



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 339**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)	A61K 31/16 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)	A61K 33/24 (2006.01)
A61K 33/36 (2006.01)	A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 8/27 (2006.01)
A61K 8/19 (2006.01)	A61K 8/42 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)	A61K 8/64 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)	A61Q 7/00 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01961017 .9**

86 Fecha de presentación : **03.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1427383**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

54 Título: **Composiciones y métodos para prevenir la alopecia inducida por una quimioterapia.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73 Titular/es: **Richard Voellmy**
avenue des Cerisiers 39B
1009 Pully, CH

72 Inventor/es: **Voellmy, Richard**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

Composiciones y métodos para prevenir la alopecia inducida por una quimioterapia.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a condiciones y composiciones capaces de inducir la respuesta al estrés en folículos pilosos y a métodos para usar dichas condiciones y composiciones para prevenir la alopecia inducida por quimioterapia.

10 **Antecedentes**

La quimioterapia frecuentemente induce la pérdida de pelo. Con quimioterapia, los pacientes no sólo experimentan una menor resistencia e independencia sino que también deben soportar un símbolo físico de su enfermedad en la pérdida de su pelo. Esta pérdida de pelo es una experiencia traumática que puede derivar en una baja autoestima y resistencia global. Se sabe que algunos pacientes han rechazado la quimioterapia por temor a perder su pelo. Durante varias décadas se han utilizado torniquetes del cuero cabelludo para prevenir la alopecia inducida por quimioterapia. Esta técnica implica la colocación de un torniquete neumático alrededor del nacimiento del pelo en el momento de la administración del fármaco quimioterapéutico. El torniquete es luego inflado a una presión por encima de la tensión arterial sistólica, reduciendo el flujo sanguíneo al cuero cabelludo. La eficacia de esta técnica nunca ha sido demostrada sin ambigüedades. El uso de torniquetes ha sido sustituido en mayor o menor medida por la hipotermia del cuero cabelludo. Con esta técnica se baja la temperatura del cuero cabelludo por debajo de 24°C aplicando compresas frías, etc., antes de la quimioterapia. Se ha dicho que la técnica provee un buen efecto protector del cabello de bueno a excelente en un 50-70%. No obstante, los resultados se han mantenido notoriamente variables. Además, la práctica es más bien incómoda y sólo es tolerada durante un rato. Parece que es más eficaz para agentes de quimioterapia con vidas medias cortas. Además se informó de diferentes casos de metástasis del cuero cabelludo en pacientes que usaron la hipotermia del cuero cabelludo. Finalmente, parece que la técnica funciona considerablemente peor para la quimioterapia combinatoria que para la terapia que usa agentes únicos. También se probaron diferentes procedimientos farmacológicos para la prevención de la pérdida de pelo inducida por quimioterapia. Para una revisión, ver Dorr. 1998. Semin. Oncol. 25: 562-570. La mayor parte de los fármacos evaluados fallaron (por ejemplo, alfatocoferol, minoxidilo, calcitriol) o mostraron una marcada preferencia de sexo (1,25-dihidroxivitamina D). Se obtuvieron resultados más prometedores con la sustancia inmunomoduladora tricloro de amonio (dioxi-etileno-0,0') telurato (AS101). Sredni *et al.* 1996. Int. J. Cancer 65: 97-103. No obstante, aún se está esperando una confirmación de este estudio. Además, se debe resolver la cuestión de si el inmunomodulador es sólo eficaz si se administra unas semanas antes de la quimioterapia. Si es así, esto disminuiría ligeramente la utilidad del compuesto. Otro candidato de fármaco puede ser el ImuVert, quizás usado en combinación con acetilcisteína. ImuVert es una preparación de ribosoma de vesícula membranaria de *Serratia marescens*. La combinación de AS 101 y acetilcisteína mostró eficacia en un modelo roedor, pero no hay datos disponibles sobre humanos. Sería apropiado mantener la cautela puesto que el ImuVert, como un modificador de la respuesta biológica, tiene el potencial de producir toxicidades inaceptables. Así, no hay ningún fármaco en el mercado que proteja generalmente contra la alopecia inducida por quimioterapia, y hay sólo pocos candidatos de fármacos que estén bajo desarrollo activo. En consecuencia existe una demanda de otros candidatos de fármacos y métodos para proteger contra la alopecia por quimioterapia.

Resumen de la invención

Células, tejidos, órganos y organismos enteros responden al estrés proteotóxico aumentando la expresión de un grupo de proteínas que son las proteínas denominadas de choque térmico o de estrés (Hsps). A esta respuesta se le hace referencia aquí como la respuesta de las proteínas de estrés, y a las condiciones y compuestos que suscitan esta respuesta se les llama inductores. Las condiciones que suscitan la respuesta son específicamente denominadas inductores físicos, y los compuestos que suscitan la respuesta inductores químicos. Basados en lo habitualmente conocido sobre las consecuencias posibles de la activación de la respuesta de las proteínas de estrés en células, tejidos y órganos cancerosos, es importante evitar la activación de esta respuesta durante el tratamiento quimioterapéutico contra el cáncer. La presente invención se basa en el entendimiento del inventor de que existe una situación particular en la que los efectos protectores de niveles elevados de Hsps pueden ser controlados para prevenir la toxicidad no asociada al tratamiento de fármacos quimioterapéuticos sin comprometer la eficacia de los mismos fármacos frente a un tumor. Esta situación específica se refiere al pelo del cuero cabelludo de un paciente sometido a tratamiento con quimioterapia de un tumor no residente en el cuero cabelludo o en el pelaje o partes del mismo de un animal mamífero sometido a quimioterapia de un tumor no localizado en la piel. Muchos fármacos quimioterapéuticos y combinaciones de fármacos de este tipo causan la pérdida de pelo (alopecia) del cuero cabelludo del paciente o del pelaje del animal. Se puede aplicar un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés al cuero cabelludo de un paciente o a la piel de un animal de manera que alcance las células mitóticamente activas de los folículos del pelo antes de entrar en la circulación general. Como consecuencia, las células foliculares pilosas y, dependiendo de la naturaleza de la composición que comprende el inductor químico, algunas otras células de la piel, pueden ser expuestas a una concentración de inductor químico que es suficientemente alta para activar la respuesta de las proteínas de estrés en estas células. Los niveles de proteínas de estrés aumentarán, y, como consecuencia, las células foliculares pilosas estarán protegidas contra la exposición posterior a agentes citotóxicos quimioterapéuticos durante un periodo de normalmente 1-2 días, y el fenotipo de la alopecia no se desarrollará. Aunque, inevitablemente, una fracción de moléculas del inductor químico finalmente entrará en la circulación general, debido al alto grado de dilución del inductor químico en la circulación y a que la respuesta de las proteínas de estrés no se activa hasta que no se alcance una concentración

umbral de inductor químico, la activación de la respuesta de estrés se limitará a las células de los folículos pilosos y, posiblemente, células de la piel y no ocurrirá en un grado significativo en las células sanguíneas u otros órganos. Así, el inductor químico tópicamente administrado sólo activará la respuesta protectora de las proteínas de estrés en los folículos pilosos y, posiblemente, en la piel pero no en otro lugar del cuerpo y, consecuentemente, no afectará negativamente a la eficacia del tratamiento con quimioterapia de tumores no localizados en el cuero cabelludo o en la piel. En el caso de un régimen quimioterapéutico donde un fármaco quimioterapéutico es sólo administrado una vez, puede bastar un único tratamiento previo tópico del paciente o animal con una composición comprendiendo un inductor químico para producir el efecto de proteger el folículo piloso. Muchos regímenes de quimioterapia implican diferentes ciclos de tratamiento con fármaco quimioterapéutico cuyo ciclos pueden estar separados por días o semanas. En estos casos la administración tópica de una composición que comprende un inductor químico puede ser de forma igualmente periódica antes de cada tratamiento con fármaco quimioterapéutico. Con este tipo de régimen, el inductor químico será eliminado durante cada ciclo de tratamiento y nunca se acumulará a un nivel suficiente para la activación sistémica de la respuesta de las proteínas de estrés.

Así, la invención se refiere a un método para proteger a un paciente humano o animal mamífero que deba someterse a tratamiento con quimioterapia de un tumor no residente en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal de la alopecia inducida por quimioterapia. La protección de un paciente humano o animal mamífero comprende la prevención o reducción de la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia. El método comprende la administración al cuero cabelludo del paciente o la piel del animal de una cantidad eficaz de una composición que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés. La administración de fármaco quimioterapéutico es retardada durante un tiempo suficientemente largo para permitir que ocurra la inducción de la respuesta de las proteínas de estrés y que las proteínas de estrés se acumulen en los folículos pilosos a niveles protectores. Una cantidad eficaz de una composición que comprende un inductor químico es una cantidad que es al menos igual a la cantidad requerida para causar un aumento mensurable en la concentración de al menos una proteína de estrés del grupo de las Hsps incluyendo Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína en folículos pilosos residentes en la piel expuesta a la composición que comprende un inductor químico y que produce una mayor resistencia de los folículos pilosos frente a los fármacos quimioterapéuticos. Un aumento mensurable en la concentración de una Hsp es un aumento de al menos el 25% sobre la concentración medida antes de la administración de una composición de la invención. La exposición de células cultivadas a un inductor químico normalmente produce un aumento rápido de la expresión de la Hsp y un aumento suficiente de las concentraciones de Hsp en el plazo de 2 a 12 horas para hacer las células resistentes contra los tóxicos incluyendo los fármacos quimioterapéuticos. No obstante, la piel incluyendo folículos pilosos representa una barrera significativa, y se puede requerir más tiempo, hasta 24 horas, para que un inductor químico alcance una concentración eficaz en las células foliculares pilosas. Por lo tanto, el fármaco quimioterapéutico es preferiblemente administrado entre 2 y 36 horas después de la administración al cuero cabelludo de un paciente o a la piel de un animal de una composición que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés. Más preferiblemente, la administración de medicamento quimioterapéutico es retardada durante 8 a 24 horas. Se conocen muchos inductores químicos de la respuesta de las proteínas de estrés. Generalmente, cualquier compuesto que produzca alguna proteotoxicidad funciona como inductor químico. Los inductores preferidos son compuestos de la serie de la ansamicina de benzoquinona (p. ej., geldanamicina), sales arsénicas (p. ej., arsenito de sodio), sales de estaño (p. ej., cloruro estánnico), sales de zinc (p. ej., cloruro de zinc) y diamida. Otro inductor químico preferido es un factor de transcripción de choque térmico activado 1 (HSP1) que puede ser administrado como una proteína recombinante o como un ácido nucleico conteniendo un gen para el factor en una forma expresable.

El método de la invención también incluye el tratamiento previo del cuero cabelludo de un paciente o la piel de un animal con composiciones que comprenden un inductor químico y adicionalmente un potenciador de penetración para facilitar el transporte del inductor a las células de los folículos pilosos.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para proteger contra la alopecia inducida por quimioterapia, las composiciones comprendiendo un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés, un potenciador de penetración y un diluyente o solvente apropiado. Los inductores químicos preferidos usados en estas composiciones son diamida, compuestos de la serie de ansamicina de benzoquinona, sales arsénicas, sales de zinc y HSF activados en forma de proteína o ácido nucleico.

La invención también se refiere al uso de un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés para la producción de un medicamento para proteger a un paciente humano o animal mamífero que deba ser sometido a tratamiento con quimioterapia de un tumor no residente en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal contra la alopecia inducida por la quimioterapia, administrando una cantidad eficaz del medicamento al cuero cabelludo del paciente humano o la piel del animal mamífero suficientemente antes de la administración de un fármaco quimioterapéutico. Una cantidad eficaz de medicamento de este tipo es una cantidad que es al menos igual a la cantidad requerida para hacer que se pueda medir un aumento de la concentración de al menos una proteína de estrés del grupo de las Hsps incluyendo Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína en folículos pilosos que residen en la piel expuesta al medicamento comprendiendo un inductor químico y que produzca una mayor resistencia de los folículos pilosos frente a los fármacos quimioterapéuticos. Un aumento mensurable de la concentración de una Hsp es un aumento de al menos el 25% sobre la concentración antes de la administración de un medicamento de la invención. Preferiblemente, el fármaco quimioterapéutico es administrado entre 2 y 36 horas después de la administración al cuero cabelludo de un paciente o a la piel de un animal de un medicamento que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés. Más preferiblemente, la administración del fármaco quimioterapéutico es retardada de 8 a 24 horas. Se conocen muchos inductores químicos de la respuesta de las proteínas de estrés. Generalmente, cualquier condición o

- compuesto que produzca alguna proteotoxicidad funciona como un inductor. Los inductores químicos preferidos para el uso en la producción de un medicamento de la invención son compuestos de la serie de ansamicina de benzoquinona (p. ej., geldanamicina), sales arsénicas (p. ej., arsenito de sodio), sales de estaño (p. ej., cloruro estánnico), sales de zinc (p. ej., cloruro de zinc) y diamida. Otro inductor químico preferido es un factor 1 de transcripción de choque térmico activado (HSP1) que puede ser administrado como una proteína recombinante o como un ácido nucleico que contiene un gen para el factor en una forma expresable. La invención también incluye el uso de un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés y de un potenciador de penetración que facilite la transmisión del inductor a los folículos pilosos para la producción de un medicamento para proteger contra la alopecia inducida por quimioterapia.
- La invención también se refiere a un método que usa un inductor físico de la respuesta de las proteínas de estrés, p. ej., calor, para proteger a un paciente humano o a un animal mamífero que deba ser sometido a tratamiento con quimioterapia de un tumor no residente en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal contra la alopecia inducida por quimioterapia. La protección de un paciente humano o un animal mamífero comprende la prevención o reducción de la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia. En una forma de de estrés y (b) someter a dicho paciente humano o animal a tratamiento con quimioterapia.

