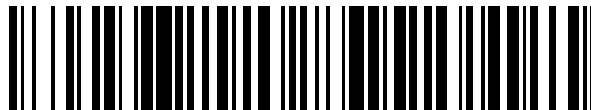


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 090**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2005 E 05770969 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1745071**

54 Título: **Conjugados tripeptídicos agonistas de la MSH**

30 Prioridad:

11.05.2004 FR 0405069

22.10.2004 FR 0411276

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

21.04.2014

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR;

INSTITUT EUROPEEN DE BIOLOGIE

CELLULAIRE (25.0%);

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER I (25.0%) y

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II (25.0%)

72 Inventor/es:

MARTINEZ, JEAN;

VERDIE, PASCAL;

DUBS, PASCALINE;

PINEL, ANNE-MARIE y

SUBRA, GILLES

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 456 090 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados tripeptídicos agonistas de la MSH.

5 La presente invención se refiere a nuevos conjugados tripeptídicos agonistas de la MSH y a su aplicación terapéutica y cosmética.

La alfa-MSH es una sustancia producida naturalmente por el organismo humano conocida por tener numerosas actividades fisiológicas: antipiréticas, anti-inflamatorias y pigmentantes.

10 Como mediador, la alfa-MSH posee unos receptores específicos de los cuales cinco han sido descritos y poseen cada uno 7 dominios transmembranarios. A nivel de la piel, las actividades citadas anteriormente hacen intervenir el receptor "melanocortina-1" (MC-1r). A este nivel, la fijación de la alfa-MSH induce la activación de una proteína G (que presenta una sub-unidad α de tipo Gys) que estimulará a su vez la adenililciclase y producirá así la adenosina mono fosfatocíclica (o AMPc).

15 La producción de AMPc induce la activación de proteínas quinasas de tipo A que activarán por fosforilación las proteínas capaces de unirse a los elementos de respuesta a la AMPc (o CREB) a nivel del ADN de los genes de la célula. Esto conduce a la expresión de mediadores que ejercen entonces sus efectos sobre las células diana.

20 En los mamíferos, la coloración de la piel y del pelo se debe a una categoría común de pigmentos: las melaninas. La producción de estas melaninas en la piel está asegurada por los melanocitos, células localizadas a nivel de la membrana basal de la epidermis y en los folículos pilosos. La síntesis de las melaninas está controlada por la actividad de una enzima: la tirosinasa. Es la producción de esta enzima (así como la de las enzimas asociadas: TRP-1 y TRP-2) la que es estimulada por la fijación de la alfa-MSH sobre su receptor MC-1. La producción de melanina por la tirosinasa tiene lugar dentro de orgánulos citoplásmicos: los premelanosomas. Una vez llenos de melaninas, estos orgánulos se denominan melanosomas y son transferidos, por medio de las dendritas del melanocito, a las células próximas: los queratinocitos. La melanina se reparte así en la epidermis, asegurando su oscurecimiento y su protección.

25 La melanina, pigmento natural reconocido por sus propiedades antirradicalarias y absorbentes de las radiaciones solares, es el agente protector fisiológico de la piel. No existe un compuesto disponible en dermocosmetología que pueda estimular la producción de este pigmento en el ser humano.

30 Además, el mecanismo de los efectos anti-inflamatorios de la alfa-MSH no está totalmente dilucidado, pero numerosos hechos experimentales convergen y llevan a pensar que la alfa-MSH, al fijarse sobre el receptor MC-1, inhibe la inducción de la NOSi (o NOS2), de NFkB e induce la expresión del ARNm seguida de la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Esta citoquina se opone a la liberación de las citoquinas de la inflamación, como IL-1, IL6, IL-8, TNF- α o INF γ . Los queratinocitos, que constituyen el 95% de la población celular de la epidermis, están considerados como unas reservas para IL-1 y presentan en su superficie celular unos receptores MC-1. Así, la fijación de la alfa-MSH sobre estos receptores permite una modulación de los fenómenos inflamatorios locales.

35 La alfa-MSH es un tridecapéptido de fórmula acetil-Ser¹-Tyr²-Ser³-Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂ (o Ser = serina, Tyr = tirosina, Met = metionina, Glu = ácido glutámico, His = histidina, Phe = fenilalanina, Arg = arginina, Trp = triptófano, Gly = glicina, Lys = lisina, Pro = prolina y Val = valina). Numerosos trabajos científicos han establecido las secuencias activas de la alfa-MSH, que están descritas habitualmente como el heptapéptido 4-10 para los efectos melanotropos (Haskell-Luevano *et al.* J. Med. Chem. 1997, 40, 2133-2139) y el tripeptido 11-13 para los efectos anti-inflamatorios (Hiltz M.E. y Lipton J.M. Peptides 1990, 11, 979-982.).

