

З. П. СОФЬИНА, Н. В. МЯСИЦЕВА, Ф. Г. АРСЕНЯН, А. М. ЮРКЕВИЧ
**ВОЗМОЖНОСТЬ УСИЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО
ДЕЙСТВИЯ АНТАГОНИСТА ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ АНАЛОГАМИ
МЕТИЛКОБАЛАМИНА**

Онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Стимулирующее действие цианокобаламина на рост перевиваемых опухолей разного вида животных (саркома кур Рауса, фибросаркома РW-2, саркома 45 и ССК крыс, карцинома Герена, саркома 180 и лимфосаркома мышей) и ослабление лечебного действия некоторых противоопухолевых препаратов при совместном их применении с витамином В₁₂, отмечаемые в ранних исследованиях, обусловлены активным биосинтезом его коферментов в организме животных. Оценка функциональной роли метилкобаламина — одного из кобаламиновых коферментов в процессах роста нормальных и опухолевых клеток — привлекает наибольшее внимание.

Метилкобаламин является коферментом метионинсинтетазной реакции — ключевого звена, определяющего синергизм действия кобаламинов и соединений фолиевой кислоты в процессах клеточной пролиферации. Особая значимость метилкобаламина для активации этой ферментной системы отмечена в результате изучения нарушенного обмена кобаламинов при лейкозах человека. Малая эффективность комбинированной цитостатической терапии при определенных вариантах острого лейкоза, протекающих с высокой концентрацией метилкобаламина в крови, подтверждала специфичность его действия в организме (Н. В. Мясичева и соавт., 1969). В настоящее время установлена активная роль метилкобаламина в процессах пролиферации клеток кроветворной ткани здоровых животных. Под воздействием метилкобаламина в селезенке мышей возрастают число клеток, синтезирующих ДНК, их митотическая активность и величина пролиферативного пула (О. Д. Голенко и соавт.). Обнаружено значительное увеличение частоты развития гемобластозов у мышей при комбинированном введении метилкобаламина с эндогенными бластомогенами. Важным моментом механизма стимулирующего действия кобаламинов является их индуцирующее влияние на активность метионинсинтетазы. В культурах нормальных клеток млекопитающих и опухолевых клеток человека активность метионинсинтетазы заметно возрастает с увеличением содержания кобаламинов в среде культивирования (Mangum и соавт.; Kately и соавт.). Опухолевые клетки разного типа, однако, отличны от нормальных по своей способности под воздействием кобаламинов усиливать биосинтез метионина, необходимый при интенсивном росте (Halpern и соавт.; Chello и Bertino). Спасательный путь с помощью кобаламинзависимой метионинсинтетазы, обеспечивая увеличение внутриклеточного пула тетрагидрофолиевой кислоты независимо от фолатредуктазной системы, представляет, по-видимому, основной механизм развития устойчивости лейкозных клеток к метотрексату (MTX) (Н. В. Мясичева; Sauer и Jaenicke).

В связи с этим реальна возможность усиления противоопухолевого эффекта данного метаболита путем его комбинированного применения

с антагонистами кобаламинового кофермента. Понимание механизма действия кобаламинов послужило обоснованием для направленного синтеза аналогов метилкобаламина и их испытания в качестве потенциальных противоопухолевых соединений.

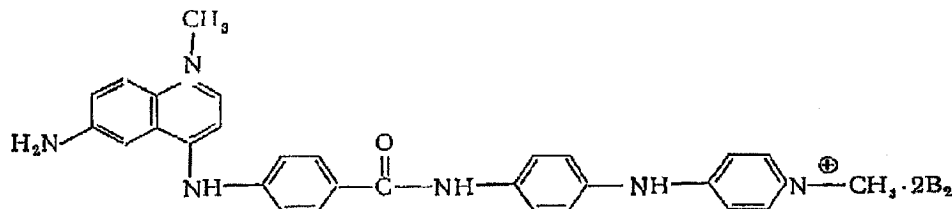
В химиотерапевтических экспериментах были изучены дифторхлорметилкобаламин и хлорпаллодат метилкобаламина, обнаруживавшие активность при исследованиях *in vitro* в подавлении роста бактериальных клеток и торможении синтеза ДНК в культуре эмбриональных фибробластов человека (Н. В. Мясищева и соавт., 1977).

При разработке схемы комбинированного воздействия были учтены основные аспекты физиологического действия кобаламинов в организме: контроль за поступлением соединений фолновой кислоты в клетки и образованием коферментов фолата, а также интенсивность поглощения кобаламинов опухолевыми клетками (Burke и соавт.; Tisman и Herbert; Floodh и Ullberg). В связи с этим можно было рассчитывать на избирательность действия исследуемых соединений и возможность снижения активности кобаламинозависимого фермента в организме. Однако трудно было ожидать значительного эффекта при их изолированном применении. Поэтому нам представлялось важным оценить противоопухолевое действие этих соединений на фоне торможения активности дигидрофолатредуктазы с помощью МТХ.

