



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 639**

51 Int. Cl.:

A61K 36/65 (2006.01)

A61K 36/539 (2006.01)

A61K 36/725 (2006.01)

A61K 36/484 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01918429 .0**

96 Fecha de presentación : **08.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1401458**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54

Título: **Composición que consiste en PHY906 y agentes quimioterapéuticos.**

30

Prioridad: **09.03.2000 US 522055**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2011

73

Titular/es: **Yale University**
Two Whitney Avenue
New Haven, Connecticut 06511, US

72

Inventor/es: **Cheng, Yung-Chi y**
Liu, Shwu-Huey

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 639 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones herbarias y extractos herbarios útiles para neoplasias de cáncer. En concreto, la invención se refiere al tratamiento de enfermedad aumentando el índice terapéutico de fármacos quimioterapéuticos mediante la composición herbaria PHY906. Más en concreto, la invención se refiere al tratamiento de cáncer aumentando el índice terapéutico de fármacos quimioterapéuticos para cáncer mediante la composición herbaria PHY906.

I. Medicina herbaria

10 La medicina herbaria se ha usado durante siglos por personas en Asia y Europa. En los Estados Unidos (EEUU), las hierbas han adquirido gran valor en el mercado en la industria de complementos dietéticos así como en medicina holística. Aproximadamente un tercio de la población norteamericana ha probado alguna forma de medicina alternativa al menos una vez (Eisenberg y col., N. Engl. J. Med., 328: 246-252 (1993)). La botánica también se ha convertido en un punto clave para la identificación de nuevos agentes activos para tratar enfermedades. Los compuestos activos, derivados de extractos vegetales, son de interés continuo en la industria farmacéutica. Por ejemplo, taxol, un fármaco antineoplásico obtenido a partir de la corteza del tejo occidental, ha resultado ser útil en el tratamiento de cáncer de mama (Gomez-Espuch y col., Bone Marrow Transplant, 25(3): 231-235 (2000)).

15 Existen muchas ramas de medicina herbaria en todo el mundo, tales como Ayurveda, Unani, Sida y Medicina China Tradicional (MCT). Mientras que la medicina occidental moderna consiste típicamente en la administración de una única entidad química capaz de intervenir en una ruta bioquímica específica, cada fórmula de MCT contiene cientos de entidades químicas de varias hierbas que se diseñan para interaccionar con múltiples dianas en el cuerpo de manera coordinada. Aunque la práctica empírica contribuyó de manera significativa a la composición herbaria y prescripción de estas medicinas herbarias antiguas, también las apoyan, hasta cierto grado, un conjunto de teorías que son todas distintas a las de la medicina occidental moderna en términos de anatomía, farmacología, patología, diagnóstico, tratamiento, etc. Entre los diferentes campos de medicina herbaria, la MCT ha desarrollado un conjunto más completo de teorías durante varios siglos que han estado bien documentadas y médicos locales las han practicado cuidando de una gran población (> 1300 millones de personas) en la gran China y en Asia Oriental incluyendo Corea y Japón.

II. Medicina China Tradicional

30 La medicina occidental generalmente emplea compuestos purificados, ya sean naturales o sintéticos, principalmente dirigidos a un solo objetivo fisiológico. Sin embargo, las composiciones usadas en la MCT habitualmente se componen de múltiples hierbas y compuestos que se dirigen a múltiples dianas en el cuerpo en base a conceptos únicos y holísticos. La MCT principalmente usa productos naturales brutos procesados, con diversas combinaciones y formulaciones, para tratar diferentes conformaciones dando como resultado menos efectos secundarios. La mayoría de la población del mundo aún tiene que darse cuenta del gran potencial de la MCT.

35 En todo el mundo se emplean con frecuencia mezclas de extractos botánicos, en lugar de un único compuesto, para tratar enfermedades y están logrando de manera lenta una creciente aceptación en países occidentales (Okada, F., Lancet 348: 5-6 (1996); Xiao PG, Xing ST y Wang LW, Journal of Ethnopharmacol 38: 167-175 (1993)). El uso de medicina china tradicional se basa en la interacción de muchos componentes químicos en una preparación herbaria que actúa simultánea y sinérgicamente sobre múltiples dianas moleculares y mecanismos celulares. Estos componentes desempeñan varias funciones; algunos pueden ser responsables de la eficacia mientras que otros pueden disminuir la toxicidad o aumentar la biodisponibilidad. Quizás, las formulaciones herbarias chinas son los fármacos botánicos mejor conocidos y se han obtenido de observaciones empíricas en seres humanos a lo largo de milenios. En muchos casos, la indicación reivindicada de una determinada preparación medicinal china es múltiple en lugar de sencilla. Esto no es sorprendente debido a los múltiples ingredientes fitoquímicos en una formulación que pueden ejercer acciones en múltiples dianas. Es posible que una formulación medicinal china pueda aliviar más de un efecto secundario asociado con el uso de agentes quimioterapéuticos para cáncer.

40 Las hierbas en una prescripción típica de MCT adquieren papeles tales como hierba principal y hierbas secundarias, incluyendo hierbas ayudante, adyuvante y guía. La hierba principal produce los principales efectos en el tratamiento de la causa o el síntoma principal de una enfermedad. Una hierba ayudante ayuda a fortalecer el efecto de la hierba principal y produce efectos importantes en el tratamiento de los síntomas acompañantes. Existen tres tipos de hierbas adyuvantes: 1) las que aumentan los efectos terapéuticos de las hierbas principal y ayudante o que tratan síntomas terciarios, 2) las que reducen o eliminan la toxicidad y otros efectos secundarios de las hierbas

principal y ayudante y 3) las que actúan sobre tejidos diana complementarios no afectados específicamente por la hierba principal. Una hierba guía dirige el efecto de otras hierbas a la zona afectada y/o coordina y media los efectos de las otras hierbas en la prescripción o formulación. A diferencia de la mayoría de las medicinas o complementos herbarios que consisten en una o más partes de una única planta, los efectos que persigue la MCT se dirigen a múltiples tejidos.

Por ejemplo, una receta de MCT bien conocida, "Decocción de Efedra" usada para tratar el asma, está compuesta por efedra, rama de canela, semilla de albaricoque amargo y regaliz. La efedra, como la hierba principal, que expulsa frío, induce la diaforesis y facilita el flujo del Lung Qi para aliviar el asma, el principal síntoma. La rama de canela, como la hierba ayudante, incrementa la inducción de efedra de diaforesis y calienta los Canales para asegurar el flujo de Yang Qi para reducir el dolor de cabeza y la pantalgia. La semilla de albaricoque amargo, como la hierba adyuvante, facilita el flujo contrario del Lung Qi y fortalece el alivio del asma por efedra. El regaliz, como la hierba guía, modera los efectos tanto de la efedra y como de la canela para asegurar una homeostasis del Qi vital. Mientras que cada una de las cuatro hierbas muestra claramente su respectiva actividad, se complementan, así como suplementan, cuando se combinan. En la práctica, la hierba principal puede prescribirse con una o más hierbas secundarias, dependiendo de los síntomas en la presentación de un paciente (Prescriptions of Traditional Chinese Medicine, Capítulo Uno, págs. 10-16, E. Zhang, editor in Chief, Publishing House, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1998).

Qi se refiere la energía total del cuerpo. Las hierbas se usan para conseguir el equilibrio óptimo de Qi; se cree que este equilibrio se manifiesta en sí mismo en la salud y el vigor general del paciente (K. C. Huang, The Pharmacology of Chinese Herbs, Segunda Edición, Página 2, 1999, CRC Press).

Las principales teorías de la MCT que orientan el tratamiento de enfermedades con medicina herbaria y otros medios, tales como acupuntura, son 1) la teoría del Yin y el Yang; 2) la teoría de los Cinco Elementos; 3) la teoría de las Visceras y los Intestinos; 4) la teoría de Qi, Sangre y Fluido Corporal; y 5) la teoría de los Canales y Colaterales.

En la MTC, el primer aspecto importante para realizar el diagnóstico adecuado es distinguir si la enfermedad es Yin o Yang, las dos fuerzas que los chinos creen que controlan el funcionamiento del universo. Yin representa el lado femenino de la naturaleza, que incluyen oscuridad, tranquilidad, profundidad, frío y humedad, mientras que Yang representa un principio masculino, que incluye luz, actividad, altura, calor y sequedad (K. C. Huang, The Pharmacology of Chinese Herbs, Segunda Edición, Página 2, 1999, CRC Press). Yin normalmente se interpreta como una fuerza negativa, mientras que yang representa una fuerza positiva. Las dos fuerzas son complementarias, y ninguna de ellas puede existir sin la otra. Por lo tanto, la MCT intenta conseguir un equilibrio entre Yin y Yang.

Al diagnosticar a un paciente en base a la filosofía del Yin y Yang, los pacientes que tienen fiebre, están sedientos, estreñidos o tienen el pulso rápido son de carácter Yang. Los individuos que tienen una aversión al frío, no están sedientos y tienen diarrea y un estado de pulso lento son de carácter Ying. La propiedad, sabor y función de las hierbas también pueden clasificarse de acuerdo con la teoría del Yin y Yang. Por ejemplo, las hierbas de naturaleza fría y fresca pertenecen a Yin, mientras que las hierbas que son de naturaleza templada y caliente pertenecen al Yang. Las hierbas con sabor ácido, amargo y salado pertenecen a Yin, mientras que las hierbas con sabor picante, dulce y soso pertenecen a Yang. Las hierbas con función astringente y remitente pertenecen a Yin, mientras que las hierbas con función dispersante, ascendente o flotante pertenecen a Yang. En la MCT, los principios del tratamiento se basan en el predominio o debilidad de Yin y Yang. Las hierbas se prescriben de acuerdo con su propiedad de Yin y Yang y su función para restablecer el desequilibrio del Ying y Yang. Actuando de este modo se consigue el beneficio del tratamiento.

De acuerdo con la teoría de los Cinco Elementos hay cinco sustancias básicas que constituyen el mundo material (es decir, madera, fuego, tierra, metal y agua). En la MCT, esta teoría se ha usado para explicar la fisiología y patología del cuerpo humano y para guiar el diagnóstico clínico y el tratamiento. Los médicos que trabajan con hierbas han aplicado las leyes de generación, restricción, subyugación y restricción inversa de los cinco elementos para desarrollar muchos regímenes de tratamiento eficaces y específicos, tales como reforzar la tierra para generar metal (fortalecer la función del bazo para beneficiar al pulmón), reponer agua para nutrir a la madera (nutrir la esencia del riñón para beneficiar al hígado), sostener la tierra para restringir la madera (complementar la función del bazo para tratar la hiperactividad del hígado) y reforzar el agua para controlar el fuego (reponer la esencia del riñón para tratar hiperactividad del corazón). En concreto, la propiedad de algunas hierbas se asigna a cada uno de los cinco Elementos con el fin de guiar la prescripción de una receta de MCT.

En la MCT, los órganos internos del cuerpo humano se dividen en tres grupos: cinco Vísceras (el Corazón, el Hígado, el Bazo, el Pulmón y el Riñón), Seis Intestinos (la Vesícula Biliar, el Estómago, el Intestino Grueso, el Intestino Delgado, la Vejiga Urinaria y el Triple Calentador), los Órganos Extraordinarios (el Cerebro, la Médula, el

Hueso, el Vaso Sanguíneo, la Vesícula Biliar y el Útero). En la MCT, las Vísceras o los Intestinos no sólo son unidades anatómicas, sino que también son conceptos de fisiología y patología que conciernen interacciones entre diferentes órganos. Por ejemplo, el corazón también se refiere a algunas de las funciones mentales y tiene influencia en funciones de la sangre, pelo, lengua y piel. Yin y Yang y los Cinco Elementos tienen influencia en las interacciones entre estos órganos internos, Vísceras, Intestinos y Órganos Extraordinarios. La complejidad de la interacción de estas teorías se usa para explicar la patología de enfermedades para las que se prescriben las hierbas, tal y como se analiza a continuación.

La prescripción de medicina herbaria en MCT comienza con el diagnóstico, que consiste en cuatro aspectos principales: interrogatorio, inspección, auscultación y olfacción, toma de pulso y palpación. Durante la fase de interrogatorio se reúne mucha información, incluyendo las características de los principales síntomas. Por ejemplo, si el síntoma principal se caracteriza por el dolor sordo de la región epigástrica, que puede aliviarse mediante calor y presión, esto sugiere la insuficiencia del Bazo-Yang. El dolor y la debilidad de los lomos y las rodillas, intolerancia al frío con extremidades frías manifiestan una debilidad del Riñón-Yang. Durante la inspección se realizan observaciones sobre la vitalidad, el color de la piel y la apariencia general y el estado de la lengua. Por ejemplo, una complexión pálida corresponde internamente al Pulmón de otoño, cuyo Qi está seco. Esto puede ocurrir cuando Yang Qi está ausente y se impide la circulación de Qi y sangre, o cuando el frío en los canales y colaterales provoca que se contraigan.

En la MCT, es de Qi, sangre y fluido corporal de donde viene la energía necesaria para las Vísceras e Intestinos, Canales y Colaterales, tejidos y otros órganos para llevar a cabo sus funciones fisiológicas; y la formación y metabolismo de Qi, sangre y fluido corporal depende de ellos. Las prescripciones de la MCT consideran los efectos herbarios en Qi y sangre para los tratamientos.

La MCT sostiene que los Canales, Colaterales y sus partes secundarias se distribuyen por todo el cuerpo. Es a través de éstos por lo que las hierbas ejercen influencia sobre las dianas patológicas y consiguen la mejora de la enfermedad. Por ejemplo, efedra actúa sobre los Canales del Pulmón y de la Vejiga Urinaria de modo que provoca sudor para aliviar el asma y promover la diuresis. Tal y como se ha señalado previamente, las aplicaciones clínicas de la acupuntura también se guían por la teoría de Canales y Colaterales.

En resumen, aunque la naturaleza o propiedad de cada hierba en la MCT puede asignarse como Yin o Yang, y a uno de los Cinco Elementos, actúan a través de Canales y Colaterales y están mediadas por Qi, Sangre y Fluido para producir efectos terapéuticos sobre las dianas, tales como Vísceras o Intestinos. Los factores patógenos pueden disfrazarse de señuelos en los mismos sistemas de Canales y Colaterales para afectar de manera negativa a las funciones de las Vísceras e Intestinos y causar de este modo enfermedad.

III. Patentes de Composiciones Herbarias en Estados Unidos

Se han expedido Patentes de Estados Unidos para composiciones herbarias usadas para el tratamiento de diversas enfermedades y otros problemas relacionados con la salud que afectan a mamíferos, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, las composiciones herbarias que incluyen *Paeonia suffruticosa* han resultado ser útiles para tratar infecciones virales, que incluyen la infección de virus del herpes y de la polio (Patente de Estados Unidos N° 5.411.733).

La inflamación ocular puede tratarse con una composición farmacéutica que contiene el alcaloide vegetal tetrandina (Patente de Estados Unidos N° 5.627.195). La Patente de Estados Unidos N° 5.683.697 desvela una composición farmacéutica que tiene acción anti-inflamatoria, anti-febril, expectorante o anti-tusiva, en la que la composición incluye partes vegetales de las especies *Melia*, *Angepica*, *Dendrobium*, *Impatiens*, *Citrus*, *Loranthus*, *Celosia*, *Cynanchum* y *Glehnia*. Se ha observado que una formulación herbaria que contiene extractos de las raíces, rizomas y/o vegetación de *Alphinia*, *Smilax*, *Tinospora*, *Tribulus*, *Withania* y *Zingiber* reduce o alivia los síntomas asociados con artritis reumatoide, osteoartritis y artritis reactiva y reduce la producción de citocinas proinflamatorias (Patente de Estados Unidos N° 5.683.698). Las composiciones que contienen talco, excremento de gusano de seda y los ingredientes de doce hierbas diferentes han demostrado ser eficaces reduciendo inflamación, dolor y fiebre en mamíferos (Patente de Estados Unidos N° 5.908.628).

También se han expedido patentes para composiciones herbarias que se usan en el tratamiento de cáncer y problemas de salud relacionados con el cáncer. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.437.866 desvela una composición que comprende una mezcla de hierbas, incluyendo especies de *Scutellaria barbata*, así como sus extractos, que se usa para reducir los efectos de tumor maligno en seres humanos. La Patente de Estados Unidos N° 5.665.393 desvela diversas composiciones herbarias que incluyen *Glycyrrhiza glabra* L. y *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Rabdosia rubescens* y *Serenoa repens* para el tratamiento de carcinoma de próstata. Además, las composiciones herbarias antitumorales incluyen *Astragali radix*, *Paeonia radix*, *Cinnamomi cortex*, *Rhemannia radi* y

Glycyrrhizae radix para su uso para aumentar la actividad antitumoral de mitomicina D y doxorubicina (Patente de Estados Unidos N° 4.613.591 y Patente de Estados Unidos N° 4.618.495).

IV. Efectos Adversos de Quimioterapia del Cáncer

5 La oncología médica ha tenido un gran impacto en el cambio de la práctica de la medicina en las últimas décadas, ya que se han identificado tratamientos curativos para una diversidad de tumores malignos anteriormente mortales. Sin embargo, pocas categorías de fármacos de uso común poseen un índice terapéutico más estrecho y un mayor potencial para causar efectos secundarios perjudiciales que los fármacos antineoplásicos (Calabresi y Chabner, 1996).

10 Los agentes anticancerosos, como muchos otros fármacos potentes con selectividad solamente moderada, pueden provocar toxicidad grave. Los efectos adversos comunes asociados con quimioterapia del cáncer incluyen, pero sin limitación, complicaciones gastrointestinales (por ejemplo, diarrea, náuseas, vómitos, anorexia y mucositis), dolor, pérdida del apetito, complicaciones de la médula ósea/hematológicas (por ejemplo, leucopenia, neutropenia, anemia, hemorragia y trombocitopenia), fatiga y trastorno del sueño.

15 Los inventores de la presente invención llevaron a cabo una búsqueda bibliográfica de formulaciones medicinales chinas que se han usado para el tratamiento de síntomas asociados con quimioterapia del cáncer. TJ-14, una formulación botánica con siete hierbas, demostró prevenir de manera potente diarrea causada por CPT-11 en pacientes con cáncer (Kase, Y, Hayakawa T y Aburada M. y col., Jpn. J. Pharmacol. 75, 407-413 (1997); Marita M., Nagai E y Hagiwara H. y col., Xenobiotica. 23, 5-10 (1993)). Se propuso que la diarrea ocurría por la acumulación de SN-38, un metabolito activo de CPT-11, creado por microorganismos intestinales. Los inventores creen que la baicalina, un inhibidor de la β -glucuronidasa, es el principio activo en TJ-14 que alivia la diarrea provocada por CPT-11 (Kase, Y, Hayakawa, T y Aburada M. y col., Jpn. J. Pharmacol. 75, 407-413 (1997); Marita M., Nagai E y Hagiwara H. y col., Xenobiotica. 23, 5-10 (1993); Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, y col., Cancer Chemother Pharmacol. 42: 280-286 (1998); Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, Kato M, y col., Cancer Res. 56: 3752-3757 (1996)). Por lo tanto, se evaluaron varias formulaciones herbarias chinas que contienen la raíz de *Scutellaria baicalensis Georgi*, que es rica en baicalina. Entre varias formulaciones examinadas en el laboratorio, los inventores eligieron PHY906. Esta formulación específica se estableció hace más de 1500 años para el tratamiento de diarrea, espasmos abdominales, fiebre, dolor de cabeza, vómitos, náuseas, sed extrema y distensión subcardial (Shang Han Lun de la Dinastía Han; Hong-Yen Hsu y Chau-Shin Hsu, Commonly used Chinese Herb Formulas with Illustrations, Oriental Healing Art Institute, California, (1980)). PHY906 consiste en cuatro hierbas con una proporción de *Scutellaria baicalensis Georgi* (escutelaria), *Paeonia lactiflora pall* (raíz de peonía blanca), *Glycyrrhizae uralensis Fisch* (regaliz) y la fruta de *Fructus ziziphi* (dátil) mezcladas en las proporciones 1,5: 1,0: 1,0: 1,0 por peso seco, respectivamente. Debe señalarse que cada hierba posee un perfil farmacológico distinto que incluye actividad anticancerígena y antiviral, estimulación hematológica e inmunológica, actividad analgésica, vasodilatación, protección del hígado, antioxidación y mejora del apetito, tal y como se muestra en la Tabla 1.

35

TABLA 1. Supuestas Actividades Biológicas de Hierbas Individuales en la Formulación PHY906

	Anti-cancerosa	Inmuno-Modulación	Anti-Bacteriana	Anti-inflamatoria	Sistema Nervioso	Otros
Scutellaria baicalensis Georgi	+	+ ↑↓ actividad bifuncional de linfocitos y macrófagos	+	+	-	antiviral, antibacteriana, antidiarreica, diurética, vasodilatación, ↓ lípido, anticoagulación, antioxidante, antiemética, protección del hígado
Paeonia lactiflora pall	+	+ ↑↓ modulador bifuncional de actividad de macrófagos	+	+	+ analgésico	vasodilatación, protección de hígado, diurética, anticoagulación, ↓ movimiento intestinal
Fructus ziziphi	+	+ Acción anti IgE	-	-	+ ↑ sueño	protección del hígado, resistencia muscular, mejora de apetito
(Cont)						
Glycyrrhiza uralensis Fisch	+	+ ↑ actividad de macrófago ↑ interferón y ↑ IL-1 ↑ linfocito ↑ interferón y ↑ IL-2 ↑ actividad de NK ↓ IgE	+	+	+ analgésico	antidiurética ↓ movimiento intestinal ↓ lípido (LDL, TC) Antioxidante antiviral anticoagulación anticomplemento
↑: aumento	↓: descenso	↑↓: aumento o descenso	+: efecto	-: sin efecto		

5 Hasta ahora, PHY906 se ha prescrito únicamente como una sola medicina en lugar de en combinación con fármacos sintéticos. Sin embargo, se puede concebir que uno de los usos documentados de PHY906 pueda ser realmente útil para aliviar los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia. Aunque se han identificado algunos de los principales componentes químicos en cada una de las cuatro hierbas de PHY906 y se han examinado sus actividades farmacológicas (Chinese Botany Shanghai Science and Technology Publishing Company (1999); Huang, H-C, Wang, H-R y Hsieh, L-M., Eur J of Pharmacol 251: 91-93 (1994); Lin, C-C y Shieh, Am J Chinese Med 1: 31-36 (1996); Tang, W. y Eisenbrand, G., Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine págs. 919-929. Springer-Verlag Press, Nueva York (1992)), las propiedades biológicas de PHY906 no se pueden predecir por completo por los ingredientes identificados.

5 Las medicinas Kampo han demostrado tener ciertos efectos sobre la diarrea inducida por CPT-11. Sin embargo, las medicinas Kampo no contienen Paeonia. En concreto, Narita M y col. (Xenobiotica, 1993, 23 (1), 5-10) desvelaron que las medicinas *Kampo* contienen glucurónidos naturales e investigaron la inhibición de β -glucuronidasa por glucurónidos naturales. Narita M y col. también contemplaron que la inhibición de β -glucuronidasa puede reducir la diarrea causada por CPT-11 (irinotecano). Mori K y col. (Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, 1998, 25 (8), 1159-63) desvelaron que una medicina *Kampo* (TJ-14) redujo la aparición de diarrea inducida por irinotecano. Takasuna Kiyoshi y col. (Japanese Journal of Cancer Research, 1995, 86 (10), 978-984) desvelaron el efecto de la medicina *Kampo* sobre síntomas diarreicos crónicos inducidos por CPT-11. Además, Takasuna Kiyoshi y col. desvelaron las composiciones de medicinas Kampo (TJ-14 y TJ-114) en la Tabla I. De acuerdo con la Tabla 1, TJ-14 consiste en 7 hierbas diferentes que incluyen *Scutellariae radix*, *Glycyrrhizae radix* y *Zizyphi fructus*, y TJ-114 consiste en 12 hierbas diferentes que incluyen *Scutellariae radix*, *Glycyrrhizae radix* y *Zizyphi fructus*.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 Los inventores de la presente invención han descubierto de manera inesperada que la composición herbaria PHY906 puede usarse en diversos procedimientos para incrementar el índice terapéutico de uno o más compuestos quimioterapéuticos y para modular la actividad hematopoyética.

20 La presente invención proporciona la composición herbaria PHY906 combinada con un portador farmacéuticamente aceptable y de manera opcional incluye uno o más compuestos quimioterapéuticos. Las cuatro especies de plantas que se eligen para preparar una formulación particular de PHY906 se seleccionan individualmente de uno de los cuatro grupos diferentes de hierbas: *Scutellaria*, *Regaliz*, *Peonia Alba* y *Fruta Ziziphi*. Las hierbas se eligen para obtener uno o más de los atributos deseables de PHY906, incluyendo dichos atributos, aunque sin limitación, aumentar el índice terapéutico de uno o más compuestos quimioterapéuticos, mejorar la actividad antitumoral de uno o más compuestos quimioterapéuticos.

25 Los compuestos o agentes quimioterapéuticos abarcados por la presente invención incluyen, aunque sin limitación, los útiles para tratar cáncer.

Las composiciones y procedimientos de la presente invención son útiles para tratar cualquier mamífero. Más en concreto, los procedimientos de la presente invención son útiles para tratar seres humanos.

30 La presente invención proporciona además composiciones que incluyen un portador farmacéuticamente aceptable; material o producto químico de una especie vegetal de cada uno de los siguientes géneros de hierbas: *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*; y uno o más compuestos quimioterapéuticos. Preferentemente, la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable, una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* y una formulación quimioterapéutica que comprende uno o más agentes quimioterapéuticos o antivirales. Más preferentemente, la preparación herbaria comprende material o productos químicos de *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*. Aún más preferentemente, la presente invención proporciona tales composiciones que incluyen *Scutellaria baicalensis*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Ziziphus jujuba* y *Paeonia lactiflora*.