Descripción detallada

El pelo está formado por la raíz, el bulbo (el centro germinativo) y el tallo. Las células proliferan en el bulbo y el pelo es empujado desde la raíz a través del cuero cabelludo. El producto final es una cadena de queratina muy compactada. El crecimiento del pelo ocurre en tres fases. La primera fase es la fase anágena, que es la fase de crecimiento. El 85-90% de los folículos pilosos humanos están en la fase anágena. Cada folículo de pelo comprende una base bulbosa de células matrices mitóticamente activas. A partir de éstas todas las células del tallo del pelo se diferencian y crecen. Las células se desplazan hacia arriba en filas al bulbo superior y se alargan verticalmente. Finalmente, estas son forzadas hacia arriba y emergen en la superficie de la piel. Las células del bulbo piloso humano se dividen por término medio cada 12 a 24 horas. Debido a esta actividad mitótica substancial, las células del bulbo piloso son particularmente susceptibles a los agentes citotóxicos. La fase anágena dura entre dos y seis años en los seres humanos. La segunda fase es la fase catágena, que dura unas semanas en los seres humanos. En esta fase la raíz del pelo se separa del bulbo piloso, se termina el almacenamiento de pigmento y el extremo de la raíz se separa del bulbo. Menos del 1% del pelo humano se encuentra en la fase catágena. La tercera fase es la fase telógena, que está caracterizada por una falta de actividad mitótica. Esta fase dura entre tres y seis meses. Aproximadamente el 10% del pelo humano está en la fase telógena. Dorr. 1998. *Semin. Oncol.* 25: 562-570. Hussein. 1993. *South. Med. J.* 86: 489-496.

La alopecia o pérdida de pelo está frecuentemente asociada a la quimioterapia contra el cáncer. Dorr. 1998. *Semin. Oncol.* 25: 562- 570. Muchos de los fármacos quimioterapéuticos comúnmente usados inducen la pérdida de pelo, aunque hay diferencias en la capacidad de diferentes fármacos para causar alopecia. Se producen muchos efectos secundarios severos con ciclofosfamida, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, etopósido, ifosfamida, paclitaxel, teniposida y topotecan. Joss *et al.* 1988. *Recent Res. Cancer Res.* 108: 117-126. Perry (ed). *The Chemotherapy Source Book*, Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1996, pp. 293-555, 595-606. Algo menos eficaces en inducir la pérdida del pelo realización, el método comprende la administración al cuero cabelludo del paciente o la piel del animal de una dosis de calor eficaz. La administración de fármaco quimioterapéutico es retardada durante un tiempo suficientemente largo para permitir que ocurra la inducción de la respuesta de las proteínas de estrés y que las proteínas de estrés se acumulen en los folículos pilosos a niveles protectores. Una dosis de calor eficaz es una dosis al menos igual a la dosis requerida para causar un aumento mensurable de la concentración de al menos una de las proteína de estrés del grupo de las Hsps incluyendo Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína en folículos pilosos que residen en la piel expuesta a la dosis de calor y que produce una mayor resistencia de los folículos pilosos frente a los fármacos quimioterapéuticos. Un aumento mensurable de la concentración de una Hsp es un aumento de al menos el 25% sobre la concentración medida antes de la administración de una composición de la invención. La exposición de células cultivadas a una dosis de calor normalmente produce un aumento rápido de la expresión de la Hsp y un aumento suficiente de las concentraciones de Hsp en el plazo de 2 a 24 horas para hacer las células resistentes contra los tóxicos incluyendo los fármacos quimioterapéuticos. Por lo tanto, el fármaco quimioterapéutico es preferiblemente administrado entre 2 y 24 horas después de la administración al cuero cabelludo de un paciente o a la piel de un animal de una dosis de calor. Más preferiblemente, la administración del fármaco quimioterapéutico es retardada de 6 a 12 horas. El calor puede ser administrado por diferentes medios. El contacto del cuero cabelludo de un paciente o la piel de un animal que necesite de tratamiento con una superficie calentada o con un líquido calentado (p. ej., agua) proporciona una dosis de calor a la piel y las células foliculares pilosas. Otros medios para calentar la piel y las células foliculares pilosas incluyen la exposición a ultrasonidos o radiación de microondas, infrarrojos o radiofrecuencias.

Por consiguiente, las formas de realización de la invención descritas aquí también se refieren a un método para el tratamiento contra el cáncer de un paciente humano o un animal mamífero que requiera del mismo comprendiendo (a) administrar al cuero cabelludo del paciente o la piel del animal una dosis efectiva de un inductor físico tal como calor o una cantidad eficaz de una composición que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas son actinomicina, 5-fluorouracilo, hidroxiaurea, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina. A menudo, estos fármacos citotóxicos quimioterapéuticos son usados en combinación, lo que aumenta el riesgo de alopecia sobre el inherente en los fármacos individuales.

Ha habido relativamente pocas investigaciones para identificar el (los) mecanismo(s) real(es) de la alopecia inducida por quimioterapia. Supuestamente, esto se debe al hecho de que la hipótesis de que los agentes citotóxicos

matan las células foliculares pilosas por el mismo mecanismo por el que matan las células cancerosas y otras células proliferantes es inmediatamente plausible. Sin embargo, se demostró que la doxorubicina mata las células del pelo al desencadenar un mecanismo apoptótico. Cece. 1996. Lab. Invest. 75 : 601-609. El mismo estudio también descubrió que los objetivos de la toxicidad de la doxorubicina eran las células del bulbo superior y matrices del folículo piloso. Otro estudio informó de que la ciclofosfamida inducía apoptosis masiva en folículos pilosos anágenos. Schilli *et al.* 1998. J. Invest. Dermatol. 111: 598-604.

Teóricamente, parece que hay diferentes formas de prevenir la pérdida del pelo inducida por quimioterapia, es decir (1) reducción de la cantidad de agente quimioterapéutico suministrado al bulbo, (2) inactivación local del fármaco quimioterapéutico, y (3) protección de las células del bulbo como propone la invención descrita aquí. La presente invención se refiere a la inducción deliberada localizada de la respuesta de las proteínas de estrés en el cuero cabelludo de un paciente o la piel de un animal mamífero que requiera quimioterapia para proteger los folículos pilosos contra los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos y combinaciones de las mismas sin comprometer la eficacia terapéutica de esos agentes.

Las células de cada órgano y cada tejido responden al estrés proteotóxico aumentando la expresión de las llamadas proteínas de choque térmico o de estrés (Hsps). Esta respuesta es denominada aquí respuesta de las proteínas de estrés. Para revisiones, ver Voellmy. 1994. Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr. 4: 357-401. Voellmy. 1996. En: Respuestas Celulares Inducibles por Estrés (Feige *et al.* Eds.), Birkhauser Verlag, Basilea, Suiza, pp.121-137. Parsell y Lindquist. 1993. Annu. Rev. Genet. 27: 437-496. Históricamente, el término "Hsp" fue usado para describir aquellas proteínas cuyos índices de síntesis eran aumentados en células expuestas al calor estresante prototípico. Las Hsps fueron distinguidas en base a los pesos moleculares de sus subunidades. Las principales Hsps tienen tamaños de subunidad de aproximadamente 110, 90, 70, 60, 20-30 y 10 kDa, respectivamente, y se les llama Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp20-30 (o Hsp pequeña) y Hsp10, respectivamente. Ahora se sabe que la mayor parte de estas Hsps son chaperones moleculares que contribuyen al plegado y replegado de las proteínas, el tráfico intracelular de proteínas, ensamblaje y disociación de complejos de proteína, degradación de proteínas, etc. También se sabe que las proteínas de estrés participan en la regulación de la actividad y estabilidad de proteínas reguladoras celulares importantes tales como los receptores de hormonas esteroides, algunas quinasas de señalización incluyendo Raf y Ras, y telomerasa. Según sus funciones fisiológicas, las Hsps no sólo son predominantes en las células estresadas sino también en las células no estresadas. Determinadas Hsps son proteínas principales incluso en la célula no estresada. Por ejemplo, la Hsp90 representa el 1-2% de la proteína celular total en ausencia de estrés. Cuando las células son estresadas, las concentraciones de Hsps aumentan más.

Se sabe desde hace mucho tiempo que la mayoría de las Hsps son codificadas por familias de genes altamente relacionados. Mientras algunos de estos genes son estrictamente regulados por el estrés, otros son ya sustancialmente activos en la célula no estresada. Algunos genes no son regulados por el estrés en absoluto y expresan proteínas de estrés constantemente. A esos genes se les llama también genes cognados de las proteínas de estrés, y a las proteínas codificadas por éstos proteínas cognadas de choque térmico o de estrés (Hscs como oposición a Hsps). La familia mejor conocida de genes de proteína de estrés codifica las proteínas con pesos moleculares subunitarios de aproximadamente 70 kDa (Hsp/c70). Los seres humanos poseen un gen de hsp70 que es ya sustancialmente activo en la célula no estresada, y cuya actividad aumenta aproximadamente 10 veces durante el estrés por calor. Este gen es también conocido como el gen hsp70A. Hay al menos otros dos genes, llamados genes hsp70B y hsp70B', que son estrictamente regulados por calor. Su actividad aumenta aproximadamente 1000 veces en la célula estresada por calor. Las células humanas también tienen al menos un gen hsc70 que codifica una proteína que está altamente relacionada con Hsp70. Este gen es esencialmente no regulado por estrés.

Como se analizó antes, la actividad de los genes Hsp regulable por estrés aumenta cuando la célula es expuesta a un estrés proteotóxico. Tal estrés proteotóxico puede ser inducido, por ejemplo, por calor, luz UV, campo electromagnético, iones de metal pesado tal como iones de Cd, Zn, Sn, o de Cu, otros compuestos reactivos por sulfhidrilos tales como arsenito de sodio (una sal arsénica), inhibidores del metabolismo de energía, en particular inhibidores de la función mitocondrial, análogos de aminoácido tales como canavanina o carboxilato de azetidina, desnaturizantes de proteínas tales como etanol, agentes oxidantes tales como diamida (bis(N,N-dimetilamida) de ácido diazinodicarboxílico) u otros agentes incluyendo, por ejemplo, tóxicos que forman aductos de proteínas tales como acetaminofén. La actividad de los genes Hsp también aumenta en células expuestas a inhibidores de proteólisis tales como lactacistina o a compuestos que interfieren en la función apropiada de una proteína de estrés. Ejemplos de este último tipo de compuesto son las ansamicinas de benzoquinona incluyendo geldanamicina y herbimicina A que se sabe que enlazan específicamente Hsp90 en su sitio de enlace nucleotídico. El modelo actual que parece ser generalmente aceptado sostiene que la exposición a cualquiera de estos estreses produce un mayor nivel de despliegue de las proteínas y, consecuentemente, una concentración elevada de proteína no nativa. Un nivel suficientemente elevado de activadores de proteínas no nativas aumentó la expresión de los genes Hsp. Las mediciones cuantitativas sugirieron que la actividad del gen Hsp sustancialmente aumentada requiere la desnaturización de aproximadamente el 1-2% de la proteína celular. Como la exposición a los productos químicos o condiciones físicas indicados arriba originó una mayor actividad del gen Hsp, a estos productos químicos o condiciones físicas se les llama también inductores químicos o físicos de la respuesta de las proteínas de estrés. Tanto los inductores químicos como los físicos pueden ser usados para la práctica de la presente invención.

La regulación por estrés de los genes de Hsp es mediada por un factor de transcripción de choque térmico (HSF). Las células de los mamíferos expresan varias moléculas SHP diferentes pero relacionadas. Sólo uno de estos factores,

HSF1, parece estar normalmente implicado en la regulación de estrés de los genes Hsp. El HSF1 es un factor ubicua-
mente expresado que es inactivo, es decir, incapaz de transactivar un gen hsp en la célula no estresada. Cuando la célula
es expuesta a uno de los inductores descritos anteriormente, el factor es activado y adquiere capacidad de transactiva-
ción. En la célula no estresada, el HSF1 forma parte de un complejo heterooligomérico dinámico que incluye Hsp90
y, posiblemente, otros chaperones y cofactores. Zou *et al.* 1998. Cell 94: 471-480. Cuando la célula es estresada, las
proteínas no nativas se acumulan. Estas proteínas no nativas enlazan preferentemente Hsp90 y otros chaperones, com-
petiendo con el HSF1 para unir los mismos chaperones. Como resultado de esta competición, una fracción de HSF1
deja de ser enlazada a un chaperón. El HSP1 disociado rápidamente se homotrimeriza y, en consecuencia, adquiere la
capacidad de enlazar específicamente las denominadas secuencias de elementos de choque térmico (HSE) presentes en
los promotores de los genes hsp. Parece que para la activación completa el HSF1 necesita además ser hiperfosforilado.
Recientes observaciones inéditas plantean la posibilidad de que los eventos que activan la fosforilación pueden ser
negativamente regulados uniendo complejos de chaperones al factor de transcripción trimérica.

