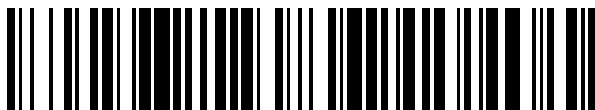




OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 373 663**

(51) Int. Cl.:  
**A61K 35/00**  
(2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04816850 .4**

(96) Fecha de presentación: **08.09.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1663103**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

(54) Título: **COMPOSICIONES DE EXTRACTOS BOTÁNICOS PARA TERAPIA DE CÁNCER.**

(30) Prioridad:  
**08.09.2003 US 501456 P**

(73) Titular/es:  
**GENYOU BIOMED INTERNATIONAL INC.  
2830 FOREST GROVE DRIVE  
HENDERSON, NV 89052, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.02.2012**

(72) Inventor/es:  
**DAO, James;  
DAO, Tom, C., S.;  
TONG, David, D.;  
WILSON, Leslie;  
JORDAN, Mary, Ann y  
GERWICK, William**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.02.2012**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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).

**ES 2 373 663 T3**

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de extractos botánicos para terapia de cáncer

### Campo técnico de la invención

Esta invención se refiere en líneas generales al campo del uso de extractos botánicos para mitigar patologías. Más 5 específicamente, la invención proporciona métodos y composiciones de extractos botánicos para su uso en la prevención y terapia de patologías que incluyen el cáncer.

### Antecedentes de la invención

Cualquier individuo presenta riesgo de desarrollar cáncer. La aparición de cáncer aumenta con el envejecimiento a lo largo de la vida ("riesgo a lo largo de la vida"). Por ejemplo, en los Estados Unidos, los hombres tienen un riesgo a lo largo de la vida de 1 a 2 de desarrollar cáncer y las mujeres tienen un riesgo de 1 a 3. Se piensa que otros factores de riesgo incluyen la genética, dieta y exposición ambiental (por ejemplo, a productos químicos mutágenos, radiación, virus transformantes, etc.). Se estima por la Organización Mundial de la Salud que ahora aparecen anualmente aproximadamente 10 millones casos nuevos de cáncer a lo largo del mundo. Se espera que ese número alcance los 15 millones en el año 2015, apareciendo dos tercios de estos nuevos casos en países en desarrollo 10 (World Health 48: 22, 1995). Por ejemplo, se estima que hay aproximadamente 600.000 casos nuevos de cáncer de pulmón por año a nivel mundial; prácticamente 1 millón de casos nuevos de cáncer de mama por año; y para el cáncer de cabeza y cuello (el sexto cáncer que ocurre con mayor frecuencia a nivel mundial) una incidencia de 15 500.000 casos nuevos anualmente. El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos estima los costes anuales globales para cáncer en 107.000 millones de \$. Los costes de tratamiento representan aproximadamente 20 40.000 millones de \$.

Varios agentes quimioterapéuticos se están usando en el tratamiento de cáncer, incluyendo agentes alquilantes, antagonistas de antimetabolitos, antibióticos anticancerosos y agentes anticancerosos obtenidos de plantas. Los ejemplos de "agentes alquilantes" incluyen mostaza de nitrógeno, clorhidrato de N-óxido de mostaza de nitrógeno, clorambutilo, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, carbocuona, tosilato de improsulfan, busulfan, clorhidrato de nimustina, mitobronitol, melfalan, dacarbazine, ranimustina, fosfato sódico de estramustina, trietilenomelamina, carmustina, lomustina, estreptozocina, pipobroman, etoglucida, carboplatino, cisplatino, miboplacitino, nedaplatino, oxaliplatino, altretamina, ambamustina, clorhidrato de dibrospidio, fotemustina, prednimustina, pumitepa, ribomustina, temozolomida, treosulfan, trofosfamida, estimalámero de zinostatina, carbocuona, adozelesina, cistemustina y bizelesina. Los ejemplos de "antimetabolitos" incluyen mercaptopericina, ribósido de 6-mercaptopurina, 25 tioinosina, metotrexato, enocitabina, citarabina, ocfosfato de citarabina, clorhidrato de ancitabina, fármacos de 5-FU (por ejemplo, fluorouracilo, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, galocitabina, emmitefur), aminopterina, leucovorina cálcica, tabloid, butocina, folinato cálcico, levofolinato cálcico, cladribina, emitefur, fludarabina, gemcitabina, hidroxicarbamida, pentostatina, piritrexima, idoxuridina, mitoguanosina, tiazofrina y ambamustina, etc. Los ejemplos de 30 "antibióticos anticancerosos" incluyen actinomicina-D, actinomicina-C, mitomicina-C, cromomicina-A3, clorhidrato de bleomicina, sulfato de bleomicina, sulfato de peplomicina, clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de aclarrubicina, clorhidrato de pirarrubicina, clorhidrato de epirrubicina, neocarzinostatina, mitramicina, 35 sarcomicina, carzinofilina, mitotano, clorhidrato de zorrubicina, clorhidrato de mitoxantrona y clorhidrato de idarrubicina, etc. Los ejemplos de "agentes anticancerosos obtenidos de plantas" incluyen fosfato de etopósido, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, tenipósido, paclitaxel, docetaxel y vinorelbina, etc.

40 Aunque se están desarrollando y ensayando nuevos productos terapéuticos para su eficacia contra tumores, muchos de los tratamientos de cáncer disponibles actualmente son relativamente ineficaces. Se ha descrito que la quimioterapia da como resultado una respuesta duradera en solamente el 4% de los pacientes tratados y prolonga sustancialmente la vida de solamente el 3% adicional de pacientes con cáncer avanzado (Smith et al., 1993, J. Natl. Cancer Inst. 85: 1460-1474). Muchos de los actuales fármacos anticancerosos son prohibitivos en cuanto a costes y 45 presentan toxicidad importante. Con respecto a lo último y dependiendo del fármaco o combinación farmacológica usada, la quimioterapia sistémica puede dar como resultado una o más toxicidades que incluyen hematológica, vascular, neural, gastrointestinal, renal, pulmonar, otológica y letal. Por ejemplo, el tamoxifeno se ha usado en mujeres durante 25 años para limitar la recurrencia de cáncer de mama. Un experimento iniciado en 1992 ha demostrado que el tamoxifeno no solamente es eficaz como un agente terapéutico, sino que también tiene un 50 beneficio muy sustancial en la prevención del cáncer (un agente preventivo del cáncer de mama). Sin embargo, en este estudio se demostró que el uso de tamoxifeno tiene efectos adversos en mujeres sanas; es decir, un riesgo aumentado de desarrollar cáncer uterino o coágulos sanguíneos pulmonares (Science News, 1998, 153: 228).

55 Las plantas son un recurso valioso para el descubrimiento y desarrollo de agentes novedosos obtenidos de forma natural para tratar el cáncer. Los fármacos que se están usando actualmente en la terapia del cáncer se diseñaron para alterar el acortamiento (despolimerización) o alargamiento (polimerización) de microtúbulos (Compton, D. A., et al., (1999) Science 286: 913-914). El centrosoma, el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) de la célula, está compuesto de dos centrioles rodeados por el denominado material pericentriolar (PCM), que consiste en una red de filamentos delgados compleja y dos conjuntos de apéndices (Paintrand, M. (1992) J Struct Biol 108: 107-128). La función principal del centrosoma es la nucleación de los microtúbulos y la formación de husos bipolares

(Tanaka, T., et al., (1999) *Cancer Res* 58(17): 3974-85). Los centrosomas y sus microtúbulos asociados dirigen los acontecimientos durante la mitosis y controlan la organización de las estructuras de la célula animal y el movimiento durante la interfase. Los tumores malignos presentan generalmente perfiles de centrosomas anormales, caracterizados por un aumento en tamaño y número de los centrosomas, por su distribución irregular, estructura anormal, fosforilación aberrante de proteínas y por capacidad aumentada de nucleación de microtúbulos en comparación con los centrosomas de tejidos normales (Lingle, W. L. et al., (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6): 2950-5; Sato, N., et al., (1999) *Clin Cancer Res* 5(5): 963-70; Pihan, G. A. et al., (1998) *Cancer Res* 58(17): 3974-85; Carroll, P. E., et al., (1999) *Oncogene* 18(11): 1935-44; Xu, X., et al., (1999) *Mol Cell* 3(3): 389-95; Brinkley, B. R., et al., (1998) *Cell Motil Cytoskeleton* 41(4): 281-8; Doxsey, S. (1998) *Nat Genet* 20(2): 104-6; Kuo, K. K., et al., (2000)

- 5 Hepatology 31 (1): 59-64). Entre las anomalías se observa que la hiperamplificación de centrosomas es más frecuente en una diversidad de tipos tumorales (Carroll, P. E., et al., (1999) *Oncogene* 18; 18(11): 1935-44; Hinchcliffe, E. H., et al., (1999) *Science* 283(5403): 851-4; Xu, X., et al., (1999) *Mol Cell* 3(3): 389-95; Weber, R. G., et al., (1998) *Cytogenet Cell Genet* 83: 266-269).
- 10 Una diversidad de fármacos, tales como paclitaxel, docetaxel, etopósido, vincristina, vinblastina y vinorelbina, usados actualmente en la terapia de cáncer se diseñaron para alterar la polimerización de los microtúbulos (para una revisión, véase Jordan MA y Wilson L., *Microtubules as a target for anticancer drugs*. *Nature Reviews Cancer* 4: 253-265 (2004)). Comparten un mecanismo de acción común de unión a tubulina, la molécula de la cual están compuestos los microtúbulos (Compton, D. A., et al., (1999) *Science* 286: 913-914; Wilson, L., et al. *Cell Struct. & Function* 24: 329-335 (1999)). Al menos seis agentes anticancerosos obtenidos de plantas han recibido la 15 aprobación de la FDA (por ejemplo, taxol, vinblastina, vincristina, topotecan, etopósido, tenipósido). Otros agentes se 20 están evaluando en experimentos clínicos (por ejemplo, camptotecina, 9AC e irinotecan).

- 25 El taxol, un diterpenoide aislado originalmente de la corteza del tejo del pacífico, *Taxus brevifolia*, es un agente antimitótico potente que actúa promoviendo el ensamblaje de tubulina en estructuras agregadas estables. (véase revisión Kingston D.G.I. *Trends Biotechnol.* 1994, 12, 222; Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. *Nature*, 1979, 277, 665). El taxol ha mostrado un potencial enorme como un compuesto anticanceroso. De hecho, ahora se está usando para el tratamiento de cáncer ovárico resistente y se están alejando experimentos clínicos para el tratamiento de 30 cánceres de mama, pulmón, cabeza y cuello. (Rowinsky, E. K.; Cazenave, L. A.; Donehower, R. C. *J. Nat. Cancer Inst.* 1990, 82, 1247; McGuire, W. P.; Rowinsky, E. K.; Rosenshein, N. B.; Grumbine, F. C.; Ettinger, D. S.; Armstrong, D. K.; Donehower, R. C. *Ann. Int. Med.* 1989, 11, 273; Forastiere, A. A., *Semin. Oncol. Supl.* 3. 1993, 20, 56).

- 35 Los alcaloides de la vinca, incluyendo los productos naturales vincristina y vinblastina y los derivados semisintéticos vindesina y vinorelbina, son fármacos antimitóticos que se usan ampliamente en el tratamiento del cáncer (Donehower RC y Rowinsky EK, *Anticancer drugs derived from plants*, en *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. De Vita VT, Hellman S y Rosenberg SA eds. págs. 409-417, JB Lippincott, Philadelphia. (1993)). Los 40 alcaloides de la vinca de segunda generación, vinorelbina y vinflunina, afectan a la dinámica de los microtúbulos de forma diferente de la vinblastina, un alcaloide de la vinca de primera generación que suprime fuertemente la velocidad y alcance del acortamiento de los microtúbulos *in vitro*, mientras que la vinorelbina y vinflunina suprimen la velocidad y alcance de los acontecimientos de crecimiento de los microtúbulos (Ngan V. K. et al., *Mol Pharmacol.* 60(1): 225-232 (2001)).

- 45 Los agentes quimiopreventivos que se están investigando para la capacidad de reducir la cantidad de células precancerosas en los pulmones de fumadores y ex-fumadores incluyen ACAPHA, una combinación de seis productos botánicos (*Sophora tonkinensis*, *Polygonum bistorta*, *Prunella vulgaris*, *Sonchus brachyotus*, *Dictamnus dasycarpus* y *Dioscorea bulbifera*) que se ha usado para la prevención de enfermedad en China durante siglos. Bajo una concesión del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, la Agencia del Cáncer de la Colombia Británica (Canadá) está dirigiendo un consorcio internacional para llevar a cabo los experimentos clínicos de fase II de ACAPHA. Cohen et al (*Seminars in Oncology* (2002) 29: 563-574; *Journal of Chinese Medicine* (2002) 68: 40-49) describe el uso de la medicina tradicional China en el tratamiento de cáncer de mama. Estos documentos enumeran una diversidad de hierbas y agentes botánicos que se han sugerido para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer de mama. La lista de hierbas prescritas con quimioterapia incluye *Ganoderma lucidum* y la lista de agentes 50 botánicos usados para la prevención de cáncer de mama incluye *Salvia miltorrhiza*. El documento KR-A-2002 078 314 describe un producto alimenticio que comprende ciervo, pato silvestre, ginseng rojo, *Agaricus Blazei*, aguja de pino, *Agrimonia pilosa*, *Phellinus linteus*, *Saururus chinensis Baill*, *Houttuynia cordata Thunb*, *Angelicae gigantis radix*, *Artemisia capillaris Thunb*, *Glycyrrhizae Radix*, asta pilosa, *Fructus Cnidii*, *Salvia miltorrhiza Bunge*, *Astragali radix*, semilla de *Cuscuta*, *Flos Carthami*, *Cistanchis Herba*, *Cordyceps sinensis*, *Eucommia ulmoides*, *Polygonala tenuifolia L.*, semilla de *Amomi*, *Gandoderma lucidum*, *Poria cocos*, *Cnidium rhizome*, *Rehmanniae radix* y *Ulmi cortex*. Meyer et al (*Prostate Cancer and Prostatic Diseases* (2002) 5: 13-15) describe el producto herbario PC-SPES comercializado por sus efectos de reducción de niveles de antígeno específico de próstata (PSA), mejorar el dolor y aumentar la calidad de vida de los que tienen cáncer de próstata resistente a hormonas. El PC-SPES comprende 55 *Chrysanthemum morifolium*, *Ganoderma lucidum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Isatis indigotica*, *Panax pseudoginseng*, *Rabdosia rubescens*, *Scutellaria baicalensis* y *Serona repens*.

60 El cáncer implica varias rutas de señalización importantes en la célula tales como rutas de control del crecimiento (el 20 por ciento de los tipos de cáncer conocidos, incluyendo algunos cánceres de mama y de cerebro). Las mismas

rutas también desempeñan papeles clave en la ruta de señalización de respuesta autoinmune, de tal forma que los inhibidores de la ruta tienen un uso potencial como fármacos inmunosupresores y antiinflamatorios. La combinación de compuestos farmacológicos con ciertas proteínas de origen natural se ha mostrado como un modo alternativo de producir productos farmacéuticos mejorados, particularmente fármacos inmunosupresores, antiinflamatorios y anticancerosos. (Briesewitz R, Ray GT, Wandless TJ, Crabtree GR., Affinity modulation of small-molecule ligands by borrowing endogenous protein surfaces. Proc Natl Acad Sci USA. (1999) Mar 2; 96 (5): 1953-1958).

Existe una necesidad de un método relativamente barato y eficaz para prevenir tumores e inhibir el crecimiento de tumores, que mitigue adicionalmente la toxicidad asociada generalmente a quimioterapia sistémica. Las 10 composiciones anticancerosas que comprenden extracto de *Gynostemma pentaphyllum*, *Camellia sinensis* (té verde) y *Crataegus pinnatifida* (bayas de majuelo) y un método de preparación de las mismas es objeto de las Patentes de Estados Unidos Nº 5.910.308 y 6.168.795 (DJang).

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona composiciones novedosas, extractos y compuestos que comprenden extractos botánicos y sus métodos para fabricación y preparación. El uso de tales compuestos en la prevención y terapia de 15 patologías (incluyendo cáncer) también está provisto al igual que los métodos para la preparación y formulación de las composiciones así como métodos para el tratamiento usando las composiciones de esta invención.

Las composiciones comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de un extracto de *Ganoderma lucidum*, un extracto de *Salvia miltiorrhiza* y un extracto de *Scutellaria barbata*; y opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de *Hippophae rhamnoides*. Aunque hay informes de efectos beneficiosos para la salud de 20 estos productos botánicos individuales, los efectos sinérgicos de su uso en terapia de combinación, como se desvela en esta invención, son novedosos. Algunas realizaciones comprenden además una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente quimioterapéutico.

La presente invención se refiere a composiciones para el uso en tratamiento de cáncer y métodos para su preparación, formulación y administración en la prevención y terapia de patologías.

25 Las composiciones de la presente invención comprenden compuestos naturales que muestran efectos citostáticos para el uso en la inhibición del crecimiento adicional de células cancerosas preexistentes que muestran una o más propiedades de (i) reforzar el sistema inmune, (ii) reducir el daño oxidativo en células y tejidos, (iii) reducir la inflamación, (iv) bloquear la proliferación de células en ciertos estadios del ciclo celular, (v) actividad antioxidante y (vi) efectos anti-mutágenos contra exposición adicional a carcinógenos y mutágenos.

30 Las composiciones de la presente invención comprenden compuestos naturales que son útiles en composiciones citotóxicas a administrarse junto con agentes quimioterapéuticos, tratamiento por radiación y cirugía. En algunas realizaciones, a un sujeto se administran composiciones de la presente invención antes de la radioterapia, quimioterapia o cirugía. En otras realizaciones, las composiciones se administran simultáneamente con otra terapia anticancerosa. Estas composiciones muestran una o más propiedades de (a) acción sinérgica con quimioterapia 35 (aumentando la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos), (b) acción sinérgica con radioterapia y cirugía (aumentando la eficacia inhibiendo el crecimiento de células cancerosas preexistentes que se evitan por radiación o cirugía) además de las propiedades indicadas previamente de (i) reforzar el sistema inmune, (ii) reducir el daño oxidativo en células y tejidos, (iii) reducir la inflamación, (iv) bloquear la proliferación de células en ciertos estadios 40 del ciclo celular, (v) actividad antioxidante y (vi) efectos anti-mutágenos contra exposición adicional a carcinógenos y mutágenos. Las propiedades anti-mutágenas (junto con la sensibilidad aumentada por sinergia) reduce los niveles de agentes quimioterapéuticos necesarios para el tratamiento, dando como resultado de este modo toxicidad reducida para los pacientes. Los composiciones de la presente invención son útiles junto con agentes quimioterapéuticos que incluyen agentes alquilantes, antagonistas de antimetabolitos, antibióticos anticancerosos y agentes anticancerosos obtenidos de plantas.

45 Los ejemplos de "agentes alquilantes" incluyen mostaza de nitrógeno, clorhidrato de N-óxido de mostaza de nitrógeno, clorambutilo, ciclocifosfamida, ifosfamida, tiotepa, carbocuona, tosilato de imrosulfan, busulfan, clorhidrato de nimustina, mitobronitol, melfalan, dacarbazine, ranimustina, fosfato sódico de estramustina, trietilenomelamina, carmustina, lomustina, estreptozocina, pipobroman, etoglucida, carboplatino, cisplatino, miboplacitino, nedaplatino, oxaliplacitino, altretamina, ambamustina, clorhidrato de dibrospidio, fotemustina, prednimustina, pumitepa, 50 ribomustina, temozolomida, treosulfan, trofosfamida, estimalámero de zinostatina, carbocuona, adozelesina, cistemustina y bizelesina.

55 Los ejemplos de "antimetabolitos" incluyen mercaptopurina, ribósido de 6-mercaptopurina, tioinosina, metotrexato, encicitabina, citarabina, ocifosfato de citarabina, clorhidrato de ancitabina, fármacos de 5-FU (por ejemplo, fluorouracilo, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, galocitabina, emmitefur), aminopterina, leucovorina cálcica, tabloid, butocina, folinato cálcico, levofolinato cálcico, cladribina, emitefur, fludarabina, gemcitabina, hidroxicarbamida, pentostatina, piritrexima, idoxuridina, mitoguazona, tiazofrina y ambamustina, etc.

Los ejemplos de "antibióticos anticancerosos" incluyen actinomicina-D, actinomicina-C, mitomicina-C, cromomicina-A3, clorhidrato de bleomicina, sulfato de bleomicina, sulfato de peplomicina, clorhidrato de daunorrubicina,

clorhidrato de doxorrubicina, clorhidrato de aclarrubicina, clorhidrato de pirarrubicina, clorhidrato de epirrubicina, neocarzinostatina, mitramicina, sarcomicina, carzinofilina, mitotano, clorhidrato de zorrubicina, clorhidrato de mitoxantrona y clorhidrato de idarrubicina, etc.

Los ejemplos de "agentes anticancerosos obtenidos de plantas" incluyen fosfato de etopósido, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, tenipósido, paclitaxel, docetaxel y vinorelbina, etc.

Las composiciones citotóxicas de la presente invención también se pueden usar junto con agentes inmunoterapéuticos que incluyen picibanilo, krestina, sizofirán, lentinán, ubenimex, interferones, interleucinas, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, linfotoxina, vacuna de BCG, Corynebacterium parvum, levamisol, polisácarido K y procodazol.

