

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 963**

51 Int. Cl.:

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2011 PCT/US2011/026706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO11109411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11751210 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2542251**

54 Título: **Aceite de sándalo y sus usos**

30 Prioridad:

01.03.2010 US 309183 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.03.2018

73 Titular/es:

**SANTALIS PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
18618 Tuscany Stone, Suite 100
San Antonio, TX 78258, US**

72 Inventor/es:

**CLEMENTS, IAN;
CASTELLA, PAUL y
LEVENSON, COREY**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 656 963 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aceite de sándalo y sus usos

5 Antecedentes

El cáncer se caracteriza por la rápida creación de células anómalas que crecen más allá de los límites celulares normales y más allá de las tasas normales de crecimiento celular. El cáncer es una causa principal de muerte en todo el mundo y representó 7,6 millones de muertes en 2008.

10

Sumario

En el presente documento se proporcionan composiciones terapéuticamente eficaces, como se define en las reivindicaciones, de aceite de sándalo y kits que comprenden las composiciones. También se proporcionan métodos para preparar y usar las composiciones. Más específicamente, en el presente documento se desvela un método para tratar un cáncer no cutáneo en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende aceite de sándalo, en el que el sujeto tiene un cáncer no cutáneo.

15

Breve descripción de las figuras

20

La Figura 1 (para referencia) muestra el efecto de aceite de sándalo australiano en una línea de células de melanoma humano C8161.

25

La Figura 2 (para referencia) muestra el efecto de aceite de sándalo de la India oriental en una línea de células de melanoma humano C8161.

La Figura 3 muestra el efecto de aceite de sándalo australiano en una línea de células de cáncer de cabeza y cuello humano FADU.

30

La Figura 4 muestra el efecto de aceite de sándalo de la India oriental en una línea de células de cáncer de cabeza y cuello humano FADU.

35

La Figura 5 muestra el efecto de aceite de sándalo australiano en una línea de células de cáncer de cuello uterino humano HELA.

La Figura 6 muestra el efecto de aceite de sándalo de la India oriental en una línea de células de cáncer de cuello uterino humano HELA.

40

La Figura 7 muestra el efecto de aceite de sándalo australiano en una línea de células de cáncer pancreático humano MIA PACA-2.

La Figura 8 muestra el efecto de aceite de sándalo de la India oriental en una línea de células de cáncer pancreático humano MIA PACA-2.

45

La Figura 9 muestra el efecto de aceite de sándalo australiano en una línea de células de carcinoma hepatocelular (hígado) humano SNU-398.

La Figura 10 muestra el efecto de aceite de sándalo de la India oriental en una línea de células de carcinoma hepatocelular (hígado) humano SNU-398.

50

La Figura 11 muestra los efectos de aceite de sándalo australiano y aceite de sándalo de la India oriental en la toxicidad en células MRC5 (fibroblasto de pulmón fetal humano normal) humanas después de 20 horas.

Descripción detallada de la invención

55

Sándalo es el nombre de diversas maderas con fragancia del género *Santalum*, que contienen aceites esenciales. La madera es pesada y de color amarillo, así como de grano fino, y a diferencia de otras muchas maderas aromáticas, conserva su fragancia durante décadas. Los sándalos genuinos son árboles hemiparasíticos de tamaño medio. En los presentes métodos, se puede usar aceite de cualquier miembro del género *Santalum*. Por ejemplo, y no como limitación, en los métodos que se presentan en el presente documento se puede usar sándalo de la India Oriental (*Santalum album*) o sándalo de Australia Occidental (*Santalum spicatum*). Otros varios miembros de las especies del género también tienen madera con fragancia y se encuentran en India, Australia, Indonesia y las islas del Pacífico.

60

En la actualidad, *Santalum album*, o sándalo de la India Oriental, es una especie vulnerable en estado silvestre y, en consecuencia, muy caro. Aunque todos los árboles de sándalo en India y Nepal son propiedad del gobierno y su recolección de la naturaleza está estrictamente controlada. Se han establecido plantaciones comerciales de *Santalum album* en Australia Occidental durante los últimos 15 años que han permitido el establecimiento de un suministro sostenible y constante de aceite. También se pueden usar *Santalum ellipticum*, *S. freycinetianum*, y *S. paniculatum*, los sándalos de Hawai.

Como se ha presentado anteriormente, se puede usar *Santalum spicatum* (sándalo de Australia Occidental). La concentración de compuestos químicos en su aceite esencial se diferencia de la de otras especies de *Santalum*, por ejemplo, *S. album*. Otras especies producidas en Australia que se pueden utilizar en los métodos, composiciones y kits que se presentan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, *S. acuminatum*, *S. lanceolatum*, *S. murrayanum*, *S. obtusifolium* y *S. album*.

Las especies de *S. spicatum* y *S. album* tienen diferentes fragancias, reflejadas por diferencias en sus componentes. En la Tabla 1 se presenta una comparación de los componentes de los aceites de sándalo australiano e indio destilados al vapor. Los componentes y sus porcentajes pueden variar según el método de extracción.

Tabla 1: Perfiles de Aceite de Sándalo Habituales		
Compuesto	% de <i>S. spicatum</i>	% de <i>S. album</i>
E nerolidol	2,1 %	0,1 %
Alfa-santaleno	nd	0,5 %
Cis-alfa-(trans) bergamoteno	nd	0,7 %
Epi-beta-santaleno	nd	1,1 %
Beta-santaleno	nd	0,3 %
Gamma-curcumeno	nd	0,2 %
Dendrolasina	1,2 %	0,2 %
Alfa-santalol	17,2 %	48,7 %
Beta-bisabolol	2,3 %	0,5 %
Epi -alfa-bisabolol	8 %	nd
Z-alfa trans -bergamotol	4,2 %	2,4 %
Epi beta -santalol	1,2 %	5 %
Cis -beta-santalol	11,4 %	20,4 %
E,E, farnesol	6,5 %	nd
Cis nuciferol	13,5 %	0,6 %
Z-beta-curcumen-12-ol	7,9 %	0,2 %
cis lanceol	2,9 %	1,5 %

Existen varios métodos para producir aceites de sándalo. Generalmente, se usan procesos de destilación a vapor, pero también se puede usar extracción con disolvente y combinaciones de los mismos. La hidrodestilación es un método de extracción tradicional. Este método produce un aceite aromático. En lugar de hacer que el vapor pase a través de la madera en polvo, se permite que el polvo se empape en agua en un hidrodestilador. Un fuego desde abajo del recipiente calienta el agua y arrastra el vapor, que se deja enfriar. El aceite de sándalo se retira a continuación de la parte superior del hidrosol.

El aceite esencial de sándalo también se puede extraer por destilación a vapor, un proceso en el que el vapor súper-calentado se pasa a través de la madera en polvo. El vapor ayuda a liberar y transportar el aceite esencial que está

encerrado en la estructura celular de la madera. A continuación el vapor se enfría y el resultado es hidrosol de sándalo y aceite esencial de sándalo.

La extracción de CO₂ supercrítico es otra técnica para extraer aceites esenciales (y otros componentes) de materiales vegetales. No usa agua ni vapor, sino que en su lugar se usa CO₂ supercrítico (dióxido de carbono) como un disolvente. Este método permite que los componentes aromáticos se extraigan sin calor, tras lo cual el CO₂ se retira del extracto resultante por evaporación y a continuación el aceite se refina y se filtra. Véase M. J. Piggott, *et al.*, Western Australian Sandalwood Oil: Extraction by Different Techniques and Variations of the Major Components in Different Sections of a Single Tree, *Flavour and Fragrance Journal* 12 (1): 43 - 46 (1998). La producción de sándalo comercialmente valioso con altos niveles de aceites aromáticos, requiere que los árboles tengan por lo menos ocho años de edad como mínimo, pero es preferente que tengan catorce años o más. En la actualidad Australia es el mayor productor de *Santalum spicatum* y Australia producirá sándalo indio en cantidades comerciales en los próximos años.

A diferencia de la mayoría de los árboles, el sándalo se cosecha al derribar todo el árbol en el lugar de cortarlo con sierra en el tronco. De esta manera, la madera valiosa del tocón y la raíz también se puede comercializar o procesar para obtener aceite. El hecho de que todo el árbol sea cosechado y usado para la producción de aceite hace que los aceites producidos sean notablemente consistentes a lo largo de la temporada y de una temporada a otra. Esta es una ventaja importante cuando el árbol se va a usar para la producción farmacéutica occidental, y se compara de manera favorable con los productos farmacéuticos obtenidos a partir de plantas estacionales, o la parte estacional de otros árboles y arbustos, tales como sus frutos, nueces u hojas. Una mejora adicional de la reproducibilidad de los aceites es el hecho de que algunas de las técnicas de extracción se han estandarizado. Véanse por ejemplo, las normas ISO 3518:2002 e ISO 22769:2009. Además, aunque se pueden usar aceites extraídos de plantaciones comerciales, los aceites también se pueden extraer del cultivo celular o de la fermentación de células del árbol.

