



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1996/11/15
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1997/05/22
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2011/08/09
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1998/05/15
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1996/001812
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1997/018239
(30) Priorité/Priority: 1995/11/15 (FR95/13544)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/66* (2006.01),
A61K 38/04 (2006.01), *A61K 38/22* (2006.01),
A61K 38/32 (2006.01), *A61K 47/48* (2006.01),
C07K 14/575 (2006.01), *C07K 5/10* (2006.01),
C07K 7/06 (2006.01), *A61K 38/00* (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
DUSSOURD D'HINTERLAND, LUCIEN, FR;
PINEL, ANNE-MARIE, FR
(73) Propriétaire/Owner:
INSTITUT EUROPEEN DE BIOLOGIE CELLULAIRE, FR
(74) Agent: NORTON ROSE OR S.E.N.C.R.L., S.R.L./LLP

(54) Titre : CONJUGUES PEPTIDIQUES DERIVES DES HORMONES THYMIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE
MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT
(54) Title: PEPTIDE CONJUGATES DERIVED FROM THYMIC HORMONES, THEIR USE AS MEDICAMENT AND
COMPOSITIONS CONTAINING THEM

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne des conjugués peptidiques comprenant une séquence d'au moins 3 acides aminés dérivés d'une hormone thymique choisie parmi la thymuline et la thymopoïétine, les acides aminés pouvant être indépendamment sous forme D, L ou DL, ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi: les acides monocarboxyliques de la formule générale (I): HOOC-R, ainsi que les dérivés alcool, aldéhyde ou amide; les acides dicarboxyliques de la formule générale (II): HOOC-R₁-COOH. Elle concerne également leur utilisation à titre de médicament et des compositions pharmaceutiques ou cosmétologiques les contenant.

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/66, 7/06, A61K 38/04	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/18239 (43) Date de publication internationale: 22 mai 1997 (22.05.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01812 (22) Date de dépôt international: 15 novembre 1996 (15.11.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/13544 15 novembre 1995 (15.11.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ D'ETUDE ET DE RECHERCHE DE PATHOLOGIE AP- PLIQUEE - SERPA [FR/FR]; 18, avenue de l'Europe, Villa Missouri - Tech Village 2, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUSSOURD D'HINTERLAND, Lucien [FR/FR]; 10, rue Pierre-Benoît, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie [FR/FR]; 771, rue des Navigateurs, F-34280 La Grande-Motte (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i>
(54) Title: PEPTIDE CONJUGATES DERIVED FROM THYMIC HORMONES, THEIR USE AS MEDICAMENT AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM (54) Titre: CONJUGUES PEPTIDIQUES DERIVES DES HORMONES THYMIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT (57) Abstract The invention relates to peptide conjugates comprising a sequence of at least 3 amino acids derived from a thymic hormone selected amongst thymuline and thymopoietine, the amino acids being independently in the form D, L or DL, said sequence being chemically or physically conjugated with at least one compound selected amongst monocarboxylic acids having the general formula (I): HOOC-R, as well as alcohol, aldehyde or amide derivatives, the dicarboxylic acids having the general formula (II): HOOC-R₁-COOH. The invention also relates to the use of such conjugates as medicaments, and pharmaceutical or cosmetological compositions containing them. (57) Abrégé L'invention concerne des conjugués peptidiques comprenant une séquence d'au moins 3 acides aminés dérivés d'une hormone thymique choisie parmi la thymuline et la thymopoïétine, les acides aminés pouvant être indépendamment sous forme D, L ou DL, ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi: les acides monocarboxyliques de la formule générale (I): HOOC-R, ainsi que les dérivés alcool, aldéhyde ou amide; les acides dicarboxyliques de la formule générale (II): HOOC-R₁-COOH. Elle concerne également leur utilisation à titre de médicament et des compositions pharmaceutiques ou cosmétologiques les contenant.		

CONJUGUES PEPTIDIQUES DERIVES DES HORMONES THYMIQUES, LEUR
UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT

L'invention se rapporte à de nouveaux dérivés synthétiques de deux
hormones thymiques, la thymuline et la thymosine, et à leurs applications,
5 en tant que médicament ou dans le domaine de la cosmétologie.

Les nombreuses études sur le fonctionnement du système
immunitaire, ont mis en évidence le rôle capital du thymus et des
hormones thymiques, dans la stimulation des défenses immunitaires de
l'organisme.

10 Les hormones thymiques, en particulier la thymuline, "J.F. BACH et
coll.", la thymopoïétine "GRANDSTEIN" et la Thymosine "DAYNE" ont été
identifiées comme étant de nature polypeptidique et peptidique.

Ces hormones et principalement la thymuline et la thymopoïétine,
ont la propriété d'induire la maturation des lymphocytes T et de stimuler la
15 réponse immunitaire de l'organisme.

Il a été démontré scientifiquement qu'il existait une relation étroite
entre la diminution des fonctions thymiques avec l'âge, et le vieillissement
cutané sur le plan physiologique normal.

Au niveau pathologique, la perte d'activité du thymus, "involution",
20 se traduit par l'apparition de troubles physiologiques : "maladies
auto-immunes, alopecies (chute anormale des cheveux) etc...".

Il a également été démontré qu'il existait une relation entre les
propriétés physiologiques du thymus et certaines cellules de l'épiderme.

Il existe en effet une similitude de structure entre certaines cellules
25 du thymus et les kératinocytes. Il a été démontré que les kératinocytes
sécrètent également, dans certaines conditions, une hormone du type
thymopoietine identique à celle sécrétée par le thymus, et sont capables
d'induire une maturation lymphocytaire post thymique, et de prendre
ainsi le relais du thymus.

30 Cette relation, entre les activités physiologiques des cellule du
thymus et les kératinocytes, a été récemment confirmée par la mise en
évidence dans les cellules du thymus, de la présence de kératine et de
kératohyaline, de structures identiques à la kératine et à la kératohyaline
sécrétée par les kératinocytes de l'épiderme.

Par ailleurs la démonstration apportée sur le plan scientifique, que les kératinocytes en phase de différenciation sécrétaient une substance activant la croissance des thymocytes, l'ETAF confirme les relations physiologiques existant entre le thymus et les kératinocytes. (ETAF :
5 Epidermal Thymocyte Activating Factor).

Il existe un parallèle entre "l'involution" du thymus et la diminution de la synthèse de l'ETAF par les kératinocytes en fonction de l'âge, avec toutefois un décalage fonctionnel en faveur des kératinocytes (maturation lymphocytaire post thymique).

10 L'utilisation des hormones thymiques, en particulier la thymuline et la Thymopoïétine en thérapeutique, a fait l'objet de nombreux travaux pharmacologiques et cliniques, en vue de la stimulation et de la régulation des défenses immunitaires de l'organisme.

Utilisées sous forme d'extraits ou de molécules obtenues par
15 synthèse chimique, ces produits ont donnés des résultats irréguliers et décevants, par suite de leur manque de stabilité, et d'un effet ubiquitaire lié à l'absence de relations doses-effets.

La présente invention a pour objet, l'obtention par synthèse chimique de dérivés peptidiques des hormones thymiques, dont la
20 structure a été orientée de façon à leur assurer une grande stabilité physico-chimique, et une activité pharmacologique parfaitement définie.

Utilisant l'ensemble des connaissances acquises et développées récemment par nos équipes, concernant le rôle primordial de l'épiderme dans les défenses immunitaires et ses relations avec le thymus
25 (International Society of Development and Comparative Immunology), la présente invention a pour objet, la réalisation de dérivés peptidiques de synthèse, dont l'activité physiologique et thérapeutique est orientée vers la stimulation et la modulation des défenses immunitaires du derme et de l'épiderme préférentiellement à toute action systémique.

Un des objets p  f  rentiel de l'invention concerne la réalisation par synthèse chimique de m  tallopeptides dont les propriétés physiologiques sont spécifiquement orientées vers l'activation du système immunitaire cutané, et la stimulation des fonctions germinatives des cellules basales de l'épiderme à l'exclusion de tout effet secondaire sur l'immunité systémique (générale).

La présente invention a pour objet la réalisation de molécules peptidiques, homologues, ou dérivés des séquences peptidiques actives des principales hormones thymiques "la thymuline et la thymopo  tine".

Les nombreux essais cliniques effectués avec ces médiateurs hormonaux n'ont pas permis de mettre en évidence leur intérêt thérapeutique.

