

Ensayo British Journal of Cancer (2004) 90, 65-69 © 2004 Cancer Research

Phase II study of Viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma

M Mabed*¹, L El-Helw¹ and S Shamaa¹ *Hematology and Medical Oncology Unit, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt*

*Correspondence: M Mabed; E-mail: mohmabed@mans.edu.eg Received 16 May 2003; revised 2 October 2003; accepted 6 October 2003

Clinical

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers worldwide. Although a wide range of therapeutic options is available, the efficacy of these methods and the prognosis of patients with HCC remain very poor. This study was conducted to evaluate the efficacy and safety of viscum fraxini-2 in patients with chemotherapy-naïve, advanced hepatocellular carcinoma. 23 patients with unresectable HCC who had received no prior systemic chemotherapy with objectively measurable tumors were enrolled on this study. The mistletoe preparation for the study is an aqueous injectable solution. It contains one milliliter of viscum fraxini in dilution stage-2 (15 mg extract of 20 mg mistletoe herb from ash tree, diluted in di-sodium-mono-hydrogen phosphate, ascorbic acid and water) which is equivalent to 10000 ng/ml injection ampoules. 2 ampoules of viscum fraxini-2 were administered subcutaneously once weekly. As assessed by conventional imaging criteria, 3 (13.1%) patients have achieved complete response, 2 (8.1%) patients have achieved a partial response. 9 (39.1%) had progressive disease while 9 (39.1%) patients didn't have evaluation of response due to early death. The median overall survival time for all patients was 5 months (range 2–38 months), for those who achieved a CR was 29 months (range 12–38 months) and, for those who achieved a PR was 6.5 months (range 6–7 months). The median progression free survival for all patients was 2 months (range 1 – 38 months), for those who achieved a CR, it was 29 months (range 8–38 months) and for those who achieved a partial response, it was 5 months (range 4–6 months). No hematologic toxicity has been encountered. The spectrum of non-hematologic toxicity was mild. The WHO toxicity

criteria grade 3-4 were 34.8% drug related fever, 13.1% erythema at injection site and 17.4% pain at the site of injection. No drug related discontinuation or toxic deaths have occurred. Viscum fraxini-2 seems to be particularly promising in patients with advanced HCC, it shows antitumor activity and low toxicity profile. Further studies in combination with other active agents are clearly warranted. British Journal of Cancer (2004) 90, 65-69. doi:10.1038/sj.bjc.6601463 www.bjcancer.com © 2004 Cancer Research UK

Keywords: chemotherapy; hepatocellular carcinoma; phase II; viscum fraxini-2,

Resumen-Abstract

El carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los cánceres más comunes en todo el mundo. A pesar de que existe una amplia gama de opciones terapéuticas, debido a la pobre eficacia de estos métodos, el pronóstico de los pacientes con CHC sigue contando con un pronóstico poco favorable.

El presente estudio se llevó a cabo con el fin de evaluar la eficacia y la seguridad del medicamento Viscum fraxini-2 en pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) avanzado que no hubieran recibido tratamiento previo con quimioterapia.

Para este estudio se seleccionaron 23 pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) no reducible, que no habían recibido quimioterapia sistémica previa y cuyos tumores podían medirse con criterios objetivos.

Como tratamiento para el estudio se empleó una preparación de muérdago en forma de solución inyectable acuosa.

Esta consistía en una ampolla de un mililitro de Viscum fraxini en dilución 2, es decir, extracto de 15 mg de muérdago vegetal procedente de 20 mg de fresno, diluido en fosfato disódico, ácido ascórbico y agua) que equivale a una ampolla de inyección de 10000 ng / ml.

Se administró dos ampollas de Viscum fraxini-dilución2 por semana, empleando para ello la vía subcutánea.

Tras una evaluación mediante criterios de imagen convencionales, los resultados fueron los siguientes:

- 3 (13,1%) pacientes lograron una respuesta completa,
- 2 (8,1%) pacientes lograron una respuesta parcial.
- 9 (39.1%) progresaron en su enfermedad
- 9 (39.1%) pacientes no pudieron ser evaluados debido a muerte prematura.

La media del tiempo de supervivencia general para todos los pacientes fue de 5 meses (rango 2-38 meses), para aquellos que lograron una remisión completa fue de 29 meses (rango 12-38 meses) y, para aquellos que lograron una respuesta parcial fue de 6,5 meses (rango 6– 7 meses).