40 Las composiciones herbarias de la presente invención son particularmente útiles con quimioterapias para el cáncer, tales como, sin limitación, tratamiento con una formulación de irinotecano (CPT-11, Campostar®), 5-fluorouracilo (FU o 5-FU), VP-16, beta-L-Dioxolano-citidina (L-OddC), leucovorina (LV) y combinaciones de los mismos, tales como, pero sin limitación, FU/LV y CPT-11/FU/LV.

45 La presente invención proporciona procedimientos para aumentar el índice terapéutico de compuestos terapéuticos de cáncer usados en el tratamiento de cáncer. Más en concreto, la presente invención proporciona dichos procedimientos que incluyen la administración de uno o más agentes anticancerosos en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y material o producto químico o una preparación herbaria que comprende una especie vegetal de cada uno de los siguientes géneros de hierbas: *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*. Los procedimientos de la presente invención proporcionan el uso de un material o un producto químico o una preparación herbaria que comprende dichas hierbas que están forma de un extracto granulado de un licor acuoso concentrado. Dichas composiciones pueden estar en forma ingerible, tal como, pero sin limitación, polvos, cápsulas, líquidos y comprimidos. Como alternativa, los procedimientos de la presente invención usan tales composiciones en forma de supositorio.

50 La presente invención también proporciona procedimientos para tratar enfermedades en mamíferos que necesitan tal tratamiento que incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable; material o producto químico o una preparación herbaria que comprende una especie vegetal de cada uno de los siguientes géneros de hierbas: *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*,

Ziziphus y *Paeonia*; y uno o más compuestos quimioterapéuticos.

Además, la presente invención proporciona procedimientos para tratar enfermedades en un mamífero que necesite tal tratamiento que incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterapéuticos y una composición que incluye un portador farmacéuticamente aceptable; material o producto químico o una preparación herbaria que comprende una especie vegetal de cada uno de los siguientes géneros de hierbas: *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*. La presente invención incluye tales procedimientos en los que la composición se administra antes de la administración de uno o más compuestos quimioterapéuticos. La presente invención también incluye tales procedimientos en los que la composición se administra después de la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos.

La presente invención contempla la administración de una formulación quimioterapéutica que comprende uno o más agentes quimioterapéuticos en combinación con una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una preparación herbaria que comprende una especie vegetal de cada uno de los siguientes géneros de hierbas: *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*.

La presente invención usa las composiciones herbarias desveladas para aumentar la actividad antitumoral de los agentes quimioterapéuticos, disminuyendo la toxicidad del agente quimioterapéutico.

En un aspecto, la presente invención desvela un tratamiento que comprende un régimen quimioterapéutico que comprende uno o más compuestos terapéuticos y una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*.

Además, la presente invención proporciona un régimen terapéutico que comprende uno o más compuestos quimioterapéuticos y una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*.

Adicionalmente, la presente invención desvela regímenes quimioterapéuticos y composiciones que comprenden tres compuestos quimioterapéuticos, preferentemente CPT-11, FU y LV y una composición herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* o material o producto químico de una especie vegetal de cada uno de los siguientes géneros de hierbas *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto sobre Dosificación Diferente de CPT-11 en Ratones BDF-1 Sin Tumor. Se administró CPT-11 por vía intraperitoneal (i.p) solamente el día 0 (N=5 en cada grupo).

Figura 2. Efecto de PHY906 sobre el Peso Corporal en Ratones BDF-1 Tratados con CPT-11 que tienen Tumor de Colon 38. Se administró CPT-11 (400 mg/kg) por vía intraperitoneal solamente el día 0. PHY906 se administró por vía oral dos veces al día durante 8 días comenzando el día 0 en la dosis indicada (N=5 en cada grupo).

Figura 3. Efecto de PHY906 sobre el Crecimiento Tumoral en Ratones BDF-1 Tratados con CPT-11 que tienen Tumor de Colon 38. Se administró CPT-11 (400 mg/kg) por vía intraperitoneal solamente el día 0. PHY906 (500 mg/kg) se administró por vía oral dos veces al día durante 8 días comenzando el día 0. Los valores p se calcularon usando el ensayo t de Student pareado.

Figura 4. Efecto de PHY906 sobre el Cambio Hematológico en Ratones BDF-1 Tratados con CPT-11 que tienen Tumor de Colon 38 (N=5 en cada grupo). Se administró CPT-11 (400 mg/kg) por vía intraperitoneal solamente el día 0. PHY906 (500 mg/kg) se administró por vía oral dos veces al día durante 4 días comenzando el día 0 (N=5 en cada grupo).

Figura 5. Efecto de PHY906 sobre el Peso Corporal en Ratones BDF-1 Tratados con FU/LV que tienen Tumor de Colon 38. Se administró secuencialmente LV (100 mg/kg) y FU (100 mg/kg) por vía intraperitoneal durante un periodo de 1 hora solamente el día 0, tal y como se describe en Materiales y Procedimientos. PHY906 se administró por vía oral 30 min después de una dosis inicial de LV el día 0 y continuó dos veces al día durante 4 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 6. Efecto de PHY906 sobre el Crecimiento Tumoral en Ratones BDF-1 Tratados con FU/LV que tienen Tumor de Colon 38. Se administró secuencialmente LV (100 mg/kg) y FU (100 mg/kg) por vía intraperitoneal durante un periodo de 1 hora solamente el día 0, tal y como se describe en Materiales y Procedimientos. PHY906 se administró por vía oral 30 min después de una dosis inicial de LV el día 0 y continuó dos veces al día durante 4 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 7. Efecto de PHY906 sobre el Cambio Hematológico en Ratones BDF-1 Tratados con FU/LV que tienen Tumor de Colon 38. Se administró secuencialmente LV (100 mg/kg) y FU (100 mg/kg) por vía intraperitoneal durante un periodo de 1 hora solamente el día 0, tal y como se describe en Materiales y Procedimientos. PHY906 se administró por vía oral 30 min después de una dosis inicial de LV el día 0 y continuó dos veces al día durante 4 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 8. Efecto de PHY906 sobre el Crecimiento Tumoral en Ratones BDF-1 Tratados con CPT-11/FU/LV que tienen Tumor de Colon 38. Se administró secuencialmente LV (100 mg/kg), CPT-11 (200 mg/kg) y FU (100 mg/kg) por vía intraperitoneal durante un periodo de 1 hora solamente el día 0, tal y como se describe en Materiales y Procedimientos. PHY906 se administró por vía oral 30 min después de una dosis inicial de LV el día 0 y continuó dos veces al día durante 4 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 9. Efecto de PHY906 sobre el Crecimiento Tumoral en Ratones BDF-1 Tratados con CPT-11/FU/LV que tienen Tumor de Colon 38. Se administró secuencialmente LV (100 mg/kg), CPT-11 (300 mg/kg) y FU (100 mg/kg) por vía intraperitoneal durante un periodo de 1 hora solamente el día 0, tal y como se describe en Materiales y Procedimientos. PHY906 se administró por vía oral 30 min después de una dosis inicial de LV el día 0 y continuó dos veces al día durante 4 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 10. Efecto de PHY906 sobre el Cambio de Peso Corporal en Ratones BDF-1 Tratados con CPT-11/FU/LV que tienen Tumor de Colon 38. Se administró secuencialmente LV (100 mg/kg), CPT-11 (300 mg/kg) y FU (100 mg/kg) por vía intraperitoneal durante un periodo de 1 hora solamente el día 0, tal y como se describe en Materiales y Procedimientos. PHY906 se administró por vía oral 30 min después de una dosis inicial de LV el día 0 y continuó dos veces al día durante 4 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 11. Efecto de PHY906 sobre el Crecimiento Tumoral en Ratones Desnudos NCr Tratados con CPT-11 que tienen Tumor Humano HepG2. Se administró CPT-11 (200 mg/kg) por vía intraperitoneal solamente el día 0. PHY906 se administró por vía oral 30 min antes que CPT-11 el día 0 y continuó dos veces al día durante 8 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 12. Efecto de PHY906 sobre el Peso Corporal en Ratones Desnudos NCr Tratados con CPT-11 que tienen Tumor Humano HepG2. Se administró CPT-11 (200 mg/kg) por vía intraperitoneal solamente el día 0. PHY906 se administró por vía oral 30 min antes que CPT-11 el día 0 y continuó dos veces al día durante 8 días a 500 mg/kg (N=5 en cada grupo).

Figura 13. Efecto antitumoral de L-OddC con PHY906 sobre Ratones BDF-1 que tienen Colon 38. Cinco ratones hembra BDF-1 (8-10 semanas de edad, peso medio aproximadamente 20 g) se sometieron a inyección subcutánea con células tumorales de Colon 38. Solamente se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de L-OddC (beta-L-Dioxolano-citidina 25 mg/kg, q.d.X5) el día cero. PHY906 se administró por vía oral (1 g/kg, b.i.d) el día cero y en una base diaria hasta la finalización del experimento (q.d es una abreviatura de "quaque die" que significa una vez al día, q.d.X5 significa que uno de los cinco ratones recibió la dosis una vez al día; b.i.d es una abreviatura de "bis in die", que significa dos veces al día). El peso del tumor se calculó tal y como se describe en Materiales y Procedimientos.

Figura 14. Efecto antitumoral de VP-16 con PHY906 sobre Ratones BDF-1 que tienen Colon 38. Cinco ratones hembra BDF-1 (8-10 semanas de edad, peso medio aproximadamente 20 g) se sometieron a inyección subcutánea con células tumorales de Colon 38. Solamente se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de VP-16 (etopósido 25 mg/kg, q.d.X5) el día cero. PHY906 se administró por vía oral (1 g/kg, b.i.d) el día 0 y en una base diaria hasta la finalización del experimento. El peso del tumor se calculó tal y como se describe en Materiales y Procedimientos.

Figura 15. Efecto antitumoral de 5-Fluorouracilo (FU) con PHY906. Cinco ratones hembra BDF-1 (8-10 semanas de edad, peso medio aproximadamente 20 g) se sometieron a inyección subcutánea con células tumorales de Colon 38. Solamente se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de FU (250 mg/kg) el día cero. PHY906 se administró por vía oral (1 g/kg, b.i.d) el día cero y en una base diaria hasta la finalización del experimento. El peso del tumor se calculó tal y como se describe en Materiales y Procedimientos.

Figura 16. Efecto antitumoral de 5-Fluorouracilo (FU) con PHY906. Cinco ratones hembra BDF-1 (8-10 semanas de edad, peso medio aproximadamente 20 g) se sometieron a inyección subcutánea con células tumorales de Colon 38. FU (30 mg/kg, q.d. X5) se inyectó por vía intraperitoneal diariamente. PHY906 se administró por vía oral (1 g/kg, b.i.d) el día 0 y en una base diaria hasta la finalización del experimento. El peso del tumor se calculó tal y como se describe en Materiales y Procedimientos.

Figura 17. Efecto antitumoral de CPT-11 con PHY906 frente a Loperamida sobre Ratones BDF-1 que tienen Colon 38. Cinco ratones hembra BDF-1 (8-10 semanas de edad, peso medio aproximadamente 20 g)

se sometieron a inyección subcutánea con células tumorales de Colon 38. Los ratones no recibieron ningún tratamiento, solamente PHY906, solamente CPT-11, CPT-11 y PHY906 o solamente Loperamida. PHY906 y CPT-11 se administraron tal y como se establece en la Figura 3. Solamente una dosis de Loperamida se inyectó por vía intraperitoneal (2 mg/kg, p.o (administración oral), b.i.d.) el día cero. El peso del tumor se calculó tal y como se describe a continuación en Materiales y Procedimientos.

Figuras 18A-C. Farmacocinética de CPT-11/FU/LV en Plasma. PHY906-6 es el lote clínico de PHY906. SN-38 es un metabolito activo de CPT-11. FUR+FUMP son metabolitos de nucleósido y nucleótido de FU.

Figuras 19A-C. Farmacocinética de CPT-11/FU/LV en Hígado. PHY906-6 es el lote clínico de PHY906. SN-38 es un metabolito activo de CPT-11. FUR+FUMP son metabolitos de nucleósido y nucleótido de FU.

Figuras 20A-B. Farmacocinética de CPT-11/FU/LV en Tumor. PHY906-6 es el lote clínico de PHY906. SN-38 es un metabolito activo de CPT-11.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

Los agentes quimioterapéuticos del cáncer a menudo inducen efectos secundarios adversos graves que pueden afectar a la calidad de vida del paciente así como interferir con el régimen terapéutico. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que las medicinas herbarias chinas en combinación con agentes anticancerosos convencionales son útiles para reducir los efectos secundarios adversos de agentes quimioterapéuticos de cáncer y para mejorar la calidad de vida de pacientes sometidos a quimioterapia. PHY906, una formulación botánica compuesta por cuatro hierbas diferentes, se ha usado durante siglos en China en el tratamiento de diversas dolencias gastrointestinales y otras enfermedades. La presente invención se basa en los resultados de experimentos llevados a cabo en modelos animales evaluando la eficacia potencial de PHY906 en el alivio de efectos secundarios inducidos por los agentes quimioterapéuticos de cáncer en pacientes con cáncer colorrectal. En concreto, la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que PHY906 reduce diversas toxicidades de huésped inducidas por el tratamiento con CPT-11, FU, FU/LV, CPT-11/FU/LV, L-OddC, VP-16 o CPT-11/loperamida, y mantiene e incluso potencia la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos. Más específicamente, PHY906 mejora el índice terapéutico de CPT-11, y una triple combinación de CPT-11/FU/LV potenciando los efectos antitumorales de los agentes terapéuticos y reduciendo diversas toxicidades de huésped. Estos descubrimientos no se limitan a un agente anticanceroso concreto ni a un modelo de tumor concreto.

La presente invención también se basa en parte en el descubrimiento de un régimen que puede usarse junto con diversos agentes anticancerosos para disminuir la toxicidad que limita la dosis y para aumentar la eficacia de los agentes. Este descubrimiento es una adición extremadamente importante al arsenal de técnicas de tratamiento dirigidas a cánceres humanos.

I. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos habituales en la técnica a los que pertenece la presente invención. Aunque cualquier procedimiento o material similares a los en descritos el presente documento pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferentes.

Tal y como se usa en el presente documento, “quimioterapéutico de cáncer” o “agente quimioterapéutico de cáncer” se refiere a un agente quimioterapéutico para el tratamiento de enfermedad neoplásica o cáncer.

Tal y como se usa en el presente documento, “quimioterapia” se refiere al tratamiento de enfermedad por medio de sustancias químicas o fármacos.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión “formulación quimioterapéutica” se refiere a una composición que comprende un agente quimioterapéutico.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “extracto” se refiere a una preparación concentrada de un fármaco vegetal o animal obtenido retirando los componentes activos del mismo con un disolvente, evaporando todo o casi todo el disolvente y ajustando la masa o polvo residual a un patrón prescrito. Los extractos se preparan de tres formas, semilíquida o de consistencia de jarabe, granular o sólida, y como un polvo seco (véase <http://www.graylab.ac.uk/cgi-bin/omd?query=extract>).

En una realización, los extractos son formas concentradas de fármacos brutos usados en una diversidad de formas de dosificación sólida y semisólida (en Remington’s Pharmaceutical Sciences 17^a ed. (Gennaro, ed), Capítulo 84, págs. 1516-1517, Mack Publishing Co, Easton, PA (1985)). Por ejemplo, los extractos granulados (por ejemplo,

5 masas plásticas) tienen una consistencia que les hace adecuados para masas de píldoras y se convierten en píldoras (por ejemplo, extracto puro de *Glycyrrhiza* USP). Además, las masas granulares son muy adecuadas para su uso en pomadas y supositorios. Los extractos en polvo se adecuan mejor a formulaciones en polvo tales como cápsulas, polvos y comprimidos. Además, los extractos semilíquidos o de consistencia de jarabe pueden usarse en la fabricación de preparaciones farmacéuticas (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985).

10 En un aspecto relacionado, los extractos pueden considerarse soluciones de principios activos obtenidos poniendo en remojo o macerando preparaciones de fármacos brutos vegetales o animales en líquidos (maceración) o pasando dichos fármacos brutos a través de sustancias porosas (percolación) para su uso como un agente medicinal. Además, los agentes medicinales de este tipo pueden estar en forma de tinturas o extractos fluidos [sic] (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985).

15 En una realización, el extracto está en forma de tintura. Por ejemplo, las tinturas pueden incluir, aunque sin limitación, soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas preparadas a partir de material vegetal o a partir de sustancias químicas. Las tinturas pueden realizarse mediante percolación o maceración y normalmente la potencia se asigna por la cantidad de actividad de un peso especificado del fármaco (en gramos) por 100 ml de tintura (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985). Por ejemplo, la Tintura de Piel de Naranja Dulce contiene 50 g de piel de naranja dulce por 100 ml de tintura.

20 En otra realización, el extracto está en forma de extracto fluido [sic]. Por ejemplo, los extractos fluidos incluyen, aunque sin limitación, preparaciones líquidas de fármacos vegetales que comprenden alcohol como el disolvente o como un conservante, o ambos, donde normalmente cada ml contiene el constituyente terapéutico de 1 gramo del fármaco que representa. Los extractos fluidos pueden hacerse por percolación como un procedimiento general (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985).

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "actividad hematológica" se refiere a la actividad asociada a la sangre y a los órganos que forman la sangre.

25 Técnicamente hablando, el término "hierba" se refiere a una planta pequeña, no leñosa (es decir, con el tallo carnoso), caduca o perenne que contiene semillas en la que todas las partes aéreas mueren al finalizar cada estación floreciente. Las hierbas se evalúan por sus cualidades medicinales, de sabor o aroma. Como la palabra se usa de manera más general y como la palabra se usa en el presente documento, una "hierba" se refiere a cualquier planta o parte vegetal que tiene un uso como complemento alimenticio, medicina, fármaco, terapéutico o para la mejora de vida. Por lo tanto, tal y como se usa en el presente documento, una hierba no se limita a la definición botánica de una hierba sino a cualquier material botánico, planta o parte vegetal usada para dichos fines, incluyendo cualquier planta o parte vegetal de cualquier especie o subespecie vegetal del reino Metaphyta, que incluye hierbas, arbustos, subarbustos y árboles. Las partes vegetales usadas en composiciones herbarias incluyen, aunque sin limitación, semillas, hojas, tallos, ramitas, ramas, brotes, flores, bulbos, granos, tubérculos, rizomas, estolones, raíces, frutos, piñas, bayas, cámbium y corteza.

35 Tal y como se usa en el presente documento, una "composición o formulación herbaria" se refiere a cualquier composición o formulación que incluye hierbas, plantas herbarias, partes vegetales herbarias y/o extractos herbarios. Por lo tanto, tal y como se usa en el presente documento, una composición o formulación herbaria incluye la preparación herbaria que comprende complementos alimenticios herbarios, medicinas herbarias, fármacos herbarios y alimentos médicos. Los ejemplos de composiciones herbarias incluyen, pero sin limitación, los siguientes componentes: una planta entera o una parte vegetal de una única especie vegetal; plantas enteras o partes vegetales de múltiples especies vegetales; componentes múltiples derivados de una única especie vegetal; componentes múltiples derivados de múltiples especies vegetales; extractos herbarios o cualquier combinación de estos diversos componentes. También se consideran las composiciones herbarias que comprenden uno o más productos químicos de una única o de muchas especies vegetales.

45 Para una revisión profunda de diversas composiciones herbarias véase, por ejemplo, Kee Chang Huang, The Pharmacology of Chinese Herbs, CRC Press (1993).

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "actividad inmunológica" se refiere a la actividad asociada al sistema inmune, inmunidad, sensibilidad inducida y alergia.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "tasa de mortalidad" se refiere a la proporción de muertes en una población o a un número específico de la población, donde mortalidad se define como el índice de muertes o la proporción del número total de muertes en el total de la población. Por ejemplo, el índice de mortalidad el día 30 tras la aparición de síntoma de ataque isquémico puede variar de aproximadamente el 13,3% (por ejemplo, tras tratamiento con el activador de plasminógeno de tipo tisular, véase Albers y col., JAMA (2000) 283(9): 1145-

1150) a más de aproximadamente el 65% (por ejemplo, ataque con hemorragia, véase Mahaffey y col., Am Heart J (1999) 138 (3 Pt 1): 493-499).

5 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "Calidad de Vida (CDV)" se refiere al buen estado general de un animal, especialmente un mamífero, e incluso más específicamente un ser humano. La CDV de un individuo puede evaluarse en base a cualquier parámetro, un grupo de dos o más parámetros o una evaluación o puntuación general global. Los ejemplos de índices útiles para evaluar la CDV incluyen, aunque sin limitación, los asociados con los patrones del sueño; patrones de alimentación; patrones de bebida; agilidad; movilidad; tono de piel; visión; retención/pérdida/crecimiento de pelo; tono muscular; masa muscular; fuerza; peso; salud del seno; presencia, ausencia o grado de inflamación; sentimientos de incomodidad; habilidad para realizar ciertas tareas; niveles de ansiedad; tiempos de respuesta; habilidad para concentrarse; retención de memoria; habilidad verbal; percepción sonora; presencia, ausencia o grado de dolores de cabeza; espasmos musculares; daño nervioso; gusto; tacto; olfato; presencia o ausencia de enfermedades oportunistas; y presencia o ausencia de parásitos.

Como se usa en el presente documento, el término "régimen" se refiere a un programa o tratamiento.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "índice terapéutico" se refiere a cómo de selectivo es un fármaco al producir los efectos deseados. El índice terapéutico es la proporción de DL₅₀ con respecto a DE₅₀. La DE₅₀, la dosis efectiva media, es la dosis de un fármaco necesaria para producir un efecto especificado en el 50% de la población. La DL₅₀ es la dosis letal media tal y como se ha determinado en animales de experimentación.

II. Realizaciones Específicas

20 Quimioterapia.

En general, quimioterapia se refiere al tratamiento de una enfermedad, especialmente neoplasias, infecciones parasitarias y enfermedades microbianas, con agentes químicos que de alguna manera actúan sobre los organismos infecciosos o tumores.

Quimioterapia de Cáncer

25 *Introducción:* la quimioterapia continúa siendo una de las modalidades más eficaces para tratar cáncer en pacientes. A pesar de que son bastante eficaces, también se conoce que los agentes quimioterapéuticos alteran de manera negativa la calidad de vida de los pacientes. Algunos efectos secundarios observados con frecuencia incluyen mielosupresión e inmunosupresión, diarrea, neuropatía periférica, náuseas y vómitos, fiebre, disfunción del hígado y toxicidad cardiaca, etc. ("Physicians Desk Reference" (1999) Medical Economics Company). En muchos casos, estos efectos secundarios adversos impiden a los pacientes recibir dosis escalonadas o cursos adicionales de terapia, comprometiendo de este modo la eficacia de estos agentes. El alivio de algunos o todos de estos efectos secundarios, sin comprometer a la actividad anticancerosa de agentes quimioterapéuticos, no solamente mejoraría la calidad de vida (CDV) de los pacientes con cáncer, sino que también permitiría un protocolo de tratamiento más agresivo, dando como resultado posiblemente un mejor éxito clínico. En la actualidad, la mayoría de las terapias de apoyo usan agentes sencillos, tales como antieméticos, agentes anti-mucositis y factores de crecimiento de colonias, que se dirigen a efectos secundarios individuales pero que no se dirigen al amplio espectro de efectos secundarios asociados con quimioterapia de cáncer (Bleiberg H y Cvitkovic E., Eur J Cancer 32A (Supl 3): S18-S23 (1996); Wierda D. y Matamoros M., Toxicol & Applied Pharmacol 75: 25-34(1984); Goldber R. M. y Erlichman C., Oncology 12: 59-63 (1988)).

40 Los fármacos para tratar el cáncer incluyen los productos naturales más convencionales tales como paclitaxel (TAXOL), los semi-sintéticos tales como etopósido, y muchos agentes diversos más nuevos tales como interleucina-2 y el ácido retinoico todo-trans. Para una lista completa de agentes quimioterapéuticos útiles en el tratamiento de enfermedades neoplásicas véase, por ejemplo, la Tabla X-1 en las páginas 1227-1229 de Calabresi y Chabner (1996).

45 Los principales efectos adversos asociados con quimioterapias de cáncer administradas comúnmente se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales Efectos Adversos de Quimioterapia de Cáncer.

<u>Principales Efectos Adversos en la Salud</u>	<u>Agente Antineoplásico</u>
Pancreatitis	VP-16, ara C
Alopecia	VP-16, Doxorubicina, Taxol, FU, araC
Cardiotoxicidad	Taxol, Doxorubicina
Cutáneo	Doxorubicina
Diarrea	CPT-11
Disnea	ara C
Rubor	Tamoxifeno
Fiebre/Temblores	VP-16, Doxorubicina
Hepatotoxicidad	VP, Taxol, ara C, Metotrexato
Nefrotoxicidad	Cisplatino
Ototoxicidad	Cisplatino
Hipoplasia de Médula Ósea	Casi todos los fármacos anticancerosos

5 *5-Fluorouracilo*: El análogo de fluoropirimidina, 5-fluorouracilo (5-FU o FU) muestra un amplio espectro de actividad clínica. Sigue siendo uno de los agentes más activos en el tratamiento de cáncer colorrectal tanto en la enfermedad de adyuvante como avanzada, y también en otras neoplasias malignas del GI (Pinedo y Peters, 1988). Además, este agente es activo contra cánceres de mama, y cabeza y cuello.

10 Los avances recientes en la terapia de cáncer colorrectal han usado modulación bioquímica para activar de manera selectiva rutas metabólicas específicas de pirimidina. El folato reducido, leucovorina (LV), es un modulador químico eficaz y se ha usado en tratamientos clínicos junto con FU (Peters y Van Groeningen, 1991; Joulia, y col., 1999). Se ha demostrado que la adición de folato exógeno en forma de LV mejora las respuestas a FU en ensayos clínicos (Calabresi y Chabner, Página 1250, 1996). El mecanismo de interacción de LV que se pretende es el de la inhibición mejorada de timidilato sintasa.

El índice de respuesta a FU en pacientes con enfermedad avanzada se mejoró desde el 10%-12% (tratamiento solamente con FU) hasta el 20%-30% (tratamiento con FU/LV).

15 Para una descripción detallada de los usos terapéuticos de los análogos de fluoropirimidina, incluyendo FU, véase por ejemplo, Chabner y col., 1996.

