA 插入尿嘧啶	安全，效果不很肯定，2012 年被美国 FDA 否定
皮卡、(PIKA) (依生公司 2006 年)	双链 RNA + 卡那霉素 + 氯化钙	含有卡那霉素，在新加坡完成皮卡狂犬病疫苗 2 期临床研究
帕米卡制剂(Pamica) (信福公司 2016 年)	双链 RNA + 非抗生素氨基化合物 + 氯化钙	不含有抗生素，实验研究安全效果显著

本篇实验内容由中国医学科学院药物研究院、辉源生物科技(上海)有限公司与本公司协作完成，通过对肿瘤抑制率、瘤体重量及肿瘤转移、小白鼠脾重、体重、存活数等指标检测本公司研制的帕米卡[®]制剂

在肺癌、乳腺癌、黑色素瘤小白鼠模型中的有效性及安全性。在种类多多、抗原多多,变异多多、个性化情况多多的病毒和恶性肿瘤面前,阐明用具有良好安全性帕米卡这种非特异性免疫促进剂作为广谱并具有显著效果的抗病毒、抗肿瘤治疗的新思路新方法具有重大现实意义。

2. 材料和方法

2.1. 材料

2.1.1. 药物

实验药物:帕米卡(Pamica)双链 RNA 免疫复合物 3 mg/ml, 8.0 ml/瓶 批号: P-20170802, 淡黄色均相液体, 样品密封, 避光, 冷藏保存, 信福(北京)医药科技有限公司制备; 阳性对照药: PD1: Biocell 公司, 货号 BE0033-2, 批号: 662817J3; 紫杉醇注射液: 批号: 17041211, 扬子江药业集团有限公司; 顺铂: Sigma, 货号: P4394-25MG, 批号: MKCD 4531; 小鼠活体成像底物: 厂家: Promega, 货号: P1043, 批号: 0000196128。

2.1.2. 肿瘤细胞株

LL2 (小鼠 Lewis 肺癌细胞株) 购于美国模式菌种收集中心(ATCC, CRL-1642), 由辉源生物科技(上海)有限公司保种维持传代; 4T1 乳腺癌细胞, 中国医学科学院药物研究所传代及冻存; B16F10 (小鼠黑色素瘤细胞株) 购于中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院细胞资源中心, 由中国医学科学院药物研究院高钟镐课题组保种维持传代。

2.1.3. 小白鼠

C57BL/6 小鼠, 用于 LL-2 肺癌实验, 雌性, 7~8 周龄, 购自上海西普尔-必凯实验动物中心, 生产许可证号为: SCXK(沪)2013-0016, 合格证号为 2008001681505; BALB/c 小鼠, 用于 4T1 乳腺癌, 6~8 周龄, 雌性, 体重为 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物质量合格证: 11400700254120; C57BL/6N 小鼠, 用于黑色素瘤, 雄性, 6~8 周龄, 体重 18~20 克。购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK(京)2016-0006, 质量合格证编号: NO.11400700343596。

2.2. 方法

2.2.1. LL-2 肺癌实验(实验地点: 辉源生物科技(上海)有限公司)

首先构建 LL2 肿瘤移植模型: C57BL/6 小鼠经异氟烷麻醉后皮下接种 LL2 小鼠肺癌细胞 $1 \times 10^6/0.1$ ml, 成瘤率为 100%; 然后各组小白鼠如下处理: 顺铂尾静脉注射 5 mg/kg, 1 次/周; 帕米卡肌肉注射或鼻腔喷雾 150、200 μ g/只, 1 次/隔天, 每周 3 次测量肿瘤体积, 称小白鼠体重; 实验终点: 在给药后的第 14 天因肿瘤体积超过 2000 mm³ 结束整个实验; 观测指标: 肿瘤体积: 肿瘤体积(TV)的计算公式为: $TV = 1/2 \times a \times b^2$ 。其中 a 和 b 分别代表肿瘤的长径和短径。瘤重: 实验结束后剥取肿瘤组织, 记录肿瘤重量; 体重: 按以下公式计算体重变化率(BWC): $BWC = BW_n/BW_0 \times 100\%$ 其中 BW_0 为分组给药当天体重, BW_n 为每次测量时的体重; 数据处理及统计学处理: 所有数据均以平均值 \pm 标准差(SEM)的形式表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2.2.2. 4T1 小鼠原位乳腺癌(实验地点: 中国医学科学院药物研究院)

首先构建 4T1 小鼠原位乳腺癌动物模型: 取雌性 BALB/c 小鼠, 选择处于对数生长期的 4T1-luc 乳腺癌细胞, 以 $1 \times 10^5/0.2$ ml/只的数量接种于 BALB/c 小鼠第四乳腺垫下; 各组接种后 12 天分别如下处理: PBS 溶液滴鼻给予 100 μ l/只, 每两天给药一次; PD1 腹腔注射 PD1 溶液 100 μ g/只, 每周给药一次; 紫杉醇组(PTX)静脉注射 PTX 溶液 10 mg/kg, 每周给药一次; Pamica 滴鼻组滴鼻给予 300 μ g/只(100 μ l/只), 每两天给药一次; Pamica 肌注组左后腿肌注给予 300 μ g/只, 每两天给药一次; Pamica 与 PD1 联合给药组滴鼻给予 Pamica