La media de supervivencia libre de progresión de la enfermedad para todos los pacientes fue de 2 meses (rango 1-38 meses), para aquellos que lograron una

remisión completa, fue de 29 meses (rango 8-38 meses) y para aquellos que lograron una respuesta parcial, fue de 5 meses (rango 4-6 meses).

No se encontró toxicidad hematológica en el tratamiento. El espectro de toxicidad no-hematológica fue leve. Los criterios de toxicidad de la OMS de grado 3-4 fueron 34,8% de fiebre relacionada con los medicamentos, 13,1% de eritema en el lugar de la inyección y un 17,4% de dolor en el lugar de inyección. No se produjo ninguna necesidad de interrumpir el tratamiento relacionada con el uso del medicamento ni muertes atribuibles a éste.

Por tanto, Viscum fraxini-2 parece ser particularmente prometedor en pacientes con CHC avanzado, mostrando actividad antitumoral y un perfil de baja toxicidad. Se justifica llevar a cabo nuevos estudios en los que se combine el Viscum fraxini-2 con otros medicamentos activos.

Por favor presten atención a que las dosis que se han empleado en el presente estudio no son las habituales que el laboratorio Abnoba recomienda

ABNOBA Heilmittel GmbH Hohenzollernstr. 16 75177 Pforzheim/ Germany e-Mail: info@abnoba.de 10/02/04

Egypt: Viscum Fraxini England: abnobaVISCUM. Germany: abnobaVISCUM Korea: abnobaVISCUM, Perú: abnobaVISCUM. Netherlands: abnobaVISCUM. Swiss: abnobaVISCUM

El Carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los cánceres más comunes de distribución mundial. Aunque resulta mucho menos común en los países occidentales, estadísticamente es el tumor maligno más común en áreas de África y Asia (Bosch and Muñoz, 1991; Lotze *et al*, 1993). A pesar de que existe un amplio abanico de opciones terapéuticas estas no resultan de gran eficacia, no mejorando el pronóstico de los pacientes con CHC. La resección quirúrgica en estos momentos parece ser la única posibilidad de curación.

Sin embargo, las tasas de resección quirúrgica para pacientes con CHC siguen siendo bajas debido a una alta incidencia de cirrosis asociada, tanto por la invasión directa del tumor en el sistema porta del hígado como por la propagación de este en forma rápida por todo el mencionado órgano (Venook, 1994) .

En la mayoría de los pacientes con CHC, la enfermedad avanza hasta una etapa en

la cual ya no se dispone de un tratamiento local efectivo. Este hecho enfatiza la necesidad apremiante de lograr encontrar una quimioterapia sistémica eficaz para pacientes con CHC no operable.

El papel de la quimioterapia en el tratamiento del CHC continúa siendo controvertido. Hasta ahora se han administrado numerosos fármacos quimioterapéuticos, tanto de forma aislada, como de manera combinada en pacientes con CHC en un intento por alargar su tiempo de supervivencia que se estima de manera predictiva en el corto plazo.

Lamentablemente, la actividad de los agentes aislados ha resultado limitada, apenas unos pocos fármacos han demostrado tener una tasa de respuesta superior al 10%. Los resultados de la quimioterapia combinada han demostrado ser igualmente decepcionantes, dado que la adición de medicamentos aumentaba considerablemente la toxicidad sin presentar una mayor eficacia comparada con la terapia con doxorubicina como agente único (Whang-Peng and Chao, 1998).

Por lo tanto, no existe medicamento o protocolo de tratamiento que pueda ser recomendado como una terapia estandarizada para este grupo de pacientes. Dada la falta de una quimioterapia sistémica efectiva, existe una necesidad urgente de investigar nuevos medicamentos.

El *Viscum album* L. (muérdago) es una planta semiparásita que crece sobre diferentes árboles hospedadores (Becker, 1986). El extracto de muérdago está formado por un compuesto de varias sustancias biológicas activas.

El principio fitoterapéutico del muérdago proviene de una acción combinada por la modificación en la respuesta citotóxica y biológica, que resulta de la actividad de las lectinas de la planta y de otras sustancias biológicamente activas (Zarkovic *et al*, 2001).

En 1920 Rudolf Steiner recomendó el muérdago como un remedio eficaz para el tratamiento del cáncer (Steiner, 1961).

