

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580046187.8

[51] Int. Cl.

A61K 36/539 (2006.01)

A61K 36/725 (2006.01)

A61K 36/484 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 2 日

[11] 公开号 CN 101098705A

[22] 申请日 2005.11.9

[21] 申请号 200580046187.8

[30] 优先权

[32] 2004.11.9 [33] US [31] 60/625,943

[32] 2005.4.7 [33] US [31] 11/100,433

[86] 国际申请 PCT/US2005/040605 2005.11.9

[87] 国际公布 WO2006/053049 英 2006.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.9

[71] 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 Y-C·程 S-H·刘

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 张晓威

权利要求书 2 页 说明书 99 页 附图 38 页

[54] 发明名称

草药组合物 PHY906 及其在化学治疗中的应用

[57] 摘要

本发明提供了用于提高药物治疗指数的草药组合物，所述药物包括那些用于治疗疾病，尤其是治疗病毒感染和癌瘤的药物。本发明提供了用于改善正经历化学治疗的个体的生活质量的方法。此外，本发明通过向正经历这样的化学治疗的人给药所述草药组合物 PHY906，来提高化学治疗药物的治疗指数，以改善疾病治疗。

1. 一种组合物，其包含：
 - i) 药学可接受的载体；
 - ii) 草药制剂，其包含黄芩属(*Scutellaria*)、甘草属(*Glycyrrhiza*)、枣属(*Ziziphus*)和芍药属(*Paeonia*)；以及
 - iii) 化学治疗制剂，其包含一种或多种选自：多柔比星、沙立度胺、卡培他滨、吉西他滨和奥沙利铂的化学治疗化合物。
2. 权利要求 1 的组合物，其中所述化学治疗制剂还包含 5-FU 和 LV。
3. 权利要求 1 的组合物，其中所述草药制剂由黄芩(*Scutellaria baicalensis*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、枣(*Ziziphus jujuba*)和芍药(*Paeonia lactiflora*)组成。
4. 一种治疗有此需要的哺乳动物的方法，所述方法包括给药治疗有效量的权利要求 1 的组合物。
5. 一种减轻化学治疗化合物在哺乳动物中的副作用的方法，所述方法包括给药权利要求 1 的组合物。
6. 一种提高化学治疗化合物在哺乳动物中的抗肿瘤活性的方法，所述方法包括给药权利要求 1 的组合物。
7. 一种改善正经历化学治疗的哺乳动物的生活质量的方法，所述方法包括给药治疗有效量的权利要求 1 的组合物。
8. 一种抑制肿瘤生长的方法，所述方法包括给药权利要求 1 的组合物。
9. 一种提高一种或多种用于治疗癌症的癌症治疗化合物的治疗指数的方法，所述方法通过向有此需要的哺乳动物给药治疗有效量的组

合物来进行，所述组合物包含药学可接受的载体和下列各草药属的植物种：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属；其中所述一种或多种癌症治疗化合物选自：多柔比星、沙立度胺、卡培他滨、吉西他滨和奥沙利铂。

10. 一种治疗有此需要的哺乳动物中的疾病的方法，所述方法包括给药治疗有效量的一种或多种化学治疗化合物和一种组合物，所述组合物包含：

i) 药学可接受的载体；和

ii) 草药制剂，其包含黄芩属、甘草属、枣属和芍药属；

其中所述一种或多种化学治疗化合物选自：多柔比星、沙立度胺、卡培他滨、吉西他滨和奥沙利铂。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述组合物在给药所述一种或多种化学治疗化合物之前给药。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述组合物在给药所述一种或多种化学治疗化合物之后给药。

13. 权利要求 10 的方法，其中所述组合物与所述一种或多种化学治疗化合物同时给药。

草药组合物 PHY906 及其在化学治疗中的应用

相关申请

本申请要求 2005 年 4 月 7 日提交的美国申请 11/100,433 和 2004 年 11 月 9 日提交的美国临时申请 60/625,943 的利益，这些申请被全文引入本文作为参考。

本申请涉及 2002 年 12 月 30 日提交的美国申请 10/220,876，其为 2001 年 3 月 8 日提交的国际申请 PCT/US01/07353 的国家阶段，PCT/US01/07353 是 2000 年 3 月 9 日提交的现已放弃的美国申请 09/522,055 的部分继续申请，所有这些申请均被全文引入本文作为参考。

发明领域

本发明涉及用于提高药物治疗指数的草药组合物和草药提取物，所述药物包括那些用于治疗疾病，尤其是治疗病毒感染和癌瘤的药物。本发明的方法能用于改善正经历化学治疗的个体的生活质量。具体地，本发明涉及通过用草药组合物 PHY906 来提高化学治疗药物的治疗指数以治疗疾病。更具体地，本发明涉及通过用草药组合物 PHY906 提高癌症化学治疗药物的治疗指数以治疗癌症。

发明背景

本文中的所有公开和专利申请均被引入作为参考，就如同特别和分别指出的将各公开或专利申请引入作为参考的程度相同。

草药

亚洲和欧洲人已经使用草药达几百年。在美国(US)，草药在食物

增补剂工业以及全身治疗的药物中已变得有商业价值。大约三分之一的美国人口已经至少尝试过一次一些形式的替代药物(Eisenberg 等人, N. Engl. J. Med., 328: 246-252 (1993))。植物药也已成为鉴定治疗疾病的新型活性剂的焦点。来自植物提取物的活性化合物受到制药工业的持续关注。例如: 已经发现获自短叶紫杉树树皮的抗肿瘤药物紫杉醇可用于治疗乳腺癌(Gomez-Espuch 等人, Bone Marrow Transplant, 25(3): 231-235(2000))。

在全世界存在许多草药分支, 例如印度医药(Ayurveda medicine)、尤纳里医药(Unani medicine)、Sida 医药和中药(TCM)。尽管现代西药典型地由给药能够介入特定生化途径的单一化学实体组成, 但每种 TCM 处方均包含来自几种草药的数百种化学实体, 它们被设计为以协调的方式与体内的多种靶相互作用。虽然实践经验明显促成了草药组合物和这些古老的草药处方, 但是它们也不同程度地受到一套理论的支持, 这些理论在解剖学、药理学、病理学、诊断治疗等方面均不同于现代西医的理论。在不同的草药领域中, TCM 已经在数百年间发展出了一套更完整的理论, 该理论已经由当地医师进行了充分记录和实践, 治疗大中国和包括韩国与日本在内的东亚的庞大人口(>13 亿人)。

中药

西药通常使用天然或合成的纯化的化合物, 大部分定向于单一的生理学靶。然而, TCM 中所用的组合物通常由多种草药和化合物组成, 它们基于独特的和整体的概念定向于体内多种靶。TCM 主要以不同组合和制剂使用经加工的粗天然产物来处理不同的结构, 从而导致更少的副作用。TCM 的巨大潜力还未被世界上大多数人认识到。

植物提取物的混合物而非单一化合物正在世界范围内广泛用于治疗疾病, 并在西方国家获得的逐步提高认可(Okada, F., Lancet 348: 5-6(1996); Xiao PG, Xing ST 和 Wang LW, Journal of Ethnopharmacol 38: 167-175(1993))。中药的应用基于草药制剂中许多化学成分的相互作

用，这些成分同时并协同地作用于多种分子靶和细胞机制。这些成分具有不同的功能；一些成分或许是产生功效的原因，而其他成分可以降低毒性或增加生物利用度。中草药制剂可能是已知最好的植物药，源自历经千年的人类中的观察经验。在许多情况中，指定中药制剂主张的适应症是多种而非单一的。这并不令人意外，因为在一种制剂中许多植化成分可以对多个靶发挥作用。可能的是，一种中药制剂可以缓解一种以上与应用癌症化学治疗药物相关的副作用。

在典型的 TCM 处方中，草药被指定作为君药和包括臣药、佐药和使药在内的辅药(the secondary herb)。君药在治疗疾病病因或主要症状方面产生主导作用。臣药帮助增强君药的作用并在治疗附随的症状方面起主导作用。存在三种类型的佐药：1)那些提高君药和臣药的治疗作用或治疗第三位的症状的佐药；2)那些减少或消除君药和臣药的毒性和其他副作用的佐药；和 3)那些对不特异性地受君药影响的互补性靶组织起作用的佐药。使药将其他草药的作用引导至受侵袭的部位和/或协调并介导处方或制剂中其他草药的作用。与由单一植物的一个或多个部位组成的大多数草药或增补剂相反，TCM 的预期作用是指向多个组织。

例如：著名的 TCM 处方“麻黄汤”用于治疗哮喘，它由麻黄、桂枝、苦杏仁和甘草组成。作为君药的麻黄散寒、诱发发汗并促使肺气流动以缓解哮喘的主要症状。作为臣药的桂枝提高麻黄的诱发发汗作用并温筋以确保阳气流动，用于减轻头痛和全身痛。作为佐药的苦杏仁促进肺气的反向流动并增强麻黄缓解哮喘的作用。作为使药的甘草缓和麻黄与桂皮的作用以确保正气(vital Qi)的体内平衡。尽管四种草药中的每一种均明确显示出其相应的活性，但当组合起来时，它们彼此互补和补充。在实践中，可以将君药与一种或多种辅药一起开据处方，这取决于患者描述的症状(Prescriptions of Traditional Chinese medicine, Chapter One, pp10-16, E. Zhang, 首席编辑, Publishing House, Shanghai University of Traditional Chinese medicine, 1998)。

气指身体内的总能量。草药用于实现气的最佳平衡；认为这种平衡本身在患者的总体健康与活力中显示(K. C. Huang, *The Pharmacology of Chinese Herbs*, 第二版, Page 2, 1999, CRC Press)。

指导用草药和其他方式如针灸治疗疾病的 TCM 的主要理论是：1) 阴阳学说；2)五行学说；3)脏腑学说；4)气、血和津液学说；以及 5)经络学说。

在 TCM 中，得出恰当诊断的首位重要方面是确定疾病属阴还是属阳，中国人认为这两种力量控制着宇宙的运转。阴代表自然的阴性面，包括暗、静、深、寒和湿；而阳代表阳性成分，包括光、活力、高、热和干(K. C. Huang, *The Pharmacology of Chinese Herbs*, 第二版, P2, 1999, CRC Press)。通常将阴解释为负面力量，而阳代表正面力量。这两种力量互补，缺一不可。因此，TCM 试图实现阴与阳之间的平衡。

在基于阴阳哲学对患者的诊断中，那些患有发热、口干、便秘或具有疾脉脉象(rapid pulse condition)的患者具有阳性特征。具有恶寒、不口干且腹泻并表现出迟脉脉象的个体具有阴性特征。还可根据阴阳学说将草药的性、味和功能分类。例加：寒性与凉性的草药属阴，而温性与热性的草药属阳。具有酸、苦和咸味的草药属阴，而具有辛、甜和淡(bland)味的草药属阳。具有收敛和沉降(subsiding)功能的草药属阴，而具有发散、上行和上浮(floating)功能的草药属阳。在 TCM 中，治疗机理基于阴和阳的盛或虚。根据草药的阴阳特性及其使阴阳失衡复原的功能开据处方。在这样做的过程中获得治疗益处。

根据五行学说，由五种基本物质(即：木、火、土、金和水)组成物质世界。在 TCM 中，已将该理论用于解释人体生理学和病理学并用于指导临床诊断和治疗。中医大夫(herbal physician)已应用五行相生、相克、相乘和相侮的法则作出了许多有效且特效的治疗方案，例如培土生金(增强脾的功能以益于肺)、滋水涵木(滋养肾精以益于肝)、扶土克木(补充脾的功能以治疗肝机能亢进)和强水控火(补充肾精以治疗心脏机能亢进)。特别地，为了指导开据 TCM 处方，五行的每一种赋予了一

些草药特性。

在 TCM 中，将人体的内脏器官分成三组：五脏(心、肝、脾、肺和肾)；六腑(胆囊、胃、大肠、小肠、膀胱和三焦)；特别器官(脑、骨髓、骨、血管、胆囊和子宫)。在 TCM 中，脏或腑不仅是解剖学单位，而且是涉及不同器官间相互作用的生理学和病理学的概念。例如：心脏也涉及一些精神功能并影响血液、毛发、舌和皮肤的功能。阴阳五行影响这些内部器官、脏、腑和特别器官间的相互作用。理论的相互影响的复杂性被用于解释开据草药处方的疾病病理学，如下所述。

在 TCM 中，草药处方从诊断开始，所述诊断由四个主要项目组成：问诊、望诊、听诊和闻诊、脉诊和叩诊。在问诊阶段，收集大量信息，包括主要症状的特征。例如：如果主要症状的特征在于上腹部中有可以通过温暖和压迫来减轻的钝痛，则这提示脾阳不足。腰膝酸软、畏寒肢冷显示肾阳虚。在望诊阶段，观察活力、皮肤颜色、以及一般表象和舌的情况。例如：面无血色在体内对应秋肺，其气燥。在缺乏阳气和气血循环受阻或经络寒导致它们收缩时，可能发生这种情况。

在 TCM 中，正是由气、血和津液带来了五脏六腑、经络、组织和其他用于执行它们的生理功能的器官所需的能量；而气、血和津液的形成与代谢又依赖于这些器官。TCM 的处方考虑草药对气和血的作用来用于治疗。

TCM 认为经络及其分支部分遍布全身。认为草药正是通过它们发挥对病理学靶的影响并实现疾病改善。例如：麻黄对肺经和膀胱经起作用以诱发发汗，从而缓解哮喘和促进利尿。如上所述，针灸的临床应用也受经络学说的指导。

总之，尽管可以将 TCM 中各草药的性质和特性归于五行之一和阴或阳，但是它们通过经络起作用并通过气、血和津液介导，以在靶如脏腑上获得治疗作用。致病因素可以通过非常相同的经络系统伪装诱骗，以损害脏腑功能并由此导致疾病。

草药组合物在美国的专利情况

已经授权关于草药组合物的美国专利，用于治疗折磨哺乳动物，包括人类的多种疾病和其他涉及健康的问题。例如：已经发现包括牡丹(*Paeonia suffuticosa*)的草药组合物用于治疗病毒感染，包括疱疹病毒和脊髓灰质炎病毒的感染(美国专利 5,411,733)。

可用包含植物生物碱汉防己甲素的药物组合物治疗眼部炎症(美国专利 5,627,195)。美国专利 5,683,697 公开了具有抗炎、抗发热、祛痰或止咳作用的药物组合物，其中所述组合物包括来自楝属(*Melia*)、*Angepica*、石斛属(*Dendrobium*)、凤仙花属(*Impatiens*)、柑桔属(*Citrus*)、桑寄生属(*Loranthus*)、青葙属(*Celosia*)、白前属(*Cynanchum*)和珊瑚菜属(*Glehnia*)的植物部位。已经发现，包括山姜属(*Alphinia*)、菝葜属(*Smilax*)、青牛胆属(*Tinospora*)、蒺藜属(*Tribulus*)、睡茄属(*Withania*)和姜属(*Zingiber*)的根、根茎和/或植物(vegetation)的提取物的草药制剂可减轻或缓解与风湿性关节炎、骨关节炎和反应性关节炎相关的症状，可以减少致炎细胞因子的产生(美国专利 5,683,698)。已经证实包含滑石、蚕粪便和十二种不同草药成分的组合可有效减轻哺乳动物的炎症、疼痛和发热(美国专利 5,908,628)。

还授权了用于治疗癌症及癌症相关的健康问题的草药组合物的专利。例如：美国专利 5,437,866 公开了包含草药混合物的组合物，所述草药包括半枝莲(*Scutellaria barbata*)种及其提取物，所述组合物用于改善人类中的恶性病的影响。美国专利 5,665,393 公开了包括洋甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)和黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)、碎米桠(*Rabdosia rubescens*)和锯齿棕(*Serenoa repens*)的多种草药组合物用于治疗前列腺癌。此外，抗肿瘤草药组合物包括黄芪属的根(*Astragali radix*)、芍药属的根(*Paeonia radix*)、樟属的树皮(*Cinnamomi cortex*)、*Rhemannia*的根和甘草属的根(*Glycyrrhizae radix*)，用于提高丝裂霉素 D 和多柔比星的抗肿瘤活性(美国专利 4,613,591 和美国专利 4,618,495)。

癌症和癌症化学治疗的不良作用

在美国，癌症仍是死亡的第二大原因。人们对用于治疗胃肠癌，包括结肠直肠癌、肝癌和胰腺癌的方法感兴趣，不是因为它们的更高的发病率，而是因为它们的高死亡率，尤其是胰腺癌和肝癌患者 (Bergsland 等人 *Current Opinion in Oncology*, 12: 357-361 (2000); Fernandez-等人 *Curr Opin Gastroenterol*, 18: 563-567 (2002); Jemal 等人 *Cancer J Clin*, 52: 23-47 (2002); Skolnick 等人, *The Journal of the American Medical Association*, 276: 1457-1458 (1996))。从 1992-1999 年，研究显示结肠直肠癌的五年相对存活率为 62.3%，而肝癌为 6.9%，胰腺癌为 4.4%。肝癌的中位生存期为 3.5 周至 6 个月，而胰腺癌为 4 至 6 个月(Jemal 等人 *Cancer J Clin*, 52: 23-47 (2002))。由于仅有非常差的化学治疗方案，胰腺癌在美国的所有癌症中死亡率最高，自诊断后 5 年的存活率小于 5%(Jemal 等人 *Cancer J Clin*, 52: 23-47(2002))。尽管目前在临床试验中使用几种方案治疗肝细胞癌，但没有可利用的经 FDA 批准的化学治疗药物。胰腺癌和肝细胞癌两者的低存活率是因为诊断困难、肿瘤生长非常旺盛、手术切除肿瘤的可能性低以及肿瘤具有高比率的化学治疗耐受性。

吉西他滨是唯一的临床批准用于胰腺癌的化学治疗药物；但是，患者对吉西他滨的响应率仅为 6-11%，总体存活时间通常为 4-6 个月。吉西他滨是核苷类似物，具有两种作用机理，包括抑制核苷酸还原酶，该酶能将核苷酸二磷酸转化为脱氧核苷酸三磷酸，后者是 DNA 合成所需的并在 DNA 合成中作为欺骗性底物与脱氧胞苷三磷酸竞争 (Jemal 等人, *CA Cancer J Clin*, 52: 23-47, 2002; Abbruzzese 等人, *Cancer Supplement*, 95: 941-945, 2002; Hertel 等人, *Cancer Res.*, 50: 4417-4422, 1990; Pettersson 等人, *Pancreas*, 23: 273-279, 2001; Philip 等人, *Cancer Supplement*, 95: 908-911, 2002; Schultz 等人, *Oncology Research*, 5: 223-228, 1993; Von Hoff 等人, *Current Opinion in Oncology*, 14: 621-627,

2002)。由于吉西他滨单一治疗的低响应率和存活率，临床已测试了几种吉西他滨组合药物方案，用于改善治疗功效。这些试验包括吉西他滨与其他通用和 FDA 批准的抗癌药，包括 CPT-11、卡培他滨和奥沙利铂(Bruns 等人, *Clinical Cancer Research*, 6: 1936-1948, 2000; Jacobs 等人, *Cancer Supplement*, 95: 923-927, 2002; McGinn 等人, *Cancer Supplement*, 95: 933-940, 2002; Oettle 等人, *Cancer Supplement*, 95: 912-922, 2002)。不幸的是，没有发现满意的组合药物方案，仍然迫切需要用于胰腺癌的有效方案。

目前通过手术操作和化学治疗来治疗肝细胞癌。对于一些患者，手术切除和术后治疗可改善外观。不幸的是，绝大多数肝细胞癌患者会患有不能切除的癌症。尽管目前正在临床试验中使用几种方案治疗肝细胞癌，但没有可用的经 FDA 批准的化学治疗药物。在历史上，全身化学治疗具有很少价值或没有价值，尽管已经证实 5-氟尿嘧啶(5-FU)和多柔比星(ADM)的响应率为从 10 至 20%(Suart 等人, *Am. J. Clin. Oncol.*, 19: 136-139, 1996)。卡培他滨(Xeloda®)被合理地设计成作为口服前药从胃肠道有效吸收，并优先在瘤组织中转化为 5-FU。目前，卡培他滨被批准作为用于结肠直肠癌和乳腺癌的一线治疗，具有减少的毒性(Berg 等人, *Semin.Oncol.*, 25: 53-59, 1998; Schwetz 等人, *JAMA*, 286: 2085, 2001)。卡培他滨是潜在的令人兴奋的新的治疗药物。尽管在肝癌中与 5-FU 或 ADM 享有相似的临床响应(13%)，但卡培他滨具有明显的优点，例如是具有相对低毒性的口服给药药物，这将改善肝细胞癌患者的生活质量(Aguayo 等人, *Seminars In Oncology*, 28: 503-513, 2001; Leung 等人, *Seminars In Oncology*, 28: 514-520, 2001; Lozano *et al*, *Oral Capecitabine (Xeloda) for the Treatment of Hepatobiliary Cancers (Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocarcinoma, and Gallbladder Cancer)*. 19. 2000. *Proceedings of ASCO*)。

在美国，已报道结肠直肠癌是第三常见的癌症死亡原因(ACS *Cancer Facts and Figures*. American Cancer Society, 2004)。最近，FDA 批

准使用奥沙利铂/5-FU/LV 的三联组合作为晚期结肠直肠癌患者的一线治疗。奥沙利铂是合成的二氨基环己烷铂化合物，其类似于顺铂，能引起铂-DNA 加合物的形成并破坏 DNA 的完整性(Eric Raymond 等人, *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 227-235, 2002)。其他类型的化学治疗药物如 5-FU、CPT-11 是结肠直肠癌治疗中常用的化学治疗药物。不幸的是，在用化学疗法治疗的患者中，已确定严重腹泻是限制剂量的毒性之一。

在过去几十年中，医学肿瘤学对改变药物实践具有巨大影响，因为已经确定了用于各种前述致命恶性病的药物根治疗法。然而，与抗肿瘤药物相比，常用的少数几类药物具有更窄的治疗指数，且引起不良副作用的可能性更大(Calabresi 和 Chabner, 1996)。

像仅具有中等选择性的许多其他有效药物一样，抗癌药可以产生严重的毒性。与癌症化学治疗的相关的常见不良作用包括但不限于：胃肠道并发症(例如腹泻、恶心、呕吐、厌食和粘膜炎)、疼痛、食欲缺乏、骨髓/血液并发症(例如白细胞减少、中性白细胞减少、贫血、出血、血小板减少)、疲劳和睡眠障碍。

本发明的发明人对已用于治疗与癌症化学治疗相关的症状的中药制剂进行了文献检索。据报道，包含七种草药的植物制剂 TJ-14 有效预防癌症患者中由 CPT-11 引起的腹泻(Kase, Y, Hayakawa T 和 Aburada M. 等人, *Jpn. J. Pharmacol.* 75, 407-413 (1997); Marita M., Nagai E 和 Hagiwara H. 等人, *Xenobiotica*. 23, 5-10 (1993))。推测腹泻是因 SN-38 的蓄积而发生，SN-38 是由肠微生物产生的 CPT-11 的活性代谢物。本发明人认为， β -葡糖醛酸糖苷酶抑制剂贝加灵是 TJ-14 中的活性成分，其缓解由 CPT-11 引起的腹泻(Kase, Y, Hayakawa T 和 Aburada M. 等人, *Jpn. J. Pharmacol.* 75, 407-413 (1997); Marita M., Nagai E 和 Hagiwara H. 等人, *Xenobiotica*. 23, 5-10 (1993); Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, 等人, *Cancer Chemother Pharmacol.* 42: 280-286 (1998); Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, Kato M, 等人, *Cancer Res.* 56: 3752-3757 (1996))。因

此，评价了包含黄芩(*Scuellaria baicalensis Georgi*)根的几种中草药制剂，其富含在贝加灵中。在实验室检验的几种制剂中，本发明人选择了 PHY906。在 1500 多年前就已确定，这种特定制剂可用于治疗腹泻、腹部痉挛、发热、头痛、呕吐、恶心、剧渴和下贲门扩张(subcardial distentio)(Shang Han Lun of the Han Dynasty; Hong-Yen Hsu 和 Chau-Shin Hsu, Commonly used Chinese Herb Formulas with Illustrations, Oriental Healing Art Institute, California, (1980))。PHY906 由一定比例的四种草药黄芩(*Scutellariae baicalensis Georgi*)(scute)、芍药(*Paeonia lactiflora pall*)(白芍根)、甘草(*Glycyrrhizae uralensis Fisch*)(甘草)和大枣(*Fructus ziziphi*)(海枣)的果实组成，其混合比例分别为 1.5:1.0:1.0:1.0 (干重)。应注意各草药具有不同的药理学特征(profile)，其包括抗癌和抗病毒活性、血液学和免疫学刺激、止痛活性、血管舒张、保肝、抗氧化及改善食欲，如表 1 所示。

表 1.PHY906 制剂中各草药的推定生物活性

	抗癌	免疫调节	抗菌	消炎	神经系统	其他
黄芩	+	+	+	+	-	抗病毒、抗菌、止泻、利尿、血管舒张、↓脂、抗凝、抗氧化、止吐、保肝
芍药	+	↑↓淋巴细胞与巨噬细胞活性 双功能	+	+	+	血管舒张、保肝、利尿、抗凝、↓肠运动
大枣	+	↑↓巨噬细胞活性 双功能调节剂	-	-	+	保肝、肌耐力、改善食欲
甘草	+	抗 IgE 作用	+	+	↑睡眠	抗利尿
		↑巨噬细胞活性			止痛	↓肠运动
		↑干扰素↑IL-1				↓脂(LDL、TC)
		↑淋巴细胞				抗氧化
		↑干扰素和↑IL-2				抗病毒
		↑NK 活性				抗凝
		↓ IgE				抗补体
↑: 增加 ↓: 下降 ↑↓: 下降或增加 +: 有效 -: 无效						

到目前为止, 仅将 PHY906 作为单一药物而非与合成药物组合开据处方。然而, 可以理解, 文献记载的 PHY906 应用之一实际上可用于缓解因化学治疗诱发的副作用。尽管已经验明了 PHY906 的四种草药中每一种的一些主要化学成分, 并且已经检验了它们的药理学活性 (Chinese Botany Shanghai Science and Technology Publishing Company (1999); Huang, H-C, Wang, H-R 和 Hsieh, L-M., Eur J of Pharmacol 251: 91-93 (1994); Lin, C-C 和 Shieh, Am J Chinese Med 1: 31-36 (1996); Tang, W. 和 Eisenbrand, G., Chinese Drugs of Plant Origin : Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine pp. 919-929. Springer-Verlag Press, New York, (1992)), 但不可能通过所验明的成分完全预计 PHY906 的生物学特性。

发明概述

本发明人已经意外地发现, 草药组合物 PHY906 能被用于各种方法, 来提高一种或多种化学治疗化合物的治疗指数和调节造血活性。当化学治疗药物与 PHY906 一起给药时, 本文公开的方法通过提高所述化学治疗药物的功效并降低所述药物的毒性, 能够用于改善化学治疗的患者的生活质量。

本发明提供了草药组合物 PHY906, 其与药学可接受的载体组合并任选地包含一种或多种化学治疗化合物或抗病毒剂。选择用于制备特定 PHY906 制剂的四种植物种各自选自下列四种不同属(group)的草药之一: 黄芩属(Scutellaria)、甘草(Licorice)、白芍药(Peony Alba)和枣属果实(Ziziphi Fruit)。选择草药以获得 PHY906 的一种或多种所需属性, 其中这样的属性包括但不限于: 提高一种或多种化学治疗化合物的治疗指数、增强一种或多种化学治疗化合物的抗肿瘤活性或增强一种或多种抗病毒剂的抗病毒活性、调节造血活性、调节血液学和免疫学活性及改善正经历化学治疗或抗病毒治疗的哺乳动物的生活质量。

本发明包括的化学治疗化合物或化学治疗药物包括但不限于用于

治疗癌症、寄生虫感染和微生物感染的化学治疗化合物或化学治疗药物。

本发明包括的抗病毒化合物或抗病毒剂包括用于治疗病毒感染、疾病或病症的化合物或抗病毒剂。

本发明的组合物和方法用于治疗任何哺乳动物。更具体地，本发明的方法用于治疗人类。

本发明还提供了组合物，其包含药学可接受的载体；来自下列各草药属的植物种的材料或化学品：黄芩属(*Scutellaria*)、甘草属(*Glycyrrhiza*)、枣属(*Ziziphus*)和芍药属(*Paeonia*)；以及一种或多种化学治疗化合物。优选地，所述组合物包含：药学可接受的载体；草药制剂，其包含黄芩属、甘草属、枣属和芍药属；以及化学治疗制剂，其包含一种或多种化学治疗药物或抗病毒剂。更优选地，所述草药制剂包含来自黄芩属、甘草属、枣属和芍药属的材料或化学品。最优选地，本发明提供了包括黄芩(*Scutellaria baicalensis*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、枣(*Ziziphus jujuba*)和芍药(*Paeonia lactiflora*)的这样的组合物。

本发明的草药组合物特别用于癌症化学治疗，例如但不限于使用伊立替康(CPT-11, Camptosar®)、5-氟尿嘧啶(FU 或 5-FU)、亚叶酸(LV)、VP-16、 β -L-二氧戊环胞苷(L-OddC)、卡培他滨、吉西他滨、奥沙利铂、多柔比星、沙立度胺及其组合进行治疗，所述组合例如但不限于 FU/LV、CPT-11/FU/LV、奥沙利铂/FU/LV 以及吉西他滨/奥沙利铂。本发明提供了包括 PHY906 和一种或多种化学治疗药物的组合物，所述化学治疗药物例如但不限于 CPT-11、5-FU、VP-16、L-OddC、卡培他滨、吉西他滨、奥沙利铂及其组合，所述组合例如但不限于 FU/LV、CPT-11/FU/LV 和奥沙利铂/FU/LV。本发明还提供了组合物，其包含 PHY906 和化学治疗药物的一种或多种类似物和衍生物，所述化学治疗药物例如 CPT-11、5-FU、VP-16、L-OddC、LV、卡培他滨、吉西他滨、多柔比星、沙立度胺和奥沙利铂。

本发明的草药组合物特别用于抗病毒治疗。优选地，将所述草药组合物与用于治疗 AIDS 的抗病毒剂一起给药。更优选地，将所述草药组合物与选自 AZT、D4T 和 DDI、3TC、ddC 和 FTG 的抗病毒剂一起给药。

本发明提供了提高用于治疗癌症的癌症治疗化合物的治疗指数的方法。本发明还提供了提高用于抗病毒疾病治疗的抗病毒剂的治疗指数的方法。更具体地，本发明提供了如下方法，该方法包括联合给药一种或多种抗癌或抗病毒剂和治疗有效量的组合物，所述组合物包含药学可接受的载体和来自下列各草药属的植物种的材料或化学品或包含下列各草药属的植物种的草药制剂：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属。本发明的方法提供了来自这样的草药的材料或化学品的用途，或包含这样的草药的草药制剂的用途，其中所述材料或化学品或草药制剂为出自水溶液的粒状提取物，所述水溶液包括但不限于水和醇。这样的组合物可为可摄取的形式，例如但不限于：散剂、胶囊、液体和片剂。或者，本发明的方法使用栓剂形式的这样的组合物。

本发明还提供了治疗需要这样的治疗的哺乳动物中的疾病的方法，其包括给药治疗有效量的组合物，所述组合物包含：药学可接受的载体；来自下列各草药属的植物种的材料或化学品或包含下列各草药属的植物种的草药制剂：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属；和一种或多种化学治疗化合物。

本发明还提供了治疗需要这样的治疗的哺乳动物中的疾病的方法，其包括给药治疗有效量的一种或多种化学治疗化合物或抗病毒剂和组合物，所述组合物包含：药学可接受的载体；来自下列各草药属的植物种的材料或化学品或包含下列各草药属的植物种的草药制剂：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属。本发明包括这样的方法，其中在给药一种或多种化学治疗化合物之前给药所述组合物。本发明还包括这样的方法，其中在给药一种或多种化学治疗化合物之后给药所述组合物。

本发明通过向需要这样的治疗的哺乳动物给药治疗有效量的组合物，提供了调节造血活性来治疗疾病的方法，所述组合物基本上由药学可接受的载体和来自下列各草药属的植物种的材料或化学品或包含下列各草药属的植物种的草药制剂组成：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属。本发明提供了这样的方法，其中来自草药的所述材料或化学品以出自水溶液的粒状提取物形式，所述水溶液包括但不限于水和醇。具体地，本发明提供了这样的方法，其中所述组合物为可摄取的形式，例如但不限于：散剂、胶囊、液体和片剂。或者，本发明提供了这样的方法，其中所述组合物是栓剂的形式。

本发明还提供了改善正经历化学治疗或抗病毒治疗的哺乳动物的生活质量的方法，其包括给药治疗有效量的一种或多种化学治疗化合物和组合物，所述组合物包含：

- i) 药学可接受的载体；和
- ii) 材料或化学品，其来自下列各草药属的植物种：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属。

本发明关注联合给药包含一种或多种化学治疗药物的化学治疗制剂和一种组合物，所述组合物包含药学可接受的载体和包含下列各草药属的植物种的草药制剂：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属。

本发明还关注联合给药包含一种或多种抗病毒剂的抗病毒制剂和一种组合物，所述组合物包含药学可接受的载体和包含下列各草药属的植物种的草药制剂：黄芩属、甘草属、枣属和芍药属。

本发明使用所公开的草药组合物来提高化学治疗药物的抗肿瘤活性、提高抗病毒剂的抗病毒活性、降低化学治疗药物或抗病毒剂的毒性、调节哺乳动物的血液学和免疫学活性并改善正经历化学治疗或抗病毒治疗的哺乳动物的生活质量。

在一方面，本发明公开了包括化学治疗方案的治疗方法，所述方案包括一种或多种化学治疗化合物和一种组合物，所述组合物包含药学可接受的载体和包含黄芩属、甘草属、枣属和芍药属的草药制剂。

在另一方面,本发明公开了包括抗病毒方案的治疗方法,所述方案包括一种或多种抗病毒剂和一种组合物,所述组合物包含药学可接受的载体和包含黄芩属、甘草属、枣属和芍药属的草药制剂。

此外,本发明提供了一种治疗方案,所述方案包括一种或多种化学治疗化合物或抗病毒化合物和一种组合物,所述组合物包含药学可接受的载体及包含黄芩属、甘草属、枣属和芍药属的草药制剂。

另外,本发明公开了化学治疗方案和组合物,其包括三种化学治疗化合物,优选 CPT-11/FU/LV 或奥沙利铂/CPT-11/FU/LV 和包含黄芩属、甘草属、枣属和芍药属的草药制剂或来自下列各草药属的植物种的材料或化学品:黄芩属、甘草属、枣属和芍药属。本发明关注包含一种或多种抗病毒剂的抗病毒治疗。

附图简述

图 1. 不同剂量的 CPT-11 对非荷瘤 BDF-1 小鼠的作用。仅在第 0 天腹膜内(i.p.)给药 CPT-11(各组中 N=5)。

图 2. PHY906 对 CPT-11 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠体重的作用。仅在第 0 天腹膜内给药 CPT-11(400 mg/kg)。从第 0 天开始以指示的剂量每天口服两次 PHY906,持续 8 天(各组中 N=5)。

图 3. PHY906 对 CPT-11 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠肿瘤生长的作用。仅在第 0 天腹膜内给予 CPT-11(400 mg/kg)。从第 0 天开始每天口服两次 PHY906(500 mg/kg),持续 8 天。使用斯氏配对 t-检验(Student's paired t-test)计算 p 值。(各组中 N=5)

图 4. PHY906 对 CPT-11 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠血液学变化的作用(各组中 N=5)。仅在第 0 天腹膜内给予 CPT-11(400 mg/kg)。从第 0 天开始每天口服两次 PHY906(500 mg/kg),持续 4 天(各组中 N=5)。

图 5. PHY906 对 FU/LV 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠体重的作用。如材料和方法中所述,仅在第 0 天的 1 小时期限内腹膜内依

次给药 LV(100 mg/kg)和 FU(100 mg/kg)。在第 0 天,在 LV 的初始剂量后 30 min,以 500 mg/kg 口服给予 PHY906,并继续在 4 天中每天服用两次(各组中 N=5)。

图 6. PHY906 对 FU/LV 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠肿瘤生长的作用。如材料和方法中所述,仅在第 0 天的 1 小时期限内腹膜内依次给药 LV(100 mg/kg)和 FU(100 mg/kg)。在第 0 天,在 LV 的初始剂量后 30 min,以 500 mg/kg 口服给予 PHY906,并继续在 4 天中每天服用两次(各组中 N=5)。

图 7. PHY906 对 FU/LV 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠血液学变化的作用。如材料和方法中所述,仅在第 0 天的 1 小时期限内腹膜内依次给药 LV(100 mg/kg)和 FU(100 mg/kg)。在第 0 天,在 LV 的初始剂量后 30 min,以 500 mg/kg 口服给予 PHY906,并继续在 4 天中每天服用两次(各组中 N=5)。

图 8. PHY906 对 CPT-11/FU/LV 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠肿瘤生长的作用。如材料和方法中所述,仅在第 0 天的 1 小时期限内腹膜内依次给药 LV(100 mg/kg)、CPT-11(200 mg/kg)和 FU(100 mg/kg)。在第 0 天,在 LV 的初始剂量后 30 min,以 500 mg/kg 口服给予 PHY906,并继续在 4 天中每天服用两次(各组中 N=5)。

图 9. PHY906 对 CPT-11/FU/LV 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠肿瘤生长的作用。如材料和方法中所述,仅在第 0 天的 1 小时期限内腹膜内依次给药 LV(100 mg/kg)、CPT-11(300 mg/kg)和 FU(100 mg/kg)。在第 0 天,在 LV 的初始剂量后 30 min,以 500 mg/kg 口服给予 PHY906,并继续在 4 天中每天服用两次(各组中 N=5)。

图 10. PHY906 对 CPT-11/FU/LV 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠体重变化的作用。如材料和方法中所述,仅在第 0 天的 1 小时期限内腹膜内依次给药 LV(100 mg/kg)、CPT-11(300 mg/kg)和 FU(100 mg/kg)。在第 0 天,在 LV 的初始剂量后 30 min,以 500 mg/kg 口服给予 PHY906,并继续在 4 天中每天服用两次(各组中 N=5)。

图 11. PHY906 对 CPT-11 治疗的具有人类 HepG2 肿瘤的 NCr-裸鼠肿瘤生长的作用。仅在第 0 天腹膜内给药 CPT-11(200 mg/kg)。在第 0 天, 在给予 CPT-11 之前 30 min, 以 500 mg/kg 口服给予 PHY906, 并继续在 8 天中每天给予两次(各组中 N=5)。

图 12. PHY906 对 CPT-11 治疗的具有人类 HepG2 肿瘤的 NCr-裸鼠体重的作用。仅在第 0 天腹膜内给予 CPT-11(200 mg/kg)。在第 0 天, 在给予 CPT-11 之前 30 min, 以 500 mg/kg 口服给予 PHY906, 并继续在 8 天中每天服用两次(各组中 N=5)。

图 13. L-OddC 和 PHY906 对具有结肠 38 的 BDF-1 小鼠的抗肿瘤作用。给雌性 BDF-1 小鼠(8-10 周龄, 平均重量约 20 g)皮下注射结肠 38 肿瘤细胞。从第 0 天开始连续 5 天, 腹膜内注射 L-OddC(β -L-二氧戊环胞苷 25 mg/kg, q.d. X5)。在第 0 天并每天口服给药 PHY906(1 g/kg, b.i.d.), 直到完成本实验(q.d. 是“每天”的缩写, 它指每天一次; q.d. X5 指在连续 5 天中, 五只小鼠中每一只均接受每天一次的剂量; b.i.d. 是“每天两次”的缩写, 它指一天两次)。(各组中 N=5)。

图 14. VP-16 和 PHY906 对具有结肠 38 的 BDF-1 小鼠的抗肿瘤作用。给雌性 BDF-1 小鼠(8-10 周龄, 平均重量约 20 g)皮下注射结肠 38 肿瘤细胞。在第 0 天并连续 5 天, 每天腹膜内注射一次 VP-16(依托泊苷 25 mg/kg, q.d. X5)。在第 0 天并每天口服给药 PHY906(1 g/kg, b.i.d.), 直到完成本实验。(各组中 N=5)。

图 15. 5-氟尿嘧啶(FU)和 PHY906 的抗肿瘤作用。给五只雌性 BDF-1 小鼠(8-10 周龄, 平均重量约 20 g)皮下注射结肠 38 肿瘤细胞。仅在第 0 天腹膜内注射一次剂量的 FU(250 mg/kg)。在第 0 天并每天口服给药 PHY906(1 g/kg, b.i.d.), 直到完成本实验。(各组中 N=5)。

图 16. 5-氟尿嘧啶(FU)与 PHY906 的抗肿瘤作用。给每组的雌性 BDF-1 小鼠(8-10 周龄, 平均重量约 20 g)皮下注射结肠 38 肿瘤细胞。从第 0 天开始, 在连续 5 天中每天腹膜内注射 FU(30 mg/kg, q.d. X5)。在第 0 天并每天口服给药 PHY906(1 g/kg, b.i.d.), 直到完成本实验。

(各组中 N=5)。

图 17. CPT-11 和 PHY906 与洛哌丁胺相比对具有结肠 38 的 BDF-1 小鼠的抗肿瘤作用。给雌性 BDF-1 小鼠(8-10 周龄, 平均重量约 20 g)皮下注射结肠 38 肿瘤细胞。小鼠或者不接受治疗、单独给予 PHY906、单独给予 CPT-11、给予 CPT-11 和 PHY906, 或单独给予洛哌丁胺。如图 3 中所述给药 PHY906 和 CPT-11。仅在第 0 天口服给予一次剂量的洛哌丁胺(2 mg/kg, p.o.(口服给药), b.i.d.)。(各组中 N=5)。