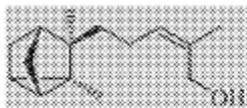
Como se usa en el presente documento, un aceite de sándalo puede ser un aceite de sándalo que cumpla las especificaciones de la Organización Internacional de Normalización (ISO) para el aceite y por lo tanto comprende un 20-45 % de santaloles, cuando se obtienen a partir de *S. spicatum*, y un 57-79 % de santaloles cuando se obtienen a partir de *S. album*. Sin embargo, el 20-45 % de santaloles y el 57-79 % de santaloles se determina con respecto al aceite puro y antes de combinar un aceite de este tipo con cualquier otro excipiente o principio activo. Se entiende que una preparación de eficaz de aceite de sándalo puede tener una concentración de santaloles menor (o superior) a la del aceite de sándalo a partir del que se prepara, y que las concentraciones eficaces se pueden obtener a partir de aceites de sándalo que están fuera de las especificaciones de la ISO antes de su formulación. Un santalol puede ser un α -santalol (se muestra a continuación), un β -santalol (se muestra a continuación), y/o cualquier otro isómero o derivado activo (tales como ésteres) de los mismos.

Como se usa en el presente documento, un aceite de sándalo puede comprender al menos aproximadamente un 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, un 99 % de santaloles o cualquier porcentaje entre los porcentajes que se presentan en el presente documento, cuando se obtiene a partir de *S. spicatum*. El aceite de sándalo puede comprender al menos un 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % un 99 % de santaloles o cualquier porcentaje entre los porcentajes que se presentan en el presente documento, cuando se obtiene a partir de *S. album*. Como se ha presentado anteriormente, el aceite se puede extraer de árboles cultivados o de cultivo celular de células del árbol.

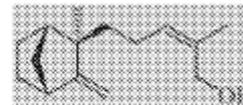
En los métodos que se presentan en el presente documento, el aceite de sándalo puede comprender los ingredientes en las cantidades enumeradas en la Tabla 1 más o menos aproximadamente un 20 %, y más preferentemente más o menos aproximadamente un 10 %, 5 %, 2 %, un 1 % o cualquier porcentaje entre los porcentajes que se presentan en el presente documento. La composición puede comprender excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La composición también puede comprender otros principios activos además del aceite de sándalo.

También se entiende que la actividad del aceite de sándalo se puede deber a uno o más componentes que se presentan en la Tabla 1 que actúan por separado o en conjunto. Por lo tanto, en el presente documento se presentan formulaciones que aumentan la concentración del componente o componentes activos y que reducen la concentración del componente o componentes inactivos. Se pueden formular versiones sintéticas de los componentes activos, o sus derivados, en conjunto con o para reemplazar a los componentes de origen natural del aceite de sándalo.

El aceite de sándalo se puede preparar mediante destilación a vapor, extracción con CO₂ supercrítico, extracción con disolvente, hidro-destilación y combinaciones de los mismos. También es posible sintetizar uno o más de los principios activos de aceite de sándalo, tal como se identifica en la Tabla 1 y a partir de ese momento combinar principios activos individuales en conjunto.



alfa-santalol



beta-santalol

Como se usa en el presente documento, el término sujeto puede ser un vertebrado, de forma más específica un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, primate no humano, vaca, gato, 5 cobaya o roedor), un pez, un ave o un reptil o un anfibio. El término no indica una edad o sexo en particular. Por lo tanto, se pretende cubrir los sujetos adultos y recién nacidos, tanto si son de género masculino como femenino. Como se usa en el presente documento, paciente o sujeto se pueden usar indistintamente y pueden hacer referencia a un sujeto con una enfermedad o trastorno. El término paciente o sujeto incluye sujetos humanos Y veterinarios.

10 El método desvelado para tratar cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición que comprende aceite de sándalo como se define en las reivindicaciones, en el que el sujeto tiene un cáncer no cutáneo. Con los métodos que se presentan en el presente documento se puede tratar cualquier cáncer no cutáneo. Estos incluyen, pero no se limitan a, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer cerebral (por ejemplo, glioblastoma), cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, un cáncer del sistema nervioso central, 15 cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer adrenal, cáncer de hígado, y leucemia. El cáncer puede ser una neoplasia sólida (por ejemplo, sarcoma o carcinoma) o un crecimiento canceroso que afecta al sistema hematopoyético (por ejemplo, linfoma o leucemia). El presente método para tratar un cáncer no cutáneo en un sujeto comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de aceite de sándalo, en el que el cáncer en el sujeto no es un cáncer del cuello uterino.

20 Como se usa en el presente documento los términos tratamiento, tratar, que trata o que mejora se refiere a un método para reducir los efectos de una enfermedad o afección o síntoma de la enfermedad o afección. Por lo tanto en el método desvelado, tratamiento puede hacer referencia a una reducción o mejora de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o un 100 % de la gravedad de una enfermedad o afección o síntoma de la 25 enfermedad o afección establecidos. Por ejemplo, se considera que el método para tratar el cáncer es un tratamiento si existe una reducción de un 10 % en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con un sujeto de control que no recibiera una composición que comprende aceite de sándalo. Por lo tanto la reducción puede ser una reducción de un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, un 100 %, o cualquier porcentaje entre 10 y 100 en comparación con los niveles de control. Se entiende que el tratamiento no hace referencia 30 necesariamente a una curación o ablación completa de la enfermedad, afección o síntomas de la enfermedad o afección.

Además para referencia se desvela un método para prevenir la progresión de la queratosis actínica a carcinoma de células escamosas (SCC) en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de aceite de 35 sándalo. Como se usa en el presente documento, por "prevenir", "que previene", o "prevención" se hace referencia a un método para descartar, retrasar, evitar, obviar, prevenir, parar, o dificultar el inicio o incidencia de la progresión de queratosis actínica a carcinoma de células escamosas cutáneas. Por ejemplo, se considera que el método desvelado es una prevención si existe aproximadamente un 10 % de reducción o retraso del inicio de SCC o progresión de queratosis actínica a SCC un sujeto cuando se compara con sujetos de control con queratosis actínica 40 que no recibieron una composición para prevenir SCC. Por lo tanto, la reducción puede ser de aproximadamente un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, un 100 %, o cualquier cantidad de reducción entre los mismos con respecto a sujetos de control.

El modo de acción de los ingredientes contenidos en el aceite de sándalo puede ser apoptótico. Por lo tanto, puede 45 ser ventajoso combinar aceite de sándalo, o los ingredientes en el mismo, con un agente quimioterapéutico. Estos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, Acivicina; Aclarrubicina; Clorhidrato de Acodazol; AcrQnina; Adozelesina; Aldesleuquina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramincina; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; 50 Brequinar Sodio; Bropirimina; Busulfán; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetímero; Carboplatino; Carmustina; Clorhidrato de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Deszaguanina; Mesilato de Deszaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; 55 Edatrexato; Clorhidrato de Eflomitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Epirubicina; Clorhidrato de Epirubicina; Erbulozol; Clorhidrato de Esorubicina; Estramustina; Fosfato de Sodio y Estramustina; Etanidazol; Aceite I 131 Etiodizado; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; 5-Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sodio; Gemcitabina;

Clorhidrato de Gemcitabina; Oro Au 198; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarrubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-I a; Interferón Gamma-Ib; Iproplatino; Clorhidrato de Irinotecán; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Clorhidrato de Liarozol; Lometrexol Sodio; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de
 5 Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogarilo; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sodio; Metoprina; Meturedopa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina C; Mitosper; Mitotano; Mitoxantrona; Clorhidrato de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatino; Oxisurán; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromano; Pisosulfano; Clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero Sodio; Porfiromicina;
 10 Prednimustina; Clorhidrato de Procarbazona; Puromicina; Clorhidrato de Puromicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sodio; Esparsomicina; Clorhidrato de Espirogermanio; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalano Sodio; Tegafur; Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiampirina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina;
 15 Clorhidrato de Topotecán; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Clorhidrato de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredopa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatinp; Zinostatina; Clorhidrato de Zorrubicina. Una combinación de una composición de
 20 aceite de sándalo con un agente quimioterapéutico reduce la dosificación requerida generalmente para cualquier agente solo. Esto es altamente deseable, ya que una reducción de este tipo podría reducir de forma simultánea la toxicidad causada por dosis más elevadas de cualquiera de la composición de aceite de sándalo o el agente quimioterapéutico.

25 Los aceites de sándalo o ingredientes de los mismos se pueden proporcionar en una composición farmacéutica. Dependiendo del modo de administración pretendido, la composición farmacéutica se puede presentar como formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, o suspensiones, preferentemente en una forma de dosificación unitaria adecuada para administración individual de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una cantidad terapéuticamente
 30 eficaz del aceite de sándalo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, o diluyentes. Por vehículo farmacéuticamente aceptable se hace referencia a un material que no es biológicamente o de otro modo no deseable, que se puede administrar a un individuo junto con el compuesto seleccionado sin causar efectos biológicos inaceptables o sin interactuar de una manera perjudicial con los otros componentes de la composición farmacéutica en el que está
 35 contenido.

