

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®制剂抗病毒抗肿瘤作用及展望

林海祥*, 刘芳, 孙晓林

信福(北京)医药科技有限公司, 北京

Email: *haixianglin510@163.com

收稿日期: 2020年8月28日; 录用日期: 2020年9月10日; 发布日期: 2020年9月17日

摘要

本综述旨在报道当致病因子突破皮肤黏膜或发生肿瘤细胞生长等危险信号, 通过提高机体自身非特异免疫力的新思路新方法而具有的抗病毒抗肿瘤治疗的效果。非特异性免疫促进剂“帕米卡”在纷繁难以克服的病毒、肿瘤治疗中表现出显著的有效性和良好的安全性。帕米卡是多种模式识别受体TLR3、TLR4、NOD、MDA-5和RIG-1的配体, 能多靶点地激活机体免疫系统, 免疫1~5小时能在动物体血清里检测到干扰素 α 、 γ 、白细胞介素-2、-6、-12、肿瘤坏死因子等多种细胞因子, 促进机体产生共刺激因子CD80、CD86, 促进抗原呈递细胞的提呈, 促进免疫细胞和细胞受体的增殖, 直接或间接活化巨噬细胞、DC、NK、T细胞, B细胞, 进而促进肿瘤的消亡, 使肿瘤萎缩、退化, 阻止肿瘤的自然转移。帕米卡激活信号传导通路绑定TRIF、TRAF, 级联式地活化机体免疫力。在肺癌、乳腺癌、黑色素瘤荷瘤小白鼠试验中帕米卡表现出具有极其显著的有效性($P < 0.05 \sim 0.001 \sim 0.0001$), 显现出帕米卡以提高全身非特异性免疫方法抗病毒抗肿瘤治疗新路径的可行性。

关键词

抗病毒, 抗肿瘤, 双链RNA, TLR3, 非特异性免疫

Open the Therapeutic Revolution Door of Antiviral Antitumor with Improving Systemic Non-Specific Immunity

—The Effectiveness of Pamica® Preparation in Antiviral Antitumor and Its Prospect

Haixiang Lin*, Fang Liu, Xiaolin Sun

*通讯作者。

XINFU (Beijing) Pharmaceutical Technology Co. Ltd., Beijing
Email: haixianglin510@163.com

Received: Aug. 28th, 2020; accepted: Sep. 10th, 2020; published: Sep. 17th, 2020

Abstract

It is important mission in therapeutic fields to cure viral diseases, metastatic tumors due to have not been specific drugs and therapeutic vaccines for viruses and tumors so far. That is a new idea and new way for us: Pamica have shown markedly effects and good safety faced hardly viral infection and metastatic tumors with improving systemic nonspecific immunity. The composition of Pamica is dsRNA polyI:C, non-biotic amino compounds and CaCl₂. It is the ligands of pattern recognition receptors TLR3, TLR4, NOD, MDA-5 and RID-1. As Pamica combined with these receptors that can stimulate different immune processes including produce cytokines including IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-12p40, IL-6, TNF- α during 1 - 5 hours, promote macrophage function, stimulate antigen-presenting cells to produce co-stimulators of CD80, CD86. In the mice with non small cell lung cancer, breast cancer, melanoma, the efficacy of Pamica showed significant difference ($P < 0.05 - 0.001 - 0.0001$) compared with the control. Our results showed that Pamica had the ability to inhibit tumor cell proliferation and promote cell apoptosis by binding TRIF, TRAF signaling pathway to lead cascade activated body immunity. These preliminary findings underlined promise of this potentially life-saving drug by improve systemic nonspecific immunity. It is possible to provide a new idea and new way to open therapeutic revolutionary door of anti-viruses and anti-tumors.

Keywords

Anti-Viruses, Anti-Tumors, dsRNA, TLR3, 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. 帕米卡概述

帕米卡® (Pamica)由双链聚肌苷酸-聚胞苷酸(PIC)、非抗生素类氨基化合物(Amino)、阳离子化合物(Calsium)等物质组成, 各成分英文字母组合成 Pamica, 音译为帕米卡。图 1 为帕米卡示意图。

帕米卡处方的优越性: 1) 帕米卡是 TLR3、TLR4、NOD、MDA-5、RIG-1 等多种模式识别受体的配体, 与受体结合后能多靶点地激活机体免疫系统。2) 非抗生素类氨基化合物带正电荷的氨基可与聚阴离子 PolyI:C 的结合, 形成稳定双链 RNA 结构, 也是 TLR4 的配体, 能有效地促进机体免疫[1]。