En effet, utilisés sous forme de préparations injectables pour le traitement des déficits immunitaires et des affections auto-immunes, les résultats ont tous été négatifs, en raison de leur activité ubiquitaire en fonction des doses administrées.

Il semble que ces effets ubiquitaires soient liés à la structure de ces composés, obtenu par synthèse, qui ne leur permet pas de se fixer normalement sur les globulines et les récepteurs cellulaires, compte tenu de leur administration parentérale.

C'est pourquoi l'un des objets de l'invention est la réalisation de composés sous forme de m  tallopeptides obtenu par synthèse, dont les activités physiologiques sont orientées vers la modulation du système immunitaire et l'activation des cellules germinatives de l'épiderme, par applications topiques locales, selon le principe pharmacologique des "relations-structures-activités" (Principe de H  nch).

Plus particulièrement la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique ou cosm  tologique contenant au moins un conjugué peptidique comprenant une séquence d'au moins trois acides aminés dérivés de la séquence totale de la thymuline ou de la thymopo  tine, les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou DL, ladite séquence étant conjuguées chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi :

- les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou ramifié, éventuellement substitué, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ;

- les acides dicarboxyliques de formule générale



dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant

au moins 3 atomes de carbone, de préférence 3 à 10 atomes de carbone, droit ou ramifié, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino, hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C₁-C₃, R₁ pouvant en outre former un

cycle avec l'une des fonctions acides.

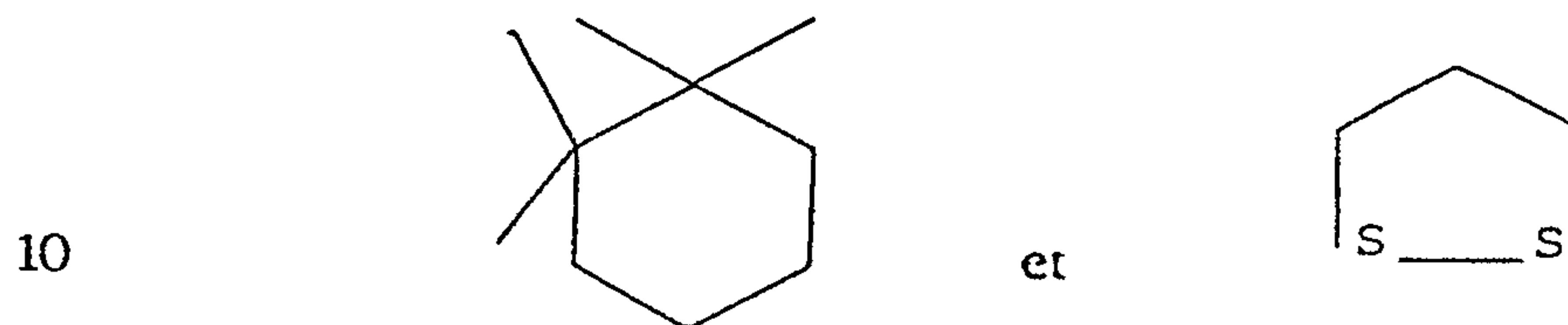
Les conjugués selon l'invention, sont des dérivés de faible poids moléculaire, qui sont obtenus notamment sous forme de sels, d'esters ou d'amides des composés de formule I ou II.

Parmi les composés de formule I, sont particulièrement préférés des acides carboxyliques, à activité métabolique essentielle du cycle tricarboxylique de Krebs, agissant au niveau des mitochondries, comme coenzyme de décarboxylation oxydative, et dont les propriétés sont de se fixer préférentiellement par covalence sur les fonctions ε aminés de certains peptides, sous forme de lipo-amides, facilitant ainsi la présentation des conjugués peptidiques obtenus selon l'invention au récepteur beta de classe G, des cellules de l'épiderme.

Pour ces acides, et d'autres convenant à la mise en oeuvre de l'invention, R peut représenter un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C₁-C₂₀, notamment en C₁-C₄, substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkényl ou alkynyl, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :

NH₂, OH, oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C₁ à C₃, notamment méthyl.

- 5 En particulier lorsque R représente une chaîne aliphatique en C₁-C₂₀, elle peut être substituée par un cycle choisi parmi



D'autres composés de formule I adaptés à la mise en oeuvre de l'invention sont ceux pour lesquels, dans la formule générale I, R peut
15 représenter un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



dans laquelle R₂ peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié
20 comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de carbone, éventuellement substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.

De manière avantageuse, dans la formule II, R₁ représente un reste alkylène en C₄-C₈ éventuellement substitué.

Des conjugués peptidiques selon l'invention sont notamment ceux pour lesquels l'acide de formule générale I est choisi parmi l'acide
25 acétique, l'acide pyroglutamique, l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque, la N-lypoyl-lysine, les acides hydroxydécénoïques et décénoïliques, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol et le rétinol, l'acide myristique et ses dérivés, l'acide palmitique, sous forme de sels, d'esters ou amides, ou bien l'acide de formule générale II est choisi parmi
30 l'acide adipique, l'acide α-amino adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et leurs dérivés.

Les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide α -DL-Lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide
5 sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy- Δ^2 -décénoïque et l'acide trans-oxo-9-decene-2-oïque, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol, et le rétinol, l'acide myristique et l'acide palmitique.

La séquence en acides aminés des conjugués selon l'invention contiendra l'une des 3 séquences suivantes :

10 Gln-Gly-Gly
 Arg-Lys-Asp
 Lys-Asp-Val

En effet plus spécifiquement, la présente invention concerne la réalisation de deux séries de molécules peptidiques dont les activités sont
15 complémentaires, au niveau des applications dans les domaines de la médecine humaine et de la dermo-cosmétologie.

La présente invention concerne préférentiellement des conjugués peptidiques, dérivés de l'hormone thymique circulante, la thymuline, et dont les activités physiologiques sont orientées vers la maturation du
20 système immunitaire et des différents médiateurs du système immunitaire cutané.

Ces conjugués peptidiques étant particulièrement orientés vers le traitement des maladies auto-immunes de la peau, et en particulier, la prévention et le traitement des alopécies quelles soient d'origine
25 physiologique (vieillesse), traumatiques ou pathologiques.

La présente invention concerne également la réalisation de conjugués peptidiques, dérivés de l'hormone thymique cellulaire, la thymopoïétine, et dont les activités physiologiques sont également orientées vers la maturation du système immunitaire de la peau, tout en
30 possédant une activité préférentielle pour la stimulation des métabolismes, des cellules de l'épiderme, en particulier des kératinocytes germinatifs, dont ils stimulent les sécrétions et les synthèses endocellulaires des molécules de structures "kératines de bas poids moléculaires et kératohyalines".

Cette série de conjugués peptidiques étant particulièrement indiquée, vers le traitement des maladies de la peau, liées à des déficits immunitaires, et en particulier, au traitement préventif et curatif, du vieillissement cutané d'ordre physiologique (âge) ou pathologique.

- 5 De préférence la séquence en acides aminés des conjugués peptidiques dérivés de la thymuline répond à la formule générale suivante:



- dans laquelle Gln représente la glutamine ou un dérivé de la glutamine,
10 Gly représente la glycine ou un dérivé de la glycine ; les dérivés comprennent notamment les dérivés halogénés des acides aminés en cause. Les acides aminés peuvent être sous forme naturelle ou non.

Selon l'un des aspects de l'invention, les conjugués peptidiques présenteront donc la formule suivante :

- 15
$$\text{A-X-Gln-Gly-Gly-Y} \quad (\text{III})$$

dans laquelle A est un composé de formule générale I ou II tel que défini précédemment, en particulier l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque ou la N-lypoyllysine.

- X est : Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Pyr-Ala-Lys-Ser, une liaison ou
20 Glx-Ala-Lys-Ser

dans laquelle Glx est : Pyro-Glu, Glu ou Gly et ses dérivés

- Y est : Ser-Asn-OH
Ser-Asn-NH₂
25 Ser-OH
Ser-NH₂

Les amino-acides étant sous la forme L, D ou DL

- 30 Dans les formules qui suivent, Pyr représente l'acide pyroglutamique.

De préférence, les conjugués peptidiques de formule III comportent une séquence d'au moins 4 acides aminés, en particulier de 4 à 9 acides aminés, celle-ci comprenant avantageusement la séquence Gln-Gly-Gly-Ser.