Se conocen diversos sistemas de administración para administrar las composiciones desveladas en el presente documento, e incluyen encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías mucosal, tópica, intradérmica, intratecal, intratraqueal, mediante nebulizador,
 40 mediante inhalación, intravesicular, intramuscular, intraperitoneal, vaginal, rectal, intravenosa, subcutánea, intranasal, y oral. También se pueden usar combinaciones de administración. Por ejemplo, una composición se puede administrar por vía intranasal y por vía intravenosa al sujeto. En otro ejemplo, una composición se puede administrar por vía oral y por vía intravenosa al sujeto. Los compuestos se pueden administrar mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos
 45 epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal, vaginal y mucosa intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía local al área con necesidad de tratamiento, por ejemplo mediante aplicación tópica o inyección local, tal como inyección directamente en un tumor. El modo de administración se determina de forma empírica basándose en un número de factores que incluyen el tipo de cáncer.
 50

Para todos los métodos de administración desvelados en el presente documento, cada método puede comprender opcionalmente además la etapa de diagnosticar a un sujeto con cáncer o diagnosticar a un sujeto con necesidad de profilaxis o prevención de carcinoma de células escamosas. El método también puede incluir evaluar la eficacia de la composición de aceite de sándalo, opcionalmente en combinación con el agente terapéutico, y modificar el régimen
 55 de tratamiento.

La cantidad de agente terapéutico eficaz para tratar el cáncer puede depender de la naturaleza del cáncer Y sus síntomas asociados, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Por lo tanto, estas cantidades variarán dependiendo del tipo de cáncer. Además, se pueden usar ensayos *in vitro* para identificar
 60 intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a usar en la formulación también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debería decidir de acuerdo con el criterio del experto y cada circunstancia del sujeto. Por ejemplo, la concentración de aceite de sándalo en la composición administrada al sujeto puede ser de aproximadamente 0,5 micromolar a aproximadamente 300 micromolar. En otros ejemplos, la concentración de aceite de sándalo puede ser de aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente
 65 150 micromolar, de aproximadamente 5 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de aproximadamente 10

micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de aproximadamente 20 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de aproximadamente 30 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de aproximadamente 40 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de aproximadamente 50 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de 60 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de 70 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de 80 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de 90 micromolar a aproximadamente 150 micromolar, de 100 micromolar a 150 micromolar, de 125 micromolar a 150 micromolar, de 1 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de aproximadamente 5 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de aproximadamente 10 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de aproximadamente 20 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de aproximadamente 30 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de aproximadamente 40 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de aproximadamente 50 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de 60 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de 70 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de 80 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de 90 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, de 100 micromolar a 300 micromolar, de 125 micromolar a 300 micromolar, de 150 micromolar a 300 micromolar, de 175 micromolar a 300 micromolar, de 200 micromolar a 300 micromolar, de 225 micromolar a 300 micromolar, de 250 micromolar a 300 micromolar o de 275 micromolar a 300 micromolar. Cuando las concentraciones de aceite de sándalo se expresan en micromolaridad, se entiende que se trata de la micromolaridad del alfa-santalol en enlace que les han dado. Por ejemplo, la concentración de aceite de sándalo puede ser aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 60, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300 micromolar o cualquier concentración entre las concentraciones que se presentan en el presente documento. La concentración de aceite de sándalo en la composición es de un a un 0,002 % a un 0,1 % de aceite de sándalo (p/p). Por ejemplo, la concentración de aceite de sándalo en la composición puede ser de aproximadamente un ,0002 % a aproximadamente un ,005 %, o de aproximadamente un ,0002 % a aproximadamente un ,01 %, o de aproximadamente un ,0002 % a aproximadamente un ,05 %, o de aproximadamente un ,0002 % a aproximadamente un 0,1 %. La concentración de aceite de sándalo también puede ser aproximadamente un ,0002 %, ,0003 %, ,0004 %, ,0005 %, ,0006 %, ,0007 %, ,0008 %, ,0009 %, ,001 %, ,002 %, ,003 %, ,004 %, ,005 %, ,006 %, ,007 %, ,008 %, ,009 %, ,01 %, ,02 %, ,03 %, ,04 %, ,05 %, ,06 %, ,07 %, ,08 %, ,09 %, 0,1 % o cualquier porcentaje entre los porcentajes que se presentan en el presente documento. También se pueden usar múltiples administraciones y/o Dosificaciones. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir de sistemas de ensayo de modelo *in vitro* o animal.

Para cualquiera de los mecanismos de administración que se presentan en el presente documento, alguien con experiencia en la materia puede formular la composición de modo que la concentración de aceite de sándalo en el órgano diana esté entre aproximadamente 0,5 micromolar y aproximadamente 300 micromolar. Este intervalo no pretende ser limitante ya que la concentración en el órgano diana puede ser superior o inferior dependiendo del mecanismo de administración y del órgano diana. Dependiendo de la formulación y de la vía de administración, para conseguir esta concentración en el órgano diana, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. Por ejemplo, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o cualquier otra dosificación entre las cantidades de dosificación que se presentan en el presente documento.

La divulgación también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. En el kit se presenta, opcionalmente asociado con el recipiente o recipientes de este tipo, un modo de administración, que incluye, por ejemplo, una jeringa, un inhalador, o similares.

Como se usa en el presente documento, el término vehículo incluye cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, lípido, estabilizante, u otro material bien conocido en la técnica para uso en formulaciones farmacéuticas. La elección de un vehículo para su uso en una composición dependerá de la vía de administración pretendida para la composición. La preparación de vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe, *por ejemplo*, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 21^a Edición, ed. University of the Sciences en Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia Pa., 2005. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como tampones fosfato, tampón citrato, y tampones con otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN® (ICI, Inc.; Bridgewater, Nueva Jersey), polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™ (BASF; Florham Park, NJ).

Las composiciones que contienen aceite de sándalo adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones acuosas o no acuosas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones, y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles fisiológicamente aceptables. Las composiciones para inyección parenteral también pueden incluir liposomas, emulsiones o co-solventes. Los ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

10

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y reparto. La prevención de la acción de microorganismos se puede estimular con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15

Las formas de dosificación sólidas para administración oral de los compuestos que se describen en el presente documento o derivados de los mismos incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En Las formas de dosificación sólidas de este tipo, los compuestos que se describen en el presente documento o derivados de los mismos se mezclan con al menos un excipiente (o vehículo) habitual inerte tal como citrato sódico o fosfato dicálcico o (a) cargas o diluyentes, tales como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, tales como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes, tales como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, tales como por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos complejos y carbonato sódico, (e) retardadores de solución, tales como por ejemplo, parafina, (f) aceleradores de absorción, tales como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, tales como por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes, tales como por ejemplo, caolín y bentonita, e (i) lubricantes, tales como por ejemplo, talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento. Las formas de dosificación sólidas tales como las cápsulas duras o blandas se pueden usar en el tratamiento de cáncer de vejiga o cualquier otro cáncer para el que sea deseable la administración oral. Los intervalos de dosificación para estas cápsulas se han presentado anteriormente.

30

Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden usar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

35

Las formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con revestimientos y cubiertas, tales como revestimientos entéricos y otros conocidos en la técnica. Pueden contener agentes de opacidad y también pueden ser de una composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una cierta parte del tracto intestinal de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también se pueden presentar en forma microencapsulada, si fuera apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

40

45

Las formas de dosificación líquidas para administración oral de los compuestos que se describen en el presente documento o derivados de los mismos incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes de uso común en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, o mezclas de estas sustancias, y similares.

50

55

Para la administración específica de un sitio de las composiciones a un órgano también se pueden usar liposomas y nanopartículas, por ejemplo, para su administración al hígado. Las composiciones para el tratamiento de cánceres nasales o pulmonares se pueden formular en un aerosol u otra forma inhalable.

60

En el presente documento los intervalos se pueden expresar como de aproximadamente un valor en particular, y/o a aproximadamente otro valor en particular. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, este incluye desde un valor en particular y/o hasta el otro valor en particular. De forma análoga, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente anterior, se entenderá que se desvela el valor en particular.

65

Un número de aspectos se han descrito. Sin embargo, se entenderá que se pueden hacer diversas modificaciones. Además, cuando se describe una característica o etapa, ésta se puede combinar con cualquier otra característica o etapa en el presente documento, incluso si la combinación no se indica de forma explícita. Por consiguiente, otros aspectos están dentro del alcance de las reivindicaciones.

5

Ejemplos

Para los experimentos que se describen en el presente documento se estudiaron dos extractos de aceite de sándalo. El aceite se preparó por destilación a vapor y contenía los componentes que se muestran en la Tabla 1.