图 18A-C. CPT-11/FU/LV 在血浆中的药物动力学。PHY906-6 为 PHY906 的临床批次。SN-38 是 CPT-11 的活性代谢物。FUR + FUMP 是 FU 的核苷和核苷酸代谢物。

图 19A-C. CPT-11/FU/LV 在肝中的药物动力学。PHY906-6 为 PHY906 的临床批次。SN-38 是 CPT-11 的活性代谢物。FUR + FUMP 是 FU 的核苷和核苷酸代谢物。

图 20A-B. CPT-11/FU/LV 在肿瘤中的药物动力学。PHY906-6 为 PHY906 的临床批次。SN-38 是 CPT-11 的活性代谢物。

图 21. 在吉西他滨(150 mg/kg, qd, D1 和 8)治疗的具有小鼠 PAN02 肿瘤的 C57/BL6 小鼠中, PHY906(500 mg/kg, bid, D1-4 和 8-11)对肿瘤生长的作用。在第 1 天和第 8 天, 每天腹膜内给予一次吉西他滨(150 mg/kg)。在第 1-4 天和 8-11 天, 在给予吉西他滨之前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 22. 在吉西他滨(300 mg/kg, qd, D1 和 8)治疗的具有小鼠 PAN02 肿瘤的 C57/BL6 小鼠中, PHY906(500 mg/kg, bid, D1-4 和 8-11)对肿瘤生长的作用。在第 1 天和第 8 天, 每天腹膜内给药一次吉西他滨(300 mg/kg)。在第 1-4 天和 8-11 天, 在给予吉西他滨之前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 23. 在吉西他滨(600 mg/kg, qd, D1 和 8)治疗的具有小鼠 PAN02 肿瘤的 C57/BL6 小鼠中, PHY906(500 mg/kg, bid, D1-4 和 8-11)对肿瘤生长的作用。在第 1 天和第 8 天, 每天腹膜内给药一次吉西

他滨(600 mg/kg)。在第 1-4 天和 8-11 天, 在给予吉西他滨之前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 24. 在吉西他滨(300 mg/kg, qd, D1 和 8)治疗的具有小鼠 PAN02 肿瘤的 BDF-1 小鼠中, PHY906(500 mg/kg, bid, D1-4 和 8-11)对肿瘤生长的作用。在第 1 天和第 8 天, 每天腹膜内给药一次吉西他滨(300 mg/kg)。在第 1-4 天和 8-11 天, 在给予吉西他滨之前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 25. 在吉西他滨(600 mg/kg, qd, D1 和 8)治疗的具有小鼠 PAN02 肿瘤的 BDF-1 小鼠中, PHY906(500 mg/kg, bid, D1-4 和 8-11)对肿瘤生长的作用。在第 1 天和第 8 天, 每天腹膜内给予一次吉西他滨(600 mg/kg)。在第 1-4 天和 8-11 天, 在吉西他滨之前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 26. 在吉西他滨(300 mg/kg, qd, D1、8、26 和 33)治疗的人类 PANC-1 肿瘤异种移植物中, PHY906(500 mg/kg, bid, D1-4、8-11、26-29 和 33-36)对肿瘤生长的作用。在第 1 天、第 8 天、第 26 天和第 33 天, 每天腹膜内给予一次吉西他滨(300 mg/kg)。在第 1-4 天、第 8-11 天、第 26-29 天和第 33-36 天, 在给予吉西他滨之前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 27. 在吉西他滨(300 mg/kg, qd, D1、8、26 和 33)治疗的人类 PANC-1 肿瘤异种移植物中, PHY906(500 mg/kg, bid, D1-4、8-11、26-29 和 33-36)对体重变化的作用。在第 1 天、第 8 天、第 26 天和第 33 天, 每天腹膜内给予一次吉西他滨(300 mg/kg)。在第 1-4 天、第 8-11 天、第 26-29 天和第 33-36 天, 在吉西他滨之前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 28. 在吉西他滨(300 mg/kg, qd, D1 和 8)治疗的具有小鼠 PAN02 肿瘤的 BDF-1 小鼠中, 906MT(1g/kg*, bid, D1-4 和 8-11)对肿瘤生长的作用。在第 1 天和第 8 天, 每天腹膜内给予一次吉西他滨(300 mg/kg)。在第 1-4 天和第 8-11 天, 在给予吉西他滨之前 30 min,

每天口服两次 906MT(1 g/kg*)(各组中 N=5)。906MT 是从市场上获得的常规制剂。因此所用的数量(1 g/kg*)是近似的。

图 29. (A)吉西他滨(dFdC)及(B)其代谢物(dFdU)在血浆中的药物动力学。口服一次剂量的吉西他滨(600 mg/kg)或/和 PHY906(500 mg/kg)。在给予吉西他滨前 30 min 给予 PHY906。每只小鼠在不同的时间点取血两次, 每个时间点取血三只小鼠。

图 30. PHY906 对吉西他滨+奥沙利铂治疗的具有人类 PANC-1 肿瘤的 NCr-裸鼠的抗肿瘤作用。在第 1 天, 在一天一次腹膜内给予吉西他滨(300 mg/kg)前 30 min, 腹膜内给予奥沙利铂(10 mg/kg)。在第 1-4 天, 在给予奥沙利铂前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 31. PHY906 对 CPT-11 治疗的具有人类 HepG2 肿瘤的 NCr-裸鼠肿瘤生长的作用。仅在第 0 天腹膜内给予 CPT-11(200 mg/kg)。在第 0 天, 在给予 CPT-11 前 30 min, 以 500 mg/kg 口服 PHY906, 并继续在 8 天中每天口服两次(各组中 N=5)。

图 32. PHY906 对卡培他滨治疗的具有人类 HepG2 肿瘤的 NCr-裸鼠肿瘤生长的作用。从第 0 天开始到连续 14 天, 每天口服两次卡培他滨(360 mg/kg)。间断地在第 0-3 天和第 7-10 天, 在给卡培他滨前 30 min, 以 500 mg/kg 每天口服两次 PHY906(各组中 N=5)。

图 33. PHY906 对多柔比星治疗的具有人类 HepG2 肿瘤的 NCr-裸鼠的抗肿瘤作用。在第 1、4 和 7 天, 每天腹膜内给药一次多柔比星(7.5 mg/kg)。在第 1-4 天和 8-11 天, 在给予多柔比星前 30 min, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 34. PHY906 对沙立度胺治疗的具有人类 HepG2 肿瘤的 NCr-裸鼠的抗肿瘤作用。在第 1-14 天, 连续每天腹膜内给药一次沙立度胺(1 g/kg)。在第 1-4 天, 在给予沙立度胺前 3 小时, 每天口服两次 PHY906(500 mg/kg)(各组中 N=5)。

图 35. PHY906 对奥沙利铂在具有结肠 38 的 BDF-1 小鼠中的抗肿

瘤活性的作用。在第1天腹膜内给予奥沙利铂(10 mg/kg, D1)。在第1-4天,在给予奥沙利铂前30 min,以500 mg/kg 每天口服两次PHY906(各组中N=5)。

图36. PHY906对奥沙利铂/5-FU/LV在具有结肠38的BDF-1小鼠中的抗肿瘤活性的作用。在第1天、第2天、第8天和第9天,腹膜内给予5-FU和LV(分别为50 mg/kg)。在第1天和第8天,腹膜内给予奥沙利铂(5 mg/kg)。在第1-4天和第8-11天,在给予5-FU/LV前30 min,以500 mg/kg 每天口服两次PHY906(各组中N=5)。

图37. 用(A)载体; (B)奥沙利铂/5-FU/LV; 或(C)PHY906加奥沙利铂/5-FU/LV治疗的具有结肠38的BDF-1小鼠的卡-迈生存曲线。从第1天开始,腹膜内给予奥沙利铂(10 mg/kg, D1)和5-FU/LV(分别为50 mg/kg, D1-2)。在第1-4天,在给予奥沙利铂/5-FU/LV前30 min,以500 mg/kg 每天口服两次PHY906(各组中N=5)。

图38. PHY906对奥沙利铂、5-FU/LV和奥沙利铂/5-FU/LV治疗的具有结肠38的BDF-1小鼠体重的作用。在第1天腹膜内给予奥沙利铂(5 mg/kg, D1)。在第1、2、8和9天,腹膜内给予5-FU和LV(分别为50 mg/kg)。在第1-4天和第8-11天,在给予5-FU/LV或奥沙利铂前30 min,以500 mg/kg 每天口服两次PHY906(各组中N=5)。

优选实施方案详述

I. 总述

本发明部分地基于如下发现:在体内动物模型中,PHY906降低化学治疗诱发的毒性,包括体重下降和死亡,PHY906还能增强许多抗肿瘤药如CPT-11、5-FU、VP-16、L-OddC、卡培他滨、吉西他滨、奥沙利铂、多柔比星、沙立度胺、CPT-11/5-FU/LV、吉西他滨/奥沙利铂和奥沙利铂/5-FU/LV的抗肿瘤功效。PHY906是传统中草药制剂,由4种不同的草药组成,它已经持续约1800年被用于治疗胃肠疾病,它们中的一些是通常在正经历化学治疗的癌症患者中观察到的副作用。

本发明还部分地基于如下发现：在肝细胞癌和胰腺癌模型中，PHY906 都显著增强所研究的化学治疗药物的治疗指数。在人肝细胞异种移植小鼠模型中，PHY906 与口服的 5-FU 前药卡培他滨、CPT-11、多柔比星或沙立度胺共同给药，在小鼠胰腺癌模型中，PHY906 与吉西他滨、奥沙利铂、吉西他滨/奥沙利铂共同给药。在动物模型中，PHY906 与卡培他滨或吉西他滨的共同给药没有改变卡培他滨、吉西他滨或其各自代谢物的药物动力学曲线。

还在结肠直肠癌小鼠模型中检查了 PHY906 对奥沙利铂、5-FU/LV 和奥沙利铂/5-FU/LV 抗肿瘤活性的作用。本发明部分基于如下发现：PHY906 增强奥沙利铂和奥沙利铂/5-FU/LV 的抗肿瘤活性，如图 35 和 36 所示。PHY906 不仅能将死亡率减少至 60%，而且能延迟由奥沙利铂/5-FU/LV 引起的动物死亡的发生，如图 37 所示。

生化研究揭示，PHY906 制剂具有广泛的药理学活性。PHY906 可能的作用机理包括：(1)通过抑制肠 CYP3A4，增强药理学活性剂的口服摄取；(2)抑制 NF- κ B 活性；(3)抑制 MMP 活性；和(4)破坏肝脏肿瘤中血窦的完整性。

这些临床前的体内研究为临床环境中开发 PHY906 提供了理论。启动 PHY906 的 I/IIA 期双盲、安慰剂对照的、剂量递增研究，以评价 PHY906 在调节 CPT-11 诱导腹泻的潜在作用，所述腹泻与晚期结肠直肠癌患者每周推注 CPT-11/5-FU/LV 相关。获益的患者加入第二个 I/II 期开放标记、剂量递增临床试验，以评价 PHY906 与卡培他滨的组合在治疗肝细胞癌中的作用。

还已显示 PHY906 在小鼠模型中通过加强治疗药的抗肿瘤作用以及减少多种宿主毒性而增加几种抗癌药如伊立替康(CPT-11)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、伊立替康/5-氟尿嘧啶/亚叶酸(LV)、伊托泊苷(VP-16)和 L-OddC 的治疗指数。为研究是否需要全部四种植物药以获得观察到的全部生物学活性，研究了五种制剂：具有全部四种植物药的完整制剂和各自缺少一种植物药成分的四种植剂(A=黄芩，B=芍药，C=枣，D

=甘草)。在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠模型中，当从 PHY906 制剂中除去植物药 A 或植物药 B 时，CPT-11 抗肿瘤作用的强度受到损害。相反，没有发现植物药 C 和 D 有助于增强 CPT-11 的抗肿瘤作用。但是，当检查体重下降作为 CPT-11 的不良毒副作用时，除了 B，所有植物药均有助于保护体重下降。因此，所观察到的 PHY906 生物学活性需要全部四种植物药。

还在体外研究了植物药对细胞色素 P450 同工酶(CYP1A2、2C9、2C19、2D6 和 3A4)的作用，以检查植物药对分离的酶靶的潜在作用。已知这些酶中的一种，即 CYP3A4 是 CPT-11 的主要的引起代谢的酶。尽管在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠模型中的研究显示，PHY906 对 CPT-11 的药物动力学或药效学没有影响，但观察发现 PHY906 是具有不同功效的个体的细胞色素 P450 同工酶的抑制剂。对单个植物药以及三种植物药的四种独立制剂进行个体 P450 抑制的研究显示在调节个体酶抑制作用的特定植物药之间存在相互作用。这些研究显示在体内和体外研究中，植物药作用的复杂性、补偿性和多因素性与来源于中药的原理一致。PHY906 正处于作为结肠直肠癌患者的 CPT-11/5-FU/LV 调节剂的 I/IIa 期临床试验中。

总之，本发明部分基于如下发现：

1. 在不同小鼠模型中，PHY906 增加各种化学治疗药物在人类胰腺癌、肝细胞癌和结肠直肠癌中的治疗指数。具体地，通过增强抗肿瘤活性、减少死亡率和避免体重下降，PHY906 能提高多种化学治疗药物的治疗指数。

2. PHY906 不改变这些化学治疗药物在小鼠模型中的药物动力学。

3. PHY906 增强所研究的癌症化学治疗药物的药物作用机理可能在于但不限于抑制 NF- κ B、MMP 或破坏肝细胞癌血窦的完整性。

4. 需要 PHY906 制剂中的全部四种草药(A=黄芩，B=芍药，C=枣，D=甘草)来获得观察到的最大范围的功效；

• 在 PHY906 制剂中，草药 A 促成避免体重下降和增强抗肿瘤作用

($p < 0.05$)。

- 草药 B 促成增强 PHY906 的抗肿瘤活性($p < 0.05$)，但不能避免由癌症化学治疗药物诱发的体重下降。

- 草药 C 和 D 避免由癌症化学治疗药物诱发的体重下降。

5. 不同批次的 PHY906 在人类 CYP450 抑制和细胞生长抑制方面显示出一致性；

- 草药 A 是人类 CYP450 以及细胞生长的有效抑制剂。

- 草药 D 在所检查的细胞系中显示出极低的细胞毒性，是极弱的人类 CYP450 抑制剂。

6. PHY906 显示出对人类 CYP450 的强大体外抑制活性。但是，动物数据显示，PHY906 不影响 CPT-11 代谢，或不损害化学治疗药物的抗癌活性。

癌症化学治疗药物经常诱发严重的不良副作用，这些副作用会影响患者的生活质量，并且干扰治疗方案。本发明部分地基于如下发现：中草药与标准抗癌药的组合可用于减少癌症化学治疗药物的不良副作用，改善正经历化学治疗的患者的生活质量。PHY906 是由四种不同草药组成的植物药制剂，在中国，已经在数百年中将它用于治疗各种胃肠疾病和其他疾病。本发明基于在动物模型中进行的实验结果，所述实验评价在结肠直肠癌患者中，PHY906 在减少由癌症化学治疗药物诱发的副作用方面的潜在功效。具体地，本发明部分地基于如下发现：PHY906 能减少由 CPT-11、FU、FU/LV、CPT-11/FU/LV、L-OddC、VP-16、沙立度胺、多柔比星、卡培他滨、吉西他滨、奥沙利铂、吉西他滨/奥沙利铂或奥沙利铂/FU/LV 治疗所诱发的各种宿主毒性，并且能保持甚至增强化学治疗药物的抗肿瘤活性。更具体地，通过增强化学治疗药物的抗肿瘤作用并减少各种宿主毒性，PHY906 可增强 CPT-11、5-FU、卡培他滨、奥沙利铂、多柔比星、沙立度胺、VP-16、L-OddC、以及 CPT-11/FU/LV 和奥沙利铂/FU/LV 三联组合的治疗指数。这些发现不限于一种特定的抗癌药或一种特定的肿瘤模型。

本发明还部分地基于对如下方案的发现，所述方案可与各种抗癌药组合使用，以降低限制剂量的毒性并增强药物的功效。对于用于人类癌症治疗方法的物质，这个发现是极为重要的补充。

II. 定义

除非另有说明，本文所用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。尽管在本发明的实施或检测过程中可能使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料，但仍然描述了优选的方法和材料。

本文所用的“癌症化学治疗的”或“癌症化学治疗药物”指用于治疗肿瘤疾病或癌症的化学治疗药物。

本文所用的“化学治疗的”指通过化学品或药物治疗疾病。

本文所用的术语“化学治疗制剂”指包括化学治疗药物的组合物。

本文所用的术语“提取物”指按如下获得的植物药或动物药的浓缩制品：使用适宜的溶媒(溶剂)从中提取出活性成分，蒸发掉全部或接近全部的溶剂，将残余物或粉末调节至规定的标准。制备三种形式的提取物：半固体或具有糖浆状稠度的物质、丸药或固体，以及作为干粉(参见 <http://www.graylab.ac.uk/cgi-bin/omd?query=extract>)。

在一个实施方案中，提取物是各种固体和半固体剂型中所用粗制药物的浓缩形式(Remington's Pharmaceutical Sciences 第 17 版. (Gennaro, ed), Chapter 84, pp. 1516-1517, Mack Publishing Co, Easton, PA (1985))。例如，丸药(即：塑性体(plastic mass))提取物具有的稠度使得它们适合于丸药块并将其制成丸剂(例如纯甘草属提取物 USP)。此外，丸药块很好地适用于软膏剂和栓剂。粉状提取物更适合粉状制剂如胶囊、散剂和片剂。此外，具有糖浆状稠度的半固体或提取物能够用于制备药物制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985)。

在一个相关方面，可认为提取物是按如下获得的活性成分溶液：将植物或动物原料药浸泡或浸渍在液体中(浸解)，或者使这类原料药通

过多孔物质(渗滤), 作为药剂供使用。此外, 这种类型的药剂可以是酊剂或流浸膏剂[sic]的形式(Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985)。

在一个实施方案中, 所述提取物是酊剂形式。例如, 酊剂可以包括但不限于由植物或由化学品制备的醇或水醇溶液。可以通过渗滤或浸渍制备酊剂, 一般以特定活性药物的重量(按克计)/100ml 酊剂表示功效(Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985)。例如, 甜桔皮酊剂包含 50 g 甜桔皮/100ml 酊剂。

在另一个实施方案中, 所述提取物是流浸膏剂[sic]形式。例如, 液体提取物包括但不限于植物药的液体制剂, 其中包括醇作为溶剂或作为防腐剂或两者兼而有之, 其中通常每 ml 包含 1 克治疗成分所代表的药物。通过作为常规方法的渗滤法能够制备流浸膏剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985)。

本文所用的术语“血液学活性”指与血液和造血器官相关的活性。

从技术上讲, 术语“草药”指小的非木本(即带有新鲜茎的)的一年生或多年生有种子的植物, 其中所有气生部位均在各生长季节结束时死亡。草药具有医疗、调味(savory)或芳香性质。当更一般地使用该术语和当本文使用该术语时, “草药”指具有食物增补、医学、药物、治疗或延长生命的用途的任何植物或植物部位。因此, 本文所用的草药不限于草药的植物学定义, 而是用于这类目的的任何植物性药材、植物或植物部位, 包括 Metaphyta 界中的任何植物种或亚种的任何植物或植物部位, 包括草药、灌木、半灌木和树。草药组合物中所用的植物部位包括但不限于: 种子、叶、茎、嫩枝、枝(branch)、芽、花、球茎、谷粒、块茎、根茎、长匍枝、根、果实、球果、浆果、形成层和树皮。

本文所用的“草药组合物或制剂”指包括草药、草药植物、草药植物部位和/或草药提取物的任何组合物或制剂。因此, 本文所用的草药组合物或制剂包括包含草药食物增补剂、草药和药用食物的草药制

剂。草药组合物的例子包括但不限于下列成分：单一植物种的完整植物或植物部位；多植物种的完整植物或植物部位；来源于单一植物种的多种成分；来源于多种植物种的多种成分；草药提取物；或这些不同成分的任何组合。本发明还关注包括来源于单一或多植物种的一种或多种化学品的草药组合物。

关于不同草药组合物的充分综述，例如参见 Kee Chang Huang, *The Pharmacology of Chinese Herbs*, CRC Press (1993)，该文献被全文引入本文。

本文所用的术语“免疫学活性”指与免疫系统、免疫性、诱发的敏感性和变态反应相关的活性。

本文所用的术语“死亡率”指人口或特定人口数量中的死亡比例，其中将死亡率定义为死亡比例或总死亡数量与总人口之比。例如，缺血性中风症状发作后 30 天的死亡率可能为约 13.3%(例如在用组织型纤溶酶原激活物治疗后，参见 Albers 等人, *JAMA* (2000) 283(9): 1145-1150)至大于约 65%(例如出血性中风，参见 Mahaffey 等人, *Am Heart J* (1999) 138(3 Pt 1): 493-499)。

本文所用的术语“生活质量(QOL)”指动物，尤其是哺乳动物、更具体地是人的一般健康。能够基于任一参数、一组两个或多个参数或基于一般总体评价或评分来评价个体的 QOL。用于评价 QOL 的有用指标的例子包括但不限于与下列内容相关的指标：睡眠模式；进食模式；饮用模式；灵活性；可动性；皮肤色泽；视觉；毛发保留/缺失/生长；肌肉色泽；肌肉质量；力量；体重；窦健康；存在或不存在炎症，或其程度；不适感；完成特定任务的能力；焦虑程度；响应时间；集中能力；记忆保留；语言能力；听觉；存在或不存在头痛，或其程度；肌肉痉挛；神经损害；味觉；触觉；嗅觉；机会性疾病的存在或不存在；寄生虫的存在或不存在。

本文所用的术语“方案”指治疗程序。

本文所用的术语“治疗指数”指产生所需疗效时药物选择性如

何。治疗指数是 LD_{50} 与 ED_{50} 的比例。半数有效量 ED_{50} 是在 50% 人群中产生特定疗效所需的药物剂量。 LD_{50} 是在实验动物中测定的半数致死量。

III. 具体实施方案

A. 化学治疗

通常，化学治疗指用化学剂治疗疾病、尤其是肿瘤、寄生虫感染和微生物疾病，这些化学剂以一定的方式作用于感染性的有机体或肿瘤。

1. 癌症化学治疗

介绍：化学治疗仍旧为用于治疗癌症患者的最有效方式之一。尽管十分有效，但也众所周知化学治疗药物不良地破坏患者的生活质量。一些通常观察到的副作用包括：骨髓抑制和免疫抑制、腹泻、外周神经病、恶心和呕吐、发热、肝功能障碍和心脏毒性等(“Physicians Desk Reference” (1999) Medical Economics Company)。在许多情况下，这些不良副作用妨碍患者接受递增剂量或追加的治疗过程，由此限制了这些药剂的功效。减轻这些副作用中的一些或全部、而不损害化学治疗药物的抗癌活性，这样不仅可以改善癌症患者的生活质量(QOL)，而且允许使用更强力的治疗方案，导致可能的改善的临床成功。目前，大多数支持疗法使用单一药剂如止吐药、抗粘膜炎药和集落生长因子，它们以个别的副作用为靶，但不对应与癌症化学治疗的相关的多种副作用(Bleiberg H 和 Cvitkovic E., Eur J Cancer 32A(Suppl 3): S18-S23 (1996); Wierda D.和 Matamoros M., Toxicol & Applied Pharmacol 75: 25-34(1984); Goldber R.M.和 Erlichman C., Oncology 12: 59-63 (1988))。

用于治疗癌症的药物包括：更常规的天然产物，如紫杉醇(TAXOL)；半合成药物，如依托泊苷；以及许多较新的不同药剂，如白介素-2 和全反式维甲酸。关于用于治疗肿瘤疾病的化学治疗药物的综合目录，参见例如 Calabresi 和 Chabner(1996)1227-1229 页表 X-1。

表 2 提供了与通常给药的癌症化学治疗相关的主要不良作用。

表 2. 癌症化学治疗的主要不良作用

主要的不良健康作用	抗肿瘤药
胰腺炎	VP-16、阿糖胞苷
脱发	VP-16、多柔比星、紫杉醇、FU、阿糖胞苷
心脏毒性	紫杉醇、多柔比星
皮肤影响	多柔比星
腹泻	CPT-11
呼吸困难	阿糖胞苷
潮红(flush)	他莫昔芬
发热/寒战	VP-16、多柔比星
肝毒性	VP、紫杉醇、阿糖胞苷、甲氨蝶呤
中毒性肾损害	顺铂
骨毒性	顺铂
骨髓发育不全	几乎所有抗癌药

5-氟尿嘧啶：氟嘧啶类似物 5-氟尿嘧啶(5-FU 或 FU)表现出多种临床活性。在辅助的和重病环境中，在结肠直肠癌的治疗以及其他 GI 恶性病方面，它仍是最具活性的药剂之一(Pinedo 和 Peters, 1988)。此外，该药还有效抗乳腺癌和头颈癌。

结肠直肠癌治疗的近期发展已经使用生化调节来选择性激活特定的嘧啶代谢途径。还原的叶酸盐，即亚叶酸(LV)是有效的生化调节剂，已经与 FU 组合用于临床治疗(Peters 和 Van Groenigen, 1991; Joulia,等人, 1999)。在临床试验中，已经证实添加 LV 形式的外源性叶酸盐可提高对 FU 的响应(Calabresi 和 Chabner, P1250, 1996)。LV 相互作用的假设机制是胸苷酸合酶抑制。

在晚期疾病患者中，对 FU 的响应率由 10%-12%(单独 FU 治疗)改善至 20%-30%(FU/LV 治疗)。

卡培他滨：卡培他滨(Xeloda®)是用于治疗癌症的口服药物。在

1998 年，卡培他滨被 FDA 批准用于治疗转移性乳腺癌，这种癌症耐受其他药物如紫杉醇(Taxol®)、多柔比星和 adriamycin®。在 2001 年，它被 FDA 批准用于治疗转移性结肠直肠癌，其常用 5-FU 治疗。在每 21 天的周期中，卡培他滨一般给药 14 天，然后是 7 天的休息期。

卡培他滨是具有抗肿瘤活性的氟嘧啶氨基甲酸盐。卡培他滨的化学名为 5'-脱氧-5-氟-N-[(戊氧基)羰基]胞苷。卡培他滨描述于美国专利 5,472,949 中，该文献被全文引入本文作为参考。

卡培他滨属于称为抗代谢物的化学治疗药物组。它是 5'-脱氧-5-氟胞苷(5'-DFUR)的前药，具有独特的激活机理。卡培他滨被位于肝的羧酸酯酶或胞苷脱氨酶转化为 5'-DFUR。5'-DFUR 被肿瘤中的胸苷磷酸化酶(dThdPase)转化为活性形式 5-FU。与健康组织相比，卡培他滨可利用肿瘤组织中高浓度的 dThdPase，导致肿瘤选择性地产生 5-FU。在正常细胞和肿瘤细胞中，5-FU 进一步被代谢成两种活性代谢物：5-氟-2-脱氧尿苷一磷酸(FdUMP)和 5-氟尿苷三磷酸(FUTP)。FdUMP 通过减少正常胸苷的制备来抑制 DNA 合成，而 FUTP 通过与尿苷三磷酸竞争来抑制 RNA 和蛋白质合成。卡培他滨的活性部分 5-FU 是细胞周期阶段特异性的(S 期)。

研究显示，与静脉内给药(i.v.)的 5-FU/LV 相比，卡培他滨具有更好的响应。在一项研究中，与 5-FU/LV 的 11%响应率相比，用卡培他滨治疗的患者获得了显著性($P=0.0014$)更好的响应率，为 21%。用卡培他滨和 5-FU/LV 治疗的疾病进展中位时间分别为 128 天和 131 天(非显著性(NS))，中位生存时间分别为 380 天和 407 天(NS)(Hoff 等人 J Clin Oncol. 19: 2282-2292, 2001)。在另一项研究中，与 5-FU/LV 的 14%响应率相比，用卡培他滨治疗的患者也获得显著性($P=0.027$)更好的响应率，为 21%。疾病进展中位时间分别为 137 天和 131 天(NS)，中位生存时间分别为 404 天和 369 天(NS)(Van Cutsem 等人 J Clin Oncol. 19: 4097-4106, 2001)。与 i.v. 5-FU/LV 相比，卡培他滨还具有改善的安全曲线。

与单独的 5-FU/LV 相比，使用卡培他滨与 5-FU/LV 的联合治疗来治疗结肠直肠癌已经显示出存活益处。用于治疗结肠直肠癌的其他卡培他滨潜在联合治疗包括但不限于：卡培他滨/奥沙利铂、卡培他滨/伊立替康、卡培他滨/奥沙利铂/gefitimib、卡培他滨/奥沙利铂/5-FU/LV 和卡培他滨/放射治疗。对于乳腺癌治疗，联合治疗包括但不限于：卡培他滨/伊立替康、卡培他滨/多西紫杉醇(Taxotere®)、卡培他滨/紫杉醇和卡培他滨/5'-DFUR。

像其他化学治疗一样，服用卡培他滨也伴有副作用。卡培他滨最常见的副作用包括：腹泻、恶心、呕吐、口的疼痛性肿胀、疲劳、手或足的疼痛性皮疹和肿胀、白细胞计数低(这可能导致感染)、血小板计数低(这可能导致出血)和贫血。在接受卡培他滨的患者中，约每三个人就有一个人具有严重的副作用，但是当停止药物或当降低剂量时，这些副作用通常是可逆的。

对于氟嘧啶类似物，包括 5-FU 和卡培他滨的治疗用途的详细描述，参见例如 Chabner 等人, 1996。

CPT-11：伊立替康(CPT-11)是半合成的喜树碱类似物，其抑制复制细胞中的拓扑异构酶 I。在用一线 FU/LV 治疗失败的癌症患者中，它表现出抗肿瘤活性(Bleiberg, 1999; Stucky-Marshall, 1999)。

尽管 CPT-11 为 FDA 批准的作为晚期结肠直肠癌患者的二线治疗，但观察到的响应率级别仅为 10%-15%。

与该药剂相关的主要副作用包括：白细胞减少、贫血、恶心/呕吐、食欲缺乏和腹泻。因此，期望开发一种调节剂，其能提高 CPT-11 的抗肿瘤活性的功效和/或缓解与 CPT-11 治疗相关的一些毒副作用，从而使癌症患者的总体生活质量和体力状态得到改善。

CPT-11/FU 和 CPT-11/FU/LV 组合：据报道，结肠直肠癌是北美地区死于癌症的第二位主导原因。目前 FDA 批准用于治疗结肠直肠癌的两种药物是伊立替康(CPT-11, Camptosar®)和 5-氟尿嘧啶(FU)。FU 是抗代谢药物，它抑制合成 DNA 所需的胸苷酸合酶。通常将 FU 与还原

叶酸盐 LV 一起给药, LV 能增加 FU 对胸苷酸合酶的亲合性。目前将这种治疗用作转移性结肠癌的一线治疗(Murakami K, Sakukawa, R, Sano, M,等人, Clin Cancer Res. 5: 2304-2310 (1999); van der Wilt C.L, van Groeningen, C.J, Pinedo H.M,等人, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123: 595-601 (1997))。CPT-11 是拓扑异构酶 I 的有效抑制剂, 这种核酶参与 DNA 在复制过程中的解旋。已经证实 CPT-11 作为 FU 失败后的二线治疗, 对转移性结肠直肠癌的抗肿瘤活性(Kase, Y, Hayakawa, T, Togashi, Y,等人, Jpn J Pharmacol, 75: 399-405 (1997); Araki E, Ishikawa M, Iigo M, 等人, Jpn J Cancer Res 84: 697-702 (1993); Bissery MC, Vrignaud P, Lavelle F,等人, Anti-Cancer Drugs 7: 437-460 (1996); Saltz L.B, Cox J.V, Blanke C,等人, New. Eng.J. Med. 343: 905-914 (2000))。最近, FDA 批准将 CPT-11/FU/LV 的三联组合用作晚期结肠直肠癌的一线治疗。不幸的是, 在使用该联合治疗治疗的患者中, 已经将严重腹泻鉴定为限制剂量的毒性之一(Saltz L.B, Cox J.V, Blanke C,等人, New. Eng.J. Med. 343: 905-914 (2000); Murakami K, Sakukawa, R, Sano, M,等人, Clin Cancer Res. 5: 2304-2310 (1999); van der Wilt C.L, van Groeningen, C.J, Pinedo H.M,等人, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 123: 595-601 (1997))。

VP-16(依托泊苷): VP-16 也称作依托泊苷, 它显示出对抗小细胞肺癌、睾丸癌、淋巴瘤和白血病(O'Dwyer, P.,等人, Etoposide (VP-16-213), Current Status of an Active Anti-cancer Drug, New Engl. J. Med. 312: 692-700 (1985))和包括在霍奇金病、乳头瘤病毒和弥漫性组织细胞淋巴瘤中所见的肿瘤的显著临床活性。

据信依托泊苷通过稳定酶-DNA 复合物来阻断 DNA 拓扑异构酶 II 的催化活性, 在所述复合物中 DNA 裂解并与所述酶共价连接。参见 Chen, G. L., Yang, L., Rowe T. C., Halligan, B. D., Tewey, K.,和 Liu, L., J. Biol. Chem., 259: 13560 (1984); Ross, W., Rowe, T., Glisson, B., Yalowich, J., 和 Liu, L., Cancer Res., 44: 5857 (1984); Rowe, T., Kuppfer, G., 和 Ross, W., Biochem. Pharmacol., 34: 2483 (1985), 特别将这些文献引入

本文作为参考。

作为背景技术，拓扑异构酶是控制 DNA 拓扑学状态的酶。II 型拓扑异构酶催化 DNA 链通过 DNA 中短暂的双链断裂处。所得 DNA 连接数量的改变使得这些酶介导 DNA 的互变，例如超螺旋和超螺旋松弛、链状排列和脱链状排列、打结和不打结。参见 Wang, J. C., *Annu. Rev. Biochem.*, 54: 665 (1985) 和 Maxwell, A., 和 Gellert, M., *Adv. Protein Chem.*, 38: 69 (1986)，特别将这些文献引入本文作为参考。

已经证实 II 型拓扑异构酶参与许多重要的细胞过程，包括 DNA 复制和转录，以及染色体分离。因此，这些酶是许多抗癌药，包括依托泊苷和替尼泊苷的关键作用靶。导致细胞死亡的关键步骤可能是这些药物能够阻断 DNA 拓扑异构酶 II 的催化活性，如上所述。

β -L-二氧戊环胞苷(L-OddC)： β -L-二氧戊环胞苷[L-OddC]是显示具有抗癌活性的非天然 L 构象的第一种核苷类似物(Grove 等人, *Cancer Res* (1996) 56(18): 4187-4191)。在人前列腺和肝细胞异种移植肿瘤模型中，已显示该化合物具有有效的抗肿瘤活性(Grove 等人, *Cancer Res* (1995) 55: 3008-3011)。此外，已显示 L-OddC 在体外有效对抗人角质细胞的过度增殖活性(Schwartz 等人, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* (1998) 11(4-5): 207-213)。

通过平衡敏感性和平衡不敏感性核苷转运体系，该化合物快速转移进入细胞而起作用，在所述体系中它被结合到细胞的 DNA 中。DNA 结合导致 DNA 降解成大片段，而没有产生核小体间梯化。

吉西他滨：在 1996 年，吉西他滨(Gemzar®)被 FDA 批准用于治疗局部晚期或转移性胰腺癌，作为最初治疗或在用化学治疗药物氟尿嘧啶治疗之后使用。它还被批准与化学治疗药物顺铂(Platinol®)组合，用于治疗局部晚期或转移性非小细胞肺癌。吉西他滨是静脉内给药(i.v.)的，其剂量取决于几个因素，包括：所治疗的病症、患者的身高、所使用的具体治疗方案和患者的整体健康。

吉西他滨是 2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷的通用名。也知道其化学名为 1-

(4-氨基-2-氧代-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,2-二氟核糖。吉西他滨公开于美国专利 4,808,614 和 5,464,826，这些文献被引入本文，参考它们关于如何合成、配制和使用吉西他滨来治疗敏感肿瘤的教导。吉西他滨作为一盐酸盐和作为 β -异构体出售。

吉西他滨属于称为抗代谢物的药物组。通常，抗代谢物通过抑制细胞产生或修复 DNA 的能力，从而使得细胞不能复制或修复自身，最终引起细胞死亡，来产生其抗癌作用。吉西他滨显示细胞阶段特异性，主要杀灭进行 DNA 合成(S 期)的细胞，还能阻断细胞通过 G1/S 期边界的进程。吉西他滨被核苷激酶在细胞内代谢成活性二磷酸(dFdCDP)和三磷酸(dFdCTP)核苷。吉西他滨的细胞毒性作用来自二磷酸和三磷酸核苷的两种作用的组合，这导致抑制 DNA 合成。首先，吉西他滨二磷酸抑制核糖核苷酸还原酶，该酶负责催化产生脱氧核苷三磷酸用于 DNA 合成的反应。二磷酸核苷对该酶的抑制引起脱氧核苷酸，包括 dCTP 的浓度减少。其次，吉西他滨三磷酸与 dCTP 竞争进入 DNA。细胞内 dCTP 浓度的减少(通过二磷酸的作用)促进吉西他滨三磷酸进入 DNA(自身增强)。在吉西他滨核苷酸进入 DNA 后，仅有一种额外的核苷酸进入 DNA。在此加入后，即可抑制 DNA 的进一步合成。

像其他化学治疗药物一样，吉西他滨可引起不良副作用。使用吉西他滨的更常见副作用包括但不限于：白细胞数计减少导致感染危险增加、血小板计数减少导致出血危险增加、恶心、呕吐、肝功血液检查增加和疲劳。较不常见的副作用是：腹泻；口唇疮；流感样症状；皮肤皮疹；手、踝和面部肿胀、毛头稀少和发痒。

奥沙利铂：在 2002 年，奥沙利铂(Eloxatin®)被 FDA 批准用于转移性结肠直肠癌患者的二线治疗。在 2005 年 2 月，它被批准用于晚期结肠直肠癌的一线治疗。这个较近的批准推荐将奥沙利铂与 5-氟尿嘧啶和亚叶酸(5-FU/LV)组合使用。奥沙利铂是静脉内给药的，其剂量取决于几个因素，包括：所治疗的病症、患者的身高、所使用的具体方案和患者的整体健康。

奥沙利铂是二氨基环己烷化合物，已知在与顺铂相同的加成物形成位置引起 DNA 损坏。它还被称为 L-OHP，是第三代铂络合物。奥沙利铂的化学名为顺式草酸(反式-1-1,2-环己烷二胺)铂(II)。奥沙利铂公开于美国专利 4,169,846 和相关专利：美国专利 5,290,961、美国专利 5,298,642、美国专利 5,338,874、美国专利 5,420,319 和 PCT/IB/00614，这些文献被全文引入本文作为参考。

本文所用的术语“奥沙利铂”包括顺式草酸(反式-1-1,2-环己烷二胺)铂(II)、其光学对映异构体顺式草酸(反式-d-1,2-环己烷二胺)铂(II)及其任何外消旋混合物。术语“奥沙利铂”还包括具有高光学纯度的顺式草酸(反式-1-1,2-环己烷二胺)铂(II)，即光学纯度等于或高于约 99.5%，例如根据美国专利 5,338,874(该文献被全文引入本文作为参考)所述的程序获得的顺式草酸(反式-1-1,2-环己烷二胺)铂(II)，其熔点为约 198℃至约 292℃，尤其是根据美国专利 5,420,319 公开的程序获得的顺式草酸(反式-1-1,2-环己烷二胺)铂(II)，其光学纯度为约 99.94%或更高，熔点为约 198.3℃至约 199.7℃，该文献被全文引入本文作为参考。奥沙利铂的衍生物包括但不限于卡铂和顺铂。

奥沙利铂属于新一类铂试剂。它包含与草酸盐和二氨基环己烷(DACH)络合的铂原子。认为与顺铂和卡铂相比，庞大的 DACH 导致更大的细胞毒性(Wiseman 等人, *Drugs Aging* 1999;14(6): 459-75)。奥沙利铂的确切作用机理是未知的。奥沙利铂形成活性铂络合物，认为该络合物通过形成 DNA 分子的链间交联来抑制 DNA 合成。奥沙利铂通常不与顺铂或卡铂交叉耐受，可能是由于 DACH 基团和对 DNA 错配修复的抵抗(Wiseman 等人, *Drugs Aging* 1999, 14(6): 459-75; Misset 等人, *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 2000, 35(2): 75-93)。临床前研究显示，奥沙利铂与氟尿嘧啶和伊立替康的活性代谢物 SN-38 是协同的(Cvitkovic 等人, *Semin Oncol* 1999, 26(6): 647-62)。奥沙利铂是放射敏感剂(Freyer 等人, *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 19: 260a; Carraro 等人, *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000,19: 291a)。它是细胞周期相非特异性

的 (Sanofi-Synthelabo. Eloxatin : Summary of product characteristics (Europe): France; 1 October 1999)。

像其他化学治疗药物一样, 使用奥沙利铂也有副作用。较常见的副作用包括: 恶心、呕吐、由于神经刺激而使手和/或足麻木和刺痛、嘴唇麻木、腹泻、腹痛、口疮、呼吸困难和疲劳。较少见的副作用包括行走困难、白细胞计数减少导致感染危险增加、血小板计数减少导致出血危险增加、难以吞咽或呼吸、对寒冷温度的耐受性差和具有皮疹的变态反应、发痒、唇舌肿胀或突然咳嗽。