- 10 Aunque se ha conocido que algunos compuestos de la presente invención demuestran beneficios para la salud cuando se administran individualmente, la presente invención se refiere a combinaciones novedosas de compuestos naturales que demuestran las propiedades de las composiciones cuando se administran como combinaciones especificadas. En general, las composiciones específicas de la presente invención muestran una mejora sinérgica de sus eficacias cuando se administran en combinación.
- 15 La presente invención y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes de forma adicional en la siguiente Descripción Detallada de la Invención y en las Figuras adjuntas y realizaciones.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una plataforma de extracción para extractos botánicos.

- 20 La Figura 2 muestra valores de índice de combinación (IC) para la inhibición de la proliferación celular en composiciones (Aneustat<sup>TM</sup>) que comprenden Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) y fármacos quimioterapéuticos.

Las Figuras 3A-3C proporcionan resúmenes de las potencias para la inhibición de la proliferación celular por los diferentes productos botánicos Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14).

- 25 La Figura 4 muestra valores de índice de combinación (IC) para la inhibición de la actividad de la enzima COX-2 por extractos de acetato de etilo (panel superior) y cloruro de metileno (panel inferior) de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos.

- 30 La Figura 5 muestra valores de índice de combinación (IC) para la inhibición de las actividades de las enzimas COX-1 y COX-2 por extractos de acetato de etilo de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos.

La Figura 6 muestra la proporción de las potencias de la inhibición de COX-2 con respecto a la inhibición de COX-1 por extractos de acetato de etilo (Nº 0401) de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos.

- 35 La Figura 7 muestra las potencias para la inhibición de COX-2 y COX-1 por extractos de acetato de etilo (Nº 0401) de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos.

La Figura 8 muestra monocitos (precursores de macrófagos) tratados con diferentes concentraciones de extractos de Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) y la liberación de TNF- $\alpha$  medida mediante un inmunoensayo ELISA.

- 40 La Figura 9 muestra la proliferación de linfocitos inducida por Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14).

La Figura 10 muestra ensayo de Ames realizado en extractos de Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) con 20  $\mu$ g por placa.

La Figura 11 muestra los efectos de Aneustat sobre el peso corporal de ratones SCID.

- 45 La Figura 12 muestra la curva de supervivencia para la línea celular A549 tratada con Aneustat.

La Figura 13 muestra los efectos del tratamiento con Aneustat sobre el crecimiento de xenoinjertos de SCLC.

La Figura 14 muestra los efectos del tratamiento con Aneustat sobre la histopatología de xenoinjerto de SCLC.

La Figura 15 muestra los efectos del tratamiento con Aneustat sobre la proliferación de células SCLC.

La Figura 16 muestra los efectos del tratamiento con Aneustat sobre xenoinjertos de línea celular de cáncer de

próstata DU145 *in vivo*.

La Figura 17 muestra los efectos del tratamiento con Aneustat sobre el crecimiento de xenoinjertos de NSCLC.

La Figura 18 muestra los efectos del tratamiento con Aneustat y cisplatino+docetaxol sobre la histopatología de xenoinjerto de NSCLC AB117.

- 5 La Figura 19A y 19B muestran histogramas que ilustran los efectos del tratamiento con Aneustat y cisplatino+docetaxol sobre la distribución de células NSCLC a lo largo del ciclo celular.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona métodos y composiciones novedosas para el uso como agentes anticancerosos para prevenir y tratar cáncer en un individuo. La presente invención se refiere a un descubrimiento novedoso de que las composiciones basadas en extractos botánicos pueden inhibir de forma eficaz el crecimiento tumoral y ser sustancialmente no tóxicas cuando se administran a un individuo. La composición comprende extractos de Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata y Salvia miltiorrhiza y, opcionalmente, Hippophae rhamnoides (espino amarillo).

10 En una realización, este método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición a un individuo (un mamífero; y en una realización preferida, un ser humano) que lleva un tumor. En otra realización, el método comprende administrar una cantidad profilácticamente eficaz de la composición a un individuo para prevenir el desarrollo de tumor (por ejemplo, en un individuo que presenta un riesgo elevado de desarrollar tumor; o en un individuo que está en remisión, pero en riesgo de recurrencia).

15 Por tanto, un objeto importante de la presente invención es proporcionar un método para el tratamiento de un individuo que lleva un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz y no tóxica de una composición que tiene una propiedad de inhibir el crecimiento tumoral cuando se administra al individuo que lleva el tumor.

20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para la prevención del desarrollo de tumor en un individuo que presenta riesgo de desarrollo de tumor administrando una cantidad profilácticamente eficaz de una composición que tiene una propiedad de prevenir o inhibir la incidencia del crecimiento tumoral cuando se administra al individuo.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de tratamiento de un individuo que lleva tumor o un individuo que presenta riesgo de desarrollar tumor, con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que tiene las propiedades de inhibir el crecimiento tumoral y de ser sustancialmente no tóxica cuando se administra al individuo. "Sustancialmente no tóxica" significa que la composición carece de la toxicidad asociada generalmente a quimioterapia sistémica; es decir, carece de toxicidades detectables incluyendo hematológica, vascular, neural, gastrointestinal, renal, pulmonar, otológica y de inmunosupresión (que puede conducir a infecciones letales).

30 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método de tratamiento de un individuo que ha tenido una reducción sustancial en la carga tumoral pero que todavía presenta riesgo de recurrencia, en el que el método comprende administrar al individuo una cantidad profilácticamente eficaz de una composición que tiene las propiedades de inhibir el crecimiento tumoral y de ser sustancialmente no tóxica cuando se administra al individuo.

#### **Definiciones**

35 "Tumor" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, queriendo decir tumor primario no linfóide sólido de origen de célula epitelial ductal, incluyendo, pero sin limitación, tumores que se originan en la mama, próstata, colon, pulmón, páncreas, hígado, estómago, vejiga o sistema reproductor (cuello del útero, ovarios, endometrio, etc.), cerebro y médula ósea; melanoma; o linfoma.

40 "Inhibir el crecimiento tumoral" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, queriendo decir uno o más de ralentizar el crecimiento del tumor, detener el crecimiento del tumor, causar la reducción o regresión del tumor, inhibir la invasión tumoral, causar la muerte de célula tumoral y causar la reducción o regresión de metástasis.

45 "Prevención de desarrollo tumoral" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, queriendo decir inhibir el crecimiento del tumor; y más específicamente, causar la muerte de célula tumoral en la prevención de la formación de masa tumoral.

50 El término "planta" como se usa en este documento se refiere a semillas, hojas, tallos, flores, raíces, bayas, corteza o cualquier otra parte vegetal que sea útil para los fines descritos. Para ciertos usos, se prefiere que se utilice la parte subterránea de la planta, tal como la raíz y el rizoma. Las hojas, tallos, semillas, flores, bayas, corteza u otras partes vegetales también tienen efectos medicinales y se pueden usar para preparar té y otras bebidas, crema y en la preparación de alimentos.

La "sinergia" se puede medir mediante el índice de combinación (IC). El método del índice de combinación se

- describió por Chou y Talalay. (Chou, T.-C. The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism, pág. 61-102. En T.-C. Chou y D. C. Rideout (ed.), Synergism and antagonism in chemotherapy. Academic Press, San Diego, Calif. (1991); Chou, T.-C. y P. Talalay. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors. Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Un valor de IC de 0,90 o menos se considera sinérgico, siendo valores de 0,85 moderadamente sinérgicos y siendo valores inferiores a 0,70 significativamente sinérgicos. Se considera que los valores de IC de 0,90 a 1,10 son prácticamente aditivos y que los valores superiores son antagónicos.

**Tabla 1. Sinergia/antagonismo como una función de los valores de IC**

Valor de IC	Interpretación
>10	Antagonismo muy fuerte
3,3 - 10	Antagonismo fuerte
1,45 - 3,3	Antagonismo
1,2 - 1,45	Antagonismo moderado
1,1 - 1,2	Ligero antagonismo
0,9 - 1,1	Aditivo
0,85 - 0,9	Ligera sinergia
0,7 - 0,85	Sinergia moderada
0,3 - 0,7	Sinergia
0,1 - 0,3	Sinergia fuerte
<01	Sinergia muy fuerte

- 10 Se señala que la determinación de la sinergia puede verse afectada por la variabilidad biológica, dosificación, condiciones experimentales (temperatura, pH, tensión de oxígeno, etc.), programa de tratamiento y proporción de combinación. La sinergia se mide como valores de índice de combinación (IC), considerándose valores de 0,7 o menos niveles significativos de sinergia.

#### Productos botánicos

- 15 (i) Ganoderma lucidum (Reishi): Ganoderma lucidum se elogió por sus efectos de aumentar la memoria y prevenir la falta de memoria en la edad anciana descritos en Shen Nong Ben Cao Jing vol. 1 ya en 456-536 d.C. La investigación en ratones usando Ganoderma lucidum administrado por vía oral o por vía tópica sugiere que Ganoderma lucidum tiene actividad anti-inflamatoria. Stavinoha, W., Satsangi, N. y Weintraub, S. (1995). Study of the antiinflammatory efficacy of Ganoderma lucidum. En B.-K. Kim y Y. S. Kim (Eds.), Recent Advances in 20 Ganoderma lucidum research (págs. 3-7). Seoul Korea: The Pharmaceutical Society of Korea.

Se han sugerido aplicaciones de Ganoderma para (1) quimioprofilaxis de cáncer en individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer (2) uso accesorio en la prevención de metástasis o recurrencia de cáncer (3) palivación de caquexia y dolor relacionados con cáncer y (4) uso accesorio con quimioterapia concurrente para reducir los efectos secundarios, mantener los recuentos leucocitarios y permitir una dosificación más óptima de productos químico o radioterapéuticos. Chang, R (1994) Effective Dose of Ganoderma in Humans; Proceedings of Contributed Symposia 59A, B 5th International Mycological Congress, Vancouver: págs. 117-121. Ya que los estudios de la dosificación humana eran tradicionales y empíricos, un intervalo de dosificación apropiado de Ganoderma para terapia se calculó usando estos datos y principios farmacocinéticos. Los cálculos sugirieron (1) una dosis de cuerpo fructal seco de Ganoderma de 0,5 a 1 g por día para el mantenimiento de la salud (2) de 2 a 5 g por día si hay fatiga crónica, estrés, problemas autoinmunes u otros problemas de salud crónicos (3) de 5 a 10 g por día para enfermedad grave. Chang, R (1993) Limitations and Potential applications of Ganoderma and related fungal polyglycans in clinical ontology; First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom products: 96.

- 35 (ii) Scutellaria barbata (escutelaria): Se ha demostrado que Scutellaria barbata, una medicina tradicional china para tumores de hígado, pulmón y rectales, inhibe la mutagénesis, unión a ADN y metabolismo de aflatoxina B1 (AFB1) y aminopirina N-desmetilasa ligada a citocromo P450. (Wong B. Y., et al. Eur J Cancer Prev 1993 Jul; 2(4): 351-6; Wong B. Y., et al., Mutat Res. 1992 Jun 1; 279(3): 209-16). Scutellaria barbata también es capaz de mejorar la función de los macrófagos *in vitro* e inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. (Wong B. Y., et al. Cancer Biother Radiopharm 1996 Feb; 11(1): 51-6).

- Este producto botánico contiene vitaminas C y E así como calcio, potasio, magnesio, hierro, escutelarina de cinc, aceite volátil, taninos y principios amargos. La escutelarina actúa sobre el sistema nervioso central. La escutelarina, un ingrediente activo de *Scutellaria barbata*, se ha purificado mediante cromatografía líquida. (Wenzhu Zhang; Duolong Di; Bo Wen; Xia Liu; Shengxiang Jiang, Determination of Scutellarin in *Scutellaria barbata* Extract by Liquid Chromatography-Electrochemical Detection, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 26 (13): 2133-2140 (2003).
- (iii) *Salvia miltorrhiza* (Dan Shen): Existen más de 900 especies de salvia y muchas de las mismas tienen historias de usos medicinales. Dan shen se usa en la medicina tradicional china para promover la circulación de la sangre y para eliminar la estasis de la sangre. Bensky D, Gamble A Chinese botanical Medicine Materia Medica 1987 Eastland Press: Seattle. 384. Aumenta la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en plaquetas, proporcionando de este modo protección contra embolia pulmonar e inhibición de la agregación plaquetaria. Wang X, et al. "Effect of danshen injection on pulmonary thromboembolism and platelet free radical levels in mice". Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 1996; 21: 558-60. También se ha demostrado que *Salvia miltorrhiza* disminuye el colesterol, reduce la lesión endotelial e inhibe la peroxidación lipídica en animales hipercolesterolemicos. Esta inhibición de la oxidación de LDL puede reducir la ateroesclerosis. Wu YJ, et al. "Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltorrhiza*". Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 481-6. Se ha observado que un constituyente de *Salvia miltorrhiza* inhibe la contracción inducida por noradrenalina de tiras aórticas mediante reducción de la movilización de Ca<sup>2+</sup>. Esta actividad vasodilatadora puede explicar el uso tradicional de *Salvia miltorrhiza* en hipertensión. Naga M, et al. "Vasodilator effects of des(alpha carboxy-3,4-dihydroxyphene-thyl) lithospermic acid (8-epiblechnic acid), a derivative of lithospermic acids in salviae miltorrhizae radix" Biol Pharm Bull 1996; 19: 228-32. Se ha demostrado que *Salvia miltorrhiza* tiene un efecto marcadamente superior a la nitroglicerina, con una acción más persistente y una mejora mejor de la función cardiaca. Bai YR., Wang SZ. "Hemodynamic study on nitroglycerin compared with *Salvia miltorrhiza*" Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 1994; 14: 24-5, 4.
- Salvia miltorrhiza* también es el ingrediente principal en el Compuesto Dan Shen. El Compuesto Dan Shen comprende cuatro productos botánicos importantes para la mejora de la circulación periférica y el bienestar general. Las acciones de *Crataegus laevigata* se potencian por el producto botánico chino *Salvia miltorrhiza* (Dan Shen), el producto botánico indio *Coleus forskohlii* y *Valeriana officinalis*. La medicina botánica china utiliza *Salvia miltorrhiza* para irregularidades de la mujer, dolor abdominal, insomnio, urticaria, hepatitis y mastitis.
- (iv) *Hippophae rhamnoides* (espino amarillo): El aceite de semilla de espino amarillo contiene un alto contenido de los dos ácidos grasos esenciales, ácido linoleico y ácido α-linolénico, que son precursores de otros ácidos grasos poliinsaturados tales como ácidos araquidónico y eicosapentaénico. El aceite de la pulpa/piel de bayas de espino amarillo es rico en ácido palmitoleico y ácido oleico (Chen et al. "Chemical composition and characteristics of seabuckthorn fruit and its oil". Chem. Ind. Forest Prod. (Chinese) 10 (3), 163-175). El aumento en el nivel de ácido α-linolénico en lípidos plasmáticos mostró un claro efecto de mejora sobre síntomas de AD (Yang et al. J Nutr Biochem. 2000 Jun 1; 11(6): 338-340). Estos efectos del ácido α-linolénico pueden haberse debido a cambios en la composición de eicosanoídes y otros mecanismos independientes de la síntesis de eicosanoídes (Kelley 1992, α-linolenic acid and immune response. Nutrition, 8 (3), 215-2).
- Las propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras del espino amarillo (*Hippophae rhamnoides*) se han demostrado usando linfocitos como un sistema de modelo. (Geetha et al. J Ethnopharmacol 2002 Mar; 79(3): 373-8). El efecto antiulcerógeno de un extracto de hexano de *Hippophae rhamnoides* también se ha demostrado. (Suleyman H et al., Phytother Res 2001 Nov; 15(7): 625-7). La radioprotección mediante una preparación botánica de *Hippophae rhamnoides* contra irradiación letal de todo el cuerpo en ratones sugiere eliminación de radicales libres, aceleración de la proliferación de células madre y propiedades de inmunoestimulación. (Goel HC et al., Phytomedicine 2002 Jan; 9(1): 15-25).
- (v) *Camellia sinensis* (té verde): las hojas secas de la planta *Camellia sinensis* se procesan hasta dar tres tipos de té: té oolong, té negro y té verde. El extracto de té verde es un potente extracto rico en bioflavonoides, que se usa principalmente para combatir los radicales libres. Tiene un alto contenido de polifenoles, que son un tipo de bioflavonoides. Al preparar té verde, las hojas de té se estabilizan mediante calor húmedo o seco, que destruye la enzima polifenoloxidasa y de este modo evita la oxidación de polifenoles. Estos polifenoles son los ingredientes biológicamente activos principales del té verde. En realizaciones preferidas, el té verde es el té Dragon Well o el té Lung Ching.
- Los polifenoles en el té verde son catequinas con múltiples estructuras de tipo anillo ligadas. Los polifenoles son una forma de bioflavonoides con varios grupos de fenol. Controlan tanto el sabor como la acción biológica. Las catequinas, un grupo químico de polifenoles que poseen propiedades antioxidantes (protegen células del daño mediado por radicales libres) incluyen galato de epigalo-catequina-3 (EGCG), epigalocatequina y galato de epicatequina-3. Recientemente se ha demostrado que EGCG es un inhibidor de la urocinasa (Jankun et al., 1997, Nature 387: 561) y quinol-oxidasa; enzimas que pueden ser cruciales para el crecimiento de células tumorales. El galato de epigalocatequina-3 (EGCG) también protege contra infecciones digestivas y respiratorias.
- Ganoderma lucidum, *Scutellaria barbata*, *Salvia miltorrhiza* e *Hippophae rhamnoides* (espino amarillo) y *Camellia*

sinensis (té verde) se han usado individualmente para la promoción de la salud y fines terapéuticos. Las novedosas propiedades de inhibición de tumor, refuerzo inmune, reducción de la inflamación y antioxidantes observadas para las composiciones que comprenden extractos de Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata y Salvia miltorrhiza y, opcionalmente, Hippophae rhamnoides (espino amarillo) y Camellia sinensis (té verde) y los efectos sinérgicos demostrados por las combinaciones novedosas de dos o más de estos extractos usados en el método de acuerdo con la presente invención probablemente son el resultado de combinaciones de uno o más de saponinas, flavonoides y polifenoles presentes en los extractos.

### Composiciones

Las composiciones se normalizan basándose en las actividades específicas de propiedades definidas, lo que permite un control de calidad muy eficaz basado en combinaciones basadas en Cl<sub>50</sub> normalizadas. Como se analiza a lo largo de esta solicitud, los procedimientos de extracción específicos facilitan adicionalmente la normalización de las composiciones.

Las composiciones comprenden preparaciones botánicas extraídas con agua caliente y disolventes orgánicos que permiten el suministro de fármaco cómodo (por ejemplo, oral).

Las composiciones de la presente invención pueden estar en cualquier forma que sea eficaz, incluyendo, pero sin limitación, polvos secos, molidos, emulsiones, extractos y otras composiciones convencionales. Para extraer o concentrar los ingredientes eficaces de las composiciones, típicamente la parte vegetal se pone en contacto con un disolvente adecuado, tal como agua, alcohol, metanol o cualquier otro disolvente o disolventes mixtos. La elección del disolvente se puede hacer de forma rutinaria, por ejemplo, basándose las propiedades del ingrediente activo que se tiene que extraer o concentrar por el disolvente. Los ingredientes activos preferidos de las composiciones crenulata incluyen, pero sin limitación, salidrosida, tirosol, β-sitosterol, ácido gálico, pirogalol, crenulatina, rodionina y/o rodiosina. Estos ingredientes se pueden extraer en la misma etapa, por ejemplo, usando un disolvente alcohólico, o se pueden extraer individualmente, usando cada vez un disolvente que sea especialmente eficaz para extraer el ingrediente diana particular de la planta. En ciertas realizaciones, la extracción se puede realizar mediante el siguiente proceso: molienda de la parte seleccionada, preferiblemente raíz, hasta dar polvo. El polvo se puede sumergir en un disolvente deseado durante una cantidad de tiempo eficaz para extraer los agentes activos de las composiciones. La solución se puede filtrar y concentrar para producir una pasta que contenga una alta concentración de los constituyentes extraídos por el disolvente. En algunos casos, la pasta se puede secar para producir un extracto en polvo de las composiciones crenulata. El contenido de ingrediente activo en el extracto se puede medir usando HPLC, UV y otros métodos de espectrometría.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar de cualquier forma mediante cualquier vía eficaz, que incluye, por ejemplo, oral, parenteral, entérica, intraperitoneal, tópica, transdérmica (por ejemplo, usando un parche convencional), oftálmica, por vía nasal, local, no oral, tal como aerosol, inhalación, subcutánea, intramuscular, bucal, sublingual, rectal, vaginal, intraarterial e intratecal, etc. Se puede administrar en solitario o en combinación con cualquier ingrediente o ingredientes, activos o inactivos, incluyendo en una forma medicinal, o como un aditivo de alimento o bebida.

En realizaciones preferidas de la invención, las composiciones se administran por vía oral en cualquier forma adecuada, que incluye, por ejemplo, planta completa, material vegetal en polvo o pulverizado, extracto, píldora, cápsula, gránulo, comprimido o una suspensión.