10

CÁNCER DE MAMA

Para análisis de actividad en cáncer de mama, se sometieron a ensayo varias líneas celulares contra la actividad tumorigénica de los dos aceites de sándalo descritos anteriormente. La identificación sistemática se realizó en el Southern Research Institute (Birmingham AL) usando protocolos basados en los desarrollados por el Developmental Therapeutics Program de NCI/NIH. En resumen, las líneas de células tumorales humanas del panel de identificación sistemática de cáncer se cultivan en medio RPMI 1640 (SIGMA ALDRICH®) que contenía suero bovino fetal al 10 % y L-glutamina 2 mM.

Una vez que las células se propagan lo suficiente, siete placas de todas las líneas adherentes se sembraron a 5.000 células/pocillo en un volumen total de 50 µl, y siete placas de todas las líneas de suspensión se sembraron a 5.000 – 20.000 células/pocillo (dependiendo de la línea celular) en un volumen total de 50 µl. Las placas se colocaron en una incubadora de cultivo celular humidificada durante una noche para permitir la unión de las células adherentes.

25

Se añadieron 50 µl de soluciones de aceite a diversas concentraciones a pocillos apropiados que ya contenían 50 µl de células y medio para exponer las células a las concentraciones finales de los compuestos requeridos. Se añadieron 50 µl de medio a pocillos de control de medio y celular y 50 µl de mezcla apropiada a las placas apropiadas pocillos de control de vehículos. Al mismo tiempo que la exposición al fármaco, se realizó un ensayo con el Ensayo CellTiter-Glo® (CTG) el Día 0 en placa para obtener un recuento en el Día 0. Las células se exponen a los compuestos durante 72 h. Después de un periodo de exposición de 72 h, todas las placas restantes se sometieron a ensayo usando CTG.

30

El alcance de la actividad inhibitoria del crecimiento de cada aceite se informó como CI_{50} , que es la concentración nominal de aceite que da como resultado un crecimiento celular a las 72 horas que era un 50 % del observado en los pocillos de control, que contenían células pero no muestras de aceite. Los resultados se presentan a continuación:

35

Tabla 2. Actividad frente a líneas de células de cáncer de mama			
Línea Celular	Nombre del Panel	CI_{50} (µM)	
		<i>Santalum album</i>	<i>Santalum spicatum</i>
MCF7	Mama	55	102
MDA-MB-231/ATCC	Mama	61	140
MDA-MB-468	Mama	20	70
HS 578T	Mama	29	93
BT-549	Mama	73	149
T-47D	Mama	38	102

Se mostró la actividad consistente frente a 6 líneas celulares obtenidas a partir de cánceres de mama humanos. Esto indica una amplia actividad frente a muchos cánceres de mama humanos. En particular, el crecimiento de las seis líneas de células de cáncer de mama se inhibía con ambos aceites, con el aceite de *S. album* siendo más activo que el aceite de *S. spicatum* en un factor de aproximada de 2-3.

CÁNCER DE PULMÓN

Se estudiaron líneas de células de cáncer de pulmón usando el mismo diseño experimental que se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan a continuación.

5

Línea Celular	Nombre del Panel	CI ₅₀ (µM)	
		<i>Santalum album</i>	<i>Santalum spicatum</i>
A549	Pulmón de Células No Microcíticas	63	149
EKVX	Pulmón de Células No Microcíticas	48	186
HOP-62	Pulmón de Células No Microcíticas	63	233
HOP-92	Pulmón de Células No Microcíticas	126	193
NCI-H226	Pulmón de Células No Microcíticas	62	108
NCI-H23	Pulmón de Células No Microcíticas	56	99
NCI-H322M	Pulmón de Células No Microcíticas	66	114
NCI-H460	Pulmón de Células No Microcíticas	45	98
NCI-H522	Pulmón de Células No Microcíticas	49	85

Estos experimentos muestran una actividad consistente frente a 9 líneas de células obtenidas a partir de cánceres de pulmón de células no microcíticas humanas. Esto indica una amplia actividad frente a muchos cánceres de pulmón. En particular, el crecimiento de las nueve líneas de células de cáncer de pulmón se inhibía con ambos aceites, con el aceite de *S. album* siendo aproximadamente 1,5-4 más activo que el aceite de *S. spicatum*.

10

CÁNCER DE PRÓSTATA Y OVARIO

Se estudiaron líneas de células de cáncer de próstata y ovario usando el mismo diseño experimental que se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan a continuación.

15

Línea Celular	Nombre del Panel	CI ₅₀ (µM)	
		<i>Santalum album</i>	<i>Santalum spicatum</i>
OVCAR-3	Ovario	18	54
OVCAR-4	Ovario	41	86
OVCAR-5	Ovario	64	117
OVCAR-8	Ovario	38	54
NCI/ADR-RES	Ovario	59	105
SK-OV-3	Ovario	72	104
PC-3	Próstata	35	90
DU-145	Próstata	65	223

Se mostró la actividad consistente frente a 8 líneas celulares obtenidas a partir de cánceres de ovario y próstata humanos. Esto indica una amplia actividad frente a muchos cánceres de gónadas humanas. En particular, el

crecimiento de las ocho líneas de células de cáncer se inhibía con ambos aceites, con el aceite de *S. album* siendo aproximadamente 1,5-3 veces más activo que el aceite de *S. spicatum*.

CÁNCER RENAL

5

Se estudiaron líneas de células de cáncer renal usando el diseño experimental que se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan a continuación.

Tabla 5 Actividad frente a líneas de células de cáncer de riñón			
Línea Celular	Nombre del Panel	CI ₅₀ (µM)	
		<i>Santalum album</i>	<i>Santalum spicatum</i>
786-0	Renal	43	79
A498	Renal	45	93
ACHN	Renal	78	279
CAKI-1	Renal	68	212
RXF 393	Renal	21	54
SN12C	Renal	38	63
TK-10	Renal	46	90
UO-31	Renal	60	106

10 Se mostró la actividad consistente frente a 8 líneas celulares obtenidas a partir de cánceres renales humanos. Esto indica una amplia actividad frente a muchos cánceres hepáticos. En particular, el crecimiento de las nueve líneas de células de cáncer renal se inhibía con ambos aceites, con el aceite de *S. album* siendo aproximadamente 2-4 veces más activo que el aceite de *S. spicatum*.

15 OTROS CÁNCERES

También se estudiaron otras líneas de células de cáncer diversas usando el diseño experimental que se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan a continuación.

Tabla 6 Actividad frente a diversas líneas de células de cáncer			
Línea Celular	Nombre del Panel	CI ₅₀ (µM)	
		<i>Santalum album</i>	<i>Santalum spicatum</i>
CCRF-CEM	Leucemia	31	53
HL-60(TB)	Leucemia	6,6	7.8
K-562	Leucemia	17	60
MOLT-4	Leucemia	31	63
RPMI-8226	Leucemia	16	33
SR	Leucemia	7	20
COLO 205	Colon	51	251
HCC-2998	Colon	69	118
HCT-116	Colon	88	202
HCT-15	Colon	49	78

Tabla 6 Actividad frente a diversas líneas de células de cáncer			
Línea Celular	Nombre del Panel	CI ₅₀ (µM)	
		<i>Santalum album</i>	<i>Santalum spicatum</i>
HT29	Colon	61	111
KM12	Colon	64	101
SW-620	Colon	14	44
SF-268	SNC	23	61
SF-295	SNC	31	129
SF-539	SNC	22	76
SNB-19	SNC	28	71
SNB-75	SNC	39	122
U251	SNC	26	78

Se mostró la actividad consistente frente a diversas líneas celulares obtenidas a partir de médula ósea humana, el SNC y el colon. Esto indica una amplia actividad frente a una gran diversidad de cánceres. En particular, el crecimiento de todas las líneas celulares se inhibía con ambos aceites, con el aceite de *S. album* siendo más activo que el aceite de *S. spicatum* en todas las líneas (~1-3 veces en leucemia, ~1,5-5 veces en colon, y ~2,5-4 veces en líneas del SNC).

En resumen, todas las líneas celulares estudiadas presentaban una inhibición de su crecimiento con ambos aceites con el aceite de *S. album* siendo más activo que el aceite de *S. spicatum*.

10

CURVAS DE RESPUESTA A LA DOSIS

Varias líneas celulares se examinaron durante un periodo de 72 horas para obtener dosificaciones. Los aceites se evaluaron frente a carcinoma hepatocelular SNU-398 (HCC), cáncer de Cabeza y Cuello FaDu, cáncer del cuello uterino HeLa, and las líneas de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2. La viabilidad celular después de tratamiento durante 72 horas se midió con el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Más particularmente, las líneas de células de cáncer se obtuvieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA) y se mantuvieron en medio de crecimiento apropiado. Las células se propagaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5 %. Una vez cultivadas a una confluencia de un 50 %, las células se volverán a suspender en medio de cultivo celular. Un día antes del tratamiento (Día 0), las células se siembran en pocillos en placa de 96 pocillos para ensayos de MTT.