Estudios sobre la mutagénesis del HSF1 humano condujeron al descubrimiento de factores mutantes que han de-
jado de ser regulados por el estrés pero que son capaces de transactivar genes hsp en ausencia de cualquier estrés.
Zuo *et al.* 1995. Mol. Cell. BioL 15: 4319-4330. Xia *et al.* 1999. Cell Stress & Chaperones 4: 8-18. Estos factores
mutantes que funcionan como inductores químicos de la respuesta de las proteínas de estrés son también denomina-
dos en este caso HSF1 activados. Las delecciones y sustituciones de aminoácidos en la región entre aproximadamente
los aminoácidos 185 y 315 del polipéptido HSF humano de 1529 residuos de largo originan este fenotipo desregu-
lado. Se sabe que las delecciones y sustituciones en la región entre aproximadamente los aminoácidos 200 y 315 son
constitutivamente transactivadoras cuando son sobreexpresados de genes transfectados. De interés particular son las
sustituciones y delecciones en la región entre aproximadamente los aminoácidos 185 y 200 que producen factores
que son constitutivamente activos incluso en concentraciones excesivamente bajas. Se describieron ejemplos de de-
lecciones y sustituciones conocidas para hacer el HSF1 constitutivamente transactivador en la solicitud de la patente
PCT/US98/01038 (WO98/31803) que es incorporada aquí en su totalidad como referencia. Se observa que la solicitud
WO98/31803 también describía el HSF no humano y factores quiméricos capaces de transactivar genes hsp en ausen-
cia de estrés. Aunque no toda delección o sustitución en la región de los residuos 185-315 originará un HSF1 humano
desregulado, la identificación de factores desregulados mutantes es fácilmente conseguida por un experto en la materia
usando uno de varios métodos de análisis. Por ejemplo, se puede introducir un gen que codifique un HSF1 mutado que
debe ser probado en un vector de expresión adecuado. El constructo de expresión resultante puede ser introducido por
transfección en una célula que contenga una o más copias de un gen indicador conducido por un promotor hsp. Un
ejemplo de tal línea celular es HeLa-CAT, una línea celular humana que contiene diferentes copias de un gen de clo-
ranfenicol acetiltransferasa bajo el control de un promotor hsp70B humano. Baler. *et al.* 1992. J. Cell Biol. 117:1151-
1159. La mayor actividad del gen indicador que puede ser medida por un ensayo conveniente de actividad de indicador
indicará que un HSF1 mutado es capaz de transactivar un gen hsp en ausencia de estrés.

Se sabe desde hace mucho tiempo que la exposición de las células a un estrés por calor no letal protege las células
de un estrés por calor posterior más severo que es letal para las células nativas. Parsell y Lindquist. 1993. Annu. Rev.
Genet. 27: 437-496. El tratamiento previo con calor también protege a las células de algunos estreses por productos
químicos. Este efecto protector está correlacionado con la mayor expresión de las Hsps. Experimentos de transfección
proporcionaron una evidencia directa de que los mayores niveles de ciertas proteínas individuales de estrés producen
una tolerancia al estrés. Por ejemplo, se descubrió que las células transfectadas para sobreexpresar transitoriamente
Hsp70 o líneas celulares estables que sobreexpresan la misma Hsp tienen una mayor resistencia al estrés. Li *et al.*
1991. Proc. Natl. Acad. Sci EEUU 88: 1681-1685. Huot *et al.* 1991. Cancer Res. 51: 5245-5252. Jaattela *et al.* 1992.
EMBO J. 11: 3507-3512. Se hicieron observaciones análogas en experimentos con animales. La capacidad de las
Hsps para proteger contra los daños por isquemia/reperfusión en el corazón fue demostrada por experimentos con
preparación previa con calor (Liu *et al.* 1992. Circulation 86: 11358-11363. Richard *et al.* 1996. Fund. Clin. farmacol.
10: 409-415. Joyeux *et al.* 1998. Cardiovasc. Res. 40: 124-130) al igual que por estudios usando animales transgénicos.
En estos últimos estudios, los corazones de ratones transgénicos que sobreexpresaban Hsp70 fueron sometidos a un
evento isquémico. Se evaluó la recuperación de los corazones del trauma isquémico pasados 30 minutos de reperfusión
después del evento isquémico. Como se juzgó por mediciones de fuerza contráctil y liberación de creatina quinasa,
los corazones de los ratones transgénicos mostraron una mejora significativa de recuperación en comparación con los
corazones de animales no transgénicos. Plumier *et al.* 1995. J. Clin. Invest. 95: 1854-1860. Marber *et al.* 1995. J.
Clin. Invest. 95:1446-1456. Se obtuvieron resultados similares en experimentos donde se modificaron los corazones
de ratas adultas con un gen hsp70 por infusión intracoronaria de una formulación de HVJ-liposoma conteniendo el
gen hsp70. Suzuki *et al.* 1997. J. Clin. Invest. 99: 1645-1650. Los ratones transgénicos sobreexpresando Hsp70 en el
cerebro también exhibieron un menor daño neurológico tras una oclusión arterial cerebral media. Plumier *et al.* 1997.
Cell Stress & Chaperones 2: 162-167. Se descubrió que el tratamiento previo de conejos con calor o una sal de estaño
previene la parálisis provocada por isquemia aguda de la médula espinal. Perdrietz *et al.* 1999. Ann. N. Y. Acad. Sci.
874: 320-325. Comunicación Personal. De forma similar, se demostró la protección de la función renal de un daño
isquémico en un modelo de cerdo. Perdrietz *et al.* 1999. Ann. N. Y. Acad. Sci. 874: 320-325.

En cuanto a los efectos protectores de las proteínas de estrés en la piel, se demostró reiteradamente que el trata-
miento previo con calor aumenta la supervivencia de colgajos de piel. Esta supervivencia mejorada fue correlacionada
con la mayor expresión de Hsp70 en los colgajos de piel. Koenig *et al.* 1992. Plast. Reconstr. Surg. 90: 659-694. Wang
et al. 1998. Plast. Reconstr. Surg. 101: 776-784. Además, el tratamiento previo con calor protegió las células cultivadas
epiteliales y queratinocitos del daño inducido por UVB. Este efecto protector fue asociado a niveles elevados de Hsp, en
particular niveles de Hsp70. Trautinger *et al.* 1995. J. Invest. Dermatol. 105: 160-162. La inyección de un anticuerpo

de Hsp70 aumentó la sensibilidad de los queratinocitos a la lesión por UVB. Bayerl y Jung. 1999. *Exp. Dermatol.* 8: 247-253.

Las células que expresan un mutante de HSF1 constitutivamente activo sobreexpresaron Hsps y exhibieron mayor resistencia al estrés por calor, a la isquemia simulada y a la exposición a ciclofosfamida (evaluada en células derivadas de hepatocitos (HepG2)). Xia *et al.* 1999. *Cell Stress & Chaperones* 4: 8-18. La sobreexpresión de la proteína de estrés Hsp70 mejoró la resistencia celular a la adriamicina. Roigas *et al.* 1998. *Prostate* 34: 195-202. La sobreexpresión de Hsp27 también generó resistencia a la doxorubicina. Richards *et al.* 1996. *Cancer Res.* 56: 2446-2451. Oesterreich *et al.* 1993. *Cancer Res.* 53: 4443-4448. El laboratorio de Karlseder y otros informaron igualmente de que la sobreexpresión específica de Hsp70 o Hsp27 protegía a las células de la apoptosis inducida por doxorubicina. Karlseder *et al.* 1996. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 153-159. Richards *et al.* 1996. *Cancer Res.* 56: 2446-2451. Oesterreich *et al.* 1993. *Cancer Res.* 53: 4443-4448. La sobreexpresión de Hsp70 o Hsp27 también hizo a las células resistentes a la cisplatina. Komatsuda *et al.* 1999. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14: 1385-1390. Richards *et al.* 1996. *Cancer Res.* 56: 2446-2451. Oestemich *et al.* 1993. *Cancer Res.* 53: 4443-4448. Estos estudios demostraron claramente que la mayor expresión de Hsps individuales generaban la protección de tipos de célula particulares de la toxicidad de agentes quimioterapéuticos citotóxicos. Debido a la conservación de la estructura y función de las proteínas de estrés y la conservación de la respuesta de las proteínas de estrés, se espera que los últimos descubrimientos se apliquen de forma similar a otros tipos de célula aparte de aquellas estudiadas al igual que a células en tejidos. También se espera que la sobreexpresión de las Hsps también protejan a las células de otros agentes citotóxicos aparte de aquellos evaluados en los estudios mencionados arriba y que la sobreexpresión de toda la cohorte de Hsps tenga al menos un efecto protector comparable a la sobreexpresión de las Hsps individuales. Finalmente, varios estudios respaldaban la noción de que la activación de la respuesta de las proteínas de estrés también induce resistencia a fármacos múltiples. Chin *et al.* 1990. *J. Biol. Chem* 265: 221-6. Kim *et al.* 1998. *Exp. Mol. Med.* 30: 87-92. Estos descubrimientos sugieren que la activación de la respuesta de las proteínas de estrés disminuirá la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos citotóxicos usados solos o en combinación en la quimioterapia contra el cáncer. Así, la activación de la respuesta de las proteínas de estrés durante el tratamiento con quimioterapia para el cáncer está claramente contraindicada.

El efecto protector de una respuesta de proteínas de estrés activada en células cancerosas puede ser ligeramente reducido por otros mecanismos. La sobreexpresión continua de un HSF1 constitutivamente activo inhibió el crecimiento celular. Xia *et al.* 1999. *Cell Stress & Chaperones* 4: 8-18. Las células con crecimiento detenido pueden ser menos susceptible a los agentes citotóxicos que las células que crecen. No obstante, se publicó que la detención del crecimiento de las células con sobreexpresión de HSF1 activado fue debida a la redirección eficaz de estas células hacia la producción de cantidades excesivas de Hsps en lugar de otras proteínas esenciales. Es dudoso que esta situación sea fisiológicamente pertinente. Las Hsps tuvieron una relación privilegiada con el sistema inmunitario a finales de los años 80, varios investigadores observaron que las hsp's eran objetivos preferidos para las respuestas inmunológicas celulares y humores a la infección por bacterias, hongos y protozoos. Estas conclusiones fueron desconcertantes porque las proteínas de estrés incluso de organismos divergentes están altamente relacionadas. Por lo tanto pueden ocurrir reacciones autoinmunes. De hecho, pacientes infectados, vacunados e incluso sanos expresan anticuerpos y células T dirigidas contra las proteínas de estrés. Aparentemente, las respuestas inmunológicas contra las proteínas de estrés son finamente reguladas, y las reacciones severas autoinmunes son evitadas. Más recientemente se descubrió que las proteínas de estrés potencian drásticamente la inmunogenicidad de los antígenos enlazados de manera covalente y no covalente. Curiosamente, y esto distingue las proteínas de estrés de la mayoría de otros adyuvantes, la inmunidad favorecida por las proteínas de estrés parece ser predominantemente de un tipo similar a Th1, estimulante de fagocitos y de la activación de linfocitos citotóxicos (CTL). Huang *et al.* 2000. *J. Exp. Med.*, en prensa. Aunque no se entiende bien el mecanismo subyacente para la actividad inmunológica de las proteínas de estrés, se sospecha que éste puede implicar la estimulación de la presentación de antígenos. En los últimos años se publicaron diferentes estudios sugiriendo que una mayor expresión de proteínas de estrés solas pueden intensificar la presentación por parte de células tumorales de sus antígenos y, por lo tanto, pueden estimular respuestas inmunológicas dirigidas contra las células tumorales. Melcher *et al.* 1998. *Nat. Med.* 4: 581-587. Todryk 1999. *J. Immunol.* 163: 1398-1408. Wells *et al.* 1997. *Scand. J. Immunol.* 45: 605-612. No obstante, aunque se podría demostrar la actividad antitumoral de preparaciones conteniendo proteínas de estrés combinadas con péptidos/proteínas antigénicas en modelos tumorales, la importancia de los efectos que afectan al sistema inmunitario resultantes de la sobreexpresión de las proteínas de estrés dentro de células tumorales sigue siendo incierta. Parece improbable que estos efectos fueran capaces de contrarrestar los efectos citoprotectores de las proteínas de estrés sobreexpresadas, efectos citoprotectores que disminuyen la eficacia del tratamiento con quimioterapia.

Así, basados en lo actualmente conocido sobre las consecuencias posibles de la activación de la respuesta de las proteínas de estrés en células, tejidos y órganos cancerosos, es crucialmente importante evitar la activación de la respuesta de las proteínas de estrés durante el tratamiento contra el cáncer con quimioterapia. La presente invención se basa en la comprensión del inventor de que en al menos una situación particular es posible aprovechar la actividad protectora de niveles elevados de Hsps para prevenir la toxicidad no relacionada con el tratamiento de los fármacos quimioterapéuticos sin comprometer la eficacia de los fármacos frente al cáncer que necesita ser tratado con quimioterapia. Esta situación concierne los folículos pilosos en el cuero cabelludo de un paciente con cáncer o en la piel de un animal que necesite quimioterapia. Como se analizó antes, la toxicidad no relacionada con el tratamiento de muchos fármacos quimioterapéuticos y combinaciones de fármacos producen la pérdida de pelo del cuero cabelludo en un paciente humano y la pérdida de pelo del pelaje de animales tratados. Se puede administrar un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés directamente al cuero cabelludo de un paciente con cáncer o la piel de un animal de manera que éste alcance las células mitóticamente activas de los folículos pilosos antes de entrar en circulación,

es decir, sin mucha dilución. Los niveles de proteínas de estrés en células foliculares pilosas expuestas al inductor y, posiblemente, algunas otras células de la piel aumentarán, y, en unas horas, los folículos pilosos estarán protegidos de la exposición posterior a agentes quimioterapéuticos citotóxicos durante un periodo de normalmente 1-2 días. Finalmente, una fracción de las moléculas del inductor entrarán en la corriente sanguínea. No obstante, debido al alto nivel de dilución del inductor químico en la corriente sanguínea, y a que el inductor químico necesita alcanzar una concentración umbral antes de que se establezca una respuesta de las proteínas de estrés, la activación de la respuesta de las proteínas de estrés permanecerá limitada a las células de los folículos pilosos y, posiblemente, de la piel y ocurrirá en un grado significativo en las células sanguíneas u otros órganos. Por lo tanto, el inductor químico nunca alcanzará más que una concentración sistémica desdeñable, concentración que es demasiado baja para afectar la eficacia del tratamiento con quimioterapia de tumores no residentes en folículos pilosos o, si es tópicamente administrado, el inductor químico no es específicamente dirigido a los folículos pilosos en la piel expuesta al inductor. Debido a que los regímenes de quimioterapia frecuentemente implican diferentes ciclos de administración de fármacos quimioterapéuticos con un intervalo de días o semanas, la administración de inductor químico también puede ser periódica, precediendo cada ciclo de administración de fármacos quimioterapéuticos. Aunque sea administrado reiteradamente, con este tipo de régimen de administración el inductor químico será eliminado durante cada ciclo de tratamiento y nunca se acumulará a niveles suficientes para la activación sistémica de la respuesta de las proteínas de estrés. Así, la presente invención implica la administración tópica de una cantidad eficaz de un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés al cuero cabelludo de un paciente con cáncer o la piel de un animal suficientemente antes de la administración de un agente quimioterapéutico para tratar un cáncer no residente en las células expuestas al inductor para activar selectivamente una respuesta de las proteínas de estrés protectora en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal. Un inductor químico también puede ser tópicamente administrado en cualquier otra región del cuerpo humano susceptible de padecer alopecia inducida por quimioterapia, tal como por ejemplo regiones de las cejas, barba y bigote. Además, también se espera que los métodos y composiciones de la invención sean asimismo efectivos para la protección contra la alopecia provocada por tratamiento con radiación. Así, la invención también incluye cualquiera de las formas de realización descritas para la protección de un paciente humano o animal de alopecia inducida por radiación. Tal y como se utiliza aquí, una “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad de un inductor químico (o composición comprendiendo un inductor) que provoque la respuesta biológica de los folículos pilosos de un paciente humano o animal o la respuesta médica de un paciente humano o animal considerada por un investigador o médico. El término “cantidad efectiva” comprende cualquier cantidad que, comparado con un tejido conteniendo folículos pilosos correspondiente o sujeto humano o animal que no haya recibido tal cantidad, dé como resultado una mayor resistencia de los folículos pilosos de ser matados por los agentes quimioterapéuticos o un mejor tratamiento, prevención, o reducción de la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia.