40 Además, los trabajos recientes han llevado a diversos autores a depositar unas patentes que describen unas estructuras ciclizadas (Hruby *et al.* US nº 5.674.839 y US nº 6.054.556). Por otra parte, el hexapéptido Ac-Nle-Ala-His-(D)Phe-Arg-Trp-NH₂ (FR 2 835 528) que presenta la secuencia tetrapeptídica de base, está comercializado como agonista de la α -MSH. Sin embargo, este compuesto es de alto peso molecular y posee por lo tanto una actividad terapéutica o cosmética muy limitada. En efecto, su tamaño lo hace difícil de optimizar y su biodisponibilidad es limitada. Además, es caro y difícil de preparar.

45 El tripeptido acetilado Ac-His-DPhe-Arg-NH₂ está descrito por Haskell-Luevano *et al.* (Peptides, 1996, Vol. 17, nº 6, páginas 995-1002) como que no presenta ninguna actividad de tipo alfa-MSH.

50 Por otra parte, el tetrapéptido Ph(CH₂)₃CO-His-DPhe-Arg-Trp posee una actividad muy importante como agonista de la alfa-MSH (Koikov *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 13 (2003), páginas 2647-2650). Esta secuencia tetrapeptídica siempre ha sido identificada como el fragmento mínimo que presenta una actividad biológica y no se ha descrito o sugerido hoy en día ninguna otra modificación del tamaño del tetrapéptido. Ahora bien, el tamaño y el peso molecular de este tetrapéptido son todavía demasiado elevados.

55 De manera sorprendente, los inventores han descubierto que algunos tripeptidos palmitoilados en el extremo N-

terminal presentan también una actividad agonista significativa de la α -MSH. Estos agonistas tienen un peso molecular muy bajo, por lo tanto son fáciles de optimizar, tienen una buena biodisponibilidad y son muy fáciles de preparar.

5 La presente invención se refiere por lo tanto a un conjugado tripeptídico de fórmula:

- a) A-His-DPhe-Arg-NH₂, o
- b) A-His-DPhe-Trp-NH₂

10 en la que

A representa el radical que corresponde a un ácido monocarboxílico, seleccionado de entre el ácido fenilbutírico o el ácido palmítico, en forma de enantiómeros o de diastereoisómeros así como sus mezclas, incluyendo las mezclas racémicas.

15 Los aminoácidos en el conjugado tripeptídico de fórmula a) o b) pueden tener una configuración D, L o DL, si no se especifica de otra manera.

20 Así, los conjugados tripeptídicos de fórmula a) o b) pueden comprender uno o varios átomos de carbono asimétricos. Pueden por lo tanto existir en forma de enantiómeros o de diastereoisómeros. Estos enantiómeros, diastereoisómeros, así como sus mezclas, incluyendo las mezclas racémicas forman parte de la invención.

En el marco de la presente invención, se entiende por:

- 25 - Ala, la alanina,
- Phe, la fenilalanina,
- Trp, el triptófano,
- Arg, la arginina,
- Nap, la Naftilalanina,
- 30 - Tpi, el ácido tetrahidronorhaman-3-carboxílico,
- Tic, el ácido tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico,
- Orn, la ornitina,
- His, la histidina, y
- Lys, la lisina.

35 Se precisa asimismo que los conjugados tripeptídicos mencionados anteriormente y que constituyen el objeto de la presente invención se obtienen en forma terminal NH₂ (dicho de otra manera que presentan una función amida).

40 Los tripeptidos conjugados según la presente invención están unidos en forma de amidas al ácido fenilbutírico o palmítico. Las conjugaciones según la presente invención se pueden efectuar haciendo reaccionar la función amina del aminoácido con la función ácida del ácido fenilbutírico o palmítico.

Entre los conjugados tripeptídicos de la invención, se pueden citar los conjugados tripeptídicos seleccionados de entre el grupo constituido por:

- 45 1) Palm-His-DPhe-Arg-NH₂,
- 2) Palm-His-DPhe-Trp-NH₂,
- 3) Pbu-His-DPhe-Arg-NH₂.

50 Los conjugados tripeptídicos objeto de la presente invención se pueden obtener o bien ventajosamente por síntesis química clásica, o bien por síntesis enzimática, según cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia.