Материал и методы. Исследования проведены на мышах линии С₅₇BL, СВА, BALB/c и гибридах BDF₁/С₅₇BLx DBA(2), массой 20–25 г, полученных из питомника АМН СССР. Противоопухолевая активность аналогов метилкобаламина изучена на переливаемых лейкозах L-1210 и La и солидных опухолях: аденокарциноме молочной железы (Ca-755), раке шейки матки (РШМ-5) и аденокарциноме кишечника (АКАТОЛ). Мы выбрали в качестве основного объекта исследования солидные опухоли, на которых легче выявить стимулирующее влияние метилкобаламина, чем на модели лейкозов мышей L-1210 и La, с высоким пролиферативным пулом и весьма короткой продолжительностью жизни животных.

Метилкобаламин (СН₃Сbl) и дифторхлорметилкобаламин (CF₂СlСbl) получены по известному методу (Wood и соавт., 1968), модифицированному в разделе выделения (Е. М. Тачкова и соавт.). Хлорпаллодат метилкобаламина (MetСbl·PdCl₂) синтезируют способом Е. Г. Чаусера. Метилкобаламин вводили внутримышечно из расчета 10 мг/кг 2 раза на курс лечения с интервалом 96 ч, CF₂СlСbl — ежедневно подкожно из расчета 500 мг/кг одномоментно либо 2 раза в день по 250 мг/кг в течение 5 дней. Плохо растворимый хлорпаллодат метилкобаламина вводили перорально в 2% крахмальной суспензии в суточной дозе 500 мг/кг в течение 5 дней или 2 раза с интервалом 96 ч. Суточная доза вводилась одномоментно или по 250 мг 2 раза в день. МТХ фирмы «Lederle» использовали в дозе 10 мг/кг внутривнутрино с интервалом 96 ч.

В наших исследованиях активность кобаламиновых производных изучена не только при комбинированном применении с МТХ, но также с хинолиновым производным (NSC-176319):



Препарат получен нами из Национального института рака США в соответствии с соглашением о сотрудничестве между СССР и США в области химиотерапии опухолей. Согласно характеристике, представленной американскими учеными, препарат является ингибитором метионинсинтезазы (Carter и соавт.). Хинолиновое производное применяли внутривнутрино в дозе 5 мг/кг ежедневно или с интервалом 96 ч, что составляет половину максимально переносимой дозы для использованного режима. Лечение начинали через 48 ч после перевивки опухоли. Результаты воздействия оценивали через 24 ч после окончания курса лечения и в различные сроки на протяжении жизни животных. Критерием эффективности служили процент торможения роста опухоли, вычисляемой по условному объему, и увеличение продолжительности жизни животных. В каждом из опытов контрольные и опытные группы составляли так, чтобы их численность обеспечивала статистическую значимость минимальных учитываемых процентов торможения

роста опухолей (50%) и увеличения продолжительности жизни мышей (25%). В соответствии с указанными требованиями опытные группы состояли из 6—10 мышей, а контрольные — из 6—13 животных, в зависимости от используемого штамма опухоли.

Результаты и их обсуждение. В проведенных исследованиях впервые обнаружено стимулирующее влияние метилкобаламина на рост перевиваемых опухолей Са-755, АКАТОЛ, в меньшей степени — на рост РШМ-5 (табл. 1). Наибольшая интенсивность роста опухоли под воздействием метилкобаламина наблюдалась при перевивке Са-755 мышам-гибридам BDF_1 (180%) по сравнению с ростом той же опухоли у мышей чистой линии $C_{57}Bl$. Стимуляция размножения опухолевых клеток происходила в период введения метилкобаламина; наибольшее различие в величине опухолей у животных опытной и контрольной групп выявлено непосредственно после окончания введения препарата. В последующие сроки рост опухолей у мышей, получавших метилкобаламин, замедлялся. При перевивке АКАТОЛ мышам разного пола интенсивность роста опухоли при воздействии метилкобаламина различна. Стимулирующее действие препарата было значительно выражено у самцов (см. табл. 1).

Как и следовало ожидать, изолированное воздействие аналогов метилкобаламинов тормозило рост перевиваемых опухолей Са-755, РШМ-5 в небольшой степени и лишь непосредственно после введения препаратов (табл. 2).