沙立度胺: 沙立度胺是谷氨酸的衍生物, 在 20 世纪 50 年代最早被开据处方作为止吐药。不幸的是, 发现沙立度胺在胎儿形成中具有致畸作用。因此, 沙立度胺退出了市场。近些年, 在其他药物领域中研究了沙立度胺。发现沙立度胺能显著减少新血管的形成并抑制血管内皮生长因子(VEGF)诱发的血管发生, 血管发生是血液学恶性病的重要进程。几项临床试验暗示沙立度胺可能也具有抗肿瘤性质。

沙立度胺存在两种异构体形式, 将它们称为右手性的和左手性的。这两种异构体自然互换, 形成外消旋混合物。沙立度胺衍生的类似物包括免疫调节药(IMiD)和 SelCID(选择性细胞因子抑制药)。IMiD 的例子包括但不限于 CC-4047 和 CC-5013。SelCID 的例子包括但不限于 CC-7034 和 CC-9088。沙立度胺的其他衍生物包括但不限于 lenalidomide、 α -EM12、 β -EM12 和邻苯二甲酰邻苯二甲酰亚胺。

在近些年, 已发现沙立度胺在各种疾病, 包括但不限于 AIDS、麻疯病、风湿性关节炎和癌症的治疗中具有一些作用。具体地, 在 HIV 患者中, 沙立度胺有助于减少 cashexia(身体和肌肉质量的进行性减少)的作用和治疗 aphothous 溃疡(口咽中的疮生长)。沙立度胺还能有效地停止 HIV 复制。还显示沙立度胺具有抗炎和免疫抑制性质, 这使得其可能有效地治疗贝切赫特病(Behcet's disease)、肉瘤、硬皮病和克罗恩病。

此外, 已经确定沙立度胺为用于治疗晚期复发和难控的多发性骨

髓瘤(MM)的有效的疗法(Singhal 等人 1999 N. Engl. J. Med. 341: 1565-1571)。已研究证实,沙立度胺和 IMiD 两者不仅抑制血管发生,而且直接诱发耐受骨髓瘤细胞中的凋亡和生长抑制。它们还阻断骨髓瘤细胞与骨髓间质细胞的结合以及对凋亡的相关保护,阻断骨髓瘤细胞生长、存活和迁移因子如白介素-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和血管内皮生长因子的分泌增加,这种分泌的增加是由骨髓瘤细胞与骨髓间质细胞的结合引发的。而且,它们在体内扩大天然杀伤细胞和 T 细胞的数量,改善对抗人骨髓瘤细胞的功能,增强这些细胞对抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的敏感性。(参见例如 Anderson 等人 2001 Semin Hematol 38: 6-10; Hideshima 等人 2000 Blood 96: 2943-2950; Gupta *et al* 2001 Leukemia 15: 1950-1961; Davies 等人 2001 Blood 98: 210-216; Treon 等人 2001 J Immunother 24: 236-271; Lentzsch 等人 2003 Leukemia 17: 41-44)。但是,沙立度胺的功效明显受到不良作用的限制,不良作用包括:镇静、神经病、便秘和深静脉血栓症。

多柔比星:多柔比星(阿霉素、DOX、ADM)是由真菌 *streptomyces peucetius* 产生的蒽环类抗生素,已经被批准用于治疗各种癌症。多柔比星是 DNA 拓扑异构酶 II 的抑制剂;它通过蒽环部分的插入、金属离子的螯合或者通过产生自由基来损害 DNA。尽管没有经 FDA 批准的化学治疗药物可用于治疗肝细胞癌,但多柔比星现在被用作“标准的”化学治疗。在包括 475 名可评价患者的八项试验中报告的响应率为 16%(范围为 0-35%)(Engstrom PF 等人, (1993) in Cancer Medicine Holland JF, Frei E (eds) pp. 1430-1441. London: Lea 和 Febiger)。

生活质量(QOL):癌症治疗成功的评价措施包括但不限于肿瘤块和类型以及肿瘤扩散速率和数量的变化(被评价肿瘤的局部和远端)。化学治疗的领域的技术人员还能够确定特定的治疗方法是否可提高患者的预期寿命和生活质量(即使对那些对通常治疗没有响应的患者)。例如,可以通过几种标准来确定对胃肠疾病的有效治疗,这些标准包括但不限于肠炎评分(基于临床症状如腹痛、痛性痉挛、粪便中的愈创木

脂和腹泻的综合评分)、以及相关终点如所递送的化学治疗的剂量百分比、住院天数、输血、静脉输液治疗、抗运动剂和饮食能力。

关于治疗作用,患者的自觉症状并非始终符合医生所进行试验的结果。例如:即使在获得不利测试结果的情况下,当尿失禁和排泄的发生减少时,患者也相信治疗已经起作用,其结果是生活质量(QOL)得到改善。在化学治疗的过程中,患者生命中的负面副作用如脱发、体重下降、食欲减退、疲劳、腹泻、恶心、呕吐等可能会持续并且导致日夜不停的缓慢折磨,这从身体上和精神上对于患者均是无法忍受的。因此,本发明方法的治疗效力是指不仅部分或完全免除疼痛或者减少肿瘤生长或癌症进程,而且减少或消除通常与治疗相关的副作用,其总体结果是提高了生活质量。

可以包括基线评价作为治疗方案的组成部分,由此测量各种标准并使这些标准与 QOL 关联。此外,患者可以报告患者每日情况如感觉“平静”或经受“中度”疼痛。然后在治疗过程之中和之后使用这些测量,以评价患者是否感觉生活质量已经得到改善。

2. 寄生虫感染的化学治疗

寄生原生动物在人和动物中导致各种感染,由寄生原生动物导致的许多疾病对宿主是致命的。例如,尽管国际上作了巨大努力来根除疟疾,但是它仍然对人体健康有明显的威胁;锥虫病如由克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)导致的恰加斯病和由布氏锥虫(*T. brucei*)导致的非洲睡眠病在非洲和南美中并不罕见;在无免疫应答的宿主中,由卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)、鼠弓形体(*Toxoplasma gondii*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium spp.*)导致的机会性感染在发达国家中正在日益变得显著。

在一些原生动物病如恰加斯病中,没有令人满意的治疗;在其他疾病中,可能产生原生动物的耐药株。因此,仍需要确定新的且有效的抗原生动物药物。然而,就大部分情况而言,通过抗一组寄生虫的天然产物和合成化合物的生物筛选来发现抗寄生虫药物,这是随机和

费时的方法。

尽管在疫苗开发中有令人鼓舞的进展，但是化学治疗仍然是控制大多数寄生虫感染的单一最有效、有效率和廉价的方式(Tracy 和 Webster, *Chemotherapy of Parasitic Infections*, in Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Edition, pages 955-985, 1996)。目前可用的药物在治疗由吸虫和肠寄生虫导致的人体感染方面特别有效。但是迫切需要新型或更好的药物来抵抗全身感染如囊尾幼虫病、丝虫病、利什曼病、旋毛虫病和锥虫病，阻止特别由疟疾和其他原生动动物寄生虫表现出的耐药性的形成。原生动动物寄生虫对药物产生耐药性远易于蠕虫对药物产生耐药性，这与其在宿主中更迅速增殖的情况一致。

抗寄生虫药物在患者中应安全而有效，这是必需的。抗寄生虫药物的治疗功效是复杂的，取决于宿主、寄生虫和环境因素。因此，通常通过试验和误差来决定最佳药物和最佳剂量方案，而非来自对患地方病感染的患者进行细致的药物动力学和药效学研究。为了进行正确的评价，仅应在适当的流行病学研究公开了传播模式和年龄特异性流行性与疾病感染强度之间的关系之后，再制定基于人群的化学治疗方案。为了得到最佳结果，应将化学治疗与其他适合于特定感染、环境和宿主人群的公众健康措施联用。用于群体化学治疗的理想药剂应该对感染性寄生虫的所有发育阶段具有广泛活性。在仅口服一天的高治疗剂量下，它也应是安全的：在使用条件下保持化学稳定性；作为耐药性的诱发物是有效的；并且是廉价的。目前几乎没有可用的抗寄生虫药物满足这些标准。

对无性生殖红细胞疟疾寄生虫有效的化学治疗药物包括氯奎、奎宁、甲氟奎和卤泛群。其他药物如乙胺嘧啶、磺胺类、砒类和四环素类作用缓慢且疗效低于上述药剂，由此通常将它们与其他化学治疗药物联用。药剂如阿托伐醌、氯奎、糠酸二氯尼特、依氟鸟氨酸、依米丁和去氢依米丁、8-羟基喹啉类、美拉脾醇、甲硝唑、硝呋替莫、喷他

脘、米帕林、锑酰葡萄糖酸钠和舒拉明可有效地治疗寄生虫感染，包括锥虫病、利什曼病、阿米巴病、甲第虫病和毛滴虫病。最终，通常用驱肠虫药如苯并咪唑、乙胺嗪、伊维菌素、美曲磷酯、氯硝柳胺、奥沙尼喹、哌嗪、吡喹酮和双羟萘酸噻嘧啶治疗带有寄生虫蠕虫、蠕虫病的感染。关于寄生虫感染化学治疗的综述，参见 Tracy 和 Webster 的，文献同上。

3. 微生物疾病的化学治疗

在 1936 年，由 Colebrook 和 Kenny 以及 Buttle 和合作者报道了使用磺胺在产后脓毒病和脑膜炎球菌感染中的有利临床结果，这使医学领域人员意识到了抗菌化学治疗的新领域。在 1941 年，青霉素大量生产并首次用于有限的临床试验。目前，全部住院患者中至少 30%接受使用抗生素的一个或多个疗程，已经治愈了数以百万计可能致命的感染。

抗生素是由各种微生物(细菌、真菌、放线菌)产生的物质，它们可抑制其他微生物的生长，最终可以消灭它们。然而，通常将该术语扩展至包括合成的细菌活性剂，例如磺胺类和喹诺酮类，它们并非微生物的产物。抗生素在物理、化学和药理学特性、抗菌谱以及作用机理方面各不相同。

基于化学结构和提示作用机理的最常见抗菌剂分类如下：(1)抑制细菌细胞壁合成的药剂；例如结构相似的青霉素类和头孢菌素类、不相似的药剂如环丝氨酸、万古霉素、杆菌肽，以及咪唑类抗真菌药如咪康唑、酮康唑和克霉唑；(2)直接对微生物细胞膜起作用的药剂，从而影响渗透性并导致胞内化合物泄漏；它们包括洗涤剂、多粘菌素和多粘菌素 E 甲磺酸，以及与细胞壁固醇类结合的多烯类抗真菌药；(3)影响 30S 或 50S 核糖体亚基功能，导致对蛋白质合成的可逆抑制的药剂；这些制菌药物包括氯霉素、四环素类、红霉素和克林霉素；(4)与 30S 核糖体亚基结合并改变蛋白质合成(其最终导致细胞死亡)的药剂；它们包括氨基糖苷类；(5)影响核酸代谢的药剂，如抑制 DNA-依赖性

RNA 聚合酶的利福霉素(例如利福平), 和抑制回旋酶的喹诺酮类; (6) 抗代谢物, 包括甲氧苄啶和磺胺类, 它们阻断微生物必需的特定代谢步骤; (7)核酸类似物, 如齐多夫定、更昔洛韦、阿糖腺苷和阿昔洛韦, 它们抑制 DNA 合成必需的病毒酶, 从而终止病毒复制。(参见 Chambers 和 Sande, Section IX Chemotherapy of Microbial Diseases: Antimicrobial Agents, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, page 1029, 1996.)

抗生素在治疗感染方面是否有效取决于几个因素。要使抗生素有效, 必须在感染部位获得足够的抗生素浓度以抑制细菌生长。然而, 药物的浓度必须保持在对人体细胞具有毒性的浓度以下。如果抑制或杀灭微生物所需的抗生素浓度大于可以获得安全性的浓度, 则认为微生物对该抗生素具有耐药性。细菌可能对抗菌剂产生耐药性, 这是因为该药剂不能达到其靶、该药剂失活或所述靶已改变。一些细菌产生保留在细胞表面上或细胞表面内的酶而使药物失活。其他细菌具有防止药物进入的不透性细胞膜。一些细菌缺乏由孔蛋白构成的水通道, 亲水药剂使用该通道跨过细菌的外膜, 而其他细菌缺乏药物进入细菌细胞所需的转运体系。抗生素抗性病原体的出现导致对治疗抗微生物疾病的新型药物和新型方法存在持久增加的需求。

B. 抗病毒治疗

1. 病毒和病毒性疾病

病毒是不能由其自身再生的微生物。然而, 通过感染宿主细胞, 病毒利用宿主细胞的代谢机质产生更多的病毒物质。宿主细胞内的病毒感染和复制通常导致疾病, 无论该宿主是动物还是植物。由病毒感染导致的人体疾病包括例如获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和肝炎。对该领域的一般性讨论列于 Fundamental Virology, Second Edition, (ed. B. N. Fields, D. M. Knipe, R. M. Chanock, M. S. Hirsh, J. L. Melnick, T. P. Monath, and B. Roizman, Raven Press, Ltd., New York, N.Y. 1991)。下面讨论几种病毒和它们导致的疾病例子。

逆转录病毒：逆转录病毒包括主要感染脊椎动物的病毒大家族。许多疾病，包括一些肿瘤的诱发与逆转录病毒感染有关(参见同上 Fundamental Virology, pp. 645-708)。逆转录病毒包含通过 DNA 中间体复制的 RNA 基因组。在逆转录病毒生命周期早期，RNA 基因组通过病毒编码的逆转录酶(RT)被拷贝到 DNA 中。该酶能够使用 RNA 和 DNA 模板，从而由感染性 RNA 基因组产生第一链 DNA(负链)，使用第一链 DNA 作为模板产生 DNA 的互补第二链(正链)。为了合成这些 DNA 链，RT 利用称作脱氧核苷三磷酸(dNTP)的细胞底物。

能够将人逆转录病毒分类成白血病病毒(HTLV 型病毒)和免疫缺陷病毒(HIV 型病毒)。HTLV 感染可以导致一种形式的白血病。HIV 感染导致获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。存在两种相关的人免疫缺陷病毒：HIV-1 和 HIV-2。HIV-1 的毒力超过 HIV-2。HTLV 和 HIV 均感染外周血液淋巴细胞(PBL)。

其他动物逆转录病毒包括猫白血病病毒(FeLV)和慢病毒属。有毒力的 FeLV 感染一般导致猫致死性再生障碍性贫血。慢病毒属导致各种神经和免疫疾病，例如绵羊的绵羊脱髓鞘性脑白质炎和马的感染性贫血。

感染人、动物和植物的几种其他病毒也依赖逆转录酶进行复制。它们包括逆转录病毒如已知存在于几个种类中的白血病病毒，包括人体 HTLV-1，以及逆转录酶依赖性 DNA 病毒，例如花椰菜花叶病毒(植物病毒)。

病毒性肝炎：肝炎是人体肝的疾病。它的表现为肝发炎，通常由病毒感染引起，有时来自毒性剂。肝炎可以发展成肝硬化、肝癌，并最终导致死亡。已知几种病毒如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒和己型肝炎病毒可导致不同类型的病毒性肝炎。其中，HBV 和 HCV 最为严重。

乙型肝炎由 DNA 病毒引起。它具有 50-160 天的长潜伏期。它通常通过注射受感染的血液或血液衍生物或通过使用受污染的针头、刺血

针或其他器械而传播。乙型肝炎病毒感染导致肝广泛损伤。此外，慢性乙型肝炎感染与随后发展成属于主要死亡原因的肝细胞癌相关。

丙型肝炎由 RNA 病毒引起。潜伏期为 6-8 周，其中约 75%为亚临床感染，并产生慢性持久性感染。很高的百分比发展成慢性肝病，从而导致肝硬化和可能的肝细胞癌。丙型肝炎难以治疗，据估计全世界有 5 亿人感染它(约为感染 HIV 的 15 倍)。

疱疹病毒：分离自人体的疱疹病毒包括但不限于：单纯疱疹 1 型病毒(“HSV-1”)、单纯疱疹 2 型病毒(“HSV-2”)、人巨细胞病毒(“HCMV”)、水痘-带状疱疹病毒(“VZV”)、EB 病毒(“EBV”)、人 6 型疱疹病毒(“HHV6”)、单纯疱疹 7 型病毒(“HSV-7”)、单纯疱疹 8 型病毒(“HSV-8”)。还从马、牛、猪(假狂犬病病毒(“PSV”)和猪巨细胞病毒)、鸡(感染中性喉气管炎)、黑猩猩、鸟类(马立克氏病 1 型和 2 型疱疹病毒)、火鸡和鱼中分离出疱疹病毒(参见“Herpesviridae: A Brief Introduction”, Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, Chapter 64, 1787 (1990))。

单纯疱疹病毒(“HSV”)感染一般是复发性病毒感染，其特征在在于炎症轻度增加的基础上，皮肤或粘膜上出现充满澄清液体的单一或多簇小泡。

单纯疱疹病毒是相对大尺寸的病毒。HSV-2 通常产生唇单纯性疱疹。通常但并不总能从生殖器损害中回收 HSV-2。一般来说，HSV-2 通过性交传播。

由水痘-带状疱疹病毒(人 3 型疱疹病毒)导致的疾病包括水痘(水痘)和带状疱疹(带状疱疹)。巨细胞病毒(人 5 型疱疹病毒)导致婴儿中的巨细胞包含体疾病。EB 病毒(人 4 型疱疹病毒)是传染性单核细胞增多的病原体，与伯基特淋巴瘤和鼻咽癌有关。可以对人造成难题的动物疱疹病毒包括 B 病毒(Old World 猴子的疱疹病毒)和绒猴疱疹病毒(New World 猴子的疱疹病毒)。

2. 抗病毒剂

抗病毒剂包括治疗生殖器疱疹的药物如阿昔洛韦(ACV)到治疗 AIDS 的药物如齐多夫定(AZT)和双脱氧肌苷(DDI)。下面讨论几种抗病毒剂的例子。

在许多年中,开发了抗逆转录病毒的药物来治疗 AIDS。抗逆转录病毒药物包括例如: Abacavir(ABC)、Adefovir(ADV)、Amprenavir(APV)、齐多夫定(AZT)、去羟肌苷(ddI)、扎西他滨(ddC)、Stavudine(d4T)、Efavirenz(EFV)、拉米夫定(3TC)、沙奎那韦(SQV)、Indinavir(IDV)、Ritonavir(RTV)、Delavirdine(DLV)、Nelfinavir(NFV)、奈韦拉平(NVP)。然而,用抗病毒剂物治疗 AIDS 的尝试没有满足所需的成功程度。尽管一些抗病毒剂物的功效较高,但是最初体外/体内测试的特征在于迅速产生耐受这些药物的 HIV-1 变体。另外,使用抗病毒药物存在潜在的毒性。需要有效而安全的方式来治疗 AIDS。

没有局部或全身化学治疗药物被证实对治疗单纯疱疹病毒有效,但可能不包括在表浅疱疹性角膜炎中使用的局部用碘苷(IDU)。对该化合物在皮肤疱疹中作用的报道是不一致的。已经用于治疗 HSV 的其他药物包括三氟胸苷、阿糖胸苷(阿糖胸普, ara-A)、阿昔洛韦,其他病毒 DNA 合成抑制剂可能对疱疹性角膜炎有效。这些药物抑制单纯疱疹病毒的复制,可以抑制临床表现。然而,单独疱疹病毒仍然隐藏在感觉神经节中,复发的比例在药物治疗和未治疗的个体中相似。此外,已经出现了一些耐药性疱疹病毒菌株。因此,还需要开发更有效的方式来治疗与单纯疱疹病毒相关的疾病。

目前,乙型肝炎病毒(HBV)感染的预防方法是安全有效地接种乙型肝炎疫苗。然而,接种疫苗对那些已经感染的个体(即携带者和患者)无效。许多药物已经用于治疗慢性乙型肝炎,除了干扰素,无一被证明是有效的。

对于丙型肝炎,目前没有可用的有效免疫方法,仅能通过其他预防措施如改善卫生保健和卫生条件并阻断传播途径来控制丙型肝炎。目前,唯一可接受的慢性丙型肝炎治疗是干扰素和/或利巴韦林,前者

需要至少六(6)个月的治疗，后者能够抑制受感染细胞中的病毒复制，并改善一些人的肝功。然而，用干扰素、用或不用利巴韦林治疗具有有限的长期功效，其响应率约为 25%。

C. PHY906

介绍: PHY906 是传统中草药制剂，由四味分别选自四种草药属之一的草药组成。所述四种草药属通常称作黄芩属(有时称作 Scute)、甘草、芍药和枣属果实(表 3)。因此，为了制备本发明所需的草药组合物，从表 3 提供的四种植物属的每一种中选择一种植物种。尽管提供了所列植物种的特定组合作为优选 PHY906 制剂的例子，但是本发明的组合物和方法包括四种植物种的任何组合，其中植物种选自表 3 中四组的每一种。本发明包括这类草药的任何这类组合，所述的草药具有至少一种本文所述的 PHY906 产生的生物活性或所需作用。

表 3 . 能够用于制备 PHY906 的四个属的特定种的例子

TCM 草药属的常用英文名			
黄芩属(Scutellaria)	甘草(Licorice)	芍药(Peony Alba)	枣 属 果 实 (Ziziphi Fruit)
草 玉 梅 (<i>Anemone rivularis</i> Buch.-Ham. ex DC.)	毛相思子(<i>Abrus mollis</i> Hance)	黄 牡 丹 (<i>Paeonia delavayi</i> Franch. var. lutea (Delavay ex Franch.) Finet et Gagnep.)	枣 (<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.)
峨 眉 糖 松 果 (<i>Thalictrum omelense</i> W.T. Wang et S.H. Wang)	粗 毛 甘 草 (<i>Glycyrrhiza aspera</i> Pall.)	芍药(<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.)	无 刺 枣 (<i>Ziziphus jujuba</i> Mill. var. inermis)
扁 阔 叶 十 大 功 劳 (<i>Mahonia bealei</i> (Fort.) Carr.)	黄 甘 草 (<i>Glycyrrhiza eurycarpa</i> P.C.Li)	美 丽 芍 药 (<i>Paeonia mairei</i> Levi.)	

南天竹 (<i>Nandina domestica</i> Thunb.)	洋甘草 (<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.)	毛叶草芍药 (<i>Paeonia obovata</i> Maxim. var. <i>willmottiae</i> (Stapf) Stern)	
滇黄芩 (<i>Scutellaria amoena</i> C.H. Wright)	胀果甘草 (<i>Glycyrrhiza inflata</i> Bat.)	雪花构 (<i>Daphne papyracea</i> Wall. ex Steud.)	
<i>Scutellaria amoena</i> C.H. Wright var. <i>cinerea</i> Hand.-Mazz.	圆果甘草 (<i>Glycyrrhiza squamulosa</i> Franch.)	青羊参 (<i>Cynanchum otophyllum</i> Schneid.)	
黄芩 (<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi)	甘草 (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	羊乳 (<i>Codonopsis lanceolaria</i> Sieb. et Zucc. Trautv.)	
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi var. <i>albiflora</i> K. Onuma	假秦艽 (<i>Phlomis betonicoides</i> Diels)		
中甸黄芩 (<i>Scutellaria chungtienensis</i> C.Y. Wu)			
连翘叶黄芩 (<i>Scutellaria hypericifolia</i> Levl)			
丽江黄芩 (<i>Scutellaria likiangensis</i> Diels)			
<i>Scutellaria obtusifolia</i> Hemsl. var. <i>trinervata</i> (Vant.) C.Y. Wu et H.W. Li			
狄叶黄芩 (<i>Scutellaria regeliana</i> Nakai)			
<i>Scutellaria regeliana</i> Nakai var. <i>ikonnikovii</i> (Juz.) C.Y. Wu et H.W. Li			

甘肃黄芩 (<i>Scutellaria rehderiana</i> Diels)			
<i>Scutellaria tenax</i> W.W. Smith var. <i>patentipilosa</i> (Hand. -Marz.) C.Y. Wu			
粘毛黄芩 (<i>Scutellaria viscidula</i> Bunge)			

这种草药制剂已经在亚洲长期用于治疗各种疾病，如心脏扩张、腹部痉挛、发热、头痛、呕吐、干呕、口渴和粘样粪便(Hani Oka 和 Taki No, 1998)。将优选的 PHY906 制剂列在表 4 中。

表 4. TCM 制剂 PHY906 的草药成分

科学名	百分比	常用名	传统用途
黄芩	33.3	黄芩根	用于降低毛细管通透性；减少炎症；治疗肠炎和痢疾；增加胆汁分泌以治疗黄疸；治疗肌痉挛以治疗咳嗽；排出寄生虫
甘草	22.2	甘草根	用于润肺止咳；松弛痉挛并止痛；节制草药的作用；泻火和释放毒素
枣	22.2	海枣	具有利尿和强身作用
芍药	22.2	白芍根	用于抑制和缓解疼痛；安抚韧带并纯化血液

替代 PHY906 制剂具有黄芩属、甘草属、枣属和芍药属草药，其相对比例分别如下：4/14:3/14:4/14:3/14。

尽管提供了 PHY906 草药的特定比例作为例子，但本发明的组合物和方法包括具有本文所述的所需生物活性的任何比例的四种草药成分。

目前，由 Sun Ten Laboratories, Inc., in Irvine, CA (台湾 Sun Ten

Pharmaceutical Co. Ltd.的子公司)使用表 4 提供的制剂生产 PHY906 明胶胶囊和颗粒药袋。自 1983 年以来,这种 PHY906 制剂由 Brion Herbs Corporation (12020 B Centralia Road, Hawaiian Garden, CA, 90716)作为食物增补剂分配和销售。

生产: 提供了对能够用于生产 PHY906 的工艺简单综述。首先,将适当比例的草药粗原料成分置于夹套反应器中,在升高的恒温下用水萃取,同时搅拌。所述配比列于由专家制剂记录再现的生产说明。然后用 120 目筛从所述液体中分离固体物质。收集滤液,然后通过减压蒸发水而浓缩。在升温下将浓缩的液体喷雾干燥,以得到干粉,接着处理干粉,以得到成粒的粉末。然后将这种松散的物质配制成所需的剂型。

利用工艺控制确保产品的均匀性和完整性。这类工艺控制包括但不限于:检查加工液体的体积、确定 HPLC 以建立化学指纹分析,鉴定所述原料的特性和对中间体和终产品的检查和测定。为所进行的每种分析以及制备和生产控制的每一步骤建立可接受的质量水平(AQL)限度。

在生产说明记录中,为生产过程所用的所有成分指定特定批号。在批量投料前复查质量控制记录。

使用纯标记物来鉴定和控制原料以及草药物质的质量。表 5 列出了用于制备 PHY-06 草药的各原料的标记物。

表 5. 用于 PHY906 草药成分的标记物

草药	草药的原产地	标记物
黄芩	中国山西省	贝加灵
甘草	中国内蒙古自治区	甘草甜
枣	中国河北/山东省	白屈菜酸
芍药	中国安徽省	芍药苷

D. PHY906 的药物制剂

可以通过非肠道、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、经皮或含服途径给药本发明的组合物。作为替代或同时，可以通过口服途径给药。所给药的剂量将取决于受体的年龄、健康和体重、同时进行治疗类型(如果有的话)、治疗频率和所需作用的性质。

可以将本发明用于全身给药的药物制剂配制成用于肠道、非肠道或局部给药。实际上，可以同时使用所有这三种类型的制剂，以实现活性成分的全身给药。

本发明还提供了包含一种或多种治疗药的组合物，该组合物可治疗各种类型癌症和/或调节造血活性，例如肺结核(T.B.)、天然杀伤细胞(NK)、单核细胞和树突细胞的免疫调节。

尽管个体需要不同，但是确定各成分有效量的最佳范围在现有技术范围内。

除药用活性剂外，本发明的组合物还可以包含合适的可药用载体，包括赋形剂和助剂，它们有利于将所述活性化合物加工成制剂，该制剂能够用于将药物递送至作用部位。

PHY906 能够以药物制剂的形式使用，例如为固体、半固体或液体的形式，其中包含作为活性成分的 PHY906，并混有适合外用、肠道或非肠道应用的有机或无机载体或赋形剂。可以将所述活性成分与例如常用的无毒可药用载体混合成片剂、丸剂、胶囊、栓剂、溶液、乳剂、混悬剂和适合应用的任何其他形式。本发明的制剂包括如下制剂，其包含滑石、水、葡萄糖、乳糖、阿拉伯树胶、明胶、甘露醇、淀粉糊、三硅酸镁、玉米淀粉、角蛋白、胶体二氧化硅、马铃薯淀粉、尿素和适用于生产固体、半固体或液体形式制剂的其他载体，还可以使用助剂、稳定剂、增稠剂、着色剂和香料。

为了制备固体组合物如片剂或胶囊，将 PHY906 与药物载体(例如常用片剂成分，如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸氢二钙或树胶)和其他药用稀释剂(例如水)混合，以形

成固体预配制组合物，它包含基本上均匀的 PHY906 混合物或其无毒药理学可接受的盐。当将预配制组合物称为基本上均匀时，是指将活性成分均匀分散在组合物中，使得可以方便地将该组合物再分成等效的单位剂型，如片剂、丸剂和胶囊。然后将这种固体预配制组合物再分成包含有效量本发明组合物的上述单位剂型类型，优选胶囊。

能够给包含 PHY906 的片剂或丸剂包衣或以其他方式复合，以提供具有延长作用优点的剂型。例如，所述片剂或丸剂能够包括内层剂量和外层剂量成分，后者作为前者的外部封盖的形式。两种成分能够被肠溶层隔开，该层用于阻止在胃中崩解，使内部成分完整无缺地进入十二指肠，或用于延迟释放。能够将各种材料用于这类肠溶层或衣料，这类材料包括许多聚合酸以及聚合酸与如下材料如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的混合物。

可以包括 PHY906 用于口服或通过注射给药的液体形式包括：水溶液、适当调味的糖浆、水或油混悬剂和包含食用油如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油的调味乳剂以及酞剂和类似的药物载体。适用于水混悬剂的分散剂或助悬剂包括：合成的天然树胶，如黄芪胶、阿拉伯胶、藻酸盐、右旋糖酐、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶。

用于口服给药的液体制剂可以采用例如溶液、糖浆或混悬剂的形式，或者它们可以作为在使用前用水或其他合适载体再溶解的干燥产品。可以通过常规方式，使用药理学可接受的添加剂制备这类液体制剂，所述添加剂为例如：助悬剂(例如山梨醇糖浆、甲基纤维素或氢化的可食用脂肪)；乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶)；非水载体(例如杏仁油、油酯类或乙醇)；防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)；和人工或天然着色剂和/或甜味剂。

对于口腔给药，本发明的组合物可以采用以常规方式配制成的片剂或锭剂形式。

还可以将 PHY906 配制成通过注射给药的非肠道制剂，注射包括

使用常规的导管插入技术或输注。注射用制剂可以存在于单元剂型中，例如在安瓿或多剂量容器中，包含添加的防腐剂。所述组合物可以采用如下形式，例如在油或水性载体中的混悬剂、溶液或乳剂，可以包含配制剂如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。或者，所述活性成分可以是粉末形式，用于在使用前以合适的载体例如无菌无热原的水再溶解。

用于非肠道给药的合适制剂包括可水溶形式的活性化合物的溶液，例如水溶性盐的溶液。此外，可以将活性化合物的悬浮液作为适当的油性注射混悬剂给药。合适的亲脂性溶剂或载体包括：脂肪油，例如芝麻油或合成的脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯。含水注射混悬剂可以包含增加所述混悬剂粘度的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或右旋糖酐。任选地，该混悬剂还可以包含稳定剂。还能够使用脂质体包封药剂，用于递送至细胞中。

在实践本发明的方法时，可以单独或组合使用 PHY906，或者与其他治疗剂或诊断剂组合。在某些优选实施方案中，可以根据通常接受的医学实践，将本发明的化合物与用于癌症化学治疗的典型处方的其他化合物共同给药。可以将本发明的化合物在体内，一般为哺乳动物如人、绵羊、马、牛、猪、狗、猫、大鼠和小鼠体内使用，或在体外使用。

用于制备可给药组合物的实际方法和给药至受体所必需的调整对本领域技术人员将是已知或显而易见的，详细描述于例如 Remington's Pharmaceutical Science, 17th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)中，该文献被引入本文作为参考。

“治疗指数”用于表示在比较治疗作用和不良作用时，对药物选择性的定性描述。例如，如果将不良作用标为 T (就毒性而言)，将治疗作用标为 E ，则治疗指数可以定义为 TD_{50}/ED_{50} ，或者在一些其他任何响应水平下的近似比。

E. 使用 PHY906 的方法

本发明提供了联合使用 PHY906 和治疗剂来治疗各种疾病、症状或病症的方法。

具体地，本发明提供了联合使用 PHY906 和化学治疗药物来治疗疾病、症状或病症的方法。优选地，本发明提供了治疗癌症的方法，该方法包括向患者联合给药一种或多种癌症化学治疗药物和 PHY906。所述化学治疗药物包括但不限于 CPT-11、5-FU/LV、VP-16、L-OddC、卡培他滨、吉西他滨、奥沙利铂、沙立度胺、多柔比星、及其组合。更优选地，本发明提供了治疗结肠直肠癌、胰腺癌、肝细胞癌的方法，该方法包括联合给药 CPT-11/FU/LV、奥沙利铂/FU/LV 或奥沙利铂/吉西他滨和 PHY906。

本发明关注联合使用 PHY906 和抗病毒剂来治疗疾病、症状或病症的方法。优选地，本发明提供了治疗与病毒感染相关的疾病的方法，该方法包括向患者联合给药一种或多种抗病毒剂和 PHY906。更优选地，本发明提供了治疗 AIDS 的方法，该方法包括联合给药一种或多种抗逆转录病毒药和 PHY906。甚至更优选地，所述抗逆转录病毒药选自 AZT、D4T、DDC、3TC 和 DDI。最优选地，向患者给药包括三种抗病毒剂和 PHY906 的组合。三种抗病毒剂的优选组合包括但不限于：1) D4T、3TC 和蛋白酶抑制剂；2) AZT、3TC 和蛋白酶抑制剂；和 3) AZT、DDI 和蛋白酶抑制剂。用于治疗 HIV 的优选蛋白酶抑制剂包括但不限于奈非那韦、茚地那韦、沙奎那韦和利托那韦。

在本发明的一个方面，向细胞系如癌症或癌细胞系和 HIV 细胞系给药 PHY906，以评价 PHY906 对不同细胞系的毒性。优选地，所述癌症或癌细胞系包括但不限于：Jurkat、KB、HepG2、Hep G1.6、T-细胞淋巴瘤(CEM)、结肠 26、结肠 38、HCT116、PANC 01、PANC 02、HPAC，所述 HIV 细胞系包括但不限于 H9 细胞和 MT-2 细胞。

在本发明的另一个方面，向动物联合给药 PHY906 与一种或多种化学治疗药物或抗病毒剂，以确定 PHY906 是否可以有效地提高所述活性剂的治疗指数和正经历化学治疗的或抗病毒治疗的动物的生活质

量。优选地，所述动物是哺乳动物。更优选地，所述哺乳动物是人。

动物可能是用于特定癌症或病毒性疾病的动物模型。此外，动物可能具有缺陷型免疫系统。这类动物模型在本领域中是公知的。已经将天然免疫缺陷的小鼠用于研究免疫系统、癌症和感染性疾病，包括获得性免疫缺陷综合征或 AIDS。例如，裸(NU)鼠是无胸腺的，所以不能发生 T 细胞分化和成熟。作为异种移植、尤其是人肿瘤宿主和抗癌药的测试，裸鼠已经被使用了许多年。严重的联合免疫缺陷综合征(SCID)小鼠表现出 TCR(T 细胞受体)和免疫球蛋白基因均为有缺陷的重排，表现出严重的免疫缺陷。beige(BG)小鼠携带有功能性天然杀伤细胞缺陷，而 X-连接的免疫缺陷(XID)小鼠在产生 B 细胞方面存在缺陷。此外，已经在各种品系中进行了杂交，以产生带有更广泛免疫缺陷表型的品系(例如 BG/NU 和 BG/NU/XID)。

可以考虑将其他实验动物作为用于本发明的实验室动物候选者，它们几乎没有或没有自身免疫系统，或者已经用药物或放射处理，或者是通过传统遗传发育或遗传工程产生的，以具有受抑制的免疫系统、弱化的免疫系统或变性的免疫系统或者根本没有免疫系统，例如 SCID 马和其他 SCID 动物以及甚至潜在 AIDS 感染的动物，其中在动物的免疫系统被破坏或失活后，AIDS 已经被抑制((Perryman L. E., McGuire, T. C., Torbeck, R. L., and Magnuson, N. S., Clin. Immunol. Immunopath., 23(1): 1-9, 1982)。

用于研究经胎盘或产期抗逆转录病毒治疗的鼠模型是公知的(Sharpe 等人 (1987) Science 236: 1671-1674; Sharpe 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 9792-9796; Sharpe 等人 (1989) J. Virol. 63: 1049-1053)。此外，已经确定应用猕猴作为哺乳动物模型，来研究由猿猴巨细胞病毒、Venezuelan 和西方马脑炎病毒、以及腮腺炎病毒导致的非逆转录病毒胎儿感染的过程(London 等人 (1986) Teratology 33: 323-331; London 等人 (1977) Teratology 16: 285-296; London 等人 (1982) Teratology 25: 71-79; London 等人 (1979) J. Inf. Diseases 139: 324-

328)。用猿猴免疫缺陷病毒(SIV)感染猕猴(*Macaca mulatta*)近似地模拟了人中的 HIV-1 感染。HIV-1 和 SIV 都是具有相似分子结构的慢病毒属病毒(Chakrabarti 等人 (1987) *Nature* 328: 543-547), 均引起免疫缺陷, 从而导致机会致病菌感染以及中枢神经体系损害(Letvin 等人 (1985) *Science* 230: 71-73)。

已经报道将所产生的动物模型用于研究 AIDS 和骨髓细胞分化, 其中在将人胎儿肝、胸腺和淋巴节共植入 SCID 小鼠以形成 SCID/nu 小鼠时, 人淋巴细胞短暂增殖(McCune 等人 (1988) *Science* 241: 1632-1686)。这些小鼠中的人免疫组织对人免疫缺陷病毒(HIV)感染敏感(Namikawa 等人 (1988) *Science* 242: 1684-1686), 近来已经将该模型用于测试 AZT 在延缓 AIDS 病毒复制中的效力。

美国专利 6,184,436 公开了用作 AIDS 小动物模型的转基因小鼠。该小鼠包括转基因, 转基因包括在与人 CD4 启动子的可操作连接中编码 HIV-1 的 DNA 序列, 位于小鼠 CD4 基因增强子的侧翼。该小鼠发生了严重的 AIDS 疾病并导致早期死亡。

在优选实施方案中, 对于用一种或多种化学治疗药物或抗病毒剂与 PHY906 联合治疗的动物, 评价其体重下降和存活率, 并与仅给药所述一种或多种化学治疗药物或抗病毒剂的对照动物比较。还可能评价 PHY906 对抗肿瘤或抗病毒活性的作用, 以确定 PHY906 的功效。

具体地, 可能将 PHY906 评价为抗病毒治疗如 AIDS 的调节剂。能够使用上述用于 AIDS 的任何动物模型。第一步包括通过评价动物的体重下降, 确定对健康动物给药的抗病毒剂或抗病毒剂组合的最大耐受剂量。第二步包括对诊断为 AIDS 的动物给药抗病毒剂或抗病毒剂与 PHY906 的组合。评价动物的体重, 与在治疗过程中不接受 PHY906 的对照动物进行比较。此外, 通过测定红细胞计数或血小板计数, 评价 PHY906 与抗病毒剂或多种抗病毒剂的组合的血液学毒性。评价动物的白细胞计数, 以确定 PHY906 与抗病毒剂或多种抗病毒剂的组合在治疗 AIDS 动物中的效力。将各试验的结果与不给药 PHY906 的对照动物进

行比较。

F. 用于联合治疗的制剂

本发明提供了包括组合物的联合治疗，所述组合物包含一种或多种化合物和 PHY906，用于治疗癌症，尤其是结肠直肠癌、胰腺癌和肝细胞癌。优选地，所述化合物为化学治疗药物，例如 CPT-11、5-FU、LV、VP-16、L-OddC、卡培他滨、吉西他滨、沙立度胺、多柔比星和奥沙利铂。所述化合物也可以是抗病毒剂如 AZT、DDI、3TC 和 D4T。联合治疗可以将所述化合物与 PHY906 作为组合物一起给药，或者与 PHY906 的给药分离地给药所述化合物。可以单独使用本发明的组合物或与另一种治疗(例如手术、放射、生物学治疗)组合进行治疗。

能够独立控制每种组合物成分的给药剂量和频率。例如，一种成分可以每天口服给药三次，而第二种成分可以每天静脉内给药一次。也可以将所述化合物和 PHY906 配制到一起，从而一次给药递送两种成分。制剂和剂量如下所述。

药物组合物的配制：可以通过任何合适的手段给药组合物的每种化学治疗药物和 PHY906，所述手段导致化合物的浓度、连同其他成分在到达靶区域时是特别抗肿瘤的。可以将任何适当量的化学治疗药物包括在任何合适的载体物质中，通常含量为组合物总重的 1-95wt%。可以使所提供的组合物剂型适合口服、非肠道(例如静脉内、肌内)、直肠、皮肤、鼻内、阴道、吸入、皮肤(贴片)或眼科给药途径。因此，组合物的形式可以为例如：片剂、胶囊、丸剂、散剂、颗粒剂、混悬剂、乳剂、溶液、包括水凝胶的凝胶剂、糊剂、软膏剂、乳膏、橡皮膏、drenches、递药装置、栓剂、灌肠剂、可注射剂、植入物、喷雾或气雾剂。可以根据常规药学实践配制药物组合物(参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York)。