300 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每两天给药一次 + 接种后 12 天腹腔注射 PD1 溶液 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每周给药一次；Pamica 与 PTX 联合给药组为滴鼻给予 Pamica 300 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每两天给药一次 + 接种后 12 天静脉注射 PTX 溶液 10 mg/kg ，每周给药一次；以游标卡尺动态测量瘤块体积。肿瘤体积计算公式： $V = 0.5 \times L \times D^2$ (其中，V 为肿瘤体积，L 为肿瘤长径，D 为肿瘤短径)。统计学分析：实验数据均以“均值 \pm 标准差”表示，数据分析采用 SPSS Statistics 19 (version 4.0.100.1124; SPSS Inc., IBM Company, USA) 软件。数据比较采用单因素方差分析 ANOVA，组间显著性差异采用 t 检验，以星号如下表示：* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。

2.2.3. B16F10 黑色素瘤(实验地点：中国医学科学院药物研究院)

首先构建 B16F10 黑色素瘤 C57BL/6N 小鼠模型：取雄性 C57BL/6N 小鼠，选择处于对数生长期的 B16F10 黑色素瘤细胞，以 $1 \times 10^6/0.1\text{ml}/\text{只}$ 的数量接种于 C57BL/6N 小鼠右侧腋下；各组接种后 6 天分别如下处理：PBS 溶液组滴鼻 100 $\mu\text{L}/\text{只}$ ，每两天给药一次；PD1 组为接种后 6 天腹腔注射 PD1 溶液 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每周给药一次；PTX 组静脉注射 PTX 溶液 10 mg/kg ，每周给药一次；Pamica 滴鼻组滴鼻给予 300 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每两天给药一次；Pamica 肌注组左后腿肌注给予 300 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每两天给药一次；Pamica 与 PD1 联合给药组滴鼻给予 Pamica 300 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每两天给药一次 + 接种后 6 天腹腔注射 PD1 溶液 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每周给药一次；Pamica 与 PTX 联合给药组滴鼻给予 Pamica 300 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，每两天给药一次 + 接种后 6 天静脉注射 PTX 溶液 10 mg/kg ，每周给药一次，实验终点：在给药后的第 10 天；统计学分析：实验数据均以“均值 \pm 标准差”表示，数据分析采用 SPSS Statistics 19 (version 4.0.100.1124; SPSS Inc., IBM Company, USA) 软件。数据比较采用单因素方差分析 ANOVA，组间显著性差异采用 t 检验，以星号如下表示：* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。

3. 实验结果

3.1. 帕米卡对荷 LL-2 肺癌小白鼠实验模型的体内抗肿瘤效果研究

3.1.1. 各组荷瘤小白鼠在实验终点的肿瘤体积及统计学分析

肿瘤接种后其中一组随即分组给药，剩余组三天后按照肿瘤体积及体重随机分组给药，以三天后分组给药当天为第 1 天。溶媒对照组肿瘤生长良好，在第 14 天肿瘤体积达到 $2201.09 \pm 68.01 \text{ mm}^3$ 结束实验。表 2 结果表明各实验组肿瘤体积与溶媒对照组相比都明显缩小，具有极其显著差异($p < 0.0001$)，此次实验帕米卡注射组效果优于滴鼻组。

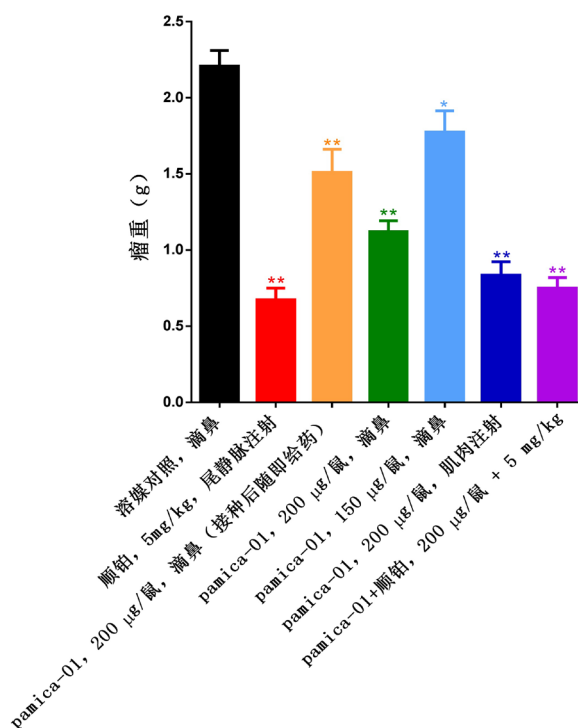
Table 2. Tumor inhibition rate of mice in each treatment group at the end of the experiment
表 2. 统计学分析各治疗组在实验终点的肿瘤抑制率