Alternativamente, se puede dirigir un inductor físico de la respuesta de las proteínas de estrés tal como calor transitorio directamente al cuero cabelludo de un paciente con cáncer o la piel de un animal de manera que alcance las células mitóticamente activas de los folículos pilosos pero no penetre mucho debajo de la piel. Los niveles de proteínas de estrés en células foliculares pilosas expuestas al inductor y otras células de la piel aumentan, y, en unas horas, los folículos pilosos estarán protegidos de la exposición posterior a agentes quimioterapéuticos citotóxicos durante un periodo de normalmente de 1-2 días. Debido a la administración dirigida del inductor físico, los niveles de proteínas de estrés no aumentarán en otras células distintas de las células de la piel, y la eficacia del tratamiento con quimioterapia de tumores no residentes en folículos pilosos u otros lugares en la piel no será disminuida. Como los regímenes de quimioterapia frecuentemente implican diferentes ciclos de administración de fármacos quimioterapéuticos separados por días o semanas, la administración de inductor físico también puede ser periódica, precediendo cada ciclo de administración de fármacos quimioterapéuticos. Así, la presente invención también implica la administración prevista de una dosis efectiva de un inductor físico de la respuesta de las proteínas de estrés al cuero cabelludo de un paciente con cáncer o la piel de un animal suficientemente antes de la administración de un agente quimioterapéutico para tratar un cáncer no residente en células expuestas al inductor para activar selectivamente una respuesta de las proteínas de estrés protectora en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal. Un inductor físico también puede ser dirigido a cualquier otra región del cuerpo humano susceptible de padecer alopecia inducida por quimioterapia, tal como por ejemplo las regiones de las cejas, barba y bigote. Además, se espera que esta forma de realización de los métodos de la invención sea también eficaz para la protección contra la alopecia provocada por tratamiento con radiación. Así, la invención también incluye cualquiera de las formas de realización descritas para la protección de un paciente humano o animal de alopecia inducida por radiación. Tal y como se utiliza aquí, una “dosis efectiva” se refiere a una dosis de un inductor físico que provoque la respuesta biológica de los folículos pilosos de un paciente humano o animal o la respuesta médica de un paciente humano o animal considerada por un investigador o médico. El término “dosis efectiva” comprende cualquier dosis que, comparado con un tejido conteniendo folículos pilosos correspondiente o sujeto humano o animal que no haya recibido tal dosis, dé como resultado una mayor resistencia de los folículos pilosos de ser matados por los agentes quimioterapéuticos o un mejor tratamiento, prevención, o reducción de la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia.

Inductores

Como se analizó antes, los inductores de la respuesta de las proteínas de estrés incluyen inductores físicos tales como calor, radiación de UV, campo electromagnético e inductores químicos tales como iones de metales pesados, p. ej., iones de Cd, Zn, Sn o de Cu, otros compuestos reactivos con sulfhidrilo, p. ej., arsenito de sodio (una sal arsénica), inhibidores del metabolismo de energía, en particular inhibidores de la función mitocondrial, análogos de aminoácidos, p. ej., canavanina o carboxilato de azetidina, desnaturizantes de proteínas, p. ej., etanol e hidrócloruro de guanidinio, agentes oxidantes, p. ej., diamida, y otros agentes, p. ej., tóxicos que forman aductos de proteína

tales como el acetaminofén. Los inductores también incluyen inhibidores de proteólisis tales como lactacistina y compuestos que interfieren en la función apropiada de una Hsp. Ejemplos del último tipo de compuesto incluyen ansamicinas de benzoquinona tales como geldanamicina y herbimicina A que se sabe que enlazan específicamente la Hsp90 en su sitio de enlace de nucleótido. Para consultar una lista de inductores típicos ver Zou *et al.* 1998. Cell Stress & Chaperones 3: 130-141. La lista mencionada arriba no es exhaustiva. Se sabe de muchos otros productos químicos que son también inductores de la respuesta de las proteínas de estrés. Algunos de estos productos químicos incluyendo biclomol, ciclopentenonas y ciertas prostaglandinas no parece corresponder a ninguno de los grupos ya citados. Además, hay pocas dudas de que se descubran nuevos inductores químicos en el futuro, porque, generalmente, cualquier compuesto que tenga algún grado de proteotoxicidad inducirá la respuesta de las proteínas de estrés. Puede o puede que no se deduzca fácilmente si un compuesto particular es proteotóxico a partir de su estructura. Parece en consecuencia más apropiado definir los inductores químicos funcionalmente mejor que estructuralmente. Para los objetivos de esta invención un inductor es un compuesto que es capaz de aumentar la expresión de Hsp en una concentración subletal o es una condición subletal física que estimula la expresión de Hsp. Hay muchos métodos para descubrir si un compuesto/condición física es un inductor o no. Por ejemplo, se pueden exponer cultivos de células de mamífero paralelos a un rango de concentraciones subletales de una sustancia que deba evaluarse en presencia de un aminoácido radiomarcado. Después de un periodo de exposición apropiado, las células son cosechadas y lisadas, y los lisatos de las células son sometidos a SDS-PAGE y autorradiografía o fluorografía. Si la sustancia evaluada es un inductor químico, aumentará el nivel de síntesis de polipéptidos con pesos moleculares típicos para las hsps (p. ej.; 90, 70, 25-27 kDa). En una versión más rigurosa de la misma prueba se inmunoprecipita una Hsp particular de los lisatos de las células usando un anticuerpo anti-Hsp y se estima el nivel relativo de síntesis de la Hsp con SDS-PAGE y autorradiografía o fluorografía de la proteína inmunoprecipitada. Los anticuerpos anti-Hsp están comercialmente disponibles, por ejemplo, en StressGen Biotechnologies Corp de Victoria, B.C.

Obsérvese que no solo los compuestos de moléculas pequeñas tales como aquellos expuestos antes son inductores químicos de la respuesta de las proteínas de estrés. Los inductores químicos también incluyen moléculas más grandes tales como proteínas y ácidos nucleicos. Ejemplos no limitadores de tales inductores químicos son genes funcionales que codifican un HSF1 constitutivamente activo al igual que proteínas de HSF1 constitutivamente activo. Su transmisión a las células induce la expresión de la proteína de estrés que puede ser detectada por la prueba descrita antes. También se incluyen los genes para las proteínas de estrés individuales tales como Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína y las proteínas codificadas por estos genes. Su transmisión a las células reproducirán parcialmente la respuesta de las proteínas de estrés, es decir, provocan un mayor nivel de una proteína de estrés particular que puede ser detectado por la prueba indicada arriba.

Las formas de realización de la presente invención implican la administración tópica de una composición que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés al cuero cabelludo de un paciente con cáncer o la piel de un animal mamífero. Gracias a este modo de administración, la concentración sistémica de inductor químico permanece baja. Consecuentemente, hay un riesgo relativamente pequeño de toxicidad sistémica u organoespecífica provocada por un inductor químico. En consecuencia resultaría evidente que esencialmente cualquier inductor químico puede ser usado en las composiciones de la invención. No obstante, los más preferidos serán los inductores químicos que ya han sido probados o usados en seres humanos tales como, por ejemplo, sales de estaño, sales de zinc y sales arsénicas, o inductores químicos que están a punto de ser probados en seres humanos tales como, por ejemplo, una ansamicina de benzoquinona. También se prefieren los inductores químicos con reactividad química bien conocida tales como diamida así como inductores químicos que se espera que sean activadores altamente específicos de la respuesta de las proteínas de estrés tales como una forma activada de HSF1 transmitido como ácido nucleico o proteína.

Formulaciones que comprenden un inductor químico y aplicación

Dependiendo de sus propiedades químicas (p. ej., lipofilia, tamaño molecular), un inductor químico puede ser tópicamente administrado en un solvente tal como el etanol, propilenoglicol o glicerol. Schilli *et al.* 1998. J. Invest. Dermatol. 111: 598-604. Tata *et al.* 1994. J. PharmSci. 83: 1508-1510. Sredni *et al.* 1996. Int. J. Cancer 65: 97-103. Más normalmente, un inductor químico será administrado en una formulación que también incluya uno o más potenciadores de penetración (o promotores). La aplicación dérmica e intrafolicular son campos altamente activos de investigación académica e industrial, y un experto en la materia conocerá los métodos apropiados para transmitir un inductor químico particular. El término "potenciador de penetración (o promotor)" se usa aquí en su sentido más amplio para incluir cualquier método físico o cualquier composición química que aumente la permeabilidad de la piel comprometiendo temporalmente la integridad y propiedades fisicoquímicas de la piel o que de como resultado un direccionamiento selectivo a los folículos pilosos. También significa que incluye vehículos de transmisión tales como liposomas, incluyendo liposomas deformables y ultradeformables, al igual que métodos eléctricos activos tales como iontoforesis, vibración ultrasónica y electroporación. También incluye la preparación de derivados lipofílicos de moléculas para ser transmitidos. Por ejemplo, se utilizó el pelado con bandas para potenciar la permeabilidad de la piel, particularmente para las macromoléculas. Yang *et al.* 1995. Br. J. Dermatol. 133: 679-685. Un cepillado repetido de la piel permitió la transmisión eficaz incluso de ADN desnudo en los estratos externos de la epidermis y folículos pilosos. Yu *et al.* 1999. J. Invest. Dermatol. 112: 370-375. Potenciadores de penetración químicos bien conocidos son Azone, Degamma E, o sulfóxido de N-decilmtilo. Hoogstraate *et al.* 1991. Int.-J. Farm 76: 37-47. Bodde *et al.* 1989. Biochem-Soc. Trans. 17: 943-945. Choi *et al.* 1990. Farm. Res. 7: 1099-1106. Ver también Marjukka Suhonen *et al.* 1999. J. Liberación controlada 59: 149-161. Ejemplos recientes de potenciadores de permeación químicos son ésteres de N-acetilprolinato, polietilenoglicol-8-glicerilcaprilato/caprato, SEPA e hidrogeles tales como hidrogeles de deoxicolato. Tenjarla *et al.* 1999. Int. J. farm. 192: 147-158. Tran. 1999. J. Surg. Res. 83: 136-140. Diani *et al.*

1995. *Skin Pharmacol.* 8: 221-228. Valenta *et al.* 1999. *Int. J. Pharm.* 185: 103-111. La derivatización lipofílica de moléculas para ser transmitidas ha tenido éxito, por ejemplo, en el caso de IFNalfa. Los derivados de acilo (longitud de cadena 12-16) mostraron una mayor absorción cutánea y percutánea que la molécula no derivatizada. Foldvari *et al.* 1999. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 129-137. La iontoforesis es un método basado en la estimulación eléctrica de la permeabilidad de la piel para las moléculas principalmente ionizadas. Se ha usado con éxito para transmitir a la piel pequeñas moléculas y pequeños polipéptidos. Guy. 1998. *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 371-374. Uno de los últimos métodos eléctricos es la electroporación que se ha usado para transmitir compuestos hidrofílicos a la piel. Banga y Prausnitz. 1998. *Trends Biotechnol.* 16: 408-412. También se dispone de métodos para transmitir ácidos nucleicos a folículos pilosos. WO 00/24895 y WO 98/46208.

El uso de tecnologías de encapsulación para la transmisión a la piel y, específicamente, transmisión intrafolicular de moléculas activas se ha convertido en el procedimiento preferido en los últimos años. Un estudio de Fresta y Puglisi sugirió que los liposomas unilamelares a base de lípido de estrato córneo pueden ser dispositivos adecuados para la transmisión dérmica de fármacos. Fresta y Puglisi. 1996. *J. Drug Target* 4: 95-101. De gran interés es el desarrollo último de liposomas ultradeformables que han sido usados para transmitir una variedad de moléculas grandes y pequeñas a la piel. Por ejemplo, vesículas conteniendo fosfatidicolina mezclada con surfactantes tales como colato de sodio, Span 80 y Tween 80 fueron usados con éxito para la transmisión de la hormona estradiol. El Maghraby *et al.* 2000. *Int. J. Pharm.* 196: 63-74. Cevc. 1996. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13: 257-388. Particularmente pertinente son los descubrimientos de que las formulaciones a base de lípidos catiónicos pueden transmitir moléculas grandes y pequeñas incluyendo oligonucleótidos a los folículos pilosos. Esta transmisión puede tener una especificidad exquisita puesto que se desarrolla a través de la unión de la envoltura de la raíz interna y externa. Lieb *et al.* 1997. *J. Pharm. Sci.* 86: 1022-1029. Hoffman mostró que los liposomas a base de fosfatidicolina pueden dirigir tintes, melaninas, genes y proteínas selectivamente a los folículos pilosos. Hoffman. 1998. *J. Drug Target* 5: 67-74. Los genes transmitidos son activos en el folículo, haciendo el folículo un objetivo para la terapia genética selectiva. Li y Hoffman. 1995. *Nat. Med.* 1: 705-706. Hoffman. 2000. *Nat. Biotechnol.* 18: 20-21.