La presente invención se refiere además a una composición cosmética, dermatológica o farmacéutica o a un complemento alimenticio que comprende un conjugado tripeptídico según la presente invención y eventualmente un excipiente cosmética o farmacéuticamente aceptable.

55 Los conjugados tripeptídicos pueden ser administrados para su utilización cosmética o farmacéutica por vía tópica. También se pueden utilizar en complementos alimenticios, dicho de otra manera en el campo nutracéutico por vía oral.

60 Los conjugados tripeptídicos según la invención se administran preferentemente por vía tópica.

La composición cosmética farmacéutica o dermatológica podrá presentarse en las formas que son conocidas habitualmente para este tipo de administración, es decir en particular las lociones, las espumas, los geles, las dispersiones, las pulverizaciones, los sueros, las máscaras, las leches corporales, las pomadas, las soluciones, las emulsiones, los geles o las cremas, por ejemplo, con unos excipientes que permiten en particular una penetración

cutánea con el fin de mejorar las propiedades y la accesibilidad del principio activo. Estas composiciones contienen generalmente además del conjugado tripeptídico según la presente invención, un medio fisiológicamente aceptable, en general a base de agua o de disolvente, por ejemplo unos alcoholes, unos éteres o unos glicoles. Pueden contener también unos agentes tensioactivos, unos conservantes, unos agentes estabilizantes, unos emulsionantes, unos espesantes, otros principios activos que conducen a un efecto complementario o eventualmente sinérgico, unos oligoelementos, unos aceites esenciales, unos perfumes, unos colorantes, colágeno, unos filtros químicos o minerales, unos agentes hidratantes o unas aguas termales.

En la composición cosmética tópica, el conjugado tripeptídico según la invención puede estar presente a una concentración comprendida entre 10^{-8} M y 10^{-3} M, comprendida ventajosamente entre 10^{-7} M y 10^{-5} M.

La presente invención se refiere además a un conjugado tripeptídico según la presente invención o a una composición farmacéutica según la presente invención para su utilización como medicamento, destinado ventajosamente a tratar el cáncer, a cicatrizar las heridas y lesiones crónicas de los diabéticos, las úlceras varicosas o las heridas quirúrgicas, a tratar o prevenir las estrías, las alergias, en particular cutáneas, las reacciones inflamatorias, los trastornos de la melanogénesis, la dermatitis atópica, el eczema, la soriasis, el vitíligo, el eritema, y en particular el eritema fotoinducido, las alopecias inflamatorias, el asma o a tratar la obesidad.

Se refiere además a la utilización de un conjugado tripeptídico según la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar el cáncer, a cicatrizar las heridas y lesiones crónicas de los diabéticos, las úlceras varicosas o las heridas quirúrgicas, a tratar o prevenir las estrías, las alergias, en particular cutáneas, las reacciones inflamatorias, los trastornos de la melanogénesis, la dermatitis atópica, el eczema, la soriasis, el vitíligo, el eritema, y en particular el eritema fotoinducido, las alopecias inflamatorias, el asma o a tratar la obesidad.

La presente invención se refiere además a una composición cosmética según la presente invención para una utilización como melanotrópico y/o antieritematoso, para acelerar la melanización de la epidermis, para obtener un bronceado cutáneo natural, para el tratamiento curativo y preventivo de las arrugas de la cara, del cuello y de las manos o para asegurar una protección total contra las radiaciones solares ultravioletas (UVA-UVB).

Por último, la presente invención se refiere a una composición cosmética para acelerar la melanización de la epidermis, para obtener un bronceado cutáneo natural, para el tratamiento curativo y preventivo de las arrugas de la cara, del cuello y de las manos o para asegurar una protección total contra las radiaciones solares ultravioletas (UVA-UVB) que comprende la aplicación sobre la piel de una composición cosmética según la presente invención.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título indicativo no limitativo.

Ejemplo 1: Preparación de 2 tripéptidos según la invención.

Los productos químicos utilizados son los siguientes:

Los aminoácidos protegidos en el extremo N-terminal por un grupo α -Fmoc, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-D-His(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, fueron adquiridos en SENN chemicals, y en Advanced Chemtech.

El agente de acoplamiento, el HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio), fue adquirido en SENN chemicals.

La N,N-dimetilformamida (DMF), el diclorometano (DCM), el metanol, el acetonitrilo, el éter etílico, el ácido trifluoroacético (TFA), la piperidina, el anhídrido acético, fueron adquiridos en Riedel de Haën, Carlo Erba o Acros organics, y utilizados sin purificación.