治疗组别 Treatment	肿瘤体积(14 天) TV at day 14	肿瘤抑制(%) T/Cb (%)	p 值 p value
Vehicle	2201.09 \pm 68.01	--	--
Cisplatin 顺铂(5 mg/kg)	637.79 \pm 62.87	28.9	<0.0001
Pamica-1 (200 μg ，即时给药，滴鼻)	1331.51 \pm 139.21	60.4	<0.0001
Pamica-1 (200 μg ，滴鼻)	1163.83 \pm 52.88	52.8	<0.0001
Pamica-1 (150 μg ，滴鼻)	1839.36 \pm 83.57	83.5	0.0667
Pamica-1 (200 μg ，肌肉注射)	929.69 \pm 109.95	41.7	<0.0001
Pamica-1 + 顺铂(200 μg + 5 mg/kg ，滴鼻 + I.V)	799.63 \pm 82.86	36.3	<0.0001

3.1.2. 各组荷瘤小白鼠瘤重

实验结束后，对所有存活动物进行安乐死，并且剥离肿瘤称瘤重及统计学测定，图 1 结果表明与溶

媒对照组相比, 各实验组的肿瘤重量明显减小, Pamica 150 $\mu\text{g}/\text{鼠}$, 滴鼻(接种后 3 天给药), 肿瘤重量明显减小, 具有显著差异 ($p < 0.05$), 其余均具有极其显著差异 ($p < 0.01$)。



Note: *表示与溶媒组相比 $p < 0.05$, **表示与溶媒组相比 $p < 0.01$ 。

Figure 1. Tumor weights of lung cancer (LL2 cell) mice (C57BL/6) treated by Pamica

图 1. 帕米卡对小鼠肺癌 LL2 细胞 C57BL/6 小鼠移植瘤模型瘤重的影响

3.2. 帕米卡对荷 4T1-luc 小鼠原位乳腺癌模型的体内抗肿瘤效果研究

3.2.1. 各组荷瘤小白鼠肿瘤体积

表 3 表明在实验过程中各组肿瘤体积排序: Pamica 肌注组 < Pamica 滴鼻组 < Pamica + PTX 组 < PTX 组 < PBS 组。实验结束时, 各组肿瘤体积抑制率分别为: Pamica 肌注组 51%, Pamica 滴鼻组 40%, Pamica + PTX 组 30%, PTX 组 27%, 即 Pamica 肌注效果好于滴鼻, Pamica + PTX 联合给药组效果与 PTX 组相似, 不如 Pamica 滴鼻组, 说明 Pamica 在此肿瘤模型上肌注组、滴鼻组都优于法定抗癌药 PTX 组, 也说明 Pamica 与 PTX 不宜联合给药。

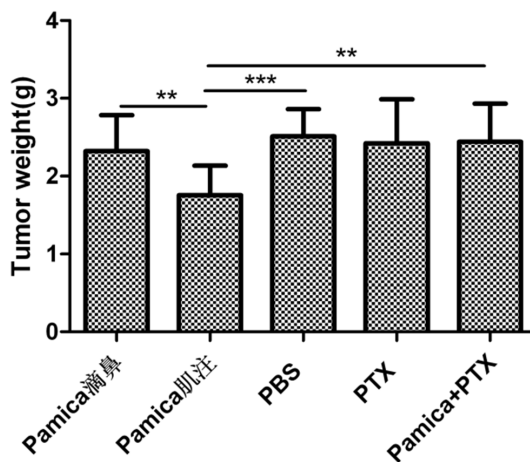
Table 3. t test results of tumor volume of mice bearing breast cancer in each treatment group compared with control group
表 3. 各治疗组小白鼠肿瘤体积 t 检验结果(与溶媒组相比)

Groups	Day	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Pamica 滴鼻		*	*	*		*	***	***	**		***
Pamica 肌注			*	**	**	***	***	***	***	***	***
紫杉醇(PTX)				*		*	**	**			***
Pamica + PTX			*	*	*	*	****	**	**	*	***

Note: 误差线表示 SD。空白表示无数据, *表示与溶媒组相比 $p < 0.05$, **表示与溶媒组相比 $p < 0.01$, ***表示与溶媒组相比 $p < 0.001$ 。

3.2.2. 各组荷瘤小白鼠瘤重

由图 2 表明帕米卡肌注组对肿瘤体积抑制作用与 PBS 对照组比较 $p < 0.001$ ，也强于 Pamica 滴鼻组，其他组包括 PTX 组与溶媒组相比均无显著抑制肿瘤生长的作用，再次表明 Pamica 肌注组优于 PTX 组。



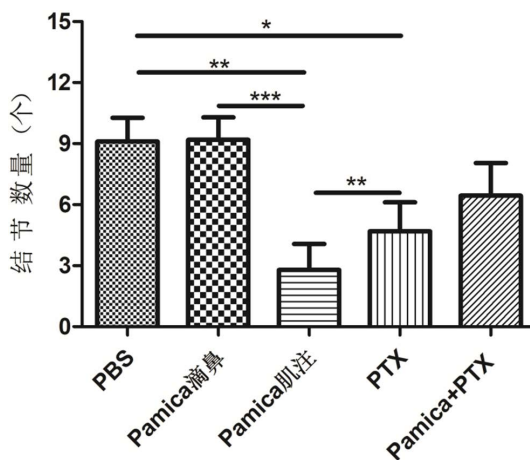
Note: 误差线表示 SD。**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ 。