При сравнительной оценке наибольшая ингибирующая активность обнаружена при использовании хлорпаллодата метилкобаламина. Эффективность торможения роста Са-755 была более выражена у мышам-гибридов BDF_1 по сравнению с мышами $C_{57}Bl$. Как было указано, именно у мышам BDF_1 в значительно большей степени проявлялось и стимулирующее действие метилкобаламина. В этой серии опытов продолжительность жизни мышам BDF_1 с аденокарциномой молочной железы при воздействии CF_2ClCbl и хлорпаллодата метилкобаламина увеличивалась на 50% (см. табл. 2). В то же время при введении производных метилкобаламина отсутствовал эффект торможения роста АКАТОЛ. Отмечено большое различие в действии кобаламиновых производных на опухоль в зависимости от режима их применения (см. табл. 2). Повидимому, при однократном введении большой дозы (500 мг/кг) возможна диссоциация препаратов с последующим образованием активной формы, стимулирующей рост опухоли.

В соответствии с нашим предположением при комбинировании аналогов метилкобаламина с МТХ обнаружено усиление их действия на опухоль (Са-755, РШМ-5; табл. 3). Увеличение противоопухолевого эффекта в результате комбинированного воздействия проявлялось непосредственно после курса введения препаратов и, особенно, в последующий период: когда эффект действия одного МТХ уже отсутствовал, сохранялся достаточно высокий процент торможения роста опухоли.

Таблица 1

Влияние метилкобаламина на рост некоторых перевиваемых опухолей

Опухоль	Доза препарата, мг/кг	Срок введения препарата после прививки опухоли, дни	Рост опухоли после введения препарата, % к контролю		
			1 день	7 дней	14 дней
Са-755 $C_{57}Bl$	10	2-й и 6-й	+74	+21	+23
BDF_1	10	2-й и 6-й	+180	+65	+10
АКАТОЛ:	10	2-й и 6-й	+20	+23	+31
самки					
самцы	10	2-й и 6-й	+126	+37	+33

Примечание. Здесь и в табл. 2—6 знак «плюс» обозначает стимуляцию роста опухоли.

Противоопухолевое действие аналогов метилкобаламина

Опухоль	Препарат	Доза препара- тов, мг/кг	Срок введения препаратов пос- ле прививки опухоли, дни	Торможение роста опухоли, % к контролю			Увеличение про- должительности жизни мышей, % к контролю
				1 день	7 дней	15 дней	
Ca-755	Хлордифторме- тилкобаламин	250+250	2-6-й	30	+8		54
		250+250	2-6-й	43	38	0	16
РШМ-5 АКАТОЛ	(CF ₂ ClCbl)	250+250	2-6-й	0	0	0	0
Ca-755 (BD F ₁)	Комплекс три- хлорметилкоба- ламина с	250+250	2-6-й	90	59		50
		500	2-6-й	13	16	20	
РШМ-5 АКАТОЛ	(MetCb. PdCl ₂)	250+250	2-6-й	80	23	0	10
		500	2-6-й	+130	+15	+18	0
		250+250	2-6-й	0	0	0	0

Для понимания возможного механизма действия аналогов метилкобаламина в организме животных был осуществлен сравнительный анализ роста тех же опухолевых штаммов при изолированном влиянии ингибитора метионинсинтетазы — хинолинового производного — и его сочетанного воздействия с МТХ. Торможение роста Ca-755, РШМ-5 и АКАТОЛ увеличивалось в зависимости от концентрации препарата. Наиболее эффективно препарат воздействовал на Ca-755. При увеличении дозы от 5 до 15 мг/кг торможение роста опухоли возрастало соответственно до 40 и 96%. Однако с увеличением дозы препарата заметно возрастала и его токсичность. Например, при штаммах лейкозов L-1210 и La наиболее оптимальной дозой, по нашим данным, являлась доза 10 мг/кг, при которой в 3—4 раза увеличивалась продолжительность жизни животных. При уменьшении дозы эффект воздействия препарата на мышей с лейкозами был существенно ниже. При солидных опухолях в наших исследованиях не было отмечено значительного увеличения продолжительности жизни мышей. При сочетанном введении препарата с МТХ даже в малой дозе (5 мг/кг) наблюдалась суммация эффекта, что подтверждало увеличение торможения роста опухоли (табл. 4). При более позднем начале лечения животных (на 8-й день после перевивки опухоли) и ежедневном введении препаратов в течение 5 сут (5 мг/кг хинолинового производного; 2 мг/кг МТХ) результаты были еще более демонстративны (Ca-755), но при суммарном воздействии увеличивалась также и общая токсичность (табл. 5).