2. 帕米卡的安全性及有效性研究

表 1 综述了帕米卡各项试验内容、作用靶点、方法、结果及出处。

3. 帕米卡作用机理

如图 2 所示, 2011 年诺贝尔生理学 and 医学奖获得者 Bruce BA [3]和 Hoffmann JA [4]发现 TLRs 模式识别受体可以与微生物基本成分结合活化非特异性免疫, Steinman RM [5]发现树突状细胞(DC)具有促进机体非特异免疫并进而活化淋巴细胞启动特异性免疫, 帕米卡在免疫中具有这两方面的促进作用, 是帕米卡作用机理的依据。

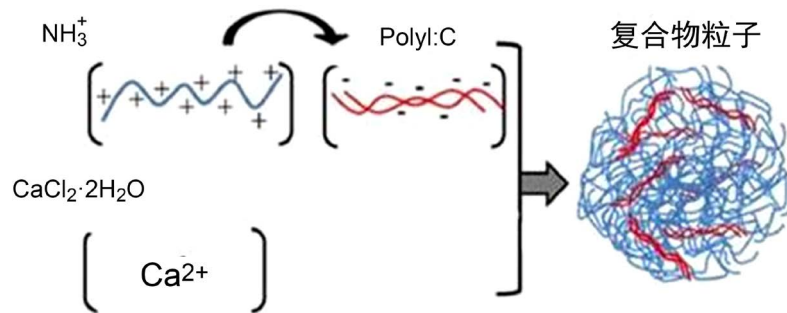


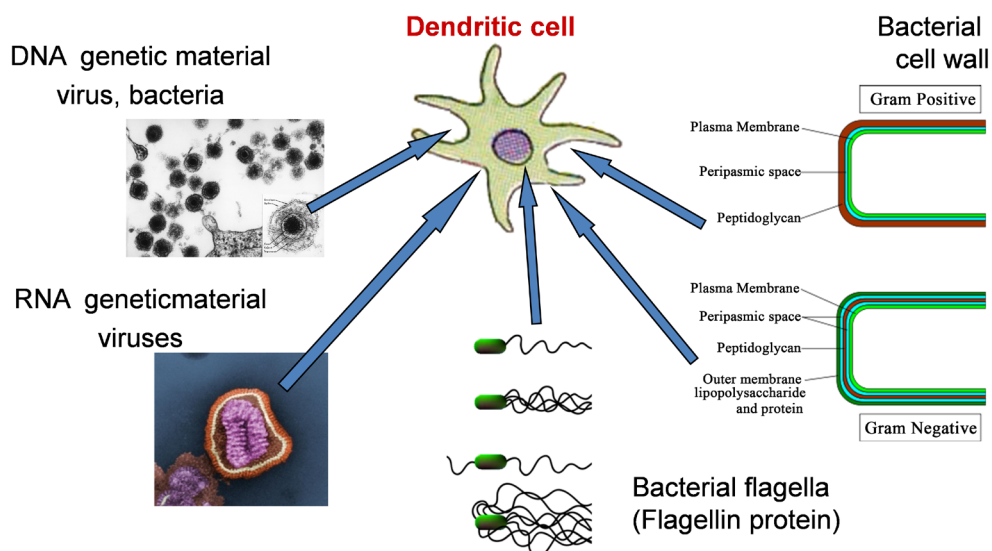
Figure 1. Structure diagram of compound PolyI:C-NH₂-Ca²⁺
图 1. PolyI:C-NH₂-Ca²⁺的复合物结构示意图