可以将本发明的药物组合物配制成基本上就在给药时或在给药后的任何预定时间或时间段释放活性化合物。后一类组合物通常被称为控释制剂,其包括:(i)随着时间段延长,在体内产生基本上恒定的药物浓度的制剂;(ii)在预定的迟滞时间后,随着时间段延长,在体内产生基本上恒定的药物浓度的制剂;(iii)通过在体内保持相对恒定有效的药物水平,同时使与活性药物血浆水平波动(锯齿动力学模型)相关的不良副作用最小化,从而在预定的时间段内维持药物作用的制剂;(iv)通过例如将控释组合物空间安置到患病组组织或器官的附近或内部,从而定位药物作用的制剂;和(v)通过使用载体或化学衍生物将药物递送到特定的靶细胞类型,从而靶向药物作用的制剂。

当化合物单独或与 PHY906 组合时,给药控释制剂形式的化合物是特别优选的,这样具有:(i)窄治疗指数(即导致有害副作用或毒性反应的血浆浓度与导致治疗作用的血浆浓度之间的差值很小;通常,将治疗指数 TI 定义为半数致死剂量(LD₅₀)与半数有效剂量(ED₅₀)的比率);(ii)在胃肠道中具有窄吸收窗;或(iii)非常短的生物学半衰期,从而为了将血浆水平维持在治疗水平,需要在一天中频繁给药。

为了获得其中释放速率超过所述化合物代谢速率的控释制剂,可能应用许多策略中的任何一种。在一个实施例中,通过适当选择各种制剂参数和成分,包括例如各种类型的控释组合物和衣料,来获得控释。因此,将药物与适当的赋形剂配制到药物组合物中,在给药至有机体后,该药物组合物能以受控的方式释放活性物质。例子包括单个或多单元的片剂或胶囊组合物、油溶液、悬浮液、乳剂、微囊、微球、纳米粒、贴片和脂质体。

用于口服的固体剂型:用于口服的包含 PHY906 和一种或多种化合物的组合物制剂包括片剂,片剂中包含活性成分,并混有无毒药学可接受的赋形剂。这些赋形剂可以是例如:惰性稀释剂或填充剂(例如蔗糖、山梨醇、糖、甘露醇、微晶纤维素、淀粉,包括马铃薯淀粉、碳酸钙、氯化钠、乳糖、磷酸钙、硫酸钙或磷酸钠);造粒剂和崩解剂

(例如纤维素衍生物, 包括微晶纤维素、淀粉, 包括马铃薯淀粉、交联羧甲基纤维素钠、藻酸盐或海藻酸); 粘合剂(例如蔗糖、葡萄糖、甘露醇、阿拉伯胶、海藻酸、藻酸钠、明胶、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、硅酸镁铝、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇); 和润滑剂、助流剂和抗粘剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、硅石、氢化植物油或滑石)。其他药学可接受的赋形剂可能是着色剂、调味剂、增塑剂、保湿剂、缓冲剂等。或者, 可以将所述化合物独立于 PHY906 配制成供口服使用。

片剂可以是未包衣的, 或者可以通过已知的技术将它们包衣, 以任选地延迟在胃肠道中的崩解和吸收, 从而在更长时间内提供缓释作用。衣料可以用于以预定的模式释放活性药物(例如为了获得控释制剂), 或者它可以用于不释放活性药物, 直到通过胃以后(肠溶包衣)。衣料可以是糖衣、薄膜衣(例如, 基于羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸酯共聚物、聚乙二醇和/或聚乙烯吡咯烷酮), 或者肠溶衣(例如, 基于甲基丙烯酸共聚物、醋酸纤维素、羟丙基甲基纤维素酞酸酯、羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯、虫胶和/或乙基纤维素)。此外, 可以使用延时材料如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

固体片剂组合物可以包括衣料, 用于保护组合物避免有害的化学变化(例如, 在释放活性药物前发生化学降解)。可以按照与上面 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 中所述类似的方式, 将衣料应用到固体剂型上。

化合物和 PHY906 可以一起混合在片剂中, 或者可以被分开。在一个实施例中, 将第一药物包含在片剂的内部, 而第二药物在外部, 从而使大部分第二药物在释放第一药物前被释放。

用于口服使用的制剂也可以作为咀嚼片出现, 或者作为硬明胶胶囊, 其中将活性成分与惰性固体稀释剂(例如马铃薯淀粉、乳糖、微晶

纤维素、碳酸钙、碳酸钙或高岭土)混合,或者作为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油媒介混合,例如花生油、液体石蜡或橄榄油。可以使用上面片剂和胶囊项下所述的成分,使用例如混合器、流化床装置或喷雾干燥装置,以常规方式制备散剂和颗粒剂。

控释口服剂型:只包含所述化合物或与 PHY906 组合的口服使用控释组合物可以例如被构造成通过控制活性药物的溶出度和/或扩散来释放活性药物。

通过将化合物的片剂、胶囊、丸剂或颗粒制剂进行适当包衣,或者通过将所述化合物掺入合适的骨架中,能够获得溶出度或扩散控释。控释衣料可以包括上述一种或多种衣料物质,和/或例如虫胶、蜂蜡、glycowax、蓖麻蜡、巴西棕榈蜡、硬脂醇、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、棕榈硬脂酸甘油酯、乙基纤维素、丙烯酸树脂、dl-聚乳酸、醋酸-丁酸纤维素、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯、乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-羟基酯、甲基丙烯酸酯水凝胶、1,3-丁二醇、甲基丙烯酸乙二酯和/或聚乙二醇。在控释骨架制剂中,骨架材料还可以包括例如水化的甲基纤维素、巴西棕榈蜡和硬脂醇、卡波沫 934、硅酮、三硬脂酸甘油酯、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、聚乙烯和/或卤化碳氟化合物。

包含一种或多种请求保护的化合物组合的控释组合物还可以是漂浮片或胶囊(即在口服后,片剂或胶囊在胃内容物的顶部漂浮特定的时间段)。通过将药物与赋形剂的混合物和 20-75% w/w 水状胶体如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素造粒,能够制备化合物的漂浮片制剂。然后能够将所得颗粒压制成片剂。在与胃液接触后,片剂围绕其表面形成基本上不透水的凝胶屏障。该凝胶屏障参与将密度保持为小于一,从而允许片剂在胃液中保持漂浮。

用于口服给药的液体:可以将单独的化合物或与 PHY906 的组合配制成用于口服给药的液体。适合通过添加水来制备水悬浮液的散剂、可分散散剂或颗粒剂是用于口服给药的方便剂型。作为混悬剂的

制剂所提供的活性成分与分散剂或润湿剂、助悬剂和一种或多种防腐剂掺混在一起。合适的分散剂或润湿剂为例如：天然磷脂(例如卵磷脂或氧化乙烯与脂肪酸的缩合产物、长链脂肪醇或源自脂肪酸的部分酯)和己糖醇或己糖醇酐(例如聚氧乙烯硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯山梨坦单油酸酯等)。合适的助悬剂为例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、藻酸钠等。

非肠道组合物：也可以在剂型、制剂中，通过注射、输液或植入(静脉内、肌内、皮下等)，或通过包含常规无毒可药物载体和辅剂的合适递药装置或植入物，非肠道地给药只包括化合物或与 PHY906 组合的本发明药物组合物。这些组合物的制剂和制品对药物制剂领域的技术人员是公知的。具体的制剂能够在上述 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 中找到。

用于非肠道使用的组合物可以存在于单元剂型(例如单剂量安瓿)中，或存在于包含几个剂量的小瓶中，其中可以添加合适的防腐剂(参见下面)。组合物可以是溶液、混悬剂、乳剂、输液装置或用于植入的递药装置的形式，或者它可以作为在使用前用水或另一种合适载体溶解的干粉。除了活性药物，所述组合物还可以包括合适的非肠道可接受的载体和/或赋形剂。可以将所述化合物掺入微球、微囊、纳米粒、脂质体等中，用于控释。此外，所述组合物可以包含助悬剂、增溶剂、稳定剂、pH 调节剂和/或分散剂。

如上所述，本发明的药物组合物可以是适于无菌注射的形式。要制备这样的组合物，将合适的化合物溶解或悬浮在非肠道可接受的液体载体中。在可接受的载体和溶剂中，可以使用的是水、通过添加适当量的盐酸调整至合适 pH 的水、氢氧化钠或合适的缓冲剂、1,3-丁二醇、林格氏液和等张氯化钠溶液。水性制剂还可以包含一种或多种防腐剂(例如对羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸乙酯或对羟苯甲酸正丙酯)。当所述化合物之一仅难溶或微溶于水时，可能添加溶出度增强剂或增溶剂，或者溶剂可以包含 10-60% w/w 丙二醇等。

控释非肠道组合物：控释非肠道组合物可以是水悬浮液、微球、微囊、磁性微球、油溶液、油悬浮液或乳剂的形式。或者，可以将所述化合物掺入可生物相容的载体、脂质体、纳米粒、植入物或输液装置中。

用于制备微球和/或微囊的材料为例如可生物降解/可生物溶蚀的聚合物，例如羟乙酸乳酸聚酯、聚-(氰基丙烯酸异丁酯)、聚(2-羟乙基-L-谷氨酸)和聚(乳酸)。当配制控释非肠道制剂时，可以使用的可生物相容载体为碳水化合物(如右旋糖酐)、蛋白质(如白蛋白)、脂蛋白或抗体。

用于植入物中的材料可能是不可生物降解的(如聚二甲基硅氧烷)或可生物降解的(如聚(己内酯)、聚(乳酸)、聚(乙醇酸)或聚(原酸酯))。

直肠组合物：可以将单独的化合物或与 PHY906 组合配制用于直肠给药。对于直肠应用，组合物的合适剂型包括栓剂(乳剂或混悬剂类型)和直肠明胶胶囊(溶液或混悬剂)。在典型的栓剂制剂中，将活性药物与适当的可药用栓剂基质如可可脂、酯化脂肪酸、甘油化明胶、以及各种可溶性或可分散基质如聚乙二醇和聚氧乙烯山梨坦脂肪酸酯组合。可以掺入各种添加剂、增强剂或表面活性剂。

用于吸入的组合物：可以将单独的化合物或与 PHY906 组合配制成用于吸入。对于通过吸入给药，典型的剂型包括鼻腔喷雾和气雾剂。在典型的鼻腔制剂中，将活性成分溶解或分散在合适的载体中。以药物制剂领域技术人员理解的方式，根据常规药物实践选择药学可接受的载体和赋形剂(以及组合物所含的其他可药用材料，如稀释剂、增强剂、调味剂和防腐剂)。

经皮和局部组合物：可以将单独的化合物或与 PHY906 组合配制成用于经皮和局部给药。所述药物组合物还可以局部给药在皮肤上供经皮吸收，其剂型或制剂包含常规的无毒可药用载体和赋形剂，包括微球和脂质体。所述制剂包括：乳膏、软膏剂、洗剂、擦剂、凝胶、水凝胶、溶液、混悬剂、棒、喷雾剂、糊剂、橡皮膏和其他各类透皮

递药体系。药学可接受的载体或赋形剂可以包括：乳化剂、抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、保湿剂、促渗剂、螯合剂、凝胶成型剂、软膏剂基质、香料和皮肤保护剂。

乳化剂的例子是天然树胶(例如阿拉伯树脂或黄芪树胶)和天然磷脂(例如大豆卵磷脂和山梨坦单油酸衍生物)。抗氧化剂的例子是丁羟茴醚(BHA)、抗坏血酸及其衍生物、生育酚及其衍生物、丁羟茴醚和半胱氨酸。防腐剂的例子是对羟基苯甲酸甲酯类，例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯和苯扎氯铵。保湿剂的例子是甘油、丙二醇、山梨醇和尿素。促渗剂的例子是丙二醇、DMSO、三乙醇胺、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、2-吡咯烷酮及其衍生物、四氢糠醇和Azone.TM.。螯合剂的例子为EDTA钠、柠檬酸和磷酸。凝胶成型剂的例子是Carbopol.TM.、纤维素衍生物、斑脱土、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮。软膏剂基质的例子是：蜂蜡、石蜡、棕榈酸十六酯、植物油、脂肪酸的山梨坦酯(Span)、聚乙二醇和脂肪酸山梨坦酯与氧化乙烯之间的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨坦单油酸酯(Tween))。

关于局部给药，还可以将上述用于局部给药在皮肤上的药物组合物使用到待治疗身体部分的上面或附近。组合物可以用于直接给药，或者用于引入身体的相关孔中(例如直肠、尿道、阴道或口腔)。可以通过特定的递药装置给药组合物，如敷料或者糊剂、衬垫、纱布、带或其他合适的柔韧材料形式。

控释经皮和局部组合物：可以将单独的化合物或与PHY906组合配制成用于控释经皮和局部给药。有几种方式控制药物释放和透皮渗透的速率，包括：膜介导的体系、粘合剂扩散控制体系、骨架分散型体系和微贮库体系。通过使用上述方法的合适混合，可以获得控释的经皮和/或局部组合物。

在膜介导的体系中，活性药物存在于贮库内，贮库完全包封在由不可渗透药物的薄层如金属塑料薄层模制的浅室中，和控速聚合物膜如微孔聚合物膜或无孔聚合物膜(例如乙烯-醋酸乙烯酯共聚物)中。仅

允许活性化合物通过控速聚合物膜释放。在药物贮库中，活性药物被分散在固体聚合物骨架中，或者悬浮在粘性液体媒介如硅酮液体中。在聚合物膜的外表面，应用一薄层粘性聚合物，以使透皮体系与皮肤表面密切接触。粘性聚合物优选为与活性药物相容的低变应原聚合物。

在粘合剂扩散控制体系中，通过将活性药物直接分散在粘性聚合物中，然后将包含活性药物的粘合剂铺展到基本上不渗透药物的金属塑料背衬平片上，以形成药物贮库薄层，来形成活性药物的贮库。骨架分散型体系的特征在于，通过将活性药物基本上均匀地分散在亲水或亲脂聚合物骨架上，然后将含药聚合物模制到具有基本上充分限定表面积和厚度的圆盘中，来形成活性药物的贮库。将粘性聚合物沿着圆周铺展，以形成围绕圆盘的粘合剂带。

在微贮库体系中，通过首先将药物固体悬浮在水溶性聚合物的水溶液中，然后将药物悬浮液分散在亲脂聚合物中，以形成药物贮库的多个显微球，来形成活性物质的贮库。

剂量：每种化合物的剂量取决于几个因素，包括：给药方法、待治疗的疾病、疾病的严重性、要治疗还是要预防疾病和待治疗者的年龄、体重和健康。

化合物的优选给药量为约 0.1-30 mg/kg 体重/天，更优选的量为约 0.5-15 mg/kg 体重/天。如上所述，可以以片剂、胶囊、酏剂或糖浆的形式口服所述化合物，或者以栓剂的形式直肠给药所述化合物。化合物的非肠道给药适合以盐水溶液的形式或将化合物掺入脂质体中进行。当化合物本身的溶解性不足以溶解时，可能应用增溶剂如乙醇。

根据上述一般性讨论，下列特定的实施例仅是说明性的，并非用于限定本发明的范围。其他类型和特定的构造对本领域技术人员将是显而易见的。

实施例

材料和方法

CPT-11(伊立替康, Camptosar®)购自 Pharmacia & Upjohn Co (Kalamazoo, MI)。5-氟尿嘧啶(5-FU 或 FU)、亚叶酸(亚叶酸, LV)、洛哌丁胺、大肠杆菌 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、亚甲蓝和酚酞葡萄糖苷酸购自 Sigma, Co. (St. Louis, MO)。在 Yale University CanCer Center 按照标准步骤制备 MEME 培养基。RPMI 1640 培养基购自 JRH Co.。卡那霉素、胰酶制剂和锥虫蓝购自 Gibco Co.(Grand Island, NY)。PHY906、PHY-915、PHY-14ST 和 PHY-15ST 植物制剂由 Sun Ten Pharmaceutical Inc.(台北, 台湾)提供。以前称作 TJ-14ST 的 PHY-14ST 由七种草药组成: 半夏 (*Pinelliae ternata Breit.*)、黄芩、黄连 (*Coptis chinensis Franch*)、甘草、大枣、人参 (*Panax ginseng C*)和姜。以前称作 TJ-15ST 的 PHY-15ST 由野葛 (*Pueraria lobata Ohwi*)、黄连、黄芩和甘草组成。PHY-915 由五种草药组成: 人参、姜、白术、防风 and 桔。

由于粉制备草药提取物: 将一克(A)包含 50%(研究批次)或 10%(临床批次)淀粉赋形剂的 PHY906 干粉或(B)包含未知量赋形剂的 PHY-915、PHY-14ST 或 PHY-15ST 草药制剂添加到 10 ml 80°C H₂O 中, 在 80°C 下保温 30 min。通过离心(2060g, 15 min)从残渣中分离上清液, 立即使用。基于粗草药水提取物的干重, 计算 PHY906 上清液的浓度为 50 mg/ml(来自研究批次)或 90 mg/ml(来自临床批次)。基于粉末的干重, 将其他草药制剂的浓度看作 100 mg/ml。使用 0.45 μ m 无菌 Acrodisc 过滤器(Gelman Sciences)灭菌上清液, 用于组织培养中的生长抑制研究。

鼠: 雌性 BDF-1 小鼠(4-6 周龄)购自 Charles River Laboratories (Wilmington, MA)。雄性无胸腺 NCr 裸鼠(4 周龄)购自 Taconic Farms (Garmantown, NY)。将重量为 16 g 至 20 g 的这两种小鼠用于本研究。

抗肿瘤研究: 分别将鼠结肠 38(1-2 $\times 10^6$ 个细胞的 0.1 ml PBS 溶液)或人类 HepG2 细胞(1-2 $\times 10^6$ 个细胞的 0.1 ml PBS 溶液)皮下移植到 BDF1 或 NCr 无胸腺裸鼠中。每天用滑动卡钳测量肿瘤的长度和宽度。

按照下列公式估算肿瘤重量(Pizzorno G, Wiegand R, Lentz S, 等人, Cancer Res. 52: 1660-1665 (1992)):

$$\text{肿瘤重量(mg)} = \text{长度(mm)} \times \text{宽度(mm)}^2 / 2。$$

在 10 至 14 天后, 选择肿瘤重量为 150-200 mg 的小鼠(五只动物/组)用于药物研究(Guo X, Lerner-Tung M, Chen HX, 等人, Biochem Pharmacol 49: 1111-1116 (1995))。当肿瘤尺寸达到体重的 10% 时, 处死小鼠。单独或与抗癌化学治疗药物一起口服给药 PHY906。评价 PHY906 对所述活性剂的抗肿瘤功效的作用和对其毒性的减轻。在给药选择剂量的 PHY906 后 30 min, 腹膜内(i.p.)给药 CPT-11。如下给药 FU/LV 联合治疗的方案:

(A)单独用 FU/LV 治疗: 首次剂量的 LV(50 mg/kg, i.p.), 1 小时后是二次剂量的 LV(50 mg/kg; i.p.), 然后即刻给药 FU(100 mg/kg, i.p.);

(B)用 FU/LV + PHY906 治疗: 首次剂量的 LV(50mg/kg, i.p.), 30 min 后给药 PHY906(500 mg/kg, 口服), 30 min 后给药二次剂量的 LV(50mg/kg, i.p.), 然后即刻给药 FU 剂量(100 mg/kg, i.p.)。

如下给药 CPT-11/FU/LV 三联药物组合: (A)组仅用 CPT-11/FU/LV: 小鼠服用首次剂量的 LV(50 mg/kg, i.p.), 一时后给药 CPT-11, 然后即刻给药 LV(50 mg/kg, i.p.)和 FU(100 mg/kg, i.p.);

(B)组为 CPT-11/FU/LV + PHY906: 小鼠服用首次剂量的 LV(50 mg/kg, i.p.), 30 min 后给药 PHY906(500 mg/kg, 口服)。接着在第 0 天, 在给药 PHY906 后 30 min, 用 CPT-11、随后立即用 LV(50 mg/kg, i.p.)和 FU(100 mg/kg, i.p.)治疗小鼠。

将治疗的第 1 天定为第 0 天。从第 0 天开始每天口服给药两次 PHY906(10 am 和 3 pm), 持续 4 天或 8 天。对于对照组, 给小鼠服用载体: i.p.给药 PBS 或 p.o.给药 H₂O(口服给药)。每天监测动物的死亡率、体重下降和肿瘤尺寸。

血细胞计数: 在第 0、3、6、9 和 12 天, 用微量毛细管从小鼠取血

(20 μ l)。然后用生理盐水(0.85%氯化钠)将血液稀释到 200 μ l。通过 BAKER SYSTEM 9100TM HEMATOLOGY ANALYZER(Biochem ImmunoSystems Inc., Allentown, PA 18103-9562)对 WBC、RBC 和血小板进行计数。

细胞系和培养条件：人类 HepG2(肝细胞癌)、HCT 116(结肠癌)、CEM(白血病)和 KB(口腔表皮样瘤)细胞系和鼠结肠 38 细胞系购自美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)。通常使 HepG2 细胞系生长在补充有 10%胎牛血清(FBS)和 100 μ g/ml 卡那霉素的 MEME 培养基中。使结肠 38、HCT 116、KB 和 CEM 细胞系生长在包含 10% FBS 和 100 μ g/ml 卡那霉素的 RPMI 1640 培养基中。在 37℃和 5% CO₂：95%空气的湿润气氛下培育细胞。

在人或小鼠癌细胞系中的细胞毒性：使用亚甲蓝吸收试验测定细胞生长抑制。在第 0 天，将癌细胞(1×10^4)接种到 24-孔平板中，在具有 10% FBS 和 100 μ g/ml 卡那霉素的 1ml MEME 培养基或 RPMI 1640 内。在第 1 天，将新鲜制备和无菌的 PHY906 提取物以不同浓度加入到细胞中，在 37℃培育 3 天。然后除去培养基，用 0.3 ml 0.5% (w/v)亚甲蓝溶液(50%乙醇溶液)将细胞层染色 30 min。用自来水将平板洗涤 3 次，干燥，用 1 ml 1%肌氨酰溶液(PBS 溶液)将细胞层细胞溶解。在 Elx800 动态微量平板读数器(Bio-Tek Instruments, Inc.)上，在 595 nm 处读取溶解产物的溶液。

实施例 1：PHY906 对不同细胞系的毒性评价

简单地说，将一克各批次 PHY906 加入到 10 ml 水中(1 mg/ml)。就各批次的特性而言，参见表 6。

表 6. PHY906 的批次特性

特性	A 批	B 批
原产地	台湾 Sun-Ten	台湾 Sun-Ten
制备方法	标准	标准

在离心后收集上清液，通过 0.22 μm 过滤器过滤。将四种细胞类型用于测试各批次 PHY906 的生物学作用：a)KB 细胞(ATCC 号为 CCL-17); b)HepG2 细胞(ATCC 号为 HB-8065); c)T-细胞淋巴瘤细胞系(CEM 细胞); d)结肠 38; 和 e)HCT 116(ATCC 号为 CCL-247)。

在第 0 天，将癌细胞(1×10^4 个)接种到 24-孔平板中，在包含 10% FBS 和 100 μg/ml 卡那霉素的 1ml MEME 培养基或 RPMI 1640 内。24 小时后，将 PHY906 提取物以不同浓度添加到细胞中，在 37℃ 下培育 3 天。然后除去培养基，用 0.3 ml 0.5% (w/v)亚甲蓝溶液(50% EtOH 溶液)将细胞层染色 30 min。用自来水将平板洗涤 3 次，干燥，用 1 ml 1%肌氨酰溶液(PBS 溶液)将细胞层细胞溶解。在 Elx800 动态微量平板读数器(Bio-Tec Instruments, Inc.)上，在 595nm 处读取溶解产物的溶液。

使用人 T 细胞淋巴瘤细胞系(CEM)进行细胞毒性研究。使 CEM 细胞(5×10^4 个)生长在包含 20%展示胎牛血清的 1ml RPMI 1640 培养基中。在第 0 天添加 PHY906 提取物。在添加 PHY906 后 3 天，评价细胞的生长情况。使用血细胞计数器评估细胞数量。

将使用两(2)批样品进行的试验结果列在表 7 中。基于这些数据，发现 PHY906 来源 A 和 B 对 KB、CEM 和 HCT116 细胞具有相对小的毒性，而对结肠 38 和 HepG2 细胞具有明显较大的毒性作用(参见表 7)。在实施例 11 的表 10 中显示了相似的结果。

表 7. 传统草药制剂在不同细胞系中的细胞毒性

	IC ₅₀ (mg/ml) ^a				
草药制剂 ^b	KB	HepG2	CEM	结肠 38	HCT116
PHY906A	1.35±0.52	0.28±0.17	1.45±0.45	0.08	1.3
PHY906B	1.80±0.99	0.17±0.12	1.28±0.02	0.08	1.2

^a基于草药制剂的干重。

^b包含 50%赋形剂的不同研究批次的 PHY906。

实施例 2: CPT-11 对 BDF-1 和裸鼠的剂量测定

监测动物体重下降，作为由抗癌化学治疗药物导致的毒性指征。使用六种不同的剂量研究 CPT-11 对非荷瘤瘤 BDF-小鼠体重下降的作用：100、200、300、400、600 或 800 mg/kg 体重，从而确定小鼠中的最大耐受剂量。在研究开始时，腹膜内(i.p.)给药单一推注剂量的 CPT-11，每天监测体重下降，持续 12 天。

在本研究开始时，对每只小鼠 i.p.给药一个剂量的 CPT-11，然后每天监测动物的体重下降，持续 12 天。

低于 200 mg/kg 的剂量对体重几乎没有影响(与不接受 CPT-11 治疗的对照小鼠相比)。相反，大于或等于 600 mg/kg 的药物剂量在给药 CPT-11 后第 2 天就导致动物死亡。一般来说，小鼠能够耐受高达 400 mg/kg 的剂量。

图 1 显示存活小鼠的体重下降曲线。用 300 mg/kg CPT-11 治疗的小鼠平均体重明显低于不接受 CPT-11 治疗的小鼠平均体重，直到治疗后第 5 天(图 1)。从治疗后第 5 天直到本试验结束，这两组小鼠的平均体重没有显著性差异。体重下降的持续时间和程度对给药至动物的 CPT-11 剂量是敏感的。

在注射 400 mg/kg CPT-11 的小鼠中，在 CPT-11 治疗后即刻观察到了小鼠体重下降并持续了六天。这些动物在第 12 天逐步恢复了其最初体重。基于这些结果，将 400 mg/kg 或 300 mg/kg CPT-11 用于 BDF-1 小鼠模型。然而，接种人肿瘤细胞的裸鼠对 CPT-11 治疗明显比 BDF-1 小鼠更为敏感。在带有人类 HepG2 异种移植物的裸鼠中，CPT-11 的最大耐受剂量为 200 mg/kg(数据未显示)。

实施例 3: PHY906 对 CPT-11 诱发的荷瘤 BDF-1 小鼠体重下降的作用

在接种结肠 38 肿瘤细胞的小鼠中，评价 PHY906 作为 CPT-11 治疗的调节剂对毒副作用的影响。基于上述发现(实施例 2)，选择单一推注剂量 400 mg/kg CPT-11，来研究 PHY906 对与 CPT-11 毒性相关的体

重下降的作用。为了评价 PHY906 是否损害 CPT-11 的抗肿瘤功效，给小鼠皮下植入结肠 38 肿瘤细胞。在接种后 10 至 14 天，在没有或有 PHY906 存在的情况下，用 CPT-11(400 mg/kg, i.p.)治疗小鼠，其中以不同剂量(125 mg/kg、250 mg/kg 和 500 mg/kg)每天口服两次 PHY906。以指定剂量持续进行 PHY906 治疗，连续 8 天。

图 2 显示，PHY906 对 CPT-11 治疗的小鼠体重下降的作用是剂量依赖性的。接受 500 mg/kg/b.i.d. PHY906 补充治疗的 CPT-11 治疗动物在维持体重方面表现出显著的改善，能更快地恢复其原始体重 ($p<0.01$)。表 8 总结了统计学结果。然而，接受 250 mg/kg/b.i.d. PHY906 的小鼠在体重下降方面没有表现出差异。

表 8. 在用 CPT-11 治疗的荷瘤小鼠中，PHY-906 对体重下降的作用的统计学分析

N=5	未 治 疗	CPT- 11	CPT- 11/PHY906 500 mg/kg	CPT- 11/PHY906 250 mg/kg	CPT- 11/PHY906 125 mg/kg
未治疗	----	$P<0.01$	$P<0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$
CPT-11	$P<0.01$	----	$P<0.01$	$P>0.1$	$P>0.1$
CPT- 11/PHY906 500 mg/kg	$P<0.05$	$P<0.01$	----	$P<0.01$	$P<0.01$
CPT- 11/PHY906 250 mg/kg	$P<0.01$	$P>0.1$	$P<0.01$	----	$P>0.1$
CPT- 11/PHY906 125 mg/kg	$P<0.01$	$P>0.1$	$P<0.01$	$P>0.1$	----

实施例 4: 用 CPT-11 和 PHY906 治疗的接种结肠 38 小鼠的肿瘤重量

如实施例 3 所述治疗小鼠，评价九天期限内的肿瘤重量。结果表

明, 用 PHY906 治疗既不阻碍也不损害 CPT-11 的抗肿瘤功效(图 3)。实际上, 该数据提示这种草药确实可以提高 CPT-11 的抗肿瘤活性。

这些初步结果提示, 可以将草药组合物 PHY906 用作 CPT-11 化学治疗的调节剂, 以显著改善和缓解 CPT-11 的毒副作用, 而不危害 CPT-11 的抗肿瘤功效。

实施例 5: 在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中, PHY906 对 CPT-11 抗肿瘤活性和血液学毒性的作用

基于在上述研究中获得的结果, 500 mg/kg/b.i.d. PHY906 对由 400 mg/kg 最大耐受剂量 CPT-11 诱发的宿主毒性提供了最佳的保护。将该组剂量用于接下来的研究。对于用一次剂量 CPT-11(400 mg/kg, i.p.)治疗的具有结肠 38 的 BDF-1, 口服给予 500 mg/kg/b.i.d. PHY906, 持续 4 天或 8 天。每组使用五只小鼠, 将本实验重复八次。图 3 代表全部实验的典型结果。在动物模型中, 伴随的 PHY906 治疗没有危害根据肿瘤尺寸测定的 CPT-11 抗肿瘤活性。实际上, 肿瘤尺寸发生了轻度的减小, 这提示 PHY906 可以增强 CPT-11 的抗肿瘤活性。

骨髓抑制是用 CPT-11 治疗的患者中常见的副作用(Bleiberg H and Cvitkovic E., Eur J Cancer 32A(Suppl 3): S18-S23 (1996))。为了评价 PHY906 是否有益于逆转 CPT-11 诱发的骨髓毒性, 在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中检验血液学活性。如图 4 所示, 在全部方案中, 发现 PHY906 对红细胞计数或血小板计数没有影响, 也没有显示能保护由 CPT-11 诱发的骨髓抑制。就抗肿瘤活性和血液学活性而言, 在用 PHY906 与 CPT-11 共同治疗 4 天或 8 天的方案之间没有显著性差异(数据未显示)。

实施例 6: 在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中, PHY906 对 CPT-11 死亡率的作用

将小鼠分成使用不同治疗方案的四组: (A)组: 用载体治疗; (B)

组：用单剂量的 400 mg/kg CPT-11 i.p.注射治疗；(C)组：用单独 PHY906(500 mg/kg/ b.i.d.)治疗；或(D)组：用单剂量 400 mg/kg CPT-11 加 500 mg/kg/ b.i.d. PHY906 治疗 4 天或 8 天。各治疗方案的顺序描述于材料和方法中。如表 9 所示，在用载体或单独 PHY906 治疗 4 天或 8 天后，来自 A 组的 35 只荷瘤小鼠中的 35 只(100 %)和来自 C 组的 15 只小鼠中的 15 只(100 %)均存活下来，这表明 PHY906 没有毒性或毒性极低。相反，单独用 CPT-11 治疗(B 组)8 天后，在 40 只荷瘤小鼠中仅有 33 只(82.5 %)存活下来。然而，在接受 4 天或 8 天 PHY906 与 CPT-11 联合治疗(D 组)后，存活率明显改善至 95 %(20 只小鼠中的 19 只)或 100 %(24 只小鼠中的 24 只)。这提示，PHY906 治疗能够保护小鼠对抗由单剂量 400 mg/kg CPT-11 诱发的死亡。

表 9. 在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中，PHY906 对 CPT-11 治疗的存活率的作用

药物 方案	治疗				小鼠总数		
	CPT-11		PHY906		治疗的 N	存活的 N	存活 ^a %
	剂量(mg/kg)	天数	剂量(mg/kg)	天数			
A	0	0	0	0	35	35	100
B ^b	400	1	0	0	40	33	82.5
C	0	0	500	4	35	35	100
	0	0	500	8	15	15	100
D ^c	400	1	500	4	20	19	95
	400	1	500	8	24	24	100

^a将所有动物观察 14 天。

^b在用 CPT-11 治疗的 40 只小鼠中，7 只 在第 5 天(N=1)、第 6 天(N=3)、第 7 天(N=1)和第 8 天(N=2)死亡。

^c由于使用了 CPT-11 与 PHY906 的联合治疗(4 天)，所以 1 只小鼠在第 6 天死亡。

实施例 7: 在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中，PHY906 对

FU/LV 抗肿瘤活性的作用

FU/LV 联用表现出有效的抗肿瘤活性，被用作结肠直肠癌患者的一线治疗(Goldber R.M. and Erlichman C., *Oncology* 12: 59-63 (1988); Saltz L.B, Cox J.V, Blanke C, 等人, *New. Eng.J. Med.* 343: 905-914 (2000))。因此，用 FU/LV 在动物中进行与上述 CPT-11 治疗相似的实验。将具有结肠 38 肿瘤的小鼠分成四组：(A)组：用载体治疗；(B)组：单独用 PHY906 治疗；(C)组：单独用 FU/LV 治疗；和(D)组：用 FU/LV 加 PHY906 治疗。各治疗方案的顺序描述于材料和方法中。在该组实验中，在第 0 天对小鼠仅给药一次 FU/LV，而每天给药两次 PHY906，连续 4 天。

每天监测体重和肿瘤尺寸的改变，分别如图 5 和 6 所示。如图 5 所示，在四组中体重几乎没有发生变化。这一观察结果与使用 CPT-11 治疗观察到的结果相反。由于没有进行 FU/LV 对体重下降的剂量响应研究，所以可能的情况是，在本实验中给药的 FU/LV 剂量没有高到足以诱发毒性和相关的体重下降。尽管体重下降不足以证明 PHY906 对 FU/LV 的保护作用，但是图 6 表明 PHY906 的伴随治疗没有损害 FU/LV 在具有结肠 38 肿瘤 BDF-1 小鼠中的抗肿瘤活性。D 组动物的肿瘤生长曲线慢于 C 组，这提示 PHY906 可以提高 FU/LV 在该动物模型中的抗肿瘤活性。此外，在伴随给药 PHY906 治疗的小鼠中，在第 4、8 和 12 天监测 FU/LV 的血液学毒性。PHY906 没有逆转由 FU/LV 诱发的公知副作用，即白细胞减少或血小板减少(van der Wilt C.L, van Groeningen, C.J, Pinedo H.M, 等人, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123: 595-601 (1997))(图 7)。

实施例 8：在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中，PHY906 对 CPT-11/FU/LV 抗肿瘤活性的作用

FDA 近期批准 CPT-11 加 FU/LV 的新三联治疗作为一线治疗用于晚期结肠直肠癌(Goldber R.M. and Erlichman C., *Oncology* 12: 59-63

(1988); Saltz L.B, Cox J.V, Blanke C,等人, New. Eng.J. Med. 343: 905-914 (2000)). 已经证实该方案可减慢肿瘤生长的进程以及死亡率。然而, 在接受这种三联治疗方案的患者中, 经常观察到严重的迟发腹泻。预实验表明, 在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中, PHY906 能够提高 CPT-11 的治疗指数。因此, 使用与实施例 7 相似的方案, 评价 PHY906 对缓解三联化学治疗的中限制剂量的毒性的功效。将具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠分成两组: (A)组: 仅用 CPT-11/FU/LV 治疗; (B)组: 用 CPT-11/FU/LV 加 PHY906 治疗。两组中所用的 FU 和 LV 剂量均各为 100 mg/kg, 因为在这些剂量下, 在预研究中观察到了极低的毒性。在这种三联方案中不进行对 CPT-11 的剂量依赖性研究, 而使用 200 mg/kg 或 300 mg/kg CPT-11。各方案的顺序描述于材料和方法中。在化学治疗的后每天给药两次 PHY906, 持续 4 天。

结果表明, 在 200 mg/kg 和 300 mg/kg CPT-11 下, PHY906 不损害三联治疗的抗肿瘤功效, 分别如图 8 和 9 所示。如图 8 所示, 由于在三联治疗中使用了 200 mg/kg CPT-11, 所以在第 14 天, PHY906 轻度提高了对肿瘤的抑制($p=0.045$)。与不接受 PHY906 治疗的组相比, 在 300 mg/kg CPT-11 下, PHY906 对肿瘤抑制的提高在第 14 天时并不显著($p=0.05$), 但在第 21 天时明显($p=0.014$)。这一结果提示, 可能需要更长的时间期限, 来观察 PHY906 对 CPT-11/FU/LV 肿瘤抑制作用的提高。在所研究的剂量下, 在三联治疗和 CPT-11 治疗中, PHY906 表现出对抗肿瘤活性的相似有益作用。

在三联治疗所用的剂量下, 动物表现出体重下降。然而, PHY906 在治疗过程中没有减慢体重下降, 如图 10 所示。此外, PHY906 不影响体重下降的恢复。

实施例 9: 在有和没有 PHY906 存在的情况下, CPT-11/FU/LV 在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中的药物动力学

在有和没有 PHY906 存在的情况下, CPT-11/FU/LV 在具有结肠 38

肿瘤的 BDF-1 小鼠中的药物动力学数据如图 18-20 所示。PHY906-6 是 PHY906 的临床批次, 包含 10%赋形剂(淀粉)。

在共同给药 PHY906 与三联 CPT-11/FU/LV 后, 血浆中的 CPT-11 曲线下面积(AUC)增加。在共同给药 PHY906 后, 肿瘤或肝组织中的 CPT-11 没有显著改变。

CPT-11 的活性代谢物即 SN-38 在血浆、肝或肿瘤中保持不变。

在将 PHY906 与 CPT-11/FU/LV 三联组合共同给药后, 血浆或肝中 FU 及其核苷/核苷酸代谢物(FU + FUR + FUMP)的 AUC 发生改变。

实施例 10: 在具有人类 HepG2 肿瘤的裸鼠中, PHY906 对 CPT-11 抗肿瘤活性和毒性的作用

来自上述实施例、特别是实施例 5、7 和 8 的结果表明, PHY906 与化学治疗药物联用可以增强化学治疗药物的抗肿瘤作用, 进一步延缓肿瘤生长。基于 PHY906 所含草药的已知药理学曲线(表 1), 推断这种促进作用可以通过正常小鼠中的免疫学和/或血液学体系起作用。因此, 设计实验以在缺乏免疫学和血液学体系的裸鼠中测试这种推断。

将人类 HepG2 肿瘤细胞植入 NCr-裸鼠中, 以测试 PHY906 对 CPT-11 抗肿瘤活性的作用。前面的实验表明, CPT-11 在裸鼠中的最大耐受剂量为 200 mg/kg, 将它用于本研究。在第 0 天给药 CPT-11(200 mg/kg, i.p.)。从第 0 天开始, 每天给药两次 500 mg/kg PHY906。如图 11 所示, PHY906 没有危害 CPT-11 对裸鼠中人类 HepG2 异种移植物的抗肿瘤作用。然而, 不同于在 BDF-1 小鼠中的观察结果, PHY906 没有表现出保护由 CPT-11 导致的体重下降(图 12)或动物死亡(数据未显示)的有益作用。PHY906 可以预防正常小鼠的体重下降, 但不能防止裸鼠的体重下降, 这一事实提示 PHY906 通过血液学和免疫学体系发挥其作用, 而这二者正是裸鼠缺乏的。

实施例 11: 不同中草药制剂对 CPT-11 在小鼠中的抗肿瘤作用、体

重下降和存活率的作用

在用癌症化学治疗药物治疗的患者中，腹泻是限制剂量的毒性之一。除 PHY906 外，还检验了其他抗腹泻药物。它们包括中药如 PHY-14ST、PHY-15ST 和 PHY915、以及洛哌丁胺，目前洛哌丁胺被推荐作为抗腹泻药用于 CPT-11 诱发的迟发腹泻。

除肿瘤生长抑制和体重下降外，我们还检查了接受不同草药制剂联合单一推注给药 CPT-11 的小鼠的存活率。在所检验的几种制剂中，PHY906 是观察到提高 CPT-11 抗肿瘤活性的唯一制剂(表 9)，即使 PHY906 所含的某些草药也存在于其他草药制剂中。在死亡率研究中，PHY906 没有表现出对动物死亡率的统计学作用($P=0.044$)。观察到所测试的其他抗腹泻药如 PHY-14ST、PHY-15ST 和洛哌丁胺在防止体重下降或提高 CPT-11 抗肿瘤作用方面完全无效。令人惊讶的是，观察到 PHY-915 可减少 CPT-11 的抗肿瘤活性(表 10)。

表 10. 不同草药制剂对 CPT-11 治疗的具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠的作用