En una revisión sistemática de ensayos clínicos controlados se encontraron 23 de este tipo de estudios de los cuales 16 estaban aleatorizados, 2 quasi randomizados y cinco no randomizados.

Incluyeron tumores de pulmón, mama, de estómago, de colon, de recto, cerebro, riñón, vejiga, melanomas, gliomas y tumores genitales. Se obtuvieron resultados significativamente positivos supervivencia (n=8), remisión tumoral (n=1), mejoría de la calidad de vida (n=3) y mejoría de la calidad de vida en relación a los efectos durante colaterales durante la terapia citorreductora (n=3) (Kienle y colaboradores 2003).

Viscum Fraxini es un extracto acuoso de muérdago (*Viscum album* L. cultivado en fresnos) (Koehler, 1992) y es el preparado con mayor contenido de lectina (Scheer, 1996). En este documento, informamos de los resultados de un estudio de fase II para evaluar su eficacia y seguridad en el tratamiento de pacientes con CHC avanzado.

PACIENTES Y MÉTODOS

Criterios de elección

Los criterios de elección incluyeron: (1) CHC primario probado por patología de la alfa-fetoproteína > 400 ng / ml, con un tumor hepático altamente sospechoso de CHC por estudios de imagen; (2) tumor irreseccable y en paciente no candidato para quimioembolización arterial transcateriana (QEAT) o por inyección percutánea de etanol (PEI); (3) enfermedad medible bidimensional; (4) sin quimioterapia sistémica previa; (5) edad entre 16 y 75 años; (6) estado funcional 0-3 OMS, (7) y dentro del perfil renal, cardíaco y hematológico normal.

Protocolo de tratamiento

Antes de ser admitidos en el estudio, todos los pacientes tuvieron que proporcionar un historial clínico completo y pasar un examen físico, que incluía el análisis de su estado funcional, las enfermedades no malignas concurrentes y la medicación que estuvieran tomando. Los análisis de laboratorio a los que se sometió a los pacientes antes del tratamiento incluyeron un recuento completo de células sanguíneas, recuento diferencial de estas mismas, pruebas bioquímicas de función renal y hepática, concentración de electrolitos, radiografías de tórax, y alfa-fetoproteína, una tomografía helicoidal trifásica hepática y una evaluación de Child.

La preparación de muérdago para el estudio consistió en una solución inyectable acuosa. Esta consistía en un mililitro de viscum fraxini en la llamada dilución 2 (15 mg de extracto de procedentes de 20 mg de planta de muérdago parasitaria de fresno, diluido en fosfato sódico monohidratado, ácido ascórbico y agua) que equivale a 10000 ng / ml inyectable. Se administraron dos ampollas de Viscum fraxini-2 por vía subcutánea por semana en su día correspondiente. Los pacientes fueron examinados semanalmente durante el tratamiento para la anamnesis y el examen físico. Se determinó su hemograma completo semanal. Se examinaron las funciones renal y hepática y los niveles de fetoproteína cada 4 semanas. El tumor se evaluó mediante TAC cada 8 semanas.

Definición de respuesta

La determinación de la respuesta tumoral siguió los criterios de respuesta estándar establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Miller y colaboradores, 1981). La remisión completa (RC) se definió como la desaparición completa de todas las lesiones determinadas mediante métodos radiológicos durante al menos 4 semanas. La respuesta parcial (RP) se definió como una disminución del 50% o más en el diámetro perpendicular del nódulo tumoral más grande durante, al menos, 4 semanas, sin la aparición de nuevas lesiones o progresión de las mismas. La enfermedad estática (EE) se definió como una disminución menor del 50%, o un aumento no mayor del 25%, en el diámetro del nódulo tumoral más grande. La enfermedad progresiva (EP) se definió como un aumento mayor al 25% del diámetro del nódulo tumoral más grande en una de las lesiones medibles, o la

aparición de nuevas lesiones. Se consideró que los pacientes que no sobrevivieron a la reevaluación por métodos radiológicos tenían una respuesta indeterminada (RI).

Toxicidad

Para la evaluación de la toxicidad, se siguieron los criterios de la OMS (Organización Mundial de la Salud de 1979). Esto es, incluyó un examen físico antes de cada inyección, hemogramas completos y evaluación sérica de las funciones renal y hepática. Se evaluó la toxicidad de cada paciente después de recibir al menos una dosis de la terapia de protocolo.