Figure 2. Tumor weights of mice (C57BL/6) bearing 4T1 breast cancer treated by Pamica and paclitaxel (PTX)

图 2. 帕米卡和紫杉醇对 4T1 荷瘤小鼠瘤重的影响

3.2.3. 各组荷瘤小白鼠肺脏转移数

图 3 可以看出，所有组均出现了白色肿瘤结节，说明所有组均发生了肺转移。其中，PTX 组和 Pamica 肌注组的肺表面结节数与对照组相比显著减少，说明 Pamica 肌注和 PTX 阳性对照药能明显抑制 4T1 乳腺癌细胞的肺转移，而 Pamica 肌注抑制肺转移的效果好于法定 PTX 阳性对照药 ($p < 0.01$)，这是很重要的提示结果。



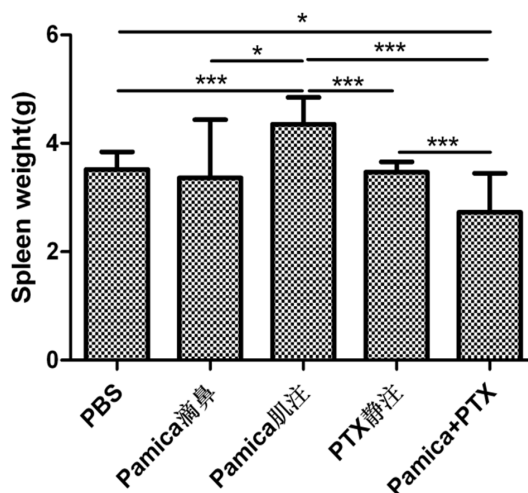
Note: 误差线表示 SD。*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ 。

Figure 3. Number of nodules on long surface of mice (C57BL/6) bearing 4T1 breast cancer treated by Pamica and paclitaxel (PTX)

图 3. 帕米卡、紫杉醇对 4T1 乳腺癌小白鼠肺表面结节数的影响

3.2.4. 各组荷瘤小白鼠脾重

脾脏是机体最大的免疫器官，占全身淋巴组织总量的 25%，含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞，是机体细胞免疫和体液免疫的中心。由图 4 可以看出，Pamica 肌注组脾重显著高于溶媒组，也显著高于 PTX 组，具有统计学极其显著差异($p < 0.001$)，说明肌注组免疫反应较强烈；PTX 组的脾重与溶媒组没有差异；而 Pamica + PTX 组的脾重显著低于溶媒组($p < 0.05$)，具有统计学差异，说明两者联合用药后，机体的免疫反应受到抑制，从侧面说明了 Pamica 与 PTX 不宜联合给药的原因。



Note: 误差线表示 SD。*表示 $p < 0.05$ ，***表示 $p < 0.001$ 。

Figure 4. Spleen weights of mice (C57BL/6) bearing 4T1 breast cancer treated by Pamica and paclitaxel (PTX)

图 4. 帕米卡、紫杉醇对 4T1 荷瘤小鼠脾重的影响

3.2.5. 各组荷瘤小白鼠体重

试验过程中不同天数测定各组小白鼠体重，并做统计学测定。由表 4 可知，Pamica 滴鼻组和 Pamica 肌注组实验过程中小鼠体重与溶媒对照组小鼠均无显著性差异。

Table 4. t test results of mice weight in each treated groups compared with the control

表 4. 各治疗组小鼠与溶媒组小鼠体重 t 检验统计学结果

组别 \ 天数	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Pamica 滴鼻										
Pamica 肌注										
PTX	*↑	**↑		*↑	**↑	**↑				*↑
Pamica + PTX				*↓						

Note: 误差线表示 SD。空白表示无数据，*表示与溶媒组相比 $p < 0.05$ ，**表示与溶媒组相比 $p < 0.01$ ，***表示与溶媒组相比 $p < 0.001$ 。

3.2.6. 小鼠活体成像检测结果

图 5 为乳腺癌 PBS 对照组，图 6 乳腺癌帕米卡治疗组小白鼠活体染色照片，从直观也表明帕米卡治疗组显著抑制了 PBS 对照组乳腺癌小白鼠的转移，有明显的治疗作用。