Dosificación y administración del inductor químico

En la práctica de la presente invención, una composición que comprende un inductor químico es aplicada al cuero cabelludo de un paciente o la piel de un mamífero no humano antes de la exposición del paciente o el mamífero a un agente quimioterapéutico citotóxico. Para proteger las células foliculares pilosas de ser matadas por el agente quimioterapéutico, el inductor químico debe alcanzar una concentración en los folículos pilosos que sea suficientemente alta para activar la respuesta de las proteínas de estrés en las células foliculares, lo que produce un aumento objetivamente mensurable de la concentración de al menos una proteína de estrés seleccionada del grupo consistente en Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína. Más preferiblemente, los niveles de varias o todas estas proteínas de estrés son elevados. Un aumento de aproximadamente el 25% en la concentración de una proteína de estrés es fácilmente detectable por análisis de transferencia western usando un anticuerpo contra la proteína de estrés. Aunque los rangos de concentraciones que causan una respuesta de las proteínas de estrés detectables en cultivos de células de mamífero son conocidos para muchos inductores químicos (ven, por ejemplo, Zou *et al.* 1998. *Cell Stress & Chaperones* 3: 130-141, incorporada aquí como referencia) y pueden servir de orientación inicial para estudios para descubrir las dosis, las concentraciones requeridas en las composiciones para la administración tópica al cuero cabelludo de un paciente (o piel de otro mamífero) son preferiblemente determinadas empíricamente para cada composición. Se apreciará que la concentración de inductor alcanzada en los folículos pilosos depende de las propiedades químicas del inductor y de la eficacia del potenciador de penetración elegido, y puede ser determinada para cada inductor químico y potenciador de penetración por el experto en la materia como se ha descrito también aquí o por cualquier otro método conocido en la técnica. Se pueden realizar estudios estándares para encontrar la dosis clínica para predecir cuánto se necesita aumentar los niveles de proteínas de estrés en los folículos pilosos para la protección máxima de las células contra varios fármacos quimioterapéuticos. El parámetro clínico más relevante que se debe medir es la densidad de pelo antes y después de la quimioterapia. Estas mediciones pueden ser cuantitativas (conteo de pelos en un área de piel de tamaño definido) o semicuantitativo (estimando grados de alopecia). De forma alternativa o adicional, se pueden tomar biopsias de piel y analizar la densidad y/o morfología de los folículos pilosos. Como un criterio de evaluación imperfecto sustituto (ver arriba) la activación de la respuesta de las proteínas de estrés en células foliculares pilosas antes de la administración de un fármaco quimioterapéutico puede ser estimada en biopsias de cuero cabelludo por métodos inmunocitoquímicos (Hashizume *et al.* 1997. *Int. J. Dermatol.* 36: 587-592. Yu *et al.* 1999. *J. Invest. Dermatol.* 112: 370-375) o transferencia western usando un anticuerpo de proteína de estrés.

El momento en el que una composición que comprende un inductor es mejor administrada al cuero cabelludo de un paciente (o piel de otro mamífero) con respecto al tiempo de iniciación de un ciclo de tratamiento con quimioterapia también puede ser determinado empíricamente según protocolos estándares. La cinética de la transmisión del inductor químico a los folículos pilosos variará con la naturaleza del inductor y potenciador de penetración elegido. En un cultivo celular, la exposición a una concentración suficiente de un inductor químico genera una activación rápida de la respuesta de las proteínas de estrés, y se alcanzan niveles citoprotectores de las proteínas de estrés en el plazo de aproximadamente 2-12 horas. Como la piel representa una barrera significativa para la transmisión de moléculas, la consecución de niveles citoprotectores de proteínas de estrés en folículos pilosos puede ser retardada hasta unas 24 horas, dependiendo de la naturaleza del inductor químico y el potenciador de penetración elegido. Así, una composición que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés puede ser administrada entre aproximadamente 2 y 36 horas antes de la administración de un agente quimioterapéutico. Preferiblemente, una composición que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés será administrada entre aproximadamen-

te 8 y 24 horas antes de la quimioterapia. Una vez alcanzados los niveles citoprotectores de proteínas de estrés en las células de los folículos pilosos, los folículos pilosos retendrán una mayor resistencia a los agentes quimioterapéuticos durante normalmente 1-2 días. Con esta orientación, un experto en la materia puede definir empíricamente con sólo experimentación rutinaria una dosificación apropiada y un régimen apropiado de administración de una composición particular que comprende un inductor químico que proporcione protección eficaz a los folículos pilosos contra los agentes quimioterapéuticos.

Dosificación y administración del inductor físico

En otro aspecto de la práctica de la presente invención, el cuero cabelludo de un paciente o la piel de un mamífero no humano es expuesto a un inductor físico de la respuesta de las proteínas de estrés antes de la exposición del paciente o el mamífero a un agente quimioterapéutico citotóxico. Para proteger las células foliculares pilosas de ser matadas por el agente quimioterapéutico, la dosis de inductor físico administrado debe ser suficientemente alta para activar la respuesta de las proteínas de estrés en las células foliculares, lo que genera un aumento objetivamente mensurable de la concentración de al menos una proteína de estrés seleccionada del grupo consistente en Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína. Más preferiblemente, los niveles de varias o todas estas proteínas de estrés son elevados. Un aumento de aproximadamente el 25% en la concentración de una proteína de estrés es fácilmente detectable por análisis de transferencia western usando un anticuerpo contra la proteína de estrés. Un inductor físico preferido es el calor. El calor puede ser transmitido o producido en un tejido objetivo por medios diferentes incluyendo contacto directo con una superficie calentada o un líquido calentado, ultrasonidos, radiación infrarroja, o radiación de microondas o radiofrecuencias. Para la práctica de la invención, los medios preferidos para transmitir calor al cuero cabelludo de un paciente o la piel de un mamífero implica el contacto directo con un líquido calentado tal como el agua. En un ejemplo no limitador, un paciente es provisto de un dispositivo que se asemeja a un gorro de ducha que cubre el cuero cabelludo del paciente. El gorro se extiende ligeramente más allá del nacimiento del pelo del paciente y forma un sello estanco con la piel inmediatamente contigua al nacimiento del pelo. El interior del gorro contiene un volumen apropiado de agua u otra solución acuosa fisiológica en correspondencia con un baño de agua de temperatura controlada mediante un conducto de entrada y salida apropiado, válvulas, tubos de conexión y una bomba de agua. El rango de dosis de calor que causa una respuesta de las proteínas de estrés detectable en cultivos de células de mamíferos es conocido y pueden servir de guía inicial para estudios para encontrar las dosis. El rango típico de temperaturas elevadas se extiende desde aproximadamente 39°C hasta aproximadamente 45°C, y la duración típica de las exposiciones a temperatura elevada es entre aproximadamente 2 horas y 15 min. Las dosis de calor apropiadas para ser aplicadas al cuero cabelludo de un paciente (o piel de otro mamífero) son preferiblemente determinadas empíricamente. Se pueden realizar estudios estándares para encontrar las dosis clínicas para predecir cuánto se deben aumentar los niveles de proteínas de estrés en los folículos pilosos para la protección máxima de las células contra varios fármacos quimioterapéuticos. El parámetro clínico más relevante que se debe medir es la densidad de pelo antes y después de la quimioterapia. Estas mediciones pueden ser cuantitativas (conteo de pelos en un área de piel de tamaño definido) o semicuantitativo (estimando grados de alopecia). De forma alternativa o adicional se pueden tomar biopsias de piel y analizar la densidad y/o morfología de los folículos pilosos. Como un criterio de evaluación imperfecto sustituto (ver arriba) se puede estimar la activación de la respuesta de las proteínas de estrés en células foliculares pilosas antes de la administración de un fármaco quimioterapéutico en biopsias de cuero cabelludo por métodos inmunocitoquímicos (Hashizume *et al.* 1997. *Int. J. Dermatol* 36: 587-592. Yu *et al.* 1999. *J. Invest. Dermatol.* 112: 370-375) o transferencia western usando un anticuerpo de proteína de estrés.

El momento en el que una dosis de calor apropiado es mejor administrada al cuero cabelludo de un paciente (o piel de otro mamífero) con respecto al tiempo de iniciación de un ciclo de tratamiento con quimioterapia también puede ser determinado empíricamente según protocolos estándares. En cultivo celular, la exposición a una dosis de calor apropiada genera una activación rápida de la respuesta de las proteínas de estrés y se alcanzan niveles citoprotectores de las proteínas de estrés en el plazo de varias horas. Como la piel puede representar una barrera significativa a la transmisión de calor, y la exportación de calor a través de la circulación puede retardar el proceso de calentamiento, la consecución de niveles citoprotectores de proteínas de estrés en folículos pilosos puede ser retardada en varias horas. Así, una dosis de calor apropiado puede ser administrada entre aproximadamente 2 y 24 horas antes de la administración de un agente quimioterapéutico. Preferiblemente, la dosis de calor será administrada entre aproximadamente 6 y 12 horas antes de la quimioterapia. Los últimos retrasos de tiempo se refieren a la iniciación del tratamiento con quimioterapia después de empezar el calentamiento. Una vez alcanzados los niveles citoprotectores de las proteínas de estrés en las células de los folículos pilosos, los folículos pilosos retendrán una mayor resistencia a los agentes quimioterapéuticos durante normalmente 1-2 días. Con esta orientación, un experto en la materia podrá definir empíricamente con sólo experimentación rutinaria una dosis de calor apropiado y un régimen apropiado de administración de la dosis de calor que proporcionen una protección eficaz de los folículos pilosos contra los agentes quimioterapéuticos.

Modelos animales de alopecia inducida por quimioterapia

Aunque son sustitutos imperfectos del paciente humano, se pueden utilizar modelos animales de alopecia para evaluar los inductores y métodos de protección. El crecimiento del pelo humano parece diferir de aquel de muchos animales en que en los seres humanos el 90% de los folículos están en la fase anágena, mientras que en los animales adultos, tales como los roedores, este porcentaje es drásticamente inferior. Dos modelos de animal que se aproximan, respecto a la fase de crecimiento, a la situación humana son las ratas recién nacidas (de 8 días) (Hussein *et al.* 1990. *Science* 249: 1564-1566) y ratones C57/BL/6 después de la depilación de una parte del pelaje. Paus *et al.* 1990. *Br. J. Dermatol.* 122: 777-784. Paus *et al.* 1994. *Am J. Patol.* 144: 719-734. En el primer modelo, se aprovecha la ventaja

de la fase activa de crecimiento de pelo en las ratas recién nacidas, y en el segundo modelo, el rebrote de pelo es sincronizado por depilación. En el modelo de ratón, los folículos pilosos en reposo (telógenos) en la piel depilada de ratones hembra C57BU6 de 6-8 semanas son inducidos a entrar en el crecimiento de pelo activo (anágeno). Esto se consigue pintando toda la espalda o una parte deseada del pelaje de los animales anestesiados (30 mg/kg pentobarbital) con una cera y mezcla de resina, mezcla de la que se tira tras su endurecimiento. Paus *et al.* 1990. Br. J. Dermatol. 122: 777-784. Schilli *et al.* 1998. J. Invest. Dermatol. 111: 598-604. Las composiciones farmacológicas normalmente son administradas tópicamente aproximadamente 5 días después de la depilación, momento en el cual todos los folículos pilosos están en el ciclo anágeno III-IV del pelo. Por lo tanto, una formulación conteniendo un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés o una dosis de un inductor físico tal como calor será administrado en el último punto de tiempo. Los dos modelos fueron usados extensivamente en estudios de alopecia inducida por fármacos quimioterapéuticos, incluyendo la adriamicina y ciclofosfamida. Balsari *et al.* 1994. PASEB J. 8: 226-230. Schilli *et al.* 1998. J. Invest. Dermatol. 111: 598-604. Jimenez y Yunis. 1992. Cancer Res. 52: 413-415. Los modelos animales pueden ser usados para experimentos de prueba de principio, para la evaluación de potenciadores de penetración potenciales en lo que se refiere a su capacidad de mejorar la transmisión de un inductor químico a los folículos pilosos, para la estimación de la toxicidad local de un inductor químico, para la demostración de que la transmisión localizada de un inductor químico o exposición local a un inductor físico no supone una concentración elevada sistémica del inductor químico, en activación generalizada de la respuesta de proteína de estrés por el inductor físico o químico, etc. La invención así también comprende métodos para identificar agentes (es decir, inductores químicos o combinaciones de inductores químicos y potenciadores de penetración) para usarlo en la protección de un humano o animal contra la alopecia inducida por quimioterapia comprendiendo (a) administrar un agente de prueba para un modelo animal con alopecia inducida por quimioterapia, y (b) determinar si dicho agente es capaz de inducir la respuesta de las proteínas de estrés en dicho modelo animal. También se incluyen métodos para identificar agentes para usarlos en la protección de un humano o animal contra la alopecia inducida por quimioterapia comprendiendo (a) seleccionar un agente capaz de inducir la respuesta de las proteínas de estrés, y (b) administrar dicho agente de prueba a un modelo animal de alopecia inducida por quimioterapia y determinar si dicho agente protege contra la alopecia inducida por quimioterapia.

Para ilustrar mejor la invención, en las siguientes secciones se describen unos ejemplos no limitadores de experimentos usando los modelos animales mencionados arriba de alopecia.