CPT-11: el irinotecano (CPT-11) es un análogo semisintético de camptotecina que inhibe la topoisomerasa I en la célula en replicación. Muestra actividad antitumoral en pacientes con cáncer que fallan en el tratamiento de primera línea con FU/LV (Bleiberg, 1999; Stucky-Marshall, 1999).

20 Mientras que CPT-11 es una terapia de segunda línea aprobada por la FDA para pacientes con cáncer colorrectal avanzado, los índices de respuesta observados se encuentran en el orden de solamente el 10%-15%.

25 Los principales efectos secundarios asociados a este agente incluyen leucopenia, anemia, náuseas/vómitos, anorexia y diarrea. Por lo tanto, se desea desarrollar un agente modulador que pueda mejorar la eficacia de la actividad antitumoral de CPT-11 y/o aliviar algunos de los efectos secundarios tóxicos asociados al tratamiento con CPT-11 de modo que se mejoren la calidad de vida general y el estado general del paciente con cáncer.

30 *Combinación CPT-11/FU y CPT-11/FU/LV*: se ha demostrado que el cáncer colorrectal es la segunda causa principal de muerte por cáncer en Norteamérica. Los dos fármacos aprobados por la FDA actualmente para el tratamiento de cáncer colorrectal son irinotecano (CPT-11, Campostar®) y 5-fluorouracilo (FU). El FU es un fármaco antimetabolito, que inhibe la timidilato sintasa, una enzima necesaria para la síntesis de ADN. El FU normalmente se

- 5 administra con LV, un folato reducido que aumenta la afinidad de FU por timidilato sintasa. Esta terapia se utiliza actualmente como tratamiento de primera línea para cáncer de colon metastásico (Murakami K, Sakukawa, R, Sano, M, y col., Clin Cancer Res. 5: 2304-2310 (1999); van der Wilt C. L, van Groeningen, C. J, Pinedo H. M, y col., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123: 595-601 (1997)). El CPT-11 es un potente inhibidor de la topoisomerasa I, una enzima nuclear que participa cuando el ADN se desenrolla durante la replicación. El CPT-11 ha demostrado actividad antitumoral contra cáncer colorrectal metastásico como tratamiento de segunda línea tras el fallo de FU (Kase, Y, Hayakawa, T, Togashi, Y, y col., Jpn J Pharmacol, 75: 399-405 (1997); Araki E, Ishikawa M, Iigo M, y col., Jpn J Cancer Res 84: 697-702 (1993); Bissery MC, Vrignaud P, Lavelle F, y col., Anti-Cancer Drugs 7: 437-460 (1996); Saltz L. B, Cox J.V, Blanke C, y col., New. Eng. J. Med. 343: 905-914 (2000)). Recientemente, la FDA ha aprobado el uso de triple combinación CPT-11/FU/LV como el tratamiento de primera línea para cáncer colorrectal avanzado. Desafortunadamente, se ha identificado diarrea grave como una de las toxicidades limitadoras de dosis entre pacientes tratados con esta terapia de combinación (Saltz L. B, Cox J. V, Blanke C, y col., New. Eng. J. Med. 343: 905-914 (2000); Murakami K, Sakukawa, R, Sano, M, y col., Clin Cancer Res. 5: 2304-2310 (1999); van der Wilt C. L, van Groeningen, C. J, Pinedo H. M, y col., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 123: 595-601 (1997).
- 10
- 15 *VP-16 (etopósido)*: VP-16, también conocido como etopósido, muestra una significativa actividad clínica contra cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer testicular, linfoma y leucemia (O'Dwyer, P., y col., Etoposide (VP-16-213), Current Status of an Active Anti-cancer Drug, New Engl. J. Med. 312: 692-700 (1985)) e incluye neoplasias vistas en la enfermedad de Hodgkin, Papilomavirus y linfoma histiocítico difuso.
- 20 Se cree que el etopósido bloquea la actividad catalítica de topoisomerasa II de ADN estabilizando un complejo de enzima-ADN en el que el ADN se escinde y se une covalentemente a la enzima. Véase Chen, G. L., Yang, L., Rowe T. C., Halligan, B. D., Tewey, K. y Liu, L., J. Biol. Chem., 259: 13560 (1984); Ross, W., Rowe, T., Glisson, B., Yalowich, J., y Liu, L., Cancer Res., 44: 5857 (1984); Rowe, T., Kupffer, G., y Ross, W., Biochem. Pharmacol., 34: 2483 (1985).
- 25 A modo de contexto, las topoisomerasas son enzimas que controlan el estado topológico del ADN. Las topoisomerasas del tipo II catalizan el paso de la cadena de ADN a través de rupturas en doble cadena pasajeras en el ADN. El cambio resultante en el número de enlaces del ADN permite que estas enzimas medien en las interconversiones del ADN, como el superenrollamiento y la relajación del superenrollamiento, encadenamiento y desencadenamiento, anudado y desanudado. Véase Wang, J. C., Annu. Rev. Biochem., 54: 665 (1985) y Maxwell, A. y Gellert, M., Adv. Protein Chem., 38: 69 (1986).
- 30 Las enzimas ADN topoisomerasas del tipo II han demostrado participar en varios procesos celulares vitales, que incluyen la replicación y transcripción de ADN y la segregación de cromosomas. Por lo tanto, estas enzimas son una diana importante para la acción de una amplia diversidad de fármacos anticancerosos, incluyendo etopósido y tenipósido. La etapa clave hacia la muerte celular puede ser la capacidad de estos fármacos para bloquear la actividad catalítica de la ADN topoisomerasa II tal y como se ha señalado con anterioridad.
- 35 *Beta-L-Dioxolano-Citidina (OddC)*: La beta-L-dioxolano-citidina [(-)-OddC] es el primer análogo de nucleósido con la configuración antinatural L que ha demostrado tener actividad anticancerosa (Grove y col., Cancer Res (1996) 56(18): 4187-4191). Este compuesto ha demostrado tener una potente actividad antitumoral en modelos de tumor de próstata humano y xenoinjerto hepatocelular (Grove y col., Cancer Res (1995) 55: 3008-3011). Además, OddC ha demostrado ser eficaz contra actividad hiperproliferativa en queratinocitos humanos in vitro (Schwartz y col., Skin Pharmacol Appl Skin Physiol (1998) 11 (4-5): 207-213).
- 40 Este compuesto funciona mediante una rápida translocación a células mediante sistemas de transporte de nucleósidos equilibrados sensibles e insensibles en los que se incorpora al ADN de células. La incorporación al ADN permite una degradación del ADN en grandes fragmentos sin la generación de fragmentación internucleosomal.
- 45 *Calidad de Vida (CDV)*: las medidas convencionales de evaluación del éxito de tratamientos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, cambios en masa y tipo de tumor así como el índice y cantidad de extensión del tumor (tanto localmente como distante al tumor o los tumores que están siendo evaluados). Un experto en la materia de evaluaciones de quimioterapia también puede determinar si un tratamiento particular parece mejorar la esperanza de vida y la calidad de vida de un paciente (incluso para los pacientes que no responden a los tratamientos habituales). Por ejemplo, el tratamiento eficaz de enfermedades gastrointestinales puede determinarse mediante varios criterios que incluyen, aunque sin limitación, una puntuación de enteritis (en base a una puntuación compuesta de síntomas clínicos tales como dolor abdominal, calambres, guaiac en heces y diarrea) así como criterios de evaluación relacionados tales como porcentaje de dosis de quimioterapia suministrada, días de hospitalización, transfusiones, terapia con fluido intravenosa, agentes anti-motilidad y habilidad para comer.
- 50
- 55 Con respecto a un efecto del tratamiento, los síntomas subjetivos del paciente no siempre coinciden con el resultado del ensayo realizado por el médico. Por ejemplo, incluso en el caso de que se obtenga un resultado

5 desfavorable en el ensayo, cuando la incidencia de incontinencia urinaria y micción se reduce, el paciente cree que el tratamiento ha funcionado con el resultado de que la calidad de vida (CDV) mejora. Durante la quimioterapia, los efectos secundarios negativos en la vida de los pacientes, tales como pérdida de pelo, reducción de peso, pérdida de apetito, fatiga, diarrea, náuseas, vómitos, etc., pueden ser persistentes y convertirse en un tormento crónico noche y día que puede ser insoportable para los pacientes tanto física como mentalmente. Por consiguiente, la eficacia terapéutica de los procedimientos de la presente invención pretende referirse no solamente al alivio parcial o completo del dolor o la reducción en el crecimiento del tumor o regresión del cáncer, sino alivio como consecuencia de la reducción o eliminación de los efectos secundarios que tradicionalmente se asocian al tratamiento, siendo el resultado global el de una mejorada calidad de vida.

10 Las evaluaciones basales pueden entrar como parte del protocolo del tratamiento por medio de las cuales se miden diversos criterios y se correlacionan con la CDV. Además, los pacientes pueden informar en base a hechos diarios del paciente acontecimientos tales como sentirse "limpio" o experimentar dolor "moderado". Estas medidas se usan entonces durante y después del tratamiento para evaluar si el paciente siente que la calidad de vida ha mejorado.

15 PHY906

20 *Introducción:* PHY906 es una formulación botánica tradicional china compuesta por cuatro hierbas seleccionadas cada una de uno de cuatro grupos de hierbas. Los cuatro grupos de hierbas se conocen comúnmente como Scutellaria, en ocasiones conocida como escutelaria, Regaliz, Peonia Alba y Fruta Ziziphi (Tabla 3). Por lo tanto, se elige una especie vegetal de cada uno de los cuatro grupos de plantas proporcionados en la Tabla 3 con el fin de producir las composiciones herbarias deseadas de la presente invención. Aunque se ofrecen combinaciones particulares de las especies vegetales listadas como ejemplo de formulaciones PHY906 preferentes, las composiciones y procedimientos de la presente invención engloban cualquier combinación de las cuatro especies vegetales en las que una especie vegetal se selecciona de cada uno de los cuatro grupos de la Tabla 3. La presente invención engloba cualquier combinación de este tipo de dichas hierbas que tenga al menos una de las actividades biológicas o efectos deseados atribuidos a PHY906 tal y como se describe en el presente documento.

25

Tabla 3: Ejemplos de Especies Particulares de Cuatro Géneros que pueden Usarse para preparar PHY906.

Nombre Español Común del Grupo Herbario de MCT			
Escutelaria	Regaliz	Peonia Alba	Fruta Ziziphi
<i>Anemone rivularis</i> Buch.-Ham. ex DC.	<i>Abrus mollis</i> Hance	<i>Paeonia delavayi</i> Franch. var. <i>lutea</i> (Delavay ex Franch.) Finet y Gagnep.	<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.

<i>Thalictrum omelense</i> W.T. Wang y S. H. Wang	<i>Glycyrrhiza aspera</i> Pall.	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	<i>Ziziphus jujuba</i> Mill. var. Inermis
<i>Mahonia bealei</i> (Fort.) Carr.	<i>Glycyrrhiza eurycarpa</i> P.C.Li.	<i>Paeonia mairei</i> Levi.	
<i>Nandina domestica</i> Thunb.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Paeonia obovata</i> Maxim. var. <i>willmottiae</i> (Stapi) Stem	
<i>Scutellaria amoena</i> C. H. Wright	<i>Glycyrrhiza inflata</i> Bat.	<i>Daphne papyracea</i> Wall. ex Steud.	
<i>Scutellaria amoena</i> C. H. Wright var. <i>cinerea</i> Hand.-Mazz.	<i>Glycyrrhiza squamulosa</i> Franch.	<i>Cynanchum otophyllum</i> Schneid.	
<i>Scutellaria baicalensis</i> <i>Georgi</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	<i>Codonopsis lanceolara</i> Sieb. y Zucc. Trautv.	
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi var. <i>albiflora</i> K. Onuma	<i>Phlomis betonicoides</i> Diels		
<i>Scutellaria chungtienensis</i> C. Y. Wu			
<i>Scutellaria hypericifolia</i> Levl			
<i>Scutellaria likiangensis</i> Diels			
<i>Scutellaria obtusifolia</i> Hemsl. var. <i>trinervata</i> (Vant.) C. Y. Wu y H. W. Li			
<i>Scutellaria regeliana</i> Nakai			

(cont)

<i>Scutellaria regeliana</i> Nakai var. ikonnikovii (Juz.) C. Y. Wu y H. W. Li			
<i>Scutellaria rehderiana</i> Diels			
<i>Scutellaria tenax</i> W. W. Smith var. patentipilosa (Hand. -Marz.) C. Y. Wu			
<i>Scutellaria viscidula</i> Bunge			

- 5 Esta fórmula herbaria se ha usado durante mucho tiempo en Asia para tratar muchas enfermedades tales como distensión cardíaca, espasmos abdominales, fiebre, dolor de cabeza, vómitos, arcadas, sed y heces de tipo mucoso (Hani Oka y Taki No, 1998).

Una formulación preferente de PHY906 se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4. Ingredientes Herbarios de Fórmula PHY906 de MCT

Nombre científico	Porcentaje	Nombre Común	Uso Tradicional
<i>Scutellaria baicalensis</i>	33,3	Raíz de escutelaria baical	Usada para reducir permeabilidad capilar; reducir inflamación: tratar enteritis y disentería; aumentar la secreción biliar para tratar ictericia; aliviar espasmos musculares para tratar tos; para expulsar parásitos.
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	22,2	Raíz de Regaliz	Usada para hidratar los pulmones y parar la tos; relajar espasmos y cesar el dolor; moderar la acción de hierbas: para reducir ardor y liberar toxinas.
<i>Ziziphus jujuba</i>	22,2	Dátil	Tiene efectos diuréticos y fortalecedores.
<i>Paeonia lactiflora</i>	22,2	Raíz de Peonia Blanca	Usada para eliminar y suavizar el dolor: para calmar ligamentos y purificar la sangre.

- 10 Una formulación alternativa de PHY906 tiene las hierbas *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* en las siguientes proporciones relativas: 4/14:3/14:4/14:3/14, respectivamente.

Aunque que las proporciones específicas de las hierbas de PHY906 se ofrecen como ejemplos, las composiciones y procedimientos de la presente invención engloban cualquier proporción de los cuatro componentes herbarios que tengan la deseada actividad biológica tal y como se describe en el presente documento.

- 15 En la actualidad, Sun Ten Laboratories, Inc. en Irvin, CA (una compañía hermana de Sun Ten Pharmaceutical Co. Ltd. en Taiwán) produce tanto cápsulas de gelatina como bolsas de gránulos de PHY906 usando la formulación provista en la Tabla 4. Esta formulación de PHY906 se ha distribuido y vendido como un complemento dietético desde 1983 por Brion Herbs Corporation (12020 B Centralia Road, Hawaiian Garden, CA, 90716).

5 *Producción:* se proporciona un breve resumen de un procedimiento que puede usarse para producir PHY906. En primer lugar, las proporciones adecuadas de los ingredientes de las materias primas herbarias se colocan en un reactor encamisado y se extraen con agua a una elevada temperatura constante mientras se mezclan. Las proporciones se establecen en la Instrucción de Fabricación reproducida a partir del Registro de Fórmula Maestra. A continuación, los materiales sólidos se separan del líquido con un tamiz de malla 120. El filtrado se recoge y a continuación se concentra evaporando el agua bajo presión reducida. El jugo concentrado se seca mediante pulverización a elevada temperatura para producir polvo seco que más tarde se procesa para producir polvo granulado. Entonces, esta sustancia bruta se formula en la forma de dosificación deseada.

10 Los controles de procedimiento se utilizan para asegurar la uniformidad e integridad del producto. Dichos controles de procedimiento incluyen, aunque sin limitación, comprobar el volumen del jugo del procedimiento, determinaciones de HPLC para establecer Huellas Dactilares Químicas para verificar la identidad de las materias primas e inspecciones y ensayos del producto intermedio y final. Se establecen los Límites del Nivel de Calidad Aceptado (NCA) para cada análisis realizado y para cada etapa de la fabricación y control de producción.

15 A todos los componentes usados en el procedimiento de producción se les asigna un número de lote concreto en el Registro de Instrucción de Producción. Los registros de control de calidad se revisan antes de que el lote salga.

20 Las sustancias marcadoras purificadas se usan para la identificación y el control de calidad de las materias primas así como de las sustancias herbarias. La Tabla 5 enumera las sustancias marcadoras de cada una de las materias primas usadas en la preparación de la sustancia herbaria PHY906.

Tabla 5. Sustancias Marcadoras para Ingredientes Herbarios de PHY906

Hierba	Origen del Lugar Productor de la Hierba	Sustancia Marcadora
<i>Scutellaria baicalensis Georgi.</i>	Provincia de Shan Xi, China	Baicalina
<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>	Interior de Mongolia, China	Glicirricina
<i>Ziziphus jujuba Mill.</i>	Provincia de Hebei/Shangtong, China	Ácido quelidónico
<i>Paeonia lactiflora Pall.</i>	Provincia de An Hwei, China	Paenoflorina

Formulaciones Farmacéuticas

25 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica o bucal. Como alternativa, o concurrentemente, la administración puede ser por vía oral. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud y peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

La formulación farmacéutica para administración sistémica de acuerdo con la invención puede formularse para administración entérica, parenteral o tópica. De hecho, los tres tipos de formulación pueden usarse simultáneamente para conseguir la administración sistémica del principio activo.

30 La presente invención proporciona además composiciones que contienen uno o más agentes que tratan varios tipos de cáncer y/o modulan la actividad hematopoyética, tal como la inmunomodulación de tuberculosis (T.B), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos y células dendríticas.

Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos de cantidades eficaces de cada componente es decisión del experto en la materia.

35 Además del agente farmacológicamente activo, las composiciones de la presente invención pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos a preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente para enviarse al lugar de acción.

40 PHY960 puede usarse en forma de una preparación medicinal, por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida que contiene PHY906, como un principio activo, mezclado con un portador o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones externas, entéricas o parenterales. El principio activo puede estar compuesto, por

ejemplo, con los portadores habituales no tóxicos farmacéuticamente aceptables para comprimidos, miniesferas, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otra forma adecuada para su uso. Las formulaciones de la presente invención abarcan las que incluyen talco, agua, glucosa, lactosa, goma arábiga, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea y otros portadores adecuados para su uso en la fabricación de preparaciones en forma sólida, semisólida o líquida y pueden usarse junto con agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes y colorantes y perfumes.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos o cápsulas, PHY906 se mezcla con un portador farmacéutico (por ejemplo, ingredientes convencionales para fabricar comprimidos tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas) y otros diluyentes farmacéuticos (por ejemplo, agua) para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla sustancialmente homogénea de PHY906 o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de la misma. Cuando se hace referencia a las composiciones de preformulación como sustancialmente homogéneas, se pretende decir que los principios activos se dispersan uniformemente por toda la composición de modo que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide a continuación en formas de dosificación unitaria del tipo anteriormente descrito que contienen una cantidad efectiva de la composición de la presente invención, preferentemente en cápsulas.

Los comprimidos o píldoras que contienen PHY906 pueden revestirse o formarse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando el último en forma de cubierta sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que su liberación se retrase. Puede usarse una variedad de materiales para estas capas o revestimientos entéricos incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas, en las que PHY906 se puede incorporar para administración por vía oral o por inyección, incluyen soluciones acuosas, jarabes con los sabores adecuados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones con sabores con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete así como elixires y vehículos farmacéuticos similares. Los agentes dispersantes o de suspensión adecuados para suspensiones acuosas incluyen gomas sintéticas naturales, tales como tragacanto, arábiga, alginato, dextrano, carboximetil celulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina.

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones o pueden presentarse como un producto seco para reconstituirse con agua u otros vehículos adecuados antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse a través de medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, celulosa de metilo o grasas comestible hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres grasos o alcohol etílico); conservantes (por ejemplo, *p*-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico); y colorantes y/o edulcorantes artificiales o naturales.

Para administración bucal, las composiciones de la presente invención pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de manera convencional.

PHY906 también puede formularse para administración parenteral mediante inyección, que incluye el uso de técnicas de cateterización o infusión convencionales. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas, o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos grasos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los principios activos pueden tener forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones grasas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa de sodio,

sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede también contener estabilizantes. También pueden usarse liposomas para encapsular el agente para su suministro a la célula.

Al practicar los procedimientos de la presente invención, PHY906 puede usarse solo o en combinación, o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En ciertas realizaciones preferentes, los compuestos de la presente invención pueden co-administrarse con otros compuestos típicamente prescritos para quimioterapia de cáncer de acuerdo con la práctica médica generalmente aceptada. Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse *in vivo*, normalmente en mamíferos, tales como seres humanos, ovejas, caballos, vacas, cerdos, perros, gatos, ratas y ratones o *in vitro*.

Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables y los ajustes necesarios para administración a sujetos se conoce bien y serán evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 17^a Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985), que en el presente documento se incorpora por referencia.

“Índice terapéutico” se usa para designar un estado cualitativo de la selectividad de un fármaco cuando se están comparando un efecto terapéutico y un efecto adverso. Por ejemplo, si se asigna T (de tóxico) al efecto adverso y E al efecto terapéutico, el índice terapéutico puede definirse como DT50/DE50 o una proporción similar en otros niveles arbitrarios de respuesta.

Procedimientos para usar PHY906

La presente invención proporciona procedimientos para usar PHY906 en combinación con agentes terapéuticos en el tratamiento de diversas enfermedades, afecciones o trastornos.

Específicamente, la presente invención proporciona procedimientos para usar PHY906 en combinación con agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de enfermedades, afecciones o trastornos. Preferentemente, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración a un paciente de uno o más agentes quimioterapéuticos contra el cáncer en combinación con PHY906. Más preferentemente, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer colorrectal que comprende la administración de CPT-11/FU/LV en combinación con PHY906.

En un aspecto de la invención, PHY906 se administra a líneas celulares, por ejemplo, líneas celulares de cáncer o carcinoma y líneas celulares de VIH, para evaluar la toxicidad de PHY906 en diferentes líneas celulares. Preferentemente, las líneas celulares de cáncer o carcinoma incluyen, aunque no se limitan a, KB, HepG2, linfoma de linfocitos T (CEM), Colon 38 y HTC116 y las líneas celulares de VIH incluyen, aunque no se limitan a, células H9 y células MT-2.

En otro aspecto de la invención, PHY906 en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o antivirales se administra a un animal para determinar si PHY906 es eficaz aumentando el índice terapéutico del agente y la calidad de vida del animal que se somete a la terapia quimioterapéutica o antiviral. Preferentemente, el animal es un mamífero. Más preferentemente, el mamífero es un ser humano.

El animal puede ser un modelo animal para un cáncer específico. Así mismo, el animal puede tener un sistema inmune deficiente. Estos modelos de animales son bien conocidos en la técnica. Los ratones inmunodeficientes de origen natural se han usado para estudiar el sistema inmune, el cáncer y enfermedades infecciosas, incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA. Por ejemplo, el ratón desnudo (NU) es atímico, de modo que la diferenciación y maduración del linfocito T no puede producirse. Los ratones desnudos han servido durante muchos años como huéspedes para xenoinjertos, especialmente en tumores humanos y para ensayar fármacos anticancerosos. El ratón con síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (SCID) parece transponer de manera defectuosa tanto el RCT (receptor de linfocito T) como los genes de inmunoglobulina y muestra una grave inmunodeficiencia. El ratón beige (BG) tiene un defecto en linfocitos citolíticos naturales funcionales, mientras que el ratón con inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (XID) tiene un defecto en la producción de linfocitos B. Además, se han realizado cruzamientos entre varias cepas para generar líneas con más fenotipos inmunodeficientes completos (por ejemplo, BG/UN y BG/UN/XID).

Otros animales de laboratorio que poseen un sistema inmune muy pobre o ninguno o que se han tratado con fármacos o radiación, o que se han producido por medio de desarrollo genético o ingeniería genética tradicional, para tener un sistema inmunosuprimido, un sistema inmune debilitado o un sistema inmune modificado o para que carezcan de sistema inmune, como por ejemplo, caballos SCID y otros animales SCID y posiblemente incluso animales infectados por SIDA en los que el SIDA se ha interrumpido tras la destrucción o inactivación del sistema inmune de los animales, pueden considerarse como candidatos de animales de laboratorio para su uso en la presente invención (Perryman L. E., McGuire, T. C., Torbeck, R. L. y Magnuson, N. S., Clin. Immunol. Immunopath., 23(1): 1-9, 1982).

5 Se conocen modelos murinos para estudiar terapia antirretroviral transplacentaria o perinatal (Sharpe y col. (1987) Science 236: 1671-1674; Sharpe y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 9792-9796; Sharpe y col. (1989) J. Virol. 63: 1049-1053). Además, se han establecido modelos de mamíferos que utilizan monos rhesus para estudiar el ciclo de infección fetal no-retroviral mediante citomegalovirus de simio, virus de encefalitis equina venezolana y occidental y virus de las paperas (London y col. (1986) Teratology 33: 323-331; London y col. (1977) Teratology 16: 285-296; London y col. (1982) Teratology 25: 71-79; London y col. (1979) J. Inf. Diseases 139: 324-328). La infección de monos rhesus (Macaca mulatta) con el virus de inmunodeficiencia simia (VIS) presenta una gran similitud con la infección por VIH-1 en seres humanos. Tanto VIH-1 como VIS son lentivirus con similar arquitectura molecular (Chakrabarti y col. (1987) Nature 328: 543-547), y ambos causan inmunodeficiencia dando como resultado infecciones oportunistas así como daños en el sistema nervioso central (Letvin y col. (1985) Science 230: 71-73).

15 Se ha descrito un modelo animal generado para estudiar el SIDA y la diferenciación celular en la médula ósea en el que los linfocitos humanos proliferan de manera transitoria después de co-injertar hígado fetal humano, timo y ganglios linfáticos en ratones SCID para formar ratones SCID/un (McCune y col. (1988) Science 241: 1632-1686).

A la vista del análisis general anterior, los ejemplos específicos presentados a continuación son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención. Otras configuraciones genéricas o específicas resultarán evidentes para los expertos en la materia.