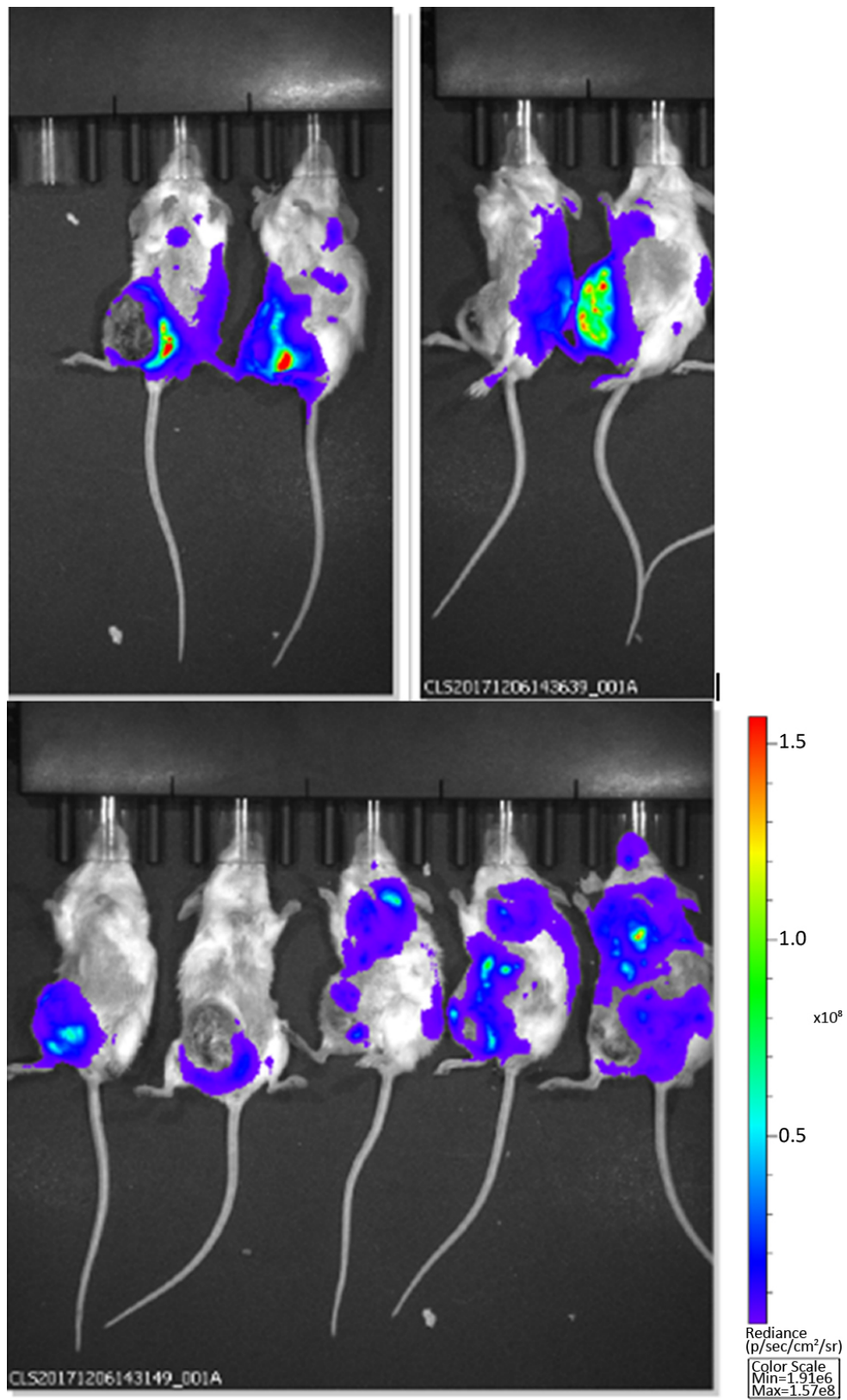


Figure 5. Photo of lived dyed PBS control mice (C57BL/6) bearing 4T1 breast cancer
图 5. 乳腺癌小白鼠 PBS 对照组活体染色照片