Se necesitará mostrar un tratamiento farmacológico o tratamiento físico elegido (p. ej., tratamiento térmico) para inducir la respuesta de las proteínas de estrés en una mayoría de células pertinentes de folículos pilosos. Además, será importante para la optimización de un régimen de tratamiento poder valorar la magnitud relativa y duración de la respuesta de las proteínas de estrés inducida en folículos pilosos. Para ello se utilizará un ensayo inmunohistoquímico que estime los niveles de piel con la forma más inducible de estrés de las Hsp70 en células de folículos pilosos y otras células. Hay al menos dos razones válidas para elegir las Hsp70 inducibles como un indicador preferido de la respuesta de las proteínas de estrés. Primero, la Hsp70 es una de las hsps más abundantes y se demostró que era en sí misma citoprotectora. Liu *et al.* 1992. Cancer Res. 52: 3667-3673. Li *et al.* 1995. Exp. Cell Res. 217: 460-468. Segundo, de los resultados de estudios precedentes usando líneas celulares y tejidos de animal resulta evidente que la expresión de la principal forma de Hsp70 es estrictamente regulada en roedores. Welch *et al.* 1983. J. Biol. Chem. 258: 7102-7111. En ausencia de estrés, su nivel es de muy bajo a ausente en todas las líneas celulares y la mayoría de los tejidos. Durante y después del estrés, la proteína se acumula rápidamente en un nivel espectacularmente elevado. Un estudio de Hashizume *et al.* (Hashizume *et al.* 1997. Int. J. Dermatol. 36, 587-592) examinó los niveles de Hsp70 inducible en el ratón C57/BL/6 y encontró que la expresión de Hsp70 inducible en los folículos pilosos anágenos es baja. Sólo durante la transformación anágena-catágena aumentó significativamente el nivel de Hsp70 inducible. Un anticuerpo monoclonal que específicamente detecta la Hsp70 inducible en células de roedor cultivadas y en secciones de tejido recientes y fijas se encuentra comercialmente disponible “<C92”, StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, BC (cat.#: SPA-810)).

Los experimentos para validar el ensayo inmunohistoquímico requieren que la expresión de la Hsp70 sea inducida, puesto que, como se analizó antes, esta proteína está normalmente ausente o sólo presente a un nivel muy bajo. Se pueden usar dos métodos diferentes para la inducción de la Hsp70. El primero implica exponer a los animales a una hipertermia de todo el cuerpo (por inmersión en un baño de agua). Aunque la temperatura y duración óptima de la exposición de calor deben ser determinadas experimentalmente, experimentos con cultivos celulares anteriores proporcionan una orientación inicial suficiente para al menos conseguir, sin experimentación adicional, un nivel de inducción de Hsp70 que es detectable inmunohistoquímicamente. El segundo método se basa en observaciones precedentes de Li y Hoffman. Li y Hoffman. 1995. Nat. Med. 1: 705-706. Estos investigadores descubrieron que los liposomas conteniendo un gen β -galactosidasa controlado por un promotor CMV transmitían eficaz y selectivamente el gen β -galactosidasa a células mitóticamente activas (células matriciales y presuntas células del tallo del folículo) de folículos pilosos anágenos de ratón, donde el gen fue activamente expresado. Se puede utilizar el mismo protocolo para introducir en células foliculares un constructo de expresión para un HSF1 humano activado (HSF1d202-316 mutante, llamado de ahora en adelante HSF1(+)). Se sabe que el HSF1(+) intensifica prominentemente la expresión de Hsp70 inducible en tipos de célula diferentes. Xia *et al.* 1999. Cell Stress & Chaperones 4: 8-18.

Para los experimentos de validación de ensayo, se expusieron ratas recién nacidas y ratones adultos después de la depilación de una parte de su pelaje a una hipertermia moderadamente severa de todo el cuerpo. De forma alternativa o adicional, se administraron liposomas conteniendo un gen hsf1(+) conducido por un promotor CMV o, como un control, un gen de β -galactosidasa a áreas en los lomos de ratas recién nacidas o áreas depiladas de ratones adultos.

Después de un tiempo apropiado (6-48 h después de la exposición al calor, o 1, 3 o 5 días después de la transducción), los animales tratados y no tratados son sacrificados, y se toman muestras de piel. Estas muestras pueden ser procesadas usando un protocolo de inmunohistoquímica estándar. Para proporcionar un protocolo ejemplar, las muestras de piel pueden ser introducidas en O.T.C. (Miles) y rápidamente congeladas. Yu *et al.* 1999 J. Invest. Dermatol. 112: 370-375. Las muestras congeladas pueden ser seccionadas en un criostato (5 urn) y recogidas en placas limpias cargadas. Después de secarlas al aire y fijarlas en acetona, la placa puede ser lavada, bloqueada y expuesta al anticuerpo C92 de Hsp70. El anticuerpo C92 se puede detectar en las muestras con un anticuerpo apropiado marcado con una enzima secundario. De forma alternativa, si fuera necesario para tener un mayor antecedente, se puede usar un anticuerpo C92 marcado con biotina (comercialmente disponible) para eliminar la necesidad de usar un anticuerpo secundario.

Se observa que la hibridación de un ácido nucleico específico podría ser usada como un ensayo alternativo de aumento de la expresión del gen Hsp70 en el caso improbable de que el enlace de los anticuerpos resulte fallido. Los genes Hsp70 de rata y ratón fueron clonados (Perry *et al.* 1994. Gene 146: 273-278. Longo *et al.* 1993. J. Neurosci. 36: 325-335), y en consecuencia se podrían preparar fácilmente sondas de hibridación.

Como también se analizó antes, durante los últimos diez años se hizo evidente que se puede conseguir la transmisión preferida y eficaz de sustancias farmacológicas de peso molecular pequeño al igual que moléculas grandes tales como ácidos nucleicos y proteínas a células mitóticamente activas de folículos pilosos por administración tópica de formulaciones a base de lípidos y liposomas conteniendo la sustancia activa de interés. Balsari *et al.* 1994. FASEB J. 8: 226-230. Li y Hoffman. 1995. Nat Med. 1: 705-706. Lieb *et al.* 1992. J. Invest. Dermatol. 99: 108-113. Lieb *et al.* 1997. J. Pharmaceutical Sciences 86: 1022-1029. Li *et al.* 1993. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29A: 192-194. Li *et al.* 1993. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29A: 258-260. Li y Hoffman. 1995. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31A: 11-13. Hoffman. 1997. J. Drug Targeting 5: 67-74. Foldvari *et al.* 1999. Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 129-137. Para los liposomas se demostró además que sólo hay una liberación desdeñable de sustancia farmacéutica en la circulación. Balsari *et al.* 1994. PASEB J. 8: 226-230. Li y Hoffman 1997. J. Derm. Sci. 14: 101-108. En los presentes experimentos ejemplares las formulaciones liposomales como describe el grupo Hoffman (Hoffman. 1997. J. Drug Targeting 5: 67-74) se utilizan para transmitir sustancias farmacéuticas a células foliculares pilosas (inductores químicos) que inducen la respuesta de las proteínas de estrés. Los liposomas de Hoffman para moléculas pequeñas y proteínas eran a base de fosfatidicolina, y aquellas para ácidos nucleicos contenían bien fosfatidicolina sola o fosfatidicolina: colesterol: fosfatidiletanolamina en una proporción de 5: 3: 2.

En los experimentos ejemplares se prueban dos tipos de inductores químicos de la respuesta de las proteínas de estrés (individualmente), arsenito de sodio compuesto de moléculas pequeñas y HSF1(+). El HSF1(+) puede ser transmitido como un HSF1(+) de codificación de ácido nucleico o como una proteína recombinante. El ácido nucleico puede ser un vector plásmido conteniendo un gen HSF1(+) bajo el control de un promotor (CMV) citomegalovirus constitutivamente activo. En una preparación terapéutica será deseable que la respuesta de las proteínas de estrés sea sólo inducida transitoriamente. Aunque el gen HSF1(+) con terminal plásmido será inactivado con tiempo, esta inactivación puede ser considerada demasiado lenta. Una alternativa sería usar un vector de expresión diferente (eucariótico) que permita la expresión regulada del gen HSF1(+). Se conocen interruptores de genes que son activados/reprimidos por presuntas sustancias inocuas de pequeño peso molecular (p. ej., tetraciclina, RU486, etc.) y se encuentran fácilmente disponibles. Gossen *et al.* 1996. Science 268: 1766-1769. Gossen y Bujard. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 89: 5547-5551. Wang *et al.* 1997. Nat. Biotechnol. 15: 239. Wang *et al.* 1997. Terapia genética 4: 432-441. El último resultado no surge si el HSF1(+) es transmitido como una proteína recombinante. Cuando un HSF1 humano de tipo salvaje y un HSF1(+) fueron expresados de constructos similares en células mamíferas, el HSF1 de tipo salvaje se acumuló a un nivel significativamente más alto que el HSF1(+) (datos inéditos), sugiriendo que la proteína mutante (es decir, HSF1(+)) es considerablemente menos estable que la proteína de tipo salvaje. Experimentos posteriores estimaron que la vida media de HSF1(+) era de 6-8 horas. Así, la introducción en células de HSF1(+) recombinante sólo puede producir una inducción transitoria de la respuesta de las proteínas de estrés. El HSF1(+) puede ser producido, por ejemplo, como una proteína señalada con un indicador o como una fusión de glutatión transferasa en *E. coli*. Voellmy. 1996. En Respuestas Celulares Inducibles por Estrés, U. Feige, R. I. Morimoto, I. Yahara, y, B. S. Polla, eds. (Basilea: Birkhaeuser Verlag). págs. 121-137. Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W.B., Toft, D.O., Smith, D.F., y Voellmy, R. Datos Inéditos. El HSF1(+) señalado con un indicador HSF1(+) y la proteína de fusión de glutatión-transferasa pueden ser purificados por métodos de cromatografía de afinidad. La fracción de glutatión transferasa puede ser separada durante la purificación, produciendo HSF1(+). Dado que ello no previene la función de HSF1(+) (resultado inédito), la eliminación de la marca del HSF1 señalado con un indicador puede no ser considerada necesaria. Se pueden obtener proteínas recombinantes esencialmente puras. Se observa que debido a la inestabilidad relativa del HSF1(+) será ventajoso usar una cepa de producción que tenga baja actividad proteolítica. Aunque el HSF1(+) puede ser expresado en sistemas de expresión bacteriana, también puede ser expresado en y purificado de sistemas de expresión eucariótica, incluyendo células de insecto infectado por baculovirus.

El arsenito de sodio es disuelto en agua o solución salina tamponada con fosfato a o cerca de la solubilidad máxima. La proteína o ácido nucleico de HSF1(+) es disuelto en la concentración máxima. Estas soluciones y serie de diluciones son luego incorporadas en liposomas como ha descrito Hoffman. Hoffman. 1997. J. Drug Targeting 5: 67-74. Los controles incluyen liposomas vacíos y liposomas conteniendo una proteína o ácido nucleico no relacionado con HSF1(+), respectivamente. Estas preparaciones liposomales son administradas a áreas en el Tomo, costado o abdomen de ratas recién nacidas (de 8 días) o áreas depiladas de ratones adultos (5 días después de la depilación). La administración puede ser una vez o puede ser repetida a intervalos apropiados (p. ej., diariamente). En momentos diferentes (12 horas, 1-10 días) después de la última administración, se sacrificaron los animales. Se tomaron muestras de piel y

se prepararon y analizaron secciones por el ensayo inmunohistoquímico descrito antes al igual que microscópicamente para estimar la densidad y morfología de los folículos pilosos.

Estos experimentos pueden responder varias cuestiones. Se pueden obtener estimaciones para cada inductor químico del las concentraciones mínimas y mejores para inducir la respuesta de las proteínas de estrés al igual que de la concentración máxima en la que el inductor puede ser administrado sin provocar daños en los folículos pilosos (sólo pertinente para el arsenito de sodio). Con respecto a la última información, se puede recordar al lector que la respuesta de las proteínas de estrés es inducida en respuesta a un estrés proteotóxico marginal. Así, en concentraciones excesivas un inductor químico tal como el arsenito de sodio tendrá una citotoxicidad significativa y matará células foliculares pilosas. Por esta razón es crítico determinar rangos de concentraciones en las que el inductor químico active la sobre-expresión de Hsp sin provocar un daño irreversible. Se puede detectar una concentración excesiva de inductor por una respuesta menor de las proteínas de estrés en comparación con la inducida por una concentración inferior al igual que por cambios en la morfología y densidad de los folículos pilosos.

Segundo, los experimentos pueden mostrar si las preparaciones liposomales se dirigen a todas o casi todas las células matrices del folículo piloso (y células del tallo del folículo putativo). Si se descubre que los liposomas preparados conteniendo un inductor según las directrices proporcionadas por Hoffman (Hoffman. 1997. J. Drug Targeting 5: 67-74) se dirigen sólo a una pequeña fracción de células matrices mitóticamente activas y células del tallo putativo, se pueden llevar a cabo experimentos análogos a los anteriormente descritos para probar los liposomas de diferente composición u otros potenciadores de penetración.

Tercero, los experimentos definen, para cada inductor, el curso de tiempo de activación de la respuesta de las proteínas de estrés al igual que su persistencia. Esta información es requerida para el diseño de regímenes efectivos de prevención de alopecia en los modelos animales. Sólo se obtendrá una protección óptima si los fármacos quimioterapéuticos son administrados después de que ocurra la activación de la respuesta de las proteínas de estrés y las concentraciones de Hsp aumenten a niveles apropiadamente elevados. Obsérvese que los datos obtenidos de los experimentos mencionados arriba sólo definen un retraso mínimo entre el tratamiento previo con inductor y tratamiento con fármaco quimioterapéutico, es decir, éstos sólo proporcionan condiciones iniciales para los experimentos descritos abajo. Estos últimos experimentos serán los que definan el nivel de Hsp70 inducible que se correlaciona con la protección óptima contra la alopecia inducida por un agente quimioterapéutico. Los datos sobre la persistencia de la respuesta de las proteínas de estrés permiten una estimación de si es probable que la inducción una vez de la respuesta proporcione protección durante todo el periodo durante el cual está previsto que un agente quimioterapéutico esté presente en una concentración eficaz. Además, proporcionan información sobre si los niveles inducidos de Hsps persisten durante un tiempo suficientemente largo para ser potencialmente protectores en animales sometidos a regímenes que impliquen la administración múltiple de un fármaco quimioterapéutico. Finalmente, revelan si la administración secuencial de varias dosis de liposomas conteniendo un inductor prolonga eficazmente el periodo durante el cual las concentraciones de Hsps son elevadas.