Análisis estadístico

Las estadísticas fueron descritas mediante porcentajes y medianas.

El tiempo de supervivencia global se calculó desde el inicio de la terapia hasta la fecha de muerte o la última visita del paciente. El tiempo hasta la progresión de la enfermedad se definió desde el inicio del tratamiento hasta la fecha de progresión de la enfermedad. Las curvas de supervivencia se construyeron utilizando el método de límite de producto de Kaplan-Meier (Kaplan y Meier, 1959).

Aprobación del estudio

El estudio fue aprobado por comités de ética locales y cada paciente hubo de firmar un consentimiento informado antes de ser incluido en el estudio.

RESULTADOS

Características de los pacientes

Las características básicas de los pacientes y las características clínicas se resumen en la Tabla 1.

Ingresaron en el ensayo veintitrés pacientes. Siendo veinte de ellos varones y 3 mujeres. La edad fue de 39 a 75 años con una media de 54 años.

Su estado funcional según criterios de la OMS fue 10 pacientes (43,5%) el estado 1, 7 pacientes (30,4%) estado 2 y 6 pacientes (26,1%) estado 3.

Tabla 1 Características de los pacientes

Características	Núm. de pacientes	%
Varones/mujeres (total)	20/3 (23)	
Edad Media (rango)	54 (39-75)	
<i>Estado funcional (criterio OMS)</i>		

1	10	43,5
2	7	30,4
3	6	26,1
<i>Hepatitis</i>		
HbsAg (+)	13	56,5
Anti HCV (+)	8	34,8
Ambos (+)	2	8,7
<i>Clasificación de Child</i>		
A	9	39,1
B	6	26,1
C	8	34,8
<i>Estadío en la clasificación de Okuda</i>		
I	4	17,4
II	12	52,2
III	7	30,4
<i>Diagnóstico</i>		
Citología	14	60,9
Por alfa-fetoproteína e imagen	9	39,1
<i>Estado del tumor</i>		
Afección bilobular	8	34,8
Afección Unilobular	15	65,2
Metástasis a distancia	4	17,4
Trombosis en la vena Porta	2	8,7
Ascitis	4	17,4

Hubo 13 pacientes HbsAg (+) (56,5%) y 8 pacientes positivos en el Anti HCV respectivamente, mientras que 2 pacientes (8,7%) resultaron positivos para ambos. Ningún paciente había recibido quimioterapia previa. La duración media del tratamiento con viscum fraxini-2 fue de 17 semanas con un rango de 3 a 152 semanas. El estadio I de Okuda se encontró en 4 pacientes (17,4%), el estadio II en 12 pacientes (52,2%) y el estadio III en 7 pacientes (30,4%). El diagnóstico de CHC se estableció mediante citología por aspiración con aguja fina (CAAF) de los tumores hepáticos en 14 pacientes (60,9%). Los 9 pacientes restantes (39,1%) fueron diagnosticados por una marcada elevación del nivel de alfa-fetoproteína combinado con estudios de imagen que indicaban un CHC avanzado. Todos los pacientes tenían CHC muy avanzado en el momento del diagnóstico. La afección lobular bilateral del hígado estuvo presente en 8 pacientes (34,8%). La afección extendida a un lóbulo estuvo presente en 15 pacientes (65,2%). Hubo metástasis a distancia en 4 pacientes (17,4%) (2 metástasis óseas y 2 metástasis ganglionares). La trombosis de la vena porta principal se detectó en dos pacientes (8,7%) mientras que la ascitis estuvo presente en 4 pacientes (17,4%).

Respuesta

Según los criterios convencionales de respuesta radiológica, 3 pacientes (13,1%) obtuvieron una RC. El primer paciente logró dicha respuesta completa tras 4 meses desde el inicio del tratamiento y permaneció libre de enfermedad durante 4 meses. El segundo y el tercer paciente lograron RC después de 6 meses y aún viven libres de enfermedad durante más de 29 y 38 meses, respectivamente. La tomografía computarizada del tercer paciente, antes del tratamiento, y después de la desaparición del tumor, se muestra en la **Imagen 1**.

2 pacientes (8,7%) lograron una respuesta parcial. Se ha demostrado progresión de la enfermedad en 9 pacientes (39,1%). Los 9 pacientes (39,1%) no tuvieron evaluación de respuesta por muerte temprana y fueron clasificados como respuesta indeterminada.