Table 1 Pamica multi targetly activate system immunity
表 1. 帕米卡多靶点激活全身免疫力

靶点 targets	方法及结果 Methods and results	结果来源 Souses of results
是 TLR3、TLR4 配体(文献报道还是 PKR、RIG1、MDA5 配体)	通过细胞信号通路试验证明帕米卡是 TLR3、TLR4 配体	香港 InvivoGen 公司检测 2018.3
IL-6: 产生细胞主要是单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞	利用抗原夹心磁珠法检测, 帕米卡(100-5000BP)免疫 1~5 小时, 小白鼠体内 IL-6 均显著提高, 比对照组提高 300 倍	欣博盛生物科技有限公司 2018.1.19; 2018.2.11
IL-12P40 产生细胞主要是 APC 细胞包括 DC 细胞、单核巨噬细胞、B 细胞	方法同上, 比对照组提高近 20 倍	同上
TNFα 产生细胞主要是白细胞	方法同上, 比对照组提高 87 倍	同上
IFNα 产生细胞主要是单核细胞、巨噬细胞产生	方法同上, 比对照组可提高 60 倍	同上
IFNγ 产生细胞主要是 NK 细胞	方法同上, 比对照组可提高近 20 倍	同上
佐剂作用: 抗体显著提高, 产生 V 细胞	肌红蛋白帕米卡免疫家兔, ELISA 方法检测抗体较完全弗氏佐剂提高 6 倍	中科爱博公司 2017.11.21
体外试验: 上调肿瘤细胞 TLR3mRNA: 上调 A549 人癌细胞和 LL/2 鼠癌细胞 TLR3mRNA	RT-QPCR 检测帕米卡经 24、48 小时处理细胞后 P 值 <0.01 和 0.001	
抑制肿瘤细胞分裂和细胞数:	抑制 LL/2 鼠癌细胞、A549 人癌细胞分裂周期和细胞数	
促进鼠癌细胞凋亡显著抑制 S 和 G1 期细胞分裂	LL/2 鼠癌细胞通过 V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡率 11.43%, 对照组 2.73% P<0.001; 人癌细胞 A549 通过 PI 染色检测细胞到位率 32.01, 对照为 17.11 P<0.001	
促进人癌细胞凋亡 显著抑制 S 和 G1 期细胞分裂	A549 人癌细胞通过 V-FITC/PI 染色经流氏细胞仪检测细胞凋亡率 20.14%, 对照组 0.13% P<0.001	中国医学科学院药物研究所吴叶丹等信福公司林海祥[2]
抑制癌细胞增殖, 减少细胞移动	通过 PI 染色检测细胞到位率 55.16, 对照为 46.52 P<0.001; 抑制癌细胞 CCK8 繁殖, 促进细胞凋亡, 减少 G1 期细胞分裂, 减少细胞移动	
帕米卡促进 DC 细胞成熟, 上调 MHC I 和 II 分子	上调 DC 细胞 MHC I 和 II 分子、促进共刺激分子 CD80, CD86 产生	