Cuarto, los experimentos también pueden revelar si la administración repetida de liposomas conteniendo un inductor, además de extender la duración de la respuesta de las proteínas de estrés, producen una respuesta más pronunciada y/o aumentan la fracción de las células matrices y células del tallo putativo de folículos pilosos que establecen una respuesta de las proteínas de estrés.

Experimentos modelo para establecer las condiciones para la protección óptima de folículos pilosos contra agentes quimioterapéuticos seleccionados

Los experimentos siguientes pueden establecer las condiciones que generan una protección óptima de los folículos pilosos contra varios agentes quimioterapéuticos en los modelos animales. Aunque los agentes quimioterapéuticos son frecuentemente usados en combinación, los animales sólo serán expuestos a fármacos únicos en estos experimentos. Debido a que se han evitado cuestiones acerca de la importancia relativa de un fármaco individual en una combinación particular, esta simplificación permite una demostración concluyente de que la inducción de la respuesta de las proteínas de estrés protege contra la toxicidad al folículo piloso de un fármaco particular. Los experimentos descritos abajo se concentran en varias sustancias farmacológicas que producen alopecia severa en seres humanos y que están presentes en muchas de las combinaciones terapéuticas comúnmente usadas. Los fármacos quimioterapéuticos seleccionados son ciclofosfamida, adriamicina, taxol, etopósido y vincristina.

En experimentos iniciales, se establecen unas condiciones bajo las cuales inyecciones intraperitoneales individuales de diferentes agentes quimioterapéuticos seleccionados causan alopecia severa (grado 3, caracterizada esencialmente por la falta total de crecimiento/rebote de pelo en la mayoría de los animales; ver abajo). Los estudios anteriores pueden proporcionar una orientación valiosa. Por ejemplo, la inducción de alopecia en ratas recién nacidas por adriamicina y ciclofosfamida fue descrita por Hussein *et al.* (Hussein *et al.* 1990. Science 249: 1564-1566), Jimenez y Yunis (Jimenez y Yunis. 1992. Cancer Res. 52: 5123-5125), Balsari *et al.* (Balsari *et al.* 1994. FASEB J. 8: 226-230) y Jimenez *et al.* (Jimenez *et al.* 1995. Am J. Med. Sci. 310: 43-47), y por etopósido por Davis *et al.* (Davis *et al.* 2001. Science 291: 134-137). La alopecia en el modelo de ratón C57/BL/6 como resultado de la exposición a ciclofosfamida fue estudiada por Paus y colaboradores. Paus *et al.* 1994. Am J. Patol. 144: 719-734. Schilli *et al.* 1998. J. Invest. Dermatol. 111: 598-604. Otros investigadores describieron la alopecia en ratones tras la administración de adriamicina. Malkinson *et al.* 1993. J. Invest. Dermatol. 101: 135S-137S. D'Agostini *et al.* 1998. Int. J. Oncol. 13: 217-224. Para obtener resultados que sean estadísticamente significativos, se usan grupos consistentes en como mínimo diez animales

para cada punto de datos en estos experimentos y en los posteriores. El ensayo principal de alopecia es la evaluación macroscópica realizada independientemente por dos observadores. Se distinguen cuatro grados: grado 0: sin alopecia, grado 1: ligera alopecia definida como menos del 50% de pérdida de pelo, grado 2: alopecia moderadamente severa definida como más del 50% de pérdida de pelo, y grado 3 con alopecia total o prácticamente total (>90%). Hussein *et al.* 1990. *Science* 249: 1564-1566. Sredni *et al.* 1996. *Int. J. Cancer* 65: 97-103. Se puede obtener corroboración de las conclusiones a partir del examen microscópico de secciones de piel, examen que cerciora la densidad y morfología de los folículos pilosos. Obsérvese que al menos en el modelo de ratón, se sabe que una mayor pigmentación y espesor de la piel están correlacionados con una progresión anágena (explicado en Paus *et al.* 1990. *Br. J. Dermatol.* 122: 777-784). Así, en caso necesario, la estimación de pigmentación y espesor de la piel podría servir de ensayos sustitutos de crecimiento de pelo. Estos experimentos iniciales definen, para cada agente quimioterapéutico, la concentración óptima en la que se produce la alopecia prácticamente completa, la ubicación en el cuerpo del animal donde el fenotipo de alopecia es más fácilmente observado (los experimentos serán conducidos con ratones depilados dorsal, lateral y ventralmente), el tiempo después de la administración en la que la expresión del fenotipo es más fácilmente evaluada así como la reproductibilidad de la expresión del fenotipo. Obsérvese que para tener protocolos experimentales lo más simples posible, lo mayormente preferido es una única administración de agentes quimioterapéuticos.

Para valorar y optimizar los efectos protectores de una respuesta de las proteínas de estrés activada contra la alopecia inducida por un agente quimioterapéutico, grupos de al menos diez ratas de 8 días o ratones C57/BL/6 5 días después de la depilación son tratados tópicamente (una vez o reiteradamente como se ha indicado) con preparaciones liposomales conteniendo un inductor elegido (aquí arsenito de sodio y HSF1 (+) de la respuesta de las proteínas de estrés. Tres preparaciones diferentes son evaluadas, la primera conteniendo inductor en la concentración mínima en la que activa un aumento mensurable del nivel de Hsp70 inducible después de 12 o 24 horas (como se estimó en los experimentos antes descritos), y la segunda y tercera conteniendo concentraciones sucesivamente más altas. La administración de un agente quimioterapéutico ocurre bien 12 o 24 horas después de la (última) administración de liposomas conteniendo un inductor o aproximadamente 12 horas o 24 horas más tarde. Una cantidad predeterminada de un agente quimioterapéutico (definida en el párrafo precedente) es inyectada intraperitonealmente en todos los animales tratados con inductor y un grupo de animales tratados con un sustituto (con liposomas vacíos en experimentos usando arsenito de sodio o con liposomas conteniendo una proteína de control o ácido nucleico en experimentos usando proteína o gen HSF1(+)). Otros grupos tratados con inductor y sustituto son inyectados con vehículo sólo. Alternativamente, para valorar y optimizar los efectos protectores de una respuesta de las proteínas de estrés activada contra la alopecia inducida por el inductor físico por calor, grupos de al menos diez ratas de 8 días o ratones C57/BL/6 5 días después de la depilación son tratados tópicamente (una vez o reiteradamente como se ha indicado), sometidos a tratamientos de calor local de diferente intensidad (exposición al calor de 39 a 45°C durante 15 a 120 min) o son dejados sin tratar. El tratamiento térmico local puede ser administrado por varios procedimientos. Un procedimiento simple puede implicar la colocación de un animal anestesiado en una malla de metal endentada fijada a un baño de agua de manera que la parte endentada de la malla y, consecuentemente, la parte del cuerpo de animal que descansa en esta parte endentada estén sumergidos en agua. La administración de un agente quimioterapéutico puede ocurrir bien 12 o 24 horas después de la (última) administración de una dosis de calor. Una cantidad predeterminada de un agente quimioterapéutico (definida en el párrafo precedente) es inyectada intraperitonealmente en todos los grupos de animales.

Los animales son luego devueltos a sus dependencias, y, al mismo tiempo previamente identificados como óptimos para la valoración del fenotipo de alopecia, registrando los grados de alopecia. Los animales son luego sacrificados, y se toman, fijan y seccionan muestras de piel. Las secciones son examinadas microscópicamente para determinar la densidad y morfología de los folículos pilosos. Para confirmar la inducción de las proteínas de estrés se pueden incluir varios animales más a cada grupo. Estos animales son sacrificados en el momento de la administración del agente quimioterapéutico, y se toman y procesan muestras de piel para la estimación inmunohistoquímica del nivel de Hsp70 inducible, es decir, del grado de inducción de la respuesta de las proteínas de estrés conseguido.

Para los experimentos en los que se evalúa la alopecia, se asigna a los animales individuales una puntuación de alopecia que varía de 0 a 3 (ver arriba). Las puntuaciones de alopecia para cada grupo de tratamiento son resumidas calculando la media y la desviación típica de las puntuaciones de alopecia de los animales individuales. Los grupos de tratamiento son comparados por análisis unidireccional de variación (ANOVA). Si se detectan diferencias entre los grupos de tratamiento por ANOVA, se puede utilizar una prueba *post-hoc* (p. ej., Prueba de Scheffe o prueba de Student Newman Keuls) para determinar qué grupos son distintos entre sí. El criterio para la significación estadística es un $p < 0,05$.

Para evitar una posible toxicidad sistémica/orgánica de los inductores químicos así como una degradación de la eficacia terapéutica de los agentes quimioterapéuticos, que se produciría si la respuesta de las proteínas de estrés fueran también inducidas en células de tumores que deben ser tratados, los experimentos descritos anteriormente usaron formulaciones liposomales tópicamente aplicadas para transferir específicamente los inductores químicos de la respuesta de las proteínas de estrés a las células pertinentes de folículos pilosos. Gracias a esta administración tópica, sólo éstas células y no otras células incluyendo las células tumorales a las que se dirige el tratamiento con quimioterapia deberían ser protegidas contra la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos. Basados en los informes anteriormente citados, cabe esperar que la administración tópica de formulaciones liposomales de inductores químicos produzca la transmisión muy localizada de los inductores deseada. Aunque cantidades pequeñas de un inductor químico tal como el arsenito de sodio pueden acabar en la circulación, su concentración será mínima debido a su dilución y, como estará muy por debajo de la concentración umbral requerida, será incapaz de activar la respuesta de las proteínas de estrés

sistémicamente. De forma similar, se espera que la concentración sistémica de HSP1(+) sea exageradamente baja y la activación de la respuesta de las proteínas de estrés en los glóbulos rojos y en los órganos debería ocurrir como mucho en sólo unas pocas células aisladas. Obsérvese que la discusión arriba no recurre a procedimientos de tratamiento donde una respuesta de las proteínas de estrés terapéutica es inducida por tratamiento térmico localizado.

En un experimento dirigido a constatar que los inductores químicos tópicamente administrados no se acumulan en la circulación y en los órganos más importantes a niveles que son suficientes para la inducción de la respuesta de las proteínas de estrés, se administró a los animales una formulación liposomal conteniendo un inductor químico (arsenito de sodio o una forma de HSF1(+)) en una cantidad y bajo condiciones conocidas de experimentos precedentes que es eficaz en la prevención de la alopecia provocada por fármacos quimioterapéuticos y, después de un retraso apropiado, inyectado con un medicamento quimioterapéutico. Los controles son animales tratados de forma similar pero con liposomas vacíos y liposomas conteniendo una proteína de control o ácido nucleico, respectivamente. Para estimar las contribuciones del agente quimioterapéutico y los componentes lipídicos de los liposomas para la inducción de la respuesta de las proteínas de estrés, otros controles pueden incluir animales que no recibieron un agente quimioterapéutico (inyectados con vehículo) o no fueron previamente tratados con liposomas conteniendo un inductor químico o de control. En varios momentos antes y después del momento de administración del fármaco quimioterapéutico, los animales son sacrificados y seccionados. Extractos de PBL, corazón, pulmón, cerebro, hígado y riñón son preparados usando metodología de rutina y son analizados por transferencia western cebadas con anticuerpo contra la Hsp70 inducible (C92). Los niveles de Hsp70 inducible son comparados. Como se analizó antes, se espera rotundamente que este experimento muestre que la inducción de la respuesta de estrés se localice en las células de los folículos pilosos.