Imagen 1:

Un caso de carcinoma hepatocelular con múltiples lesiones focales antes del tratamiento (A) con regresión del tumor (B) y desaparición del tumor (C) tras 6 meses de terapia con viscum fraxini-2.

Supervivencia

En el momento del análisis, 3 (13,1%) de los pacientes seguían vivos, incluidos dos pacientes con RC y un paciente que mantuvo la enfermedad en un estado de progresión lenta. La media del tiempo de supervivencia global para todos los pacientes fue de 5 meses (rango 2-38 meses); para aquellos que lograron una RC fue de 29 meses (rango 12-38 meses) y, para aquellos que lograron una RP fue de 6,5 meses (rango 6- 7 meses). La media de supervivencia libre de progresión para todos los pacientes fue de 2 meses (rango 1-38 meses), para aquellos que lograron una RC, fue de 29 meses (rango 8-38 meses) y para aquellos que lograron una respuesta parcial, fue de 5 meses. (rango 4-6 meses). Las curvas de supervivencia global actuarial de Kaplan-Meier y SLP para todos los pacientes se muestran en la Figura 2.

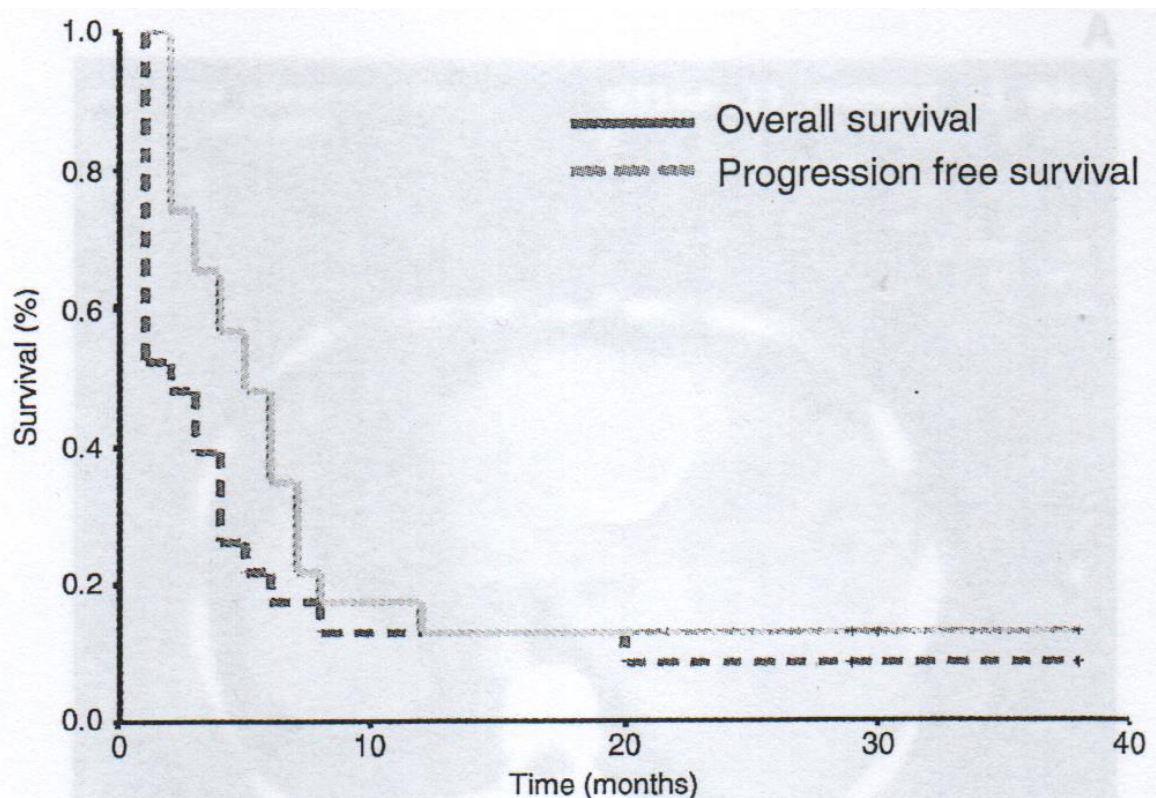


Figure 2 Actuarial overall and progression free survival curve.