El cloruro de acetilo, el anhídrido acético, la N,N-diisopropiletilamina, el triisopropilsilano, el cloruro de bencensulfonilo, el 3-piridina ácido propiónico, el ácido butanoico, el ácido hexanoico, el 3-ciclohexil-ácido propiónico, el ácido propiónico, el ácido benzoico, el ácido trans-cinámico, el ácido palmítico, el cloruro de p-toluensulfonilo, el 3,3'-difencil-ácido propiónico, el ácido hexanoico, el ácido mirístico, el ácido adamantil-carboxílico, el ácido indol-3-acético, el ácido (2-pirid-3-il)tiazol-4-carboxílico, el ácido 3-tiofenacético, el ácido 2-tiofenacético, el ácido 2-benzimidazolpropiónico, el ácido 4-bifenilacético, el ácido 4-piridilacético, el ácido α -metil-p-(2-tienoil)fenilacético (suprofen) y el ácido α -metil-4-(2-metilpropil)-bencenacético (ibuprofeno) fueron adquiridos en Aldrich o Avocado. Todos los reactivos y productos químicos son de calidad ACS y han sido utilizados sin más purificación.

Las linternas poliamida Rink de amida Synphase de la serie D y las linternas poliestireno hidroxil tritil Synphase de la serie D han sido proporcionadas por Mimotopes, Pty.

La [125 I]-NDP-MSH utilizada para unos ensayos de unión por competición se preparó según un procedimiento descrito en el artículo de Tatro *et al.* (Endocrinology 1987, 121, 1900).

La síntesis peptídica en fase sólida se realizó utilizando la estrategia Fmoc sobre un sintetizador automatizado ACT496 Ω. Cada pocillo se rellenó con 150 mg de resina Rink de amida-PS. La resina se dejó hinchar durante 30 minutos en DCM. Las etapas de desprotección y de acoplamiento se realizaron hasta que las secuencias deseadas se sintetizaron. Para la etapa de acoplamiento, se añadieron sucesivamente tres soluciones a las cubetas de reacción: 400 µl de solución 0,5 M de aminoácido protegido en el extremo N-terminal por un grupo Fmoc en N-metilpiperidona; 400 µl de solución 0,5 M de N-metilmorfolina en DMF y 400 µl de solución 0,5 M de HBTU en DMF. El tiempo de acoplamiento fue de 90 minutos. La etapa de desprotección de 20 minutos se realizó utilizando 1,2 ml de DMF/piperidina (solución 80/20, v/v). Se utilizaron cinco lavados de 1,5 ml entre las etapas, incluyendo 2 veces con DMF, 1 vez con DCM, 1 vez con metanol y 1 vez con DMF.

La desprotección de la cadena lateral y la escisión de los péptidos se realizaron durante 2 horas en el bloque de 96 reactores del autómatas utilizando 1,5 ml de cóctel de escisión (ácido trifluoroacético/agua/triisopropilsilano, 95/2,5/2,5, v/v/v) por pocillo. Después de la eliminación de la resina por filtración, el cóctel de escisión se concentró en una centrifugadora al vacío Jouan RC10-10. Los péptidos se precipitaron en éter dietílico, se transformaron en residuo por centrifugación y se eliminó el éter. Esta operación de decantación se repitió con éter dietílico fresco. El péptido bruto se solubilizó en acetonitrilo/agua (50/50, v/v) que contiene 0,1% de TFA. Las muestras se congelaron a continuación a -80°C y se liofilizaron. Esta operación se repitió dos veces.

Se purificó una muestra de 50 mg de péptido bruto por cromatografía líquida en fase inversa utilizando el sistema Waters Deltaprep con un detector de longitud de onda doble (214 y 254 nm) y un cartucho deltapack C₁₈ utilizando el mismo sistema de disolvente que para el análisis.

Los péptidos simples se analizaron por CLHP en fase inversa y CL/SM. Se distribuyeron 500 µl de acetonitrilo/agua (50/50, v/v) que contiene 0,1% de TFA sobre los compuestos liofilizados. Se extrajeron 10 µl de cada tubo para el análisis de CLHP y de CL/SM ESI+.

Los análisis de CLHP se realizaron sobre un sistema de CLHP Waters Alliance 2690 y un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y una columna C18 Merck Chromolith Speed ROD de 50 x 4,6 mm. Se utilizó un caudal de 5 ml/min. y un gradiente de 100% de B a 100% de C durante 3 minutos (Eluyente B, agua/0,1% de TFA; eluyente C, acetonitrilo/0,1% de TFA). Las estimaciones de pureza se basan en el porcentaje de superficie de los picos detectados a 214 nm.