草药制剂(1g ^c /kg, bid, 8天)	预防体重下降	P 值 ^{b,d}	抗肿瘤作用	P 值 ^{b,e}	动物死亡 ^a (死亡数/总数)
无					7/40
PHY906	显著	0.0004	提高	0.0027	0/24
PHY14ST	无变化	0.1072	无变化	0.2742	1 ^f /10
PHY15ST	无变化	0.3259	无变化	0.6535	0/3
PHY915	显著	0.0306	减少	0.0885	0/5
洛哌丁胺	无变化	0.9706	无变化	0.1595	3 ^g /10

^a所有动物观察 14 天。

^b使用斯氏配对 t-检验计算 p 值。

^c基于包含赋形剂的制剂干重。

^d在 CPT-11 治疗小鼠体重下降达到最大的当天计算。

^e在最初药物治疗后第 6 天，基于肿瘤尺寸计算。

- ^f一只小鼠在第 6 天死亡。
- ^g小鼠在第 3 天(N=1)、第 4 天(N=1)和第 5 天(N=1)死亡。

实施例 12: PHY906 在不同细胞系中的细胞毒性

为了评价体外细胞模型作为质量保证的措施，研究两种不同 PHY906 制剂(PHY906A 和 PHY906B)对不同人肿瘤细胞系和小鼠结肠 38 肿瘤细胞系的生长抑制的作用。如表 11 所示，在所述细胞系的生长抑制活性方面，PHY906A 和 PHY906B 没有显著性差异。要注意的是，发现 HepG2 细胞系对 PHY906 的敏感性高于其他人细胞系。

表 11. PHY906 在不同细胞系中的细胞毒性

草药制剂 ^b	IC ₅₀ (mg/ml) ^a				
	KB	HepG2	CEM	HCT116	结肠 38
PHY906A	0.67±0.26	0.14±0.08	0.73±0.17	0.65	0.08±0.02
PHY906B	0.90± 0.5	0.09±0.06	0.64±0.01	0.6	0.07±0.02

^a 基于粗草药水提取物的干重。

^b PHY906 的不同研究批次。

上述实验结果提示，PHY906 减轻了由 CPT-11、FU/LV 的治疗或使用 CPT-11/FU/LV 三联治疗治疗诱发的一些宿主毒性。植物药 PHY906 不仅可以维持、而且可以增强所测试化学治疗药物的抗肿瘤活性。实际上，在具有结肠 38 肿瘤的小鼠和具有人类 HepG2 异种移植物的裸鼠中，通过增加总体抗肿瘤活性，PHY906 都提高了 CPT-11、FU/LV 和 CPT-11/FU/LV 的治疗指数。在两种不同的肿瘤模型中，使用几种抗癌剂检验了这些观察结果(图 3、6、8、9 和 11)。

实施例 13: 在用 L-OddC 治疗的接种结肠 38 的小鼠中，PHY906 对肿瘤生长的作用

在接种有结肠 38 肿瘤细胞的小鼠中，评价 PHY906 作为 L-OddC(β -L-二氧戊环胞苷)治疗的调节剂，对肿瘤生长的作用。给小鼠皮下注射鼠结肠 38 肿瘤细胞。在接种癌细胞后第七天，用 L-OddC(25 mg/kg)腹膜内治疗小鼠，并口服给药 PHY906(500 mg/kg, b.i.d.)。然后在剩余的实验期内，只给动物连续给药相同剂量的 PHY906。

如图 13 所示，使用 L-OddC 的治疗表明，PHY906 既不阻碍也不损害 L-OddC 的抗肿瘤功效。实际上，数据提示该草药药物确实可以提高 L-OddC 的抗肿瘤活性。

因此，这些结果提示，可以将草药 PHY906 用作 L-OddC 化学治疗的调节剂，以显著改善和减轻毒副作用，而不危害 L-OddC 的抗肿瘤功效。

实施例 14：在用 VP-16 治疗的接种结肠 38 的小鼠中，PHY906 对肿瘤生长的作用

在接种有结肠 38 肿瘤细胞的小鼠中，评价 PHY906 作为 VP-16(依托泊普，拓扑异构酶 II 抑制剂)治疗的调节剂，对肿瘤生长的作用。给小鼠皮下注射鼠结肠 38 肿瘤细胞。在接种癌细胞后第七天，用 VP-16(25 mg/kg)腹膜内治疗小鼠，并口服给药 PHY906(500 mg/kg, b.i.d.)。然后在剩余的实验期内，只给动物连续给药相同剂量的 PHY906。

如图 14 所示，使用 VP-16 的治疗表明，PHY906 既不阻碍也不损害 VP-16 的抗肿瘤功效。实际上，数据提示该草药药物确实可以提高 VP-16 的抗肿瘤活性。

因此，这些结果提示，可以将草药 PHY906 用作 VP-16 化学治疗的调节剂，以显著改善和减轻毒副作用，而不危害 VP-16 的抗肿瘤功效。

实施例 15：在用 5-氟尿嘧啶治疗的接种结肠 38 的小鼠中，

PHY906 对肿瘤生长的作用

在接种有结肠 38 肿瘤细胞的小鼠中，评价 PHY906 作为 5-氟尿嘧啶(FU)治疗的调节剂，对肿瘤生长的作用。给小鼠皮下注射鼠结肠 38 肿瘤细胞。在接种癌细胞后第七天，用 5-氟尿嘧啶以两种剂量(250 mg/kg，在第 0 天一次剂量，或在第 0 天至第 4 天每天给药 30 mg/kg 剂量)腹膜内治疗小鼠，并口服给药 PHY906(500 mg/kg, b.i.d.)。然后在剩余的实验期内，只给动物连续给药相同剂量的 PHY906。

如图 15 和 16 所示，使用 5-氟尿嘧啶的治疗表明，PHY906 既不阻碍也不损害 5-氟尿嘧啶的抗肿瘤功效。实际上，数据提示该草药药物确实可以提高 5-氟尿嘧啶的抗肿瘤活性。

因此，这些结果提示，可以将草药 PHY906 用作 5-氟尿嘧啶化学治疗的调节剂，以显著改善和减轻毒副作用，而不危害 5-氟尿嘧啶的抗肿瘤功效。

实施例 16：在用 CPT-11 和洛哌丁胺治疗的接种结肠 38 的小鼠中，PHY906 对肿瘤生长的作用

在接种有结肠 38 肿瘤细胞的小鼠中，在抗腹泻药物洛哌丁胺存在的情况下，评价 PHY906 作为 CPT-11 治疗的调节剂，对肿瘤生长的作用。给小鼠皮下注射鼠结肠 38 肿瘤细胞。在接种癌细胞后第七天，在口服给药 PHY906(500 mg/kg, b.i.d.)存在的情况下，或在洛哌丁胺(2 mg/kg, p.o., b.i.d.)存在的情况下，单独用 CPT-11(400 mg/kg, i.p.)治疗小鼠。

图 17 比较了 PHY906 与洛哌丁胺的抗肿瘤作用。如图 17 所示，在 PHY906 存在的情况下，CPT-11 在减少肿瘤生长(确定为最初肿瘤重量的百分比)方面比洛哌丁胺更有效。

这些初步结果提示，在延迟 CPT-11 诱发的腹泻方面，草药 PHY906 比标准给药洛哌丁胺更为有效。

实施例 17: 在与伊立替康联用时, 测定 PHY906 给药的最低有效剂量(MED)和最佳持续时间

介绍: 几项研究表明, 由七种草药组成的 KamPo 药在体内有效地预防 CPT-11 诱发的动物腹泻的发生并在体内减少 CPT-11 诱发的腹泻的严重性(Mori, 1998)。

还在体内动物模型中评价了 PHY906, 已经证实它可减轻伊立替康诱发的毒性的严重性。因此, 基于长期历史经验(1500 年)证明的人体安全性、这种化合物在动物模型中有希望的临床前活性和所述相关草药化合物在该环境中的潜在活性, 能够开展研究, 以评价 PHY906 对化学治疗的诱发的毒性如体重下降、腹泻、总体体力状态和生活质量的严重性的作用, 以及对伊立替康或其他药物在患顽固性晚期结肠直肠癌患者中的抗肿瘤活性的作用。

这项研究包括经组织学证实的 FU-顽固性晚期结肠直肠癌患者。不需要可确定或可评价的疾病。患有中枢神经系统(CNS)转移性瘤的患者是适合的, 条件是 CNS 疾病在完成手术、化学治疗的和/或放疗后已经保持稳定至少 4 周。

本研究的参与者年龄应 ≥ 18 岁, 应没有明显潜在的医学疾病。所有患者应具有体力状态 ECOG 0-2, 预期寿命为至少 3 个月, 已经获得知情同意书。(ECOG 是“东方合作肿瘤机构”的缩写。ECOG 0 = 患者可进行正常活动; ECOG 1 = 患者具有最低限度的症状; ECOG 2 = 患者要花费 $< 50\%$ 的时间在病床上; ECOG 3 = 患者花费 $> 50\%$ 的时间在病床上; ECOG 4 = 患者始终在病床上)。患者必须已经从任何前期手术的影响中完全恢复, 在进入本研究的 4 周内(对亚硝基脲类或丝裂霉素 C 为 6 周), 不接受野外辐疗或任何化学治疗的。要进入本研究, 要求 ANC(绝对嗜中性白细胞计数) $\geq 1500/\mu\text{l}$, 血小板计数 $\geq 40 \text{ ml/min}$, 总胆红素 $\leq 2.0 \text{ mg/dl}$ 。

治疗前评价: 在治疗开始前, 全部患者应具有完整的病史、身体检查、并确定其体力状态。实验室研究应包括: 具有微分的全血计数

(CBC)、血清白蛋白、电解质、葡萄糖、血尿氮(BUN)、肌酸苷、血清钙和镁、肝功检验、凝血酶原和部分凝血活酶原时间和尿分析。

治疗：将伊立替康从冻干粉再溶解到 2 ml 无菌水中，用 100 ml D5W(5%葡萄糖水溶液)稀释，在 90 min 内以 125 mg/m²的剂量给药。在各参与医院的门诊治疗中，应按照每周方案将伊立替康化学治疗的给药 4 周，有 2 周休息期。

应在饮食前 30 min 空腹服用 PHY906。在化学治疗的治疗的当天，将服用首次剂量，随后给药伊立替康。

从 0.60 g 的初始剂量开始，在各餐前每天口服三次 PHY906。(每日总剂量为 1.80 gm/天)。目前东方患者所使用的 PHY906 剂量为 7.2 gm/天，迄今为止还没有观察到不良事件。因此，建议开始本试验的剂量为所述草药常用剂量的 1/4。在完整的 4 周化学治疗的过程中，将 PHY906 和伊立替康一起给药，有 2 周休息。最少有三名患者将接受该初始剂量水平的 PHY906 治疗。一旦 3 位患者完成了整个 6 周的周期，如果 3 位患者中没有 1 位出现限制剂量的毒性(DLT)，则将对随后组的 3 位患者使用下一个较高的剂量。在全部患者中，将在开始第一个化学治疗的周期后 24 小时进行药物动力学研究。

如果 3 位患者中有 1 位出现 DLT，则将以相同的剂量水平再治疗 3 位患者。如果接下来的 3 位患者中有≤1 位患者出现 DLT(总共 6 位患者中的 1 位或 2 位)，则将会把剂量递增至下一剂量水平，除非在双盲方案中发生那些情况，此时下一个递增将到达改良 Fibonacci 方案上的水平 n + 1(表 12)。

表 12. PHY906 的剂量递增方案

剂量水平	递增	总剂量(gm/天)
1	开始	1.8
2	2 × 水平 1	3.6
3	2 × 水平 2	7.2

一旦达到 7.2 gm/天剂量水平，并且在该水平“n”上没有观察到 ≥ 2 级的毒性，则进行如下改良 Fibonacci 递增。		
N+1	$1.5 \times \text{水平 } n$	
N+2	$1.33 \times n+1$	
N+3	$1.25 \times \text{水平 } n + 2$	
所有随后的水平：25%的递增，直到达到最大耐受剂量。		

PHY906 的剂量递增方案：如果临床指示和首席研究者认为必需，则可以使用较低的剂量水平，而非上述特定的剂量水平。

进入和递增至下一剂量方案的受体比例将取决于进入各剂量水平的患者安全性曲线评价。将按照 NCI 临床试验指南(CTG)扩充的常用毒性标准来评价毒性并分级。

用于该方案的止吐药方案将由掺入 50 ml 生理盐水的 1-2 mg 格拉司琼组成，在每个治疗天的化学治疗的前，经 1/2 小时给药。在需要时，将该止吐药(静脉内或口服给药)每 8 小时重复一次，以控制恶心和/或呕吐。每周重复一次治疗，连续 4 周，随后休息 2 周。该过程将构成一个治疗周期。

将用阿托品(0.5-1 mg)静脉内治疗在伊立替康输注过程中或之后不久发生的腹泻。对于在给药伊立替康后 ≥ 12 小时发生的腹泻，在首次出现腹泻症候时，将口服 4 mg 洛哌丁胺治疗患者，随后每 2 小时口服 2 mg(在夜晚每 4 小时口服 4 mg)，直到腹泻完全消除至少 12 小时。如果腹泻带血，伴有 $\geq 101.6^\circ\text{F}$ 的发热并持续不退 ≥ 12 小时，则认为该患者应去医院作进一步检查和治疗。

伊立替康的剂量修改：在本研究中将不递增伊立替康的剂量。将按照制造商提供的包装插页的推荐，针对毒性修改剂量(表 13)。

表 13. 对每周和每 3 周 1 次方案的推荐剂量修改。不应开始新治疗过程，直到粒细胞计数恢复至 $\geq 1500/\text{mm}^3$ ，血小板计数恢复至 $\geq 100,000/\text{mm}^3$ ，与治疗相关的腹泻完全消除。应使治疗延缓 1-2 周，以

允许从与治疗相关的毒性中恢复。如果在延缓 2 周后该患者尚未恢复，则应考虑终止 Camptosar。

每周毒性 NCI 等级 ^b 值	化学治疗的过程中	下一次治疗过程开始时(完全恢复后)，与前一过程的初始剂量相比 ^a	
	每周	每周	每 3 周一次
无毒性	维持剂量水平	↑25mg/m ² 至 150 mg/m ² 的最大剂量水平	1 维持剂量水平
白细胞减少 1(1500 至 1999/mm ³) 2(1000 至 1499/mm ³) 3(550 至 999/mm ³) 4(<500/mm ³)	维持剂量 ↓25 mg/m ² 不使用剂量，然后↓25mg/m ² ，此时消除至≤2 级 不使用剂量，然后↓50mg/m ² ，此时消除至≤2 级	维持剂量水平 维持剂量水平 ↓25 mg/m ² ↓50 mg/m ²	维持剂量水平 维持剂量水平 ↓25 mg/m ² ↓50 mg/m ²
白细胞减少性发热(4 级白细胞减少&≥2 级发热)	不使用剂量，然后↓ 50 mg/m ² ，此时消除	↓ 50 mg/m ²	↓ 50 mg/m ²
其他血液学毒性	对白细胞减少、血小板减少、还基于 NCI 毒性标准修改剂量，在开始随后治疗过程时与上述白细胞减少症推荐的相同		
腹泻 1(2-3 次排便/天 >pretx ^c) 2(4-6 次排便/天 >pretx ^c) 3(7-9 次排便/天 >pretx ^c) 4(=10 次排便/天 >pretx ^c)	维持剂量水平 ↓ 25mg/m ² 不使用剂量，然后↓ 25 mg/m ² ，此时消除至 ≤2 级 不使用剂量，然后↓ 50 mg/m ² ，此时消除至 ≤2 级	维持剂量水平 维持剂量水平 ↓ 25 mg/m ² ↓ 50mg/m ²	维持剂量水平 维持剂量水平 ↓ 50 mg/m ² ↓ 50mg/m ²
其他非血液学毒性 1 2 3 4		维持剂量水平 维持剂量水平 ↓25 mg/m ² ↓50 mg/m ²	维持剂量水平 维持剂量水平 ↓25 mg/m ² ↓50 mg/m ²

^a 所有剂量修改应基于最坏的前述毒性

b 国家癌症研究所常用毒性标准

c 治疗前

响应和毒性评价：通过每周身体检查和血液计数评价毒性，按照国家癌症研究所的常用毒性标准分级。在每次治疗前重复这些评价和完全的化学曲线。

患者还每天记录其肠道习性和抗蠕动剂的使用情况。该日记将包括摄取 PHY906 的时间、其肠运动频率和持久性的记录(成形的、庞大的或水样)，由患者使用抗蠕动治疗来控制这种症状。

在第一个周期过程中，参与研究的护士将在巡视期间每周与每位患者接触至少一次，以增强对腹泻控制和完成日记的指导。还将使用确定的 FAST 方法学评价总体生活质量，包括衰弱、恶心、呕吐和食欲下降。

由药剂师对各次临床治疗巡视进行药丸计数，以评价对 PHY906 的顺从性。将在每两个治疗周期后评价疾病响应。将按照 ECOG 标准确定响应，在患有可确定或可评价疾病的所有患者中评价该响应，但这并不构成本研究的终点。

伊立替康的药物动力学：在选定的患者中，进行药物动力学研究，以评价 PHY906 是否影响伊立替康的代谢和消除。在这些患者中，单独给药首次剂量的伊立替康(第 1 周期 / 第 1 天)，在第 2 天开始给药 PHY906。

在给药伊立替康前、在输注伊立替康过程中的 30 min、60 min、90 min 以及周期 1 的第 1 天和周期 1 的第 8 天输注结束后 0.5、1.5、3.5 和 6 小时，立即将血样收集在肝素化的试管内。在聚苯乙烯试管内，立即用 2.50 μ l 血浆处理血样，添加 500 μ l 内标溶液。内标溶液由 50 μ l/ml 喜树碱的冰醋酸酸化乙腈溶液组成，4.0 ml 溶于 100 ml。将样品涡旋 30 秒，在 40 $^{\circ}$ C 水浴放置 15 min，在室温下冷却，然后与 900 μ l 25mM 三乙胺缓冲液(pH4.2)混合。将上清液转入 1.5 ml Eppendorf 管，在微量

离心机中以 13,000 xg 离心 4 min, 通过高效液相色谱法(HPLC)分析澄清上清液的等分部分。

在 Microsorb C18(4.5 × 250 mm, 5 µm 粒度)反相 HPLC 柱上进行色谱分析, 用 72 : 28(v/v) 25 mM TEA/乙腈缓冲液以 1ml/ min 洗脱, 利用具有 λEX 372 nm 和 λEm 535 nm 的荧光检测器(Pharmacia & Upjohn SOP #UPJ-120-5)。利用 PC-NONLIN 软件 (Scientific Consulting Lexington, KY)和标准药物动力学方程, 通过数据的非区划分析, 确定最大血浆浓度、末端半衰期和 AUC(曲线下面积)。在周期 1/第 1 天和周期 1/第 8 天进行药物动力学研究, 以确定延长 PHY906 暴露是否对伊立替康的血浆清除产生累积作用。

实施例 18: 对胰腺癌、肝细胞癌和结肠直肠癌的作用

A.材料和方法

药物: 吉西他滨 HCl(Gemzar®)购自 Eli Lilly and company (Indianapolis, IN)。³H-吉西他滨(14 Ci/mmol、1 mCi/ml 的 50% EtOH 溶液)购自 Moravek Biochemicals, Inc. (Brea, CA)。四氢尿苷(THU)购自 Calbiochem (San Diego, CA)。3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(AZT)和 5-氟尿嘧啶(5-FU)购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。卡培他滨(Xeloda®, CAP)购自 Roche Laboratories Inc. (Nutley, New Jersey)。具有 10%赋形剂的 PHY906 临床批次 (PHY906-6, FDA 165542) 由 Sun Ten Pharmaceutical, Inc. (Taipei, Taiwan)制备。PHY906 制剂由四种草药组成: 黄芩、芍药、枣和甘草, 其相对重量比为 3: 2: 2: 2。具有未知量赋形剂的非临床批次 906MT 购自 Min Tong Pharmaceutical Co., Ltd. (Taichung, Taiwan)。

小鼠: 体重为 16 至 20 g(4-6 周龄)的雌性 BDF-1 和 C57BL/6 小鼠购自 Charles River Laboratories (Wilmington, MA)。体重为 16 至 20 g(4-6 周龄)的雄性无胸腺 NCr 裸鼠购自 Taconic Farms (Garmantown, NY)。小鼠胰腺癌 PAN02 购自 NCI-Frederick Cancer Research Facility

(Frederick, MD)。

吉西他滨溶液的制备：用 6.66 ml PBS(磷酸缓冲的盐水)溶解 200 mg 吉西他滨 HCl 粉末，至最终浓度为 30 mg/ml。

^3H -吉西他滨溶液的制备：在 Speedvac 下干燥十微升(10 μCi) ^3H -吉西他滨，以除去乙醇，然后与 250 μl 30 mg/ml 吉西他滨混合，以使最终溶液的放射敏感性为 0.4 mCi/mmol。该 ^3H -吉西他滨溶液的最终浓度为 30 mg/ml。

从卡培他滨片制备卡培他滨溶液：将卡培他滨(150 mg/片)溶于 40 mM 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中，缓冲液包含 5%阿拉伯树胶作为载体。最终溶液包含 36 mg/ml 卡培他滨。

从干粉制备草药提取物：按照 SOP#HERB-001-PHY906 制备草药提取物。简言之，将一克包含 10%(临床批次 PHY906)淀粉赋形剂的不同批次 PHY906 干粉添加到 10 ml 80°C H_2O 中，在 80°C 下保温 30 分钟。在室温下，通过离心从残渣中分离上清液(2060g, 15 min)。对于临床批次的 PHY906(1 g/10 ml $\times$ 0.9)，基于干粉的干重，计算 PHY906 上清液的浓度为 90 mg/ml。由于 906MT 的赋形剂量是未知的，将该制剂的浓度看作 100 mg/ml。用水将草药提取物稀释成 50 mg/ml，在室温下保存，在 24 小时内使用。将在静置过程中发生的所有残余沉淀物涡旋成悬浮液，用于治疗动物。

肿瘤细胞：人肝细胞癌 HepG2、人 PANC-1 胰腺癌和鼠结肠 38 结肠直肠癌细胞系购自美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)。通常使 HepG2 和结肠 38 细胞系生长在 MEME 培养基中，而 PANC-1 细胞系生长在 DMEM 培养基中，培养基都补充有 10%胎牛血清(FBS)。将来自 NCI 的小块鼠 PAN02 肿瘤悬浮在 PBS 溶液中，使最终体积为 0.8 ml。将细胞植入小鼠左侧腹。当肿瘤达到 1500-2000 mm^3 时，进行小鼠之间的肿瘤移植。

小鼠肿瘤模型：将肿瘤细胞(5×10^6 个细胞的 0.1 ml PBS 溶液)皮下移植到小鼠左侧腹中。14 天后，选择尺寸为 300-500 mm^3 的肿瘤进

行药物研究。用滑动卡钳测量每个肿瘤的长度和宽度。按照下列公式估算肿瘤重量:

肿瘤尺寸(mm³)=长度(mm)×宽度(mm)²/2。

在 Yale Animal Facility 开展研究并保存动物。

在有或没有 PHY906 存在的情况下, 化学治疗药物的抗肿瘤活性: 将总共 20 只荷瘤小鼠分成 4 组(N=5 只小鼠/组):

- 1) 载体
- 2) PHY906
- 3) 化学治疗药物
- 4) PHY906 + 化学治疗药物

将药物治疗的第一天定为第 1 天。在指定的天数, 在化学治疗药物前 30 min, 给小鼠口服给药 PHY906(500 mg/kg, bid)。按照给定的剂量和方案, 腹膜内或口服给药化学治疗药物。每天监测小鼠的肿瘤尺寸、体重和死亡率。当肿瘤尺寸达到体重的 10%时, 处死小鼠。

血浆处理: 通过在 4°C 以 10,000g 离心 10 min, 从血液中分离小鼠血浆。

a) 包含卡培他滨的样品: 在 10 µl 5-碘尿嘧啶(IU)(50 µg/ml)内标存在的情况下, 用 200 µl 乙腈萃取血浆(50 µl)。在离心后, 通过 speedvac 干燥来自含卡培他滨样品的上清液, 用 50 µl 0.1 M 乙酸钠缓冲液(pH 4.8)溶解, 用 1.3 ml 水饱和的乙酸乙酯萃取。在离心(10,000g 4°C 10 min)后分离有机层, 通过 speedvac 干燥, 用 100 µl 水溶解。

b) 包含吉西他滨的血浆: 在 5 µl 0.1 mM AZT 内标存在的情况下, 用 200 µl 乙腈(ACN)萃取血浆(50 µl)。在离心后, 通过 speedvac 干燥上清液, 用包含 2.5% CAN 和 97.5% 15 mM 醋酸铵(pH 5.0)的溶液溶解。

然后通过带 UV 吸收的 HPLC 和/或放射活性分析所得被分析物。

统计学分析和研究的统计幂(Diggle 等人 Analysis of Longitudinal Data, 2nd ed.Oxford: Oxford Science Publications (1994)): 使用随机影响模型分析来自相似剂量动物试验的数据。使用 SAS 中的 PROC MIXED

程序，来考虑从相同小鼠中收集的观察值之间的相关性。

使用下列模型分析纵向数据：

$$y_{ijk} = \mu + \alpha t_k + \beta(I_D t_k) + \gamma(I_P t_k) + \delta(I_D I_P t_k) + e_{ijk},$$

其中 y_{ijk} 为在第 k 个时间点，第 i 组(未治疗、单独的药物、单独的 PHY906 和药物+PHY906)第 j 个个体的相对肿瘤尺寸， t_k 是第 k 个时间点， α 为基线时间影响(未治疗组)， I_d 和 I_p 是进行药物治疗和 PHY906 治疗的可用指征， β 为药物特异性线性时间作用， γ 为 PHY906 特异性线性时间作用， δ 为药物-PHY906 协同的线性时间作用， e_{ijk} 为剩余(误差)项。我们假设来自不同个体的误差是独立的，来自相同个体不同时间点的误差符合回归模型 AR(1)，从而考虑如下事实：在相同的治疗组内，来自相同个体的观察值更相关，在相同的个体中，来自更近时间点的响应更相关。使用 SAS 8.01 的 PROC MIXED 进行统计学分析。

B. 结果

1. 胰腺癌

a)在具有鼠 PAN02 的 C57/BL 小鼠中，PHY906 对不同剂量吉西他滨抗肿瘤活性的作用

为了确定 PHY906 和吉西他滨联合使用的最佳剂量方案以改善吉西他滨的抗肿瘤活性，在具有 PAN02 鼠胰腺癌的 C57/BL6 小鼠中，研究吉西他滨的三个不同剂量 150、300 和 600 mg/kg 与 500 mg/kg 固定剂量 PHY906 的组合(表 14)。如图 21-23 所示，在具有 PAN02 的小鼠中，PHY906 显著提高了吉西他滨的抗肿瘤活性(在吉西他滨的所有三个剂量中， $p < 0.001$)。显然，与较低的吉西他滨剂量相比，用 600 mg/kg 吉西他滨治疗的小鼠显示出更好的抗肿瘤作用。在这个小鼠模型中，150 mg/kg 剂量的吉西他滨没有抗肿瘤活性，单独的 PHY906 也是如此。

表 14: PHY906 和吉西他滨在 PAN02 鼠胰腺癌模型中的治疗状况总结

实验号	Set	鼠品种	肿瘤最初尺寸 (mm ³)	吉西他滨剂量 (mg/kg)(ip, D1 & 8)	PHY906 批次	PHY906 剂量 ^a (mg/kg)(po, D1-4 & 8-11)
1	2	C57/BL6	300-500	150	906-6	500
2	2	C57/BL6	300-500	300	906-6	500
3	2	C57/BL6	300-500	600	906-6	500
4	3	BDF-1	300-500	300	906-6	500
5	3	BDF-1	300-500	600	906-6	500
6	3	BDF-1	300-500	300	906MT	1000 ^b

^a 基于准确的赋形剂量(10%)计算 PHY906 的浓度。

^b 906MT 中的赋形剂量是未知的，基于干粉的干重计算浓度。

b)在具有鼠 PAN02 的 BDF-1 小鼠中，PHY906 对不同剂量吉西他滨抗肿瘤活性的作用

除了 C57/BL6 小鼠外，还在不同的小鼠品种中测试 PHY906 对吉西他滨抗肿瘤活性的作用。因此，将 PAN02 胰腺癌植入 BDF-1 小鼠中。如图 24-25 所示，将吉西他滨剂量从 300 mg/kg 增加到 600 mg/kg，能显著增加单独的吉西他滨与同时使用 PHY906 和吉西他滨治疗之间的肿瘤生长速率的差异。结果暗示，无论小鼠模型如何，PHY906 对吉西他滨抗肿瘤活性的作用都是明显的。另外，选择 600 mg/kg 吉西他滨剂量进行随后的动物实验。

c)在人 PANC-1 异种移植物中，PHY906 对吉西他滨抗肿瘤活性的作用

在具有人 PANC-1 的裸鼠中，测试 PHY906 对吉西他滨抗肿瘤活性的作用。如图 26 所示，在第一个药物治疗周期后，吉西他滨和 PHY906 的组合将肿瘤尺寸收缩约 60%。将剂量周期定义为一周，其中包括四天的 PHY906 治疗加三天的休息。在第二个组合药物治疗周期后，肿瘤尺寸保持稳定，同时 60%肿瘤收缩。如图 27 所示，随着第二个剂量周期的开始，小鼠经历高达 20%的体重下降。没有开始第三个

组合药物治疗周期，直到第 26 天，此时肿瘤尺寸反弹回第 21 天的原始尺寸。

d)在具有 PAN02 的 BDF-1 小鼠中，非临床批次的 PHY906 对吉西他滨抗肿瘤活性的作用

来自不同制造商的几个非临床批次 PHY906 显示出不同的化学和生物学响应。问题在于，这些体外差异是否导致不同的体内响应。906MT 具有与临床 PHY906 批次极为不同的化学和生物学活性，在具有 PAN02 的 BDF-1 小鼠中，比较它和 PHY906 对吉西他滨抗肿瘤活性的作用。由于 906MT 中赋形剂的量是未知的，基于粉末的干重，以 1 g/kg*使用 906MT 剂量。吉西他滨的剂量为第 1 天和第 8 天 300 mg/kg bid。906MT 的剂量方案与临床批次 PHY906 相同。

如图 24 所示，显示 PHY906 对吉西他滨的抗肿瘤活性有作用，但没有显示 906MT 能显著增强吉西他滨的抗肿瘤活性，如图 28 所示。这些体内结果与其他体外药理学结果一致(数据未显示)。该结果暗示，在化学治疗的中，包括不同比例或不同种类黄芩、甘草、枣和芍药的任何制剂可能具有与 PHY906 不同的治疗作用。

e) PHY906 对吉西他滨(dFdC)及其代谢物 dFdU 的药物动力学作用

对于未来的临床试验，为了确定 PHY906 是否会改变吉西他滨的代谢，在具有胰腺癌的小鼠中进行药物动力学分析。将小鼠分成三组，每组 15 只：仅吉西他滨、吉西他滨加 PHY906 和载体对照。各组的每只小鼠在两个不同的时间点取血两次。如材料和方法中所述处理血浆，通过 HPLC 分析，用放射活性确证峰的识别和定量。研究显示，在有或没有 PHY906 存在的情况下，吉西他滨及其代谢物(dFdU)在循环中的水平没有显著差异，如图 29 所示。计算吉西他滨和 dFdU 在血浆中的 AUC(浓度曲线下面积)、 C_{max} (最大药物浓度)、 T_{max} (达到最大药物浓度的时间)和 $T_{1/2}$ (半衰期)，没有显示单独给药吉西他滨或与 PHY906 组合之间的显著差异，如表 15 所总结的。

表 15：在具有 PAN02 的 BDF-1 小鼠中，PHY906 对吉西他滨

(dFdC)及其代谢物(dFdU)的血浆药物动力学参数的作用(HPLC-UV/VIS 检测数据)

化合物	检测方法	AUC (mg/ml.min)		Cmax (mg/ml)		Tmax (min)		T1/2 (min)	
		单独的 dFdC	dFdC +PHY 906	单独的 dFdC	dFdC +PHY 906	单独的 dFdC	dFdC +PHY 906	单独的 dFdC	dFdC +PHY906
dFdC	UV	10.8	15.4	0.23	0.25	15	15	27.0	31.0
dFdC	放射活性	15.6	25.0	0.36	0.40	15	15	26.5	34.2
dFdU	UV	3.1	4.4	0.014	0.022	60	120	98.3	69.8
dFdU	放射活性	5.8	8.5	0.031	0.048	60	120	93.0	49.2

f) PHY906 对吉西他滨 + 奥沙利铂治疗的具有人类 PANC-1 肿瘤的 NCr-裸鼠的作用

由于吉西他滨单一治疗在胰腺癌中响应很弱，在不同的临床试验期中，用吉西他滨开展几个联合治疗。其中包括奥沙利铂和吉西他滨的联合治疗。

发现在人 PANC-1 异种移植小鼠模型中，PHY906 与奥沙利铂和吉西他滨的联合治疗不仅能减慢肿瘤进程，而且在最初药物治疗的第 7 天，就能将肿瘤尺寸减少至 50%，如图 30 所示。

2.肝细胞癌

a)在具有人类 HepG2 肿瘤的裸鼠上，PHY906 对 CPT-11 抗肿瘤活性的作用

前面的研究显示，在结肠直肠癌和胰腺癌体内模型中，PHY906 与各种化学治疗药物的组合能加增强化学治疗药物的抗肿瘤作用。基于 PHY906 所含草药的已知药理学曲线，推测增强作用可能通过正常小鼠的免疫学和/或血液学体系起作用。因此，设计实验以在缺乏免疫学和血液学体系的裸鼠中检验该假设。将人肝细胞癌 HepG2 细胞植入 NCr-裸鼠中，以检测 PHY906 对 CPT-11 抗肿瘤活性的作用。前面的实验表明，CPT-11 在裸鼠中的最大耐受剂量为 200 mg/kg，将它用于本研究。

在第 0 天给药 CPT-11(200 mg/kg, i.p.)。从第 0 天开始, 每天给药两次 500 mg/kg PHY906, 持续 8 天。如图 31 所示, PHY906 增强了 CPT-11 对裸鼠中人类 HepG2 异种移植物的抗肿瘤作用。然而, 不同于在 BDF-1 小鼠中的观察结果, PHY906 没有表现出保护由 CPT-11 导致的体重下降或动物死亡(数据未显示)的有益作用。PHY906 可以预防正常小鼠的体重下降, 但不能防止裸鼠的体重下降, 这一事实提示 PHY906 通过血液学和免疫学体系发挥其作用。

b)在具有人类 HepG2 肿瘤的裸鼠上, PHY906 对卡培他滨抗肿瘤活性的作用

卡培他滨最初被开发作为可口服利用的氟嘧啶类似物, 能够将高浓度的活性细胞毒性剂 5-FU 递送到肿瘤组织中。在口服给药后, 卡培他滨被肝中的羧酸酯酶代谢成 5'-脱氧-5-氟胞苷(5'-DFCR), 然后被肝或肿瘤中的胞苷脱氨酶转化为 5'-脱氧-5-氟尿苷(5'-DFUR)。此外, 5'-DFUR 被嘧啶磷酸化酶催化活化为 5'-氟尿嘧啶(5-FU), 该酶富集于肿瘤或肝中(Berg 等人, *Semin.Oncol.*, 25: 53-59, 1998; Schwetz 等人, *JAMA*, 286: 2085, 2001)。Lozano 等人研究将卡培他滨用于治疗 55 名具有不可切除的肝胆癌的患者; 然而, 仅观察到 13%的响应率(Aguayo 等人, *Seminars In Oncology*, 28: 503-513, 2001; Leung 等人, *Seminars In Oncology*, 28: 514-520, 2001; Lozano 等人, *Oral Capecitabine (Xeloda) for the Treatment of Hepatobiliary Cancers (Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocarcinoma, and Gallbladder Cancer)*. 19. 2000. *Proceedings of ASCO*)。

基于 PHY906 在动物研究中对 5-FU 和 CPT-11/5-FU/LV 抗肿瘤活性的增强作用, 开展实验来研究 PHY906 是否能增强 5-FU 的口服前药即卡培他滨的抗肿瘤活性。将移植有 HepG2 人肝细胞癌细胞的总共 20 只 NCr 裸鼠分成 4 组(N=5 小鼠/组): (A)组: 载体对照; (B)组: 用 PHY906(500 mg/kg, b.i.d., 第 0-3 天和 7-10 天)治疗; (C)组: 用卡培他滨(360 mg/kg, bid x 14D)治疗; 和(D)组: 用 PHY906(500 mg/kg,

bid, 第 0-3 天、7-10 天)加卡培他滨(360 mg/kg, bid x14D)治疗。该实验所用的 PHY906 方案与临床前 I/IIa 期试验中用于缓和 CPT-11/5-FU/LV 诱发的细胞毒性的方案相同。发现 PHY906 能增强卡培他滨的抗肿瘤活性, 如图 32 所示。在较低剂量的卡培他滨中也发现了类似的观察(数据未显示)。

c)在具有人类 HepG2 肿瘤的裸鼠上, PHY906 对多柔比星抗肿瘤活性的作用

为了检查 PHY906 是否能增强多柔比星的抗肿瘤活性, 在第 1-4 天和 8-11 天, 给具有 HepG2 异种移植物的小鼠联合给药 PHY906(500 mg/kg, po, bid)和多柔比星(7.5 mg/kg, qd, D1、4、7)。如图 33 所示, 显示 PHY906 能增强多柔比星的抗肿瘤活性。

d)在具有人类 HepG2 肿瘤的裸鼠上, PHY906 对沙立度胺抗肿瘤活性的作用

将具有人类 HepG2 肿瘤的小鼠分成四组: A)对照组; B)PHY906 治疗组: 在第 1-4 天, 给小鼠每天口服两次 PHY906(500 mg/kg); C)沙立度胺组: 在连续 14 天中, 给小鼠每天腹膜内给药一次沙立度胺(1 g/kg); 和 D)PHY906 和沙立度胺组: 在沙立度胺之前 30 min 给药 PHY906。发现在人类 HepG2 异种移植小鼠模型中, PHY906 能增强沙立度胺的抗肿瘤活性, 如图 34 所示。

3. 结肠直肠癌

美国申请 10/220,876 和 PCT 申请 PCT/US01/07353(它们被全文引入本文作为参考)显示, 在具有结肠 38 肿瘤的小鼠中, PHY906 能增强 CPT-11、5-FU、CPT-11/5-FU/LV、L-OddC、VP-16 的抗肿瘤活性。还在结肠直肠癌中研究了其他方案, 如奥沙利铂和奥沙利铂/5-FU/LV。奥沙利铂是合成的二氨基环己烷铂化合物, 是第三代顺铂药物, 它引起铂-DNA 加合物的形成, 破坏 DNA 的完整性。奥沙利铂是在结肠直肠癌中显示功效的第一个铂化合物(Raymond 等人, *Annals of Oncology*, 9: 1053-1071, 2004; Mathé 等人, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 43:

237-250, 2004)。最近 FDA 批准奥沙利铂/5-FU/LV 的联合治疗作为一线治疗用于结肠直肠癌患者。在结肠直肠癌患者中, 奥沙利铂/5-FU/LV(~50%)的响应率优于 5-FU/LV 的响应率。

在具有结肠 38 肿瘤的 BDF-1 小鼠中, 检查 PHY906 对奥沙利铂、5-FU/LV 和奥沙利铂/5-FU/LV 的抗肿瘤活性的作用。将小鼠分成八组(每组中 N=5): (A)对照载体; (B)组: 用奥沙利铂治疗; (C)组: 用 5-FU/LV 治疗; (D)组: 用奥沙利铂/5-FU/LV 治疗; (E)组: 用 PHY906 治疗; (F)组: 用 PHY906 加奥沙利铂治疗; (G)组: 用 PHY906 加 5-FU/LV 治疗; 和(H)组: 用 PHY906 加奥沙利铂加 5-FU/LV 治疗。结果显示, PHY906 能增强奥沙利铂和奥沙利铂/5-FU/LV 的抗肿瘤活性, 分别如图 35 和 36 所示。奥沙利铂/5-FU/LV 联合治疗中所用的剂量导致 100%的动物死亡率。然而, 数据显示, PHY906 不仅能将死亡率减少至 60%, 而且能延迟由奥沙利铂/5-FU/LV 引起的动物死亡的发生, 如图 37 所示。除了用奥沙利铂/5-FU/LV 治疗的动物外, 在药物治疗组中没有动物在治疗过程中发生体重下降。由于死亡, 不能发现 PHY906 是否可预防由奥沙利铂/5-FU/LV 引起的体重下降, 如图 38 所示。

C.讨论

在小鼠中检查了 PHY906 对奥沙利铂、5-FU/LV、奥沙利铂/5-FU/LV、吉西他滨/奥沙利铂、多柔比星和沙立度胺的抗肿瘤活性的作用。结果显示, PHY906 可增强奥沙利铂、奥沙利铂/5-FU/LV、吉西他滨/奥沙利铂、多柔比星和沙立度胺的抗肿瘤活性, 如图 30、33、34、35 和 36 所示。结果还显示, PHY906 不仅能将死亡率减少至 60%, 而且能延迟由奥沙利铂/5-FU/LV 引起的动物死亡的发生, 如图 37 所示。

如前所述, PHY906 是四种不同草药组成的传统中草药制剂, 它已经在约 1800 年中被用于治疗胃肠疾病, 在正经历化学治疗的癌症患者中, 这些疾病中的一些是通常观察到的副作用。在小鼠结肠直肠癌模型中, 除了增强许多抗癌药如 CPT-11、5-FU、CPT-11/5-FU/LV、VP-16、L-OddC、奥沙利铂的抗肿瘤功效外, 还发现 PHY906 能减少化学

治疗的诱发的毒性，包括体重下降和死亡。

在人肝细胞异种移植小鼠模型中，PHY906 与 5-FU 的口服前药卡培他滨、多柔比星、沙立度胺或 CPT-11 共同给药，在小鼠胰腺癌模型中，PHY906 与吉西他滨、奥沙利铂、吉西他滨/奥沙利铂共同给药。研究显示，PHY906 能显著增强化学治疗药物的治疗指数。研究还显示，在动物模型中共同给药 PHY906 和 CPT-11/5-FU/LV、PHY906 和卡培他滨、以及 PHY906 和吉西他滨没有改变 CPT-11、5-FU、卡培他滨、吉西他滨或其各自的代谢物的药物动力学曲线。

生化研究显示，PHY906 制剂具有广泛的药理学活性。PHY906 作用的潜在机理包括：(1)通过抑制 MDR 增强化学治疗药物的细胞摄取；(2)抑制 NF- κ B 活性；(3)抑制 MMP 活性；和(4)抑制血管发生。

这些临床前体内研究为临床机构开发 PHY906 提供了基本原理。目前已经开放 I/II 期开放标记剂量递增临床试验的患者登记，以评价 PHY906 与卡培他滨的组合在治疗肝细胞癌中的作用。

D.总结

PHY906 是由 4 种不同草药组成的传统中草药制剂，它已经在约 1800 年中被用于治疗胃肠(GI)疾病，包括腹泻、恶心和呕吐。这些副作用在进行癌症化学治疗的患者中极为常见，从而产生如下可能性：使用 PHY906 来缓和癌症患者中的这些症状，改善他们的生活质量。在具有肿瘤的小鼠模型中，通过减少死亡率和体重下降，PHY906 能显著减少由基于 CPT-11 和基于奥沙利铂的化学治疗诱发的宿主毒性。要注意，在结肠直肠癌、胰腺癌和肝癌小鼠模型中，PHY906 可增强各种化学治疗药物的抗肿瘤活性，包括 CPT-11、CPT-11/5-FU/LV、沙立度胺、卡培他滨、多柔比星、吉西他滨、奥沙利铂和吉西他滨/奥沙利铂。PHY906 没有显著改变基于 CPT-11、基于 CPT-11/5-FU/LV、基于卡培他滨或基于吉西他滨的治疗的药物动力学或组织分布。PHY906 作用的机理是多因素的，包括：调节各种细胞因子、增强细胞渗透性和活性化合物的转运、抑制 MMP 活性和调节 NF- κ B 表达。已经开发了

化学和生物学指纹的综合图，以确保 PHY90 产品的一致性。在 I/IIa 期结肠直肠癌患者的临床试验中，对于患有晚期结肠直肠癌的患者，用 CPT-11/5-FU/LV(Saltz 用药法)作为一线治疗或用单独的 CPT-11 作为二线治疗，研究该草药制剂作为潜在的细胞毒性保护剂的作用。正在进行第二个临床试验，以确定 PHY906 是否能增强卡培他滨在肝细胞癌患者中的抗肿瘤活性。

应理解上述讨论和实施例仅作为对某些优选实施方案的详细描述。因此，对本领域普通技术人员显而易见的是，在不背离本发明精神和范围的情况下，可以进行各种修改和等同替换。本专利申请中确定的所有杂志文章、其他参考文献、专利和专利申请均被全文引入作为参考。

上面的具体描述仅用于清楚理解的目的，不应从中理解为不必要的限制，因为修改对本领域技术人员将是明显的。

尽管已经结合特定实施方案描述了本发明，但是将理解能够进行进一步修改，本申请用于包括一般符合本发明机理的任何变化、应用或适应，包括从本发明内容衍生至本发明所属领域已知或惯例的实践，它们适用于上文所列的主要特征且属于所附权利要求的范围内。

在说明书正文中未给出完全引用的参考文献

本文引用的所有参考文献均被全文引入。

Bienvenu JA, Monneret G, Gutowski MC.等人 Cytokine assays in human sera and tissues *Toxicology* 129: 55-61(1998).