La présente invention concerne tout particulièrement les conjugués
5 suivants:

- | | |
|-------|---|
| I | A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH ₂ |
| II | A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH ₂ |
| III | A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH ₂ |
| IV | A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH ₂ |
| 10 V | A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH ₂ |
| VI | A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH ₂ |
| VII | A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH ₂ |
| VIII | A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH ₂ |
| IX | A - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH ₂ |
| 15 X | A - Gln - Gly - Gly - Ser - NH ₂ |
| XXIII | A-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH. |

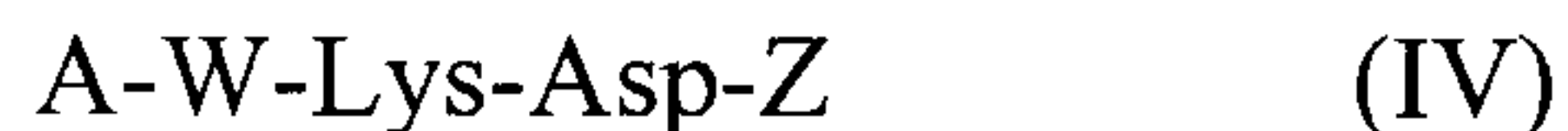
A étant défini précédemment ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.

20 Les séquences d'acides-amino mentionnées ci-dessus, peuvent être des séquences d'acides-amino naturels ou non naturels.

Il est également précisé que les conjugués peptidiques mentionnés ci-dessus et faisant l'objet de la présente invention, peuvent être obtenus sous la forme terminale NH₂ et sous la forme terminale OH.

25 De même, dans certains cas, il est possible que certains des ces acides-amino comportent des fonctions par exemple des glycosylations.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des conjugués peptidiques dérivés de la thymopoiétine et répondant à la formule générale suivante:



dans laquelle A est un composé de formule générale I ou II tel que défini précédemment ou le radical correspondant, et notamment l'acide acétique et ses dérivés, l'acide DL- α -lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, la N-lipoyl-lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et dérivés, l'acide trans-oxo-9-décène-2-oïque, l'acide trans-hydroxy-10-décène-2-oïque

W représente : Glu-Gln-Arg, Gln-Arg, Arg,
Arg-Lys-, Arg-Lys-Asp ou une liaison

Z représente : Val-Tyr-NH₂, Val-Tyr-OH

10 Val-NH₂, Val-OH, Tyr-OH, Tyr-NH₂,
OH ou NH₂

W et Z étant choisis de telle sorte que l'une au moins des séquences Arg-Lys-Asp ou Lys-Asp-Val est présente dans les composés de formule IV.

Des conjugués peptidiques de formule IV comportant la séquence
15 Arg-Lys-Asp-Val donnent d'excellents résultats.

Les acides aminés peuvent être sous forme D, L ou DL et peuvent être éventuellement glycosylés.

Des conjugués peptidiques particulièrement adaptés, et dont les activités biologiques sont complémentaires des conjugués peptidiques de
20 formule III, sont les conjugués de formule IV suivants :

- | | |
|-------|---|
| XI | A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XII | A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| XIII | A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XIV | A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| 25 XV | A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XVI | A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| XVII | A-Lys-Asp-Val-Tyr-NH ₂ |
| XVIII | A-Lys-Asp-Val-Tyr-OH |
| XIX | A-Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂ |
| 30 XX | A-Arg-Lys-Asp-Val-OH |
| XXI | A-Arg-Lys-Asp-NH ₂ |
| XXII | A-Arg-Lys-Asp-OH |

"A" étant défini précédemment ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters, ou d'amides.

Les séquences d'acides-amino mentionnés ci-dessus peuvent être des séquences d'acides-amino naturels ou non naturels.

5 Il est précisé que les conjugués peptidiques mentionnés ci-dessus peuvent être obtenus sous la forme terminale NH₂ ou OH.

Les conjugués peptidiques selon l'invention peuvent également se présenter sous forme de complexes moléculaires avec un métal, notamment le zinc.

10 Les conjugués selon l'invention pourront être obtenus par synthèse, par des techniques connues de l'homme du métier.

Les synthèses des peptides libres peuvent être effectuées d'après les techniques de MERRIFIELD, selon deux procédés.

15 Dans un premier procédé, on utilise un dérivé de la Glutamine protégé dans sa fonction d'amide γ par le "Mbh" 4,4-diméthoxybenzhydryl.

Dans un second procédé, la synthèse est effectuée sans protection de l'amide γ des résidus de la Glutamine.

20 En utilisant la première et la seconde procédure, la partie protégée C-terminale du dipeptide est associée respectivement au tétrapeptide protégé Ser-Gln-Gly et à l'hexapeptide protégé Ala-Lys-Gln-Gly-Gly.

Ainsi, la préparation des polypeptides de séquence

X-Gln-Gly-Gly-Y,

25 dans laquelle Y représente Ser-Asn et X représente Ser ou Ala-Lys-Ser, est effectuée en associant le dipeptide protégé Ser-Asn avec le peptide protégé X-Gln-Gly-Gly et par l'élimination consécutive possible des groupes protecteurs.

30 En utilisant la seconde procédure, c'est donc l'octapeptide Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn qui est obtenu, alors qu'en utilisant la première procédure, le même octapeptide est préparé à partir de l'hexapeptide Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn en passant par l'heptapeptide Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn.

L'octapeptide Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn permet alors de préparer les deux formes, par association du premier résidu PyroGlu ou Gln.

5 Le processus utilisé pour associer le résidu PyroGlu dans la séquence Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Y est le même quelles que soient les significations possibles de Y, à savoir Ser et Ser-Asn, et les significations possibles qui en sont dérivées par la modification d'un acide aminé, par exemple pour Ser-Asp, Ala-Asn.

10 Cette association est obtenue de manière avantageuse au moyen du dérivé PyroGlu-OTcp dans la séquence Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Y, dans laquelle certains acides aminés ont la possibilité d'être protégés dans leur fonction sur la chaîne latérale.

15 Les dérivés peptidiques faisant l'objet de la présente invention et précédemment décrits, peuvent être utilisés sous leur forme peptidique ou sous forme de conjugués, avec les acides carboxyliques précédemment décrits répondant à la formule générale I.

Ces mêmes conjugués peptidiques peuvent être utilisés sous forme de complexes moléculaires avec un métal.

20 Le métal utilisé pour la réalisation des complexes métallo-peptidiques de la présente invention est par exemple le Zinc, sous forme de ZnCl_2 qui peut être couplé sous forme de sel, avec un groupe carboxylique de l'acide terminal, ou sous forme de complexes "peptides- Zn^{2+} " dans les proportions suivantes de 0,5 à 5%, de préférence 1% de ZnCl_2 par molécule peptidique.

25 Ces proportions sont variables en fonction du poids moléculaire du conjugué peptidique.

Le complexe métallo-peptidique peut notamment être obtenu en solution à 10% de ZnCl_2 , pour une molécule peptidique, après chauffage à 20° C pendant 10 minutes.

30 Le complexe est ensuite purifié, par exemple sur colonne de biogel P-2, et élué avec de l'eau distillée et lyophilisé.

On obtient un colyophilisat stable contenant 1% de Zinc fixe à la molécule du peptide par affinité.

L'ensemble des composés selon la présente invention peut être utile à titre de médicament.

En particulier, les conjugués selon la présente invention peuvent servir à la préparation d'un médicament destiné à corriger les déficiences du système
5 immunitaire.

Des compositions pharmaceutiques peuvent contenir au moins un conjugué selon l'invention et des excipients adaptés à l'administration par voie parentérale ou par voie topique externe.

Ces compositions sont utilisables aussi bien dans le domaine de la
10 médecine humaine et vétérinaire, administrables par voie orale, ou parentérale, mais de préférence sous forme administrable par voie topique externe.

Des compositions particulièrement adaptées à la mise en oeuvre de l'invention sont celles contenant l'un des conjugués suivants :

15 . acide acétique-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂
. Pyr-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH
éventuellement sous forme de complexe avec un métal.

Les conjugués peptidiques faisant l'objet de l'invention, leurs dérivés et leurs compositions galéniques peuvent être présentés sous forme de crèmes, de
20 laits, de lotions ou de sprays, et comporter des excipients connus et éventuellement d'autres principes actifs.