EJEMPLOS

20 Materiales y Procedimientos

El CPT-11 (irinotecano, Camptosar®) se adquirió en Pharmacia y Upjohn Co (Kalamazoo, MI). El 5-fluorouracilo (FU), ácido fólico (leucovorina, LV), loperamida, beta-glucuronidasa de *E. coli*, azul de metileno y glucuronidato de fenoltaleína se adquirieron en Sigma, Co. (St. Louis, MO). El medio MEME se preparó en el Centro de Cáncer de la Universidad de Yale, de acuerdo con los procedimientos convencionales. El medio RPMI 1640 se adquirió en JRH Co. La kanamicina, pancreatina y azul de tripano se adquirieron en Gibco Co. (Grand Island, NY). Las preparaciones botánicas PHY906, PHY-915, PHY-14ST y PHY-15ST las suministró Sun Ten Pharmaceutical Inc. (Taipei, Taiwan). PHY-14ST, denominado anteriormente, TJ-14ST, consiste en siete hierbas: *Pinelliae ternata Breit.*, *Scuellaría baicalensis Georgi*, *Coptis chinensis Franch*, *Glycyrrhiza uralensis Fisch*, *Fructus ziziphi*, *Panax ginseng C. A. Mey.* y *Zingiber officinale Rosc.* PHY-15ST, denominado anteriormente TJ-15ST, consiste en *Pueraria lobata Ohwi*, *Coptis chinensis Franch*, *Scuellaría baicalensis Georgi* y *Glycyrrhiza uralensis Fisch*. PHY-915 consiste en cinco hierbas: *Panax ginseng C.A. Mey.*, *Zingiber officinale Rosc.*, *Atractylodes macrocephala Koidz*, *Saposhnikovia divaricata Schischk.* y *Citrus reticulata Blanco*.

35 *Preparación de extracto herbario de polvo seco:* Se añadió un gramo de (A) polvo seco de PHY906, que contenía 50% (lote de investigación) o 10% (lote clínico) de excipiente de almidón; o (B) formulaciones herbarias PHY-915, PHY-14ST o PHY-15ST, que contenían cantidades desconocidas de excipientes, a 10 ml de H₂O a 80° y se incubó a 80° durante 30 minutos. El sobrenadante se separó de los restos por centrifugación (2060 g, 15 min) y se usó inmediatamente. La concentración de sobrenadante de PHY906 se calculó en 50 mg/ml (para el lote de investigación) o 90 mg/ml (para el lote clínico), en base al peso seco del extracto acuoso de las hierbas de partida. Las concentraciones de otras formulaciones herbarias se consideraron como 100 mg/ml, en base al peso seco del polvo. El sobrenadante se esterilizó usando un filtro estéril Acrodisc de 0,45 µm (Gleman Sciences) para estudios de inhibición de crecimiento en cultivo de tejidos.

Ratones: Se adquirieron ratones hembra BDF-1 (de 4-6 semanas de edad) en Charles River Laboratories (Wilmington, M). Se adquirieron ratones desnudos NCr atímicos macho (de 4 semanas de edad) en Taconic Farmas (Garmantown, NY). Para este estudio se usaron los dos tipos de ratones que pesaban entre 16 g y 20 g.

45 *Estudios Anti-Tumorales:* Se transplantaron células murinas de Colon 39 (1-2x 10⁶ células en 0.1 ml de PBS) o células humanas de HepG2 (1-2x 10⁶ células en 0.1 ml de PBS) subcutáneamente a ratones BDF1 o a ratones desnudos NCr atímicos, respectivamente. La longitud y la anchura de los tumores se midieron diariamente con calibradores de escala. El peso del tumor se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula (Pizzorno G, Wiegand R, Lentz S, y col., Cancer Res. 52: 1660-1665 (1992)):

50 **Peso del tumor (mg)=longitud (mm) x anchura (mm)² /2**

Después de 10 a 14 días, se seleccionaron ratones (cinco animales/grupo) con pesos de tumor que variaba de 150-200 mg, para los estudios con los fármacos (Guo X, Lerner-Tung M, Chen HX, y col., Biochem Pharmacol 49: 1111-1116 (1995)). Los ratones se sacrificaron cuando el tamaño del tumor alcanzó el 10% del peso corporal. PHY906 se administró por vía oral en solitario o con agentes quimioterapéuticos anticancerosos. Se evaluó el efecto de PHY906

sobre la eficacia antitumoral y la reducción de toxicidad por parte de los agentes. CPT-11 se administró por vía intraperitoneal (i.p.) 30 minutos después de la administración de PHY906 con la dosis seleccionada. El régimen de terapia de combinación FU/LV se administró de la siguiente manera:

- 5 (A) Tratamiento solo con FU/LV: primera dosis de LV (50 mg/kg, i.p), una hora después la segunda dosis de LV (50 mg/kg, i.p) e inmediatamente después FU (100 mg/kg, i.p.).
- (B) Tratamiento con FU/LV más PHY906: primera dosis de LV (50 mg/kg, i.p), 30 minutos después PHY906 (500 mg/kg, por vía oral), 30 minutos después una segunda dosis de LV (50 mg/kg, i.p) e inmediatamente después la dosis de FU (100 mg/kg, i.p.).

La combinación triple de fármacos CPT-11/FU/LV se administró de la siguiente manera:

- 10 Grupo (A) solamente CPT-11/FU/LV: a los ratones se les administró la primera dosis de LV (50 mg/kg, i.p), una hora antes de la administración de CPT-11, e inmediatamente después LV (50 mg/kg, i.p) y FU (100 mg/kg, i.p.).
- 15 Grupo (B) CPT-11/FU/LV más PHY906: a los ratones se les administró la primera dosis de LV (50 mg/kg, i.p) 30 minutos antes de PHY906 (500 mg/kg, por vía oral). A continuación, 30 minutos después de la administración de PHY906, los ratones se trataron con CPT-11, inmediatamente después con LV (50 mg/kg, i.p) y FU (100 mg/kg, i.p.) el día 0.

El primer día de tratamiento se definió como día 0. PHY906 se administró por vía oral dos veces al día (10 am y 3 pm) durante 4 u 8 días comenzando el día 0. Para el grupo de control, a los ratones se les administró un vehículo, PBS para i. p. o H₂O para p.o. (administración oral). Se observó a los animales diariamente para determinar su mortalidad, pérdida de peso y tamaño de tumor.

- 20 *Recuentos de Células en Sangre:* Se extrajo sangre (20 µl) a los ratones los días 0, 3, 6, 9 y 12 con tubos microcapilares. A continuación, la sangre se diluyó hasta 200 µl con solución salina normal (cloruro de sodio al 0.85%). WBC, RBC y las plaquetas se contabilizaron con un BAKER SYSTEM 9100™ HEMATOLOGY ANALYZER (Biochem ImmunoSystems Inc., Allentown, PA 18103-9562).

- 25 *Líneas Celulares y Condiciones de Cultivo:* Las líneas celulares humanas HepG2 (carcinoma hepatocelular), HCT 116 (cáncer de colon), CEM (leucemia) y KB (carcinoma epidermoide oral), y la línea celular murina de Colon 38 se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD). La línea celular HepG2 se cultivó de manera rutinaria en medio MEME, complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y 100 µg/ml de kanamicina. Las líneas celulares de Colon 38, HCT116, KB y CEM se cultivaron en medio RPMI 1640 con FBS al 10% y 100 µg/ml kanamicina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%: aire al 95%.

- 30 *Citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma de ser humano o ratón:* La inhibición del crecimiento celular se midió usando el ensayo de captación de azul de metileno. Células cancerígenas (1x10⁴) se sembraron en una placa de 24 pocillos en 1 ml de medio MEME o RPMI1640 con FBS al 10% y 100 µg/ml kanamicina el día 0. El extracto de PHY906 recién preparado y esterilizado se añadió a las células el día 1, a diversas concentraciones, y se incubó a 37°C durante 3 días. Posteriormente el medio se retiró, y la capa celular se tiñó durante 30 minutos con 0,3 ml de solución de azul de metileno al 0,5% (p/v) (en etanol al 50%). Las placas se lavaron 3 veces con agua corriente y se realizó la lisis de la capa celular con 1 ml de solución Sarkosyl al 1% (en PBS). La solución de la lisis resultante se leyó en un lector de microplaca cinético E1x800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) a 595 nm.

35 Ejemplo 1. Evaluación de Toxicidad de PHY906 en Diferentes Líneas Celulares

- 40 En resumen, un gramo de cada lote de PHY906 se añadió a 10 ml de agua (1 mg/ml). Véase la Tabla 6 para las propiedades de los lotes.

Tabla 6. Propiedades de los Lotes de PHY906

Propiedad	Lote A	Lote B
Origen	Taiwán, Sun-Ten	Taiwán, Sun-Ten
Procedimiento de Preparación	Convencional	Convencional

Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de 0,22 m. Para ensayar los efectos biológicos, se usaron cuatro tipos de células de cada lote de PHY906: a) células KB (CACT N° de cat. CCL-17); b) células HepG2 (CACT N° de cat. HB-8065); c) línea celular de linfoma de linfocitos T (células CEM); d) Colon 38 y e) HCT116 (CACT N° de cat. CCL-247).

5 El día 0, se sembraron células de carcinoma celular (1×10^4) en una placa de 24 pocillos en 1 ml de medio MEME o RPMI-1640 con FBS al 10% y 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Después de 24 horas, el extracto de PHY906 se añadió a las células a diversas concentraciones y se incubó a 37°C durante 3 días. Posteriormente, el medio se retiró, y las células se tiñeron con 0,3 ml de solución de azul de metileno al 0,5% (p/v) (en EtOH al 50%) durante 30. Las placas se lavaron 3 veces con agua corriente, se secaron y la capa celular se sometió a lisis con 1 ml de solución Sarkosyl al 1% (en PBS). La solución de la lisis resultante se leyó en un lector de microplaca cinético Elx800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) a 595 nm.

10 Los estudios de citotoxicidad se realizaron con línea celular de linfoma de linfocitos T humana (CEM). Células CEM (5×10^4) se cultivaron en 1 ml de medio RPMI 1640 con suero bovino fetal expuesto al 20%. El día 0 se añadió extracto de PHY906. El crecimiento de las células se evaluó 3 días después de la adición de PHY906. Se calculó el número de células usando un hemocitómetro.

15 En la Tabla T se muestran los resultados de los ensayos usando los dos (2) lotes. Basándose en estos datos, las fuentes A y B de PHY906 tienen relativamente poca toxicidad para las células KB, CEM y HCT116, mientras que tienen efectos citotóxicos significativamente relevantes contra células de Colon 38 y HepG2 (véase la Tabla 7). En el Ejemplo 11, Tabla 10, se muestran resultados similares.

20 **Tabla 7. Citotoxicidad de Formulaciones Herbarias Tradicionales en Diferentes Líneas Celulares**

Formulación Herbaria ^b	CI ₅₀ (mg/ml) ^a				
	KB	HepG2	CEM	Colon 38	HCT116
PHY906A	1,35 ± 0,52	0,28 ± 0,17	1,45 ± 0,45	0,08	1,3
PHY906B	1,80 ± 0,99	0,17 ± 0,12	1,28 ± 0,02	0,08	1,2
a Basándose en el peso seco de la formulación herbaria					
b Lote de investigación diferente de PHY906 que contiene excipiente al 50%					

Ejemplo 2: Determinación de la Dosis de CPT-11 en Ratones BDF-1 y Ratones Desnudos

25 La pérdida de peso de los animales se controló como un indicativo de toxicidad causada por agentes de quimioterapia contra cáncer. El efecto de CPT-11 en la pérdida de peso en ratones BDF-1 que no tenían ningún tumor se estudio usando seis dosificaciones diferentes: 100, 200, 300, 400, 600 u 800 mg/kg de peso corporal para determinar la dosis máxima tolerable en ratones. Al comienzo del estudio, se administró un sola dosis embolada de CPT-11 por vía intraperitoneal (i.p) y durante 12 días se controló diariamente la pérdida de peso.

Al comienzo del estudio, a cada ratón se le administró una dosis de CPT-11, por vía i. p. y durante 12 días se controló diariamente la pérdida de peso del animal.

30 Dosis inferiores a 200 mg/kg tuvieron muy poco efecto en el peso corporal (en comparación con los ratones de control que no recibieron tratamientos con CPT-11). Sin embargo, dosis mayores o iguales a 600 mg/kg dieron como resultado la muerte del animal el segundo día tras la administración de CPT-11. En general, los ratones pudieron tolerar dosis de hasta 400 mg/kg.

35 En la Figura 1 se muestran los perfiles de pérdida de peso de los ratones supervivientes. Los pesos corporales promedio de los ratones tratados con 300 mg/kg de CPT-11 fueron significativamente inferiores a los de los ratones que no recibieron ningún tratamiento con CPT-11 hasta 5 días después del tratamiento (Figura 1). Los pesos corporales promedio de estos dos grupos de ratones no fueron significativamente diferentes desde el día 5 después del tratamiento hasta el final del ensayo. Tanto la duración como el grado de la pérdida de peso fueron sensibles a la dosis de CPT-11 administrada al animal. La pérdida de peso se observó inmediatamente después del tratamiento con CPT-11 y continuó durante seis días en ratones a los que se les inyectaron 400 mg/kg de CPT-11. Estos animales recuperaron gradualmente su peso corporal original el día 12. Basándose en estos resultados, en el modelo de ratones BDF-1, se usaron 400 mg/kg ó 300 mg/kg de CPT-11. Sin embargo, ratones desnudos a los que

se les inocularon células tumorales humanas fueron significativamente más sensibles al tratamiento con CPT-11 que los ratones BDF-1 normales. La dosis máxima tolerable de CPT-11 en ratones desnudos con xenoinjertos de HepG2 humano fue 200 mg/kg (datos no mostrados).

Ejemplo 3: Efecto de PHY906 en la Pérdida de Peso Corporal Inducida por CPT-11 en Ratones BDF-1 con Tumor

5 PHY906 se evaluó como un modulador de terapia con CPT-11 para efectos secundarios tóxicos en ratones a los que se les inoculó células tumorales de Colon 38. Basándose en descubrimientos anteriores (Ejemplo 2), se seleccionó una sola dosis embolada de 400 mg/kg de CPT-11 para estudiar el efecto de PHY906 en la pérdida de peso asociada con la toxicidad de CPT-11. Para evaluar si PHY906 influye en la eficacia antitumoral de CPT-11, se implantaron subcutáneamente células tumorales de Colon 38 a los ratones. De 10 a 14 días después de la
 10 inoculación, los ratones se trataron con CPT-11 (400 mg/kg, i.p.) en ausencia o presencia de PHY906, que se administró por vía oral dos veces al día en dosis variadas (125 mg/kg, 250 mg/kg y 500 mg/kg). El tratamiento con PHY906 continuó a la dosis indicada durante 8 días consecutivos.

15 La Figura 2 muestra que el efecto de PHY906 sobre la pérdida de peso en ratones tratados con CPT-11 es dependiente de la dosis. Los animales tratados con CPT-11 que recibieron tratamiento complementado con 500 mg/kg/b.i.d de PHY906 mostraron una significativa mejora en el mantenimiento del peso corporal y recuperaron su peso original más rápidamente (p<0.01). La Tabla 8 resume los resultados estadísticos. Sin embargo, los ratones que recibieron 250 mg/kg/b.i.d de PHY906 no mostraron ninguna diferencia en la pérdida de peso corporal en comparación con los controles.

Tabla 8. Análisis Estadístico de PHY-906 en la Pérdida de Peso en Ratones con Tumor Tratados con CPT-11

N=5	Sin Tratamiento	CPT-11	CPT-11/PHY906 500 mg/kg	CPT-11/PHY906 250 mg/kg	CPT-11/PHY906 125 mg/kg
Sin Tratamiento	----	P<0,01	P<0,05	P<0,01	P<0,01
CPT-11	P<0,01	----	P<0,01	P>0,1	P<0,1
CPT-11/PHY906 500 mg/kg	P<0,05	P<0,01	----	P<0,01	P<0,01
CPT-11/PHY906 250 mg/kg	P<0,01	P>0,1	P<0,01	----	P>0,1
CPT-11 /PHY906 125 mg/kg	P<0,01	P>0,1	P<0,01	P>0,1	----

20 Ejemplo 4: Peso de Tumor de Ratones a los que se les Inoculó Colon 38 Tratados con CPT-11 y PHY906

Los ratones se trataron tal y como se expone en el Ejemplo 3 y se evaluaron en relación a los pesos de los tumores durante un periodo de 9 días.

25 Los resultados demuestran que el tratamiento con PHY906 ni impide ni la eficacia antitumoral de CPT-11 (Figura 3) ni la afecta. De hecho, los datos sugieren que esta medicina herbaria puede realmente aumentar la actividad antitumoral de CPT-11.

Estos resultados preliminares sugieren que la composición herbaria PHY906 puede usarse como modulador para quimioterapia con CPT-11 para mejorar y aliviar de manera significativa los efectos secundarios tóxicos de CPT-11 sin comprometer a la eficacia antitumoral de CPT-11.

30 Ejemplo 5: Efecto de PHY906 en Actividad Antitumoral y Toxicidad Hematológica de CPT-11 en Ratones BDF-1 con Tumores de Colon 38

35 En base a los resultados obtenidos en los estudios anteriores, 500 mg/kg/b.i.d de PHY906 ofrece la mejor protección para la toxicidad del huésped inducida por la dosis máxima tolerable de 400 mg/kg de CPT-11. Este conjunto de dosificaciones se usaron para los siguientes estudios. A los ratones BDF-1 con tumor de Colon 38 tratados con una dosis de CPT-11 (400 mg/kg, i.p) se les administraron 500 mg/kg/b.i.d PHY906 por vía oral durante 4 u 8 días. Se usaron cinco ratones en cada grupo y el experimento se repitió ocho veces. La Figura 3 representa un

resultado típico de todos los experimentos. La actividad antitumoral de CPT-11, tal y como la mide el tamaño del tumor, no estuvo comprometida por la terapia simultánea de PHY906 en el modelo animal. De hecho, se produjo una ligera reducción en el tamaño del tumor, lo que sugiere que PHY906 puede potenciar la actividad antitumoral de CPT-11.

5 La mielosupresión es un efecto secundario común entre pacientes tratados con CPT-11 (Bleiberg H y Cvitkovic E., Eur J Cancer 32A (Supl 3): S18-S23 (1996)). Para evaluar si PHY906 invierte de manera beneficiosa la mielotoxicidad inducida por CPT-11, se examinó la actividad hematológica en ratones BDF-1 con tumores de Colon 38. Tal y como se muestra en la Figura 4, PHY906 resultó no tener ningún impacto en el cómputo de glóbulos rojos o el recuento de plaquetas entre todos los regímenes y no demostró ninguna protección sobre la mielosupresión inducida por CPT-11. Con respecto a la actividad antitumoral y la actividad hematológica, no existió una diferencia significativa entre el día 4 y día 8 de co-tratamiento de PHY906 con CPT-11 (datos no mostrados).

Ejemplo 6: Efecto de PHY906 sobre Mortalidad en Ratones BDF-1 con Tumores de Colon 38 Tratados con CPT-11

15 Los ratones se dividieron en cuatro grupos con diferentes regímenes de tratamiento: Grupo (A) tratamiento con vehículo; Grupo (B) tratamiento con una sola dosis de 400 mg/kg de CPT-11 por inyección i.p; Grupo (C) tratamiento solo con PHY906 (500 mg/kg/b.i.d) o Grupo (D) tratamiento con una sola dosis de 400 mg/kg de CPT-11 más 500 mg/kg/b.i.d de PHY906 durante 4 u 8 días. La secuencia de cada régimen de tratamiento aparece en Materiales y Procedimientos. Tal y como se representa en la Tabla 9, 35 de 35 ratones con tumor (100%) del Grupo A y 15 de 15 ratones (100%) del Grupo C sobrevivieron al tratamiento solamente con vehículo o con PHY906 durante 4 u 8 días, lo que indica ninguna una toxicidad o muy baja de PHY906. Sin embargo, el tratamiento solamente con CPT-11 (Grupo B) dio como resultado que solamente 33 de los 40 ratones con tumor (82,5%) sobrevivieron después de 8 días. En cambio, este índice de supervivencia drásticamente hasta el 95% (19 de 20 ratones) o el 100% (24 de 24 ratones) después recibir durante 4 u 8 días tratamiento de PHY906 en combinación con CPT-11 (Grupo D). Esto sugiere que el tratamiento con PHY906 puede proteger a los ratones de la mortalidad inducida por una sola dosis de 400 mg/kg de CPT-11.

25

Tabla 9. Efecto de PHY906 en la Supervivencia de Ratones BDF-1 con Tumor de Colon 38 Tratados con CPT-11.

Medicación	Tratamiento				Nº Total de Ratones		
	CPT-11		PHY906		Tratados N	Supervivientes N	Supervivencia ^a %
	Régimen	Dosis (mg/kg)	Días	Dosis (mg/kg)			
A	0	0	0	0	35	35	100
B ^b	400	1	0	0	40	33	82.5
C	0	0	500	4	35	35	100
	0	0	500	8	15	15	100
D ^c	400	1	500	4	20	19	95
	400	1	500	8	24	24	100

^a Todos los animales se observados durante 4 días

^b 7 de 40 ratones con tratamiento CPT-11 murieron el día 5 (N=1), 6 (N=3), 7 (N=1) y 8 (N=2).

^c Con el tratamiento de combinación de CPT-11 y tratamiento con PHY906 (4 días), un ratón murió el día 6.

Ejemplo 7: Efecto de PHY906 en la Actividad Antitumoral de FU/LV en Ratones BDF-1 con Tumores de Colon 38

La combinación FU/LV muestra una potente actividad antitumoral y se usa como tratamiento de primera línea en pacientes de cáncer colorectal (Goldber R. M. y Erlichman C., Oncology 12: 59-63 (1988); Saltz L.B, Cox J.V, Blanke C, y col., New. Eng. J. Med. 343: 905-914 (2000)). Por lo tanto, se realizaron experimentos similares a los descritos anteriormente para el tratamiento con CPT-11 en animales con FU/LV. Se dividieron en cuatro grupos de ratones con cáncer de colon 38: Grupo (A) tratamiento con vehículo; Grupo (B) tratamiento solo con PHY906; Grupo (C) tratamiento solo con FU/LV; y Grupo (D) tratamiento con FU/LV más PHY906. La secuencia de cada régimen aparece en Materiales y Procedimientos. En este conjunto de experimentos, FU/LV se administró a los ratones solamente una vez el día 0, mientras que PHY906 se administró dos veces al día durante 4 días consecutivos.

Los cambios en el peso corporal y en el tamaño del tumor se controlaron diariamente, tal y como se muestra en las Figuras 5 y 6, respectivamente. Tal y como se representa en la Figura 5, apenas hubo cambio de peso corporal en los cuatro grupos. Esta observación contrasta con la obtenida en el tratamiento con CPT-11. Debido a que no se realizaron estudios de dosis-respuesta de FU/LV sobre la pérdida de peso corporal, es posible que la dosis de FU/LV administrada en este experimento no fuera lo suficientemente alta como para inducir toxicidad y la asociada pérdida de peso corporal. Aunque la pérdida de peso corporal fue insuficiente para demostrar un efecto protector de PHY906 sobre FU/LV, la Figura 6 indica que el tratamiento simultáneo de PHY906 no afectó a la actividad antitumoral de FU/LV en ratones BDF-1 con tumores de Colon 38. El perfil del crecimiento tumoral en el Grupo D es inferior al del Grupo C, lo que sugiere que PHY906 puede aumentar la actividad antitumoral de FU/LV en este modelo de animal. Además, la toxicidad hematológica de FU/LV en ratones tratados con administración simultánea de PHY906 se controló los días 4, 8 y 12. El PHY906 no invirtió la leucopenia o la trombocitopenia (Figura 7), efectos secundarios bien conocidos inducidos por FU/LV ((van der Wilt C. L, van Groeningen, C. J, Pinedo H. M, y col., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123: 595-601 (1997)).

Ejemplo 8: Efecto de PHY906 sobre Actividad Antitumoral de Ratones BDF-1 con Tumores de Colon 38 Tratados con CPT-11/FU/LV

La FDA ha aprobado recientemente la nueva terapia de triple combinación de CPT-11 más FU/LV como tratamiento de primera línea para el cáncer colorrectal avanzado (Goldber R. M. y Erlichman C., Oncology 12: 59-63 (1988); Saltz L.B, Cox J.V, Blanke C, y col., New. Eng. J. Med. 343: 905-914 (2000)). Este régimen ha demostrado ralentizar el progreso del crecimiento del tumor así como el índice de mortalidad. Sin embargo, a menudo se observa diarrea grave, de aparición tardía, en pacientes que reciben este régimen de tratamiento triple. Experimentos anteriores demostraron que PHY906 podía incrementar el índice terapéutico de CPT-11 en ratones BDF-1 con tumores de Colon 38. Por lo tanto, se evaluó PHY906 usando un protocolo similar al del Ejemplo 7 para determinar su eficacia en el alivio de la toxicidad limitante de dosis de quimioterapia triple. Los ratones BDF-1 con tumores de Colon 38 se dividieron en dos grupos: Grupo (A) tratados solamente con CPT-11/FU/LV; Grupo (B) tratados con CPT-11/FU/LV más PHY906. Las dosis de FU y LV usadas en ambos grupos fueron de 100 mg/kg cada una, porque se observó una toxicidad muy baja en estudios anteriores con estas dosis. En este régimen de quimioterapia triple, no se realizó un estudio de CPT-11 dependiente de la dosis, pero se usaron 200 mg/kg o 300 mg/kg de CPT-11. La secuencia de cada régimen aparece en Materiales y Procedimientos. Después de la quimioterapia, se administró PHY906 dos veces al día durante 4 días.