El sistema de CL/SM estaba constituido por una CLHP Waters Alliance 2690 acoplada a un espectrómetro Micromass Platform II (modo ionización por electronebulización, ESI+). Todos los análisis se realizaron utilizando una columna Waters Symmetry C18, 3,5 µm, 2,1 x 30 mm. Se utilizó un caudal de 600 µl/min. y un gradiente de 100% de B a 100% de C durante 3 minutos (eluyente B, agua/0,1% de TFA; eluyente C, acetonitrilo/0,1% de TFA).

Los espectros de masa por electronebulización iónica positiva se adquirieron a un caudal de disolvente de 100 ml/min. Se utilizó el nitrógeno al mismo tiempo para el gas de nebulización y para el gas de secado. Los datos se adquirieron en modo lectura de m/z 400 a 1400 en intervalos de 0,1^{-s}; se sumaron 10 lecturas para producir el espectro final.

Los pesos moleculares de todos los compuestos se calcularon utilizando unas masas mono-isotópicas (C = 12,000, H = 1,007, N = 14,003, O = 15,994, S = 31,972).

Los resultados para los dos tripéptidos sintetizados están reunidos en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1: resultados analíticos de la síntesis de los tripéptidos

Nº de conjugado peptídico según la invención	Secuencia				% de pureza	Peso molecular
	A	AA1	AA2	AA3		
1	Palm	His	DPhe	Arg NH ₂	92	695, 4
2	Palm	His	DPhe	Trp NH ₂	97	725, 4

Ejemplo 2: Propiedades biológicas de los 2 conjugados tripeptídicos según la presente invención

La línea celular humana M4Ne (Jacobovitch *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 1979, 7, 59-64), una línea celular de melanocitos capaz de producir unas melaninas, se utilizó en este estudio para determinar los valores de CE₅₀.

Las células se mantuvieron en un medio Eagle modificado de Dulbecco con el 10% de FCS, 1 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 10⁻⁴ g/ml de estreptomina. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y los medios de cultivo de las células se renovaron cada dos días. Las células se sembraron sobre una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) 24 horas antes del contacto con los péptidos.

La línea celular de melanoma de ratones Cloudman S91 (Yasumura *et al.* Science. 154, páginas 1186-1189) se utilizó para el cribado preliminar. Las células se mantuvieron en HAM F10 con 10% de suero de caballo, 2% de suero de ternera fetal (FCS), 1 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 10^{-4} g/ml de estreptomicina (Eurobio, Les Ulis, Francia). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y los medios de cultivo de las células se renovaron cada dos días. Las células se aplicaron sobre una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) 24 horas antes del contacto con los péptidos.

Medición del AMPc:

Brevemente, las células dispuestas sobre placas el día anterior se incubaron durante 1 hora con 10^{-4} M de adenina (Sigma) y después durante 10 minutos en medio de Krebs Ringer Hepes con 10^{-4} M de isobutil-1-metilxantina (Sigma), 10^{-4} M de 4-[(3-butoxi-4-metoxifenil)metil]-2-imidazolidinona (Calbiochem) y tripéptidos a 10^{-7} M según la invención.

Después de este tiempo, la lisis de las células se realizó según el protocolo del fabricante.

El contenido en AMPc se midió utilizando un kit de ensayo de unión por competición (RPN225, Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante. Cada experimento independiente se realizó por lo menos dos veces por triplicado.

Así, se ensayó 1 tripéptido según la invención a una concentración de 50 nM sobre la inducción de AMPc que se calculó sobre la respuesta de la producción de AMPc inducida por la α -MSH (50 nM). Los resultados se presentan en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Inducción de AMPc de los tripéptidos según la invención (dada en porcentaje de la respuesta máxima del hexapéptido Ac-Nle-Ala-His-(D) Phe-Arg-Trp-NH₂ a 50 nM) sobre una línea celular de melanoma de ratón cloudman S91.

Nº de conjugado peptídico según la invención	Estructura	% de inducción de AMPc
1	Palm-His-(D)Phe-Arg-NH ₂	147

Determinación de la CE₅₀:

Se ajustaron las curvas y se determinaron los valores de CE₅₀ con la regresión no lineal en el GraphPad Prism (programa GraphPad). Cada valor de CE₅₀ era la media de por lo menos dos juegos de experimentos independientes.