Continued

帕米卡促进荷瘤小白鼠 DC 细胞促进 CD80、86 分泌	以 CD11c 标记 DC、PBS 对照组 CD11c 细胞从 4.96，帕米卡组 7.85%，同型动物阳性对照 6.02%。说明肺癌降低脾 DC，帕米卡组可提高脾 DC： 在肺癌小白鼠中同型对照小白鼠 CD80 阳转率和 MFI (流式细胞术平均的荧光强度)，分别为 0.25%和 68.49；肺癌小白鼠 PBS 组为 13.60%和 785.9；帕米卡注射组小白鼠为 20.16%和 1210.76。 促进 CD86 分泌：同型对照 CD86 阳转率和 MFI 分别为 0.73%和 135.97；肺癌小白鼠 PBS 组为 1.67%和 221.38；帕米卡注射组小白鼠为 4.01%和 353.20%。总之，帕米卡提高 DC 成熟，上调脾 MHC I 和 II 分子、CD80、CD86 共刺激分子水平，刺激体内 T 细胞。	中国医学科学院药物研究所吴叶丹等信福公司林海祥[2]
帕米卡活化信号传导绑定活化 TRIF，TRAF 帕米卡活化信号传导绑定活化 TRIF，TRAF	在肺癌小白鼠中，同型对照 CD80 阳转率和 MFI 分别为 0.25%和 68.49%；PBS 组为 13.60%和 785.9%；注射组为 20.16%和 1210.76%。CD86 阳转率和 MFI 分别为 0.73%和 135.97%；PBS 组为 1.67%和 221.38%；注射组为 4.01%和 353.20%	
肺癌小白鼠体内试验： 1、抑制荷瘤小白鼠肿瘤生长体积	抑制荷瘤小白鼠肿瘤生长体积：帕米卡肌注组 51%，喷鼻组 39%，PD1 组 15%，统计学测定 $P < 0.05$ 、0.01、0.001；肌注组小白鼠体重明显较喷鼻组轻 $P < 0.05$	
2、促进荷瘤小白鼠肿瘤细胞的凋亡	Tunel 荧光检测显示注射组凋亡和坏死细胞多于喷鼻组，并抑制了肿瘤体积	中国医学科学院药物研究所吴叶丹等，信福公司林海祥[2]
3、抗小白鼠肺癌自然转移活性和坏死	与 PBS 对照组小白鼠肺癌转移灶比：喷鼻组和 PD1 组明显有转移而注射组未见转移灶，但有肺癌前期病变；肝转移除注射组没有，对照组、喷鼻组、PD1 组都有，均没有发现脑转移	
4、延长肺癌小白鼠存活期	PBS 对照组小白鼠存活 25 天，帕米卡组 44 天， $P < 0.001$	
帕米卡调节 P13k/Akt/mTOR 信号转导通路，抑制肿瘤细胞分裂，促进肿瘤细胞凋亡	通过 Western blot 方法在 LL/2 鼠癌细胞和 A549 人癌细胞检测帕米卡增加 Akt P21 和 P53 表达，而对照组抑制 P21 和 P53 表达。流式细胞仪检测表明帕米卡封闭了细胞分裂的分裂间期。帕米卡能够通过降低 P-Akt 的表达，诱导依赖 P53 凋亡蛋白的 LL/2 鼠癌细胞和 A549 人癌细胞细胞凋亡	同上
帕米卡降低 P13k/Akt 表达引起依赖 P53-caspase (含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶的 LL/2 鼠癌细胞和 A549 人癌细胞凋亡	在免疫组织化学通过计算也获得上述同样结果。与对照组比较 P-Akt 和 cyclinD1 减少而 P53、P21、caspase3 增加。帕米卡调节 P13k/Akt/P53 通路改变细胞死亡繁殖相关的分子组成	同上
荷瘤小白鼠试验(肺癌、乳腺癌肺转移、黑色素瘤非转移)	均能显著抑制荷瘤小白鼠体积 $P < 0.0001$ ，延长存活期从对照组 22 天至帕米卡组 44 天 $P < 0.001$	中国医学科学院药物研究所(乳腺癌、黑色素瘤小白鼠 2 份报告) 辉源(上海)科技公司肺癌小白鼠 1 份报告)
异常毒性检测	小白鼠(16~18 g)腹腔 0.5 ml；豚鼠(250~350 g)腹腔 5 ml 注射后一周健存，体重增加。符合要求	信福(北京)医药科技有限公司



图片来源：编译自 Roitt's Essential Immunology, 第 13 版。

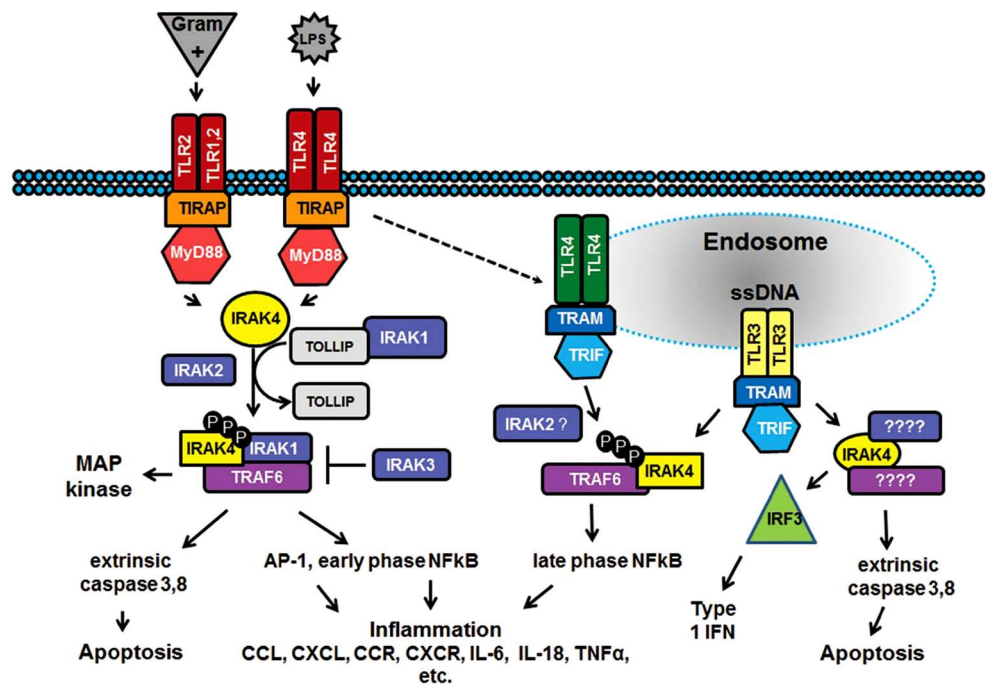
Figure 2. Recognition of DC to conserved components of bacteria and viruses