Los resultados indican que PHY906 no afecta a la eficacia antitumoral de la terapia triple tanto a 200 mg/kg como a 300 mg/kg de CPT-11, como se muestra en las Figuras 8 y 9, respectivamente. Tal y como se representa en la Figura 8, usando 200 mg/kg de CPT-11 en terapia de combinación triple, PHY906 aumenta ligeramente la supresión del tumor el día 14 ($p=0,045$). Con 300 mg/kg de CPT-11, el aumento de PHY906 en la supresión del tumor no fue significativo el día 14 ($p=0,05$), pero fue significativo el día 21 ($p=0,014$), en comparación con los grupos que no recibieron tratamiento con PHY906. Este resultado sugiere que, para observar el aumento de PHY906 en la supresión del tumor tratado con CPT-11/FU/LV, puede ser necesario un periodo de tiempo más largo. A la dosis estudiada, PHY906 mostró un efecto beneficioso similar en la actividad antitumoral en terapia de combinación triple y tratamiento con CPT-11.

A las dosis usadas en el tratamiento de combinación triple, los animales mostraron pérdida de peso corporal. Sin embargo, PHY906 no ralentizó el peso corporal durante la terapia, como se muestra en la Figura 10. Además, no afectó a la recuperación de la pérdida de peso corporal.

Ejemplo 9: Farmacocinética de CPT-11/FU/LV en Ratones BDF-1 con Tumor de Colon 38 en Presencia o Ausencia de PHY906

En las Figuras 18-20 se muestran los datos farmacocinéticos de CPT-11/FU/LV en ratones BDF-1 con tumor de Colon 38 en presencia o ausencia de PHY906. PHY906-6 es un lote clínico de PHY906, que contiene excipiente (almidón) al 10%.

El área bajo la curva (ABC) de CPT-11 en plasma aumenta tras la co-administración de PHY906 con la combinación triple de CPT-11/FU/LV. No se observa ningún cambio significativo de CPT-11 ni en el tumor ni en los tejidos hepáticos tras la co-administración de PHY906.

SN-38, un metabolito activo de CPT-11, permanece inalterable en plasma, hígado o tumor.

5 Las ABC de FU y sus metabolitos de nucleósido/nucleótido (FU+FUR+FUMP) plasma o hígado cambian tras la co-administración de PHY906 con la combinación triple de CPT-11/FU/LV.

Ejemplo 10: Efecto de PHY906 en Actividad Antitumoral y Toxicidad de CPT-11 en Ratones Desnudos con Tumor HepG2 Humano

10 Los resultados de los Ejemplos anteriores, especialmente los Ejemplos 5, 7 y 8, indican que PHY906 en combinación con agentes quimioterapéuticos puede potenciar los efectos antitumorales de agentes quimioterapéuticos y además retrasar el crecimiento tumoral. En base a los perfiles farmacológicos conocidos de hierbas contenidas en PHY906 (Tabla 1), se supone que los efectos potenciadores pueden actuar mediante sistemas inmunológicos y/o hematológicos en ratones normales. Por lo tanto, se diseñaron experimentos para ensayar la hipótesis en ratones desnudos, que carecen de sistema inmunológico y hematológico.

15 Para ensayar el efecto de PHY906 en la actividad antitumoral de CPT-11, se implantaron células de tumor HepG2 humanas en ratones desnudos NCr. Experimentos anteriores demostraron que la dosis máxima tolerable de CPT-11 en ratones desnudos era de 200 mg/kg, que fue la que se usó en este estudio. Se administró CPT-11 (200 mg/kg, i.p.) el día 0. Comenzando el día 0, PHY906 se administró dos veces al día a 500 mg/kg. Tal y como se muestra en la Figura 11, PHY906 no comprometió al efecto antitumoral de CPT-11 en xenoinjertos de HepG2
20 humanos en ratones desnudos. Sin embargo, a diferencia de la observación en ratones BDF-1, PHY906 no mostró ningún efecto beneficioso impidiendo la pérdida de peso corporal (Figura 12) o la muerte del animal (datos no mostrados) provocados por CPT-11. El hecho de que PHY906 no proteja a los ratones desnudos de la pérdida de peso como lo hace en ratones normales sugiere que PHY906 ejerce sus efectos a través de los sistemas hematológicos e inmunológicos, ausentes en los ratones desnudos.

25 Ejemplo 11. Efectos de Diferentes Formulaciones Herbarias Chinas sobre el Efecto Antitumoral de CPT-11, Pérdida de Peso Corporal y Supervivencia en Ratones

30 La diarrea es una de las toxicidades limitantes de la dosis entre pacientes tratados con agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. Además de PHY906, se examinaron otras medicinas anti-diarreicas. Estas incluyen medicinas chinas, tales como PHY14ST, PHY-15ST y PHY-915, así como loperamida, actualmente recomendada como el fármaco anti-diarreico para la diarrea de aparición tardía inducida por CPT-11.

35 Además de la inhibición del crecimiento de tumor y la pérdida de peso corporal, los presentes inventores examinaron los índices de supervivencia en ratones que recibieron diferentes formulaciones herbarias en combinación con una sola administración en bolo de CPT-11. De las varias formulaciones examinadas, PHY906 fue la única que se observó que mejoraba la actividad antitumoral de CPT-11 (Tabla 9), a pesar de que determinadas
40 hierbas contenidas en PHY906 también están presentes en las otras formulaciones herbarias. En el estudio de mortalidad, PHY906 no mostró ningún efecto estadístico en los índices de mortalidad de los animales ($P=0,044$). Se observó que otras medicinas anti-diarreicas ensayadas, tales como PHY14ST, PHY-15ST y loperamida, eran completamente ineficaces en cuanto a la protección de la pérdida de peso corporal o en cuanto al aumento de los efectos antitumorales de CPT-11. Sorprendentemente, se observó que PHY-915 disminuyó la actividad antitumoral de CPT-11 (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de Diferentes Formulaciones Herbarias en Ratones BDF-1 con Tumor de Colon 38 Tratados con CPT-11.

Formulación Herbaria (1 g ^c /kg, bid, 8 días)	Protección de Pérdida de Peso Corporal	Valor P ^{b,d}	Efecto Antitumoral	Valor P ^{b,e}	Mortalidad del animal ^a (Muerte/Total)
Ninguno					7/40
PHY906	Significativa	0,0004	Aumento	0,0027	0/24

PHY14ST	Sin Cambio	0,1072	Sin Cambio	0,2742	1 ^f /10
PHY15ST	Sin Cambio	0,3259	Sin Cambio	0,6535	0/3
PHY915	Significativa	0,0306	Disminución	0,0885	0/5
Loperamida	Sin Cambio	0,9706	Sin Cambio	0,1595	3 ^g /10

^a Todos los animales se observaron durante 14 días

^b Los valores p se calcularon usando el ensayo de la t de Student para muestras relacionadas

^c en base al peso seco de formulaciones que contienen excipiente.

^d calculado el día en que los ratones tratados con CPT-11 alcanzaron la máxima pérdida de peso corporal

^e calculado sobre el tamaño del tumor el día 6 tras el tratamiento inicial con el fármaco

^f un ratón murió el día 6

^g Ratones muertos el día 3 (N=1), 4 (N=1) y 5 (N=1).

Ejemplo 12: Citotoxicidad de PHY906 en Diferentes Líneas Celulares

Para evaluar in vitro modelos celulares como medidas de garantía de calidad, se estudiaron los efectos de dos preparaciones diferentes de PHY906 (PHY906A y PHY906B) en la inhibición de crecimiento de diferentes líneas celulares de tumor humano y en líneas celulares de tumor de Colon 38 de ratón. Tal y como se muestra en la Tabla 1, PHY906A y PHY906B no mostraron diferencia significativa en actividades inhibitoras de crecimiento entre las líneas celulares. Se observa que, las líneas celulares de HepG2 resultaron ser más sensibles a PHY906 que otras líneas celulares humanas.

5

Tabla 11. Citotoxicidad de PHY906 en Diferentes Línea Celulares

Formulación Herbaria ^b	CI ₅₀ (mg/ml) ^a				
	KB	HepG2	CEM	HTC116	Colon 38
PHY906A	0,67 ± 0,26	0,14 ± 0,08	0,73 ± 0,17	0,65	0,08 ± 0,02
PHY906B	0,90 ± 0,5	0,09 ± 0,06	0,64 ± 0,01	0,6	0,07 ± 0,02

^a en base al peso seco de extracto acuoso de hierbas sin tratar

^b Lote diferente de investigación de PHY906.

15

Los resultados de los experimentos anteriores sugieren que PHY906 reduce algunas toxicidades huéspedes inducidas por los tratamientos de CPT-11, FU/LV, o la terapia de combinación triple con CPT-11/FU/LV. El fármaco botánico PHY906 no solamente mantiene sino que también potencia la actividad antitumoral de los agentes quimioterapéuticos ensayados. De hecho, PHY906 aumenta el índice terapéutico de CPT-11, FU/LV y CPT/FU/LV aumentando la actividad global antitumoral en ratones con tumor de Colon 38 y en ratones desnudos con xenoinjertos de HepG2 humanos. Estas observaciones se ensayon con varios agentes anticancerígenos en dos modelos diferentes de tumor (Figuras 3, 6, 8, 9 y 11).

20

Ejemplo 13: Efecto de PHY906 en el Crecimiento Tumoral en Ratones a los que se les había Inoculado células de Colon 38 Tratados con L-OddC.

Se evaluó PHY906 como un modulador de terapia con L-OddC (beta-L-Dioxolano-citidina) para crecimiento de tumor en ratones a los que se les había inoculado células tumorales de Colon 38. Los ratones recibieron una

inyección subcutánea de células tumorales de Colon 38 murino. Siete días después de la inoculación de las células cancerígenas, los ratones se trataron con L-OddC (25 mg/kg) por vía intraperitoneal y con administración oral de PHY906 (500 mg/kg, b.i.d). A continuación, a los animales se les administró solamente la misma dosis de PHY906, de manera continuada, durante el resto del experimento.

5 Tal y como se muestra en la Figura 13, el tratamiento con L-OddC demuestra que PHY906 ni impide ni afecta a la eficacia antitumoral de L-OddC. De hecho, los datos sugieren que esta medicina herbaria puede realmente aumentar la actividad antitumoral de L-OddC.

10 Por consiguiente, estos resultados sugieren que la sustancia herbaria PHY906 puede usarse como un modulador para quimioterapia con L-OddC para mejorar y aliviar de manera significativa los efectos secundarios tóxicos sin comprometer la eficacia antitumoral de L-OddC.

Ejemplo 14: Efecto de PHY906 en el Crecimiento Tumoral en Ratones a los que se les había Inoculado células de Colon 38 Tratados con VP-16

15 Se evaluó PHY906 como un modulador de terapia con VP-16 (etopósido, un inhibidor de topoisomerasa II) en crecimiento de tumor en ratones a los que se les había inoculado células tumorales de Colon 38. Los ratones recibieron una inyección subcutánea de células tumorales de Colon 38 murino. Siete días después de la inoculación de las células cancerígenas, los ratones se trataron con VP-16 (25 mg/kg) por vía intraperitoneal y con administración oral de PHY906 (500 mg/kg, b.i.d). A continuación, a los animales se les administró solamente la misma dosis de PHY906, de manera continuada, durante el resto del experimento.

20 Tal y como se muestra en la Figura 14, el tratamiento con VP-16 demuestra que PHY906 ni impide ni afecta a la eficacia antitumoral de VP-16. De hecho, los datos sugieren que esta medicina herbaria puede realmente aumentar la actividad antitumoral de VP-16.

Por consiguiente, estos resultados sugieren que la sustancia herbaria PHY906 puede usarse como un modulador para quimioterapia con VP-16 para mejorar y aliviar de manera significativa los efectos secundarios tóxicos sin comprometer la eficacia antitumoral de VP-16.

25 Ejemplo 15: Efecto de PHY906 en el Crecimiento Tumoral en Ratones a los que se les había inoculado células de Colon 38 Tratados con 5-Fluorouracilo.

30 Se evaluó PHY906 como un modulador de terapia con 5-Fluorouracilo (FU) en crecimiento de tumor en ratones a los que se les había inoculado células tumorales de Colon 38. Los ratones recibieron una inyección subcutánea de células tumorales de Colon 38 murino. Siete días después de la inoculación de las células cancerígenas, los ratones se trataron con 5- fluorouracilo a dos dosis (250 mg/kg, una dosis el día 0, o una dosis diaria de 30 mg/kg desde el día 0 al día 4) por vía intraperitoneal y con administración oral de PHY906 (500 mg/kg, b.i.d). A continuación, a los animales se les administró solamente la misma dosis de PHY906, de manera continuada, durante el resto del experimento.

35 Tal y como se muestra en las Figuras 15 y 16, el tratamiento con 5-fluorouracilo demuestra que PHY906 ni impide ni afecta a la eficacia antitumoral de 5-fluorouracilo. De hecho, los datos sugieren que esta medicina herbaria a puede realmente aumentar la actividad antitumoral de 5-fluorouracilo.

Por consiguiente, estos resultados sugieren que la sustancia herbaria PHY906 puede usarse como un modulador para quimioterapia con 5-fluorouracilo para mejorar y aliviar de manera significativa los efectos secundarios tóxicos sin comprometer la eficacia antitumoral de 5-fluorouracilo.

40 Ejemplo 16: Efecto de PHY906 en el Crecimiento Tumoral en Ratones a los que se las había Inoculado células de Colon 38 Tratados con CPT-11 y Loperamida

45 Se evaluó PHY906 como un modulador de terapia con CPT-11 en crecimiento de tumor en ratones a los que se les había inocuazo células tumorales de Colon 38 en presencia de medicación antidiarreica Loperamida. Los ratones recibieron una inyección subcutánea de células tumorales de Colon 38 murino. Siete días después de la inoculación de las células cancerígenas, los ratones se trataron con CPT-11 (400 mg/kg, i.p), solamente en presencia de PHY906 administrado por vía oral (500 mg/kg, b.i.d) o en presencia de Loperamida (2 mg/kg, p.o, b.i.d).

50 La Figura 17 compara el efecto antitumoral de PHY906 y Loperamida. Tal y como se muestra en la Figura 17, CPT-11 en presencia de PHY906 es más eficaz en la reducción del crecimiento tumoral (tal y como se determina por el porcentaje de peso inicial del tumor) que la Loperamida.

Estos estudios preliminares sugieren que la sustancia herbaria PHY906 es más eficaz que la administración convencional de Loperamida para retrasar la diarrea inducida por CPT-11.

Ejemplo 17: Determinar la Dosis Eficaz Mínima (DEM) y la Duración Óptima de la Administración de PHY906 cuando se Administra en Combinación con Irinotecano.

5 *Introducción:* Varios estudios indican que la medicina Kampo, que consiste en siete hierbas, es eficaz para prevenir la aparición de diarrea inducida por CPT-11 en animales y para reducir la gravedad de la diarrea inducida por CPT-11 *in vivo* (Mori, 1998).

10 PHY906 también se ha evaluado en un modelo animal *in vivo* y ha demostrado reducir la gravedad de toxicidad inducida por irinotecano. Por consiguiente, basándose en un largo conocimiento histórico (1500 años) de demostración de inocuidad en seres humanos, la prometedora actividad pre-clínica de este compuesto en un modelo animal y la posible actividad observada en un compuesto herbario relacionado en este entorno, se puede realizar un estudio para evaluar el efecto de PHY906 en cuanto a la gravedad de toxicidades inducidas por quimioterapia, tales como pérdida de peso, diarrea, estado funcional global y calidad de vida, y en cuanto a la actividad anti-tumoral de irinotecano u otros fármacos en pacientes con cáncer colorrectal avanzado resistente al tratamiento.

15 Este estudio incluye a pacientes con cáncer colorrectal avanzado histológicamente confirmado, resistente al tratamiento con FU. No es preciso medir o evaluar la enfermedad. Los pacientes con metástasis en el sistema nervioso central (SNC) son los posibles candidatos siempre y cuando la enfermedad en el SNC se haya mantenido estable durante al menos 4 semanas tras la finalización de la cirugía, quimioterapia y/o terapia con radiación.

20 Los participantes en el estudio tendrán ≥ 18 años y no tendrán enfermedades médicas subyacentes significativas. Todos los pacientes tendrán un estado funcional del ECOG de 0-2, una esperanza de vida de al menos 3 meses y habrán dado un consentimiento por escrito. (ECOG es la abreviatura de "Grupo Oncológico Cooperativo de Oriente". ECOG 0 = paciente que realiza una actividad normal; ECOG 1 = paciente que tiene síntomas mínimos; ECOG 2 = paciente postrado en cama $< 50\%$ del tiempo; ECOG 3 = paciente postrado en cama $> 50\%$ del tiempo; ECOG 4 = paciente siempre postrado en cama). Los pacientes deben haberse recuperado por completo de los efectos de cualquier otra cirugía anterior y no pueden haber recibido ninguna radiación de campo amplio ni quimioterapia durante 4 semanas (6 semanas para nitrosoureas o mitomicina C) antes de participar en este estudio. Para participar en el estudio, se requiere un RTN (recuento total de neutrófilos) $\geq 1500/\mu\text{l}$, un recuento de plaquetas ≥ 40 ml/min y una bilirrubina total $\leq 2,0$ mg/dl.

30 *Evaluación del Pretratamiento:* Antes de comenzar el tratamiento, se tendrá un historial médico y físico completo de todos los pacientes y se determinará su estado funcional. Los estudios del laboratorio incluirán un recuento de sangre completa (RSC) con diferentes ensayos de albúmina en suero, electrolitos, glucosa, nitrógeno ureico en sangre (NUS), creatinina, calcio y magnesio en suero, función hepática, tiempo de protrombina y tromboplastina parcial y análisis de orina.

35 *Tratamiento:* El irinotecano se reconstituirá a partir de un polvo liofilizado en 2 ml de agua estéril, se diluirá en 100 ml de D5W (dextrosa en agua al 5%), y se administrará durante 90 min a una dosis de 125 mg/m^2 . La quimioterapia con irinotecano se administrará sobre un programa semanal durante 4 semanas con un periodo de descanso de 2 semanas en el ambulatorio en cada uno de los hospitales participantes.

PHY906 se tomará con el estómago vacío 30 minutos antes de las comidas. En los días de tratamiento con quimioterapia, la primera dosis se tomará antes de la administración de irinotecano.

40 PHY906 se administrará por vía oral tres veces al día antes de cada comida comenzando con una dosis inicial de 0,60 g (dosis diaria total, 1,80 g/día). La dosis de PHY906 que se está usando actualmente en pacientes en Oriente es de 7,2 mg/día, y hasta la fecha no se han observado efectos adversos. Por lo tanto, la dosis que se propone para empezar este ensayo es $\frac{1}{4}$ parte de la dosis habitual de la medicina herbaria. PHY906 se administrará durante un ciclo completo de quimioterapia de 4 semanas junto con irinotecano con un descanso de 2 semanas. Se tratará a un mínimo de tres pacientes con este nivel inicial de dosis de PHY906. Una vez que los 3 pacientes han completado un ciclo completo de 6 semanas, si 0 de los 3 pacientes experimenta toxicidad limitante de dosis (TLD), se usará entonces la siguiente dosis más alta para el siguiente grupo de 3 pacientes. Se realizarán estudios farmacocinéticos en todos los pacientes 24 horas después de comenzar el primer ciclo de quimioterapia.

50 Si 1 de 3 pacientes experimenta TLD, entonces 3 pacientes más se tratarán con el mismo nivel de dosis. Si ≤ 1 de los 3 siguientes experimenta TLD (1 ó 2 de un total de 6 pacientes), se realizará un escalonamiento de la dosis hasta el siguiente nivel de dosis excepto cuando estos hechos ocurran durante el esquema duplicado, en el que el siguiente escalonamiento será a un nivel de $n + 1$ sobre el esquema de Fibonacci modificado (Tabla 12).

Tabla 12. Programa de Escalonamiento de Dosis de PHY906

Nivel de Dosis	Escalonamiento	Dosis Total (gm/día)
1	Inicio	1,8
2	2 x nivel 1	3,6
3	2 x nivel 2	7,2
Una vez que se alcanza el nivel de dosis de 7,2 gm/día y no se observa toxicidad \geq al grado 2 en este nivel "n", se realizará un escalonamiento de Fibonacci modificado como se muestra a continuación		
N + 1	1,5 x nivel n	
N + 2	1,33 x nivel n + 1	
N + 3	1,25 x nivel n + 2	
Todos los siguientes niveles: aumentos del 25% hasta alcanzar la dosis máxima tolerada.		

5 *Programa de Escalonamiento de Dosis de PHY906:* Si se indica clínicamente y se los Investigadores Principales lo consideran necesario, se podrá utilizar un nivel de dosis inferior, en lugar del nivel anteriormente especificado.

El índice de ingreso del sujeto y el escalonamiento al siguiente régimen de dosis dependerá de la evaluación del perfil de seguridad de los pacientes que ingresan a cada nivel de dosis. La toxicidad se evaluará y clasificará de acuerdo con las Directrices de Ensayos Clínicos (DET) del NCI sobre Criterios de Toxicidad Común Ampliados.

10 El programa antiemético para este protocolo consistirá en 1-2 mg de granisetron mezclado en 50 ml de solución salina normal y se administrará $\frac{1}{2}$ hora antes de la quimioterapia cada día del tratamiento. Los antieméticos (administrados por vía intravenosa u oral) se repetirán cada 8 horas según sea necesario para controlar las náuseas y/o vómitos. El tratamiento se repetirá cada semana durante 4 semanas consecutivas seguidas de 2 semanas de descanso. Esto constituirá un ciclo de tratamiento.

15 La diarrea que se produce durante o justo después la infusión de irinotecano se tratará con atropina (0,5-1 mg) por vía intravenosa. Para la diarrea que se produce \geq 12 horas tras la administración de irinotecano, los pacientes se tratarán con loperamida 4 mg por vía oral tras el primer síntoma de diarrea seguido de 2 mg por vía oral cada 2 horas (4 mg por vía oral cada 4 horas por la noche) hasta la completa desaparición de la diarrea durante al menos 12 horas. Si la diarrea presenta sangre, asociada a fiebre de \geq 38,6 °C (101,6 °F) y persiste durante \geq 12 horas, se ingresará al paciente en el hospital para evaluación y tratamiento adicional.

20 *Modificación de la Dosis de Irinotecano:* En este estudio no habrá escalonamiento de dosis de irinotecano. La modificación de la dosis para la toxicidad se realizará tal y como se recomienda en el prospecto que proporciona el fabricante (Tabla 13).

Tabla 13: Modificaciones de las Dosis Recomendadas para el Programa Semanal y Una Vez Cada 3 Semanas

No se iniciará un nuevo ciclo de terapia hasta que el recuento de granulocitos se haya recuperado a $\geq 1500/\text{mm}^3$ y el recuento de plaquetas se haya recuperado a $\geq 100,000/\text{mm}^3$ y la diarrea relacionada con el tratamiento haya remitido por completo. El tratamiento debería retrasarse de 1 a 2 semanas para permitir la recuperación de las toxicidades relacionadas con el tratamiento. Si el paciente no se ha recuperado después de una espera de 2 semanas, debería considerarse suspender Camptosar.			
Valor de Nivel ^b NCI de Toxicidad Semanal	Durante un Ciclo de Terapia		Al inicio de los Sigüientes Ciclos de Terapia (Tras la Recuperación Adecuada) en comparación con la Dosis Inicial en el Ciclo Previo ^a
	Semanalmente	Semanalmente	Una vez cada 3 semanas
Sin Toxicidad	Mantener nivel de dosis	$\uparrow 25 \text{ mg/m}^2$ hasta una dosis máxima de 150 mg/m^2	1 Mantener el nivel de dosis

(cont)

Neutropenia 1 (1500 a 1999/ mm^3) 2 (1000 a 1499/ mm^3) 3 (550 a 999/ mm^3) 4 (<500/ mm^3)	Mantener el nivel de dosis $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ Omitir dosis, después $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ cuando se solucione a \leq grado 2 Omitir dosis, después $\downarrow 55 \text{ mg/m}^2$ cuando se solucione \leq grado 2	Mantener el nivel de dosis Mantener nivel de dosis $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ $\downarrow 50 \text{ mg/m}^2$	Mantener el nivel de dosis Mantener el nivel de dosis $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ $\downarrow 50 \text{ mg/m}^2$
Fiebre neutropénica (grado 4 neutropenia y \geq grado 2 fiebre)	Omitir dosis, después $\downarrow 50 \text{ mg/m}^2$ cuando se solucione	$\downarrow 50 \text{ mg/m}^2$	$\downarrow 50 \text{ mg/m}^2$
Otras toxicidades hematológicas	Modificaciones de dosis por leucopenia, trombocitopenia, y también en base a criterios de toxicidad de NCI y son los mismos al inicio de ciclos de terapia posteriores que los recomendados para neuropenia anteriormente.		
Diarrea 1 (2-3 deposiciones/día > pretx ^c) 2 (4-6 deposiciones/día > pretx ^c) 3 (7-9 deposiciones/día > pretx ^c) 4 (=10 deposiciones/día > pretx ^c)	Mantener el nivel de dosis $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ Omitir dosis, después $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ cuando se solucione \leq grado 2 Omitir dosis, después $\downarrow 55 \text{ mg/m}^2$ cuando se solucione \leq grado 2	Mantener el nivel de dosis Mantener el nivel de dosis $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ $\downarrow 50 \text{ mg/m}^2$	Mantener el nivel de dosis Mantener nivel de dosis $\downarrow 25 \text{ mg/m}^2$ $\downarrow 50 \text{ mg/m}^2$
Valor de Nivel ^b NCI de Toxicidad	Durante un Ciclo de Terapia	Al inicio de los Sigüientes Ciclos de Terapia (Tras la Recuperación Adecuada) en comparación con la Dosis Inicial en el Ciclo	

		Previo ^a
--	--	---------------------

(cont)

	Semanalmente	Semanalmente	Una vez cada 3 semanas
Otras toxicidades no hematológicas		Mantener el nivel de dosis	Mantener el nivel de dosis
1		Mantener el nivel de dosis ↓ 25 mg/m ² ↓ 50 mg/m ²	Mantener el nivel de dosis ↓ 25 mg/m ²
2			
3			
4			
a Todas las modificaciones de dosis deberían basarse en las peores toxicidades anteriores			
b Criterios de Toxicidad Comunes del Instituto Nacional de Cáncer			
c Pretratamiento			

5 **Respuesta y Evaluación de Toxicidad:** La toxicidad se evaluará mediante exámenes físicos semanales y recuentos en sangre y se clasificará de acuerdo con los Criterios de Toxicidad Comunes del Instituto Nacional de Cáncer. Estas evaluaciones y un perfil químico completo se repetirán antes de cada tratamiento.