Ils peuvent être utilisés seuls, ou sous forme d'associations ou de compositions galéniques pour le traitement des maladies auto-immunes dans les différents domaines de la dermatologie.

25 L'invention concerne également l'utilisation des conjugués peptidiques en dermocosmétologie et en cosmétologie.

La présente invention a donc pour objet des compositions galéniques, pharmaceutiques, et cosmétologiques comprenant au moins un des conjugués peptidiques décrit précédemment.

30 Les conjugués peptidiques de l'invention, leurs dérivés, leurs associations avec des principes actifs connus, peuvent être utilisés sous forme de préparations cosmétologiques et capillaires, notamment pour le rajeunissement et le renouvellement des couches superficielles de la peau, et en particulier pour le traitement cosméto-capillaire de la chute des cheveux.

RECEVÉ

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention, et notamment l'activité immunostimulante des peptides thymiques de synthèse administrés par voie topique, sans aucunement en limiter la portée.

5 Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1 : Action de l'ETF sur la synthèse de DNA.

Figure 2 : Action de l'ETF sur les cellules NK par voie topique (cellules cibles : YAC1). Le pourcentage de lyse est représenté aux jours 1, 3, 6, 9, 15, 18 et 21 de l'injection, pour les différents rapports cellules effectrices/cellules cibles.

Figure 3 : Action d'ETF sur les cellules NK par voie topique (cellules cibles P815).

Figure 4 : Action de l'ETF sur les cellules NK in vitro. Le pourcentage de lyse en fonction du rapport cellules effectrices/cellules cibles est donné pour différentes doses d'ETF.

Figure 5 : Action de l'ETF sur les cellules NK par voie injectable. Le pourcentage de lyse en fonction du rapport cellules effectrices/cellules cibles est représenté après stimulation par 15 µg d'ETF, et pour des animaux témoins.

Figure 6 : Rôle de l'interféron dans la stimulation des cellules NK par ETF par voie injectable. Le pourcentage de lyse est donné en fonction du rapport cellules effectrices/cellules cibles, en présence ou non d'anti-interféron.

Figure 7 : Action de l'ETF sur des cellules NK par voie injectable : cinétique de la réponse 1, 3 et 8 jours après administration de 15 µg ETF par voie intra-péritonéale.

EXEMPLE N° 1 - PREPARATION DU CONJUGUE N° II

30 A-Pyro-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-NH₂

A = acide DL Lipoïque

La synthèse est réalisée selon la méthodologie générale décrite selon les étapes suivantes :

- 1 - Boc-Gln-Gly-Gly-OMe
- 5 2 - Trifluoroacetate-Gln-Gly-Gly-OMe
- 3 - Z-Ser-NH-NH₂(But) -> Bop -> DIEA -> DMF
- 4 - Z-Ser-Glu-Gly-Gly-Ser-NH₂
- 5 - Acide Lipoïque -> BOP -> DIEA -> DMF
- 6 - Lipoyl-Pyro-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-NH₂

10

Analyse HPLC des amino-acides

Asp-1,02 ; Ser-1,77 ; Glu-1,0 ; Gly-2,00 ; Ala-0,91.

EXEMPLE N° 2 - PREPARATION DU CONJUGUE N° III

15

A-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH₂

A = Acide Adipique

La synthèse a été réalisée selon la méthodologie générale selon les étapes suivantes :

20

- 1 - Z-D-Ala-Lys-(Boc)-Ser(But) -> DMF
- 2 - Lys-(Boc)-Ser(But)-Gln(Mbh) -> DMF
- 3 - Gly-Gly-Ser(But)-Asn-O-But
- 4 - Me.OH -> CH₃COOH -> D-Ala-Lys(Boc)-Ser(But)-Gln(Mbh)
- 25 -> Gly-Gly-Ser-Asn(But)
- 5 - Acide Adipique -> BOP -> DIEA
- 6 - Adipoyl-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH₂

Analyse HPLC des amino acides

30 Asp-1,02 ; Ser-1,77 ; Glu-1,0 ; Gly-2,00 ; Ala-0,91.

EXEMPLE N° 3 - PREPARATION DU CONJUGUE N° 1

A-Pyro-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH₂

A = Acide Acétique

5 Ce conjugué est obtenu par la méthodologie décrite à l'exemple 1 à partir du dérivé :

Ala-Lys(Boc)-Ser(But-Gln-Mbh)-Gly-Gly-Ser(But)-Asn(But)
décrit précédemment.

10 On obtient un produit homogène par chromatographie dans les solvants G et H, à pH 2, 3.

Analyse HPLC des amino acides.

Asp-0,97 ; Ser-1,67 ; Glu-1,84 ; Gly-2,00 ; Ala-0,98.

15 EXEMPLE 4 - MESURE DE L'ACTIVITÉ SUR LES CELLULES DE LANGERHANS IA⁺ ET LES THYMOCYTES THY.1.2⁺ DE L'ÉPIDERME DES SOURIS C57-BL/6

I Résumé

20 Les kératinocytes des souris "C57-BL/6" stimulés par les dérivés peptidiques des hormones thymiques libèrent les médiateurs (messagers cellulaires) tels que l'ETAF, l'IL1 et IL6, qui induisent une activation de la réponse immunitaire des cellules immunocompétentes de l'épiderme, les cellules de Langerhans Ia⁺ et les Thymocytes Thy 1.2⁺.

25 La mesure de cette activation par les techniques d'immunofluorescence est caractéristique de l'activité immunomodulatrice des peptides thymiques.

I I Matériel et Méthode

30

1 - Echantillons expérimentés - Code : ETF

En solution dans propylène glycol à (c) = 10⁻⁵ M/ml

ETF - Peptide - n° I
ETF - Peptide - n° III
ETF - Peptide - n° XV
ETF - Peptide - n° XIX

5

témoin = propylène glycol

2 - Méthodologie

10 Des souris mâles C 57 - BL/6 âgées de 5 à 7 semaines, réparties à raison de 4 par cage, avec libre accès à l'eau et à la nourriture soumises à une photopériode de 12 h de lumière par 24 heures, reçoivent quotidiennement et pendant 5 jours consécutifs une application topique du peptide dans du propylène glycol (vol de 50 µl), sur la face dorsale de
15 l'oreille.

Le jour 6, les animaux sont sacrifiés. On procède au prélèvement des oreilles avec séparation de la face dorsale et de la face ventrale.

Les tissus de la face dorsale sont immergés dans de l'EDTA de Na (0,020 M) pendant 2 h à 37° C.

20 Après incubation, l'épiderme est prélevé sous forme de feuillet intact fixé à l'acétone et réhydraté dans du PBS (tampon phosphate).

Les CED (cellules épidermiques dendritiques) Thy 1-2 + et Ia + sont identifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte.

25 Le nombre de cellules par mm² est déterminé par les zones périphériques de même surface, pour chaque feuillet épidermique.

Les CED (cellules épidermiques dendritiques) portant le marqueur Ia+ ont été identifiées par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Ia+.

30 Les feuillets épidermiques sont fixés à l'acétone, puis incubés pendant 1 h à 37° C en présence de l'anticorps monoclonal anti-Ia+ et marqués par la méthode de l'immunoperoxydase indirecte (Kit).

Après incubation pendant 10 minutes à 37° C avec une solution d'amino-éthyl-carbazol, la préparation est lavée au PBS.

Les CED Thy 1.2+ ont été identifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte. Les feuillets épidermiques ont été fixés à l'acétone puis réhydratés dans le PBS.

Les tissus marqués simultanément par des anticorps de souris anti-Thy 1.2+ dilués au 1:100 pendant 16 h à 4° C. Les échantillons de tissus ont été lavés trois fois dans du PBS pendant 60 mn puis incubés 60 mn à 37° C, soit avec des anticorps de chèvre anti-souris couplés à la rhodamine, dilués au 1:20, soit avec des anticorps de chèvre anti-lapin couplés à la fluorescéine (fluorescine diluée au 1:20 dans le PBS. Les tissus ont ensuite été lavés dans le PBS avant d'être montés comme décrit précédemment).

Les témoins comportaient des feuillets épidermiques non marqués à l'anticorps primaire et incubés uniquement en présence des réactifs secondaires, afin de mettre en évidence d'éventuelles réactions croisées avec les anticorps conjugués à la rhodamine et à la fluorescéine.