Toxicidad

Todos los pacientes fueron evaluados en relación a la toxicidad. La fiebre relacionada con el fármaco se manifestó en 8 pacientes (34,8%). Se desarrolló eritema en el lugar de la inyección en 3 pacientes (13,1%). 4 pacientes (17,4%) sufrieron dolor en el lugar de la inyección. 3 pacientes tuvieron que reducir la dosis a

una ampolla en los ciclos de tratamiento posteriores. Se utilizaron antiinflamatorios y analgésicos en un solo paciente, debido a dolor intenso y eritema en el lugar de la inyección. No hubo interrupciones del tratamiento relacionadas con el fármaco ni muertes atribuibles a la toxicidad del *Viscum fraxini*-2.

VALORACIÓN DEL ENSAYO

El carcinoma hepatocelular es uno de los cánceres más frecuentes en todo el mundo (Okuda, 1980). La resección quirúrgica es, quizás, la única posibilidad significativa de curación. Aunque el diagnóstico temprano es cada vez más frecuente, particularmente en aquellas poblaciones sometidas a programas de detección, las tasas de resección para pacientes con CHC siguen siendo bajas (Lee y colaboradores 1982 y Okuda 1985). Por lo tanto, la gran mayoría de los pacientes con CHC no son candidatos para una cirugía curativa u otra terapia local, siendo la quimioterapia sistémica la única opción para su tratamiento.

El poder antitumoral de varios agentes quimioterapéuticos se ha evaluado en pacientes con CHC, arrojando la mayoría malos resultados y asociándose con una alta probabilidad de presentar efectos secundarios graves. La doxorubicina sigue siendo el fármaco más activo contra el CHC, con una tasa de respuesta tumoral en tratamiento único de aproximadamente el 10-20%. Sin embargo, su toxicidad supera su beneficio (Lai et al, 1988; Lai et al, 1990). Los agentes quimioterapéuticos distintos de la doxorubicina han demostrado una actividad aún menor y el progreso en el tratamiento de pacientes con CHC con quimioterapia ha sido decepcionante. Los nuevos fármacos quimioterapéuticos, como paclitaxel, raltrexed, irinotecan y nolatrexed, no han demostrado resultados alentadores. Estos nuevos fármacos exhiben alguna actividad antitumoral, pero las tasas de respuesta rara vez superan el 10% (Rougier et al, 1997; Chao et al, 1998; O'Reilly et al, 1998; Stuart et al, 1999). Las posibles explicaciones de la resistencia del CHC a la quimioterapia incluyen la heterogeneidad tumoral (Dexter y Leith, 1986), la dosis inadecuada de agentes contra el cáncer (Lai et al, 1990) y la sobreexpresión inducible de un gen de resistencia a múltiples fármacos (Huang et al, 1992). Por lo tanto, se debe considerar la opción de que todos los pacientes con CHC avanzado se unan a ensayos de fase II bien diseñados con nuevos agentes o protocolos antitumorales, siempre que los pacientes puedan tolerar el tratamiento.

Viscum fraxini es un extracto acuoso de muérdago. Existe actualmente una controversia sobre cómo los extractos de plantas ejercen un doble efecto, de citotoxicidad hacia las células tumorales, por una parte, y de estimulación de las células inmunes (Janssen et al, 1993) por otra.

Los efectos inmunoestimuladores del extracto de muérdago se han asignado a un compuesto, un oligosacárido de bajo peso molecular (Hamprecht et al, 1987; Mueller et al, 1989). Además, el efecto estimulante sobre la actividad de las células natural killer (NK) parece ser el resultado de una mayor producción de interferón (INF- γ) y de factores de necrosis tumoral- α (TNF- α) por células T y macrófagos respectivamente (Mueller y Anderer, 1990). Por otro lado, existen evidencias de que los componentes de la lectina de las preparaciones de muérdago son moléculas con

un efecto importante (Luther y Becker, 1987). Las lectinas aumentan el número total y la actividad de los neutrófilos, las células NK y los linfocitos granulares grandes, así como que activan simultáneamente subpoblaciones de monocitos-macrófagos y de células auxiliares. Esto se asoció con niveles más altos de citocinas como interleucinas IL-1, IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y TNF- α (Hajto et al, 1990, Schultze et al, 1991; Beuth et al. , 1993) .Los efectos inmunológicos descritos de los polisacáridos de muérdago se complementan con lípidos de membrana. Como muestran Hartmann y colaboradores (1995), las vesículas aisladas de los sistemas de membrana fueron el factor estimulante más potente para la proliferación de células T por parte de los extractos de muérdago (Hartmann et al, 1995).