Las composiciones se pueden combinar con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Con la expresión "vehículos farmacéuticamente aceptables" se quiere decir cualquier vehículo farmacéutico, tal como los vehículos convencionales descritos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 18<sup>a</sup> Edición, Mack Publishing company, 1990. Los ejemplos de vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, solución salina tamponada con fosfato que contiene Polysorb 80, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos, comprimidos farmacéuticos recubiertos y cápsulas. Típicamente, tales vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico y sales del mismo, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles. Tales vehículos también pueden incluir aditivos de sabor y color y otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos. Los excipientes generalmente formulados con las composiciones son adecuados para la administración oral y no reaccionan de forma perjudicial con las mismas o con otros componentes activos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, gelatina, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácido graso de pentaeritritol, hidroxilmetilcelulosa y similares. Otros aditivos incluyen, por ejemplo, antioxidantes y conservantes, agentes colorantes, saporíferos y diluyentes, agentes emulsionantes y suspensores, tales como goma arábiga, agar, ácido algínico, alginato sódico, bentonita, carbómero,

caragenano, carboximetilcelulosa, celulosa, colesterol, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, octoxinol 9, alcohol oleílico, povidona, monoestearato de propilenglicol, lauril sulfato sódico, ésteres de sorbitano, alcohol estearílico, tragacanto, goma de xantano y derivados de los mismos, disolventes e ingredientes variados, tales como celulosa microcristalina, ácido cítrico, dextrina, dextrosa, glucosa líquida, ácido láctico, lactosa, cloruro de magnesio, metafosfato potásico, almidón y similares.

5 Las composiciones también se pueden formular con otros ingredientes activos, tales como antioxidantes, vitaminas (A, C, ácido ascórbico, B, tales como B1, tiamina, B6, piridoxina, complejo B, biotina, colina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, B12, cianocobalamina y/o B2, D, D2, D3, calciferol, E, tales como tocoferol, riboflavina, K, K1, K2). Los compuestos preferidos incluyen, por ejemplo, creatina monohidrato, piruvato, L-Carnitina, ácido  $\alpha$ -lipoico, fitina o ácido fítico, co-enzima Q10, NADH, NAD, D-ribosa, aminoácidos tales como L-glutamina, lisina, crisina; pre-hormonas tales como 4-androstenodiona, 5-androstenodiona, 4(0 5)androstenediol, 19-nor-4 (o 5)-androstenodiona, 19-nor-4 (o 5)-androstenediol, Beta-ecdisterona y 5-metil-7-metoxi isoflavona. Los ingredientes activos preferidos incluyen, por ejemplo, polen de pino, fructus lycii, Hippophae rhamnoides, Ligusticum, Acanthopanax, Astragalus, Ephedra, codonopsis, polygala tenuifolia Willd, Lilium, Sparganium, ginseng, panax notogiseng, Garcinia, Gugge, extracto de semilla de uva o polvo y/o Ginkgo Biloba.

10 Otras plantas y productos botánicos que se pueden formular con las composiciones de la presente invención incluyen los mencionados en diversos textos y publicaciones, por ejemplo, ES Ayensu, Medicinal Plants of West Africa, Reference Publications, Algonac, Mich. (1978); L. Boulos, Medicinal Plants of North Africa, Reference Publications Inc., Algonac, Mich. (1983); y N. C. Shah, Botanical Folk Medicines in Northern India, J. Ethnopharm, 6: 294-295 (1982).

15 Otros agentes activos incluyen, por ejemplo, antioxidantes, anti-carcinógenos, agentes anti-inflamatorios, hormonas y antagonistas de hormonas, antibióticos (por ejemplo, amoxicilina) y otros agentes bacterianos y otros fármacos medicinalmente útiles tales como los identificados en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Edición, Mack Publishing Company, 1990. Una composición preferida de la presente invención comprende aproximadamente el 1%-100%, preferiblemente aproximadamente el 20-70% del extracto botánico; y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 La presente invención se refiere a métodos de administración de las composiciones, por ejemplo, para proporcionar efectos antioxidantes, para proteger contra oxidación, para proporcionar efectos anticancerosos, para promover la reparación del ADN, para proporcionar efectos anti-radiación, para proteger contra radiación, para reducir la inflamación y otras afecciones y enfermedades como se menciona en este documento.

25 Mediante el término "administrar" se quiere decir que las composiciones se suministran al hospedador de tal forma que se puede conseguir el fin deseado. Como se ha mencionado, las composiciones se pueden administrar mediante una vía eficaz, tal como por vía oral, por vía tópica, por vía rectal, etc. Las composiciones se pueden administrar a cualquier hospedador que necesite tratamiento, por ejemplo, vertebrados, tales como mamíferos, incluyendo seres humanos, seres humanos masculinos, seres humanos femeninos, primates, mascotas, tales como 30 gatos y perros, ganado, tales como vacas, caballos, aves, pollos, etc.

35 Una cantidad eficaz de las composiciones se administra a tal hospedador. Son cantidades eficaces las cantidades que son útiles para conseguir el efecto deseado, preferiblemente un efecto beneficioso o terapéutico como se ha descrito anteriormente. Tal cantidad se puede determinar de forma rutinaria, por ejemplo, realizando un experimento de respuesta a dosis en el que se administran dosis variables a células, tejidos, modelos animales (tales como ratas o ratones en ensayo de laberinto, ensayos de natación, ensayos de toxicidad, ensayos de memoria como se realizan mediante ensayo psicológico convencional, etc.) para determinar una cantidad eficaz para conseguir un efecto. Las cantidades se seleccionan basándose en diversos factores, que incluyen el medio al que se administra el virus (por ejemplo, un paciente con cáncer, modelo animal, células de cultivo tisular, etc.), el sitio de las células a tratar, la edad, salud, sexo y peso de un paciente o animal a tratar, etc. Las cantidades útiles incluyen 10 miligramos-100 gramos, preferiblemente, por ejemplo, 100 miligramos-10 gramos, 250 miligramos-2,5 gramos, 1 g, 2 g, 3 g, 500 miligramos-1,25 gramos, etc. por dosificación de diferentes formas de las composiciones tales como el polvo botánico, pasta o polvo de extracto botánico, té y bebidas preparadas para contener los ingredientes eficaces de las composiciones e inyecciones, dependiendo de la necesidad de los receptores y el método de preparación.

## 50 Composiciones citostáticas

Las composiciones citostáticas de esta invención también se denominan Aneustat<sup>TM</sup>.

55 Las composiciones de la presente invención comprenden cantidades eficaces de extractos de Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata, Salvia miltiorrhiza y, opcionalmente, Hippophae rhamnoides (espino amarillo) que muestran efectos citostáticos para el uso en la inhibición del crecimiento adicional de células cancerosas preexistentes que muestran una o más propiedades de (i) reforzar el sistema inmune, (ii) reducir la lesión oxidativa en células y tejidos, (iii) reducir la inflamación, (iv) bloquear la proliferación de células en ciertos estadios del ciclo celular, (v) actividad antioxidante y (vi) efectos anti-mutágenos contra la exposición adicional a carcinógenos y mutágenos.

En un aspecto de la invención, la composición comprende cantidades iguales de extractos de Ganoderma lucidum,

Scutellaria barbata y Salvia miltiorrhiza. La dosificación de la composición se puede determinar de forma sencilla por el experto en la materia basándose en las concentraciones eficaces de composiciones que se ha demostrado que presentan las diversas propiedades descritas en esta solicitud. Las composiciones que comprenden diferentes proporciones de los extractos individuales se pueden determinar de forma similar.

**5 Composiciones citotóxicas**

Las composiciones citotóxicas de la presente invención también se denominan Aneutox™.

Las composiciones de la presente invención comprenden extractos de Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata, Salvia miltiorrhiza y, opcionalmente, Hippophae rhamnoides (espino amarillo) que son útiles en composiciones citotóxicas a administrarse junto con agentes quimioterapéuticos, tratamiento con radiación y cirugía. Estas

10 composiciones muestran una o más propiedades de (a) acción sinérgica con quimioterapia (aumentando la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos), (b) acción sinérgica con radioterapia y cirugía (aumentando la eficacia inhibiendo el crecimiento de células cancerosas preexistentes que se evitan por radiación o cirugía) además de las propiedades previamente indicadas de (i) reforzar el sistema inmune, (ii) reducir el daño oxidativo en células y tejidos, (iii) reducir la inflamación, (iv) bloquear la proliferación de células en ciertos estadios del ciclo celular, (v) 15 actividad antioxidante y (vi) efectos anti-mutágenos contra la exposición adicional a carcinógenos y mutágenos. Las propiedades anti-mutágenas (junto con la sensibilidad aumentada por sinergia) reducen los niveles de agentes quimioterapéuticos necesarios para el tratamiento, dando como resultado por tanto toxicidad reducida para los pacientes.

20 Las composiciones citotóxicas de la presente invención se pueden usar junto con agentes quimioterapéuticos que incluyen agentes alquilantes, antagonistas de antimetabolitos, antibióticos anticancerosos y agentes anticancerosos obtenidos de plantas.

Los ejemplos de "agentes alquilantes" incluyen mostaza de nitrógeno, clorhidrato de N-óxido de mostaza de nitrógeno, clorambutilo, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, carbocuona, tosilato de imrosulfan, busulfan, clorhidrato de nimustina, mitobronitol, melfalan, dacarbazine, ranimustina, fosfato sódico de estramustina, trietenomelamina, carmustina, lomustina, estreptozocina, pipobroman, etoglucida, carboplatino, cisplatino, miboplacitino, nedaplatino, oxaliplacitino, altretamina, ambamustina, clorhidrato de dibrospidio, fotemustina, prednimustina, pumitepa, ribomustina, temozolomida, treosulfan, trofosfamida, estimálámero de zinostatina, carbocuona, adozelesina, cistemustina y bizelesina.

25 30 Los ejemplos de "antimetabolitos" incluyen mercaptopurina, ribósido de 6-mercaptopurina, tioinosina, metotrexato, encicitabina, citarabina, ocfosfato de citarabina, clorhidrato de ancitabina, fármacos de 5-FU (por ejemplo, fluorouracilo, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, galocitabina, emmitefur), aminopterina, leucovorina cálcica, tabloid, butocina, folinato cálcico, levofolinato cálcico, cladribina, emitefur, fludarabina, gemcitabina, hidroxicarbamida, pentostatina, piritrexima, idoxuridina, mitoguazona, tiazofrina y ambamustina, etc.

35 Los ejemplos de "antibióticos anticancerosos" incluyen actinomicina-D, actinomicina-C, mitomicina-C, cromomicina-A3, clorhidrato de bleomicina, sulfato de bleomicina, sulfato de peplomicina, clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de aclarrubicina, clorhidrato de pirarrubicina, clorhidrato de epirrubicina, neocarzinostatina, mitramicina, sarcomicina, carzinofilina, mitotano, clorhidrato de zorrubicina, clorhidrato de mitoxantrona y clorhidrato de idarrubicina, etc.

40 Los ejemplos de "agentes anticancerosos obtenidos de plantas" incluyen fosfato de etopósido, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, tenipósido, paclitaxel, docetaxel y vinorelbina, etc.

Las composiciones citotóxicas de la presente invención también se pueden usar junto con agentes inmunoterapéuticos que incluyen picibanilo, krestina, sizofirán, lentinán, ubenimex, interferones, interleucinas, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, linfotoxina, vacuna de BCG, Corynebacterium parvum, levamisol, polisácarido K y procodazol.

45 50 Las composiciones se seleccionan de combinaciones de extractos que comprenden Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata, Salvia miltiorrhiza. Se demuestra que las combinaciones de estos compuestos inhiben de forma sinérgica la proliferación de células cancerosas (incluyendo células cancerosas cervicales y pulmonares). También se observa que los extractos de los productos botánicos individuales también reducen la oxidación, reducen la inflamación y refuerzan el sistema inmune.

55 En un aspecto de la invención, la composición comprende cantidades iguales de extractos de Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata y Salvia miltiorrhiza. La dosificación de la composición se puede determinar de forma sencilla por el experto en la materia basándose las concentraciones eficaces de composiciones que se ha demostrado que presentan las diversas propiedades descritas en esta solicitud. Se pueden determinar de forma similar composiciones que comprenden proporciones diferentes de los extractos individuales. Por ejemplo, una composición puede mostrar efectos citostáticos a una concentración o proporción de combinaciones de extractos y grados variables de efectos citotóxicos a otras concentraciones o proporciones de combinaciones de extractos.

- En una realización, la terapia anticancerosa comprende administrar a un individuo con riesgo de desarrollar un cáncer una cantidad profilácticamente eficaz de las composiciones de la invención. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que puede efectuar la inhibición del cáncer cuando se administra a un individuo con riesgo de desarrollar un cáncer (nuevo cáncer o recurrencia). Como se sabe por los expertos en la materia, la dosificación
- 5 puede variar con el individuo dependiendo de la edad, tamaño, salud y metabolismo del individuo y factores relacionados. La vía de administración puede ser mediante cualquier vía convencional en la que se pueda suministrar la composición de forma segura y eficaz. Una vía de administración preferida es una vía oral. La composición se puede administrar en forma de comprimido/comprimido encapsulado/cápsula o en forma de un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, líquido, agua, solución salina u otra solución fisiológica o gel).
- 10 Las combinaciones de extractos que comprenden *Ganoderma lucidum*, *Scutellaria barbata*, *Salvia miltorrhiza* se seleccionan por las capacidades de inhibir la proliferación de células cancerosas (incluyendo células cancerosas cervicales y pulmonares), reducir la oxidación, reducir la inflamación y reforzar el sistema inmune. Además, están incluidos otros compuestos anticancerosos (agentes quimioterapéuticos) en una composición típica.
- 15 Los agentes quimioterapéuticos adecuados para el uso en las composiciones y métodos de la presente invención pueden ser cualquier agente farmacéuticamente aceptable que dependa, al menos en parte, de la interferencia con la estructura y/o metabolismo celular para su actividad anticancerosa. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos convencionales incluyen, pero sin limitación, compuestos de platino, tales como cisplatino, carboplatino y sus análogos y derivados; agentes alquilantes tales como clorambucilo, mostazas de nitrógeno, nitromrina, ciclofosfamida, 4-hidroperoxiciclofosfamida; 2-hexenopiranósido de aldofosfamida, melfalán, BCNU, CNU, metil-
- 20 CCNU, mostaza de uracilo, mannomustina, trietilenomelamina, clorozotocina, ACNU, GANU, MCNU, TA-77, hexametilmelamina, dibromomanitol, pipobromán, epoxipropidina, epoxipiperazina, etoglucida, pippulfan, dimetilmilelano, bubulfan, inprociona, trenimona, tio-TEPA y Aza-TEPA; antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, ácido fólico, metotrexato (MTX), 6-mercaptopurina, aminopterina, 8-azaguanina, azatioprina, uracilo, citarabina, azaserina, tegafur, BHAC, SALVIA MILTIORRHIZA108, arabinósido de citosina, cispuracám, diazamicina, HCFU,
- 25 5'DFUR, TK-177 y ciclotidina; antibióticos tales como bleomicina, daunomicina, ciclomicina, actinomicina D, mitomicina C, carzinofilina, macrocinomicina, neotramicina, macromomicina, nogaromicina, cromomicina, 7-o-metilnogalol-4'-epiadiamicina, 4-desmetoxiaunorrubicina, estreptozotocina DON y mitozantrona; agentes bis-cloroetil-antes, tales como mafosfamida, mostaza de nitrógeno, mostaza de nornitrógeno, melfalán, clorambucilo; hormonas tales como estrógenos; agentes biorreductores tales como mitomicina C y otros tales como mitoxantrona, procarbazina, adriblastina, epirubicina, predimustina, ifosfamida, inhibidores de glucoproteína P tales como taliblastina e inhibidores de proteína cinasa tales como inhibidor de proteína cinasa C (ilmofosina). Los agentes quimioterapéuticos se refieren particularmente a los agentes antimicrotúbulos o agentes que se dirigen a la tubulina que incluyen alcaloides de la vinca; alcaloides de la vinca tales como etopósido, podofilotoxina, vincristina y vinblastina; taxanos (paclitaxel, docetaxel y el precursor taxano (10-desacetilbacatina III), sales de arsénico,
- 30 colchicina (e), tio-colchicina, coichiceína, colchisal y otras sales de colchic; epipodofilotoxinas (etopósido), citocalasinas (tales como A-E, H, J), ácido okadaico, carbarilo y sus metabolitos tales como compuestos de naftol o naftilo que incluyen 1-naftol, 2-naftol, 1-naftilfosfato, malonato, nocodazol (metil-(5-[2-tienil-carbonil]-1H-benzimidazol-2-il)carbamato), criptoficina (CP) y sus análogos tales como CP-52, wortmanina, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), 14-3-3 sigma y sus homólogos (tales como rad24 y rad25), Ustiloxina F,
- 35 40 monocrotalinas tales como pirrol de monocrotalina (MCTP), estramustina y los agentes inhibidores de adenosina. Estos agentes quimioterapéuticos se pueden usar en solitario o en combinación. Preferiblemente, se combinan un antimetabolito y un agente antimicrotúbulos y más preferiblemente se combinan taxol, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, bleomicina o 5-fluorouracilo que tienen diferentes mecanismos de destrucción del tumor. La combinación que contiene compuestos de arsénico, colchicín, colchicina, colchiceína, colchisal, sales de colchic, vinblastina, paclitaxel y compuestos relacionados que interfieren con los citoesqueletos es la más preferida. Cuando nuevos agentes y fármacos quimioterapéuticos se identifiquen y se hagan disponibles para la técnica se pueden aplicar directamente a la práctica de la presente invención.
- 45 En una realización preferida, una composición citotóxica completamente natural comprende componentes vegetales tales como ciclofosfamida, 4-hidroperoxiciclofosfamida, tiotepa, taxol y compuestos relacionados, doxorubicina, daunorrubicina y neocarzinostatina además de *Ganoderma lucidum*, *Scutellaria barbata* y *Salvia miltorrhiza*.
- 50 Los fármacos que se usan actualmente en la terapia del cáncer y que están diseñados para alterar el acortamiento (despolimerización) o alargamiento (polimerización) de los microtúbulos tales como paclitaxel, docetaxel, etopósido, vincristina, vinblastina y vinorelbina son un componente preferido de composiciones citotóxicas. Estos fármacos se unen a la tubulina, la molécula de la cual están compuestos los microtúbulos, y bloquean las células en mitosis inhibiendo el ensamblaje del huso (Compton, D. A., et al., (1999) Science 286: 313-314).
- 55 Los métodos de acuerdo con la presente invención para la terapia anticancerosa con composiciones citotóxicas comprenden además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más tratamientos anticancerosos convencionales (por ejemplo, uno o más de radioterapia, quimioterapia, cirugía, inmunoterapia y terapia fotodinámica) además de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición. En una realización preferida de esta alternativa, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más fármacos quimioterapéuticos convencionales además de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición. Una combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más fármacos quimioterapéuticos

convencionales y una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición citotóxica puede dar como resultado un efecto sinérgico de la inhibición del tumor (incluyendo regresión del tumor existente).

### **Propiedades**

5 Varias propiedades distintas de las composiciones de estas invenciones hacen que sean adecuadas de forma única en la terapia del cáncer.

Las fuentes botánicas de los extractos son compuestos naturales, son esencialmente no tóxicas con una larga historia de uso de los compuestos/extractos individuales. Las propiedades anti-mutágenas demostradas por los resultados de ensayo de Ames (junto con sensibilidad aumentada por sinergia) reducen los niveles de agentes quimioterapéuticos necesarios para el tratamiento dando como resultado toxicidad reducida para los pacientes.

10 Las composiciones también demuestran la capacidad de la realización del ciclo celular mejorada, que podría hacer de la composición de Aneustat un adyuvante potente para la quimioterapia (en una formulación de Aneutox) o radioterapia aumentando la eficacia y reduciendo la dosificación de los agentes quimioterapéuticos.

Control de calidad. Las composiciones basadas en  $Cl_{50}$  se pueden normalizar basándose en las actividades específicas de propiedades definidas.

15 Las composiciones también son adecuadas para el suministro de fármaco cómodo (oral). Las composiciones se extraen con agua caliente y disolventes orgánicos (éster de acetato de etilo, etanol).

De forma global, las composiciones muestran sobre todo efecto citostático con efectos citotóxicos muy débiles en la composición de Aneustat. Las composiciones citotóxicas (Aneutox) incluyen opcionalmente agentes quimioterapéuticos conocidos.

20 Las composiciones demuestran actividad antioxidante que evita la lesión en cromosomas/genes, reduce el efecto de mutágenos, alivia los efectos secundarios de agentes quimioterapéuticos y mejora los mecanismos de reparación celular.

Las composiciones demuestran además actividad de refuerzo del sistema inmune que facilita la eliminación de (i) células dañadas o (ii) células con genes dañados. Además, las composiciones proporcionan los beneficios generales de mejorar el estado inmune (inmunoterapia pasiva).

25 La histopatología de células tratadas con Aneustat indica retención mínima de células cancerosas muertas, lo que mejora la recuperación después de la terapia de cáncer.

30 La composición muestra una actividad anti-inflamatoria marcada. El Aneustat muestra inhibición de Cox-2 (con preferencia con respecto a COX-1 en más de 4,5x). Esta actividad retrasa la progresión de tumor ya que los inhibidores de COX-2 se han sugerido como medios para tratar cáncer.