图 2. DC 对细菌病毒的保守成分的识别

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁,可以识别来源于微生物的具有保守结构的分子,当微生物突破机体的物理屏障如皮肤、粘膜等时,TLR 可以识别它们并激活机体产生免疫细胞应答。帕米卡是多种模式识别受体(PRR)的配体,包括 TLR3、4 (Toll 样受体 3、4)、NOD (细胞内核苷酸结合寡核苷酸域)蛋白家族、RIG-I (RNA 螺旋酶视黄酸诱导基因 I)、MDA5 (黑色素瘤分化相关基因 5)依赖 dsRNA 蛋白激酶等。这些受体广泛存在于上皮细胞和树突状细胞里,还存在 NK、T、巨噬细胞中,也在几种肿瘤细胞中表达。TLR3 作为病毒双链 RNA 识别受体在机体抗病毒天然免疫中发挥十分重要的作用,TLR3 与配体结合后,活化转录因子 NF- κ B 和干扰素调节因子 3 (IRF3),诱导炎症细胞释放炎症因子并介导炎症反应,同时诱导 I 型干扰素的释放,使 DC 细胞成熟,介导抗病毒抗肿瘤非特异性免疫。这些信号传导不仅通过 TLR3 还可通过 MDA5 和 RIG-I 胞浆受体。人体的巨噬细胞、嗜中性细胞、不同癌细胞、上皮细胞具有 MDA5 和 RIG-I。双链 RNA 被 MDA5 和 RIG-I 识别后,与其相关的线粒体接头分子相互作用信号级联式启动,导致 IRF3、NF- κ B 活化产生 IFN1。帕米卡喷剂属于双链 RNA (dsRNA)药物,双链 RNA 制剂作为配体一旦与这些受体结合,通过细胞内信号传导激活机体一系列非特异性和特异性免疫(如图 3 所示),在机体保护性免疫方面发挥重要作用,是调节抗感染抗肿瘤初始免疫的中心环节。

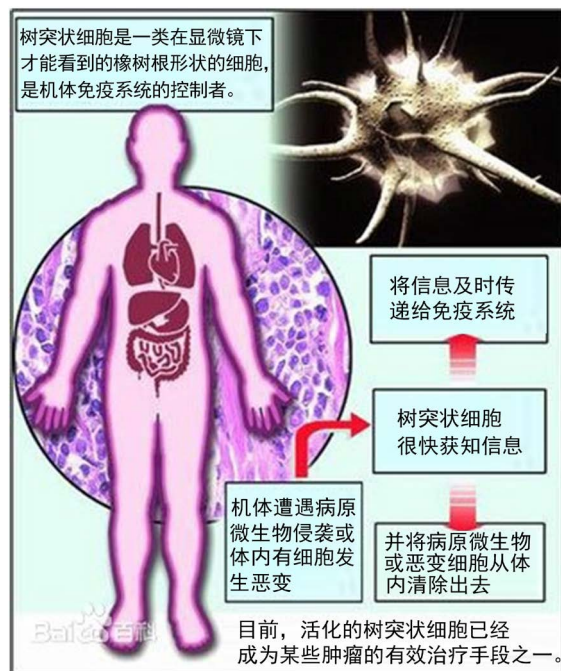
帕米卡另一主要成分“非抗生素类氨基化合物”是 TLR4 受体的配体,被识别后启动信号转导途径诱导 NF- κ B 和蛋白激酶-1 (activator protein 1, AP-1)等的活化,通过促进巨噬细胞、NK 细胞、T 细胞功能发挥抗病毒抗肿瘤作用[6]。