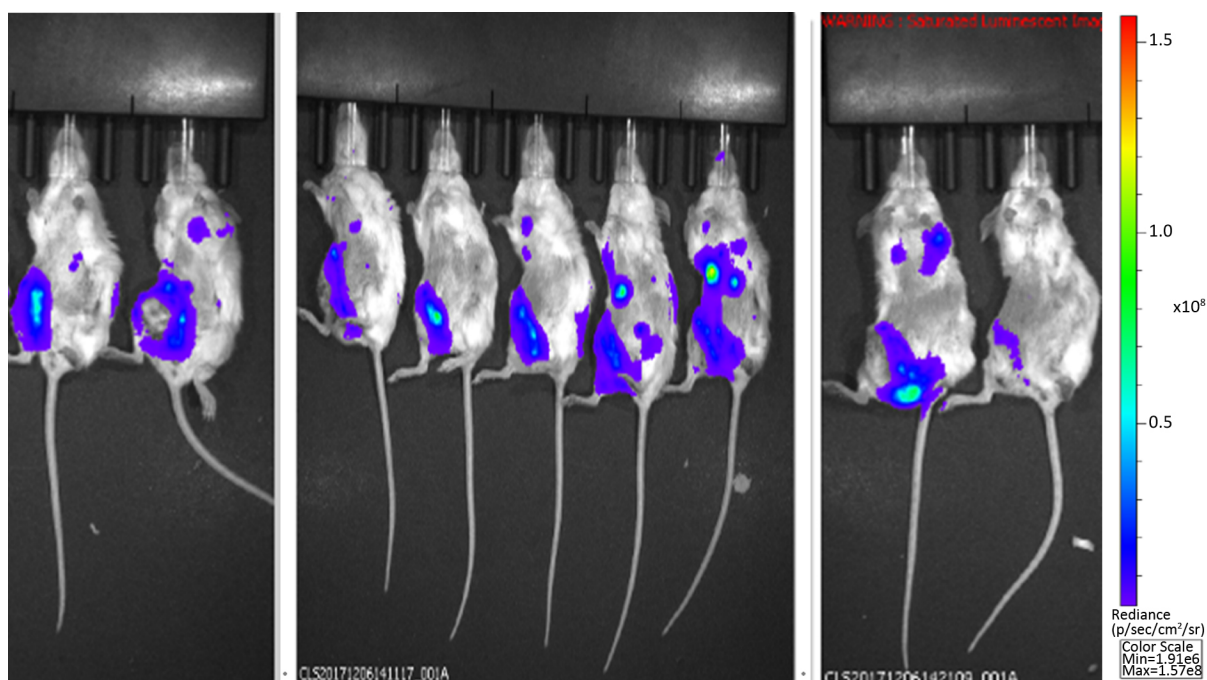


Figure 6. Photo of lived dyed mice (C57BL/6) bearing 4T1 breast cancer treated by Pamica

图 6. 乳腺癌小白鼠帕米卡治疗组活体染色照片

3.3. 帕米卡对荷 B16F10 黑色素瘤 C57BL/6N 小鼠模型的体内抗肿瘤效果研究

3.3.1. 肿瘤体积

实验终点时, 各组肿瘤体积抑制率分别为: Pamica 肌注组 45.6%, Pamica + PD1 组 22.7%, PTX 组 18.8%, Pamica 滴鼻组 13.2%, Pamica + PTX 组 10.2%, PD1 组 3.1%。

表 5 可以看出, Pamica 肌注组肿瘤抑制能力最强, Pamica 滴鼻在此模型上的抑瘤效果与 4T1 模型相似, 即在肿瘤早期表现出显著的抑制率, 在肿瘤后期无显著抑制肿瘤生长的作用。在本实验中仍表明 Pamica 肌注组优于阳性对照药 PTX 和 PD1 组, Pamica 肌注组无论在肿瘤小和大时都表现出显著的抑制作用而 PTX 和 PD1 只能在肿瘤较小时表现出显著的抑制作用。

联合用药问题: Pamica + PD1 联合用药与 Pamica + PTX 联合用药均有一定的抑制肿瘤生长的作用, 但效果与单独的 Pamica 滴鼻相比不明显。提示在此模型上, Pamica 滴鼻不宜与 PD1 或 PTX 联合用药。

Table 5. t test results of tumor volume of mice bearing 4T1 breast cancer in each groups

表 5. 各组乳腺癌小白鼠肿瘤体积 t 检验结果

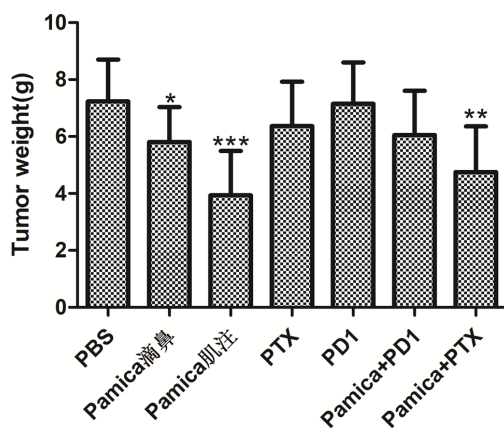
天数	2	4	6	8	10
Pamica 滴鼻	*	*	**	*	
Pamica 肌注	**	*	***	***	***
PTX		**	***		
PD1		*	**		
Pamica + PD1			**	**	*
Pamica + PTX	*		***	***	

Note: 误差线表示 SD。*表示与 PBS 组相比 $p < 0.05$, **表示与 PBS 组相比 $p < 0.01$, ***表示与 PBS 组相比 $p < 0.001$ 。

3.3.2. 各荷瘤小白鼠瘤重、脾重

实验终点时各组肿瘤重如图 7 所示, 各组肿瘤重抑制率分别为: Pamica 肌注组 45.6%, Pamica + PTX 组 34.3%, Pamica 滴鼻组 19.7%, Pamica + PD1 组 16.4%, PTX 组 12.0%, PD1 组 1.1%。与 PBS 组相比, Pamica 肌注 $p < 0.001$ 、Pamica 滴鼻 $p < 0.05$ 、Pamica + PTX $p < 0.01$ 均能明显抑制肿瘤的增长。

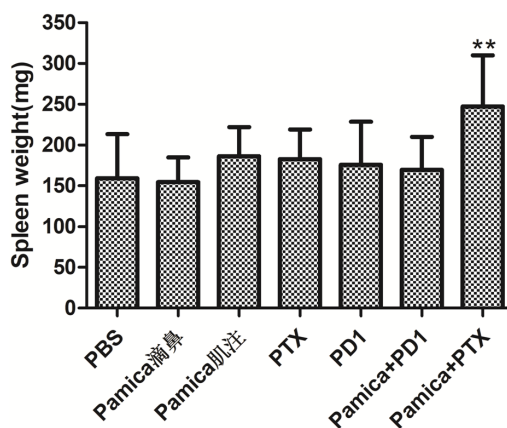
由图 8 可以看出, 与 PBS 组相比, Pamica + PTX 组脾重显著性增大, 其余组与 PBS 组相比均无显著性差异。试验表明 Pamica 肌注组、滴鼻组对肿瘤重量的抑制率优于法定抗肿瘤药 PD1 和 PTX。