Documentos relacionados en la descripción

Esta lista de documentos relacionados por el solicitante fue recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 9801038 W[0018] • WO 0024895 A [0028]
- US 9831803 A [0018] • WO 9846208 A [0028]

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- DORR. *Semin. Oncol.*, 1998, vol. 25, 562-570 [0002] [0010] [0011]
- SREDNI *et al. Int. J. Cancer*, 1996, vol. 65, 97-103 [0002]
- HUSSEIN. *South. Med. J.*, 1993, vol. 86, 489-496 [0010]
- JOSS *et al. Recent Res. Cancer Res.*, 1988, vol. 108, 117-126 [0011]
- *The Chemotherapy Source Book*. Williams & Wilkins, 1996, 293-555595-606 [0011]
- CECE. *Lab. Invest.*, 1996, vol. 75, 601-609 [0012]
- SCHILLI *et al. J. Invest. Dermatol*, 1998, vol. 111, 598-604 [0012] [0034] [0034] [0048]
- VOELLMY. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.*, 1994, vol. 4, 357-401 [0014]
- VOELLMY *et al. Stress-Inducible Cellular Responses*. Birkhauser Verlag, 1996, 121-137 [0014]
- PARSELL; LINDQUIST. *Annu. Rev. Genet.*, 1993, vol. 27, 437-496 [0014] [0019]
- ZOU *et al. Cell*, 1998, vol. 94, 471-480 [0017]
- ZUO *et al. Mol. Cell. BioL*, 1995, vol. 15, 4319-4330 [0018]
- XIA *et al. Cell Stress & Chaperones*, 1999, vol. 4, 8-18 [0018] [0021] [0022] [0037]
- BALER *et al. J. Cell Biol.*, 1992, vol. 117, 1151-1159 [0018]
- LI *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1991, vol. 88, 1681-1685 [0019]
- HUOT *et al. Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 5245-5252 [0019]

ES 2 291 339 T3

- **JAATTELA** *et al. EMBO J.*, 1992, vol. 11, 3507-3512 [0019]
- **LIU** *et al. Circulation*, 1992, vol. 86, 11358-11363 [0019]
- 5 • **RICHARD** *et al. Fund. Clin. Pharmacol.*, 1996, vol.10, 409-415 [0019]
- **JOYEUX** *et al. Cardiovasc. Res.*, 1998, vol. 40,124-130 [0019]
- **PLUMIER** *et al. J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1854-1860 [0019]
- 10 • **MARBER** *et al. J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95,1446-1456 [0019]
- **SUZUKI** *et al. J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 99, 1645-1650[0019]
- 15 • **PLUMIER** *et al. Cell Stress & Chaperones*, 1997, vol. 2, 162-167 [0019]
- **PERDRIZET** *et al. Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999, vol. 874, 320-325 [0019] [0019]
- **KOENIG** *et al. Plast. Reconstr. Surg.*, 1992, vol. 90, 659-694 [0020]
- 20 • **WANG** *et al. Plast. Reconstr. Surg.*, 1998, vol. 101, 776-784 [0020]
- **TRAUTINGER** *et al. J. Invest. Dermatol.*, 1995, vol. 105, 160-162 [0020]
- 25 • **BAYERL; JUNG.** *Exp. Dermatol*, 1999, vol. 8, 247-253 [0020]
- **ROIGAS** *et al. Prostate*, 1998, vol. 34, 195-202 [0021]
- **RICHARDS** *et al. Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 2446-2451 [0021] [0021] [0021]
- 30 • **OESTERREICH** *et al. Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 4443-4448 [0021] [0021]
- **KARLSEDER** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, vol. 220, 153-159 [0021]
- 35 • **KOMATSUDA** *et al. Nephrol. Dial. Transplant.*, 1999, vol. 14, 1385-1390 [0021]
- **OESTEMICH** *et al. Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 4443-4448 [0021]
- **CHIN** *et al. J. Biol. Chem*, 1990, vol. 265, 221-6 [0021]
- 40 • **KIM** *et al. Exp. Mol. Med.*, 1998, vol. 30, 87-92 [0021]
- **HUANG** *et al. J. Exp. Med.*, 2000 [0022]
- 45 • **MELCHER** *et al. Nat. Med.*, 1998, vol. 4, 581-587 [0022]
- **TODRYK.** *J. Immunol*, 1999, vol. 163, 1398-1408 [0022]
- **WELLS** *et al. Scand. J. Immunol.*, 1997, vol. 45, 605-612 [0022]
- 50 • **ZOU** *et al. Cell Stress & Chaperones*, 1998, vol. 3, 130-141 [0025] [0030]
- **SCHILLI** *et al. J. Invest. Dermatol.*, 1998, vol. 111, 598-604 [0028]
- 55 • **TATA** *et al. J. PharmSci.*, 1994, vol. 83, 1508-1510 [0028]
- **SREDNI** *et al. Int. J. Cancer*, 1996, vol. 65, 97-103 [0028]
- **YANG** *et al. Br. J. Dermatol.*, 1995, vol. 133, 679-685 [0028]
- 60 • **YU** *et al. J. Invest. Dermatol*, 1999, vol. 112, 370-375 [0028] [0038]
- **HOOGSTRAATE** *et al. Int-J. Pharm*, 1991, vol. 76,37-47 [0028]
- 65 • **BODDE** *et al. Biochem-Soc. Trans.*, 1989, vol. 17, 943-945 [0028]
- **CHOI** *et al. Pharm. Res.*, 1990, vol. 7, 1099-1106 [0028]

ES 2 291 339 T3

- **MARJUKKA SUHONEN** *et al. J. Controlled Release*, 1999, vol. 59, 149-161 [0028]
- **TENJARLA** *et al. Int. J. Pharm.*, 1999, vol. 192, 147-158 [0028]
- 5 • **TRAN**. *J. Surg. Res.*, 1999, vol. 83, 136-140 [0028]
- **DIANI** *et al. Skin Pharmacol.*, 1995, vol. 8, 221-228 [0028]
- **VALENTA** *et al. Int. J. Pharm.*, 1999, vol. 185, 103-111 [0028]
- 10 • **FOLDVARI** *et al. Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, vol. 30, 129-137 [0028]
- **GUY**. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1998, vol. 50, 371-374 [0028]
- 15 • **BANGA; PRAUSNITZ**. *Trends Biotechnol.*, 1998, vol. 16, 408-412 [0028]
- **FRESTA; PUGLISI**. *J. Drug Target*, 1996, vol. 4, 95-101 [0029]
- **EL MAGHRABY** *et al. Int. J. Pharm.*, 2000, vol. 196, 63-74 [0029]
- 20 • **CEVC**. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996, vol. 13, 257-388 [0029]
- **LIEB** *et al. J. Pharm. Sci.*, 1997, vol. 86, 1022-1029 [0029]
- 25 • **HOFFMAN**. *J. Drug Target*, 1998, vol. 5, 67-74 [0029]
- **LI; HOFFMAN**. *Nat. Med.*, 1995, vol. 1, 705-706 [0029]
- **HOFFMAN**. *Nat. Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 20-21 [0029]
- 30 • **HASHIZUME** *et al. Int. J. Dermatol.*, 1997, vol. 36, 587-592 [0030]
- **YU** *et al. J. Invest. Dermatol.*, 1999, vol. 112, 370-375 [0030]
- 35 • **HASHIZUME** *et al. Int. J. Dermatol.*, 1997, vol. 36, 587-592 [0032]
- **YU** *et al. J. Invest. Dermatol.*, 1999, vol. 112, 370-375 [0032]
- **HUSSEIN** *et al. Science*, 1990, vol. 249, 1564-1566 [0034] [0048] [0048]
- 40 • **PAUS** *et al. Br. J. Dermatol.*, 1990, vol. 122, 777-784 [0034] [0034] [0048]
- **PAUS** *et al. Am J. Pathol.*, 1994, vol. 144, 719-734 [0034] [0048]
- 45 • **BALSARI** *et al. PASEB J.*, 1994, vol. 8, 226-230 [0034] [0040]
- **JIMENEZ; YUNIS**. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 413-415 [0034]
- **LIU** *et al. Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 3667-3673 [0036]
- 50 • **LI** *et al. Exp. Cell Res.*, 1995, vol. 217, 460-468 [0036]
- **WELCH** *et al. J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, 7102-7111 [0036]
- 55 • **HASHIZUME** *et al. Int. J. Dermatol.*, 1997, vol. 36, 587-592 [0036]
- **LI; HOFFMAN**. *Nat. Med.*, 1995, vol. 1, 705-706 [0037]
- **PERRY** *et al. Gene*, 1994, vol. 146, 273-278 [0039]
- 60 • **LONGO** *et al. J. Neurosci.*, 1993, vol. 36, 325-335 [0039]
- **BALSARI** *et al. FASEB J.*, 1994, vol. 8, 226-230 [0040] [0048]
- 65 • **LI; HOFFMAN**. *Nat Med.*, 1995, vol. 1, 705-706 [0040]
- **LIEB** *et al. J. Invest. Dermatol.*, 1992, vol. 99, 108-113 [0040]

ES 2 291 339 T3

- **LIEB** *et al.* *J. Pharmaceutical Sciences*, 1997, vol. 86, 1022-1029 [0040]
- **LI** *et al.* *Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1993, vol. 29A, 192-194 [0040]
- 5 • **LI** *et al.* *Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1993, vol. 29A, 258-260 [0040]
- **LI**; **HOFFMAN**. *Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1995, vol. 31A, 11-13 [0040]
- **HOFFMAN**. *J. Drug Targeting*, 1997, vol. 5, 67-74 [0040] [0040] [0042] [0044]
- 10 • **FOLDVARI** *et al.* *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, vol. 30, 129-137 [0040]
- **LI**; **HOFFMAN**. *J. Derm. Sci.*, 1997, vol. 14, 101-108 [0040]
- 15 • **GOSEN** *et al.* *Science*, 1996, vol. 268, 1766-1769 [0041]
- **GOSEN**; **BUJARD**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5547-5551 [0041]
- **WANG** *et al.* *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 239 [0041]
- 20 • **WANG** *et al.* *Gene Therapy*, 1997, vol. 4, 432-441 [0041]
- **VOELLMY**. *Stress-Inducible Cellular Responses*. *Birkhaeuser Verlag*, 1996, 121-137 [0041]
- 25 • **JIMENEZ**; **YUNIS**. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 5123-5125 [0048]
- **JIMENEZ** *et al.* *Am J. Med. Sci.*, 1995, vol. 310, 43-47 [0048]
- **DAVIS** *et al.* *Science*, 2001, vol. 291, 134-137 [0048]
- 30 • **MALKINSON** *et al.* *J. Invest. Dermatol.*, 1993, vol. 101, 135S-137S [0048]
- **D'AGOSTINI** *et al.* *Int. J. Oncol.*, 1998, vol. 13, 217-224 [0048]
- 35 • **SREDNI** *et al.* *Int. J. Cancer*, 1996, vol. 65, 97-103 [0048].

REIVINDICACIONES

1. Método cosmético para impedir o reducir la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia en un paciente humano o un animal mamífero que deba ser sometido a tratamiento con quimioterapia de un tumor no residente en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal, el método comprendiendo administrar al cuero cabelludo del paciente o la piel del animal una composición que comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés, donde la composición es administrada en una cantidad y en un momento suficientemente antes de la administración de un fármaco quimioterapéutico para producir una mayor resistencia de los folículos pilosos en el cuero cabelludo o piel al fármaco en el momento de la administración del fármaco.

2. Método según la reivindicación 1, donde la cantidad y tiempos de administración de la composición causa además un aumento detectable en la concentración de al menos una proteína de estrés del grupo de las Hsps incluyendo Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína en los folículos pilosos en el momento de la administración del fármaco.

3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, donde el aumento de la concentración de la proteína de estrés es al menos aproximadamente el 25%.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde el inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés es seleccionado del grupo consistente en diamida, una ansamicina de benzoquinona, una sal arsénica, una sal de estaño, una sal de zinc y un HSF1 activado en forma de ácido nucleico o proteína.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, donde la composición además comprende un potenciador de penetración.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, donde la composición que comprende el inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés es administrada entre 2 y 36 horas antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

7. Método según la reivindicación 6, donde la composición que comprende el inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés es administrada entre 8 y 24 horas antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

8. Método cosmético para impedir o reducir la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia en un paciente humano o un animal mamífero que deba ser sometido a tratamiento con quimioterapia de un tumor no residente en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal, el método comprendiendo administrar al cuero cabelludo del paciente o la piel una dosis de calor, donde la dosis de calor es administrada en una cantidad y en un momento suficientemente antes de la administración de un fármaco quimioterapéutico para producir una mayor resistencia de los folículos pilosos al fármaco en el momento de administrar el fármaco.

9. Método según la reivindicación 8, donde la cantidad y tiempos de administración de la dosis de calor causan además un aumento detectable en la concentración de al menos una proteína de estrés del grupo de las Hsps incluyendo Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína en los folículos pilosos en el momento de administrar el fármaco.

10. Método según la reivindicación 9, donde el aumento en la concentración de la proteína de estrés es al menos aproximadamente el 25%.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 10, donde la dosis de calor es una dosis que expone las células foliculares pilosas a una temperatura entre aproximadamente 39 y 45°C durante aproximadamente 15 min a 2 horas.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, donde la dosis de calor es administrada entre 2 y 24 horas antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

13. Método según la reivindicación 12, donde la dosis de calor es administrada entre 6 y 12 horas antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 13, donde la dosis de calor es administrada por unos medios seleccionados del grupo que consiste en contacto directo con superficie o líquido calentados, radiación infrarroja, radiación de microondas, radiación de ultrasonidos y de radiofrecuencias.

15. Composición farmacéutica para impedir o reducir la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia, donde la composición comprende un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés, un potenciador de penetración y un diluyente o solvente.

16. Composición farmacéutica según la reivindicación 15, donde el inductor químico es seleccionado del grupo consistente en diamida, una ansamicina de benzoquinona, una sal arsénica una sal de estaño, una sal de zinc y un HSF 1 activado en forma de ácido nucleico o proteína.

ES 2 291 339 T3

17. Uso de un inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés para la producción de un medicamento para impedir o reducir la gravedad de la alopecia inducida por quimioterapia en un paciente humano o un animal mamífero que deba ser sometido a tratamiento con quimioterapia de un tumor no residente en el cuero cabelludo del paciente o la piel del animal.

5

18. Uso según la reivindicación 17, donde el medicamento es para la administración en una cantidad y en un momento suficientemente antes de la administración de un fármaco quimioterapéutico para producir una mayor resistencia de los folículos pilosos al fármaco en el momento de administrar el fármaco.

10

19. Uso según la reivindicación 18, donde la cantidad y tiempos de administración de la composición causan además un aumento detectable en la concentración de al menos una proteína de estrés del grupo de las Hsps incluyendo Hsp90, Hsp70, Hsp25-27 y P-glicoproteína en los folículos pilosos en el momento de administrar el fármaco.

15

20. Uso según la reivindicación 19, donde el aumento en la concentración de la proteína de estrés es al menos aproximadamente el 25%.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 - 20, donde el medicamento además comprende un potenciador de penetración.

20

22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 - 21, donde el medicamento es administrado entre 2 y 36 horas antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

25

23. Uso según la reivindicación 22, donde el medicamento es administrado entre 8 y 24 horas antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

24. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17-23, donde el inductor químico de la respuesta de las proteínas de estrés es seleccionado del grupo consistente en diamida, una ansamicina de benzoquinona, una sal arsénica, una sal de estaño, una sal de zinc y un HSF1 activado en forma de ácido nucleico o proteína.

30

35

40

45

50

55

60

65