Увеличение торможения роста опухоли и продолжительности жизни животных отмечено при комбинированном воздействии хлорпаллодата метилкобаламина и хинолинового производного (NSC-176319; табл. 6). Учитывая усиление действия МТХ при его комбинированном использовании с аналогами метилкобаламина и ингибитором метионинсинтетазы, мы осуществили комбинированное лечение мышей с Ca-755 с применением всех 3 ингибиторов: МТХ, хинолинового производного и наиболее активного аналога кобаламинового кофермента — хлорпаллодата метилкобаламина (см. табл. 6).

В результате комбинированного применения ингибиторов метионинсинтетазы и дигидрофолатредуктазы значительно усиливалось противоопухолевое действие, особенно в отдаленные сроки после окончания лечения. В этих условиях через 2 нед после окончания введения препаратов торможение роста опухоли составляло 85%, в то время как в группах мышей, получавших каждое из исследуемых соединений изолированно или комбинацию из 2 препаратов, в эти сроки угнетение роста

Противоопухолевое действие комбинации МТХ и аналогов метилcobаламина

Опухоль	Препарат	Доза введенных препаратов, м г/кг	Срок введения препаратов после прививки, дни	Торможение роста опухоли, % к к			
				1 день	5 дней	7 дней	10 дней
Ca-755 (C ₃₇ BL)	MTX	10	2-й и 6-й	75		10	+32
	MetCbl·PdCl ₂	250+250	2-й и 6-й	58		20	14
	MTX+MetCbl·PdCl ₂	10+250+250 (вводились одновременно)	2-6-й	97		75	0
PШM-5 (CBA)	PdCl ₂	10	2-й и 6-й	90		48	
	MTX	500	2-й и 6-й	+220		+100	
	MetCbl·PdCl ₂	10+500 (вводились одновременно)	2-й и 6-й	97		65	
Ca-755 (гибриды)	PdCl ₂	10	2-й и 6-й	87	81	45	67
	MTX	500	2-й и 6-й	+67	+5	+21	5
	CF ₃ SiCbl	10+500 (CF ₃ SiCbl, вводился за 3 ч до МТХ)	2-й и 6-й	97	99	74	67

Действие комбинированного применения МТХ и NSC-176319 на опухоли мышей

Опухоль	Препарат	Доза препаратов, мг/кг	Срок введения препарата после прививки опухоли, дни	Торможение роста опухоли			
				1 день	5 дней	7-8 дней	7-8 дней
Ca-755 (BDF ₁)	MTX	5	2-й и 6-й	46		9	19
	NSC-176319	5	2-й и 6-й	18		8	41
	MTX+NSC-176319	5+5 (вводились одновременно)	2-й и 6-й	81		62	66
PШM-5 (CBA)	MTX	10	2-й и 6-й	69			74
	NSC-176319	10	2-й и 6-й	20			55
	MTX+NSC-176319	10+10 (вводились одновременно)	2-й и 6-й	88			84
AKATOL (BALB/c)	MTX	10	2-й и 6-й	45		53	44
	NSC-176319	5	2-й и 6-й	12		27	30
	MTX+NSC-176319	10+5 (MTX вводился через 20 мин после NSC-176319)	2-й и 6-й	65		43	40

Teva – Fresenius
Exhibit 1026-00005

San
Exhibit 10

DOCKET
ALARM

Explore Litigation Insights

Docket Alarm provides insights to develop a more informed litigation strategy and the peace of mind of knowing you're on top of things.

Real-Time Litigation Alerts



Keep your litigation team up-to-date with **real-time alerts** and advanced team management tools built for the enterprise, all while greatly reducing PACER spend.

Our comprehensive service means we can handle Federal, State, and Administrative courts across the country.

Advanced Docket Research



With over 230 million records, Docket Alarm's cloud-native docket research platform finds what other services can't. Coverage includes Federal, State, plus PTAB, TTAB, ITC and NLRB decisions, all in one place.

Identify arguments that have been successful in the past with full text, pinpoint searching. Link to case law cited within any court document via Fastcase.

Analytics At Your Fingertips



Learn what happened the last time a particular judge, opposing counsel or company faced cases similar to yours.

Advanced out-of-the-box PTAB and TTAB analytics are always at your fingertips.

API

Docket Alarm offers a powerful API (application programming interface) to developers that want to integrate case filings into their apps.

LAW FIRMS

Build custom dashboards for your attorneys and clients with live data direct from the court.

Automate many repetitive legal tasks like conflict checks, document management, and marketing.

FINANCIAL INSTITUTIONS

Litigation and bankruptcy checks for companies and debtors.

E-DISCOVERY AND LEGAL VENDORS

Sync your system to PACER to automate legal marketing.