La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de MTT. Este procedimiento colorimétrico mide la conversión del reactivo de MTT en formazán por las mitocondrias. La producción de formazán se cuantificó mediante medición espectrofotométrica a 570 nm y es proporcional al número de células viables. Las células se cultivaron y se trataron con diferentes concentraciones del agente o agentes durante 72 horas. Después del tratamiento, se añadieron 50 µl de MTT a cada pozo y se permitió la incubación durante 1-3 horas a 37 °C. Cada pocillo se aspiró y se añadieron 200 µl de DMSO a cada pocillo para disolver el formazán. Los valores de absorbancia (DO) se midieron usando un lector de microplacas µQuant a una longitud de onda individual de 570 nm.

Las células se trataron con aceite de sándalo durante 72 horas. Los resultados de estos estudios se usaron para calcular un valor de CI₅₀ (concentración del fármaco que reduce la viabilidad celular en un 50 por ciento de control de vehículo para cada agente) en cada línea celular. Se prepararon comparaciones estadísticas (ensayo t, (desemparejado, bilateral)) o ANOVA (entre múltiples grupos) entre cada grupo. Las diferencias se consideran significativas a $p < 0,05$. Los resultados se muestran en las Figuras 1-10. En resumen, como también se observó en el panel de Células Tumorales Humanas NCI-60, el crecimiento de las cinco líneas celulares se inhibía con ambos aceites siendo del aceite de *S. album* más activo que el aceite de *S. spicatum*.

40

Los resultados presentados anteriormente indican que en el aceite de sándalo tiene una aplicabilidad general frente a las líneas celulares que representan diversos tumores sólidos y otros cánceres. Por lo tanto, como se muestran en el presente documento, el aceite de sándalo es un agente tumoricida de amplio espectro.

- 5 Los estudios *in vivo* en modelos de ratón usan los aceites formulados con co-solventes bien caracterizados, sencillos (tales como Cremophor) para mostrar la capacidad de los aceites para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumor humano después de administración sistémica. Las formulaciones basadas en liposomas, nanopartículas y aceites microencapsulados se pueden evaluar *in vivo* como vehículos de administración sistémica.
- 10 Por ejemplo, y no para ser limitante, se usa el siguiente protocolo (Véase Jacob *et al.*, Gene Ther. Mol. Biol. 8: 213-219 (2004)). En resumen, las células tumorales se cultivan en medio completo. Cuando las células representan un 70-80 %, 3-4 horas antes de su cosecha, el medio se reemplaza con medio recién preparado para retirar células muertas y desprendidas. El medio se retira y las células se lavan con PBS. Se añade una cantidad mínima de tripsina-EDTA. Las células se dispersan y se añade medio completo (de 10:1 a 5:1). Las células se centrifugan
- 15 inmediatamente a o por debajo de 1500 rpm durante 2-5 min y se lavan dos veces con PBS antes de almacenar las células en hielo. A continuación se hace el recuento de las células usando un hemocitómetro. Para excluir las células muertas se usa tinción con azul de tripano. Las células se mezclan a 1:1 con una solución de azul de tripano (el Azul de Tripano se diluye a 0,8 mM en PBS). Las células viables excluyen el azul de tripano, mientras que las células muertas se tiñen de color azul debido a la solución de azul de tripano. Las células se suspenden en un
- 20 volumen de modo que 300 μ l contengan el número de células requerido por inyección. Normalmente, se necesitan aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células por inyección.

Los ratones que tienen 4-6 semanas de edad se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) en el costado inferior con aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células. Una composición que comprende sándalo se administra a través de cualquiera

25 de los métodos de administración presentados en el presente documento después de aproximadamente 1-3 semanas cuando los tumores han alcanzado un volumen medio de aproximadamente 50-60 mm³. Los diámetros tumorales se miden con calibradores digitales, y el volumen tumoral en mm³ se calcula con la fórmula: Volumen = (ancho²) x longitud/2. Después de la administración de la composición que comprende sándalo, la disminución esperada del tamaño tumoral se puede medir con calibradores digitales como se ha descrito

30 anteriormente. También se pueden evaluar disminuciones de los síntomas.

TOXICOLOGÍA

La Figura 11 muestra que el aceite de sándalo no es tóxico en células MRC5 a una concentración inferior a

35 aproximadamente un 0,1 % de aceite de sándalo (p/p). En la Figura 11, los pocillos de color claro no muestran muerte celular y los portillos más oscuros presentan muerte celular en la línea de células de pulmón humano MRC5 a las 20 horas después de la administración de aceite de sándalo. La Figura 11 también muestra que el aceite de sándalo es menos tóxico que otros aceites esenciales. Por ejemplo, el aceite de sándalo es menos tóxico que los

40 aceites de canela, citronela o brote de clavo en células MRC5 humanas a una concentración inferior a aproximadamente 0,1 % (p/p). El aceite de sándalo también es menos tóxico que el aceite de canela en células MRC5 humanas a una concentración de aproximadamente un 0,05 % (p/p), y entre aproximadamente un 0,05 % y aproximadamente un 0,1 % (p/p). El aceite de sándalo tiene una ventana terapéutica más amplia para el tratamiento del cáncer que la mayoría de los agentes anti-tumorigénicos. Por lo tanto, al aceite de sándalo, incluso a

45 dosis elevadas, más elevadas que la mayoría de otros anti-tumorigénicos, se puede usar para tratar el cáncer con menos efectos perjudiciales o ninguno para las células normales. Por el contrario, el aceite de sándalo, incluso a dosis bajas, más bajas que la mayoría de otros agentes anti-tumorigénicos, tiene un efecto terapéutico.

Para obtener información adicional con respecto a la seguridad, los ratones se pueden dosificar con cantidades crecientes de aceites de sándalo para determinar la DL₅₀ (Véase Opdyke *et al.*, Food and Cosmetics Toxicology 989-990 (1974); y Bar y Griepentrog, Medizin Ernhar 244 (1967)). El ensayo de Ames puede determinar la mutagenicidad de acuerdo con protocolos convencionales (Véase McCann *et al.*, "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (12): 5135-5139 (1975)).

PREVENCIÓN DE LA PROGRESIÓN DE LA QUERATOSIS ACTÍNICA A CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (para referencia)

Una formulación tópica que comprende aceite de sándalo se administra a sujetos con una lesión o lesiones por queratosis actínica. A continuación la lesión se observa visualmente y/o se hace biopsia a intervalos de tiempo, para determinar si la lesión o lesiones ha progresado a carcinoma de células escamosas ten comparación con una

60 muestra de tejido de control. La muestra de tejido se puede comparar con una muestra de tejido de control de una lesión de queratosis actínica que no se puso en contacto con la formulación o con una muestra de tejido de piel normal. Como alternativa, se puede hacer una biopsia de la lesión y se puede clasificar de acuerdo con métodos convencionales (Véase, por ejemplo, Krouse *et al.*, "Progression of skin lesions from normal skin to squamous cell carcinoma", Anal. Quant. Cytol., Histol. 31 (1): 17-25 (2009)).

65

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende aceite de sándalo para su uso en el tratamiento de un cáncer no cutáneo en un sujeto, en el que el uso comprende la administración de una cantidad eficaz de dicha composición que comprende
5 aceite de sándalo al sujeto, en la que el aceite de sándalo es aceite de sándalo esencial destilado o extraído de la madera de árboles del género *Santalum* mediante destilación a vapor, hidrodestilación o extracción con disolvente, en donde el sujeto tiene un cáncer no cutáneo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer renal, leucemia, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de colon, y cáncer del sistema nervioso central, y en donde la
10 concentración de aceite de sándalo en la composición es de un 0,0002-0,1 % de aceite de sándalo (p/p).
2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde el aceite de sándalo es de *Santalum album* o *Santalum spicatum* o una combinación de los mismos.
- 15 3. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde el aceite de sándalo es de *Santalum album*.
4. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde la composición que comprende aceite de sándalo comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20 5. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde el aceite de sándalo comprende al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que consiste en E nerolidol, Alfa-santaleno, Cis-alfa-(trans) bergamoteno, Epi-beta-santaleno, Beta-santaleno, Gamma-curcumeno, Dendrolasina, Alfa-santalol, Beta-bisabolol, Epi-alfa-bisabolol, Z-alfa trans-bergamotol, Epi beta-santalol, Cis-beta-santalol, E,E, farnesol, Cis nuciferol, Z-beta-curcumen-12-ol, y cis lanceol.
- 25 6. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la composición comprende 1-300 micromolar de aceite de sándalo.
7. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la composición comprende un
30 0,0002-0,02 % de aceite de sándalo (p/p).
8. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la composición comprende una concentración de aceite de sándalo que es menos tóxica que la misma concentración de aceite de canela en una célula, en donde la concentración de aceite de sándalo está entre un 0,05 % y un 0,1 %.
- 35 9. La composición para uso de la reivindicación 8, en donde la célula es una célula MRC5 humana.
10. La composición para uso de la reivindicación 8, en donde la concentración de aceite de sándalo es de un
40 0,0002-0,02 % (p/p).