树突状细胞(DC),是功能最强的专职抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC),是连接初始免疫和继发免疫的中心环节。当受到外源性抗原或肿瘤抗原危险信号刺激时,树突状细胞摄取、加工处理这些抗原为抗原肽并与树突状细胞表面 MHC I、II 类分子(信号 1)结合,通过抗原递呈激活初始 T 细胞。为保证诱发抗原特异性的免疫刺激反应,树突状细胞还需分泌共刺激分子(信号 2)及特征性细胞因子白细胞介素 12 (IL-12)等(信号 3)。帕米卡喷剂能够通过上调 DC 细胞 MHC I 和 II 分子、促进共刺激分子 CD80, CD86 产生,促进 IL-12 产生,促进抗原呈递,连接初始免疫(非特异性免疫)和继发免疫(特异性免疫)。另一方面帕米卡本身就具有抗病毒、抗肿瘤作用(如图 4 所示)。



图片来源: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00338/full>。

Figure 3. Signaling pathways and effects after TLR3, 4 ligand combined with the receptors
图 3. TLR3、4 等受体与配体结合后信号传递途径及产生的免疫反应



图片来源: 百度识图搜索
https://graph.baidu.com/pcpage/similar?originSign=122b0004ee7a80e35542801597996113&srcp=crs_pc_similar&tn=pc&idtag=nj&sids=10005_10802_10916_10912_11006_10922_10905_10016_10901_10942_10907_11012_10961_10971_10968_11031_11120_13007_12201_13202_16109&logid=2872840947&entrance=general&tpl_from=pc&image=https%3A%2F%2Fssl1.baidu.com%2F6ON1bjeh1BF3odCf%2Fit%2Fu%3D2324375711.3558937381%26fm%3D27%26gp%3D0.jpg&carousel=503&index=0&page=1。

Figure 4. The function of dendritic cell
图 4. 树突状细胞的功用

4. 展望

帕米卡在抗病毒、抗肿瘤实验研究中显示了非特异性地多靶点促进机体全身的免疫力，特别是细胞免疫，在疾病期间可重复性长时间激发免疫力而少副作用等鲜明的迄今治疗上不同的机理和特点，从而发挥抗病毒感染和消灭残存肿瘤细胞的作用，展现出强大的抗病毒抗肿瘤免疫效应。

帕米卡制剂的治疗效果是通过致病因子突破皮肤黏膜后用提高全身非特异免疫力而具有抗病毒抗肿瘤效果的，这与笼统地以健康的生活方式和一般增强免疫力的方法不同。免疫治疗必须具有细胞免疫，产生或促进产生一系列细胞因子进入细胞内杀灭病毒和裂解病毒繁殖的细胞包括肿瘤细胞才具有治疗作用。帕米卡是 TLR3、4 等多种细胞膜式受体的配体，能多靶点非特异性地激活机体免疫系统促进多种细胞因子产生，促进 DC 成熟等具有明确的治疗作用。在没有抗原刺激下机体能杀灭肿瘤细胞、逆转肿瘤细胞逃逸、转移，与对照组相比显示出了极其显著的抗病毒抗肿瘤效果($P < 0.05 \sim 0.001$)而且未表现出副作用，这种非特异性的效果及安全性展示了美好的前景。需要证明的是在机体患病过程中在病毒、肿瘤抗原存在情况下单独帕米卡是否也能促进这些机体存在的抗原发生特异性免疫反应，而具有了显著的治疗效果。另外，帕米卡在实践中联合应用现有的治疗手段将会走出一条新的抗病毒抗肿瘤抗超级细菌的更有效和很少副作用的新路来。通过提高机体非特异免疫是打开抗病毒抗肿瘤治疗难题一条新思路新路径。

本研究系列研究结果将陆续报道。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Wu, Y.D., Huang, W., Chen, L.Q., *et al.* (2019) Anti-Tumor Outcome Evaluation against Non-Small Cell Lung Cancer *in Vitro* and *in Vivo* Using PolyI:C as Nucleic Acid Therapeutic Agent. *Am J Transl Res*, **11**, 1919-1937.
- [3] Beutler, B.A. (2009) TLRs and Innate Immunity. *Blood*, **113**, 1399-1407.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-019307>
- [4] Hoffmann, J.A. (1995) Innate Immunity of Insects. *Current Opinion in Immunology*, **7**, 4-10.
[https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80022-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80022-0)
- [5] Steunman, R.M. and Cohn, Z.A. (1973) Identification of Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: 1. Morphology Quantitation, Tissue Distribution. *Journal of Experimental Medicine*, **137**, 1142-1162.
<https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- [6] 张树政, 金城, 杜昱光. 糖生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012.