Además del efecto inmunoestimulador del extracto de muérdago y las lectinas, se ha podido estudiar que poseen un efecto citotóxico directo (Ribereau-Gayon et al, 1986; Urech et al, 1996). Las lectinas se consideran componentes esenciales del extracto acuoso de muérdago responsable de la apoptosis (Janssen et al, 1993). Las viscotoxinas que son un grupo de polipéptidos citotóxicos pertenecientes a la clase de tioninas (Schrader-Fischer y Apel, 1993) pueden mejorar la permeabilidad de la membrana celular (Lankish y Vogt, 1978). Entonces, los extractos de muérdago pueden inducir ambas formas de muerte celular biológica; apoptosis y lisis. Además, estos efectos iniciales posteriormente inducen reacciones inmunoestimuladoras.

Tomado en conjunto, el extracto completo de muérdago que contenga lípidos de membrana, como es el caso del *Viscum fraxini*, puede estimular las dos vías del sistema inmunológico, es decir, tanto las células T como las células B. Primero, porque inducen la proliferación y activación de las células inmunocompetentes, y, segundo, porque favorece la expresión de citocinas, apoyando ambos efectos la acción antitumoral.

Como conclusión, ***Viscum fraxini-2* es activo en CHC** con actividad antitumoral teniendo un **bajo perfil de toxicidad**. Por ello, se establece que queda claramente justificado el realizar más estudios en combinación con otros agentes activos.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue presentado en el 27º Congreso de la ESMO, celebrado del 18 al 22 de octubre de 2002 en Niza, Francia.

REFERENCIAS

- AM, Purcell RH, (eds) Advances in the Applied Biotechnology Series, pp 35-54.
- Chao Y, Chan WK, Birkhofer MJ, Hu OPY, Wang SS, Huang YS, Liu M, Whang-Peng J, Chi KH, Lui WY, Lee SD (1998) Phase II and pharmacokinetic study of paclitaxel therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. Br J Cancer 78(1): 34-39.

- Dexter DL, Leith JT (1986) Tumor heterogeneity and drug resistance. *J Clin Oncol* 4: 244-257.
- Falkson G, Burger W (1995) A phase II trial of Vindesine in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 52: 86 -87.
- Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rohrdorf C, Gabius HJ (1990) Increased secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin-1, and interleukin-6 by human mononuclear cells exposed to B - galactosid- specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Research* 50: 3322 -3326.
- Hamprecht K, Handgretinger R, Voetsch W, Anderer FA (1987) Mediation of human NK-activity by components in extracts of viscum album. *Int J Immunopharmacol* 9: 199 -209.
- Hartmann S, Scheffler A, Lessmann M (1995) A vesicle fraction of mistletoe induces T cell proliferation of sensitized lymphocytes in patients treated with mistletoe extracts. Beitrag Zur Tagung Der Immunologischen Gesellschaft: Regensburg.
- Huang C, Wu M, Xu G, LiDZ, Cheng H, Tu ZX, Jiang HO, Gu JR (1992) Overexpression of the MDRI gene and P-glycoprotein in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84: 262-264.
- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D (1993) *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins: Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittel Forschung, Drug-Research* 43(11): 1221 -1227.
- Kaplan EM, Meier P (1959) Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481.
- Kienle GS, Berrino F, Bussing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H (2003) Mistletoe in cancer - a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res* 8(3): 109-119.
- Koehler R (1992) Verfahren und vorrichtung zur herstellung wassriger k9lloide. Europaisches Patent Nr. 0310984.
- Lai ECS, Choi TK, Cheng CH, Mok FP, Fan ST, Tan ES, Wong J (1990) Doxorubicin for unresectable hepatocellular carcinoma. A prospective study on the addition of verapamil. *Cancer* 66: 1685-1687.
- Lai CI, Wu PC, Chan GCB, Lok ASF, Lin HJ (1988) Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 62: 479-483.
- Lankish PG, Vogt W (1978) Potentiation of hemolysis by the combined action of phospholipase A and a basic peptide containing s-s bonds (viscotoxin B). *Experientia* 27(2): 122 -123.
- Lee NW, Wong J, Ong GB (1982) The surgical management of primary carcinoma of the liver. *World J Surg* 6: 66 - 75.
- Lin J, Shiu W, Leung WT, Tao M, Leung N, Lau WY, Li AK (1993) Phase II study of high dose Ifosfamide in hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemotherapy Pharmacol* 31: 338 -339.