Bleiberg, H.: CPT-11 in Gastrointestinal Cancer. *European Journal of Cancer*, Vol. 35, No. 3, 371-379, 1999.

Bleiberg, H., Cvitkovic, E.: Characterization and clinical management of CPT-11(irinotecan)-induced adverse events: The European perspective. *Eur. J. Cancer* 32A(Suppl 3): S18-S23, 1996.

Calabresi P.和 Chabner BA: *Chemotherapy of Neoplastic Diseases*, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Edition, Section X: 1225-1232, 1996.

Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Calabresi P.: *Antineoplastic Agents*, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Edition, Chapter 51: 1233-1287.

Chen J. J.W, Wu R, Yang PC,等人 Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 51: 313-324 (1998).

Chu, X-Y, Kato, Y, Ueda, K.等人 Biliary Excretion Mechanism of CPT-11 and Its Metabolites in Humans: Involvement of Primary Active Transporters. *Cancer Res.* 58: 5137-5143, 1998.

Douillard J., Cunningham D., Roth A., Germa J., James R., Karasek P., Jandik P., Iveson T., Carmichael J., Gruia G., Dembak M., Slbaud D., Rougier P.: A randomized phase III trial comparing Irinotecan + 5FU/Follicular Acid (FA) to the same schedule of 5FU/FA in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCRC) as front line chemotherapy (CT), *Proc. ASCO*, Vol. 18, 233a, 1999.

Gilman, M. 1993. Ribonuclease protection assay. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1. (Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D.

Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Stuhl, eds.), pp 4.7.1-4.7.8, John Wiley and Sons, Inc., New York.

Guo X, Lerner-Tung M, Chen HX, Chang CN, Zhu JL, Chang CP, Pizzorno G, Lin, TS, Cheng YC. 5-Fluoro-2 pyrimidinone, A liver aldehyde oxidase-activated prodrug of 5-fluorouracil. *Biochem Pharm*, 49, 1111-1116 (1995).

Gupta E, Mick R, Ramirez J, Wang X, Lestingi TM, Vokes EE, Ratain MJ : Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the topoisomerase inhibitor irinotecan in cancer patients. *J Clin Oncol* 15: 1502-1510, 1997.

Haaz M.C., Rivory, L., Riche, C.,等人 Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions. *Cancer Res* 58: 468-472 (1998).

Hani Oka Hiroshi, Taki No Ko Suke: Application of 212 formula of Kampo Medicine. Kabusiki Kaishya, Tokyo, Japan, 1998.

Hsu H. 和 Hsu C., Commonly used Chinese herbal formulas; Companion Handbook, Ohai Press.

Joulia, J., Pinguet, F., Ychou, M., Duffour, J., Astre, C. and Bressolle, F. : Plasma and Salivary Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil (FU) in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Receiving FU Bolus Plus Continuous Infusion with High-dose Folinic Acid. *European Journal of Cancer*, Vol. 35, No. 2, 26-301, 1999.

Kaneda N., Nagata H., Furuta T., Yokokura T. : Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Res* 50: 1715-1720, 1990.

Kivisto K.T., Kroemer H.K. 和 Eichelbaum M. The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents : implications for drug interactions. *Br J. Clin Pharmacol* 40: 523-530 (1995).

Koima K.,等人, Long-term administration of Asho-saiko-to@increase

cytochrome P-450 mRNA level in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 426-428, 1998.

Lombardi V.R.M, Garcia M 和 Cacabelos L.R.R. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. *Journal of Neuroimmunol* 97: 163-171(1999).

Miller CL 和 Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 13648-13653 (1997).

Mori K., Hirose T., Machida S., Tominaga K.: Kampo medicines for the prevention of irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small cell lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 25: 1159-63, 1998.

Marita M., Nagai E., Hagiwara H., Aburada M., Yokoi T., Kamataki T.: Inhibition of beta-glucuronidase by natural glucuronides of kampo medicines using glucuronide of SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) as a substrate. *Xenobiotica* 23: 5-10, 1993.

Peters, G.和 van Groeninger, C.: Clinical relevance of biochemical modulation of 5-fluorouracil. *Annals of Oncology* 2: 469-480, 1991.

Pinedo, H.和 Peters, G.. Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 6, No. 10 (October), 1633-1664, 1988.

Pizzorno G., Wiegand R., Lentz S.和 Handschumacher R., Brequinar Potentiates 5-Fluorouracil antitumor activity in a Murine model colon 38 tumor by tissue-specific modulation of uridine nucleotide pools. *Cancer Res.*, 52: 1660-1665, 1992.

Roby C.A., Anderson GD 和 Dryer DA 等人 St John's Wort: Effect on CYP3A4 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 451-457 (2000).

Saliba F, Hagipantelli R, Misset J-L, Bastian G, vassal G, Bonnay M, Herait P, Cote C, Mahjoubi M, Mignard D, Cvitkovic E: Pathophysiology and therapy in irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with

advanced colorectal cancer: A prospective assessment. *J Clin Oncol* 16: 2745-2751, 1998.

Saltz LB, Locker PK, Plotta N, Elfring GL, Miller LL: Weekly Irinotecan (CPT-11), Leucovorin (LV), and Fluorouracil (FU) is superior to daily x5 LV/FU in patients (PTS) with previously untreated metastatic colorectal cancer (CRC), *Proc. ASCO*, Vol.18, 233a, 1999.

Stucky-Marshall, L.: New Agents in Gastrointestinal Malignancies: Part 1: Irinotecan in Clinical Practice, *Cancer Nursing*, 22(3): 212-219, 1999.

Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, Kato M, 等人 Involvement of b-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Res.* 56: 3752-3757 (1996).

Takasuna K, Takehiro H, Hirohashi M, 等人 Inhibition of intestinal microflora-glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 42: 280-286 (1998).

Wasserman E., Myara A., Lokiec F., Goldwasser F., Trivin F., Mahjoubi M., Misset J., Cvitkovic E.: Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: Two case reports. *Ann Oncol* 8: 1049-1051, 1997.

Wierda D.和 Matamoros M. Partial characterization of bone marrow hemopoiesis in mice after cisplatin administration. *Toxicol & Applied Pharmacol* 75: 25-34(1984).

Xu Guo-Jun, Introduction to the Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical Science Publication Inc., Beijin, China, 1996, p.398.

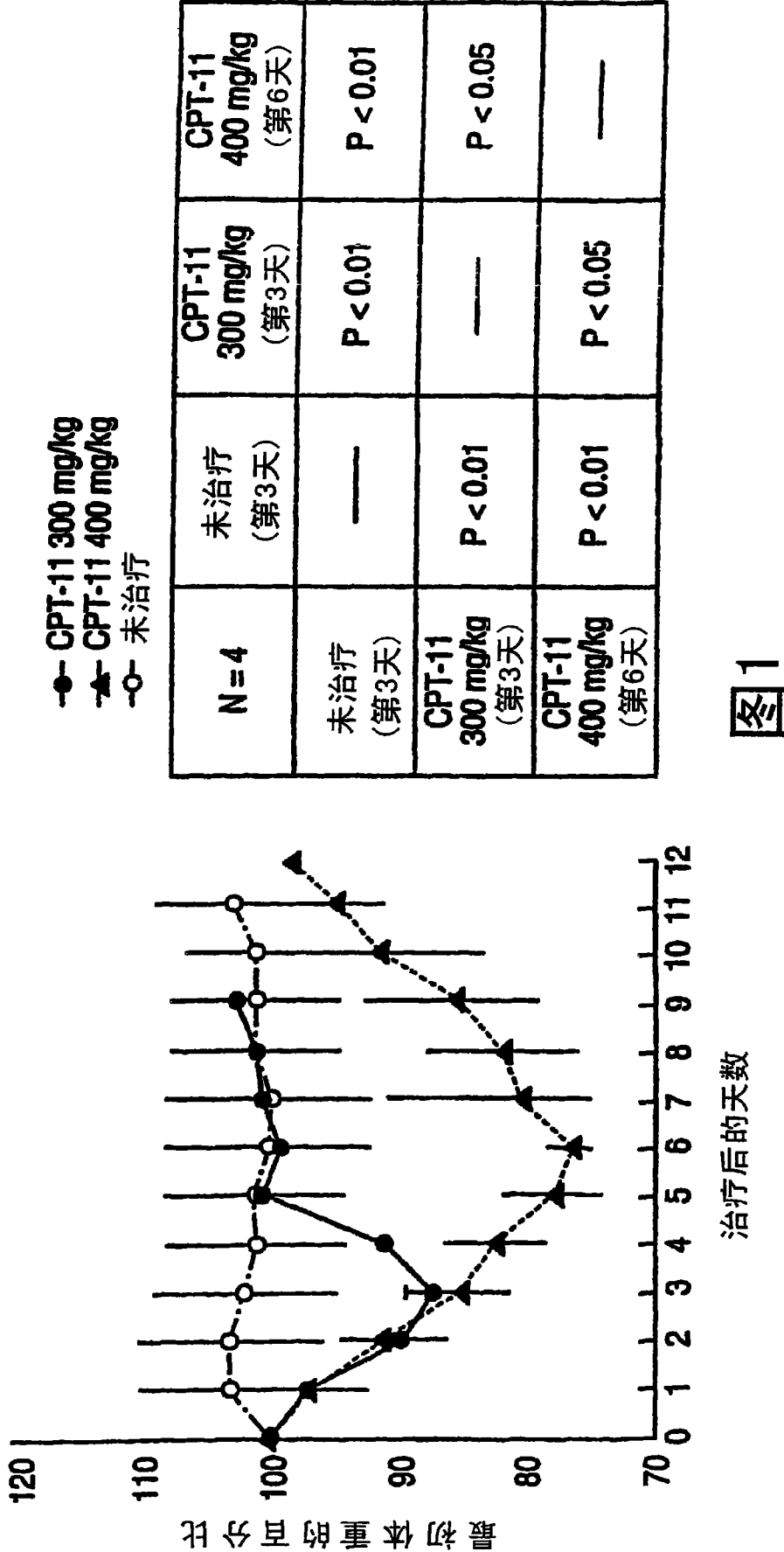


图1

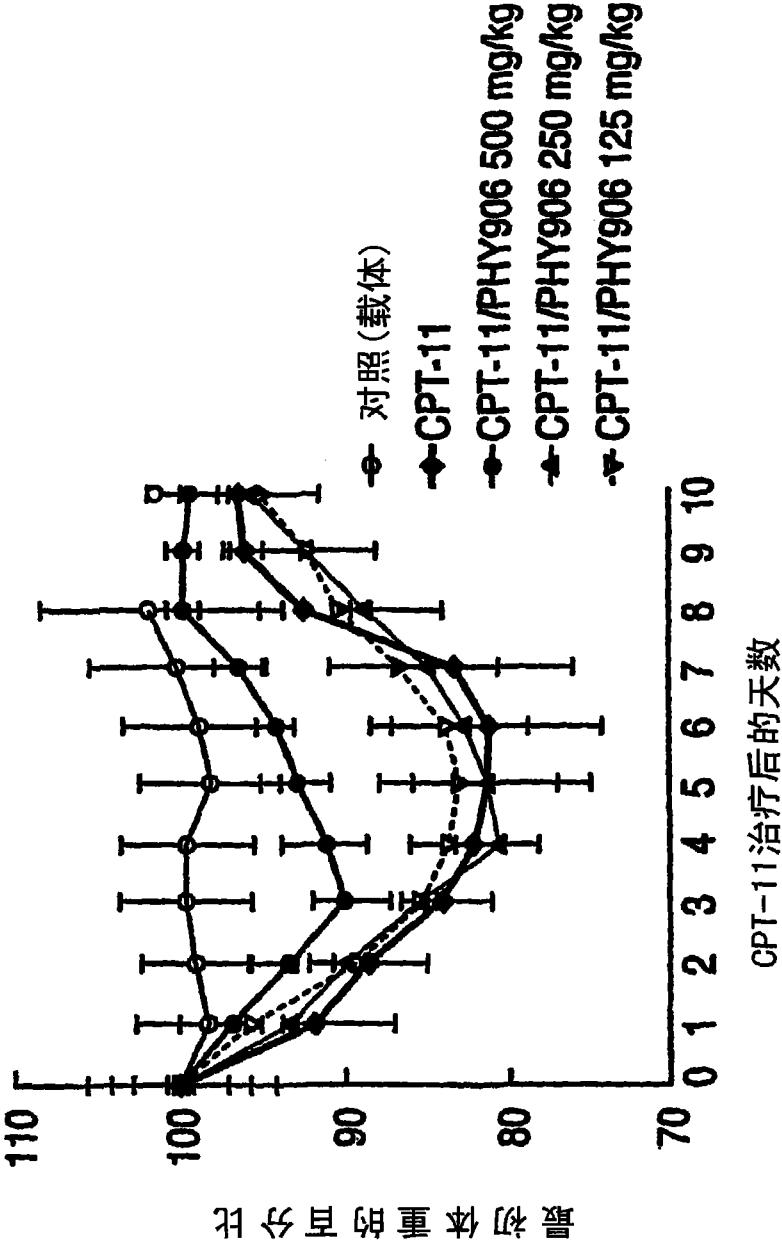
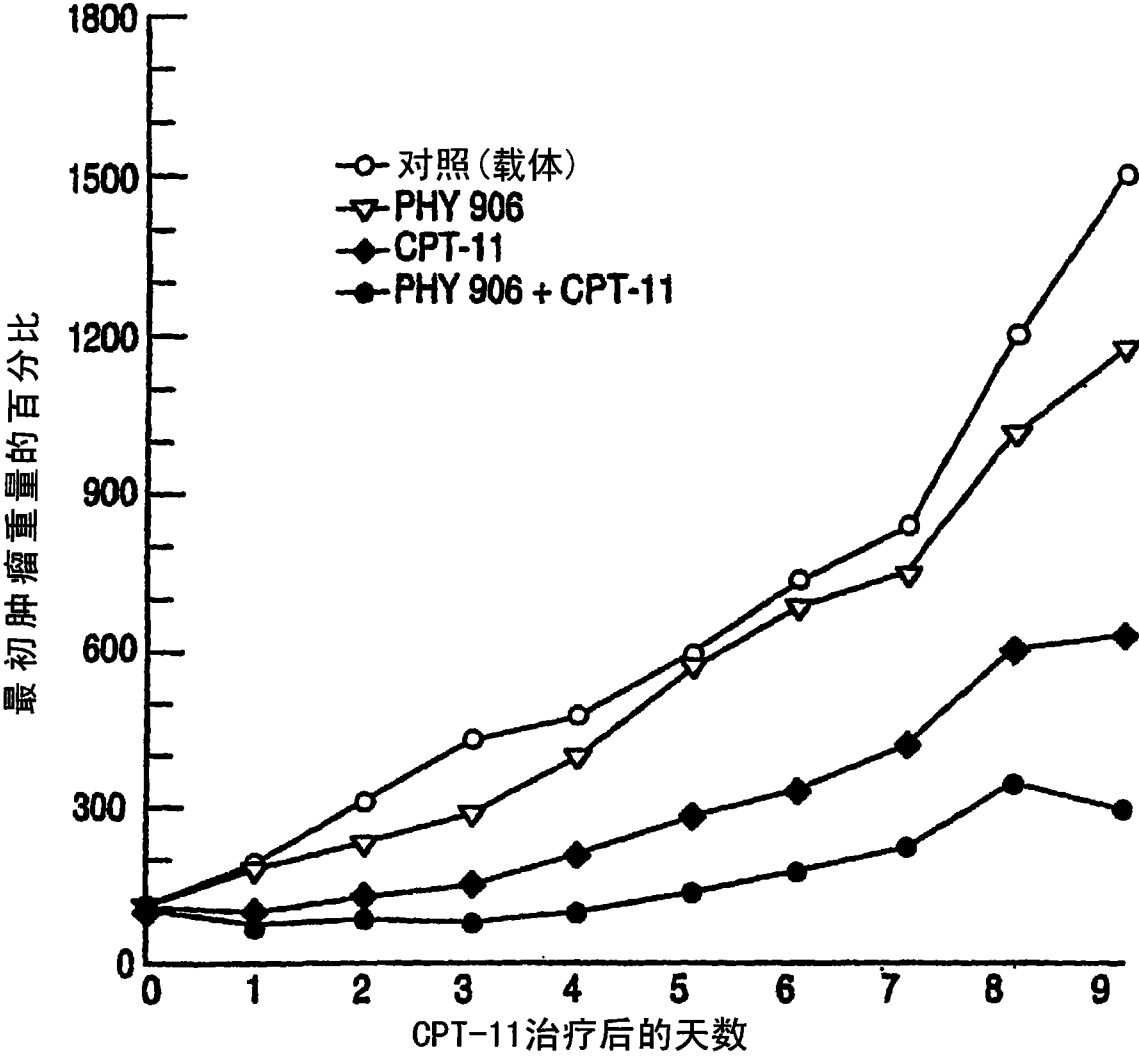


图2



第6天时t 检验的P值	对照 (载体)	PHY906	CPT-11	CPT-11+ PHY906
PHY 906	0.5950	——	0.0027	0.0001
CPT-11	0.0004	0.0027	——	0.0007
CPT-11+ PHY906	0.0001	0.0001	0.0007	——

图3

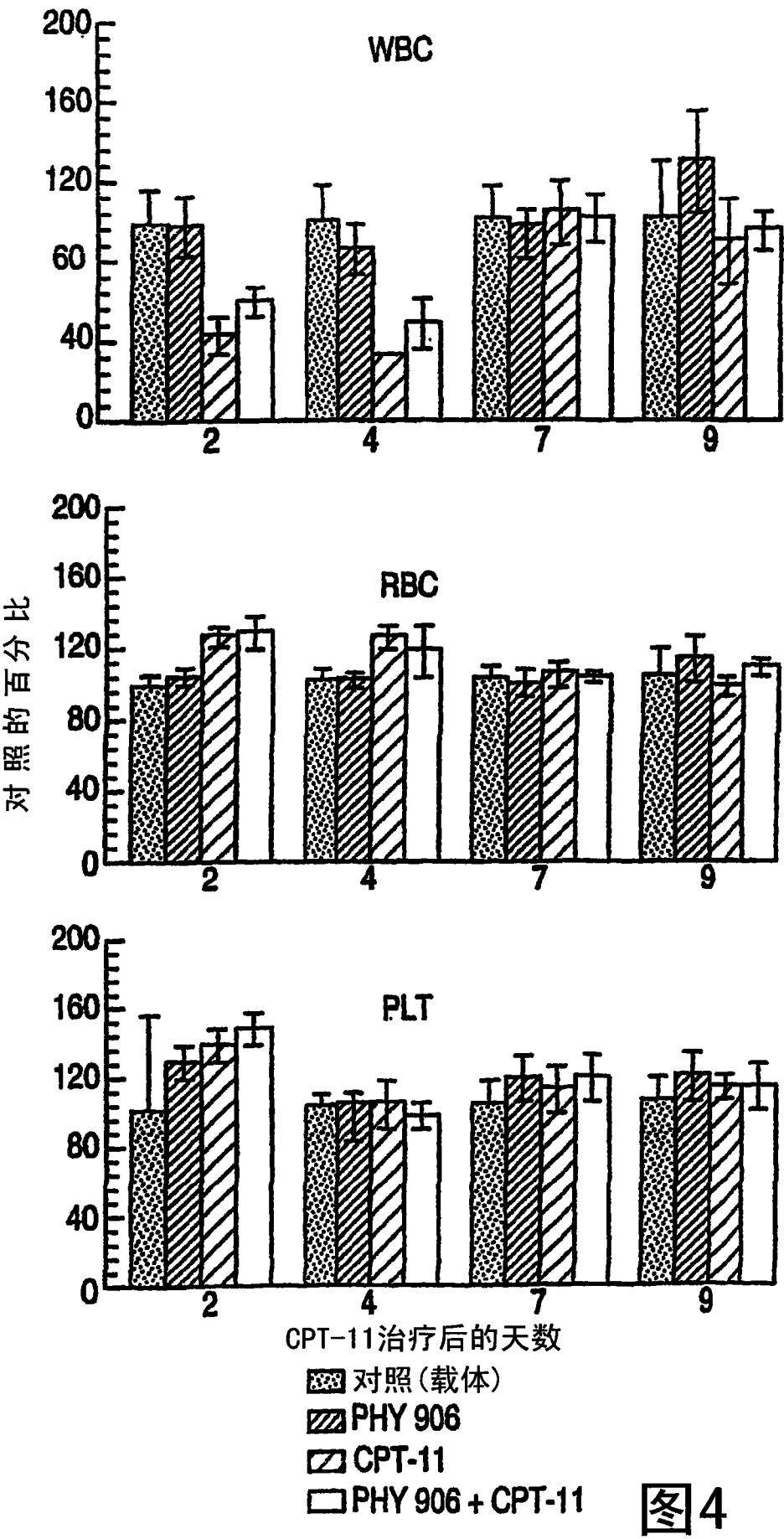


图 4

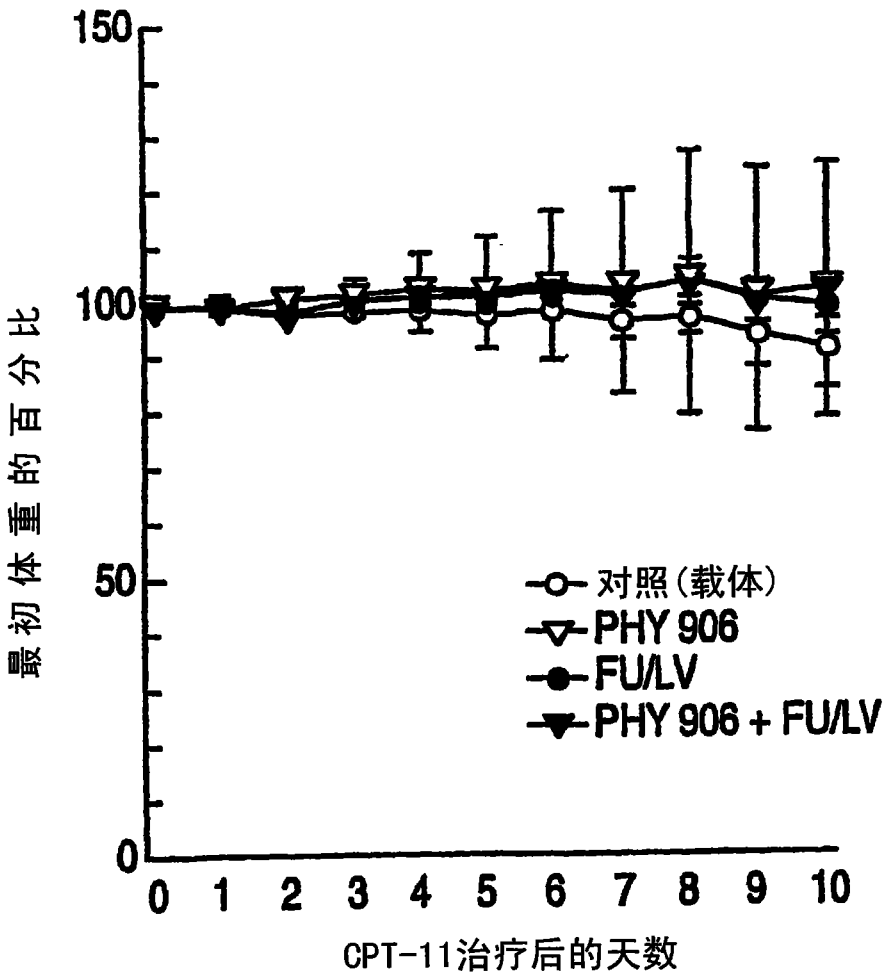


图5

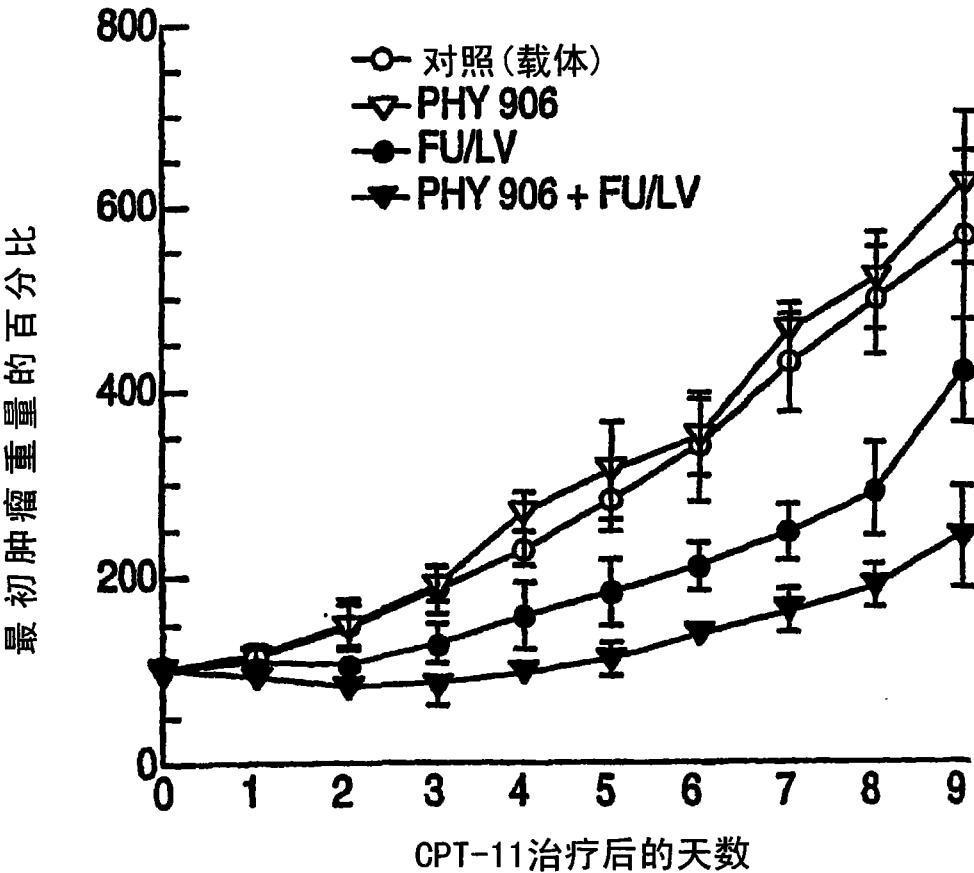


图6

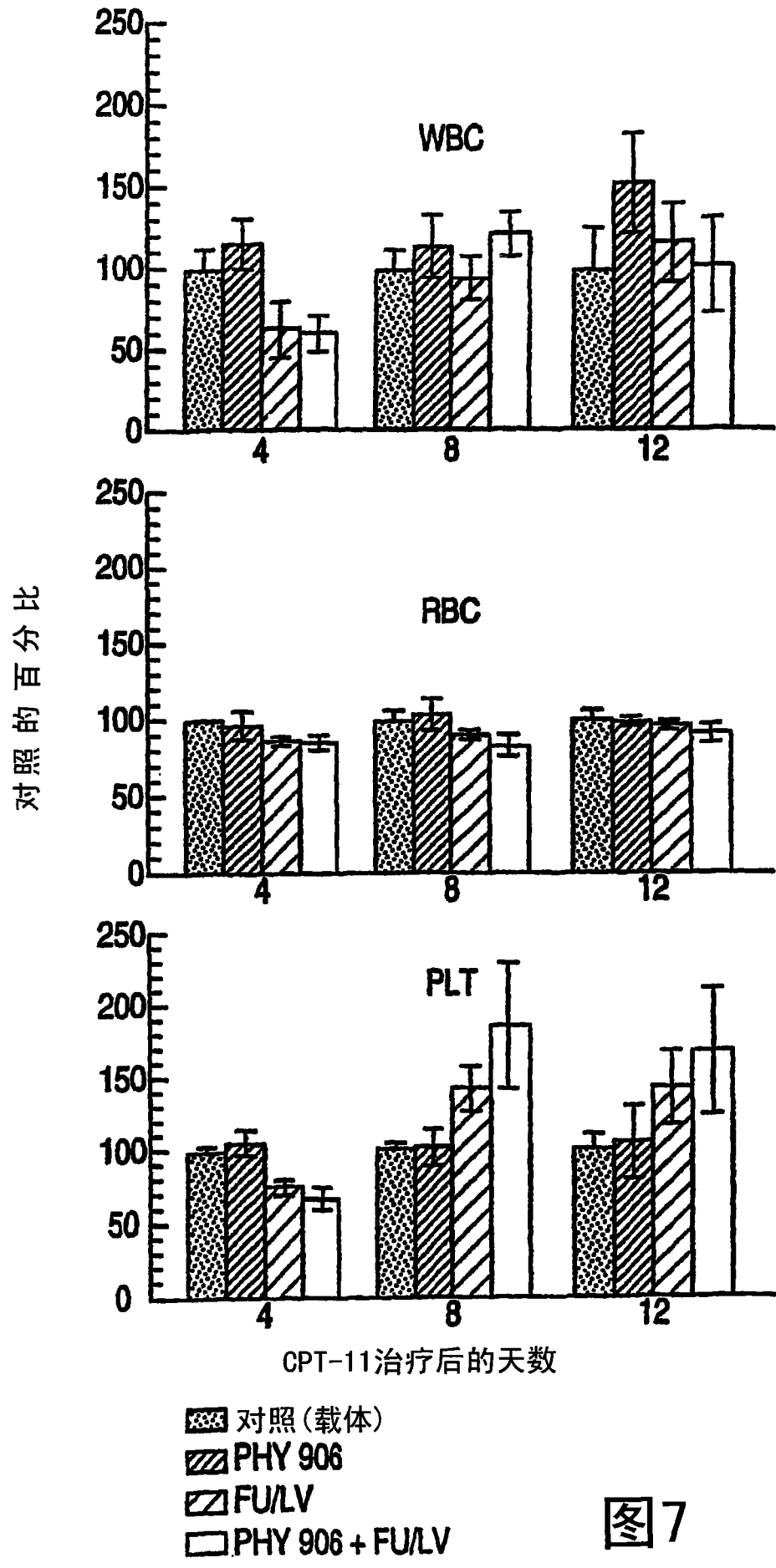


图7

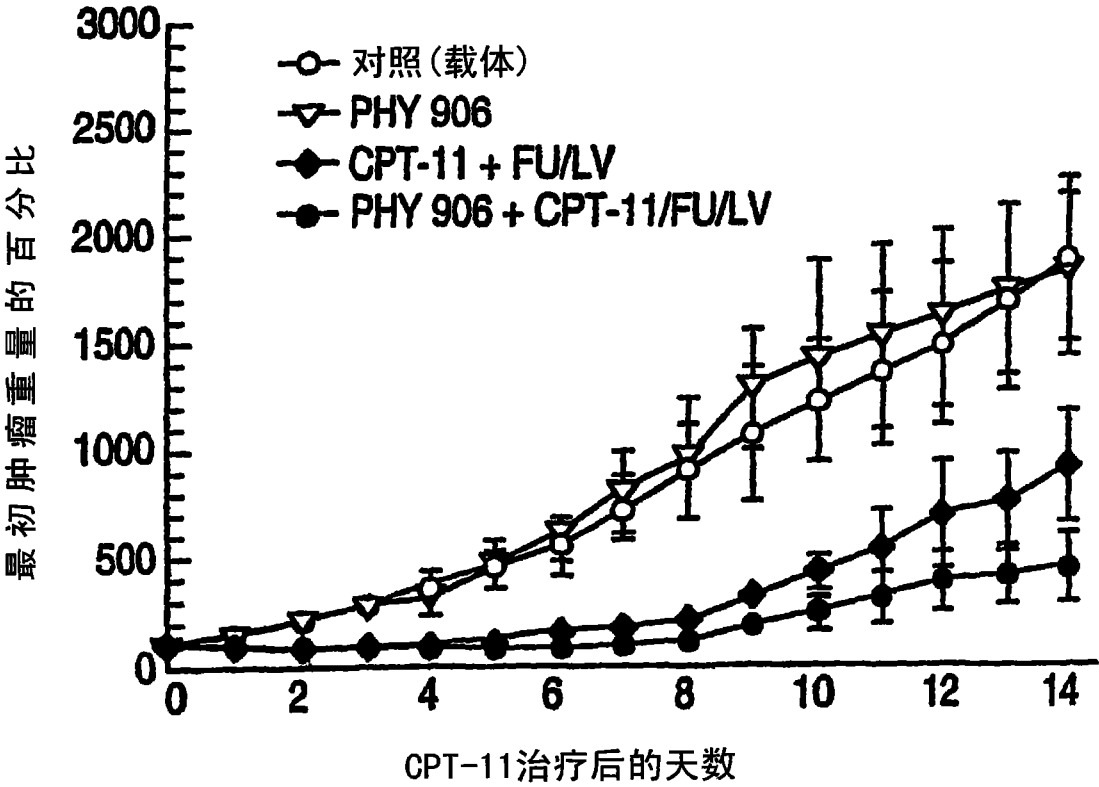


图8

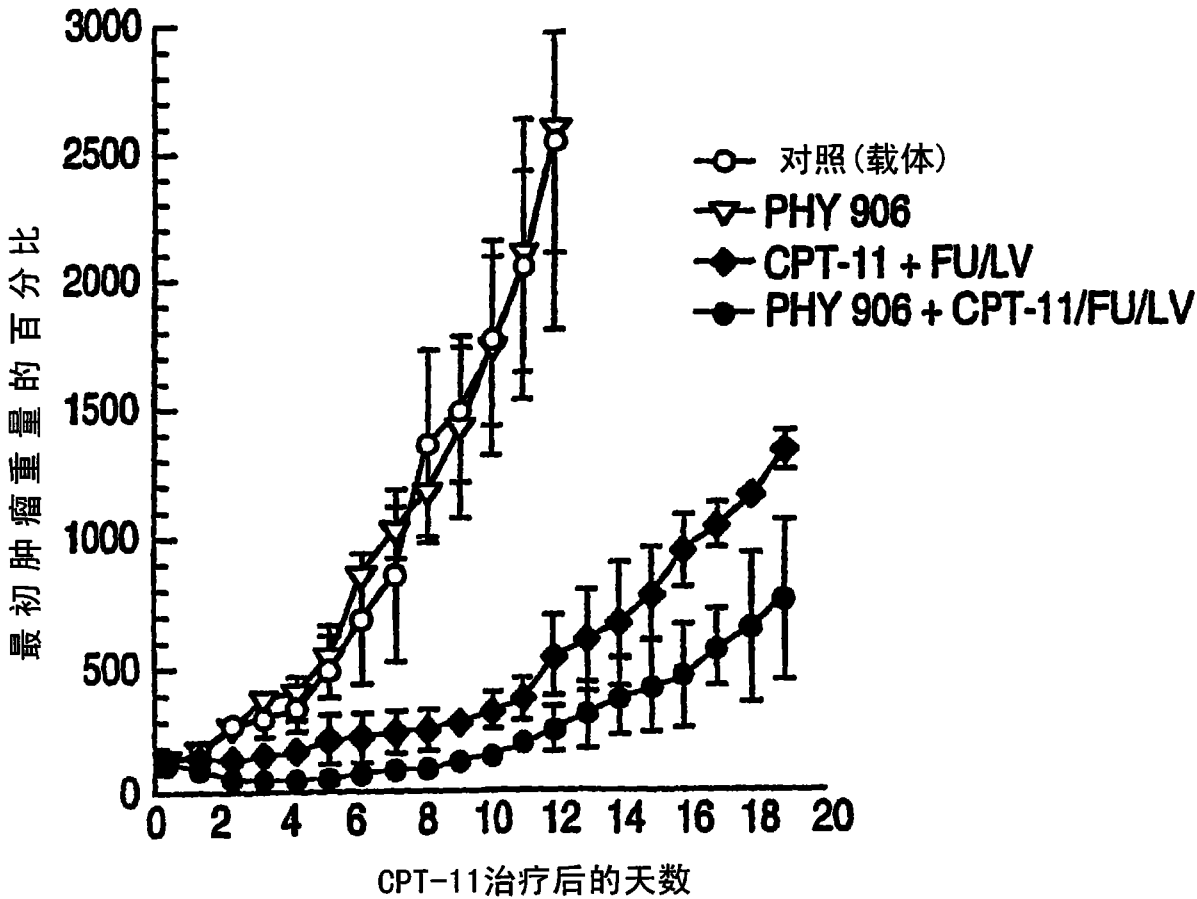


图9

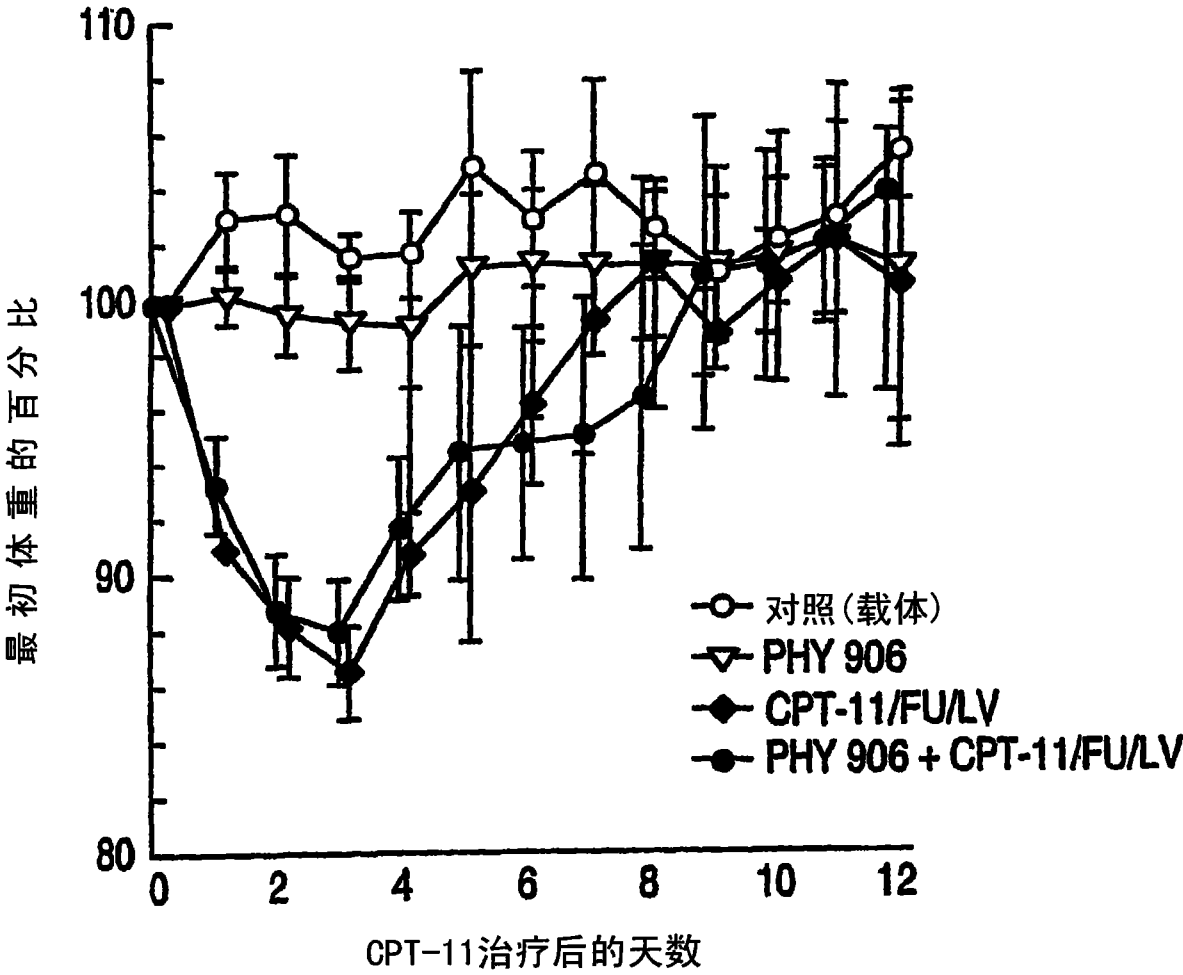
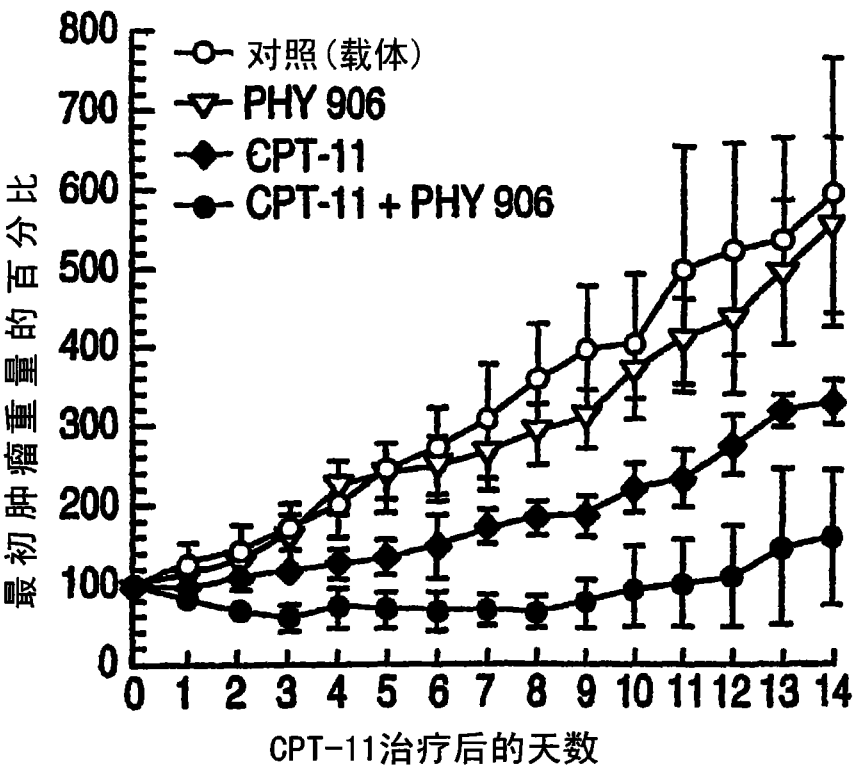