Le nombre de cellules de Langerhans Ia+ ou de CED Thy 1.2+ par millimètre carré a été déterminé dans quatre zones périphériques de même surface pour chaque feuillet épidermique, par immunofluorescence, au microscope confocal Zeiss équipé à cet effet. Au moins quatre animaux ont été étudiés dans chacun des groupes. La densité de cellules de Langerhans Ia+ et de CED Thy 1.2 + est indiquée pour chaque mesure.

3 - Résultats

Les résultats résumés dans le tableau I montrent que ETF et ses homologues, administrés par voie topique à des souris C 57 BL/6 augmentent de façon hautement significative, l'activité des cellules résidentes du système immunitaire cutané.

On observe notamment une augmentation significative des phénotypes des cellules dendritiques épidermiques de Langerhans Ia+ - (HLADR) à des doses de 0,1 à 1 nanogrammes.

Parallèlement, on observe également une augmentation significative de l'activité des thymocytes épidermiques de phénotype Thy 1.2 +, c'est à dire ETAF dépendants, à des doses identiques.

La réponse immunitaire cutanée est sous la dépendance de l'activité
5 des Kératinocytes nucléés qui secrètent l'ETAF et les médiateurs de
l'immunité, c'est à dire le 2ème signal sans lequel il n'y a pas de fonction
immunitaire physiologique normale (Immuno-dermatologie L.D.H.). On
peut considérer que l'ETF et ses homologues, rétablissent les fonctions
immunitaires de l'épiderme par activation des Kératinocytes des couches
10 basales de façon physiologique, par opposition à la stimulation
antigénique exogène.

Résultats exprimés sur 4 lots de 4 souris C 57 BL/6

Nombre de cellules Thy 1,2+ et Ia+ par mm² d'épiderme

Echantillons	Doses Nanog.	Cellules Thy 1,2+				Moyenne	%	Cellules Ia+				Moyenne	%
		1	2	3	4			1	2	3	4		
Témoins PG		80	76	87	110	88,25		98	102	100	110	102,50	
ETF-I	0,10	197	180	192	207	194,00	120	368	388	378	395	382,25	273
	0,50	200	208	199	219	206,50	134	360	392	386	399	384,25	275
	1,00	214	210	208	226	214,50	143	372	410	390	412	396,00	286
ETF-III	0,10	168	165	180	176	172,25	95	376	382	387	399	386,00	277
	0,50	190	190	205	200	196,25	122	380	388	299	388	363,75	255
	1,00	200	220	216	210	211,50	140	305	400	398	410	378,25	269
ETF-XV	0,10	160	158	160	170	162,00	84	315	326	320	330	322,75	215
	0,50	176	168	170	186	175,00	98	305	345	330	345	331,25	223
	1,00	198	180	188	199	191,25	117	348	360	348	350	351,50	243
ETF-XIX	0,10	216	210	219	212	214,25	143	360	390	378	320	362,00	253
	0,50	220	215	228	216	219,75	149	388	398	386	400	393,00	283
	1,00	227	238	230	225	230,00	161	400	410	438	415	415,75	306

EXEMPLE 5 - MESURE DE L'ACTIVITÉ ET N° IX SUR LES KÉRATINOCYTES DE PEAU HUMAINE ISSUS DE PRIMOCULTURE

I Matériel et Méthode

5

1 - Modèle Cellulaire

Culture des Kératinocytes humains normaux

10

- Sources : Plastie mammaire

- Primoculture : Les tissus fraîchement biopsiés, en asepsie totale, sont digérés à + 4° C dans la trypsine 0,25%, afin de séparer l'épiderme du derme.

15

L'épiderme est ensuite dissocié sous action mécanique douce ou enzymatique afin d'obtenir des cellules individualisées. Seules les cellules basales seront capables de se multiplier in vitro.

La culture est réalisée en atmosphère humide contrôlée (95% O₂ - 5% CO₂) à 37° C.

20

En culture monocouche, la concentration en calcium se situe entre 0,05 et 0,1 mM. Dans ces conditions, les Kératinocytes prolifèrent rapidement mais ne forment pas de strates. La synthèse des kératinocytes est maintenue. Les espaces intercellulaires sont larges : les connections cellulaires sont assurées par les microvillosités et non par les tight-junctions. Les tonofilaments de l'espace périnucléaire sont visibles mais ils ne sont pas encore rattachés aux plaques d'encrage.

25

La stratification peut être induite par une augmentation de la concentration finale en calcium dans le milieu de culture jusqu'à 1,2 mM. Alors la formation de desmosomes apparaît au bout de 2 heures.

30

Le taux de sodium et de potassium intracellulaire augmente dès la 12ème heure, de plus, il n'est pas bloqué par les inhibiteurs classiques du flux Ca²⁺/Na⁺.

La stratification verticale est visible au bout de 2 jours et la différenciation terminale s'achève par des cellules à enveloppe cornifiée.

(Hennings et coll. 1980).

5

2 - Echantillons analysés

- I - Dérivé ETF n° IX, lyophilisé-dans Dextran (40g/l) 10^{-6} M dans milieu de culture final.
- 10 II - Thymopoïétine Crist. SIGMA - 10^6 M dans milieu de culture final.
- III - Témoin : Dextran 15.000 D - (40g/l).
- IV - Protéines cellulaires - Sol. de broyat cellulaire de référence à 50 microgrammes par ml.

15 3 - Méthodologie

La culture de kératinocytes humains est réalisée comme décrit par Henning et coll (1983) ou Fuchs et coll (1981). On effectue également des cultures air-liquide selon la méthodologie suivante.

20

- Lattices de collagène sur grille

Du collagène de type I ou IV est incorporé au milieu de culture.

Des fibroblastes 3T3 sont ajoutés à cette solution à la concentration de $1,5 \cdot 10^5$ /ml etensemencés en boite de pétri de 35 mm qui sont ensuite placées à 37° C.

25

Après la formation du gel, du milieu est rajouté de façon à recouvrir entièrement les lattices. Les kératinocytes sontensemencés et maintenus ainsi en culture immergée durant 7 jours.

A ce stade les lattices sont transférées sur des grilles en acier inoxydable. Ces grilles sont placées dans des boites contenant du milieu pendant 7 à 24 jours.

30

- Membrane basale artificielle

Des cellules endothéliales de cornée de boeuf sont cultivées sur des filtres recouverts de collagène. Après stimulation avec un facteur de croissance type FGF, ces cellules sécrètent du collagène IV et de la laminine, ainsi que d'autres molécules qui se déposent sur le collagène reconstituant ainsi une pseudo-membrane basale.

Après élimination des cellules endothéliales bovines, les kératinocytes sontensemencés sur ce support.

10 - Derme artificiel

Des fibroblastes sont incorporés dans un gel de collagène. Après rétraction du gel, les kératinocytes sontensemencés sur cette lattice.

- Membrane basale du derme

Des fragments de peau humaine sont désépidermisés par immersion pendant 5 jours dans du PBS à 37° C. Après un tel traitement l'épiderme se détache complètement au dessus de la membrane basale. Des congélations et décongélations successives vont tuer les fibroblastes. Ce tissu, comportant le derme et la basale, servira de couche nourricière pour les kératinocytes.

Culture sur :		Kératohyaline	Kératine 67 kD
25	1. Plastique + immersion	-	-
	2. Filtre couvert de coll. I ou IV	I E	- -
30	3. Filtre couvert de mem- -brane basale artificielle	I E	- -
	4. Derme artificiel	I E	± ++
	5. Derme naturel désépider- -misé et tué	I E	± ++

I = Immergé

E = Emergé

Le contrôle de différenciation de l'épiderme est effectué par microscopie électronique (Prunieras, 1988), par analyse biochimique (Tinois et coll, 1993) et par analyse immunologique (Woodcock et coll, 1982, Prunieras, 1988). Cette dernière peut mettre en jeu des anticorps anti-
5 involucrine, anti-transglutaminase épidermique, anti-filaggrine et anti-kératines (AE1, AE2, AE3).

Les kératines 48 Kd sont les marqueurs de la prolifération.

Les kératines 50 et 58 Kd sont les marqueurs permanents des
kératines.

10 Les kératines 56,5 et 65/67 Kd sont les marqueurs de la différenciation.

Les marqueurs cellulaires choisis sont les Kératines de bas poids moléculaire 46/47 KD spécifiques de la croissance des cellules germinatives et de leur différenciation cellulaire.