El Aneustat también induce a que los linfocitos liberen factor de necrosis tumoral alfa, que se sabe que desempeña un papel significativo en la facilitación de la apoptosis, que es crítica en la terapia del cáncer.

35 Por tanto, la composición de Aneustat es útil en la prevención de cáncer así como en la inhibición del crecimiento de células cancerosas existentes. La composición de Aneutox se puede usar en combinación con agentes quimioterapéuticos. Reduce la resistencia farmacológica y actúa como un adyuvante a quimioterapia, radiación y cirugía. Además, la composición actúa de forma sinérgica con las terapias de cáncer: quimioterapia, radioterapia y cirugía, mejorando de este modo la eficacia y reduciendo los niveles de dosificación requeridos. Finalmente, la composición es única y eficaz debido a que los efectos de los componentes individuales de la composición actúan de forma sinérgica.

### **40 Ejemplos**

Sin detalles adicionales, se piensa que el experto en la materia puede utilizar, usando la descripción anterior, la presente invención en su alcance más amplio. Los siguientes ejemplos solamente son ilustrativos y no limitantes del resto de la descripción de ningún modo en absoluto.

45 Las siguientes combinaciones de extractos se usaron a lo largo de los ejemplos: Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata y Salvia miltiorrhiza son los componentes de Aneustat. Aneutox comprende los mismos componentes en las mismas o diferentes concentraciones y comprende adicionalmente, opcionalmente, un agente quimioterapéutico.

Además, las composiciones de la invención pueden incluir, opcionalmente, Panax Quinquefolium (ginseng occidental), Camellia sinensis (té verde) e Hippophae rhamnoides (espino amarillo). Los resultados obtenidos con estas combinaciones o los extractos individuales se compararon con frecuencia con ACAPHA, una combinación de seis productos botánicos (Sophora tonkinensis, Polygonum bistorta, Prunella vulgaris, Sonchus brachyotus, Dictamnus dasycarpus y Dioscorea bulbifera).

**Ejemplo 1: Métodos para la preparación de extractos botánicos**

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar como productos botánicos secos. Las preparaciones botánicas contienen productos fitoquímicos, algunos de los cuales son solubles en medios acuosos, mientras que otros son relativamente más solubles en medios orgánicos (alcohol, lípido). Se usaron y ensayaron

5 diferentes métodos de extracción para la capacidad de extraer ingredientes eficaces de los productos botánicos. Los métodos de extracción incluyen: extracción con agua caliente; extracción orgánica (fracción lipídica); extracción orgánica (fracción acuosa) y extracción con etanol.

Los productos se preparan a partir de productos botánicos usando diferentes disolventes con la plataforma de extracción general mostrada en la Figura 1A. En general, los productos botánicos se pre-exploran para tamaño y

10 calidad uniformes mediante medios visuales y otros medios de inspección. El material botánico en bruto se extrae con el disolvente deseado. Preferiblemente, el proceso de extracción se realiza dos veces para cada lote. Los extractos líquidos se evaporan a sequedad. Si es necesario, el disolvente se retira y los extractos secos se combinan como los productos finales. Opcionalmente, las combinaciones se pueden encapsular para el almacenamiento y suministro.

15 En los esquemas de extracción ilustrados en las Figuras 1B-1G, los productos botánicos o combinaciones botánicas se extrajeron con disolvente (agua caliente, etanol al 80% o acetato de etilo) con reflujo durante 30-60 minutos, se separaron mediante filtración para obtener un filtrado y se secaron al aire para análisis posterior. Los filtrados se combinaron, diluyeron o concentraron antes de la determinación de las actividades. Los procedimientos de

20 extracción con agua caliente, etanol al 80% y cloroformo/metanol se muestran esquemáticamente en las Figs. 1B, 1C y 1D, respectivamente. Los procedimientos de extracción de combinaciones botánicas con agua caliente, etanol al 80% y agua caliente seguido de etanol al 80% se ilustran en las Figuras 1E, 1F y 1G respectivamente. El procedimiento de extracción de combinaciones botánicas con acetato de etilo se ilustra en las Figuras 1H.

**Ejemplo 2: Efectos antiproliferativos de extractos sobre células de cáncer de pulmón**

25 Se ensayó una gran diversidad de concentraciones (en mg/ml) de extractos botánicos individuales de Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata, Pq y Salvia miltiorrhiza requeridos para la inhibición de la proliferación de células cancerosas en células de cáncer de pulmón humano A549 en cultivo tisular durante una duración de 72 h. El aumento en el número de células en presencia y ausencia de extracto se midió mediante ensayo de Sulforodamina B. Se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  para la inhibición del crecimiento celular midiendo la cantidad de proteína celular total con el ensayo de sulforodamina B como se describe por Skehan et al., "New Colorimetric Cytotoxicity Assay for

30 Anticancer-drug Screening", J. Natl. Cancer Inst., 82: 1107-1112 (1990). Se cultivaron células MCF-7 en medio RPMI 1640 que contenía suero fetal bovino al 17%, sulfato de gentamicina 12  $\mu$ g/ml y glutamina 2 mM a 37° en CO<sub>2</sub> al 5%. Las células confluentes se tripsinizaron, diluyeron 40 veces y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 24 horas de cultivo sin fármaco se añadió medio con concentraciones variables de fármaco a diferentes pocillos (concentración final de dimetil sulfóxido, 0,1%). Se determinaron los valores de  $IC_{50}$  después de 35 48 horas adicionales.

35 La Figura 2 muestra los valores de índice de combinación (IC) para la inhibición de la proliferación celular con composiciones (Aneustat™) que comprenden Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) y fármacos quimioterapéuticos. Cada componente se añadió a una concentración de sus respectivos valores de  $IC_{50}$ . Aneustat™ mostró una sinergia altamente significativa y fuerte con Gemcitabina (Gemzar™) y una sinergia significativa con metotretaxo. Se observó cierto antagonismo con carboplatino, epitolina B y docetaxel (Taxotere®).

40 Los extractos orgánicos y acuosos se compararon para eficacia. Las Figuras 3A-3C proporcionan resúmenes de las potencias para la inhibición de la proliferación celular por los diferentes productos botánicos Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) respectivamente cuando se trajeron múltiples veces y 45 mediante diferentes métodos. Se ensayaron las extracciones con agua, acetato de etilo (éster) y metanol.

**Ejemplo 3: inhibición de Cox-2 por los extractos**

45 La ciclooxygenasa (Cox) es una enzima presente de forma natural en nuestro cuerpo. La Cox-2 es una enzima que es necesaria para inducir dolor. Se usan fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) ampliamente para tratar dolor y los signos y síntomas de artritis debido a su actividad analgésica y antiinflamatoria. Están aceptado que los AINE comunes trabajan bloqueando la actividad de la ciclooxygenasa (COX), también conocida como prostaglandina G/H sintasa (PGHS), la enzima que convierte el ácido araquidónico en prostanoïdes. Recientemente se identificaron dos formas de la COX, una isoforma constitutiva (COX-1) y una isoforma inducible (COX-2), de la cual la expresión está regulada positivamente en los sitios de la inflamación (Vane, J. R.; Mitchell, J. A.; Appleton, I.; Tomlinson, A.; Bishop-Bailey, D.; Croxtoll, J.; Willoughby, D. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 2046). Se piensa que la COX-1 desempeña un papel fisiológico y es responsable de la protección gastrointestinal y renal. Por otro lado, parece que la COX-2 desempeña un papel patológico y es la isoforma predominante presente en afecciones inflamatorias. La enzima Cox2 es específica de la inflamación y los inhibidores de la Cox2 (tales como Celebrex®, Vioxx®) se han aprobado recientemente por la FDA.

- Un gran conjunto de pruebas sugiere que la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es importante en el cáncer gastrointestinal. Los niveles de ARNm de COX-2 estaban aumentados >60 veces en cáncer pancreático en comparación con tejido no tumoral adyacente. (Tucker et al., Cancer Res. 1999 Mar 1; 59(5): 987-990.). La ciclooxigenasa-2 (COX-2) estaba sobreexpresada en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) pero era indetectable en la mucosa oral normal de sujetos sanos. (Chan et al., Cancer Res. 1999 Mar 1; 59(5): 991-994). Ahora existen cada vez más pruebas de que una expresión constitutiva de la COX-2 desempeña un papel en el desarrollo y la progresión de tumores epiteliales malignos. (Denkert et al. Cancer Res. 2001 Jan 1; 61 (1): 303-308.) Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la COX-2 puede ser una diana para la prevención o el tratamiento del cáncer.
- 5 Los ensayos antiinflamatorios para la actividad inhibidora de la COX-2 se realizaron usando las isozimas de prostaglandina endoperóxido H sintasa 1 y 2 (PGHS-1 y -2) basándose en su capacidad de convertir el ácido araquídónico en prostaglandinas (PG). Los controles positivos usados en este experimento son aspirina, naproxeno e ibuprofeno.
- 10 Se midieron los valores de índice de combinación (IC) para la inhibición de la actividad de la enzima COX-2 con extractos de cloruro de metileno de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos. La inversa de la concentración del extracto o extractos que inhibieron la actividad de la enzima el 50% de la inhibición máxima (medida por inactivación por calor) se muestra en la Figura 4. La combinación de Ganoderma lucidum (Nº 9) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) mostró la mayor sinergia al igual que lo hizo la combinación de Aneustat de los tres productos botánicos.
- 15 20 Se midieron los valores de índice de combinación (IC) para la inhibición de la actividad de la enzima COX-2 mediante extractos de acetato de etilo de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos. La inversa de la concentración del extracto o extractos que inhibió la actividad de la enzima el 50% de la inhibición máxima (medida por inactivación por calor) se muestra en la Figura 5. La combinación de Ganoderma lucidum (Nº 9) y Scutellaria barbata (Nº 15) mostró cualquier sinergia significativa (IC ~ 0,6).
- 25 Un inhibidor preferido de COX-2 mostraría una mayor inhibición de COX-2 con respecto a COX-1, que es responsable de la protección gastrointestinal y renal. La proporción de las potencias de la inhibición de COX-2 con respecto a la inhibición de COX-1 por extractos de acetato de etilo (Nº 0401) de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos se midió y se muestra en la Figura 6. Las combinaciones mostradas se prepararon mezclando dos o más extractos en las proporciones de sus  $IC_{50}$  para inhibir la actividad de COX-1 o COX-2. Por tanto, se usaron diferentes mezclas de combinación para la inhibición de COX-1 y COX-2. El extracto de Salvia miltiorrhiza (Nº 14) fue el agente único más selectivo y mostró una preferencia de 15 veces por la COX-2 con respecto a la COX-1. La combinación de extractos de Ganoderma lucidum (Nº 9) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) fue 19 veces más potente al inhibir la COX-2 con respecto a la COX-1 como se muestra en la Figura 6.
- 30 35 La Figura 7 muestra las potencias de la inhibición de COX-2 y COX-1 por extractos de acetato de etilo (Nº 0401) de los productos botánicos individuales Ganoderma lucidum (Nº 9), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltiorrhiza (Nº 14) y combinaciones de los mismos. La potencia se representa como la inversa de la  $IC_{50}$  de cada composición ensayada. La inhibición se midió mediante kits de ensayo ELISA de COX-1 y COX-2 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI). Salvia miltiorrhiza (Nº 14) en solitario o en combinación con Ganoderma lucidum (Nº 9) o Ganoderma lucidum (Nº 9) y Scutellaria barbata (Nº 15) mostraron la mayor potencia.
- 40 **Ejemplo 4: Actividad antioxidante de extractos**
- 45 Se ensayan combinaciones de extractos botánicos que comprenden dos o más de baya de Scutellaria barbata, hoja de Scutellaria barbata, Pq, Ganoderma lucidum, Salvia miltiorrhiza y Scutellaria barbata para propiedad antioxidante. La combinación A comprendía los 6 ingredientes y las combinaciones B-G excluían específicamente un componente cada vez. Se observó que la hoja de Scutellaria barbata era responsable de prácticamente el 50% de la actividad antioxidante de toda la combinación.
- 50 Se ensayan combinaciones de extractos con agua caliente que comprenden dos o más de Ganoderma lucidum, Salvia miltiorrhiza y Scutellaria barbata para propiedad antioxidante. El patrón de comparación es Trolox (un análogo soluble en agua de la vitamina E) y la actividad antioxidante relativa se define como Equivalentes de Trolox (TE). El patrón de comparación es Quercetina (un flavonoide) y la actividad antioxidante relativa se define como Equivalentes de Quercetina. Se observó que la hoja de espino amarillo era responsable de prácticamente el 50% de la actividad antioxidante de toda la combinación en ambos sistemas de medición.
- Ejemplo 5: Ensayo de TNF- $\alpha$  de extractos**
- 55 La carga tumoral da como resultado aumentos significativos en el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) circulante, una citocina que puede inducir una descomposición proteica en el músculo esquelético. (Llover et al., Mol Cell Endocrinol. 1998, Jul 25; 142 (1-2): 183-189). El TNF- $\alpha$  es una citocina citotóxica liberada de linfocitos estimulados.

El TNF- $\alpha$  se dirige a células tumorales que están experimentando mitosis aberrante. Al alcanzar una célula diana, el TNF- $\alpha$  se une a un receptor y causa que la célula experimente apoptosis. El TNF- $\alpha$  se libera de varios linfocitos que incluyen macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B activados, células asesinas naturales, etc. El TNF- $\alpha$  también es un regulador importante de la respuesta inmune.

- 5 Los extractos se ensayaron para la capacidad de estimular macrófagos para liberar TNF- $\alpha$ . Se trataron monocitos (precursores de macrófagos) con diferentes concentraciones de extractos de uno o más de Ganoderma lucidum (Nº 8), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) durante 4 horas y se mide la liberación de TNF- $\alpha$  mediante un inmunoensayo ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 8. Ganoderma lucidum muestra la capacidad más potente de inducir liberación de TNF- $\alpha$ .

10 **Ejemplo 6: Capacidad de los extractos de mejorar la actividad del sistema inmune**

- La proliferación de linfocitos está relacionada con la mejora del sistema inmune, ya que representa la disponibilidad de un mayor número de células del sistema inmune que se convierten en disponibles para enfrentarse a los patógenos. Se ensayaron diferentes concentraciones de extractos de Ganoderma lucidum (Nº 8), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) para la capacidad de mejorar la proliferación de células del sistema inmune. La proliferación de linfocitos se midió como la cantidad de timidina tritiada incorporada en el ADN de los linfocitos y se muestra en la Figura 9.

15 **Ejemplo 7: Ensayo de Ames para la medición de la mutagenia de los extractos**

- El uso del ensayo de Ames está basado en la suposición de que, además de causar tumores en células animales, la mayoría de los carcinógenos son mutágenos. La bacteria usada en el ensayo es una cepa de *Salmonella typhimurium* que lleva una mutación en el operón *his* haciendo que sea incapaz de sintetizar el aminoácido histidina (His) a partir de los ingredientes en su medio de cultivo, con mutaciones en el operón *his* son auxotrofos de histidina -- son incapaces de desarrollarse sin histidina añadida. Los revertentes que restauran el fenotipo His<sup>+</sup> se desarrollarán en placas con medio mínimo sin histidina. Esto proporciona una selección simple, sensible para revertentes de mutantes *his* como mutágenos. (Ames, B., F. Lee y W. Durston. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 782-786).

- 20 El ensayo de Ames muestra si las composiciones ensayadas son por sí mismas mutágenas, y por tanto, potencialmente peligrosas. El ensayo también podría mostrar si los extractos son beneficiosos previniendo las mutaciones. Muchos compuestos se alteran en el hígado para convertirse en mutágenos. Los ensayos se realizaron por tanto en presencia y ausencia de enzimas hepáticas (extracto de hígado activado con NADPH y glucosa-6-fosfato). Se usó 2-aminoantraceno como control positivo. El ensayo de Ames se realizó sobre extractos de Ganoderma lucidum (Nº 8), Scutellaria barbata (Nº 15) y Salvia miltorrhiza (Nº 14) con 20 µg por placa y se muestra en la Figura 10. Ninguno de los extractos mostró una mutagenia significativa.

25 **Ejemplo 8: Dosis máxima tolerable de Aneustat™**

- 30 Se administró por vía oral una solución de Aneustat (Ganoderma lucidum, Salvia miltorrhiza y Scutellaria barbata) que representa 10xCl<sub>50</sub> por vía oral a ratones SCID/nod. Se administró por vía oral una solución del material extraído (43,65 mg/ml) (1 ml/día/animal) a ratones SCID/nod (25 g; n=5) una vez al día hasta durante 14 días. Los ratones se controlaron a lo largo de un periodo de 28 días para signos de estrés después de la administración del fármaco, incluyendo pérdida sustancial del peso corporal, diarrea, jadeo intenso, despeinado del pelo, etc. Los días 2 a 14 se observó una pérdida del peso corporal menor del 13% (Fig. 11) y se consideró que los animales estaban sanos. Al final del periodo se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Los ratones de control emparejados por edad (n=4) se trataron con solución salina 1 ml/día durante los 14 días. Los datos muestran que una dosificación diaria de 43,65 mg/ml/25 g de ratón del extracto no es tóxica. Esta dosificación se usó en un estudio preliminar sobre el efecto del extracto sobre el crecimiento tumoral en un sistema de modelo de xenoinjerto.

35 **Ejemplo 9: Establecimiento de un modelo de xenoinjerto de tejido de cáncer de pulmón humano/ratón**

- 40 El ensayo preclínico de productos terapéuticos de cáncer de pulmón se ha realizado en gran medida usando modelos de xenoinjerto en los que se han inyectado por vía subcutánea líneas celulares de cáncer de pulmón humano en ratones inmunodeficientes. Sin embargo, los xenoinjertos de células cancerosas pueden no imitar de forma precisa el comportamiento de tumores de pulmón *in vivo*. De hecho, los modelos de xenoinjerto de línea celular de cáncer tienen un mal historial en cuanto a predecir de forma precisa la eficacia clínica de agentes anticancerígenos. Se estableció un modelo novedoso de xenoinjerto para una diversidad de tejidos humanos precancerosos y cancerosos, incluyendo tejido de cáncer de pulmón. Lo que es más importante, los xenoinjertos en el modelo conservan las características histológicas del tejido parental. Para tipos seleccionados de cáncer, los xenoinjertos responden a terapia de un modo similar al observado en los pacientes. Por ejemplo, el tejido de cáncer de próstata desarrollado en ratones SCID mostró una respuesta espectacular a la terapia de ablación con andrógenos como se observó de forma regular en la clínica.

45 Despues de dos meses y medio de crecimiento de un xenoinjerto de cáncer de pulmón AB79 *in vivo*, uno de los dos

xenoinjertos de tejido había crecido hasta el tamaño de una nuez. Los tumores insertados en el sitio renal sobrevivieron y conservaron su histopatología original y perfil de marcador de diferenciación, incluso después de pases seriados. El tejido de cáncer de pulmón tiene una velocidad muy rápida de crecimiento en ratones SCID con un tiempo de duplicación de aproximadamente 5 días. Los análisis citogenéticos mostraron algunos cromosomas anormales.

- 5 No hay solamente translocaciones, también hay delecciones y duplicación de segmentos cromosómicos. (Obsérvese: ya que cada cromosoma tiene su propio color de presentación, más de un color a lo largo de la longitud de un cromosoma indica una translocación). El análisis de Cariotipado Espectral (SKY) mostró que el tejido de un xenoinjerto de cáncer de pulmón AB79 contenía solamente un bajo número de alteraciones cariotípicas, aunque el cáncer estaba altamente avanzado.

10 **Ejemplo 10: Efecto de supervivencia de Aneustat en ratones que llevan xenoinjertos de línea celular de cáncer de pulmón humano A549**

Se mezclaron células A549 humanas con gel de colágeno ( $10^6$  células/gel) y se injertaron debajo de las cápsulas renales de 3 ratones SCID/nod. Después de 2 meses *in vivo*, las células A549 habían formado tumores sólidos que después se recogieron y diseccionaron en múltiples trozos idénticos. Cuatro trozos (cada trozo de aproximadamente 2,5 mm<sup>3</sup>) de tumor se injertaron en un ratón el día 0. En total se injertaron 60 trozos en 15 ratones. 25 días después de injertar, el volumen promedio de tumor era de 20,8 mm<sup>3</sup>. Aneustat se administró por vía oral (14,4 mg/animal/día) a 6 ratones durante 21 días. Los ratones de control emparejados por edad se trajeron con solución salina durante el mismo periodo. Los resultados de la supervivencia de los ratones se controlaron a lo largo de un periodo de 12 semanas y se muestran en la Figura 12. Un tratamiento durante 3 semanas con Aneustat otorgó un aumento significativo en la supervivencia de ratones que llevaban tumor A549 a lo largo de un periodo de 3 meses.

15 **Ejemplo 11: Efecto de Aneustat sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de pulmón microcítico, resistente a fármacos, humano (AB79)**

La eficacia de Aneustat contra carcinoma pulmonar microcítico (SCLC) resistente a fármacos se ensayó usando xenoinjertos de un paciente de 68 años de edad con SCLC resistente a fármacos. Se injertaron de forma aleatoria 20 80 trozos (2 mm<sup>3</sup>) de tejido tumoral en 24 ratones debajo de la cápsula renal el día 0. Al comienzo del tratamiento (día 6), el volumen promedio de tumor era de aproximadamente 5 mm<sup>3</sup>, aumentando hasta 600 mm<sup>3</sup> el día 21 en el grupo de control.