- Lotze MT, Flickinger JC, Carr BJ (1993) Hepatobiliary system. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds) *Cancer: principles and practice of oncology*, ed 4. pp 883 - 914. Philadelphia: J.B. Lippincott.
- Luther P, Becker H (1987) *Die Mistel*. Berlin: Springer Verlag.
- Miller AB, Hoogstraten B, Ataquet M (1981) Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 47: 207-214.
- Mueller EA, Anderer FA (1990) Synergistic action of a plant rhamnogalacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer and lymphokin - activated killer cells: chemical specificity of target cell recognition. *Cancer Research* 50: 3646 -3651.
- Mueller EA, Hamprecht K, Anderer FA (1989) Biochemical characterization of a component in extracts of viscum album enhancing human NK cytotoxicity. *Immunopharmacology* 17: 11-18.
- Okada S, Okazaki N, Nose H, Shimada Y, Yoshimori M, Aoki K (1993) A phase 2 study of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 50: 22 -26.
- Okuda K (1980) Primary liver cancer in Japan. *Cancer (Phila.)* 45: 2663 - 2672.
- Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K (1985) Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment: study of 850 patients. *Cancer (phila.)* 56: 918 -928.
- O'Reilly E, Stuart K, Kemeny N, Steger C, Raeburn I, Sanz-Altamira P (1998) A phase II trial of irinotecan (CPT-II) in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 267: 1026.
- Ribereau- Gayon G, Jung ML, Baudino S, Salle JP (1986) Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. *Experientia* 42: 594 - 599.
- Rougier P, Ducreux M, Kerr D, Carr BI, Francois E, Ednis A, Seymour L (1997) A phase II study of raltitrexed (Tomudex) in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 8: 500-502.
- Scheer R (1996) Sicherung der pharmazeutischen Qualität von mistelpräparaten. In: R. Scheer, H. Becker, PA Berg (Ed) *Grundlagen der Misteltherapie*, pp 139 - 150. Stuttgart: Hippokrates Verlage Schrader-Fischer
- G, Apel K (1993) The anticyclic timing of leaf senescence in the parasitic plant viscum album is closely correlated with the selective degradation of sulfur-rich viscotoxin. *Plant physiology* 101: 745 - 749.
- Schultze JL, Stettin A, Berg PA (1991) Demonstration of specifically sensitized lymphocytes in patients treated with an aqueous mistletoe extract (*Viscum album* L.). *Klinische wochenschrift* 69: 397 -403
- Steiner R (1961) Vortrag vom 2. 4. 1920; *Geisteswissenschaft und Medizin* GA 312, pp 246 -262. Dornach: Verlag der Rudolf Steiner NachlaSSverwaltung.

- Stuart K, Tessitore J, Rudy J, Clendennin N, Johnston A (1999) A phase II trial of nolatrexed dihydrochloride in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 86: 410-414.
- Urech K, Schaller G, Giannattasio M (1996) Bioassay zur bestmmung von viscotoxinen. In: Scheer R, Becker H, Berg PA (eds) *Grundlagen der Mistletherapie*, pp 111- 118. Stuttgart: Hippokrates Verlag Venook AP (1994) Treatment of hepatocellular carcinoma: Too manyoptions? *J Clin Oncol* 12: 1232 -1234.
- Whang-Peng J, Chao Y (1998) Clinical trials of hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Hepatogastroenterology* 45(24): 1937 -1943.
- Wierzbicki R, Ezzat A, Abdel-Warith A, Ayoub A, Kagevi I, Fadda M, Siech J, Abdul Kareem M, Amin T, Yazigi A (1994) Phase II trial of chronic daily VP 16 administration in unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *Ann Oncol* 5: 466 -467.
- World Health Organization (1979) *WHO Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*. Geneva: WHO Offset Publications.
- Yoshida T, Okazaki N, Yoshino M, Ohkura H, Miyamoto K, Shimado Y (1988) Phase II trial of mitoxantrone in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 1897 -1898.
- Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K, Borovic S, Cipak A, Sabolovic S, Konitzer M, Mang S (2001) An overview on anticancer activities of the vsicum album extract Isorel. *Cancer Biother Radiopharm* 16: 55-62.