15 Les filaggrines marqueurs de la Kératohyaline.

Marquage fluorescent indirect selon la technique de sandwich - 48 heures après l'apport de calcium au milieu de culture (stratification).

I - Anticorps primaires "SIGMA"

20

- Ac de rat antikératine humaine 46-47 KD.
- Ac humain antikératine humaine 56,5/68 KD
- Ac humain antikératohyaline (Filaggrine)

25 II - Anticorps secondaires "SIGMA"

- Ac de souris anti Ig G2 de rat marqués FITC.
- Ac de chèvre anti Ig G humaine marqué FITC.

30

* *Dosages microscopiques*

- "Microscope ZEISS Confocal Laser Scanner"
- Epi-fluorescent - LSM 310
- Mesure des marqueurs cellulaires par immunofluorescence, avec enregistrement graphique.

35

* *Dosages spectrofluorimétriques*

- "Spectrofluorimètre Perkin Elmer LS - 50 B".
- Sur broyat surnageants cellulaires.

5

* *Dosages des protéines cellulaires*

- Technique de LOWRY au spectrophotomètre UV Perkin Elmer (surnageants de broyats cellulaires).

10 I I Résultats

Les tableaux n° II et III résument l'activité du peptide n° IX "ETF" sur la croissance des cellules germinatives des couches basales et suprabasales de l'épiderme - "Kératinocytes jeunes".

15 L'intensité de fluorescence des cellules traitées par ETF n°IX est apprécié comparativement à l'intensité de fluorescence des témoins.

On observe une augmentation significative des cellules pré-Kératinocytaires germinatives et de leur activité métabolique. En particulier au niveau des synthèses de Kératine de bas poids moléculaire et
20 des Kératohyalines "Filaggrines", de structures semblables à celle de la medulla du thymus.

Tableau II "Résumé"

Action de l'ETF sur la synthèse kératinocytaire de la kératine 46-47 KD et des protéines cellulaires comparativement à un témoin (exprimés en microgrammes/ml).

Produit	Concentration M	Kératine /Protéine Moyenne	Kératine /Protéine Ecart Type	Stimulation %
Thymo- poïétine	10 ⁻⁶	94,8	3,4	19
ETF N°-IX	10 ⁻⁶	151,5	14,9	90
	10 ⁻⁸	156,0	13,2	95
	10 ⁻¹⁰	148,9	22,9	86
	10 ⁻¹²	113,0	5,6	41

Tableau III "Résumé"

Action de l'ETF sur la synthèse kératinocytaire de la kératohyaline et des protéines comparativement à un témoin (exprimés en microgrammes/ml).

Produit	Concentration M	Kératohyaline /Protéine Moyenne	Kératine /Protéine Ecart Type	Stimulation %
Thymo- poïétine	10 ⁻⁶	4,99	0,54	35
ETF N°-IX	10 ⁻⁶	5,97	0,12	62
	10 ⁻⁸	6,75	0,66	83
	10 ⁻¹⁰	5,13	0,25	39
	10 ⁻¹²	5,11	0,39	38

EXEMPLE N° 6 - ACTION DE L'ETF SUR LES GRANULOCYTES
"MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM"

I Introduction

5

La réponse immunitaire de l'Epiderme est sous la dépendance des Kératinocytes et des cellules de Langerhans, en association avec d'autres lignées cellulaires "granulocytes-thymocytes" etc...

10 Les cellules de Langerhans sont considérablement moins compétentes pour la phagocytose que les kératinocytes, Ce qui les différencie formellement des macrophages".

Elles sont semblables, phénotypiquement et fonctionnellement des cellules "voilées" (Veiled Cells) de la lymphe afférente et des cellules interdigitalisées des nodules lymphatiques.

15 L'action des cellules de Langerhans est le résultat d'une coopération cellulaire, en particulier avec les cellules granulocytaires "phagocytes" sous la dominante des kératinocytes.

20 Il était donc intéressant d'apprécier l'activité de l'ETF, sur l'activité phagocytaire des granulocytes polymorphonucléaires et des systèmes cellulaires voisins, notamment des cellules NK (ENKAF, Epidermal Cell derived Natural Killer Activating Factor).

II - Action de l'ETF sur les granulocytes sanguins

25 1) Protocole :

Des cellules polymorphonucléaires de sang périphérique humain (granulocytes neutrophiles), à une concentration de 10^6 cellules/ml, sont préincubées 20 mm à 37° C avant l'addition de luminolet de particules de
30 zymosan opsonisées par du sérum.

La chimiluminescence est mesurée toutes les 3 minutes après l'addition du dernier réactif. Les résultats représentent la moyenne de 5 mesures indépendantes pour chaque point. (Déviation standard inférieure à 5% de moyenne).

5

Deux systèmes sont utilisés :

A. L'agent inducteur est le peptide ETF n°I présent pendant toute la durée de l'essai.

10

Des granulocytes normaux de sang périphérique humain, enrichis par sédimentation en dextrane et débarrassés des érythrocytes par lyse hypotonique. L'ETF est testé à des concentrations de 10, 1 et 0,1 µg/ml.

15 B. L'agent inducteur ETF est éliminé par lavage après préincubation et avant l'addition des réactifs chimiluminescents.

20 Granulocytes normaux de sang périphérique humain purifiés par décantation sur dextrane et lyse hypotonique des érythrocytes. ETF est incubé 20 mm à 37° C avec les granulocytes puis éliminés par lavage avant l'addition de zymosan opsonisé et de luminol.

2 - Résultats : (les valeurs représentent la moyenne de 5 mesures)

25 Système A

Traitement des cellules	Valeurs de chimiluminescence à : (mm)						
	3	6	9	12	15	18	21
30 PBS	22 966	77 598	140 423	178 951	198 063	191 781	188 531
ETF 10µg/ml	<u>79 358</u>	<u>140 100</u>	<u>170 947</u>	183 578	174 710	160 718	137 798
1µg/ml	<u>59 867</u>	<u>138 846</u>	<u>183 578</u>	207 713	203 449	188 901	168 813
0,1µg/ml	29 205	86 761	143 463	176 924	193 589	188 573	179 449

35

Système B

Traitement		Valeurs de chimiluminescence à : (mm)				
des cellules		6	9	12	15	18
5	PBS	69 924	114 751	144 83 8	162 594	164 750
	ETF 10µg/ml	<u>103 105</u>	<u>119 677</u>	125 307	119 952	112 499
	0,1µg/ml	100 532	124 819	134 788	129 950	133 707

3 - Conclusions :

- A. ETF a un impact considérable sur la potentialisation de la chimiluminescence dès les premiers instants, à des concentrations de 10 et 1 µg/ml.
- B. Même après lavage, ETF induit une activation significative des granulocytes à 10 et 0,1 µg/ml.

10 EXEMPLE 7 - ACTION DE L'ETF SUR LA SYNTHÈSE DU DNA

I - Protocole - Echantillon Peptide ETF n° VII

Un pool de cellules spléniques de souris normales est obtenu et incubé dans des microplaques avec ETF seul à des doses croissantes. Le DNA est dosé à J1, J3, J5.

Les résultats sont présentés sur la figure 1.

I I Conclusions

20

L'ETF montre une réponse très nette, proportionnelle à la dose. La plus forte dose utilisée (10 µg/ml) donne la plus grande synthèse de DNA à tous les jours du contrôle avec un maximum au 3ème jour. Il faut noter, toutefois, que les valeurs de base sont supérieures au 3ème jour, la réponse spécifique est peut-être en réalité plus précoce.

25

EXEMPLE 8 - ACTION D'ETF SUR LES CELLULES FORMANT DES PLAGES DE LYSE (PFC)

30 I Protocole

50 souris Balb/C recevant 5 µg d'ETF par voie s.c. 10⁸ GRM (globules rouges de mouton) dans 0,1 ml de PBS sont injectés par voie i.v. 20, 10, et 3 jours après ETF ou 2 jours auparavant. Technique PFC de Cunningham et Szenberg.

35

I I Résultats

Nombre de PFC pour 10^6 cellules spléniques.