图10



第14天时t检验 (*P值)	对照 (载体)	CPT-11	PHY 906
CPT011	0.02	—	0.02
PHY 906	0.6	0.02	—
CPT-11 + PHY 906	0.002	0.01	0.003

图 11

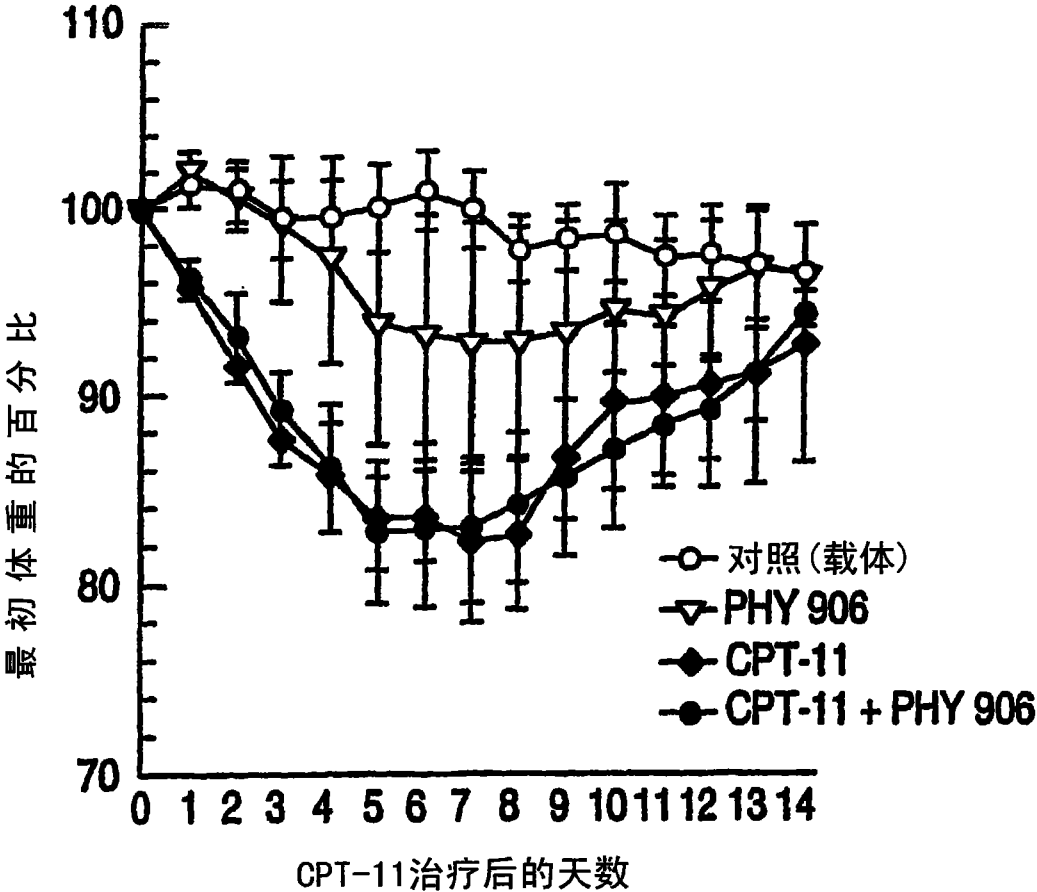


图12

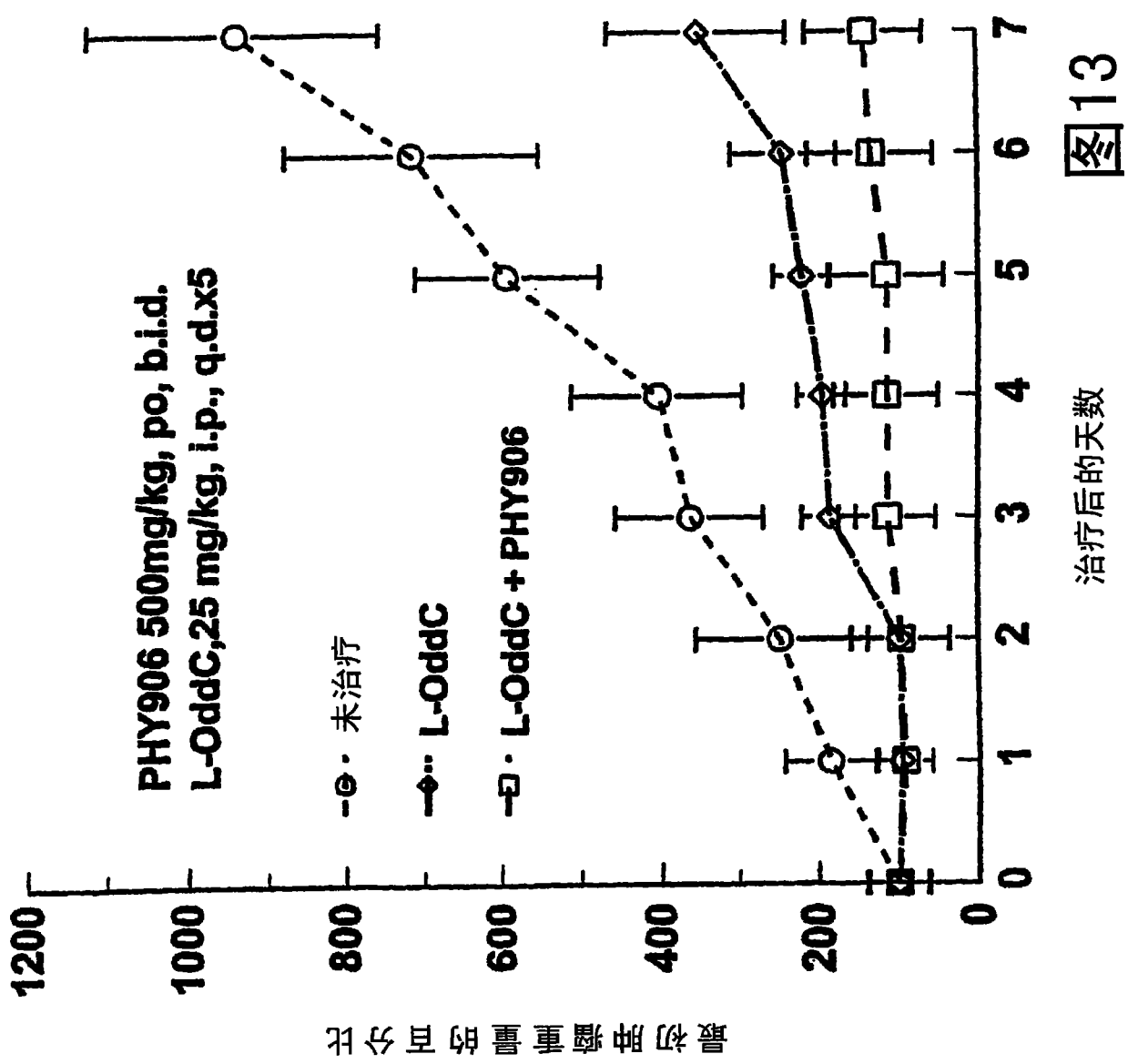


图13

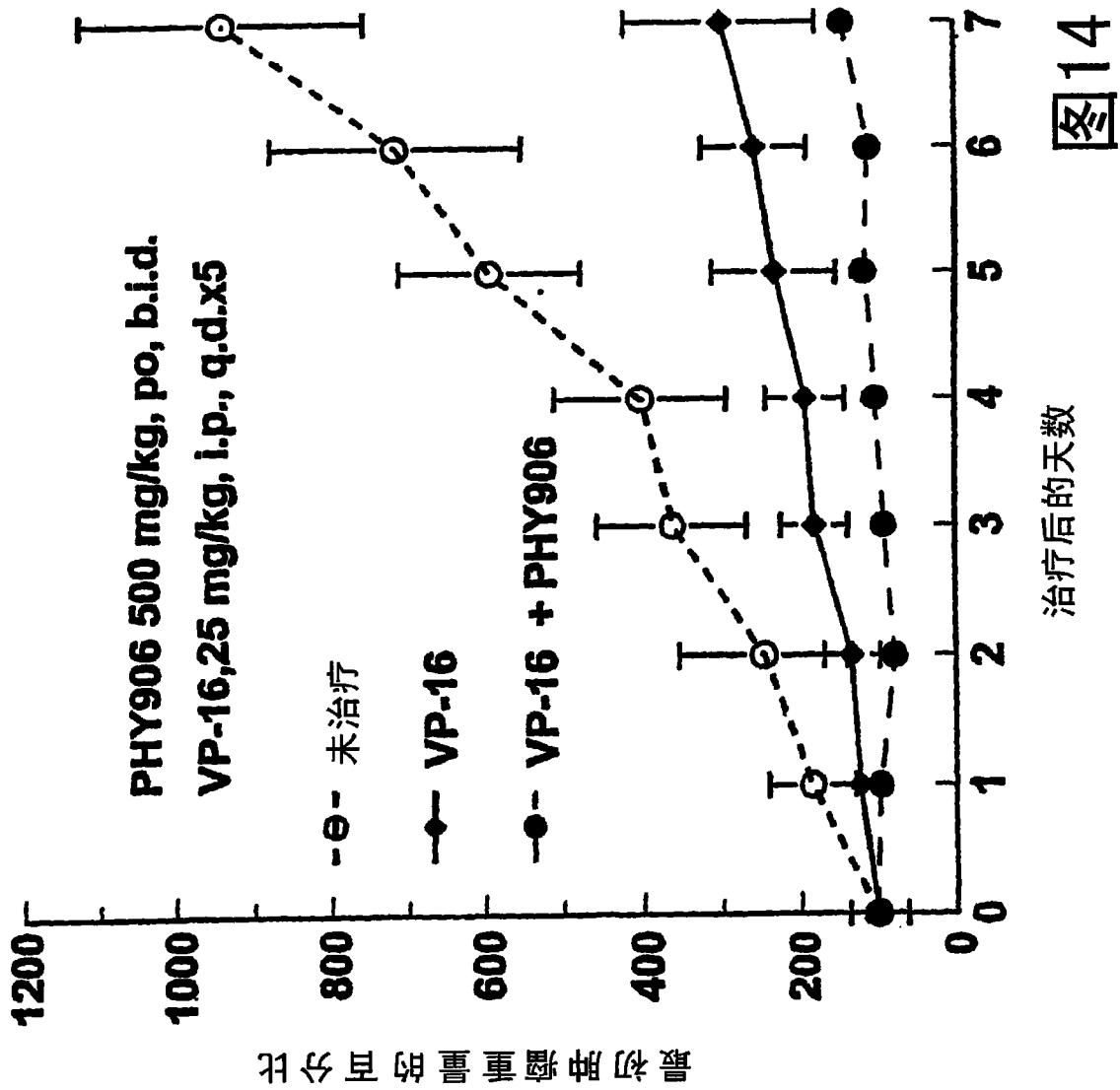
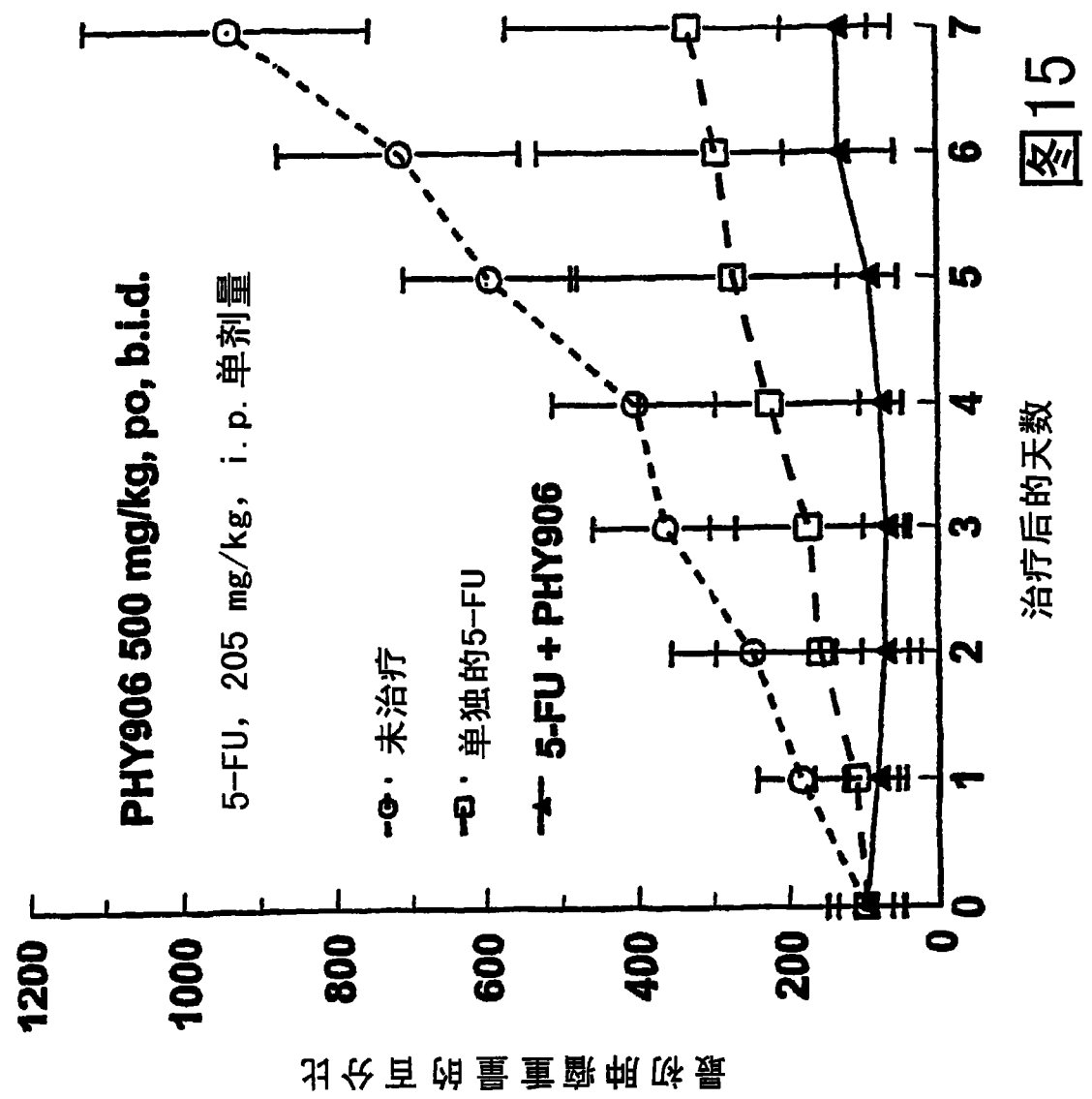


图14



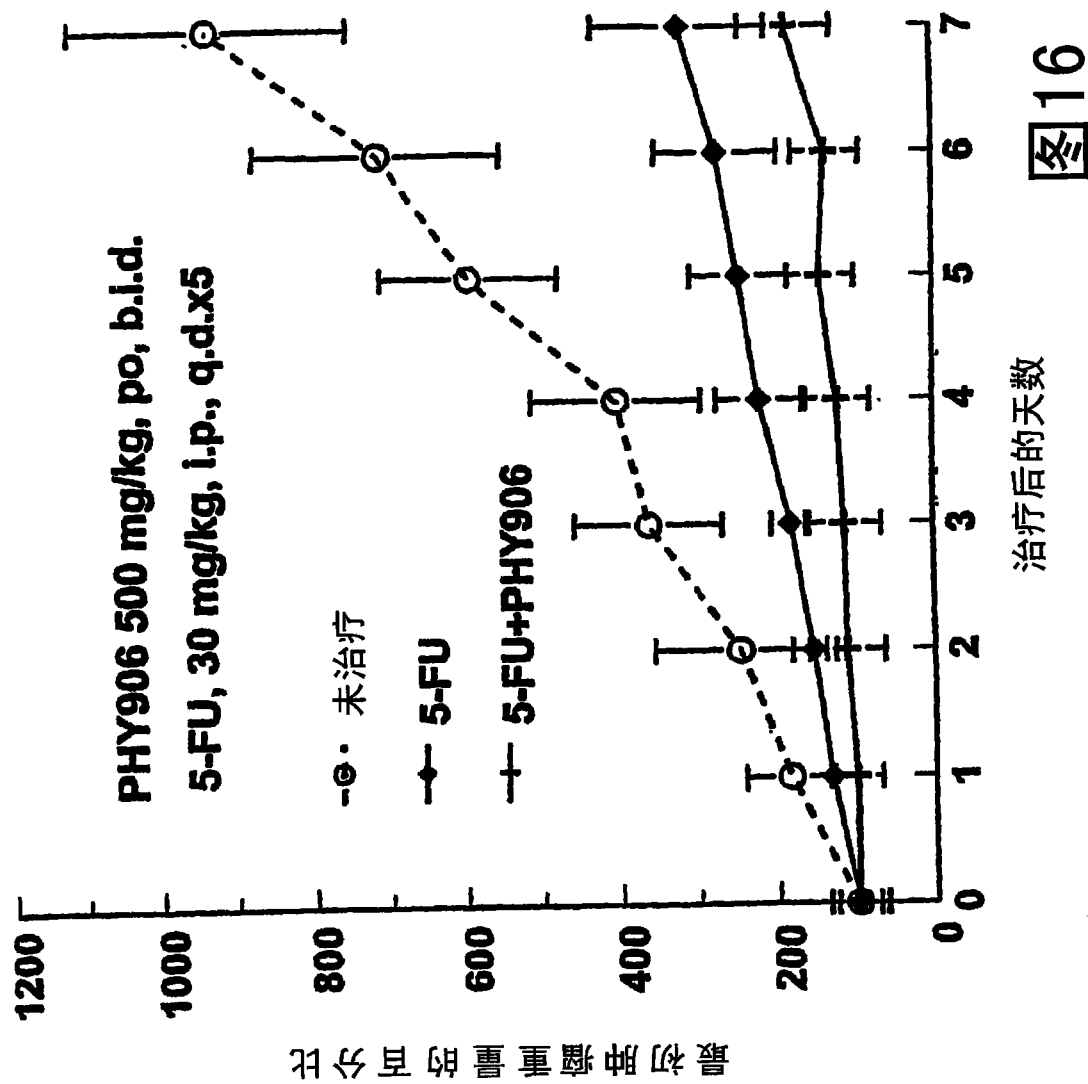
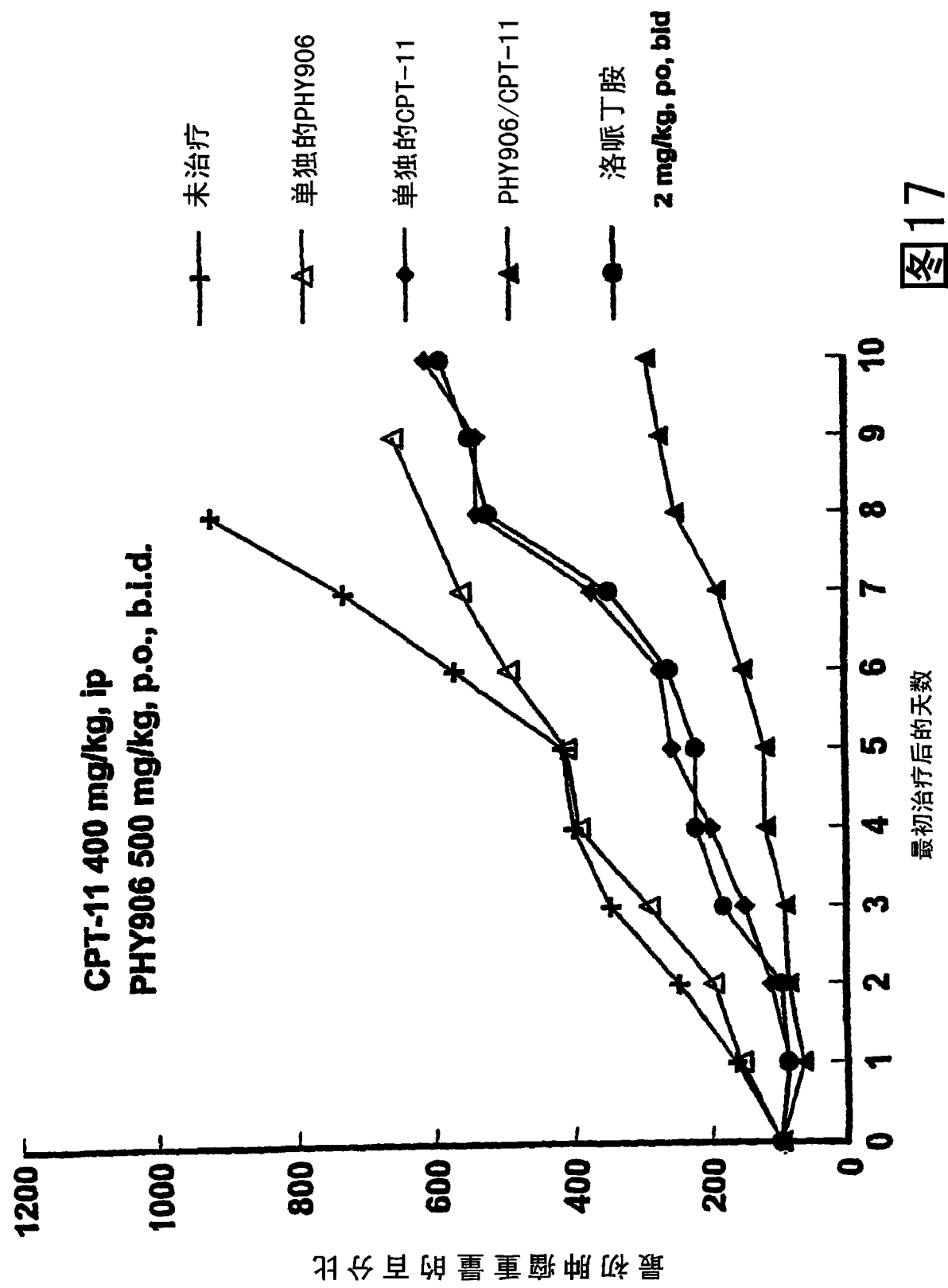