Note: 误差线表示 SD。*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$ 。

Figure 7. Tumor weights of mice (C57BL/6) bearing B16F10 melanoma treated by Pamica, PD1 and paclitaxel (PTX)

图 7. 帕米卡、PD1、紫杉醇对 B16F10 黑色素瘤小鼠瘤重的影响



Note: 误差线表示 SD。**表示 $p < 0.001$ 。

Figure 8. Spleen weights of mice (C57BL/6) bearing B16F10 breast cancer treated by Pamica, PD1 and paclitaxel (PTX)

图 8. 帕米卡、PD1、紫杉醇对 B16F10 黑色素瘤小鼠脾重的影响

3.3.3. 肺脏表面转移情况

该荷瘤小鼠模型与 4T1 乳腺癌相比肺转移能力较弱。由表 6 结果表明紫杉醇组小白鼠 2-40 处转移,

PD1 组小白鼠肺表面 2 处转移, 帕米卡滴鼻组及联合 PD1、紫杉醇组均有转移, 只有帕米卡肌注组小白鼠肺表面无可见转移灶出现, 说明帕米卡肌注组抑制 B16F10 的肺转移能力明显强于相对于其他给药组小白鼠, 包括法定抗癌药。

Table 6. Number of metastases on lung surface of mice (C57BL/6) bearing B16F10 melanoma treated by Pamica, PD1 and paclitaxel (PTX)

表 6. 帕米卡、PD1 和紫杉醇治疗黑色素瘤小白鼠对肺表面肿瘤转移灶数的比较

组别	肺脏转移情况(小鼠编号——转移灶个数)
PBS	891——1 个
	943——2 个
Pamica 滴鼻	940——1 个
	971——10 个
Pamica 肌注	无
PTX	884——4 个
	896——40 个
PD1	853——2 个
Pamica + PD1	969——1 个
Pamica + PTX	000——1 个

3.3.4. 荷瘤小白鼠生存情况

表 7 结果表明除 PD1 和 Pamica 肌注组小白鼠没有死亡外, 其余 5 组均有少量小鼠死亡, 说明 PD1 和 Pamica 肌注的安全性好。

Table 7. Survival number of mice (C57BL/6N) bearing B16F10 melanoma

表 7. 荷 B16F10 黑色素瘤 C57BL/6N 小鼠生存情况

组别	受试样品	实验开始小鼠数量(只)	实验终点小鼠数量(只)	死亡小鼠数量(只)
1	PBS	13	12	1
2	PD1	13	13	0
3	PTX	13	12	1
4	Pamica 滴鼻	13	11	2
5	Pamica 肌注	13	13	0
6	Pamica + PD1	13	12	1
7	Pamica + PTX	13	10	3

3.3.5. 各荷瘤小白鼠体重

由表 8 可知, 与 PBS 组相比, 各组荷瘤小鼠体重均无下降趋势, 说明此实验模型对各药物耐受性良好。PD1 和 Pamica 肌注组荷瘤小鼠在实验后期体重上升, 结合表 2 小鼠生存情况可以看出, 在此实验模型上, 相比于其他给药组, PD1 和 Pamica 肌注的毒性较小, 安全性高。

Table 8. t test results of mice weight increase in each treatment groups**表 8.** 各组小鼠体重增加 t 检验统计学结果

组别 \ 天数	2	4	6	8	10
Pamica 滴鼻	*↑				
Pamica 肌注				*↑	*↑
PTX					
PD1	*↑	*↑	**↑	**↑	*↑
Pamica + PD1					
Pamica + PTX					

Note: 误差线表示 SD。*表示与 PBS 组相比 $p < 0.05$ ，**表示与 PBS 组相比 $p < 0.01$ ，***表示与 PBS 组相比 $p < 0.001$ 。

3.4. 讨论

当前治疗癌症的手术、放疗、化疗是“杀敌一千自损八百”的疗法，造成严重副作用，癌症是“内源性疾病”，很难去除或杀死全部癌细胞又会使损害的机体免疫力进一步受损，更降低对癌细胞的主动免疫。分子靶向药物针对的肿瘤细胞常常会发生变异失效，诺华的新药色瑞替尼(Ceritinib)只对 3%~5% 的肺癌患者有效，因为 Ceritinib 针对的是突变的 ALK 基因，而只有 3%~5% 的肺癌患者才有 ALK 基因突变，对没有 ALK 基因突变的肺癌患者，这个药物是完全无效的；癌细胞可以很快产生抗药性，如上 Ceritinib 在治疗几个月以后就丢弃了突变的 ALK 基因，而产生新的突变来帮助癌症生长。癌症不是单一疾病，而是几千几万种疾病的组合，“世界上没有完全相同的两片树叶，世界上也没有两个完全相同的癌症”。例如肺癌患者平均每人突变数目接近 5000 个，每个人突变的组合都不同，每个患者的基因组都是特异的，中国每年这近 60 万肺癌患者其实更像 60 万种不同的疾病，这些原因导致癌症至今仍然很难治疗。