Estudios de unión: determinación de la CI₅₀

La afinidad de unión de la α MSH para el MC₁-R se determinó mediante unos estudios de competición con la [¹²⁵I]-NDP-MSH. Unas células Cos-1 transfectadas se incubaron en un medio Eagle modificado de Dulbecco, 0,2% de BSA, 0,3 mM de tampón fenatrolina durante 24 horas. Se aplicaron 10^5 células sobre unas placas de 24 pocillos con un ligando radiomarcado a una concentración de $5,8 \cdot 10^{-11}$ M. Después de una incubación de 2 horas a 24°C con diversas concentraciones de ligando, se realizaron unos lavados y se midió la radioactividad.

Se reunieron los CE₅₀ para 2 tripéptidos según la invención en la tabla 3 siguiente y se compararon con los CE₅₀ del hexapéptido y de la α -MSH.

Tabla 3: CE₅₀ de dos tripéptidos según la invención comparados a la α -MSH sobre la producción de AMPc en unas células M4Be.

Compuestos	Estructura	Tiempo de retención (min.)	CE ₅₀ (nM)
α -MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂	1,09	8,10
Hexapéptido	Ac-Nle-Ala-His-(D)Phe-Arg-Trp-NH ₂	1,14	4,00
1	Palm-His-(D)Phe-Arg-NH ₂	1,66	2,3
2	Palm-His-(D)Phe-Trp-NH ₂	2,07	17,3

Los resultados son conformes con los obtenidos con el Palm-tripéptidos 1 [Palm-His-(D)Phe-Arg-NH₂], indicando el 147% de inducción de AMPc.

El resultado más importante y más sorprendente es la actividad de los tripéptidos palmitoilados a nivel del receptor MC₁. En este estudio, se ha demostrado que la palmitoilación de los tripéptidos C-terminales de la secuencia de la α -MSH condujo a unos compuestos activos a nivel del receptor MC₁ induciendo la producción de AMPc. Estas moléculas poseen sólo una parte de lo que se describe en la bibliografía como la secuencia mínima de la secuencia del agonista de α -MSH.

5 De manera interesante, la eliminación del residuo triptófano ha dado lugar al tripéptido 1 que ha mostrado una actividad en el intervalo nanomolar ($CE_{50} = 2,3 \text{ nM}$). El tripéptido 2 al que le falta Arg ha presentado una potencia menor, con un CE_{50} de $17,3 \text{ nM}$. Estos tripéptidos son buenas moléculas líder para concebir unos ligandos potentes activos de la α -MSH para MC_1R . Estos resultados indican también que la presencia de una cadena hidrófoba sobre el extremo N-terminal de los análogos de la α -MSH, particularmente de un grupo palmitoilo, es un elemento estructural importante para la activación del receptor MC_1 de la α -MSH.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado tripeptídico de fórmula:

- 5 a) A-His-DPhe-Arg-NH₂, o
 b) A-His-DPhe-Trp-NH₂,

en la que

10 A representa el radical que corresponde a un ácido monocarboxílico seleccionado de entre el ácido fenilbutírico o el ácido palmítico, en forma de enantiómeros o de diastereoisómeros así como sus mezclas, incluyendo las mezclas racémicas.

15 2. Composición cosmética, dermatológica o farmacéutica, caracterizada porque contiene un conjugado tripeptídico según la reivindicación 1, y eventualmente un excipiente cosmética o farmacéuticamente aceptable.

20 3. Conjugado tripeptídico según la reivindicación 1, o composición farmacéutica según la reivindicación 2, a título de medicamento, destinado ventajosamente a tratar el cáncer, a cicatrizar las heridas y lesiones crónicas de los diabéticos, las úlceras varicosas o las heridas quirúrgicas, a tratar o prevenir las estrías, las alergias, en particular cutáneas, las reacciones inflamatorias, los trastornos de la melanogénesis, la dermatitis atópica, el eczema, la soriasis, el vitíligo, el eritema, y en particular el eritema fotoinducido, las alopecias inflamatorias, el asma o a tratar la obesidad.

25 4. Composición dermocosmética según la reivindicación 2, para su utilización como melanotrópico y/o antieritematoso, para acelerar la melanización de la epidermis, para obtener un bronceado cutáneo natural, para el tratamiento curativo y preventivo de las arrugas de la cara, del cuello y de las manos o para asegurar una protección total contra las radiaciones solares ultravioletas (UVA-UVB).