25 El día 7, cuando el volumen promedio del injerto era de aproximadamente 5 mm<sup>3</sup>, se inició el tratamiento con Aneustat. 3 grupos de 6 ratones cada uno se trajeron con 43,65, 14,4 y 4,3 mg/animal/día respectivamente durante 30 16 días, después de lo cual se recogieron los injertos para determinar el efecto sobre el volumen tumoral, histología, índice de apoptosis (ensayo de Tunel) e índice de proliferación (tinción con marcador de proliferación Ki67). El ensayo TUNEL detecta la fragmentación del ADN inducida por apoptosis mediante un ensayo de fluorescencia cuantitativo. La desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) cataliza la incorporación de restos de bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN nuclear en fragmentación en los extremos 3'-hidroxilo mediante marcaje de extremo 35 mellado. Entonces, un anticuerpo anti-BrdU conjugado con TRITC puede marcar los extremos 3'-hidroxilo para la detección.

El tratamiento con Aneustat inhibió el crecimiento de xenoinjerto de SCLC sustancialmente en las tres dosis (en >50% a una dosificación de 14,4 mg/ratón/día) de un modo estadísticamente significativo ( $p<0,01$ ). El extracto botánico mezclado inhibió el crecimiento del tejido de cáncer de pulmón sustancialmente a las 3 dosificaciones, en 40 aproximadamente el 50%. Las diferencias entre el crecimiento de tumor en animales de control y tratados eran estadísticamente significativas ( $p<0,01$ ). El efecto inhibidor era comparable al régimen quimioterapéutico convencional de CDDP + VP16 y se muestra en la Figura 13.

45 La histopatología mostró diferencias en patrones necróticos. En xenoinjertos no tratados, la necrosis era principalmente focal y central como es común en todos los carcinomas anaplásicos microcíticos y reflejan necrosis vasodistal causada por una proliferación rápida (Fig. 14a). Las células necróticas estaban localizadas predominantemente en las porciones centrales del tumor (Fig. 14b). La inmunotinción con Ki67 mostró aumentos habituales de la proliferación adyacente a áreas de necrosis sin signos de reparación (Fig. 14c).

En xenoinjertos tratados con Aneustat, la necrosis estaba aumentada y era principalmente confluyente en lugar de focal. La necrosis era vasocéntrica (Fig. 14d) y estaba presente en yuxtaposición al margen tumoral de avance en 50 lugar de centralmente (Fig. 14e). Las inmunotinciones con Ki67 mostraron un aumento global en el número de células en fase "S" y esto era particularmente marcado en el borde de avance (Fig. 14f). El suministro sanguíneo aumentado y la citotoxicidad suministrada por sangre en la región del crecimiento activo pueden inferirse de estas observaciones. El aumento de las células en fase S y el aumento de la actividad proliferativa puede indicar un efecto "protector" de la composición de Aneustat. El aspecto sano de xenoinjertos tratados con Aneustat (en comparación 55 con el aspecto de xenoinjertos tratados con CDDP+VP16) puede reflejar efecto citostático o la toxicidad reducida de la composición.

Se midió la apoptosis usando un Kit de Detección de Apoptosis In Situ con Fluoresceína Apop Tag® (Chemicon). Significativamente más células estaban en apoptosis en los xenoinjertos tratados con Aneustat. La muerte celular

programada inducida por el tratamiento con Aneustat es una propiedad importante, ya que los cánceres con frecuencia proliferan neutralizando la capacidad de una célula de experimentar apoptosis.

Los injertos teñidos con anticuerpo anti-Ki67 mostraron un aumento marginal, pero estadísticamente significativo, en la tinción con Ki67 de células de cáncer después del tratamiento con Aneustat. Las células marcadas con Ki67 encontradas en fase S indican el bloqueo en la fase S (Figura 15).

#### **Ejemplo 12: Estudio de la eficacia de xenoinjerto sobre línea celular de cáncer de próstata (DU145)**

Para determinar la eficacia de Aneustat sobre otros tipos de cáncer y comparar su rendimiento con un régimen quimioterapéutico convencional, se cortaron xenoinjertos de tumor de una línea celular de próstata DU145 en trozos de 2 mm<sup>3</sup> y se injertaron en ratones SCID/rod. El tratamiento se comenzó el día 13 (volumen medio = 15,6 mm<sup>3</sup>).

10 Los ratones se dividieron en 3 grupos iguales para el tratamiento con solución salina, Aneustat a 3,3 CI50 y fosfato sódico de estramustina (EMCYT®) y docetaxel (E+D). Como se mostró en la Figura 16, el Aneustat mostró un efecto inhibidor significativo comparable al régimen E+D.

#### **Ejemplo 13: Efecto de Aneustat sobre el crecimiento de xenoinjertos de línea (AB117) de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)**

15 Se obtuvo tumor AB117 que mostraba características de carcinoma de célula escamosa de pulmón de un hombre de 53 años de edad con una enfermedad de estadio tardío. Los xenoinjertos se trataron con solución salina (control), Aneustat, cisplatino+docetaxol y cisplatino+vinorrelbina. Solamente el Aneustat se administró por vía oral, los demás fármacos se administraron por vía intraperitoneal.

20 Como se muestra en la Figura 17, el Aneustat tiene un efecto inhibidor significativo sobre el crecimiento del tejido de NSCLC humano *in vivo*.

Como se muestra en la Figura 18, los tumores tratados con Aneustat mostraron un pleimorfismo aumentado (18c) y células multinucleadas (18d). Por el contrario, los tumores de control mostraron menos necrosis y pleimorfismo (18a). Los tumores tratados con cisplatino+docetaxol (18b) muestran solamente células tumorales raramente viables.

25 En los histogramas generados mediante clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) en las Figuras 19A y 19B, los tumores tratados con Cisplatino+docetaxol mostraron prácticamente una pérdida total de células que estaban ciclando. Había cierto bloqueo en la fase G2/M pero las células en S+G2+M solamente ascendían al 6%. Por el contrario, los tumores tratados con Aneustat mostraron un aumento en el porcentaje de células S, G2 y M de aproximadamente el 30-50%. Las pruebas sugieren que las células tratadas con Aneustat tienen un periodo G1 más corto o un desplazamiento aumentado de G0 a G1 refleja el ciclado aumentado de las células. El ciclado aumentado podría hacer de la composición de Aneustat un adyuvante potente para la quimioterapia (en una formulación de Aneutox) o radioterapia.

#### **Ejemplo 14: Efectos antiproliferativos de extractos sobre células de cáncer cervical**

35 Se ensayan concentraciones de extractos botánicos individuales requeridos para la inhibición de crecimiento de células de cáncer cervical en cultivo tisular y se comparan con las de ACAPHA. Los extractos orgánicos (lípido) y acuosos (agua caliente) se comparan para la eficacia. Ganoderma lucidum, Scutellaria barbata, Pq y Salvia miltiorrhiza son eficaces a menores concentraciones que ACAPHA. Las fracciones lipídicas de los extractos orgánicos son aproximadamente 10 veces más potentes que los extractos de agua caliente.

40 Las concentraciones de las fracciones lipídicas de extractos herbarios individuales requeridas para la inhibición de 50% del crecimiento de células de cáncer cervical se ensayan y comparan con las de ACAPHA y medicina china. Salvia miltiorrhiza se identifica como la fuente del extracto más potente.

Se determinan las concentraciones de las fracciones lipídicas de combinaciones de extractos herbarios (en mg/ml) requeridas para la inhibición del 50% del crecimiento de células de cáncer cervical. Las combinaciones de extractos botánicos son de 2 a 4 veces más potentes que el extracto botánico individual más potente, Salvia miltiorrhiza.

45 También se observa que las combinaciones de extractos botánicos son más potentes que el extracto más eficaz de ACAPHA.

#### **Ejemplo 15: Inhibición sinérgica del crecimiento de células de cáncer humano**

Aunque los extractos de Salvia miltiorrhiza (Nº 14), Ganoderma lucidum (Nº 9) y Scutellaria barbata (Nº 15) eran eficaces inhibiendo el crecimiento de líneas de células de cáncer humano (Tablas 2A y 2B), las combinaciones de los extractos botánicos individuales de Salvia miltiorrhiza (Nº 14), Ganoderma lucidum (Nº 9) y Scutellaria barbata (Nº 15) mostraron efecto sinérgico en la inhibición de líneas de células cancerosas humanas de cáncer de pulmón (A549), cáncer de mama (MCF7), cáncer de próstata (DU145) y cáncer de colon (DLD-1), como se muestra en las Tablas 3A y 3B.

**Tabla 2A:**  $IC_{50}$  para la inhibición de la proliferación celular mediante extractos botánicos en diferentes líneas celulares (en mg/ml con desviaciones típicas)

Extracto	Línea Celular		Línea Celular		Línea Celular		Línea Celular	
	A549 pulmón	MCF7 mama	DU145 próstata	PC-3 próstata	DLD-1 colon	Línea Celular		
	$IC_{50}$	Desv. Típ.	$IC_{50}$	Desv. Típ.	$IC_{50}$	Desv. Típ.	$IC_{50}$	Desv. Típ.
0401.009.b-03	0,078	0,0014	0,112	0,0024	0,067	0,015	0,11	0,0028
0401.014.b-03	0,014	0,0069	0,0069	0,0035	0,0078	0,00011	0,014	0,0063
0401.015.b-03	0,073	0,058	0,062	0,01	0,049	0,019	0,068	0,0089

**Tabla 2B. Cl<sub>50</sub> para la inhibición de la proliferación celular mediante extractos botánicos en diferentes líneas celulares con errores típicos de la media**

Extracto	Línea Celular									
	A549		MCF7		DU145		PC-3		DLD-1	
	Cl <sub>50</sub>	Err. Típ.								
0401.009.b-03	0,0780	0,0006	0,1120	0,0012	0,0670	0,0075	0,1100	0,0014	0,1100	0,0125
0401.014.b-03	0,0140	0,0028	0,0069	0,002	0,0078	0,00004	0,0140	0,0024	0,0034	0,0003
0401.015.b-03	0,0730	0,022	0,0620	0,0050	0,0490	0,0095	0,0680	0,0044	0,0590	0,0073

**Tabla 3A. Inhibición sinérgica de la proliferación de células de cáncer de pulmón, próstata y colon**

Combinación	Línea Celular			Línea Celular			Línea Celular			
	A549 (pulmón)			PC-3 (próstata)			DLD-1 (colon)			
	Cl <sub>50</sub>	Desv. Típ.	Err. Típ.	Cl <sub>50</sub>	Desv. Típ.	Err. Típ.	Cl <sub>50</sub>	Desv. Típ.	Err. Típ.	
9+14	0,0213	0,0060	0,0035	0,0238	0,067		0,0033	0,0303	0,0040	0,0020
9+15	0,0480	0,0061	0,0035	0,1180	0,0838		0,0410	0,0288	0,0118	0,0053
14+15	0,0293	0,0155	0,0075	0,1143	0,0696		0,0400	0,0195	0,0051	0,0025
9+14+15	0,0213	0,0081	0,0047	0,0825	0,0126		0,0060	0,0143	0,0095	0,0042

5

**Tabla 3B. Inhibición sinérgica de la proliferación de células de cáncer de mama y próstata**

Combinaciones de Extractos Botánicos	MCF7	DU145
	Cl <sub>50</sub>	Cl <sub>50</sub>
0401.009.b-03 + 0401.014.b-03	0,017	0,025
0401.009.b-03 + 0401.015.b-03	0,065	0,016
0401.014.b-03 + 0401.015.b-03	0,012	0,013
Los 3 (9 + 14 + 15)	0,042	0,017

Todas las combinaciones de los tres extractos botánicos de Salvia miltiorrhiza (Nº 14), Ganoderma lucidum (Nº 9) y Scutellaria barbata (Nº 15) inhibieron sinérgicamente la proliferación de células de cáncer de pulmón, células de mama, células de cáncer de próstata y células de cáncer de colon humano como se resume en la Tabla 4.

**Tabla 4. Resumen de la inhibición sinérgica de la proliferación de células de carcinoma de pulmón, mama, próstata y colon mediante combinaciones de extractos botánicos.**

Índice de combinación	A549 pulmón	MCF7 mama	DU145 próstata	DLD-1 colon
9+14	0,46	0,27	0,62	0,54
9+15	0,63	0,74	0,27	0,30
14+15	0,51	0,33	0,54	0,35
9+14+15	0,55	0,43	0,28	0,23

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un extracto de *Ganoderma lucidum*, un extracto de *Salvia miltorrhiza* y un extracto de *Scutellaria barbata* en la fabricación de un medicamento para terapia anticancerosa, en el que cada extracto comprende de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 50 por ciento en peso.
- 5    2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto es un extracto con agua caliente.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto es un extracto orgánico.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto es un extracto con acetato de etilo.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto presenta al menos una propiedad seleccionada entre: antiinflamación, refuerzo inmune, inducción de linfocitos para liberar TNF-alfa y aceleración de la proliferación celular.
- 10    6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la actividad antiinflamatoria inhibe selectivamente la COX-2 con respecto a la COX-1.
7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho medicamento comprende además un extracto de *Camellia sinensis* (té verde).
- 15    8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho medicamento es para la administración a un individuo en un estadio temprano de cáncer y en el que a dicho individuo también se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente quimioterapéutico.
9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que al individuo también se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más tratamientos anticancerosos seleccionados entre radioterapia, 20    quimioterapia, cirugía, inmunoterapia, terapia fotodinámica y una combinación de los mismos.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que agente quimioterapéutico se selecciona entre gemcitabina, metotrexato, ciclofosfamida, 4-hidroperoxiciclofosfamida, tiotepa, taxol, doxorrubicina, daunorrubicina y neocarzinostatina.
- 25    11. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el agente quimioterapéutico altera la polimerización de los microtúbulos.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona entre paclitaxel, docetaxel, etopósido, vincristina, vinblastina y vinorrelbina.
- 30    13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer cervical y cáncer de próstata.
14. Una composición anticancerosa que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de *Ganoderma lucidum*, un extracto de *Salvia miltorrhiza* y un extracto de *Scutellaria barbata*.
- 35    15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la composición presenta al menos una propiedad seleccionada entre: antiinflamación, refuerzo inmune, inducción de los linfocitos para liberar TNF-alfa y aceleración de la proliferación celular.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la actividad antiinflamatoria inhibe selectivamente la COX-2 con respecto a la COX-1.
- 40    17. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente quimioterapéutico.
18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el agente quimioterapéutico altera la polimerización de los microtúbulos.
- 45    19. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el agente quimioterapéutico se selecciona entre paclitaxel, docetaxel, etopósido, vincristina, vinblastina, vinorrelbina, gemcitabina, metotrexato, ciclofosfamida, 4-hidroperoxiciclofosfamida, tiotepa, taxol, doxorrubicina, daunorrubicina y neocarzinostatina.
20. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en la que cada extracto se usa en aproximadamente una cantidad igual.
21. La composición de acuerdo con la reivindicación 20, en la que cada extracto es un extracto con agua caliente.
22. La composición de acuerdo con la reivindicación 20, en la que cada extracto es un extracto orgánico.

23. La composición de acuerdo con la reivindicación 20, en la que cada extracto es un extracto con acetato de etilo.
24. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23 para su uso en terapia anticancerosa.