Los pacientes también llevarán un registro diario de su hábito intestinal y su uso de agentes anti-movilidad. Este diario incluirá la hora de la toma de PHY906, un registro de la frecuencia y consistencia de sus movimientos intestinales (con forma, sueltos o acuosos) y el tratamiento anti-movilidad que el paciente usó para dirigir este síntoma.

10 Una enfermera de investigación contactará con cada paciente al menos una vez a la semana entre visitas durante el primer ciclo para reforzar las instrucciones sobre el tratamiento de la diarrea y la finalización del diario. La calidad de vida global, incluyendo astenia, náuseas, vómitos y pérdida de apetito también se evaluarán usando la metodología FAST establecida.

15 Un farmacéutico realizará un recuento de pastillas para cada visita clínica para el tratamiento para evaluar el cumplimiento con PHY906. Se realizará una evaluación de la respuesta a la enfermedad después de dos ciclos de tratamiento. La respuesta se definirá de acuerdo con los criterios ECOG y se evaluará en todos los pacientes con enfermedad medible o evaluable pero no constituirá un punto final en este estudio.

20 **Farmacocinéticas de Irinotecano:** en pacientes seleccionados se realizarán estudios farmacocinéticos para evaluar si PHY906 afecta al metabolismo y eliminación de irinotecano. En estos pacientes, la primera dosis de irinotecano se administrará sola (ciclo 1/día 1) y PHY906 comenzará el día 2.

25 Se recogerán muestras de sangre en tubos heparinizados inmediatamente antes de la administración de irinotecano, 30, 60, 90 min durante la infusión de irinotecano y 0,5, 1,5, 3,5 y 6 h después del fin de la infusión en el ciclo 1, día 1 o en el ciclo 1 día 9. Las muestras se procesarán inmediatamente con 2,50 µl de plasma añadido a 500 µl de solución interna convencional en tubos de poliestireno. La solución interna convencional consistirá en camptotecina 50 µg/ml en acetonitrilo acidificado con ácido acético congelado, 4,0 ml en 100 ml. Las muestras se mezclarán con agitación vorticial durante 30 segundos, se colocarán en un baño de agua a 40°C durante 15 min, se enfriarán a temperatura ambiente y a continuación se mezclarán con 900 µl de un tampón de trietilamina 25 mM (pH 4,2). El sobrenadante se transferirá a tubos Eppendorf de 1,5 ml, se centrifugará durante 4 min a 13.000 x g en una microcentrífuga y una alícuota del sobrenadante sin impurezas se analizará mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

30 Los análisis cromatográficos se realizarán en una columna de HPLC de fase inversa Microsorh C18 (4,5 x 250 mm, 5 µm tamaño de partícula) eluida con tampón TEA/acetonitrilo 72: 28 (v/v) 25 mM a 1 ml/min utilizando un detector fluorescente con λEX 372 nm y λEm 535 nm ((Pharmacia & Upjohn SOP N°UPJ-120-5). La máxima concentración de plasma, la semivida terminal y el ABC (área bajo la curva) se determinarán mediante análisis no compartimental de los datos utilizando el programa informático PC-NONLIN (Scientific Consulting Lexington, KY) y ecuaciones farmacocinéticas convencionales. Los estudios farmacocinéticos se realizarán el ciclo 1/día 1 y el ciclo

1/día 8, para determinar si la exposición prolongada a PHY906 produce un efecto acumulativo de irinotecano en la eliminación de irinotecano del plasma.

REFERENCIAS PARA LAS QUE NO SE OFRECE UNA CITA COMPLETA EN EL TEXTO DE LA MEMORIA DESCRIPTIVA

- 5 Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan en su totalidad:
- Bienvenu JA, Monneret G, Gutowski MC. y col. Cytokine assays in human sera and tissues *Toxicology* 129: 55-61(1998).
- Bleiberg, H.: CPT-11 in Gastrointestinal Cancer. *European Journal of Cancer*, Vol. 35, Nº 3, 371-379, 1999.
- 10 Bleiberg, H., Cvitkovic, E.: Characterization and clinical management of CPT-11 (irinotecan)-induced adverse events: The European perspective. *Eur. J. Cancer* 32A (Supl 3): S18-S23, 1996.
- Calabresi P. y Chabner BA: *Chemotherapy of Neoplastic Diseases*, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Novena Edición, Sección X: 1225-1232, 1996.
- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Calabresi P.: *Antineoplastic Agents*, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Novena Edición, Capítulo 51: 1233-1287.
- 15 Chen J. J.W, Wu R, Yang PC, y col. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 51: 313-324 (1998).
- Chu, X-Y, Kato, Y, Ueda, K. y col. Biliary Excretion Mechanism of CPT-11 and Its Metabolites in Humans: Involvement of Primary Active Transporters. *Cancer Res.* 58: 5137-5143, 1998.
- 20 Douillard J., Cunningham D., Roth A., Germa J., James R., Karasek P., Jandik P., Iveson T., Carmichael J., Gruia G., Dembak M., Sibaud D., Rougier P.: A randomized phase III trial comparing Irinotecan + 5FU/Folinic Acid (FA) to the same schedule of 5FU/FA in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCR) as front line chemotherapy (CT), *Proc. ASCO*, Vol. 18, 233a, 1999.
- Gilman, M. 1993. Ribonuclease protection assay. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1. (Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Stuhl, eds.), págs. 4.7.1-4.7.8, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York.
- 25 Guo X, Lerner-Tung M, Chen HX, Chang CN, Zhu JL, Chang CP, Pizzorno G, Lin, TS, Cheng YC. 5-Fluoro-2 pyrimidinone, A liver aldehyde oxidase-activated prodrug of 5-fluorouracil. *Biochem Pharm*, 49, 1111-1116 (1995)
- 30 Gupta E, Mick R, Ramirez J, Wang X, Lestingi TM, Vokes EE, Ratain MJ: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the topoisomerase inhibitor irinotecan in cancer patients. *J Clin Oncol* 15: 1502-1510, 1997.
- Haaz M. C., Rivory, L., Riche, C., y col. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions. *Cancer Res* 58: 468-472 (1998).
- 35 Hani Oka Hiroshi, Taki No Ko Suke: *Application of 212 formula of Kampo Medicine*. Kabusiki Kaishya, Tokyo, Japan, 1998.
- Hsu H. y Hsu C., *Commonly used Chinese herbal formulas; Companion Handbook*, Ohai Press.
- Jouliá, J., Pinguet, F., Ychou, M., Duffour, J., Astre, C. y Bressolle, F.: Plasma and Salivary Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil (FU) in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Receiving FU Bolus Plus Continuous Infusion with High-dose Folinic Acid. *European Journal of Cancer*, Vol. 35, Nº 2, 26-301, 1999.
- 40 Kaneda N., Nagata H., Furuta T., Yokokura T.: Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Res* 50: 1715-1720, 1990.
- Kivisto K. T., Kroemer H. K. y Eichelbaum M. The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. *Br J. Clin Pharmacol* 40: 523-530 (1995).
- 45 Koima K., y col. Long-term administration of Asho-saiko-to@increase cytochrome P-450 mRNA level in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 426-428, 1998.

- Lombardi V. R. M, Garcia M y Cacabelos L. R. R. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. *Journal of Neuroimmunol* 97: 163-171(1999).
- 5 Miller CL y Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lymphomyeloid reconstituting ability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 13648-13653 (1997).
- Mori K., Hirose T., Machida S., Tominaga K.: Kampo medicines for the prevention of irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small cell lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 25: 1159-63, 1998.
- 10 Marita M., Nagai E., Hagiwara H., Aburada M., Yokoi T., Kamataki T.: Inhibition of beta-glucuronidase by natural glucuronides of kampo medicines using glucuronide of SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) as a substrate. *Xenobiotica* 23: 5-10, 1993.
- Peters, G. y van Groeninger, C.: Clinical relevance of biochemical modulation of 5-fluorouracil. *Annals of Oncology* 2: 469-7480, 1991.
- Pinedo, H. y Peters, G.. Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 6, Nº 10 (octubre), 1633-1664, 1988.
- 15 Pizzorno G., Wiegand R., Lentz S. y Handschumacher R., Brequinar Potentiates 5-Fluorouracil antitumor activity in a Murine model colon 38 tumor by tissue-specific modulation of uridine nucleotide pools. *Cancer Res.*, 52: 1660-1665, 1992
- Roby C.A., Anderson GD y Dryer DA y col. St John's Wort: Effect on CYP3A4 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 451-457 (2000).
- 20 Saliba F, Hagipantelli R, Misset J-L, Bastian G, vassal G, Bonnay M, Herait P, Cote C, Mahjoubi M, Mignard D, Cvitkovic E: Pathophysiology and therapy in irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with advanced colorectal cancer: A prospective assessment. *J Clin Oncol* 16: 2745-2751, 1998.
- 25 Saltz LB, Locker PK, Plotta N, Elfring GL, Miller LL: Weekly Irinotecan (CPT-11), Leucovorin (LV), and Fluorouracil (FU) is superior to daily x5 LV/FU in patients (PTS) with previously untreated metastatic colorectal cancer (CRC), *Proc. ASCO*, Vol. 18, 233a, 1999.
- Stucky-Marshall, L.: New Agents in Gastrointestinal Malignancies: Part 1: Irinotecan in Clinical Practice, *Cancer Nursing*, 22(3): 212-219, 1999.
- 30 Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, Kato M, y col. Involvement of b-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Res.* 56: 3752-3757 (1996).
- Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, y col. Inhibition of intestinal microflora - glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 42: 280-286 (1998).
- 35 Wasserman E., Myara A., Lokiec F., Goldwasser F., Trivin F., Mahjoubi M., Misset J., Cvitkovic E.: Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: Two case reports. *Ann Oncol* 8: 1049-1051, 1997.
- Wierda D. y Matamoros M. Partial characterization of bone marrow hemopoiesis in mice after cisplatin administration. *Toxicol & Applied Pharmacol* 75: 25-34(1984).
- Xu Guo-Jun, Introduction to the Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical Science Publication Inc., Beijin, China, 1996, pág. 398.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* para su uso en un procedimiento para tratar cáncer en un mamífero, en la que la preparación herbaria es para co-administrar con una formulación quimioterapéutica que comprende un compuesto quimioterapéutico.
- 5 2. Una formulación quimioterapéutica que comprende un compuesto quimioterapéutico para su uso en un procedimiento para tratar cáncer, en la que la formulación quimioterapéutica es para co-administrar con una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*.
- 10 3. Una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* para su uso en un procedimiento para calmar los efectos secundarios de un compuesto quimioterapéutico en un mamífero, en la que la preparación herbaria es para co-administrar con una formulación quimioterapéutica que comprende el compuesto quimioterapéutico.
- 15 4. Una formulación quimioterapéutica que comprende un compuesto quimioterapéutico para su uso en un procedimiento para tratar cáncer, en la que la formulación quimioterapéutica es para co-administrar con una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* para calmar los efectos secundarios del compuesto quimioterapéutico en un mamífero.
- 20 5. Una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* para su uso en un procedimiento para aumentar la actividad anticancerosa de un compuesto quimioterapéutico en un mamífero, en la que la preparación herbaria es para co-administrar con una formulación quimioterapéutica que comprende el compuesto quimioterapéutico.
- 25 6. Una formulación quimioterapéutica que comprende un compuesto quimioterapéutico para su uso en un procedimiento para tratar cáncer, en la que la formulación quimioterapéutica es para co-administrar con una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* para aumentar la actividad anticancerosa del compuesto quimioterapéutico en un mamífero.
7. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la preparación herbaria es para administrar por vía oral, y la formulación quimioterapéutica es para administrar por vía oral o parenteral.
8. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la preparación herbaria es para administrar por vía oral, y la formulación quimioterapéutica es para administrar por vía intravenosa.
- 30 9. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la preparación herbaria comprende *Scutellaria baicalensis*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Ziziphusjuba*, *Paeonia lactiflora* y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
- 35 10. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la preparación herbaria consiste en *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
- 40 11. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el compuesto quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en irinotecano (CPT-11), 5-fluorouracilo (5-FU), etopósido (VP-16), beta-L-Dioxolano-citidina (L-OddC), leucovorina (LV) y combinaciones de los mismos.
- 45 12. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la preparación herbaria es para administrar antes de la administración de la formulación quimioterapéutica.
13. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la preparación herbaria se administra después de la administración de la formulación quimioterapéutica.
14. La preparación herbaria o formulación quimioterapéutica para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la preparación herbaria se administran simultáneamente con la administración de la formulación quimioterapéutica.
15. Una combinación farmacéutica que comprende:

- i) una preparación herbaria que comprende *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia*; y
- ii) una formulación quimioterapéutica que comprende un compuesto quimioterapéutico.

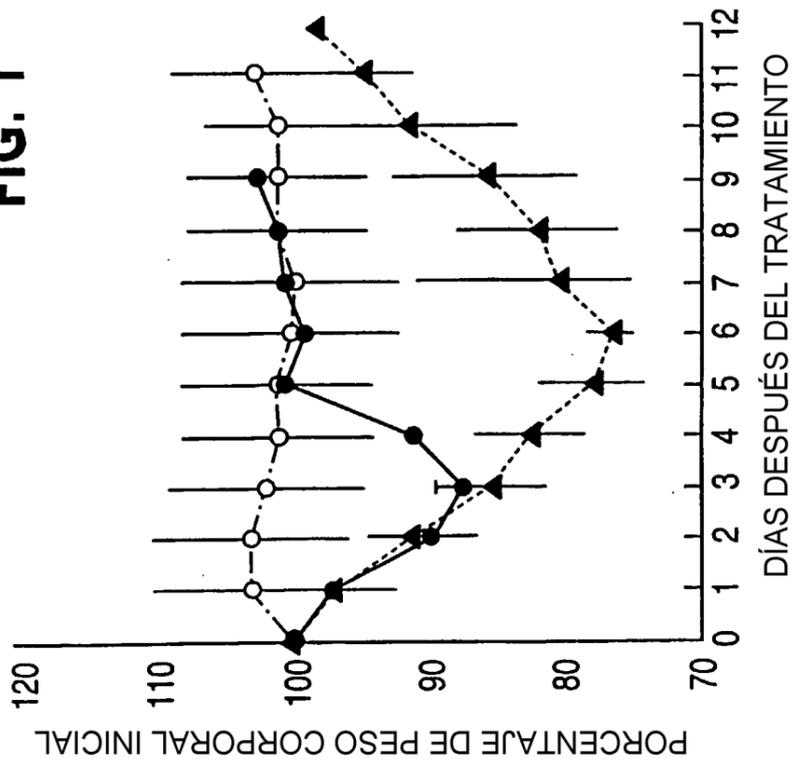
5 16. La combinación farmacéutica de la reivindicación 15, en la que la preparación herbaria comprende *Scutellaria baicalensis*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Ziziphusjuzuba*, *Paeonia lactiflora* y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

17. La combinación farmacéutica de la reivindicación 16, en la que la preparación herbaria consiste en *Scutellaria*, *Glycyrrhiza*, *Ziziphus* y *Paeonia* y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

10 18. La combinación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la que el compuesto quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en irinotecano (CPT-11), 5-fluorouracilo (5-FU), etopósido (VP-16), beta-L-Dioxolano-citidina (L-OddC), leucovorina (LV) y combinaciones de los mismos.

19. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para su uso en un procedimiento para tratar cáncer.

FIG. 1



● CPT-11 300 mg/kg
 ▲ CPT-11 400 mg/kg
 ○ SIN TRATAMIENTO

N = 4	SIN TRATAMIENTO (DÍA 3)	CPT-11 300 mg/kg (DÍA 3)	CPT-11 400 mg/kg (DÍA 6)
SIN TRATAMIENTO (DÍA 3)	—	P < 0,01	P < 0,01
CPT-11 300 mg/kg (DÍA 3)	P < 0,01	—	P < 0,05
CPT-11 400 mg/kg (DÍA 6)	P < 0,01	P < 0,05	—

FIG. 2

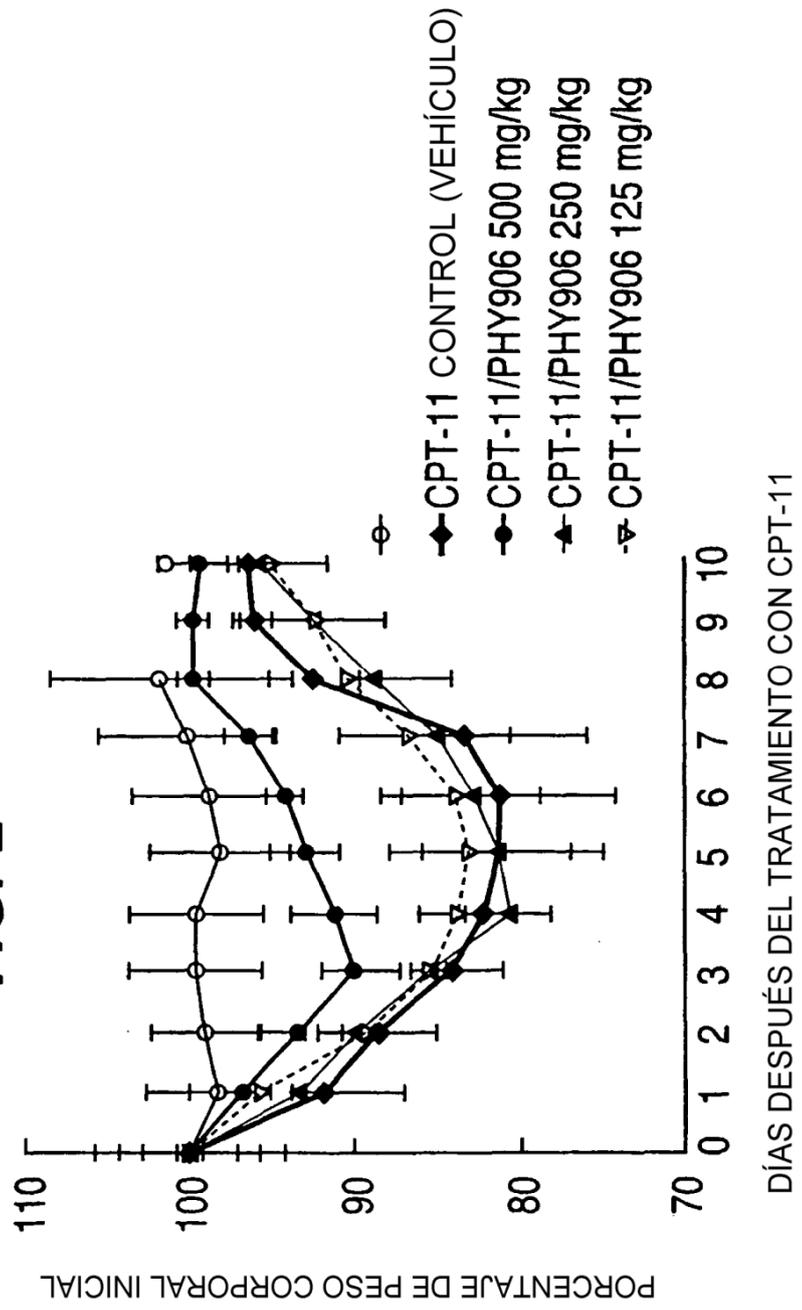
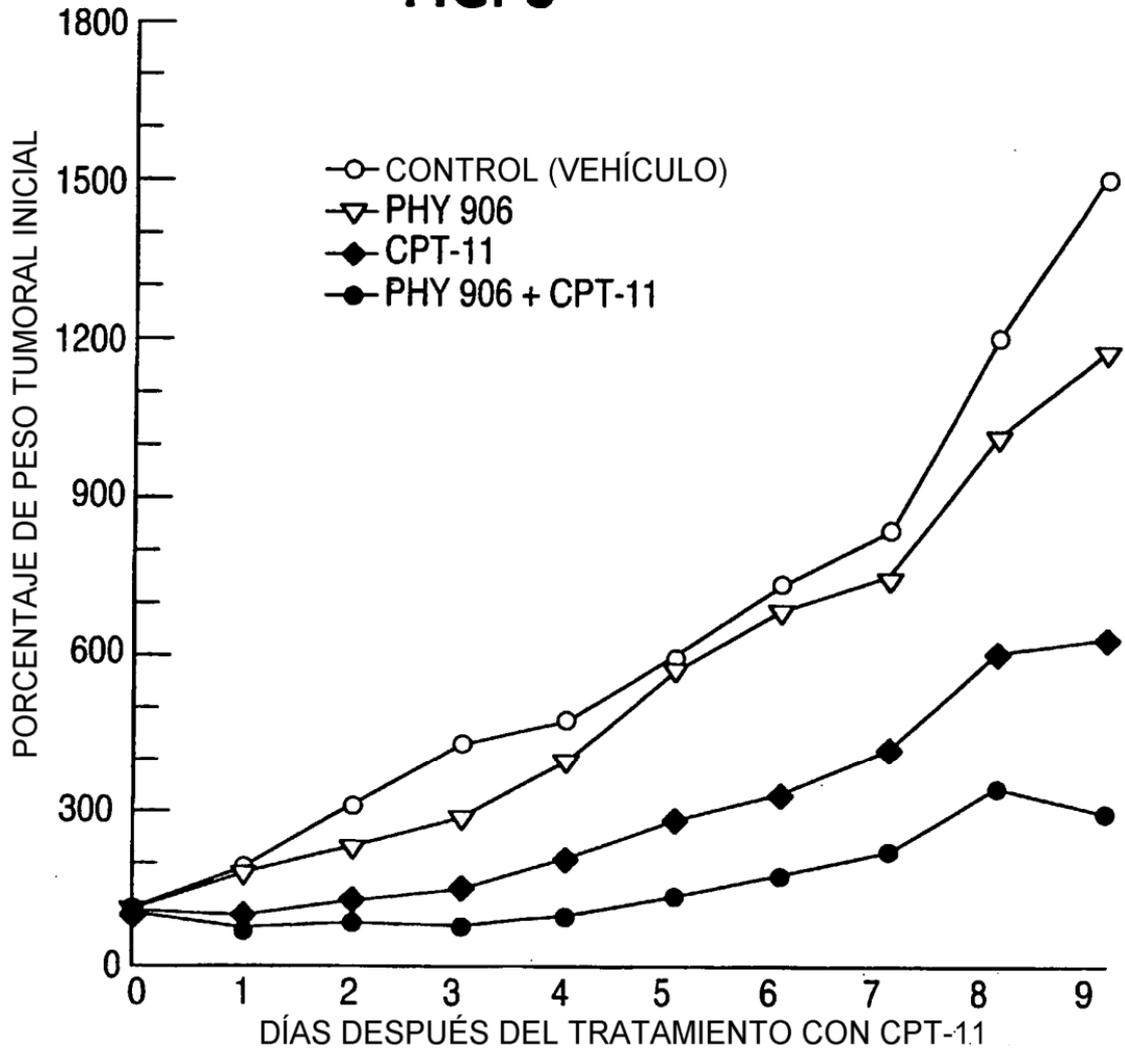


FIG. 3



VALOR P DEL ENSAYO t EL DÍA 6	CONTROL (VEHÍCULO)	PHY 906	CPT-11	CPT-11 CON PHY 906
PHY 906	0,5950	—	0,0027	0,0001
CPT-11	0,0004	0,0027	—	0,0007
CPT-11 CON PHY 906	0,0001	0,0001	0,0007	—