图16



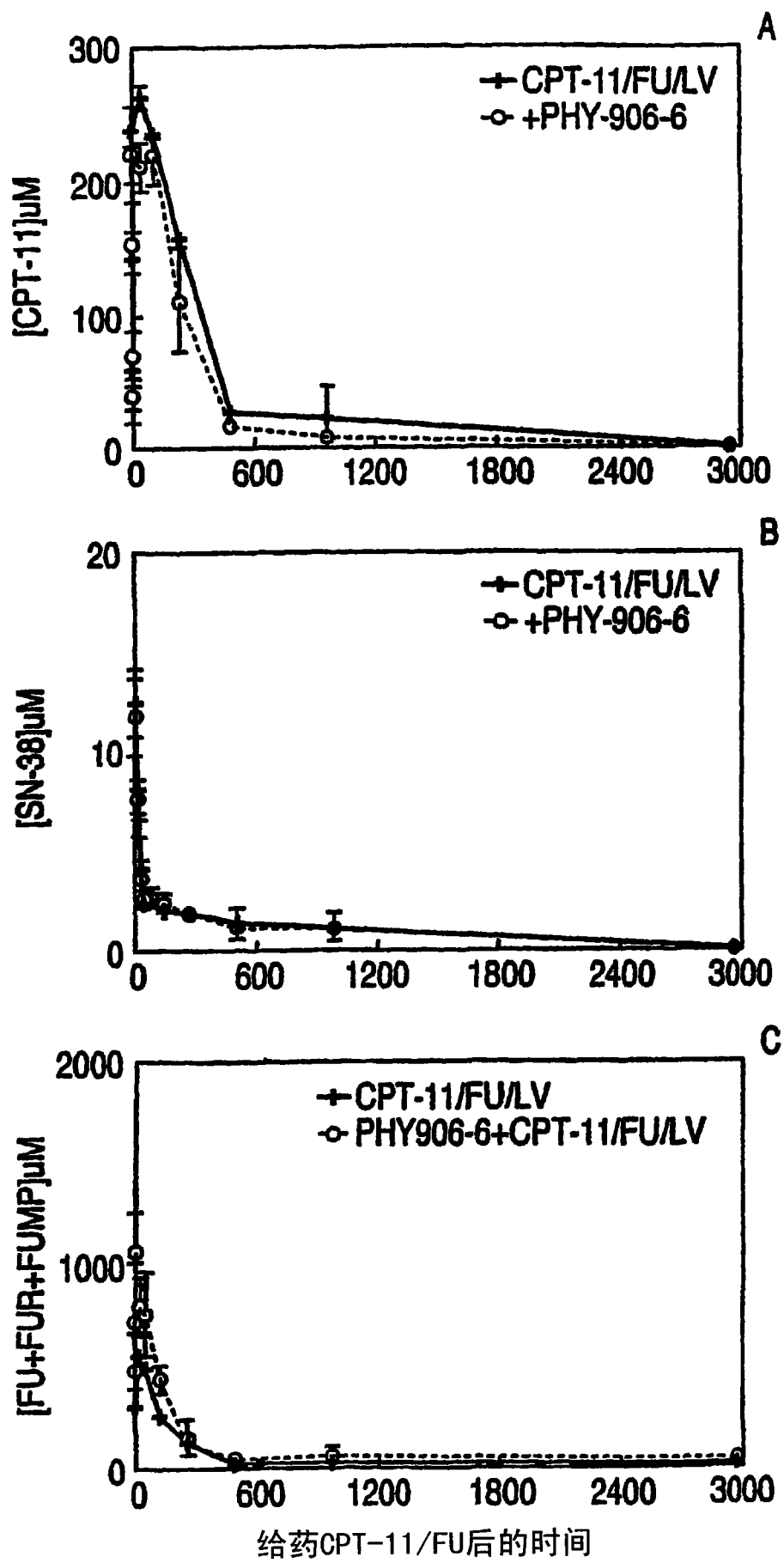


图 18

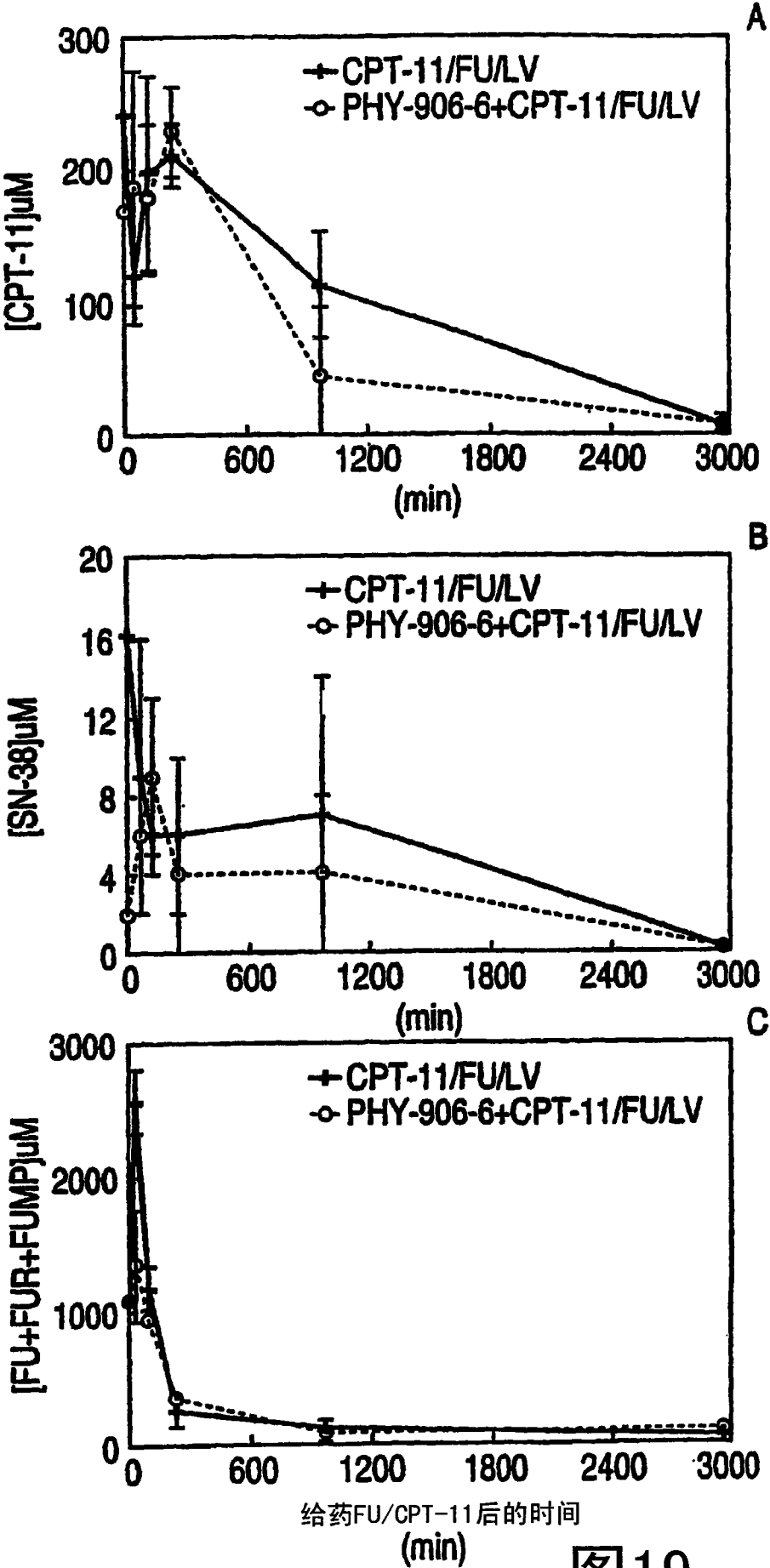


图19

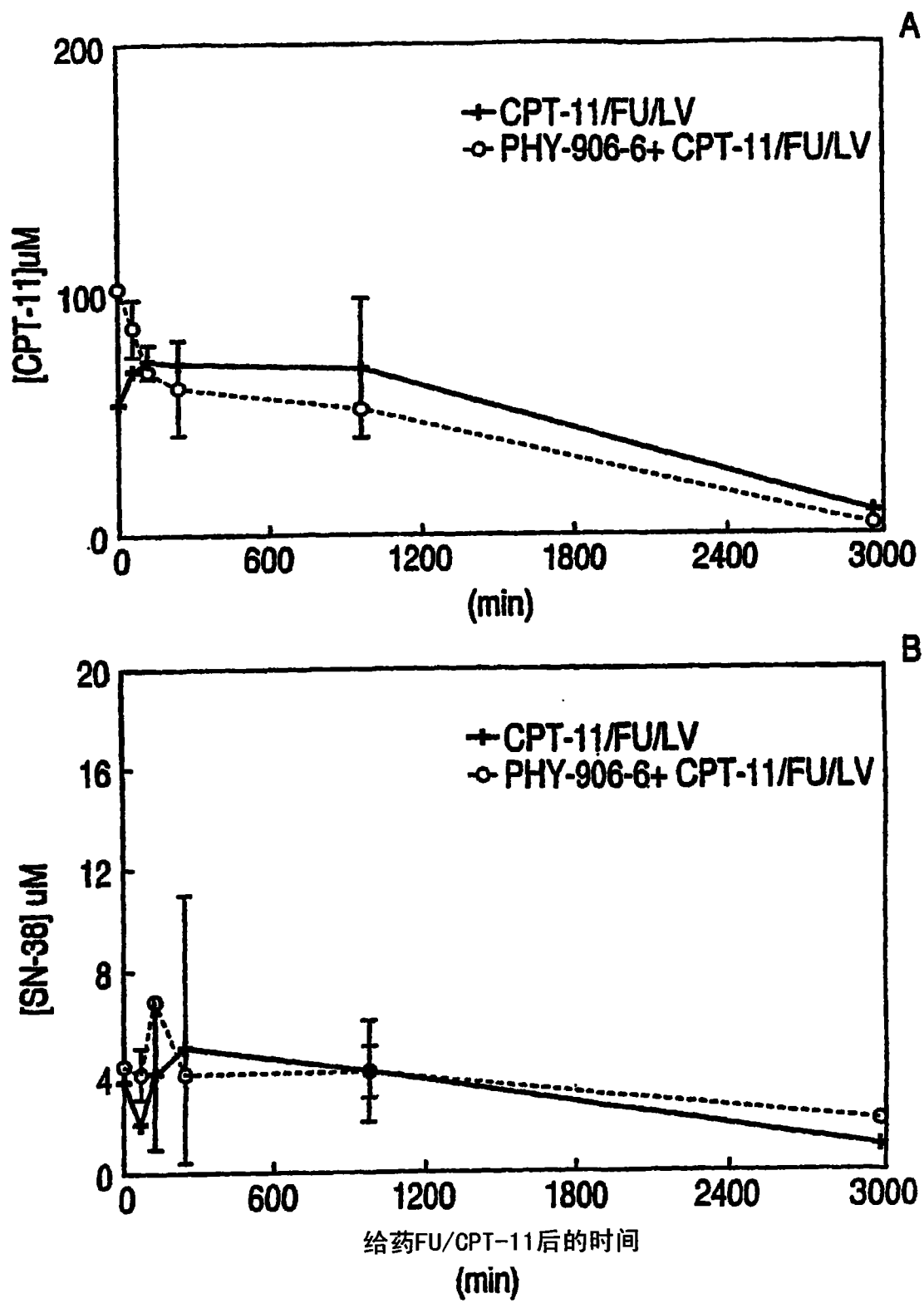


图20

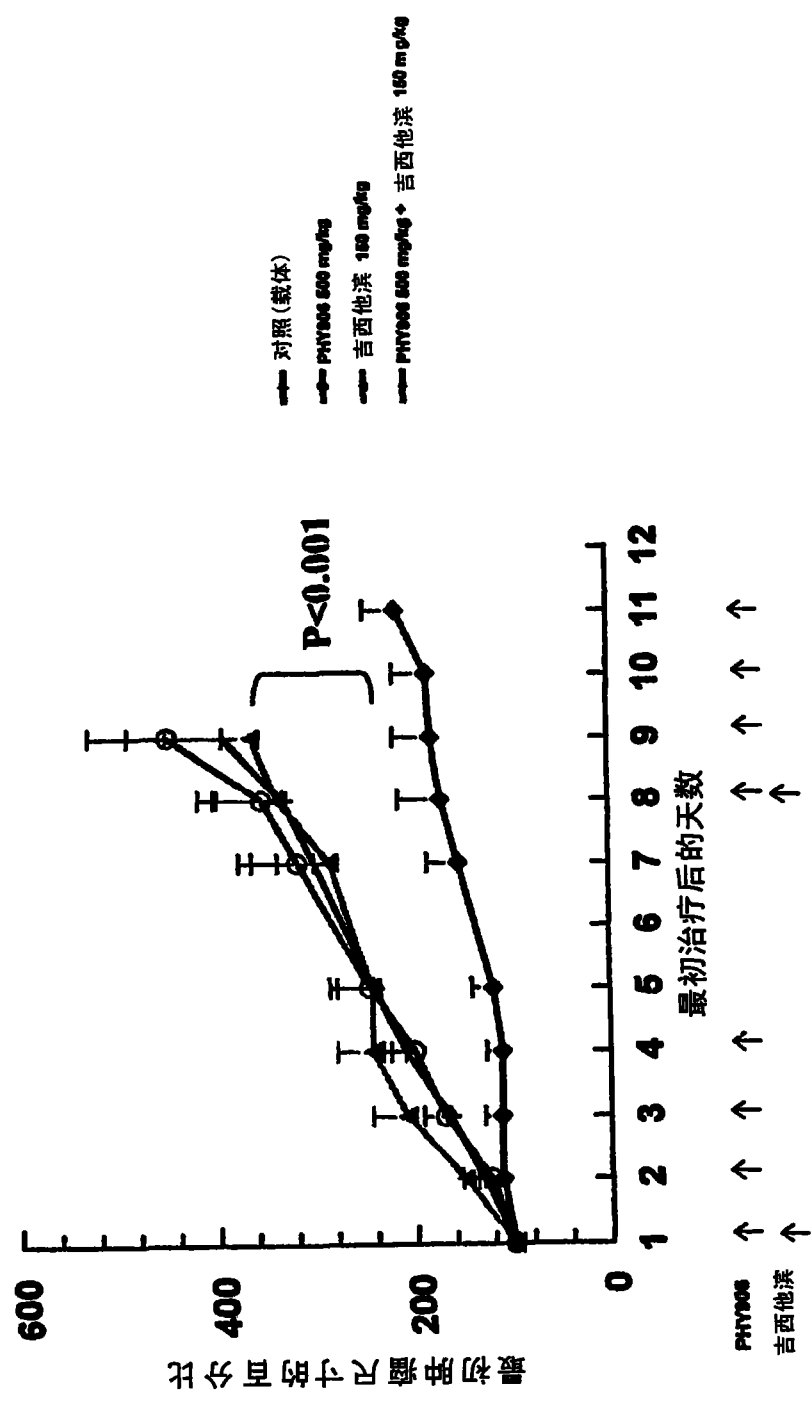


图21

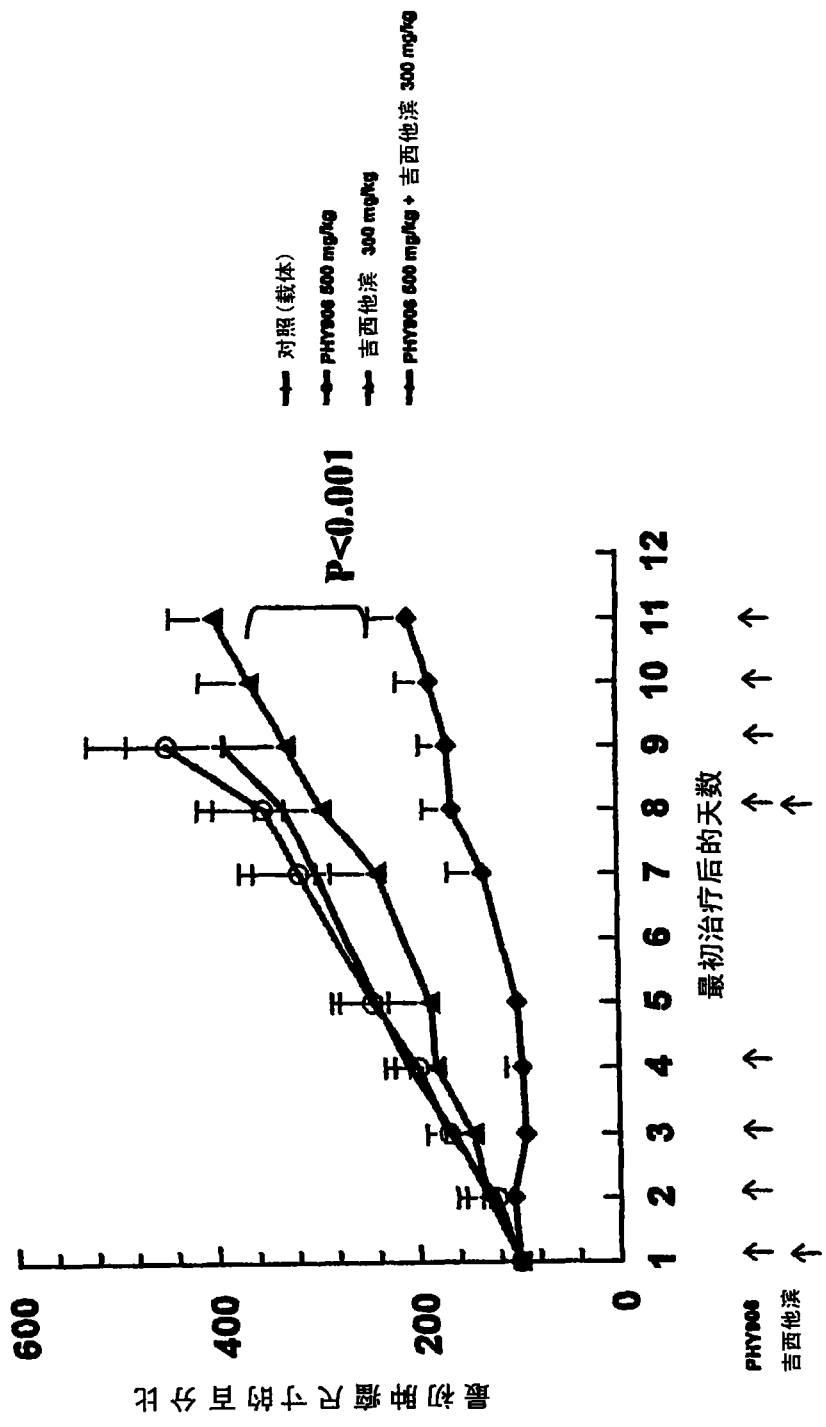


图22

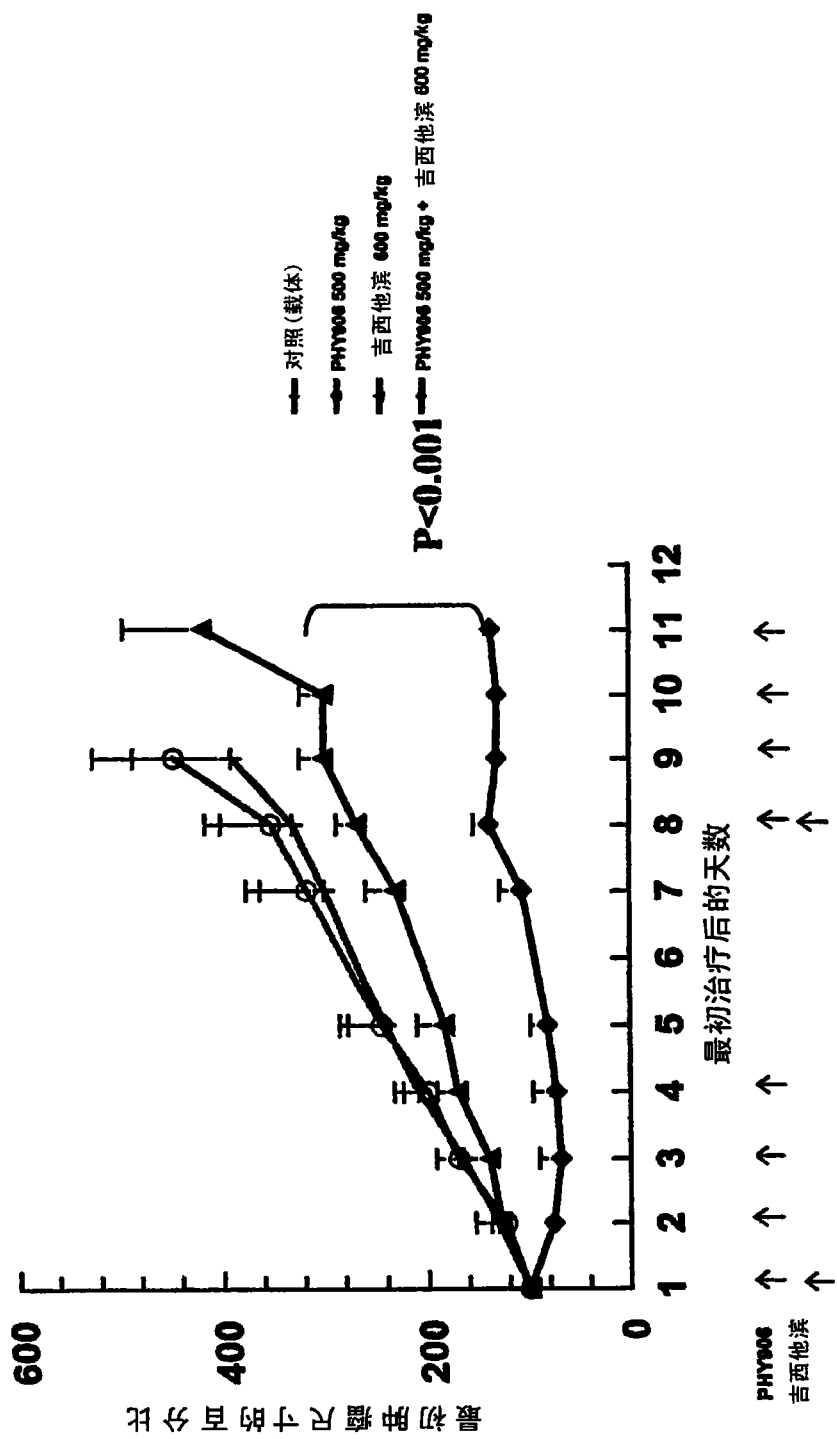


图23

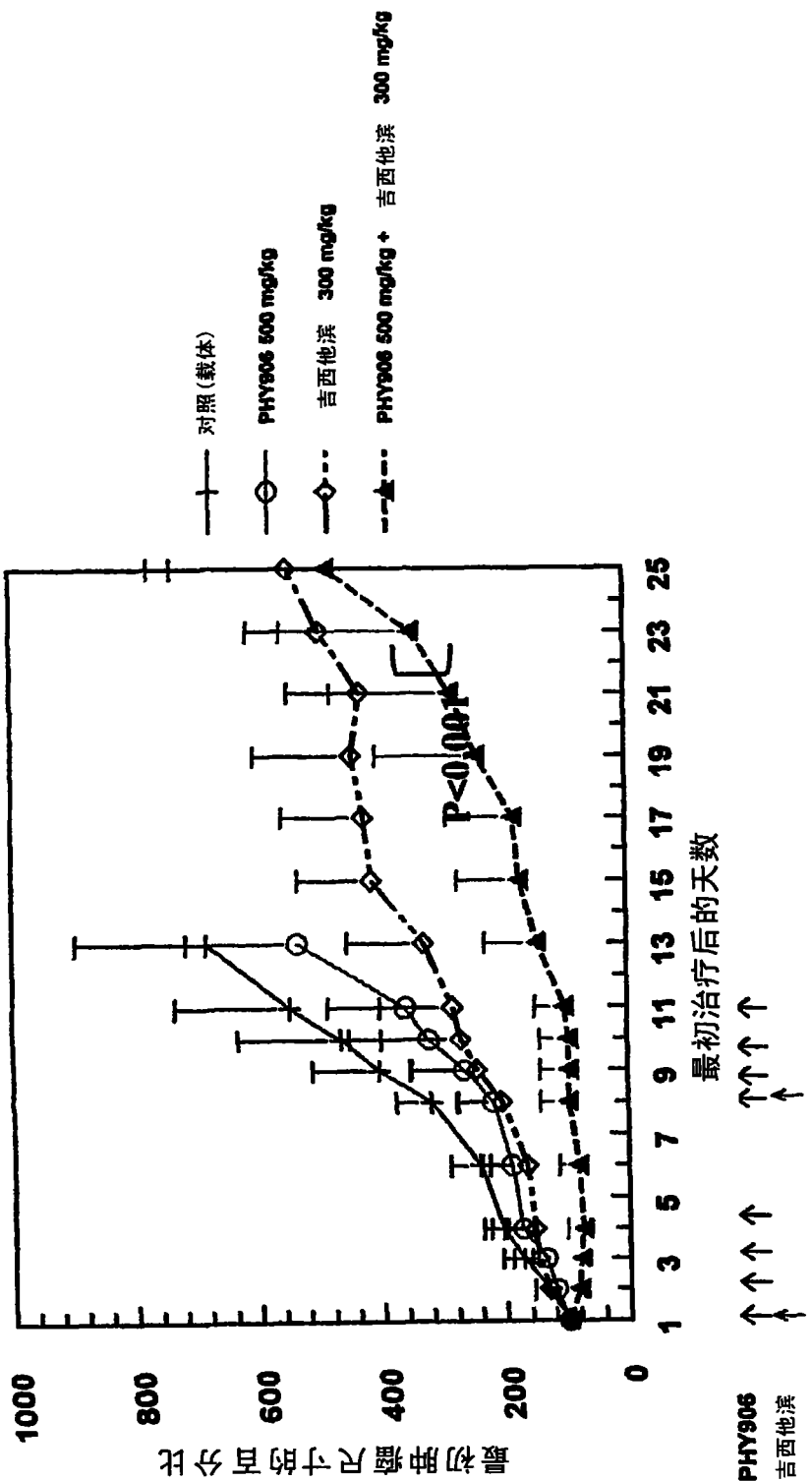


图24

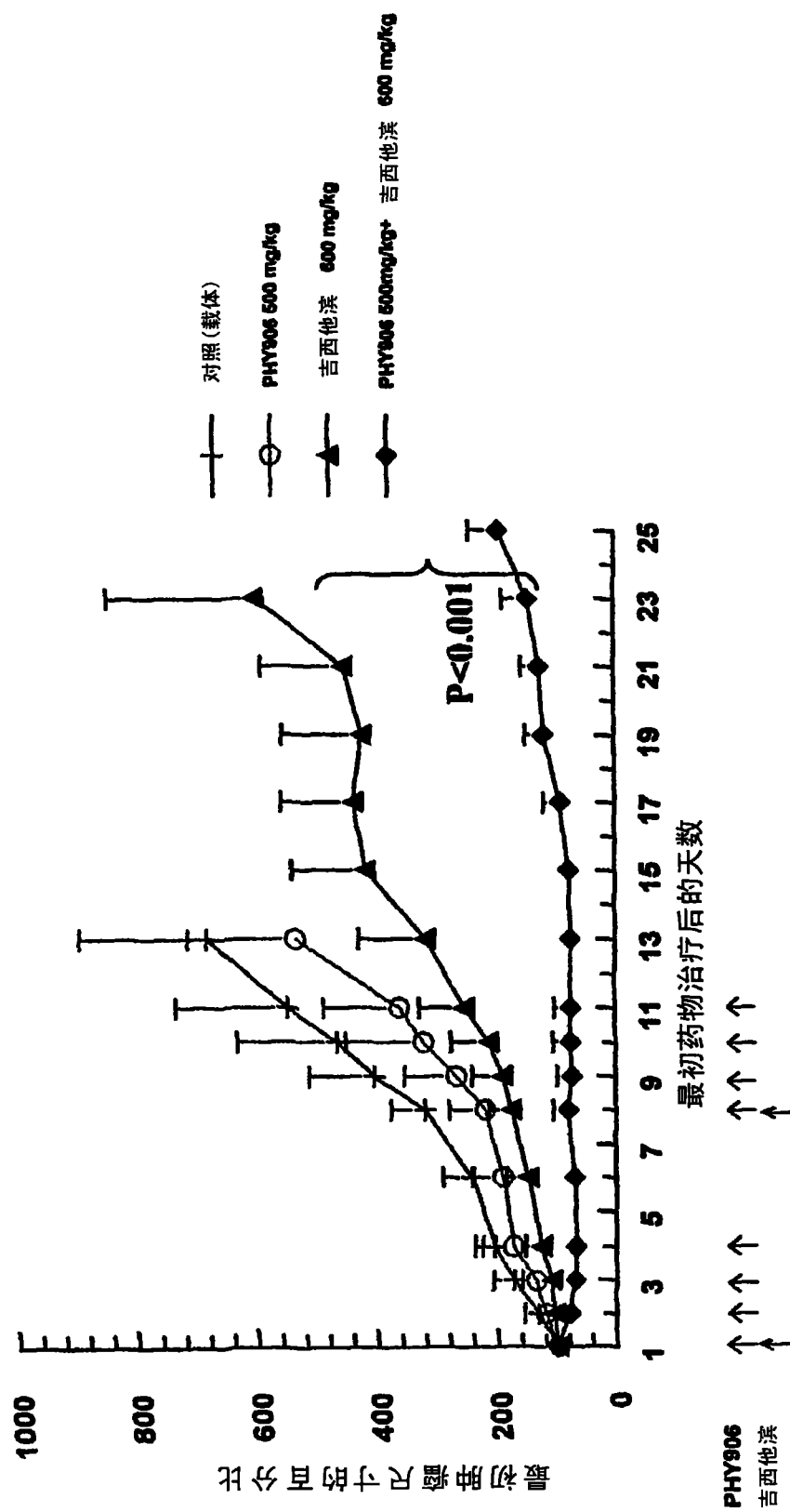


图25

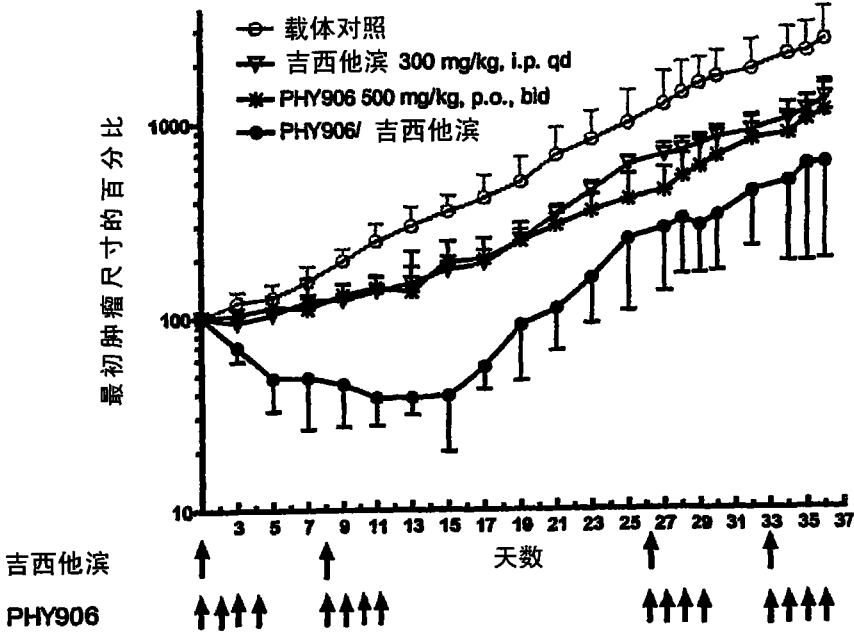


图26

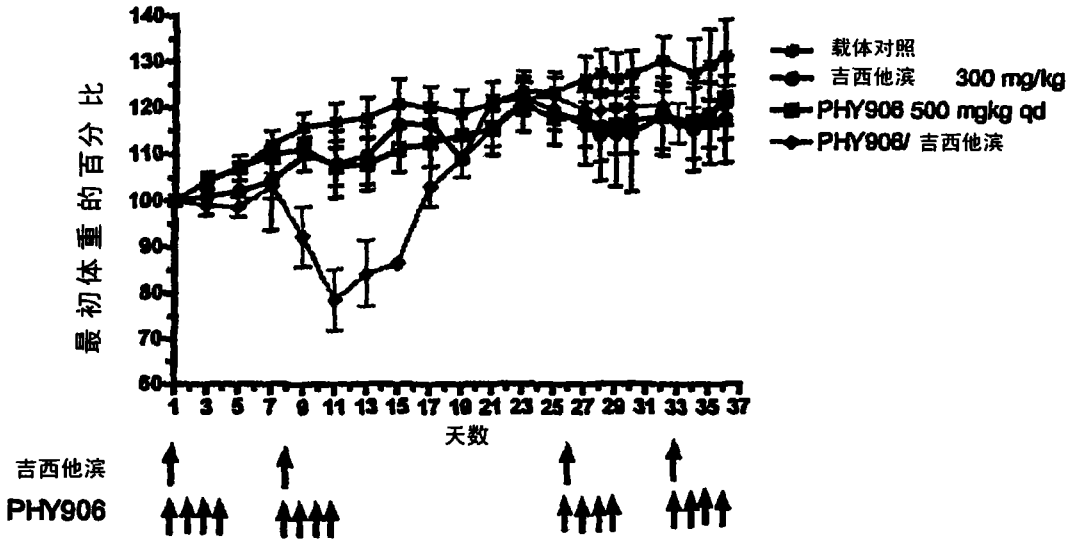


图27

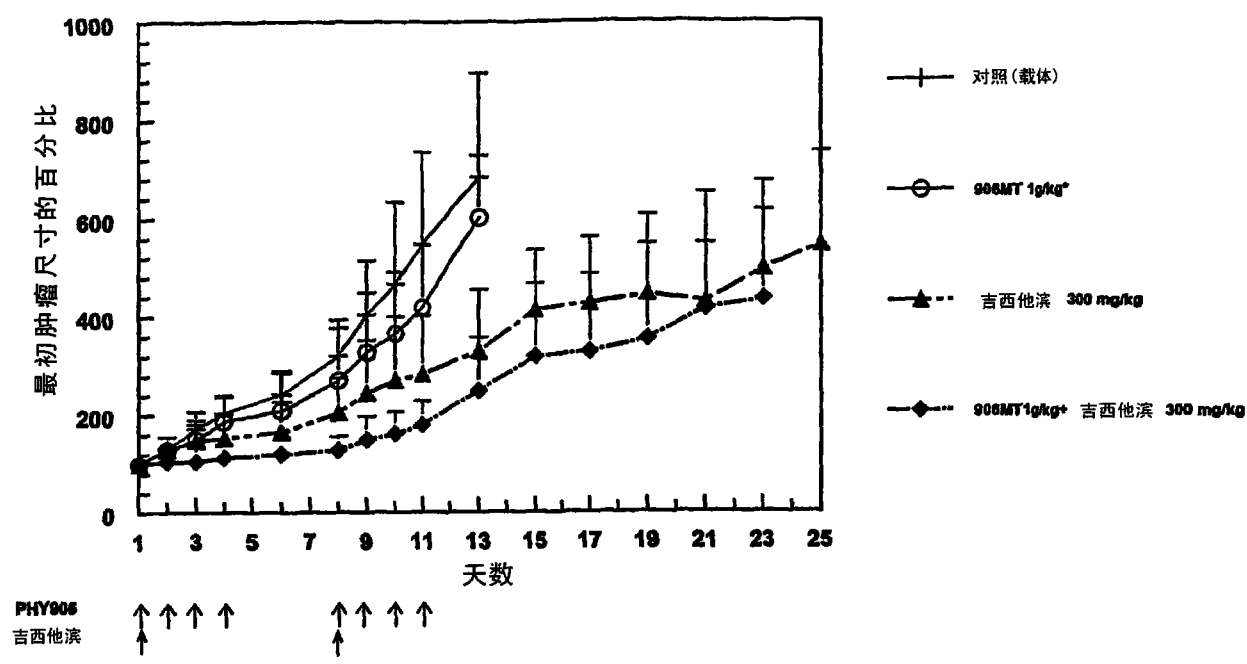


图28

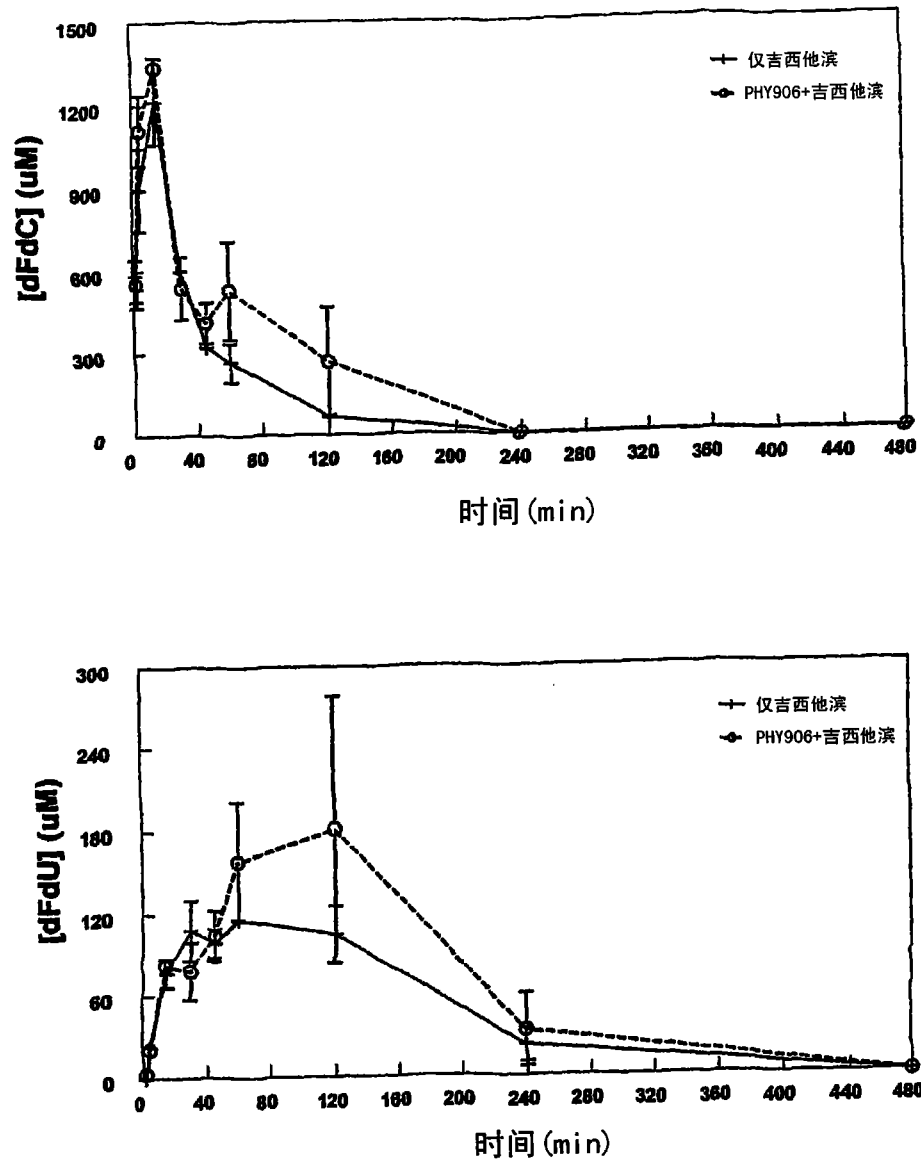


图29

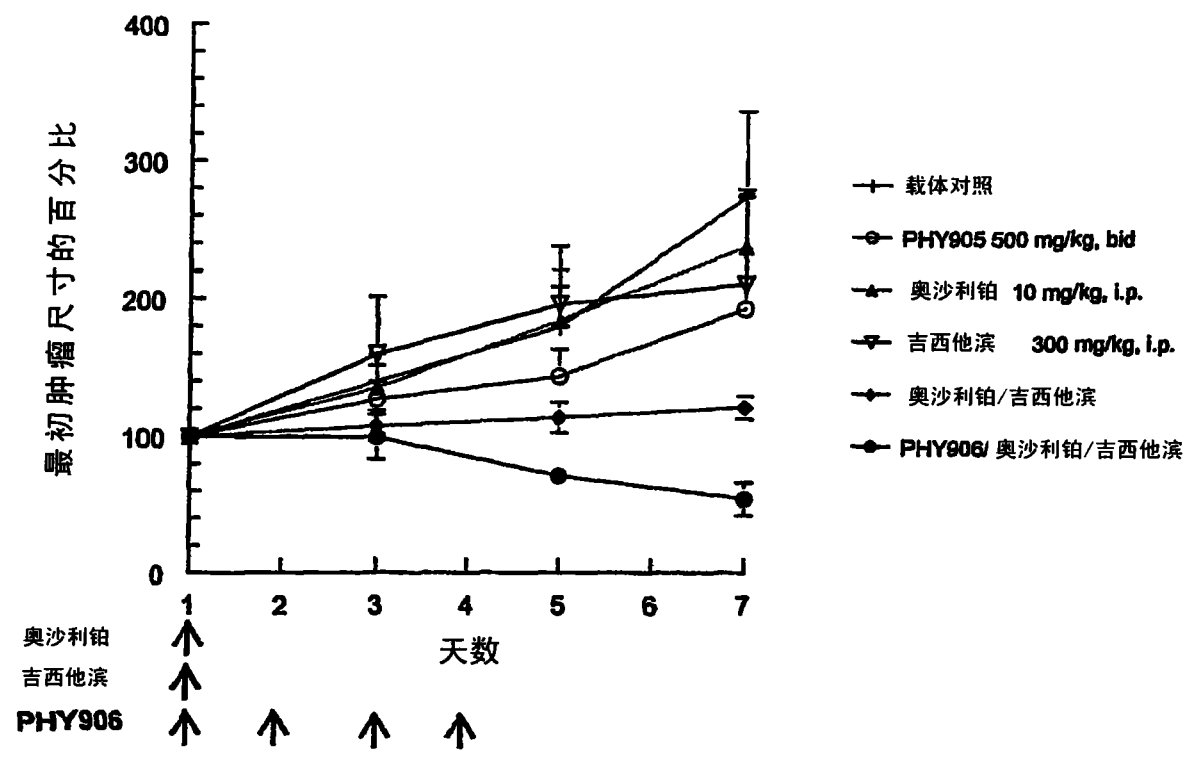


图30

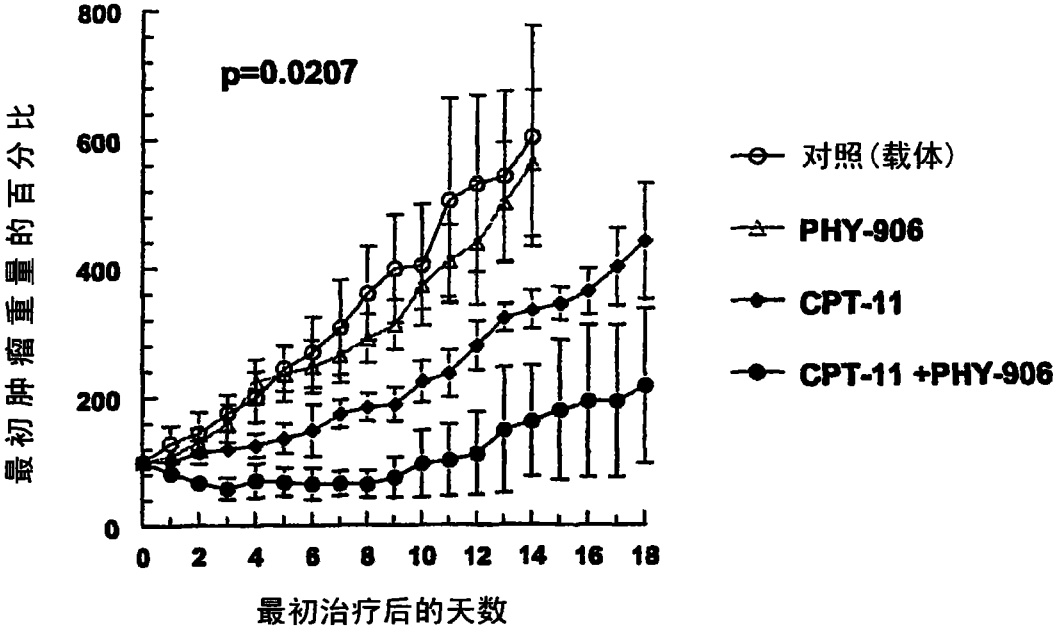


图31

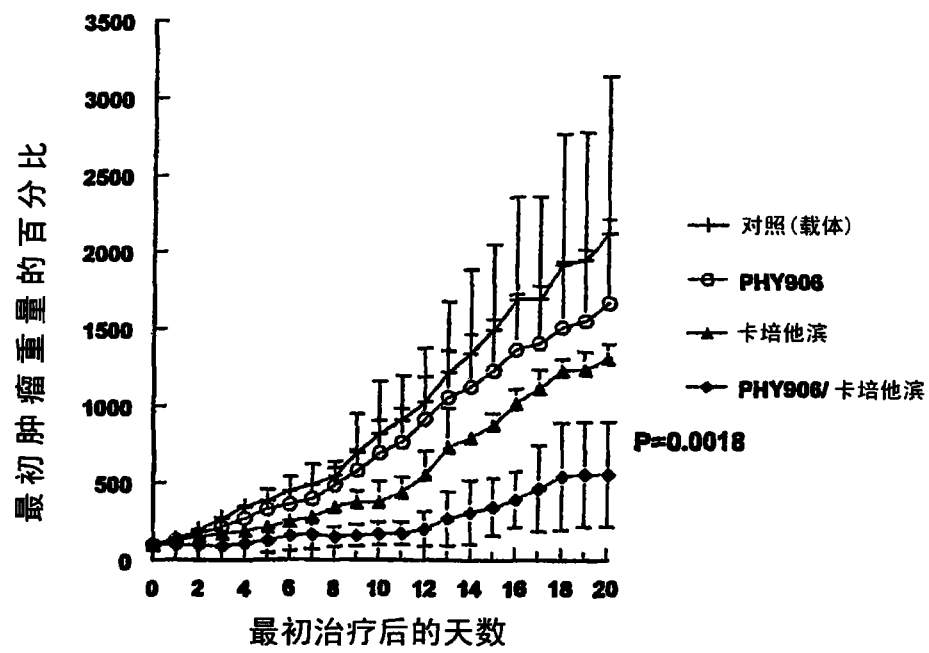


图32

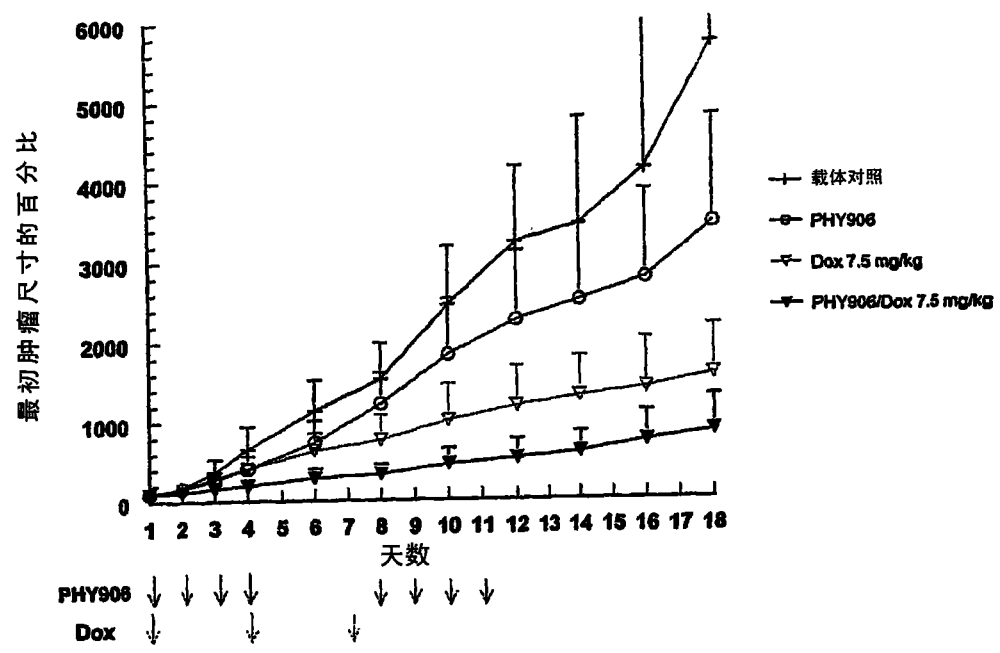


图33

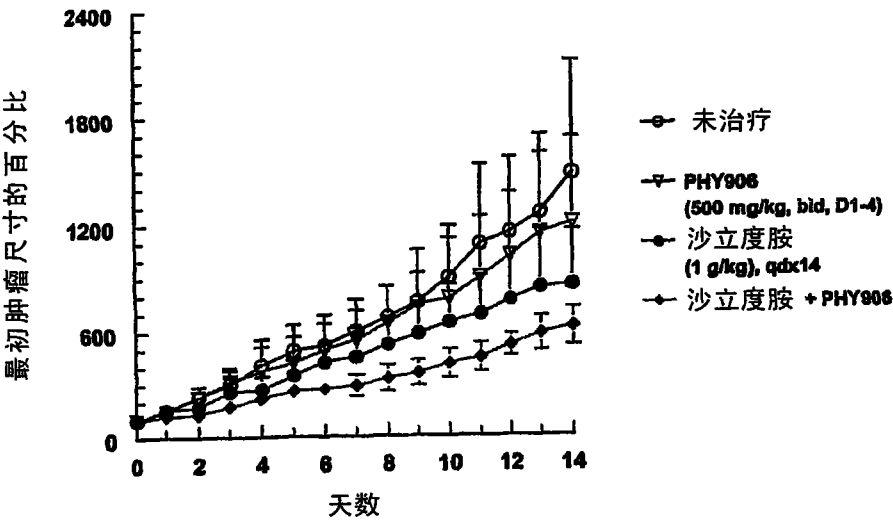


图34

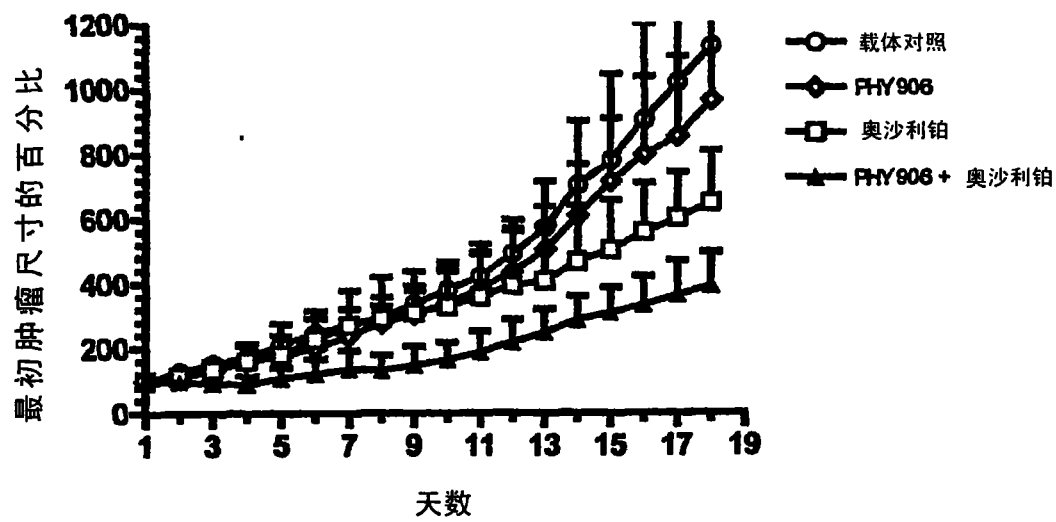


图35

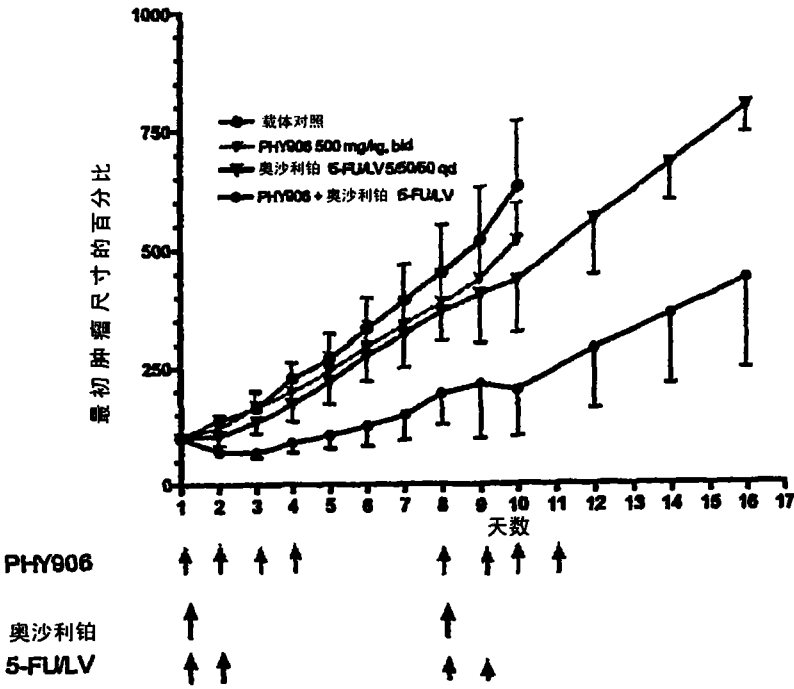


图36

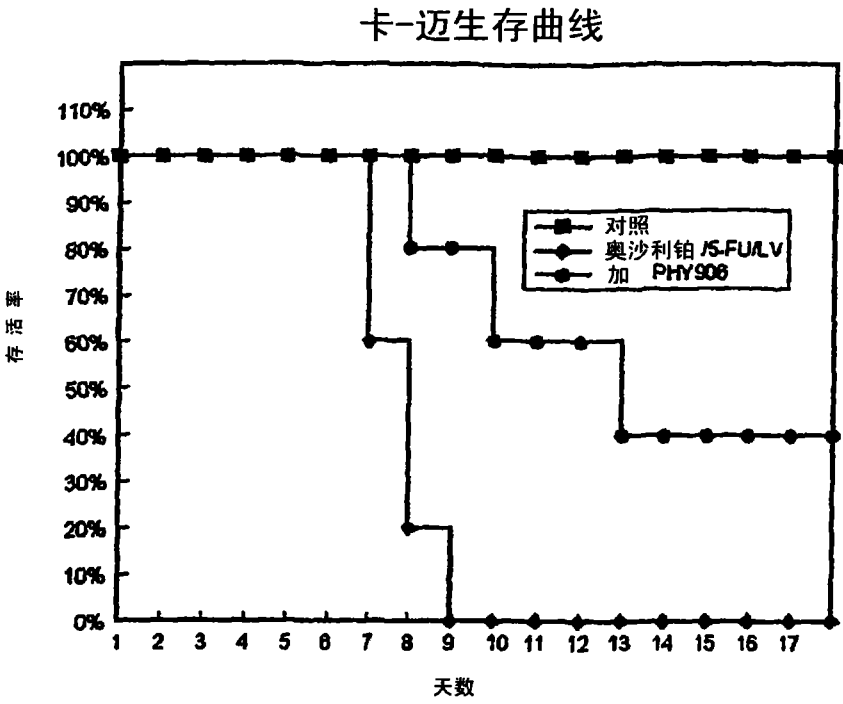


图37

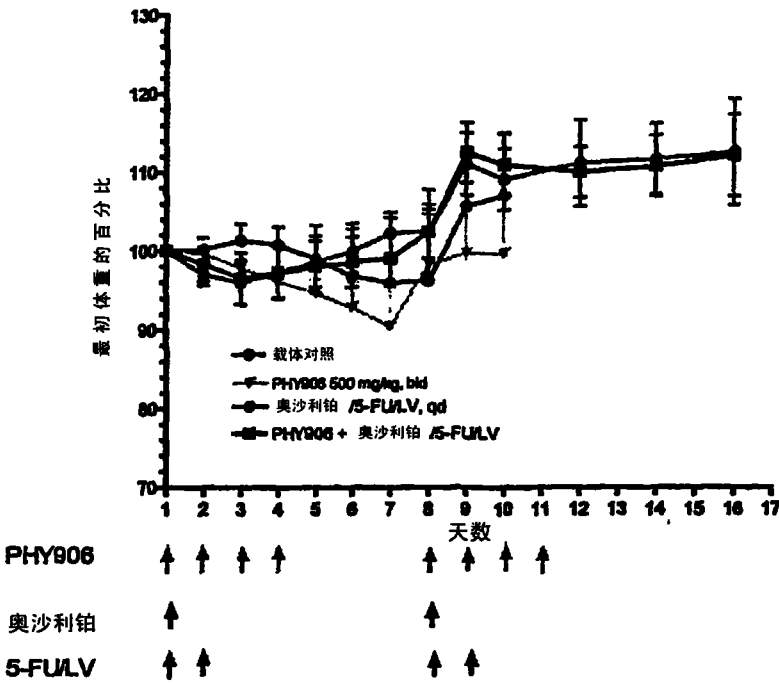


图38