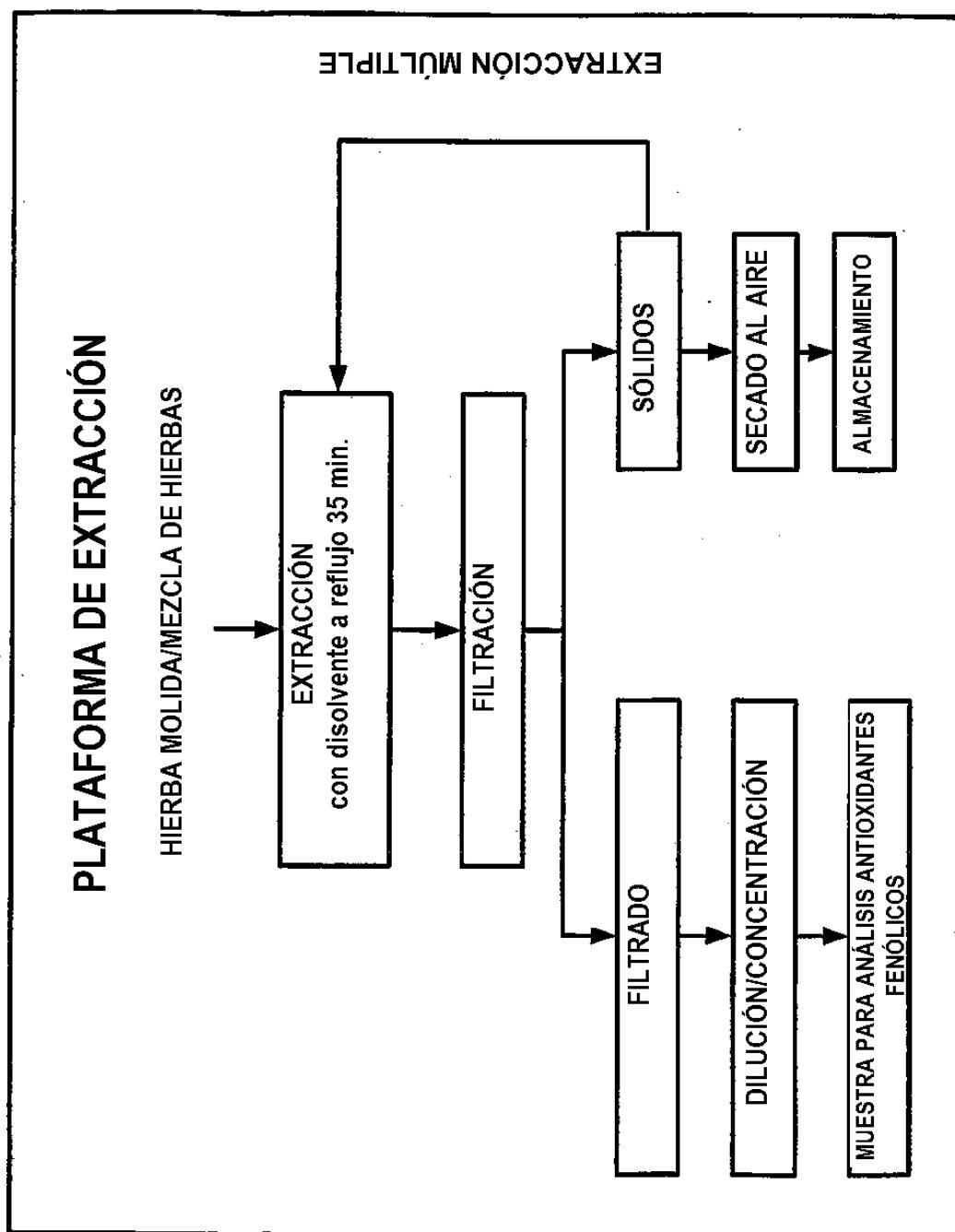


FIGURA 1A

FIGURA 1B

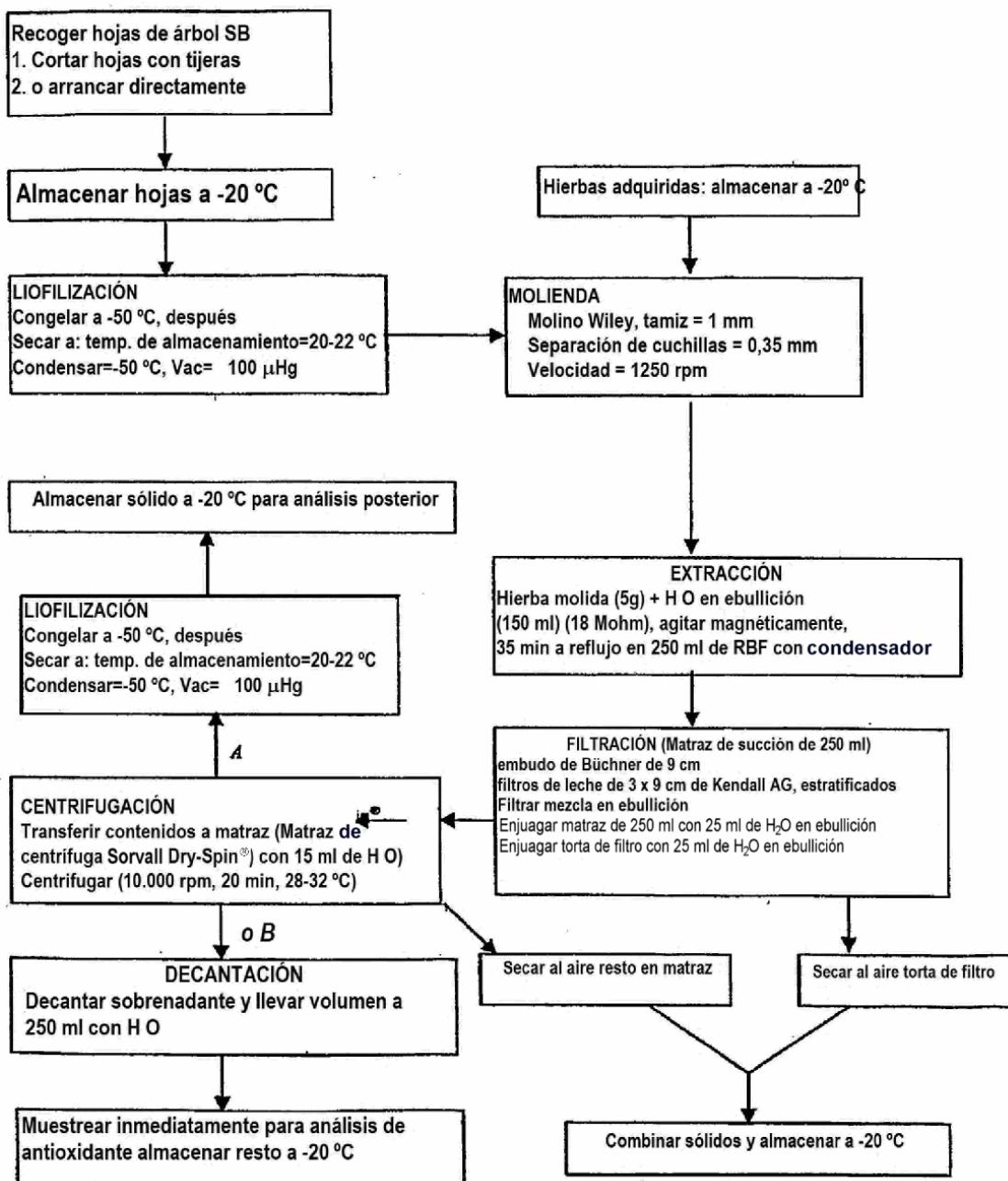


FIGURA 1C

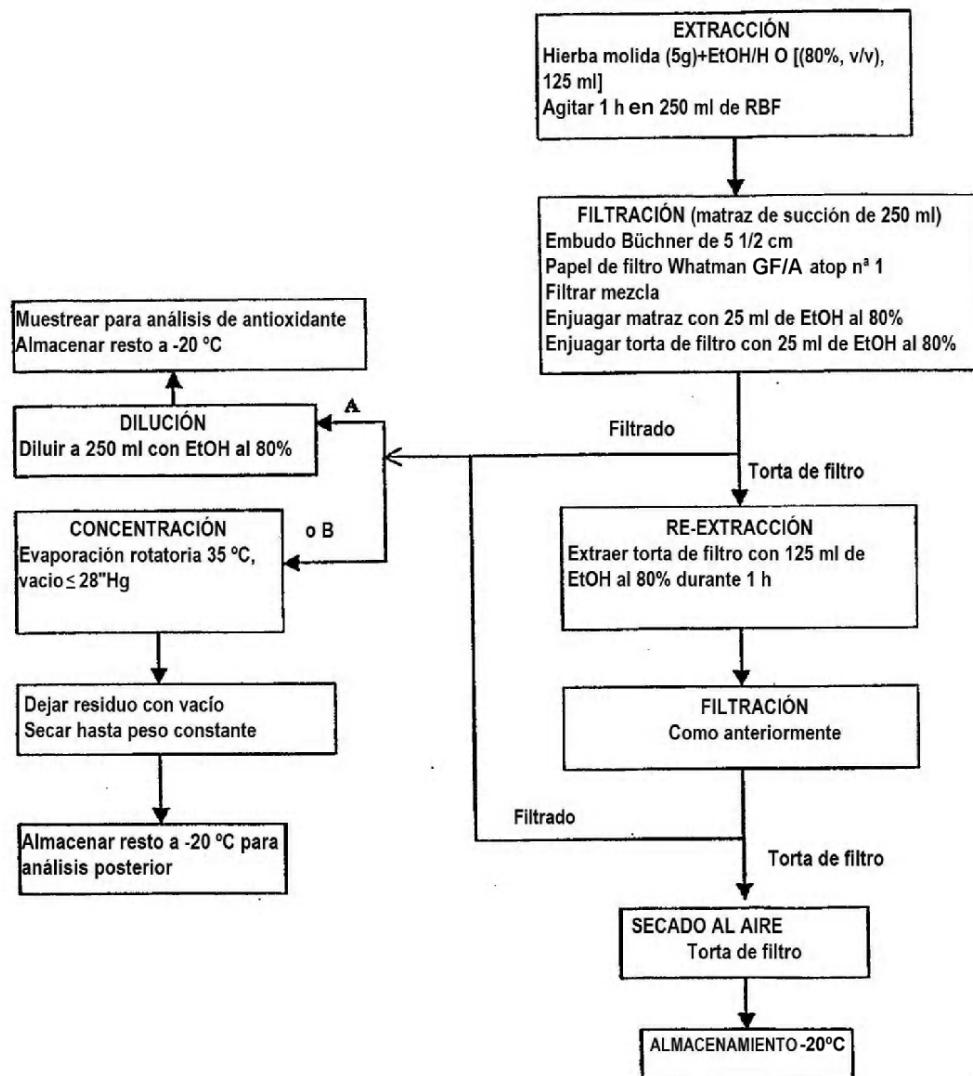


FIGURA 1D

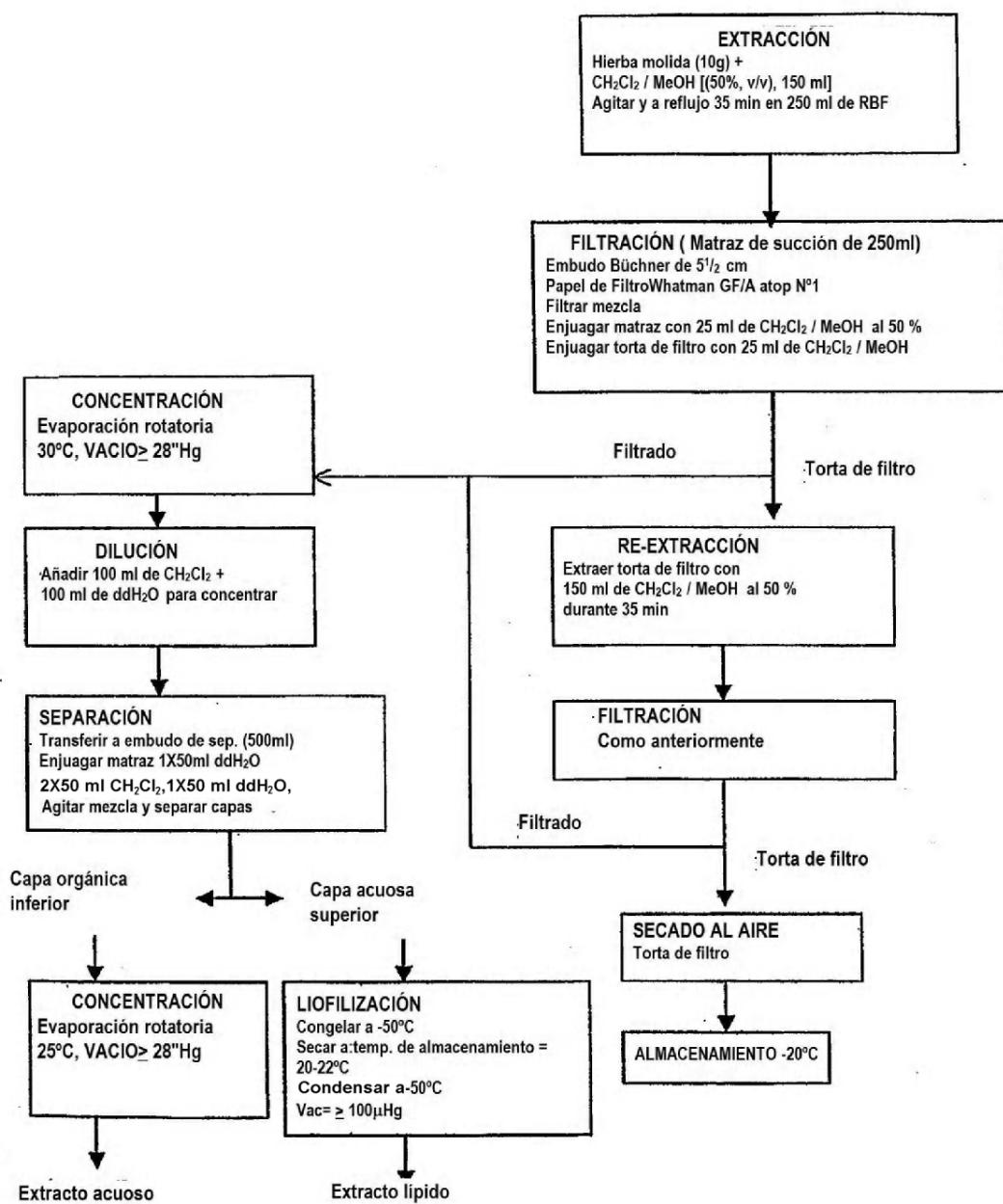


FIGURA 1E

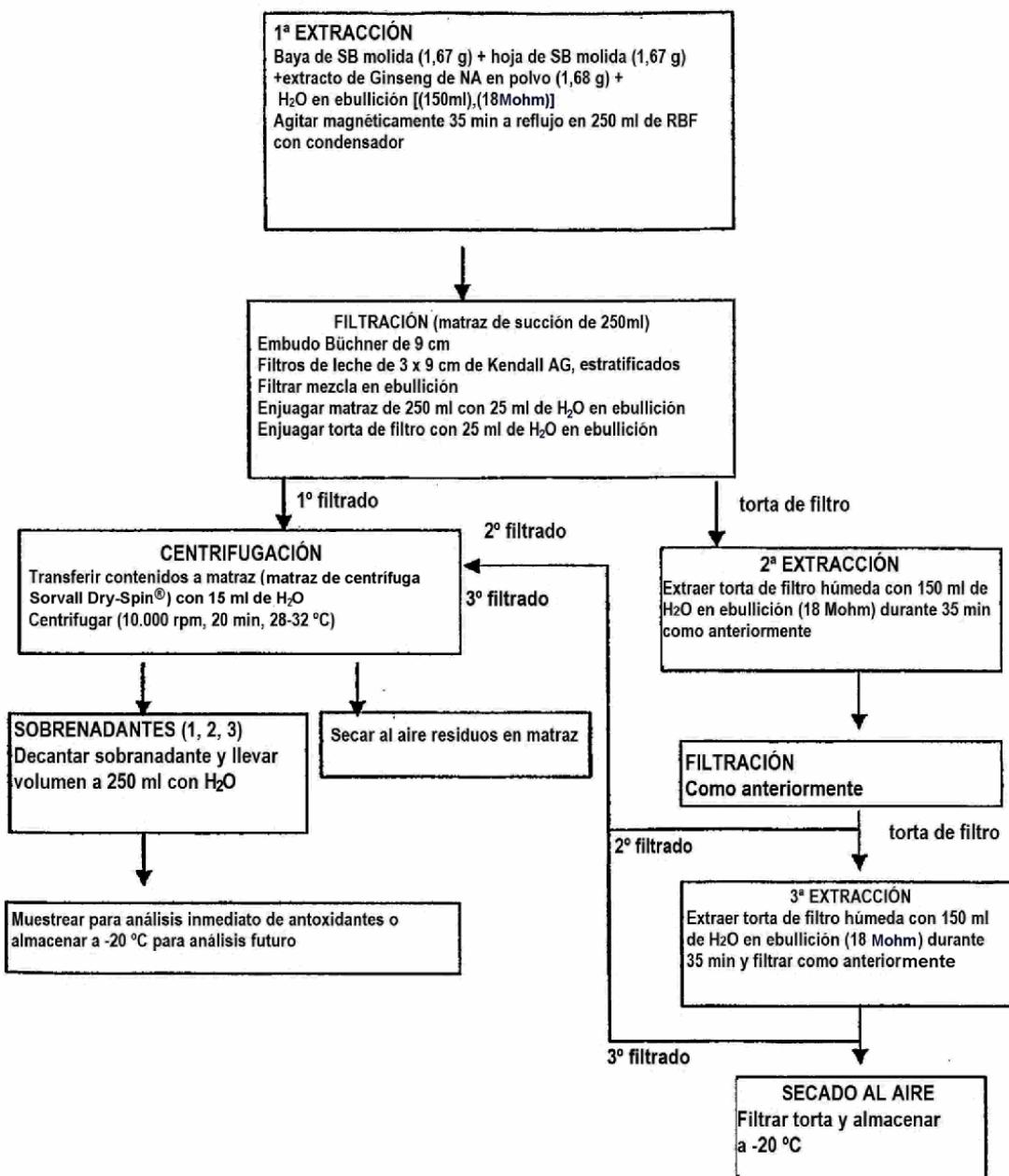


FIGURA 1F

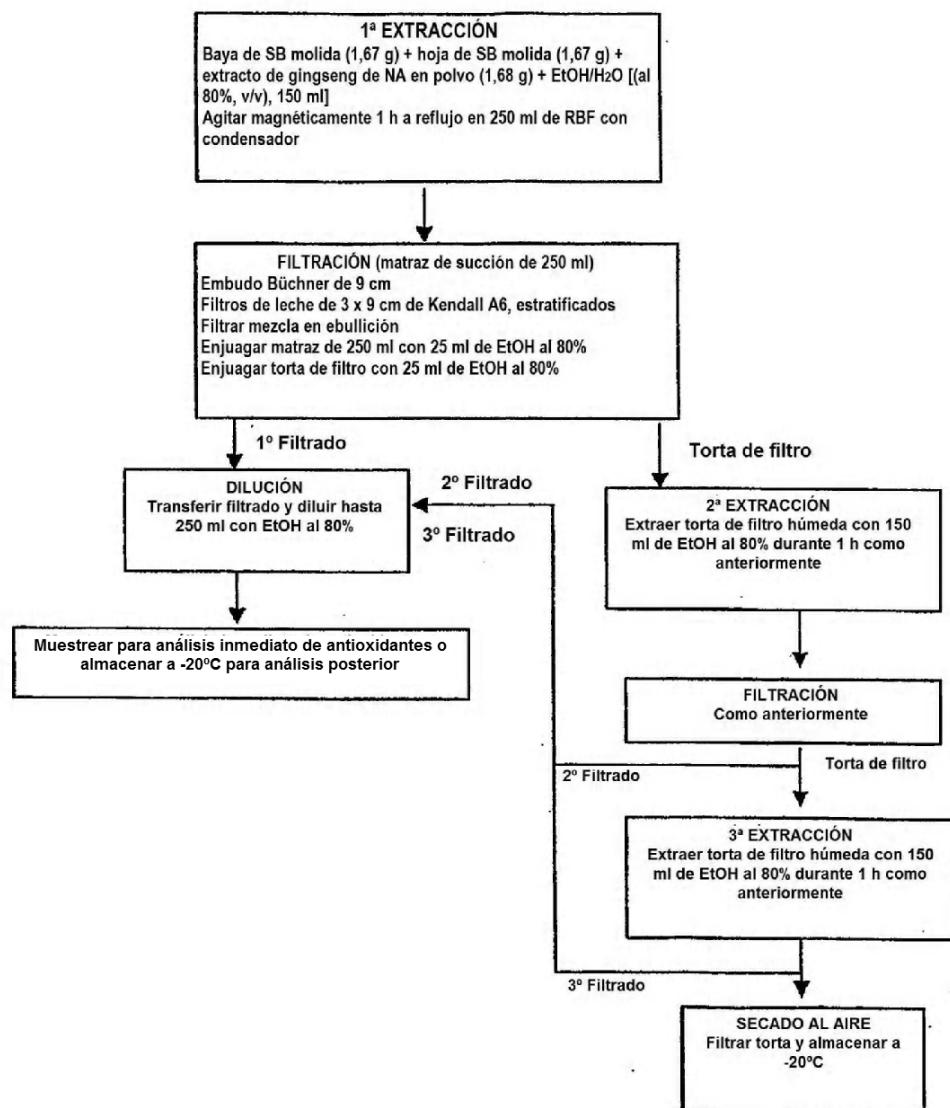
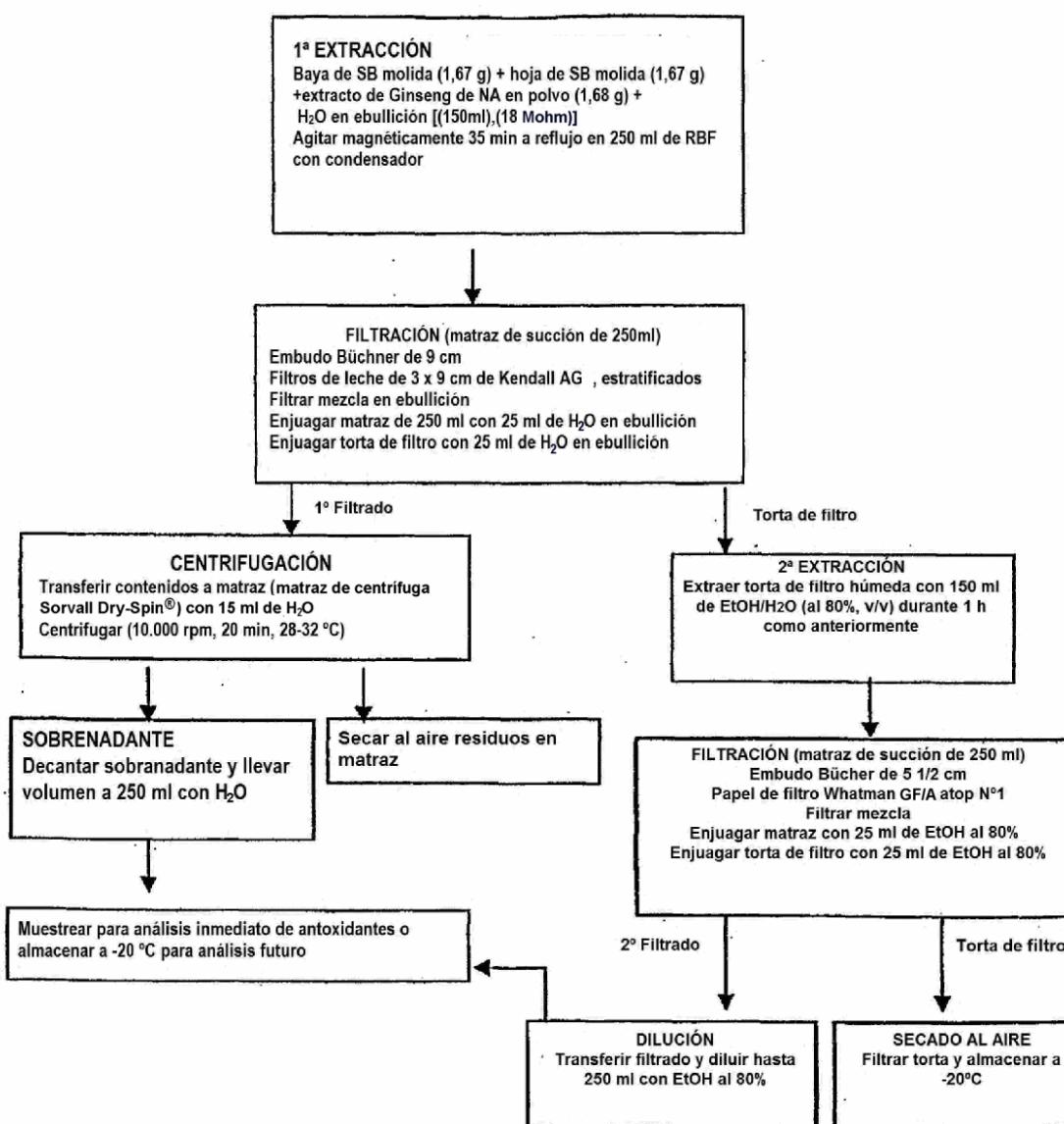