FIG. 4

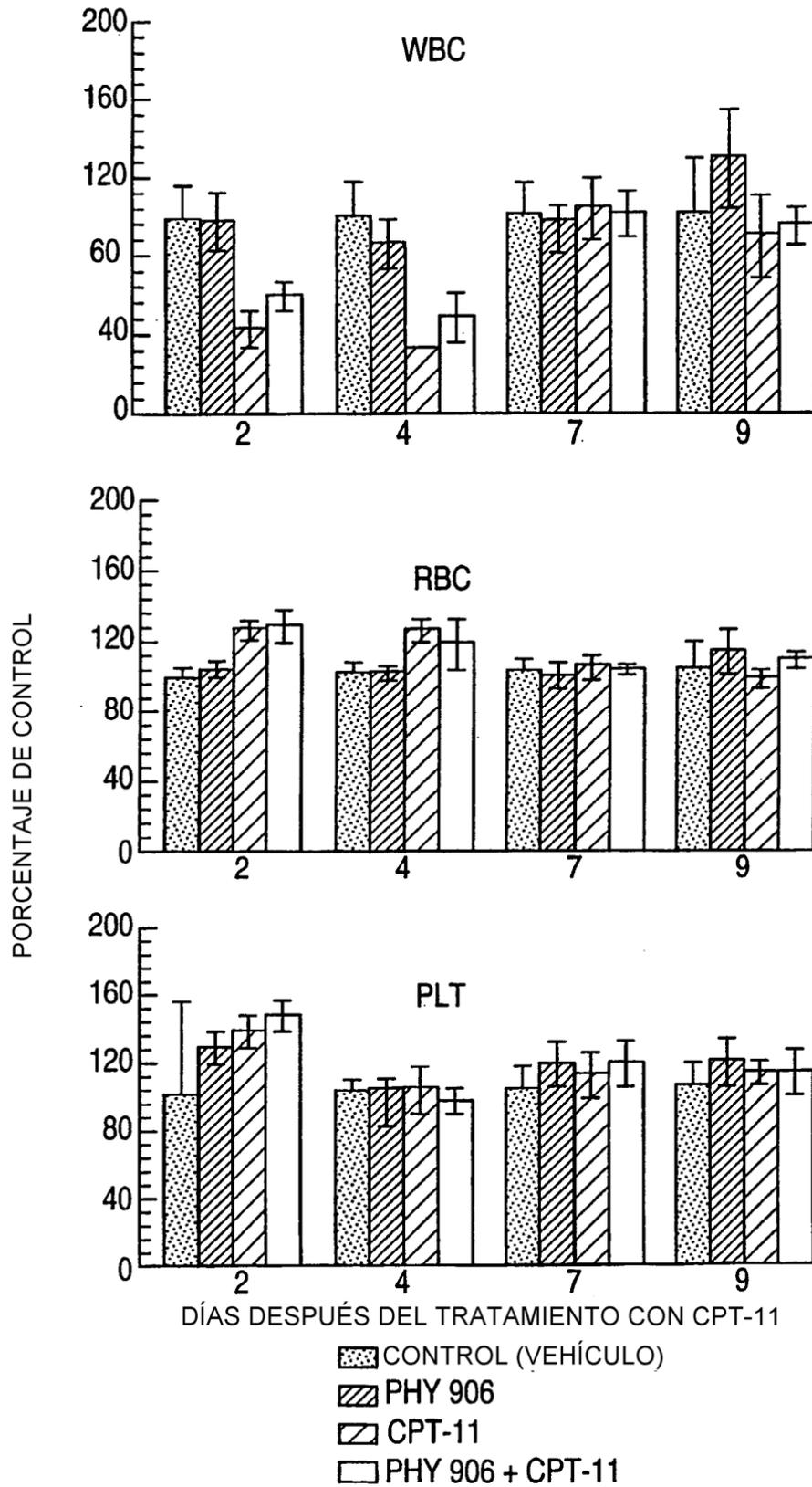


FIG. 5

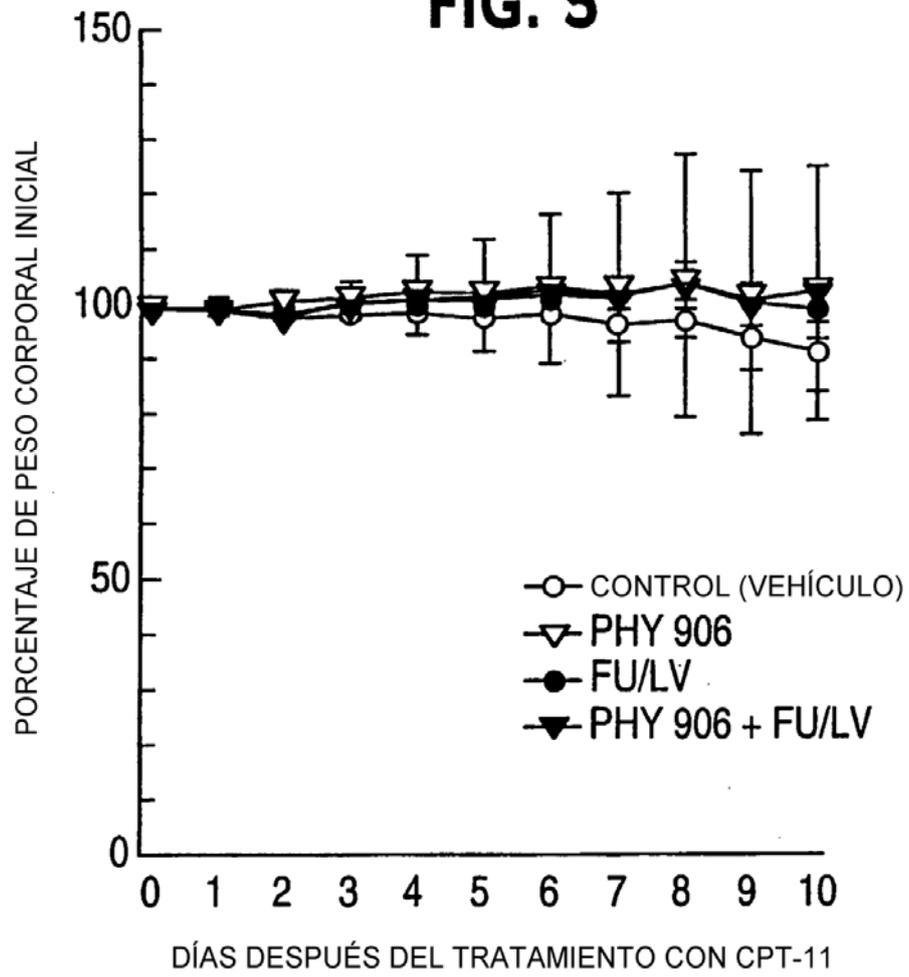
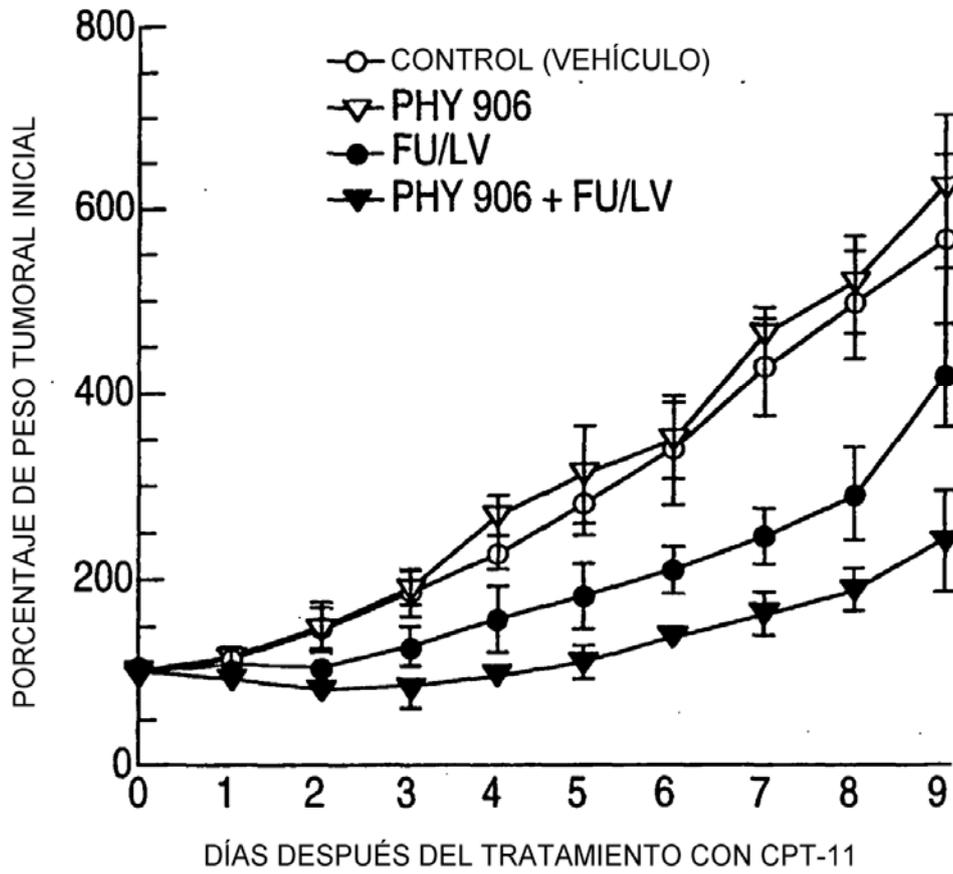


FIG. 6



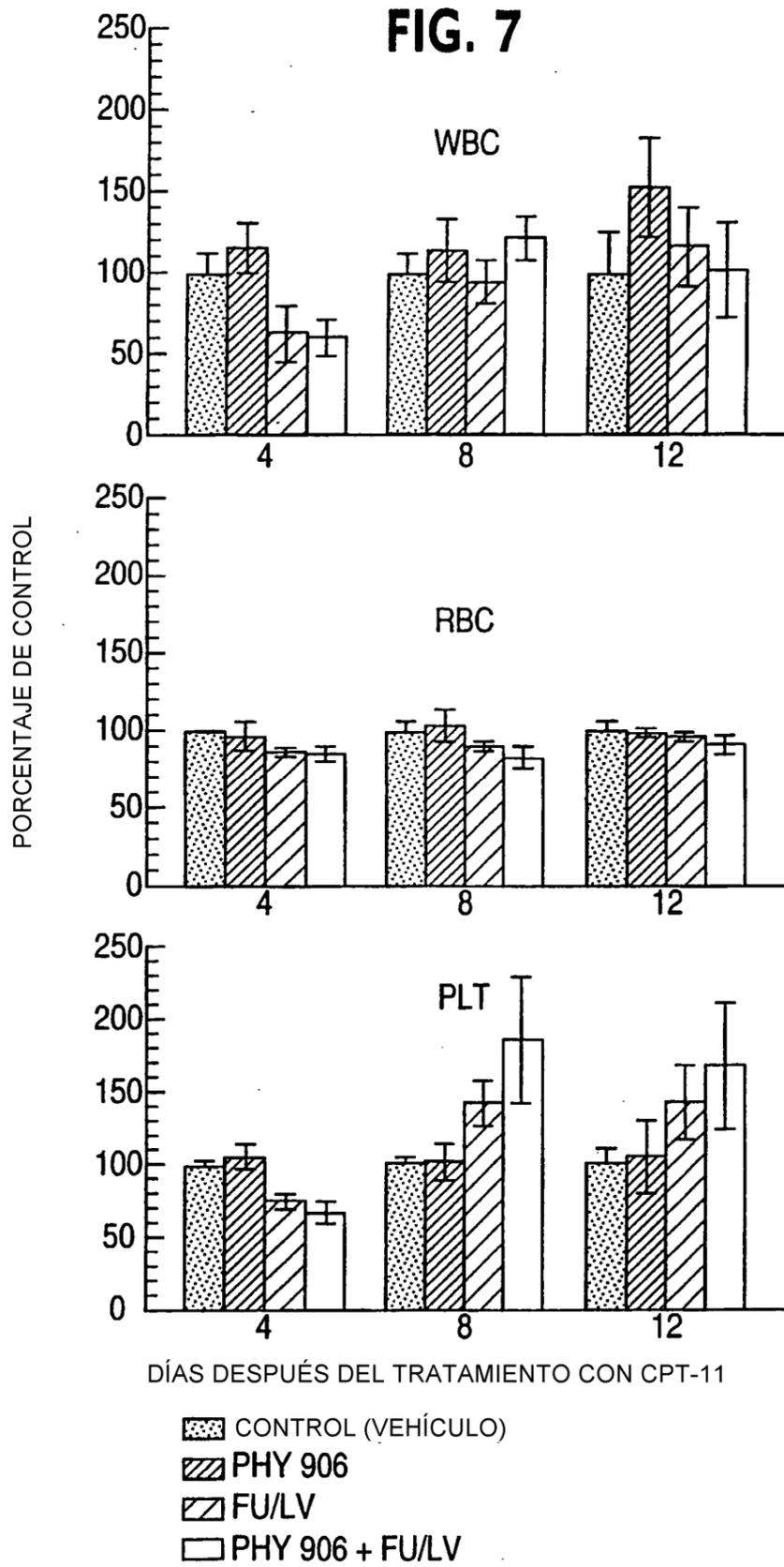


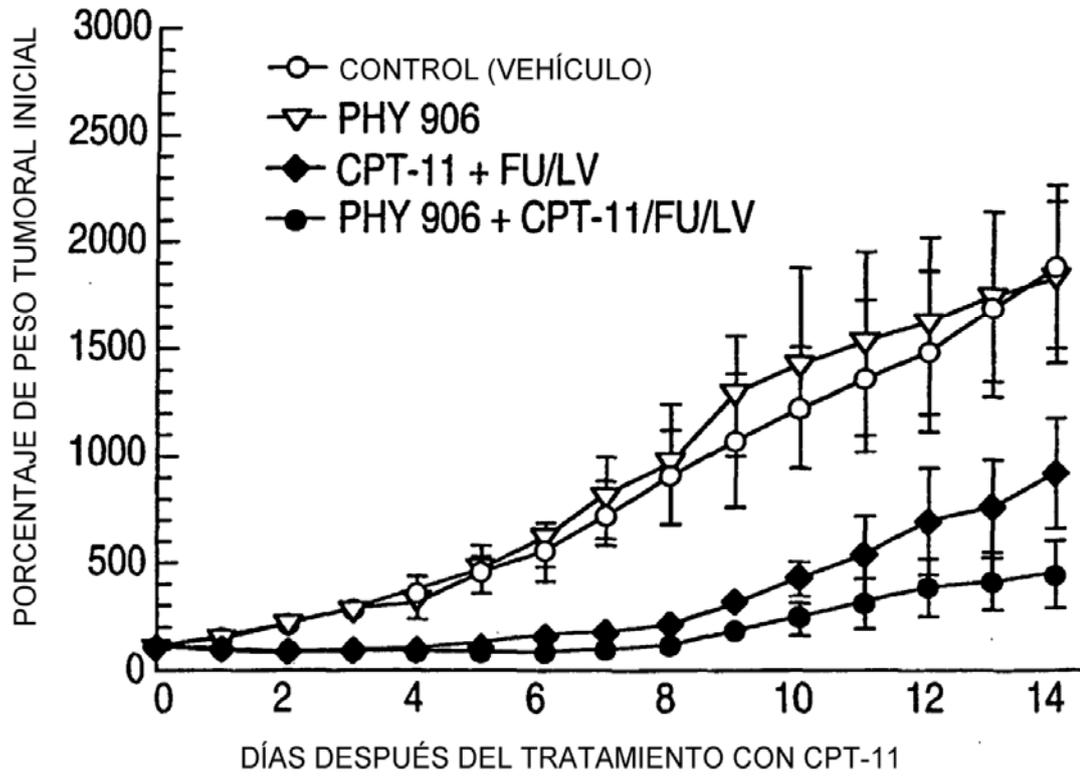
FIG. 8

FIG. 9

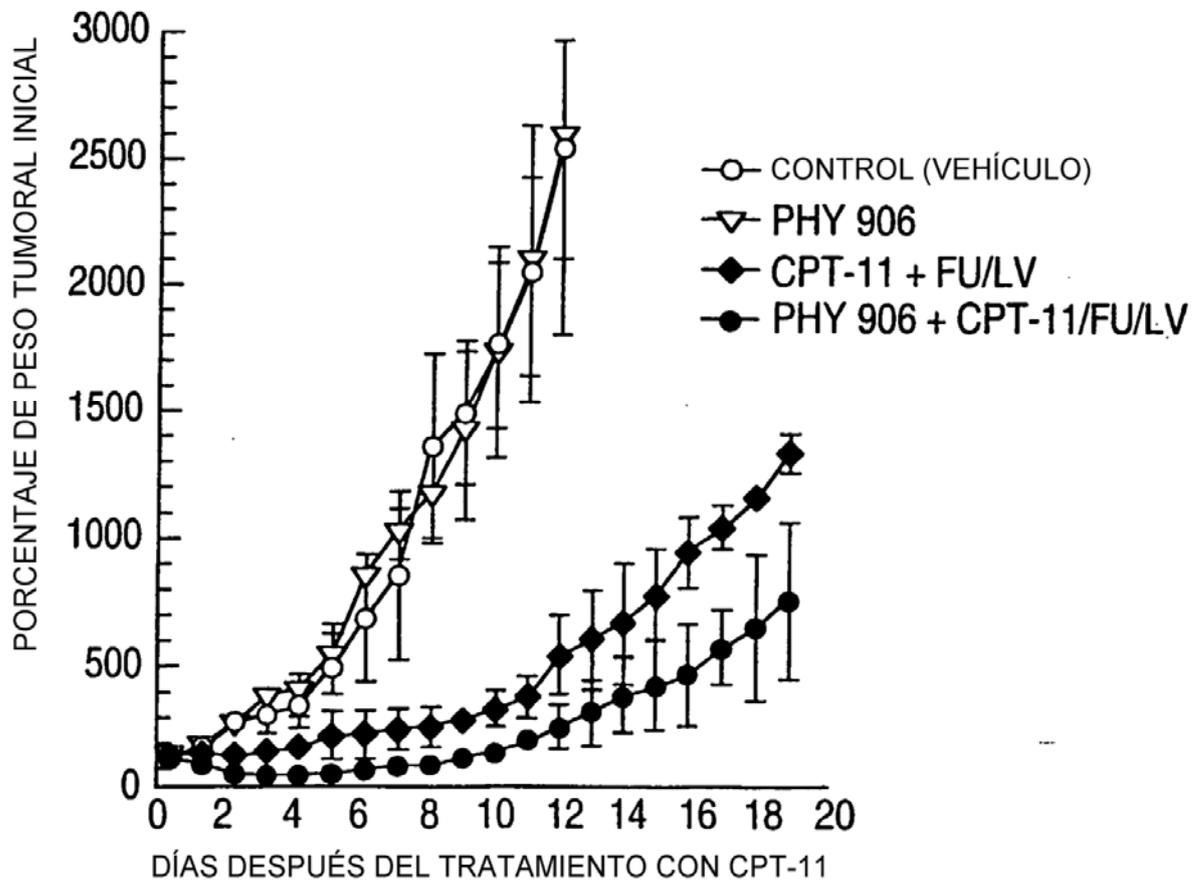


FIG. 10

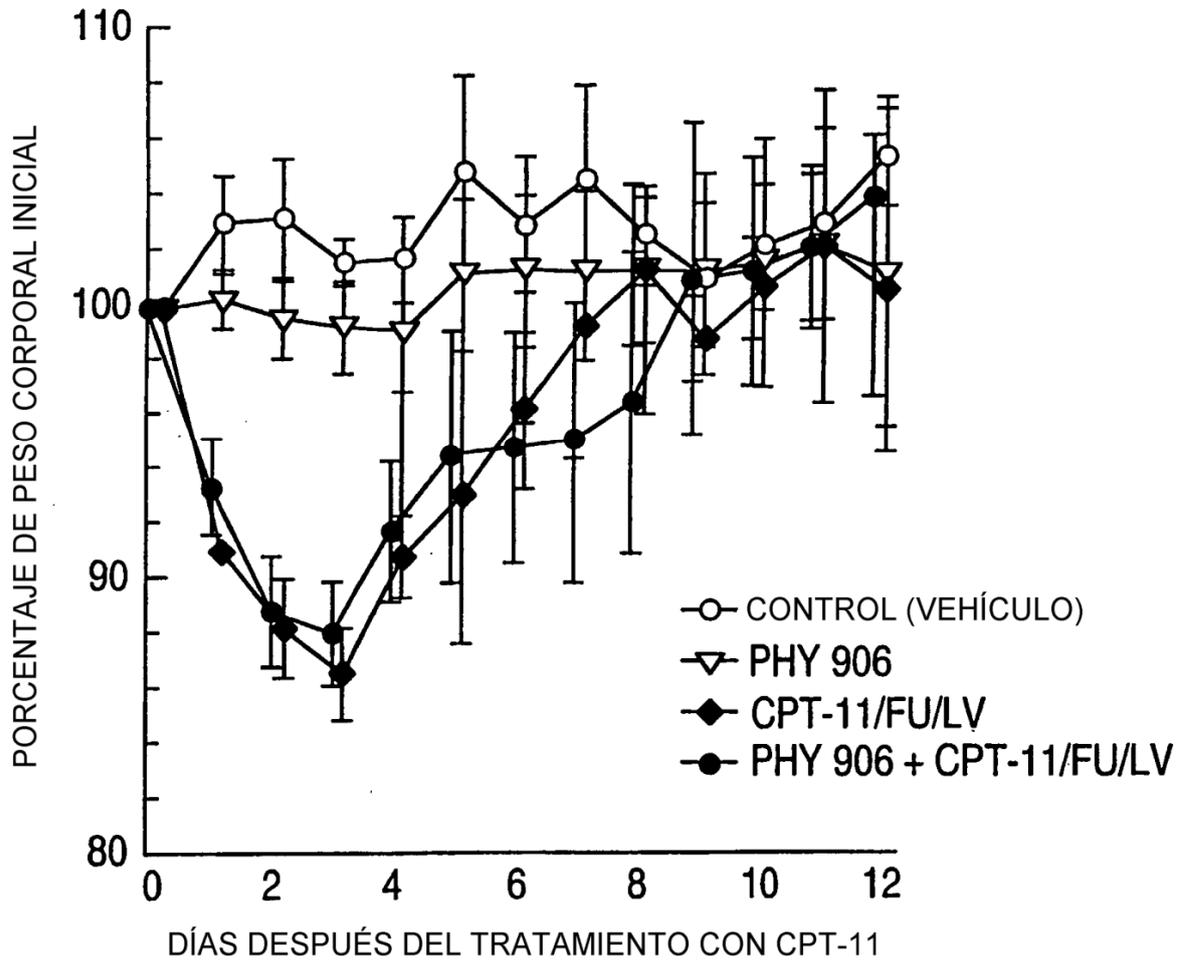
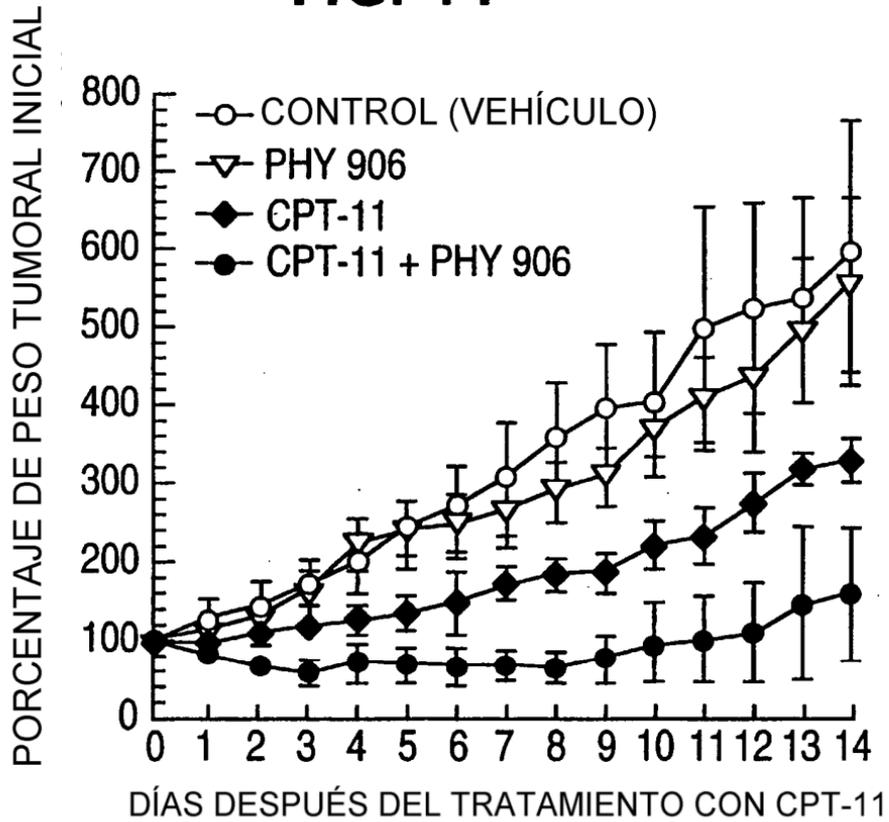


FIG. 11



ENSAYO † (VALOR DE *P) EL DÍA 14	CONTROL (VEHÍCULO)	CPT-11	PHY 906
CPT011	0,02	—	0,02
PHY 906	0,6	0,02	—
CPT-11 + PHY 906	0,002	0,01	0,003