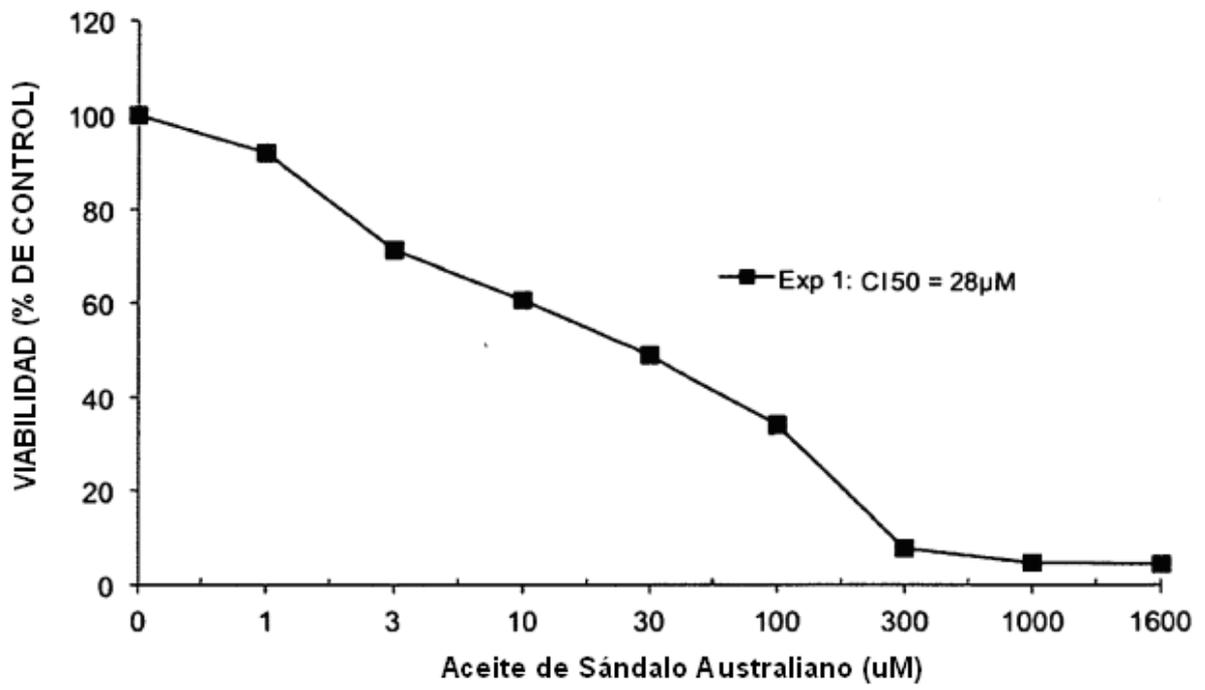


FIG. 1

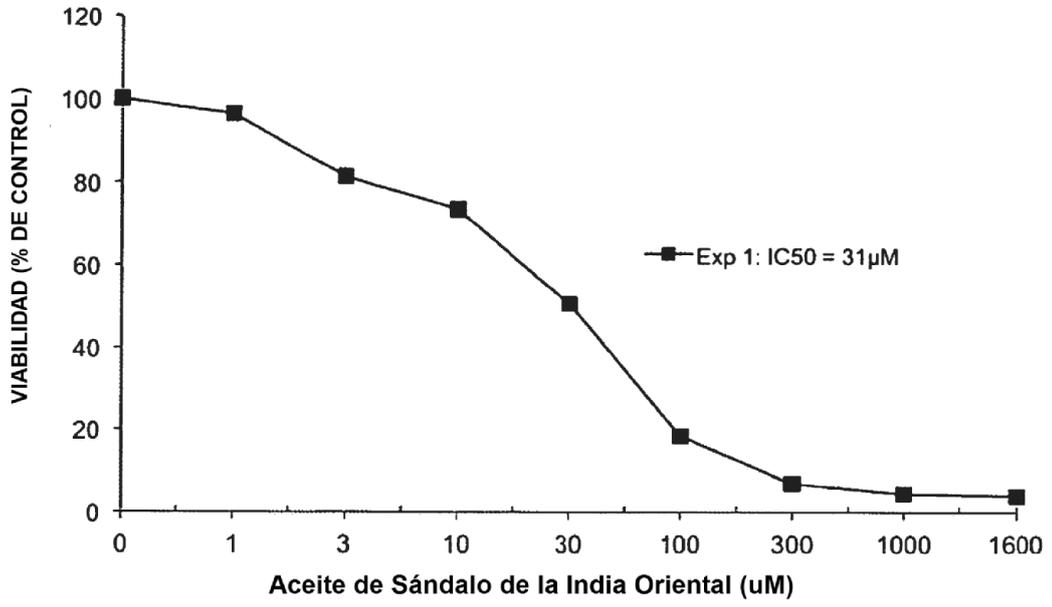


FIG. 2

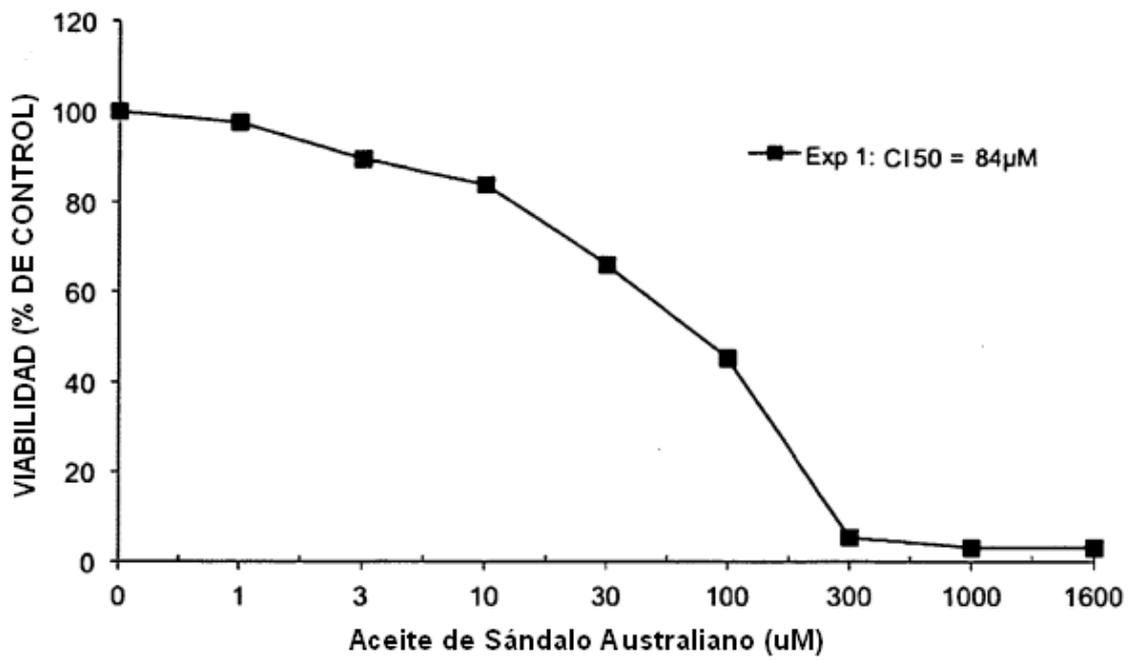


FIG. 3

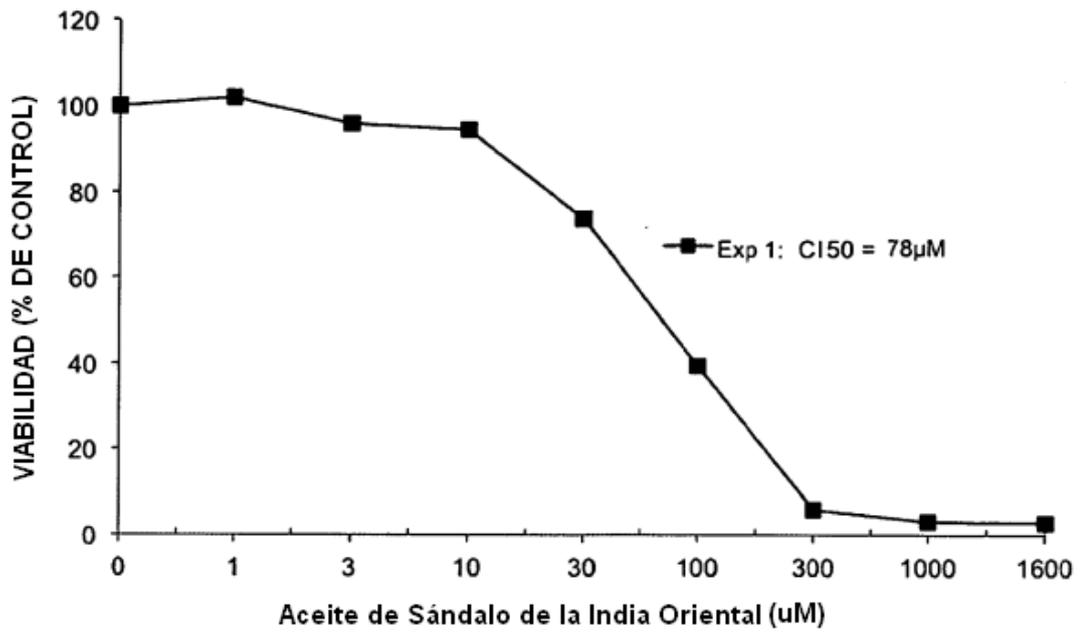


FIG. 4

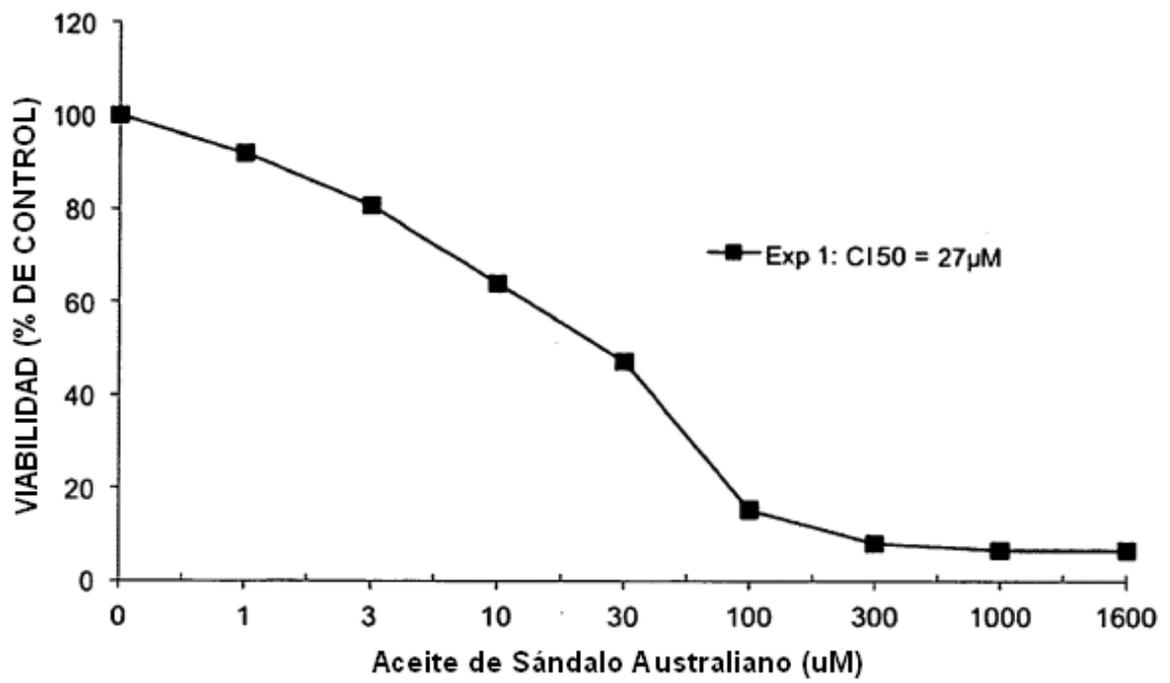


FIG. 5

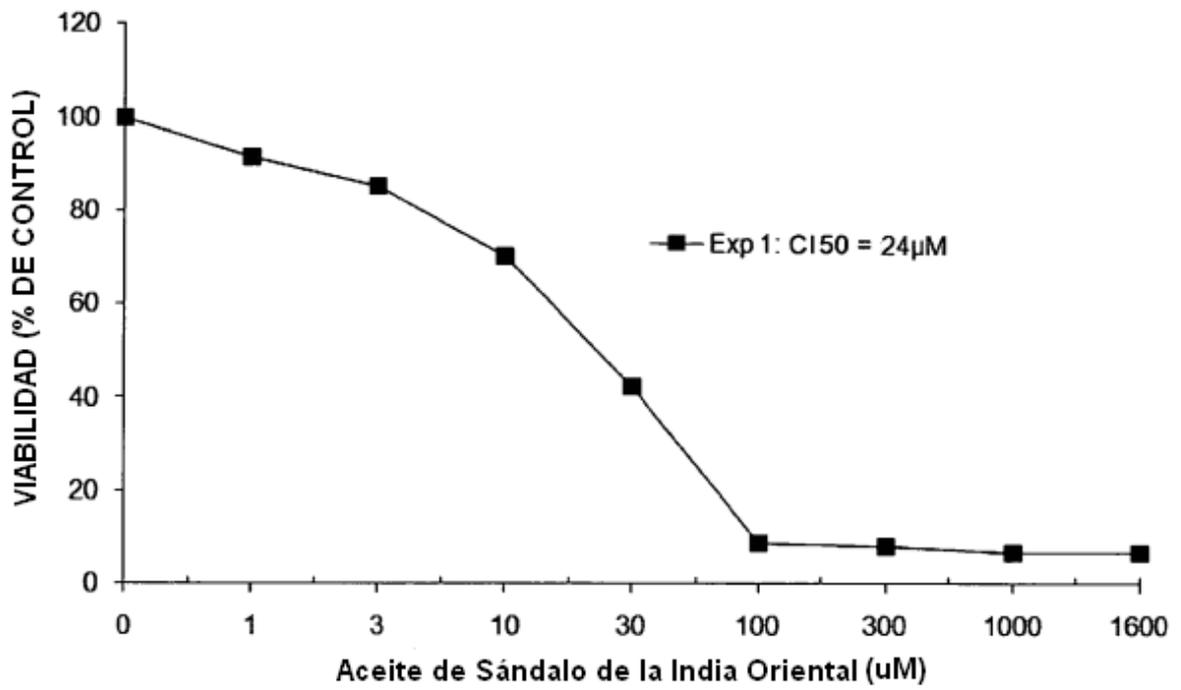


FIG. 6

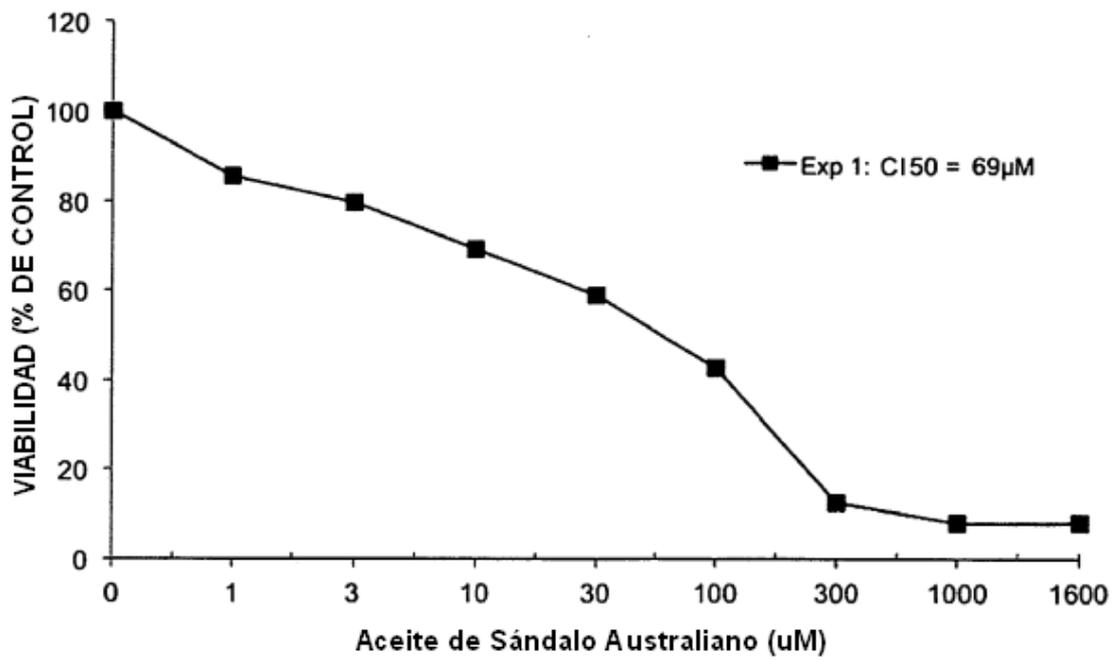


FIG. 7

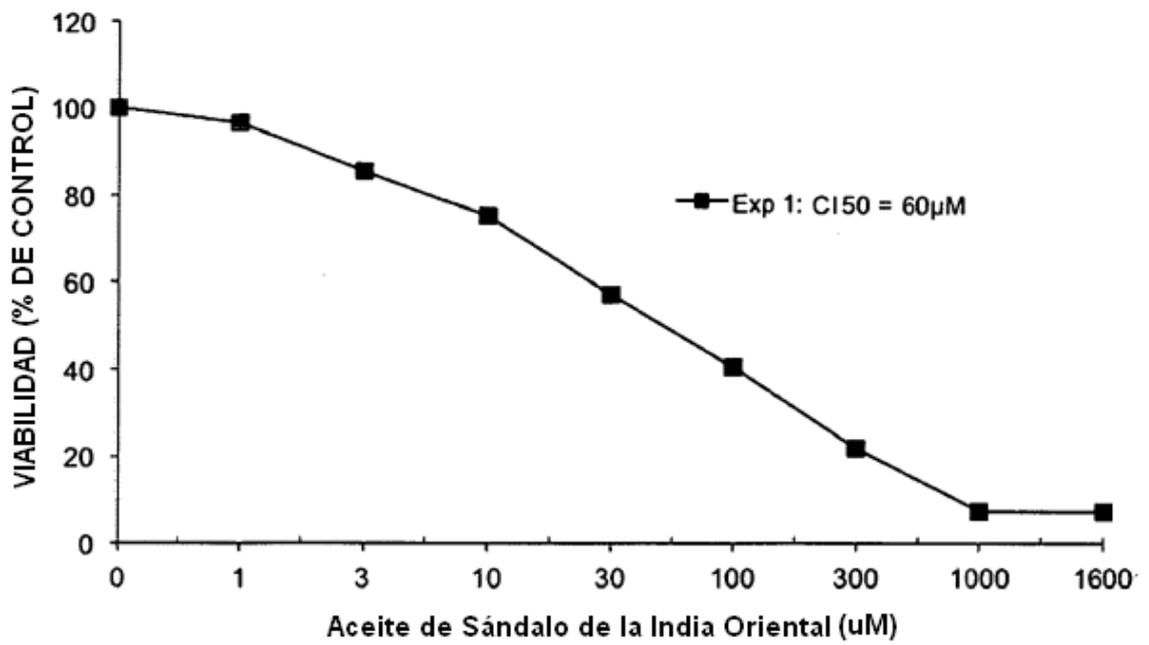


FIG. 8

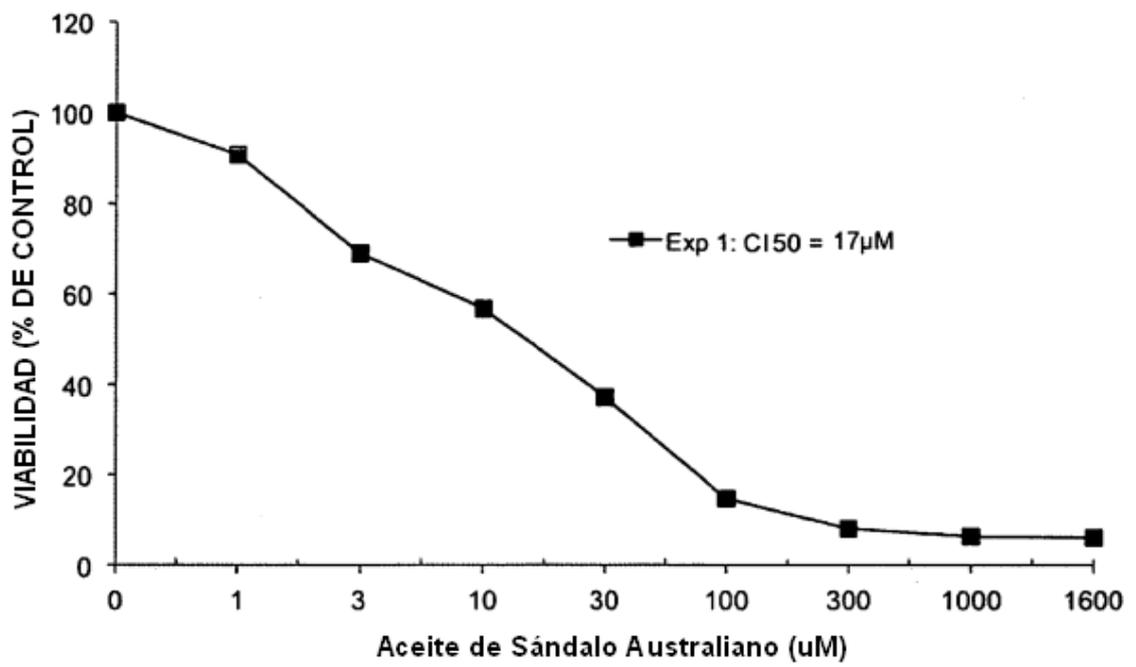


FIG. 9

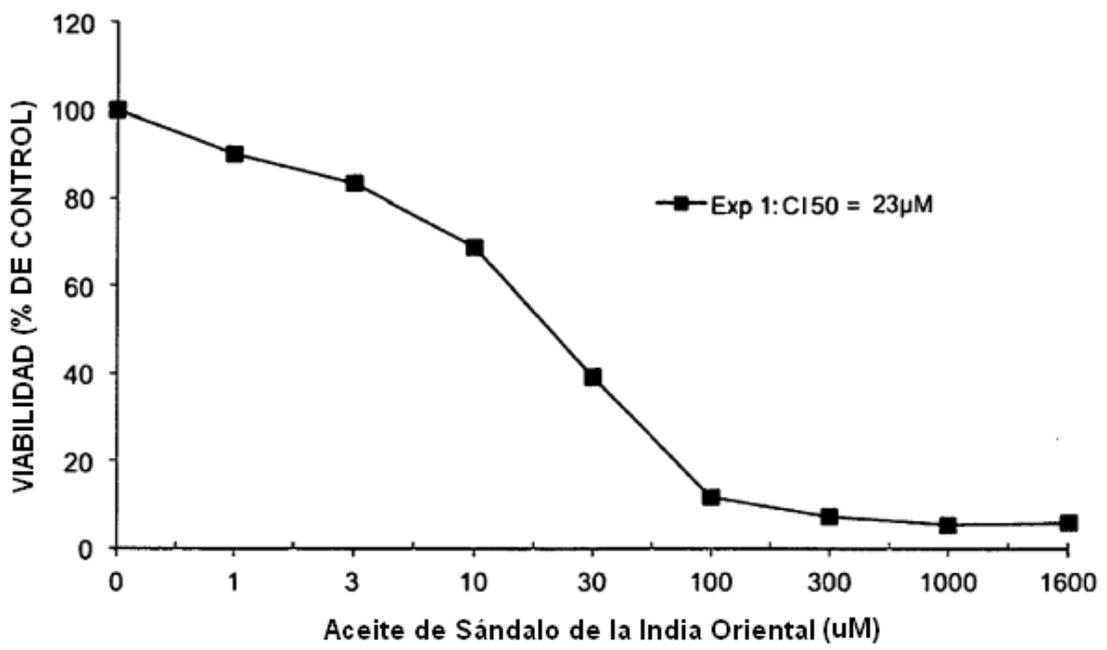