5	Traitement	Date d'immuno- stimulation	Nombre de PFC à			
			J+3	J+4	J+5	J+6
10	Témoins GRM	0	86	509	374	119
	ETF 5 μ g s.c.	J-20	69	438	318	84
		J-10	<u>323</u>	<u>823</u>	337	104
		J-3	57	399	353	129
		J+2	119	410	336	135
15						

III Conclusions :

On observe une réponse qui présente un maximum à J + 4 avec une augmentation importante, très significative, du nombre de PFC chez les animaux ayant reçu de l'ETF 10 jours avant l'antigène.

EXEMPLE 9 - ACTION D'ETF SUR LES CELLULES NK

I Action d'ETF sur les cellules NK - voie topique

1 - Protocole général voie topique :

- souris CBA/H (90 souris)
- cellules cibles :
- * YAC-1 sensibles aux NK
 - * P 815 non sensibles aux NK
 - * ETF n° VII

Les souris reçoivent chaque jour par voie topique 15 µg d'ETF en solution dans du Propylène Glycol à 10^{-5} M/ml, pendant 14 jours consécutifs. Une dose identique de rappel est administrée le 18ème jour.

La mesure de l'activité lytique est faite tous les 3 jours par comptage du ^{51}Cr libéré pour des rapports cellules effectrices : cellules cibles de 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1, pendant 4 heures d'incubation.

Les résultats sur les cellules NK par voie topique sont présentés sur les figures 2 et 3.

Les résultats sont extrêmement nets. On constate, en fonction du temps, après le début du traitement par ETF, une augmentation hautement significative de l'activité NK. Cette activité qui est décelable dès le 3ème jour devient très importante au 6ème et au 9ème jour et se maintient à un niveau très élevé pendant toute la durée de l'expérimentation (21 jours).

2 - Conclusions

Aucune cytotoxicité non spécifique sur les cellules P 815 n'est décelable à aucun moment de l'expérimentation. Ceci exclut que l'administration de l'ETF conduise à l'induction de cellules de nature cytolytique non spécifique ou à l'activation polyclonale des cellules T cytolytiques.

I I Action d'ETF sur les cellules NK - In vitro

1 - Protocole de l'essai "in vitro"

Cellules spléniques normales de souris CBA. Incubateur à 37° C + CO₂ 10⁷ cellules par ml de milieu RPMI 1640 + 5% de sérum foetal de veau. Incubation avec des quantités variables de la substance à étudier. Cellules cibles YAC-1.

La mesure de la lyse est faite par comptage du ^{51}Cr libéré pour des rapports cellules effectrices/cellules cibles de 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1 pendant 4 heures d'incubation.

Les résultats sont présentés sur la figure 4.

5

2 - Conclusions :

ETF stimule très fortement l'activité des cellules NK in vitro de façon proportionnelle à la dose.

10

A une concentration de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, l'activité de l'ETF est encore très supérieure à 25 $\mu\text{g/ml}$ de poly I : C.

(Activité au moins 100 fois supérieure à celle du produit de référence poly I : C, inducteur d'interféron).

15

III Action d'ETF sur les cellules NK - Voie injectable

1- Protocole général voie injectable :

Souris CBA/H de 4 à 5 mois. (140 souris)

20

cellules cibles :

*YAC-1 sensibles aux NK (lymphome induit/virus moloney)

* P 815 insensibles aux NK (DBA/2 mastocytoma)

25

La substance à tester (ETF n°VII) est injectée par voie i.p. dans 0,2 ml de PBS, 24 heures avant le test. La mesure de la lyse est faite par comptage du ^{51}Cr libéré pour des rapports cellules effectrices : cibles de 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1 pendant 4 heures d'incubation.

2 - Résultats NK/voie injectable

30

Les résultats de l'activité de stimulation des cellules NK par ETF sont représentés sur la figure 5. Ils montrent une forte activation des cellules NK, très significative ($P < 0,01$), chez les animaux ayant reçu l'ETF (15 mg/i.p.) par rapport aux témoins. Pas de cytotoxicité non spécifique sur les P815.

35

Sur la figure 6, on voit que l'activation des cellules NK par ETF est due à un effet inducteur d'interféron. On observe une réduction drastique des cellules NK lors de l'administration simultanée d'anti-interféron (α -IF).

5 La cinétique de la réponse des cellules NK aux jours 1, 3 ou 8 de l'injection, par rapport à un témoin PBS, est représentée sur la figure 7. La stimulation des cellules NK par EFT est de courte durée par voie injectable.

Chez les animaux jeunes (7 à 9 mois), ETF stimule à la fois les cellules NK et pré-NK de façon identique à des doses de tilorone de 1 mg par animal.

LEGENDES DES FIGURESFigure 1 :

5 ETF. Synthèse du DNA

Figure 2 :

ETF. Cellules NK/voie topique

10

○-----○ traités/ETF
●-----● témoins

Figure 3 :

15

ETF. Cellules NK/voie topique

●-----● témoins
○-----○ traités

20

Figure 4 :

ETF : cellules NK 'in vitro'

Comparaison ETF 0,1 --> 100 µg/ml

25 avec Poly I : C 25 µg/ml

○-----○----- Poly I : C 25 µg/ml (témoin +)
---------- PBS (témoin -)
●-----●----- ETF 0,1 µg/ml
+-----+----- ETF 1,0 µg/ml
□-----□----- ETF 10,0 µg/ml
Δ-----Δ----- ETF 100,0 µg/ml

30

Figure 5 :

ETF. Cellules NK voie injectable

5 Figure 6 :

ETF. Cellules NK voie injectable

Rôle de l'interféron dans la stimulation des cellules NK par ETF

10

Figure 7 :

ETF. Cellules NK voie injectable

15 Cinétique de la réponse NK ETF

Test NK 1, 3 ou 8 jours après 15 µg ETF voie (i.p.)

20

25

30

BIBLIOGRAPHIE

- 5 E. TINOIS, H. DUMAS, Q. GAETANI, D. DUPONT,
X.POURADIER DUTEIL, A. ROUGIER
Nouv. Dermatol. 12 n° 7, 510, 1993.
- 10 H. HENNING, K.A. HOLBROOK, S.H. YUSPA
The J. of Invest. Dermatol. 81 50-55, 1983.
- E. FUCHS, H. GREEN
CELL, 25 617-625, 1981.
- 15 M. PRUNIERAS
Méthodes in vitro en pharmaco-toxicologie, Colloque INSERM 170 67-76,
1988.
- 20 J. WOODCOCK-MITCHELL, R. EICHNER, W.G. NELSON, T. SUN
The J. of Cell Biol., 95 580-588, 1992.

36a

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT EUROPEEN DE BIOLOGIE CELLULAIRE
- (B) RUE: 18, AVENUE DE L'EUROPE
- (C) VILLE: RAMONVILLE ST AGNE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 31520

(ii) TITRE DE L' INVENTION: CONJUGUES PEPTIDIQUES DERIVES DES HORMONES THYMIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 21

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE: PCT/FR96/01812
- (B) DATE DE DEPOT: 15-NOV-1996

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9513544
- (B) DATE DE DEPOT: 15-NOV-1995

(viii) INFORMATIONS CONCERNANT L'AGENT:

- (A) NOM: CÔTÉ, France
- (B) NUMÉRO D'INSCRIPTION: 4166
- (C) NUMÉRO DE RÉFÉRENCE: 7091-314 FC/ntb

(ix) INFORMATION DE TÉLÉCOMMUNICATION:

- (A) TÉLÉPHONE: (514) 845-7126
- (B) TÉLÉCOPIE: (514) 288-8389
- (C) TÉLEX:

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 9 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: site modifié
- (B) EMBLEMMENT:1

36b

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Pyr-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:9

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Asn-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Xaa Ala Lys Ser Gln Gly Gly Ser Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 8 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Pyr-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:8

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Ser-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Xaa Ala Lys Ser Gln Gly Gly Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 8 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Ala"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

36c

(B) EMPLACEMENT:8

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Asn-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Xaa	Lys	Ser	Gln	Gly	Gly	Ser	Xaa
1				5			

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 7 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Ala-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:7

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Ser-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Xaa	Lys	Ser	Gln	Gly	Gly	Xaa
1				5		

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 7 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Lys-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:7

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Asn-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

36d

Xaa Ser Gln Gly Gly Ser Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 6 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:1
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Lys-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:6
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Ser-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Xaa Ser Gln Gly Gly Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 6 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:1
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Ser-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:6
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Asn-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Xaa Gln Gly Gly Ser Xaa
1 5