FIG. 12

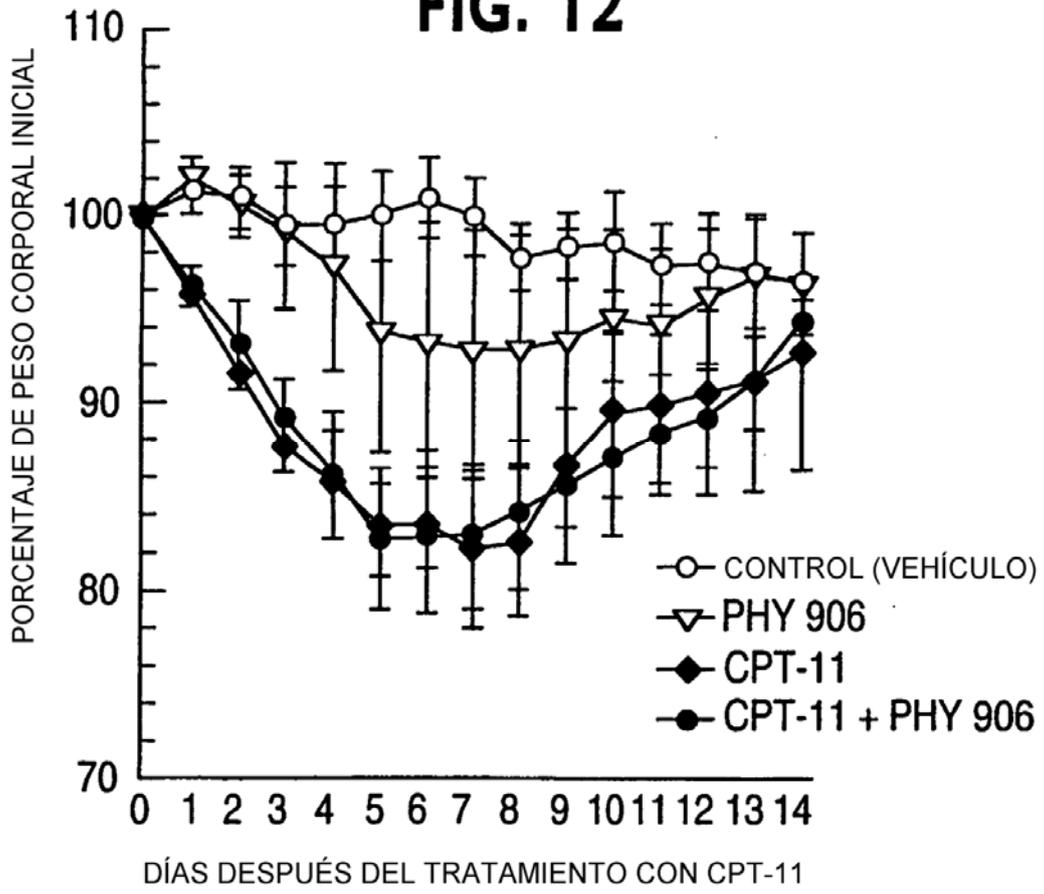


FIG. 13

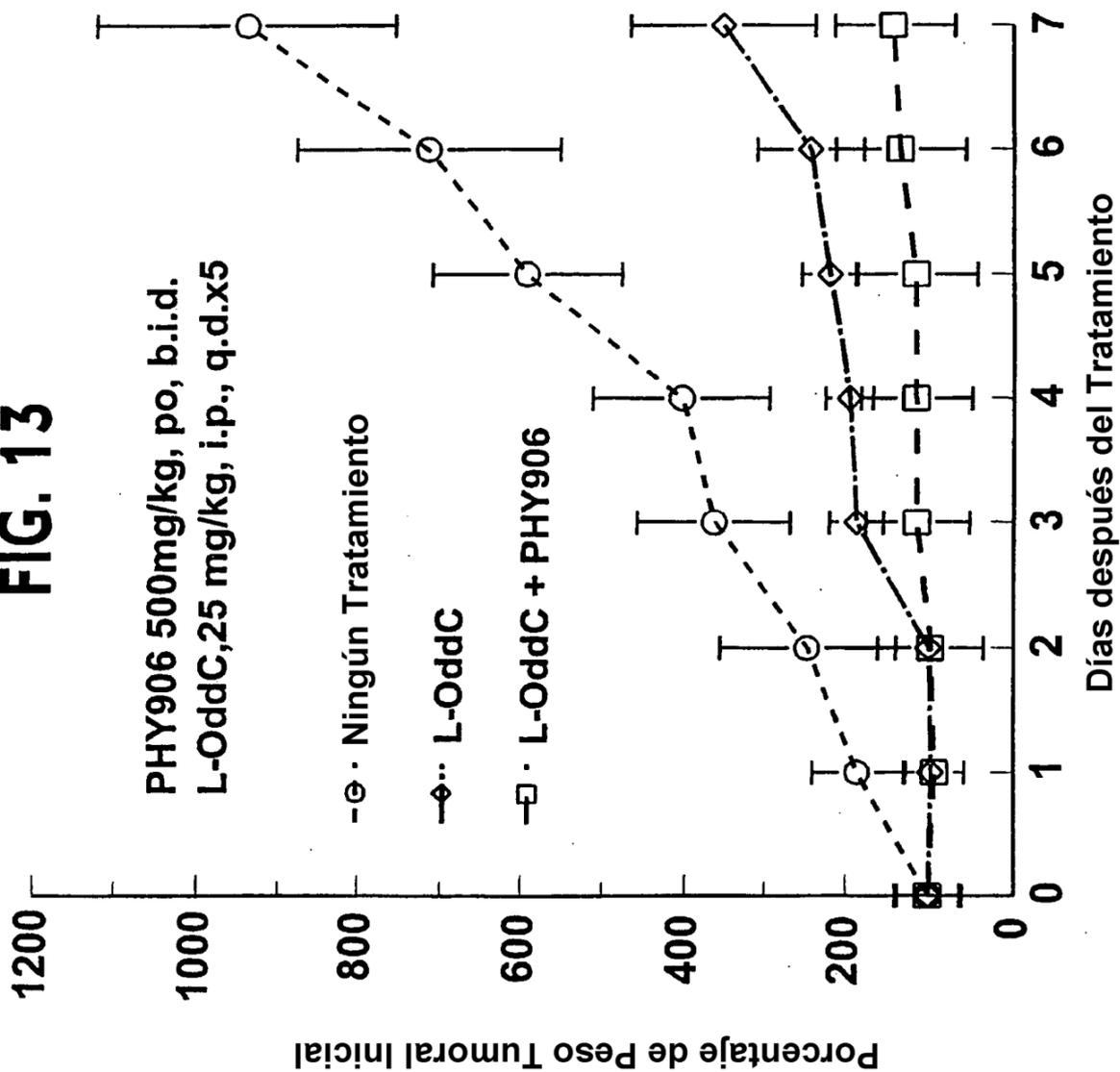


FIG. 14

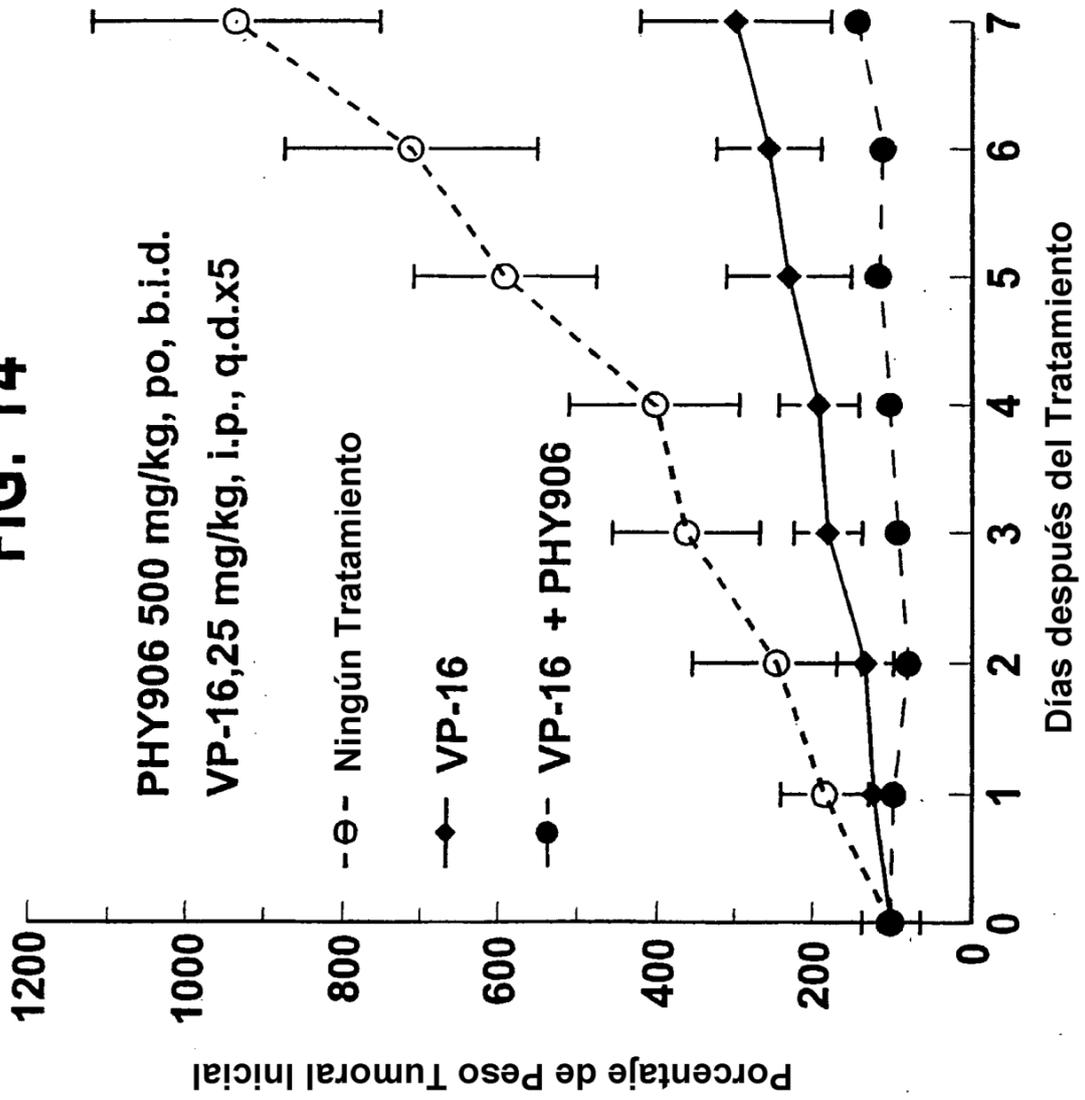


FIG. 15

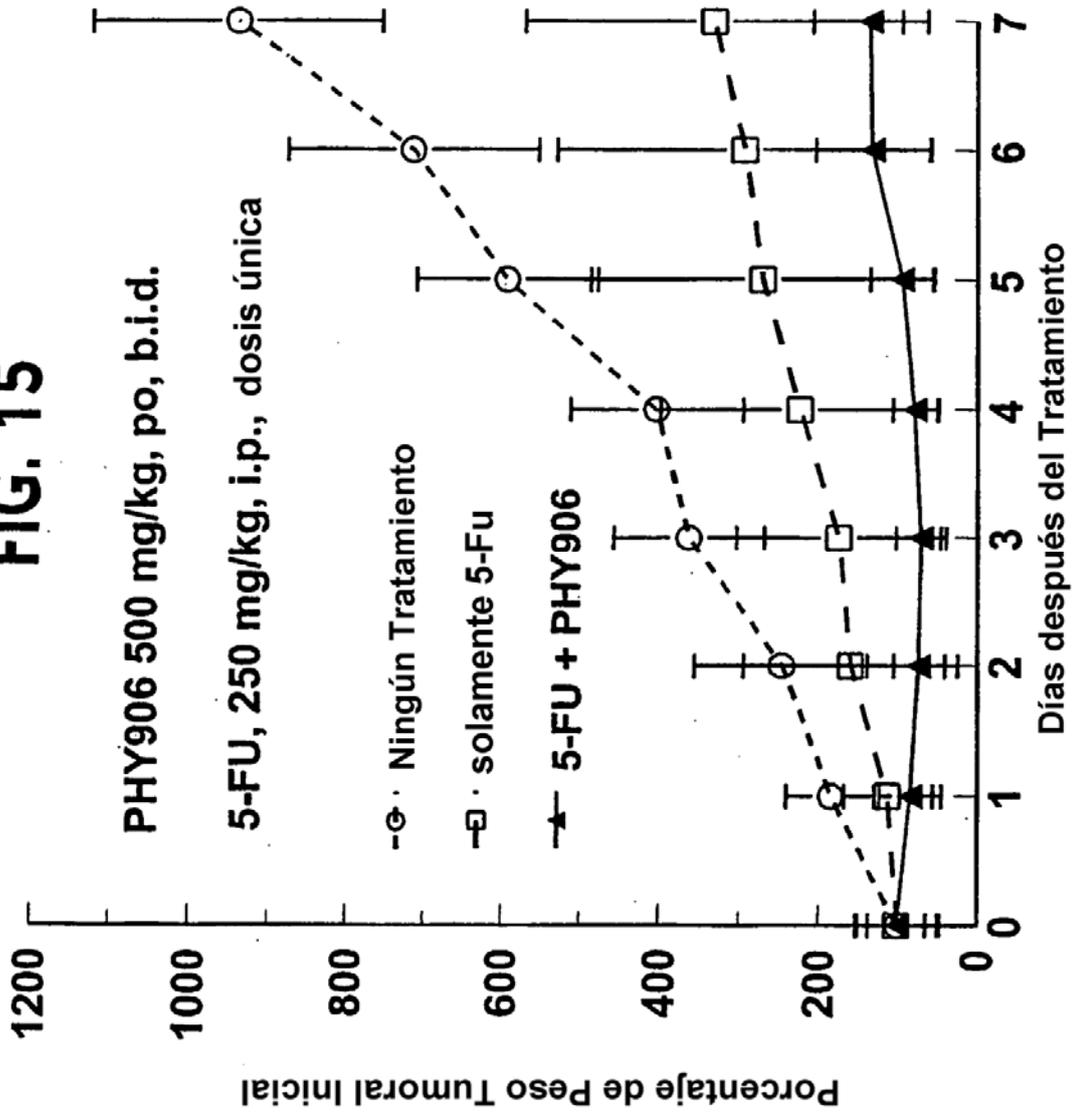
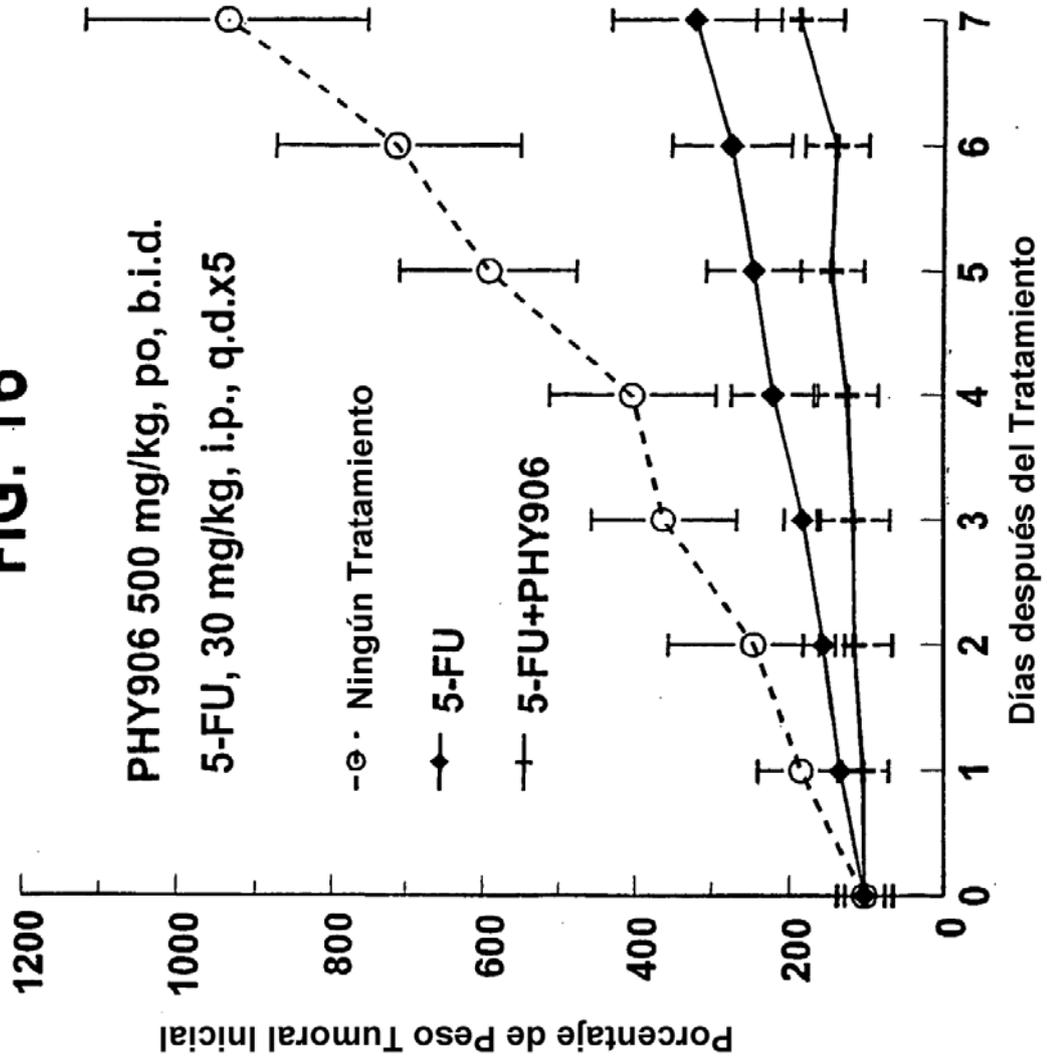


FIG. 16



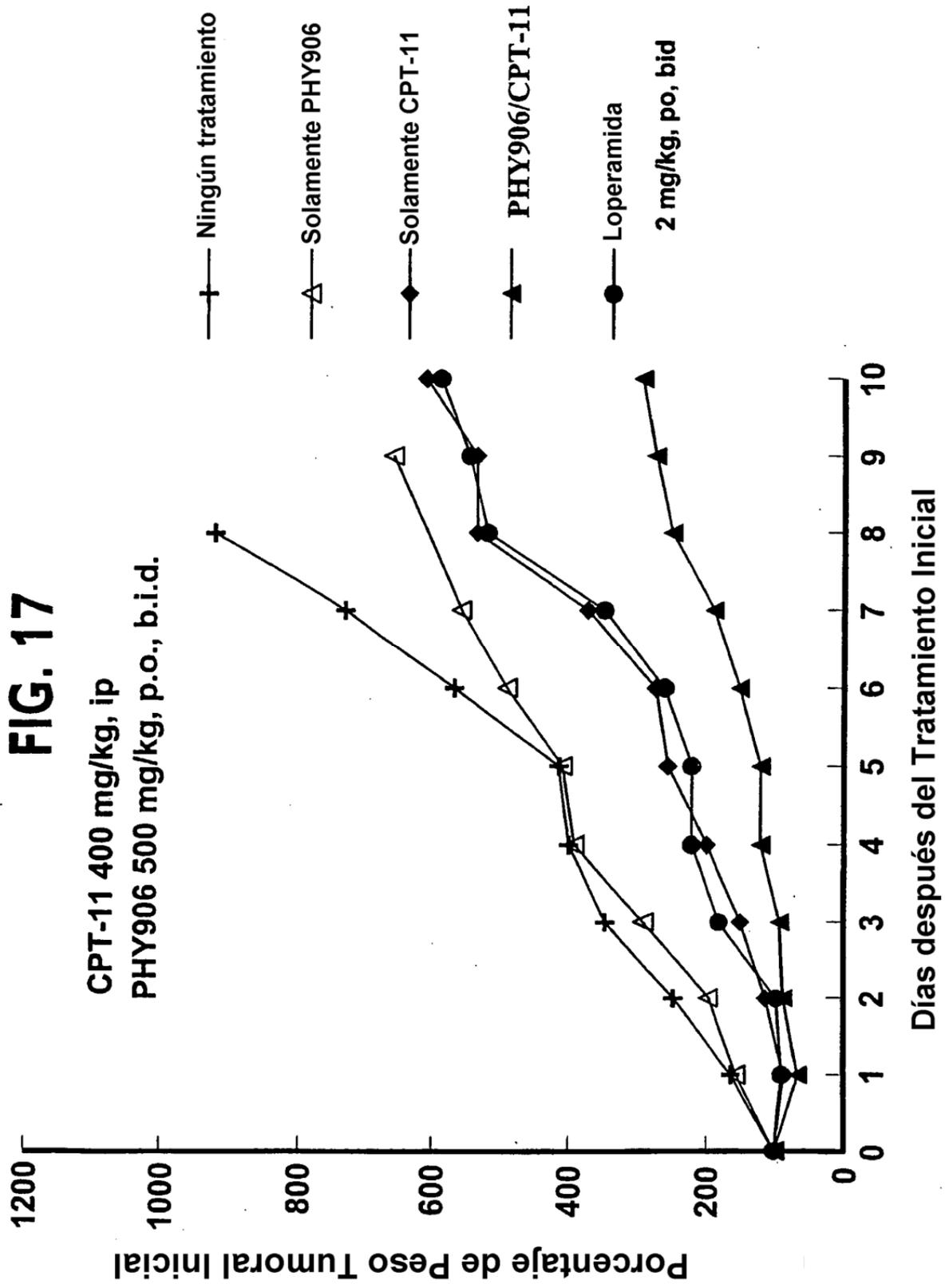


FIG. 18

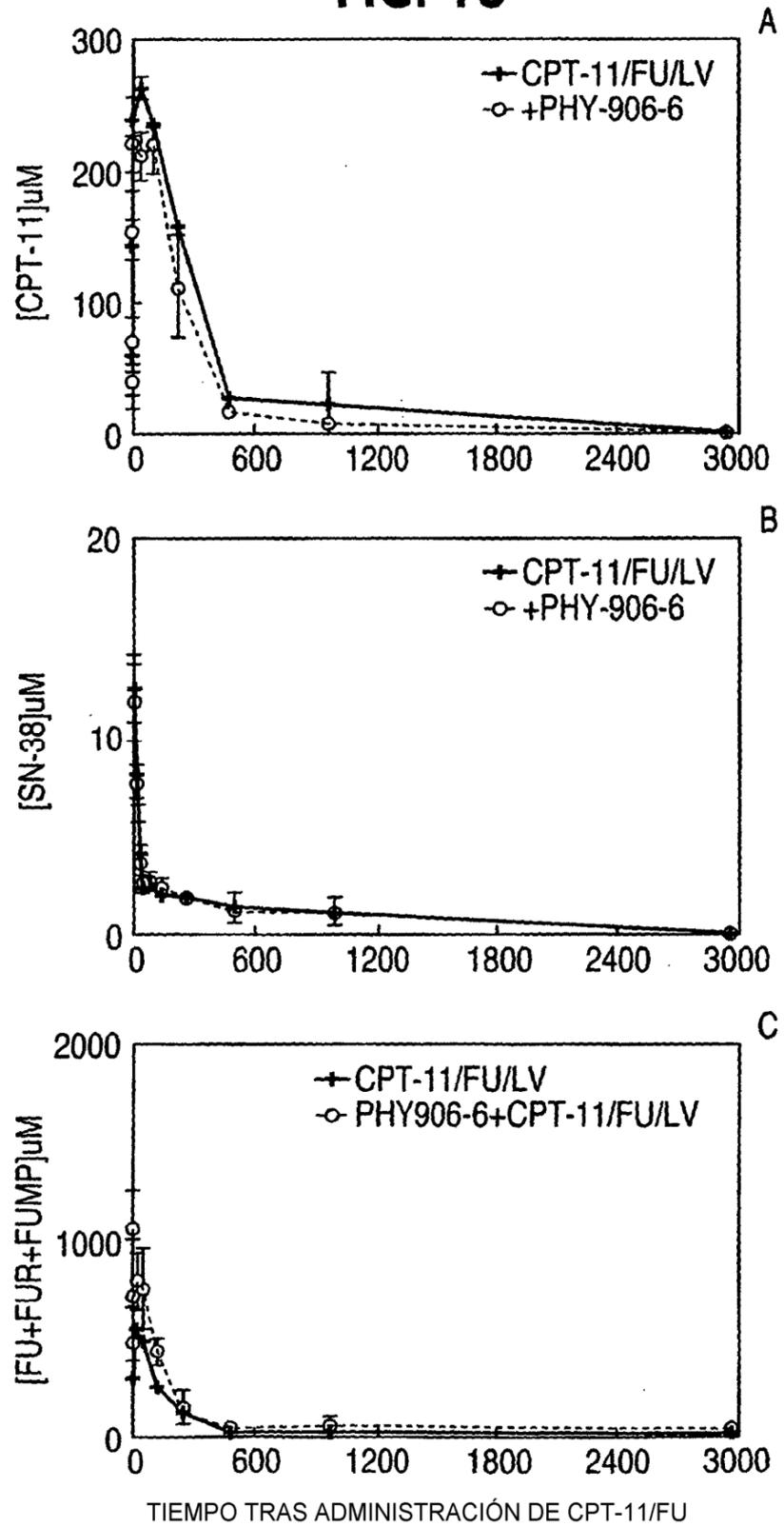


FIG. 19

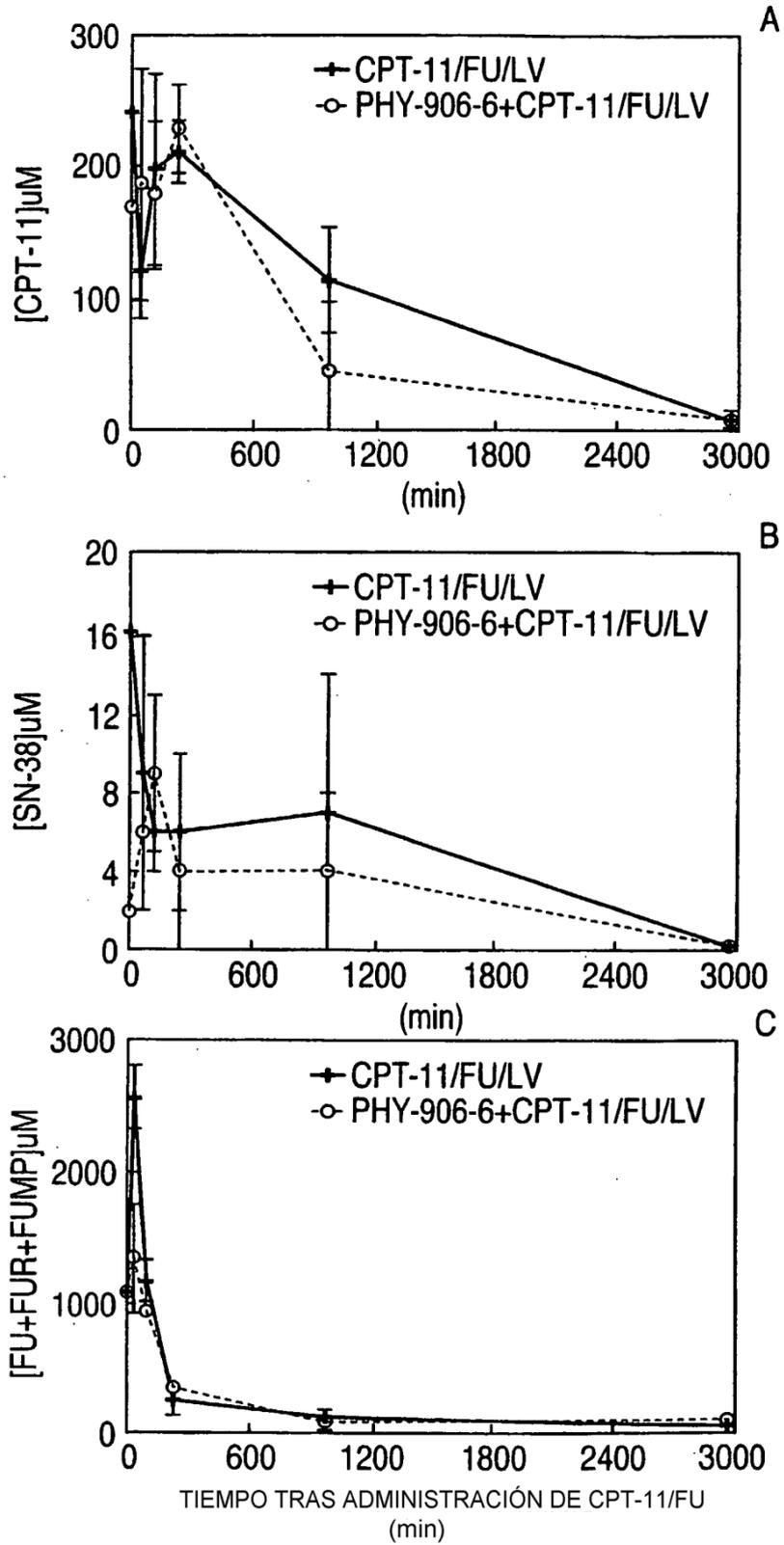


FIG. 20