FIG. 10

Células MRC5 (Humanas)

20 Horas

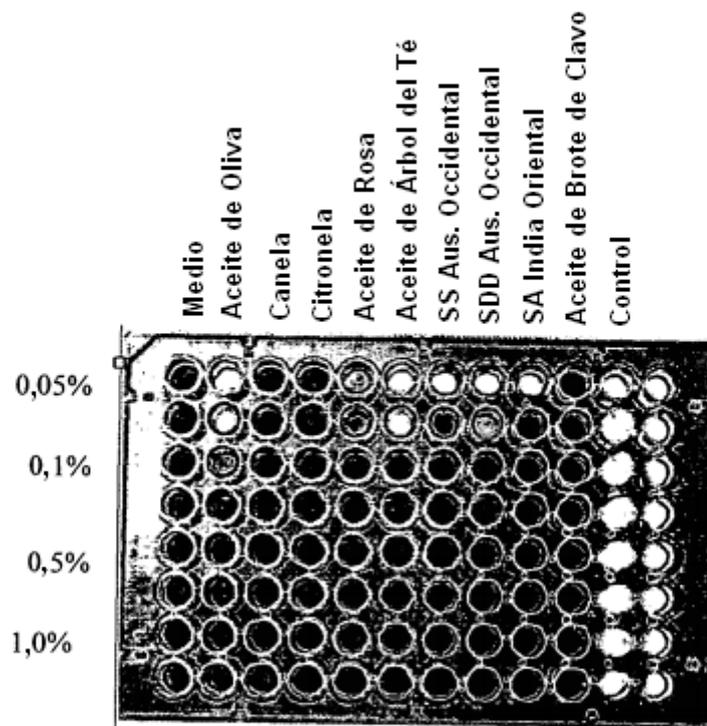


FIG. 11

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 10 • **M. J. PIGGOTT et al.** Western Australian Sandalwood Oil: Extraction by Different Techniques and Variations of the Major Components in Different Sections of a Single Tree. *Flavour and Fragrance Journal*, 1998, vol. 12 (1), 43-46 [0010]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Lippincott, Williams & Wilkins, 2005 [0028]
 - **JACOB et al.** *Gene Ther. Mol. Biol.*, 2004, vol. 8, 213-219 [0059]
- 15 • **OPDYKE et al.** *Food and Cosmetics Toxicology*, 1974, 989-990 [0062]
- **BAR ; GRIEPENTROG.** *Medizin Ernhar*, 1967, vol. 244 [0062]
 - **MCCANN et al.** Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, vol. 72 (12), 5135-5139 [0062]
 - **KROUSE et al.** Progression of skin lesions from normal skin to squamous cell carcinoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 2009, vol. 31 (1), 17-25 [0063]
- 20