帕米卡是 TLR3、4 等几种胞内受体的配体，通过信号通路传导使自身免疫力提高，杀灭肿瘤细胞治疗肿瘤。在上述小白鼠三种荷瘤模型实验中，帕米卡都能显著降低肿瘤体积、肿瘤重量，提升脾重特别是明显抑制肿瘤转移发生，统计学有效性测定 $p < 0.05 \sim 0.0001$ ，表明帕米卡对荷瘤小白鼠治疗效果极其显著甚至优于化学抗癌药紫杉醇、生物靶向药 PD1；滴鼻组效果不如肌注组，但统计学测定 $p < 0.05 \sim 0.0001$ ；对荷瘤小白鼠存活数量与对照组无差别，体重反而有增加，安全性良好。其特点为：

1) 帕米卡是非特异免疫促进剂，本身不含有抗原，对治疗的瘤种没有限制，均有明显效果，具有广谱性。对肺癌、乳腺癌、黑色素瘤体积和重量的缩小均表现出极其显著的效果。在这些荷瘤小白鼠中帕米卡制剂疗效甚至优于 PD1 著名的抗肿瘤靶向药和传统 PTX 紫杉醇化疗药，特别指出的是对肿瘤扩散和转移治疗十分困难，90% 的肿瘤病人死于肿瘤扩散和转移情况下，帕米卡对 4T1 乳腺癌小白鼠的转移率低于阳性对照组紫杉醇小白鼠，统计学测定 $p < 0.01$ ，具有极其显著意义；在黑色素瘤小白鼠肺转移中 PD1 组 2 处，紫杉醇组分别发生 4~40 处转移，而帕米卡肌注组竟没有肺转移发生，这是有重大意义的。

2) 帕米卡是非细胞毒性药物，未发现毒性，没有抗药性，安全性良好，可以反复使用。

3) 帕米卡喷剂用处大：尽管本试验帕米卡滴鼻组小鼠效果不如肌注组，可能由于小白鼠鼻腔狭小，喷入量不足，易伤害造成炎性损伤，表现试验效果早期优于后期，治疗效果统计学测定仍 $p < 0.05 \sim 0.0001$ 。需要特别指出的是小白鼠等非灵长类动物效果好是其血清中有很少的核酸酶降解双链 RNA，而帕米卡人用以喷入鼻腔、阴道等粘膜免疫方式给药将具有很大优越性：依从性好、药物直接抵达患处，不经体循环，减少人血清核酸酶破坏，使双链 RNA 制剂效果更好，RNA 药物人体应用的递送方式是成功与否的关键。

4) 关于特异性免疫：帕米卡本身不带抗原成分能否促进荷瘤小白鼠特异性免疫？在荷瘤小白鼠极其显著效果中有没有帕米卡促进特异性免疫的作用，本研究没有直接证据。这个问题留待下一篇“帕米卡作用机理研究”讨论。

与当前抗肿瘤、抗病毒的理念和方法不同，也与其它 RNA 制剂不同，帕米卡不仅是免疫佐剂，更是免疫促进剂，上述实验结果显现出帕米卡不仅安全性良好，更具有广谱并显著抑制荷瘤小白鼠肿瘤体积、重量和肿瘤转移等特点，效果甚至优于 PD1、PTX 传统抗癌药是令人吃惊的，有可能以提高机体整体免疫力疗法这一新角度开启严重威胁人体生命和社会的抗病毒抗肿瘤治疗革命大门。国际已有少量文献报道了这种有关抗癌新方法新理念[5] [6]，值得引起关注。

帕米卡在 1~5 小时就能促进机体产生多种细胞因子，但通常次日就检测不出[1]，这一特点一方面表明有效又不易产生过度免疫如细胞因子风暴等副作用，但另一方面需要隔日连续使用。本研究推崇帕米卡注射剂喷雾剂也推崇帕米卡粘膜免疫喷雾剂，正按照国家药监局要求开展临床前研究，通过临床实践确认其临床级别的安全性和有效性。

参考文献

- [1] 林海祥, 刘芳, 孙晓林. 用非特异性免疫促进剂开启抗病毒抗肿瘤治疗革命大门帕米卡[J]. 自然科学, 2020, 8(5): 435-441
- [2] 林海祥, 俞永新. 皮卡佐剂狂犬病疫苗的有效性[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(9): 1028-1031.
- [3] 林海祥, 张译. 双链 RNA (dsRNA)佐剂的比较——PIC、PICLC、PIC12U、PICKCa [J]. 自然科学, 2015, 3(4): 127-136.
- [4] Kalimuddin, S., Wijaya, L., Chen, Y.F.Z., *et al.* (2017) A Phase II Randomized Study to Determine the Safety and Immunogenicity of the Noval PIKA Rabies Vaccine Containing the PIKA Adjuvant Using an Accelerated Regimen. *Vaccine*, **35**, 7127-7132. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.097>
- [5] Ammi, R., De Waele, J., Willems, Y., *et al* (2015) Poly(I:C) as Cancer Vaccine Adjuvant: Knocking on the Door of Medical Breakthroughs. *Pharmacology & Therapeutics*, **146**, 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.010>
- [6] Spitzer, M.H., Carmi, Y., Reticker-Flynn, N.E., *et al.* (2017) System Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell*, **168**, 487-502. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.022>