FIGURA 1G



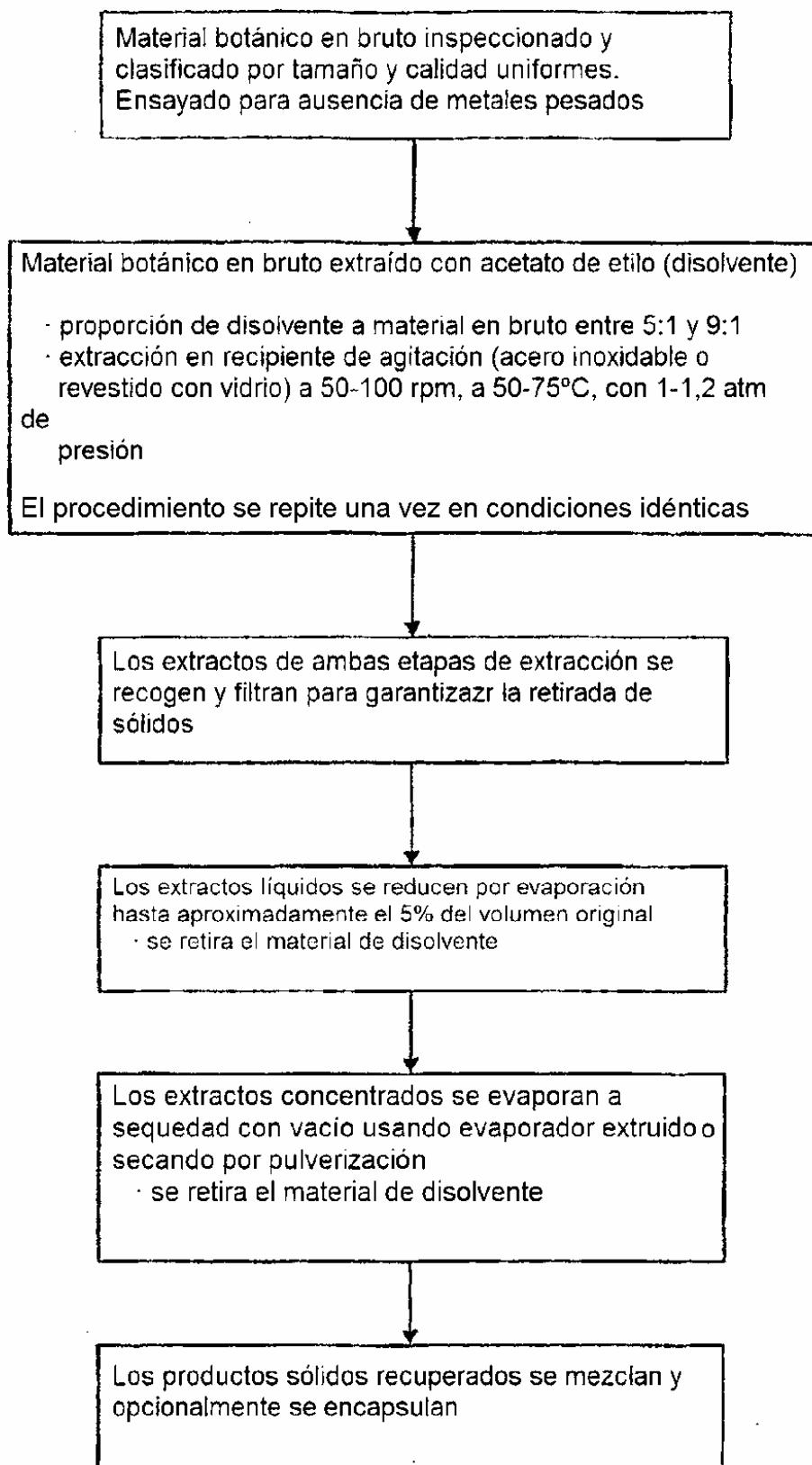


FIGURA 1H

**Valores de índices de combinación (IC) para ensayos de inhibición de la proliferación celular (SRB) sobre combinaciones de extractos (9+15) y fármacos occidentales meclados con sus valores de CI50**

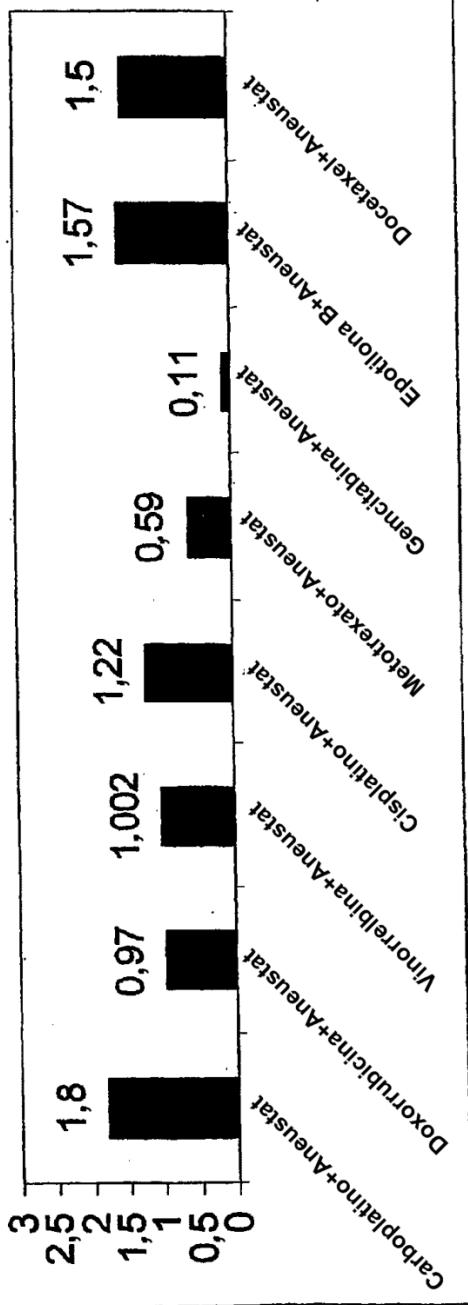


FIGURA 2

**Potencias antiproliferativas para diferentes extracciones  
de N°9 (línea celular A549)**

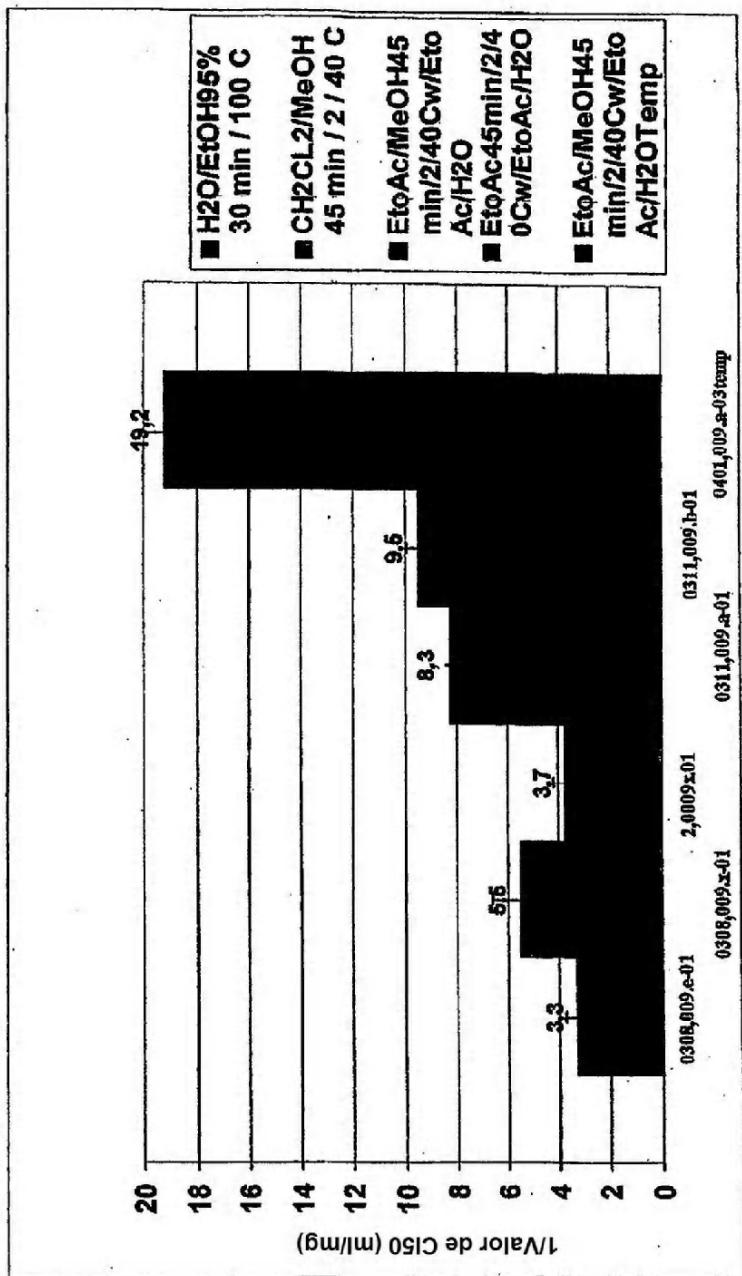
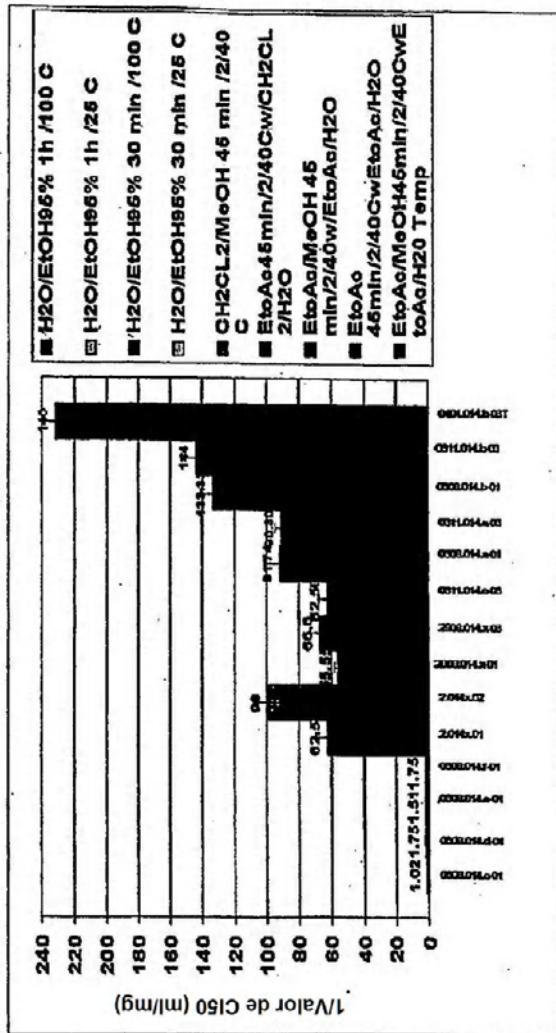


FIGURA 3A

## Potencias Antiproliferativas para diferentes extracciones de Nº 14 (línea celular A549)



**FIGURA 3B**

Potencias Antiproliferativas para diferentes extracciones de Nº  
15 (línea celular A549)

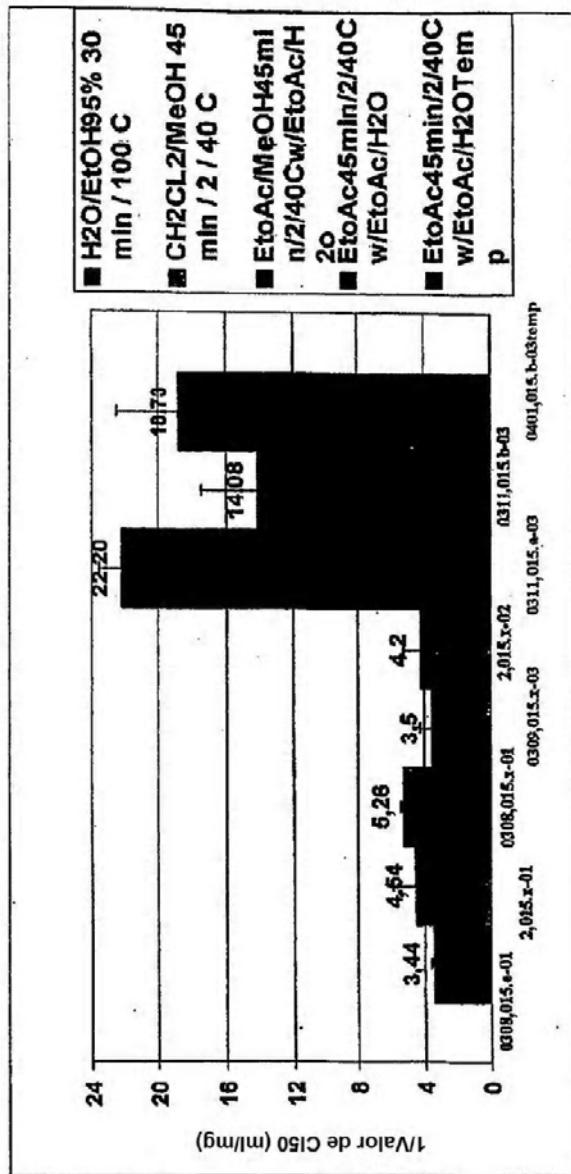


FIGURA 3C

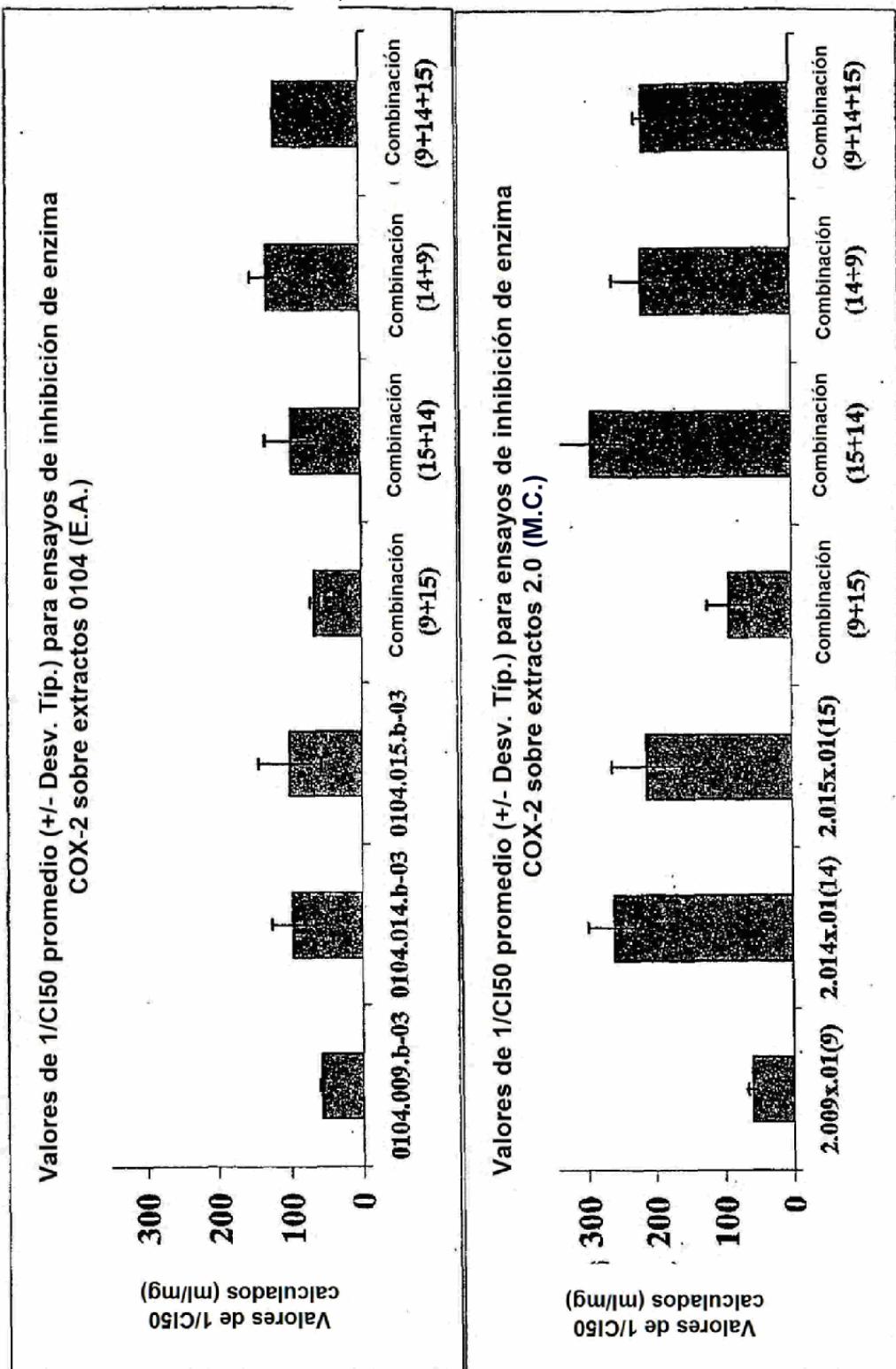


FIGURA 4

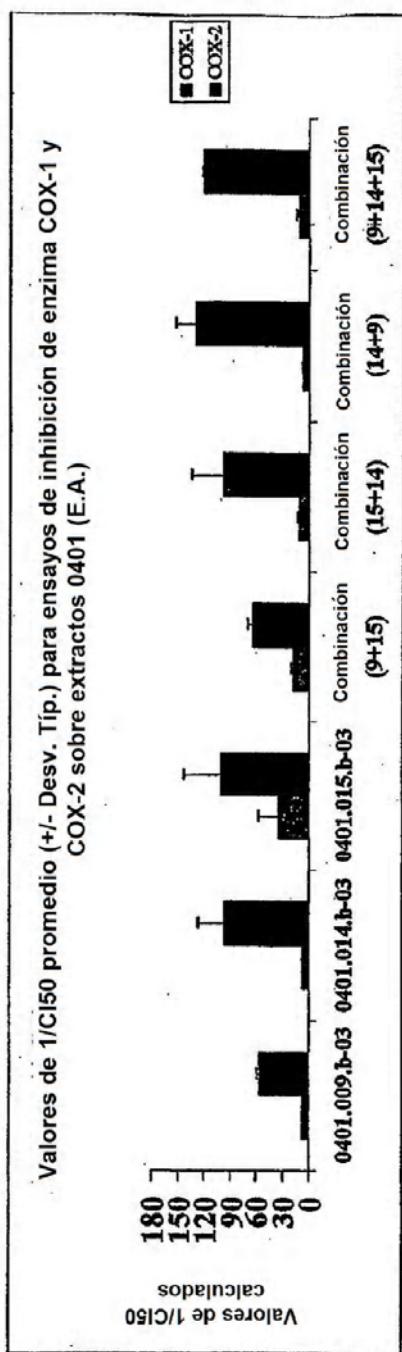


FIGURA 5

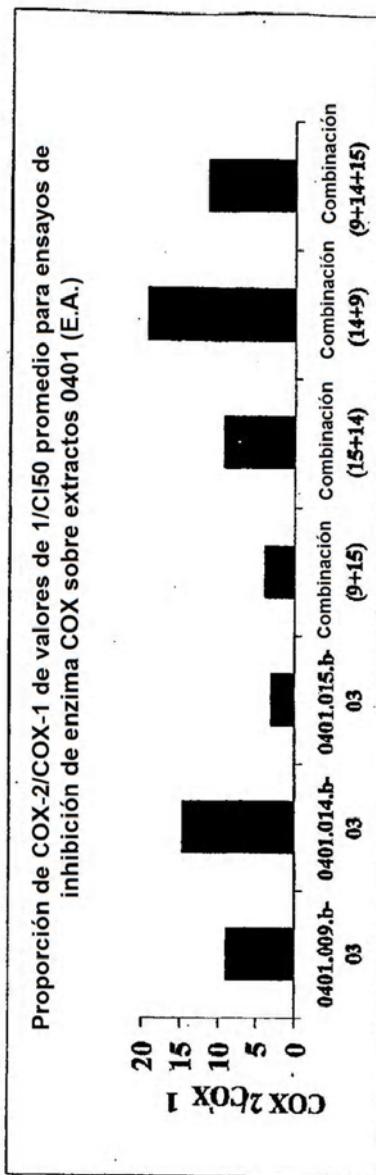


FIGURA 6

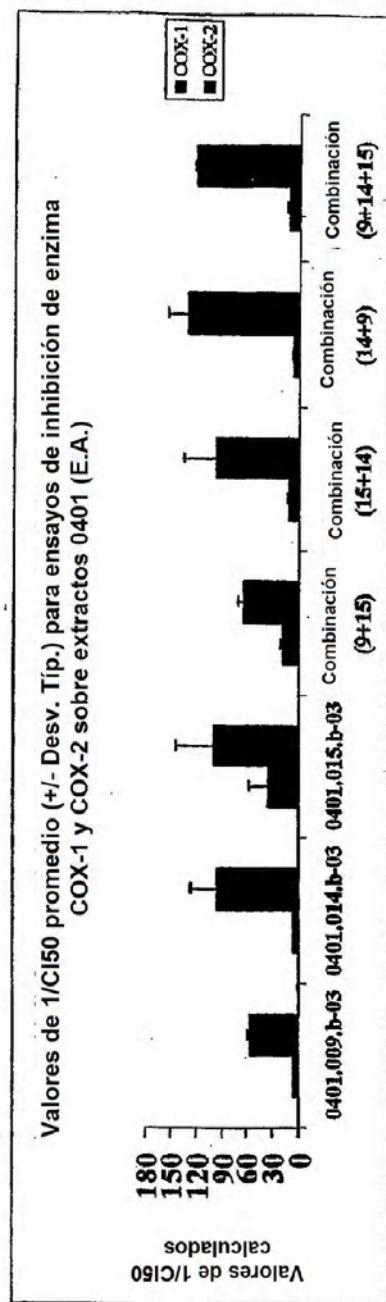


FIGURA 7

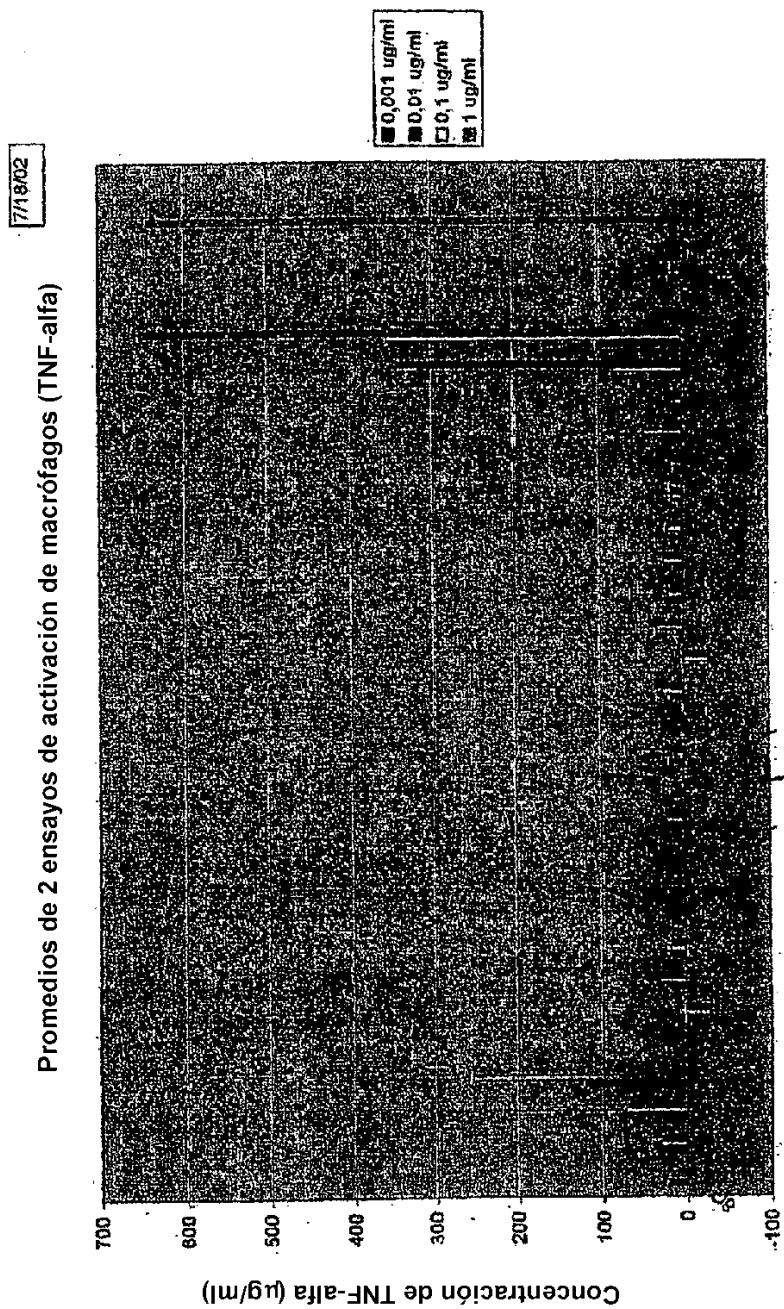


FIGURA 8

Resumen de ensayo de proliferación de linfocitos (3 experimentos)

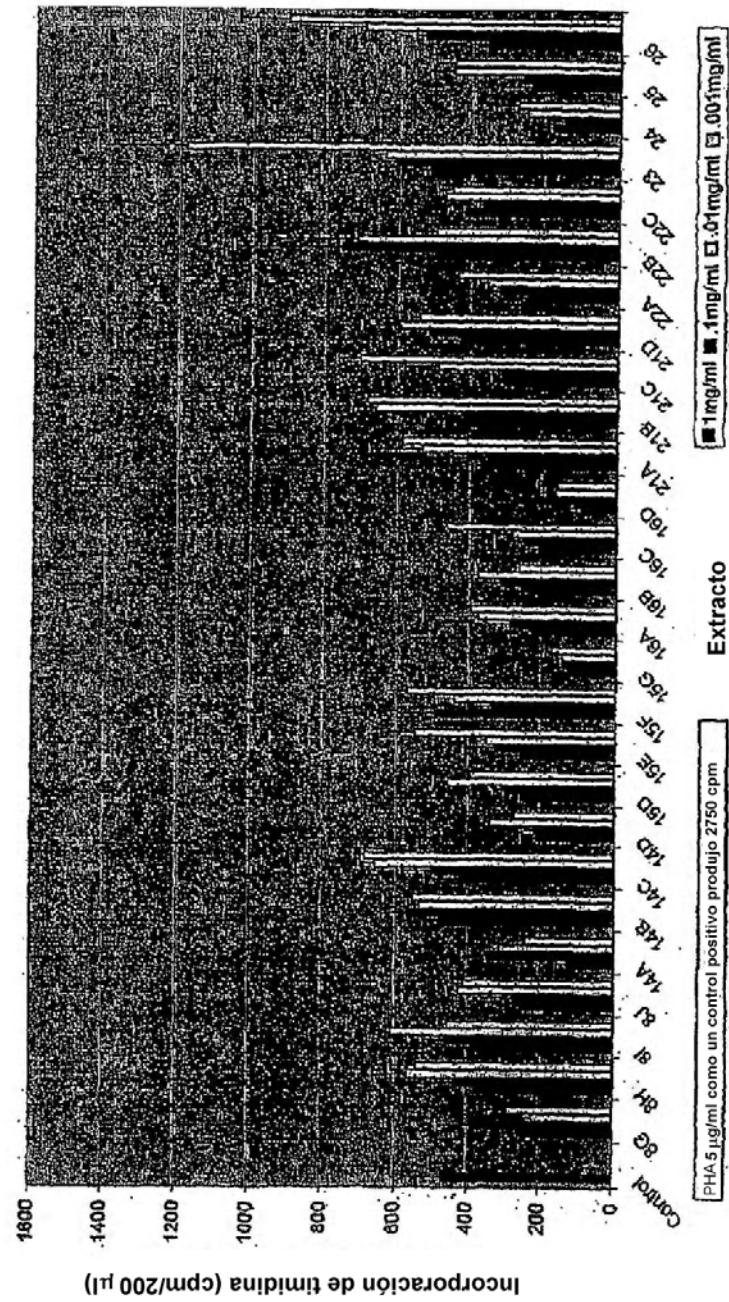


FIGURA 9

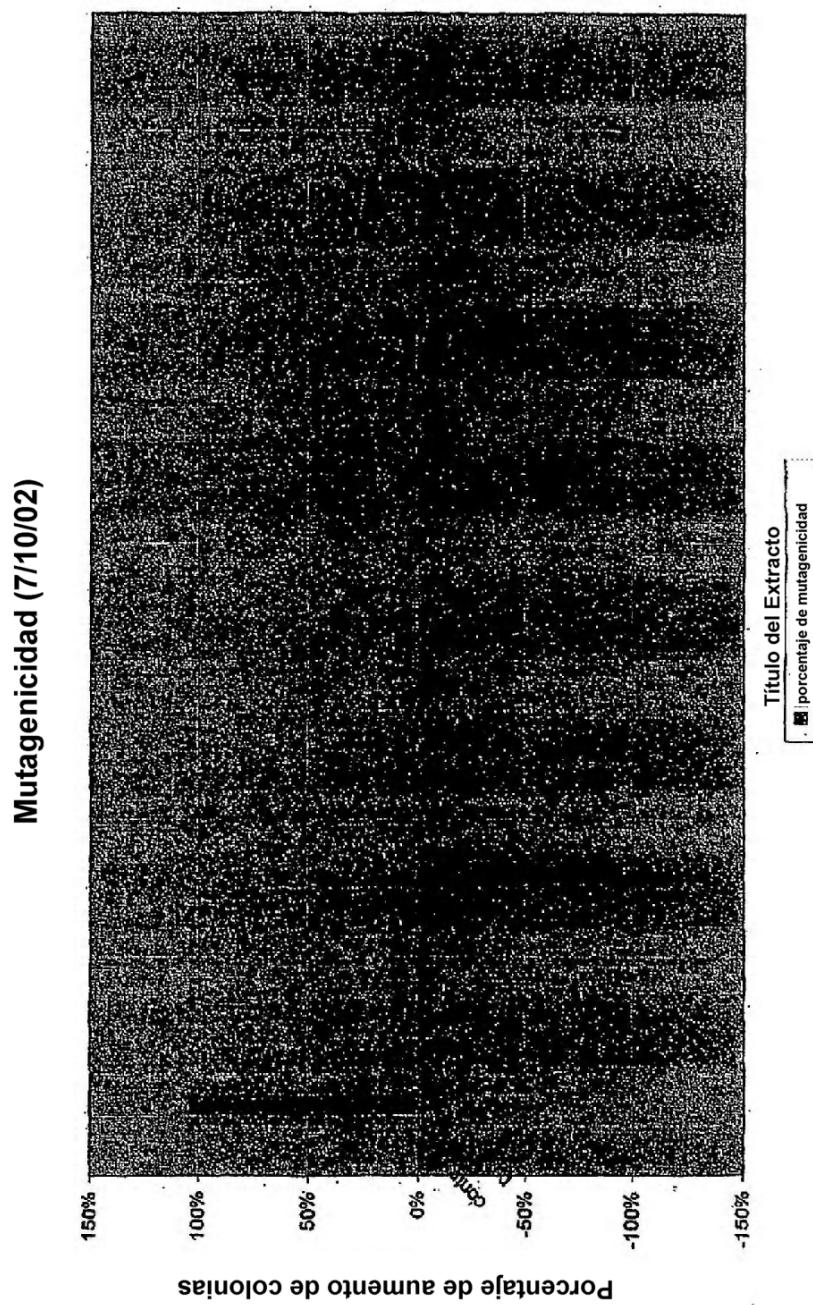


FIGURA 10

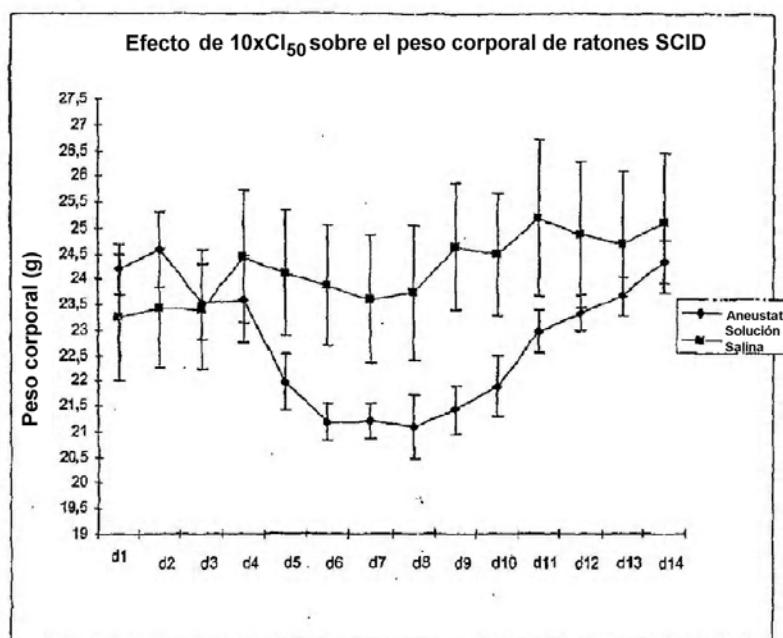


FIGURA 11

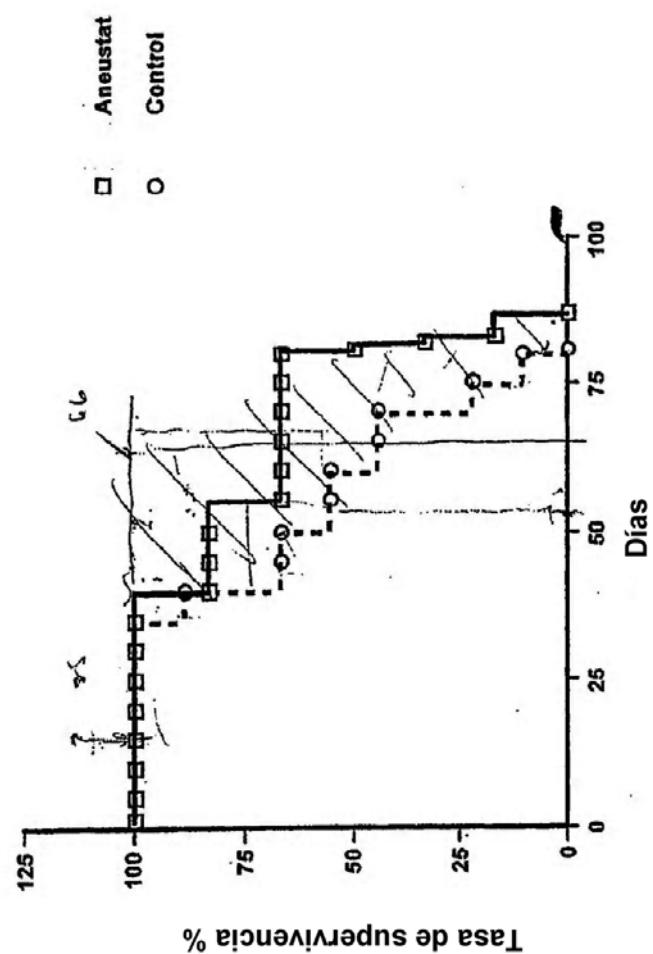


FIGURA 12

# ES 2 373 663 T3

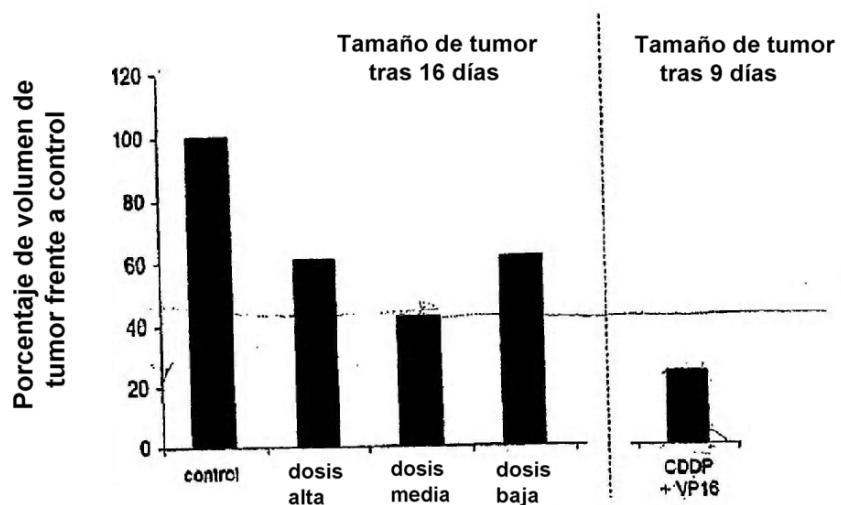


FIGURA 13

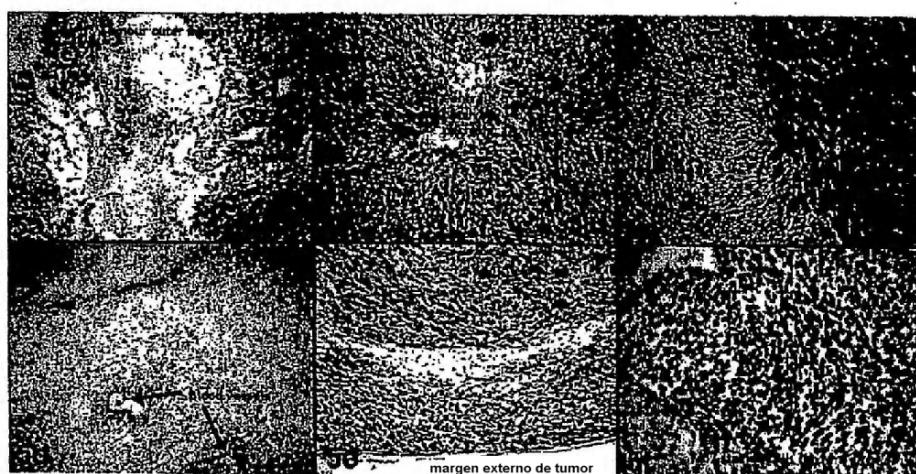


FIGURA 14

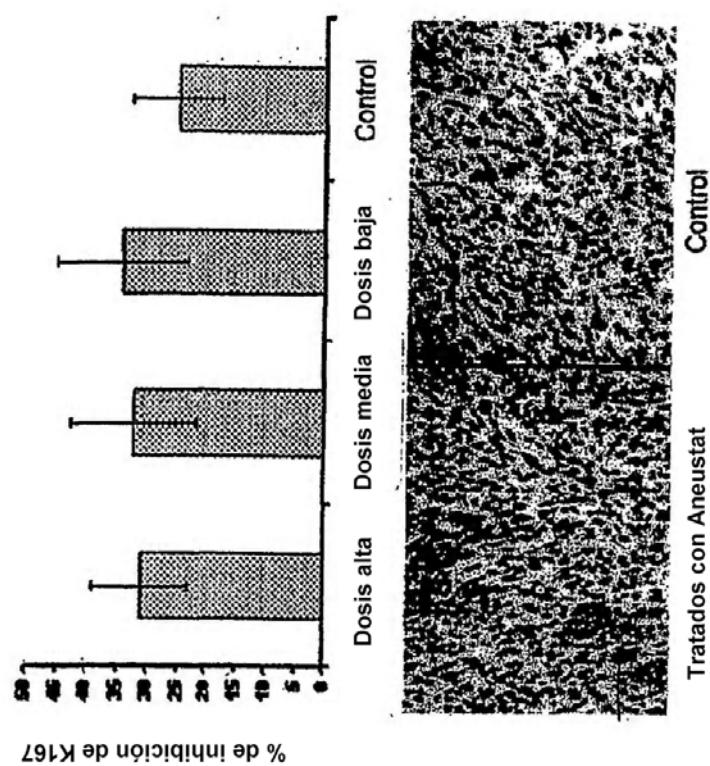
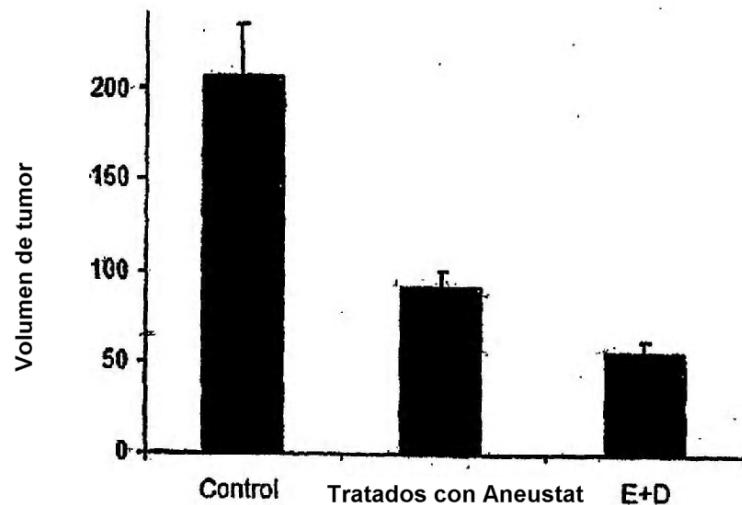


FIGURA 15

# ES 2 373 663 T3



Nota: E = fosfato sódico de estramustina  
D = Docetaxel

FIGURA 16

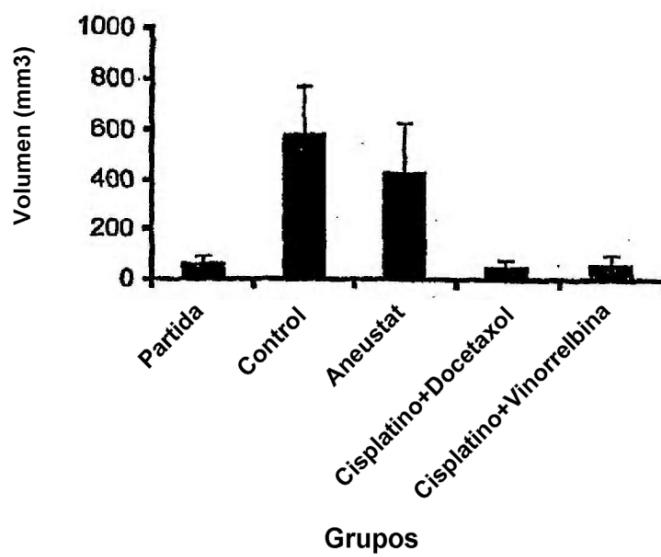
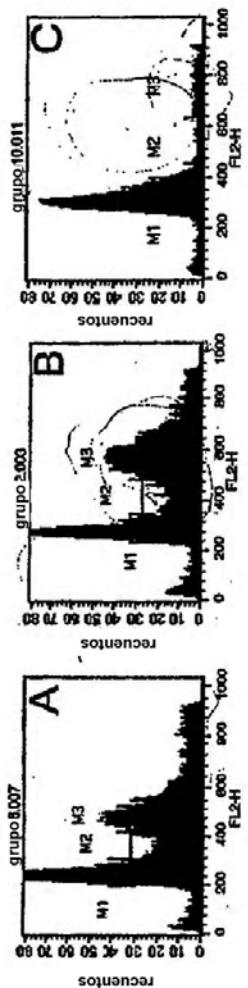


FIGURA 17

ES 2 373 663 T3



FIGURA 18



Control                          Aneustat                          Cisplatin+Docetaxol

FIGURA 19A

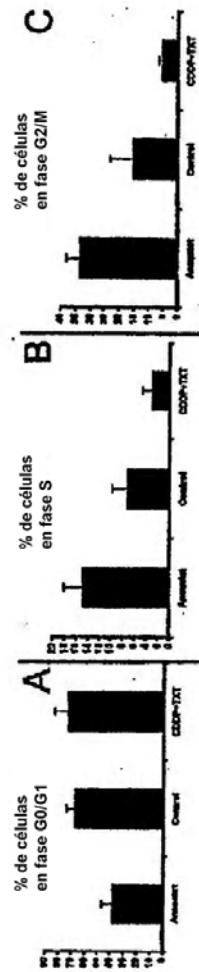


FIGURA 19B