36e

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:1
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Ser-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:5
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Ser-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Xaa Gln Gly Gly Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:1
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Gln-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:5
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Asn-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Xaa Gly Gly Ser Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 4 acides aminés

36f

- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMBLACEMENT:1
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Gln-"

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMBLACEMENT:4
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Ser-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Xaa Gly Gly Xaa
1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 7 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMBLACEMENT:1
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Glu-"

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMBLACEMENT:7
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Tyr-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Xaa Gln Arg Lys Asp Val Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 7 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

36g

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMPLACEMENT:1
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Glu-"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Xaa Gln Arg Lys Asp Val Tyr
 1 5

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 6 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMPLACEMENT:1
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Gln-"

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMPLACEMENT:6
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Tyr-NH2"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

Xaa Arg Lys Asp Val Xaa
 1 5

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 6 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Site modifié
 - (B) EMPLACEMENT:1
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Gln-"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

36h

Xaa Arg Lys Asp Val Tyr
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:1
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Arg-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:5
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Tyr-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

Xaa Lys Asp Val Xaa
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Site modifié
- (B) EMPLACEMENT:1
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Arg-"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

Xaa Lys Asp Val Tyr
1 5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 4 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé

36i

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Lys-"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:4

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Tyr-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

Xaa Asp Val Xaa

1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 4 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Lys-"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

Xaa Asp Val Tyr

1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 4 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Arg-"

36j

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:4

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie -Val-NH2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

Xaa Lys Asp Xaa

1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 4 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Arg-"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

Xaa Lys Asp Val

1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 7 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: Site modifié

(B) EMPLACEMENT:1

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "Xaa signifie A-Ala-"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

Xaa Lys Ser Gln Gly Ser Asn

1

5

REVENDICATIONS

1. Composition pour l'administration par voie topique, **caractérisée en ce que qu'elle contient :**

(i) au moins un conjugué peptidique, qui comprend une séquence d'au moins 3 acides aminés dérivés d'une hormone thymique choisie parmi la thymuline et la thymopoïétine, les acides aminés pouvant être indépendamment sous forme D, L ou DL,

ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi :

- les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou ramifié, , pouvant comporter une ou plusieurs insaturations,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ; ou

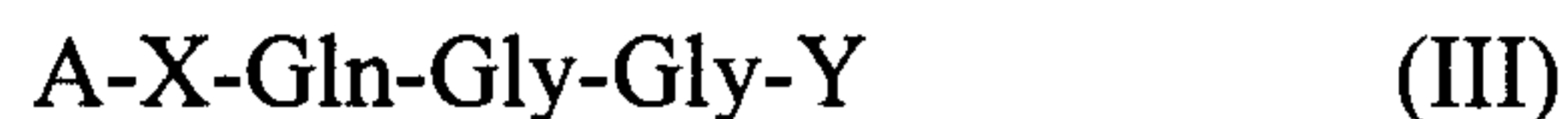
- les acides dicarboxyliques de formule générale



dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant au moins 3 atomes de carbone, droit ou ramifié, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations, R₁ pouvant former un cycle avec l'une des fonctions acides,

(ii) en combinaison avec au moins un parmi un excipient pharmaceutiquement acceptable et un excipient cosmétologiquement acceptable, adapté à l'administration par voie topique externe,

et en ce que le conjugué présente la formule générale :



dans laquelle

A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant ;

- X est : Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Pyr-Ala-Lys-Ser, une liaison ou Glx-Ala-Lys-Ser dans laquelle Glx est : Pyro-Glu, Glu ou Gly et ses dérivés ;

- Y est : Ser-Asn-OH,
Ser-Asn-NH₂,
Ser-OH, ou

Ser-NH₂;

les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

ou le conjugué présente la formule générale



dans laquelle

A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant ;

W représente : Glu-Gln-Arg, Gln-Arg, Arg,
Arg-Lys-, Arg-Lys-Asp ou une liaison ;

Z représente : Val-Tyr-NH₂, Val-Tyr-OH,
Val-NH₂, Val-OH, Tyr-OH, Tyr-NH₂,
OH ou NH₂ ;

l'une au moins des séquences Arg-Lys-Asp ou Lys-Asp-Val étant présente,

les acides aminés étant sous forme D, L ou DL,

à l'exception des conjugués peptidiques de formule suivante :

XI A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂

XII A-Glu-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH

XIII A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂

XIV A-Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH

XV A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-NH₂

XVI A-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH.

2. Composition selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀ substitué.

3. Composition selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** R₁ représente un radical aliphatique divalent comprenant 3 à 10 atomes de carbone.

4. Composition selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant au moins 3 atomes de carbone, droit ou ramifié, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations substitué.

5. Composition selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** R₁ représente un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisée en ce que** R_1 représente un radical aliphatique divalent substitué par un ou plusieurs groupes amino, hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C_1 - C_3 .

7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, **caractérisée en ce que** dans la formule générale I, R peut représenter :

- un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



dans laquelle R_2 peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone;

- un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C_1 - C_{20} substitué ou non, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :

NH_2 , OH, oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C_1 à C_3 .

8. Composition selon la revendication 7, **caractérisée en ce que** R_2 peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant 6 à 16 atomes de carbone.

9. Composition selon la revendication 7, **caractérisée en ce que** R_2 peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié au moins 6 atomes de carbone substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.

10. Composition selon la revendication 7, **caractérisée en ce que** le radical aliphatique linéaire ou ramifié en C_1 - C_{20} soit un radical alkyl, alkényl ou alkynyl.

11. Composition selon la revendication 7, **caractérisée en ce que** lesdits cycles sont substitués par un méthyle.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, **caractérisée en ce que** dans la formule II, R_1 représente un reste alkylène en C_4 - C_8 .

13. Composition selon la revendications 1 à 12, **caractérisée en ce que** R_1 représente un reste alkylène en C_4 - C_8 substitué.

14. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, **caractérisée en ce que** les acides de formule générale I ou II sont choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide DL lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque et dérivés, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras α -mono-insaturés pour lesquels " R_2 " représente un reste alkyle, linéaire ou ramifié en C_7 , et les acides hydroxydécénoïques et décénoïliques.

15. Composition selon la revendication 14, **caractérisée en ce que** les acides de formule générale I ou II sont choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide DL-Lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, l'acide N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy- Δ^2 -décénoïque et l'acide trans-oxo-9-décénoïque.

16. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, **caractérisée en ce que** la séquence d'acides aminés est liée à l'acide ou au dérivé de formule I ou II, sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

17. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, **caractérisée en ce que** le conjugué est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

- I A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH_2 ;
- II A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH_2 ;
- III A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH_2 ;
- IV A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH_2 ;
- V A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH_2 ;
- VI A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH_2 ;
- VII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH_2 ;
- VIII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH_2 ;
- IX A - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH_2 ;
- X A - Gln - Gly - Gly - Ser - NH_2 ;

XVII A-Lys-Asp-Val-Tyr- NH₂;

XVIII A-Lys-Asp-Val-Tyr-OH;

XIX A-Arg-Lys-Asp-Val- NH₂;

XX A-Arg-Lys-Asp-Val-OH;

XXI A-Arg-Lys-Asp- NH₂;

XXII A-Arg-Lys-Asp-OH; et

XXIII A-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH,

A étant un composé de formule I ou II, ou le radical correspondant,
les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou DL.

18. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, **caractérisée en ce qu'**au moins une partie des acides aminés est sous forme glycosylée.

19. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, **caractérisée en ce qu'**au moins un conjugué est sous forme de complexe métallopeptidique lié chimiquement ou physiquement à un sel de Zinc.

20. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, **caractérisée en ce qu'**elle contient le conjugué suivant :

Pyr-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH.

21. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 pour la préparation d'un médicament destiné à corriger les déficiences du système immunitaire.

22. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 pour la préparation d'une composition destinée au traitement et à la prévention de la chute des cheveux.

23. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, **caractérisée en ce qu'**il s'agit d'une préparation à usage dermatologique, utilisable sous forme de crèmes, de laits, de lotions, de sprays, en administration topique pour le traitement préventif et curatif des alopecies.

24. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, **caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition dermocosmétique.**

25. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 ou 24, **caractérisée en ce qu'il s'agit d'une préparation dermocosmétique ou cosmétique, à l'usage des soins de beauté et du rajeunissement cutané en applications locales, utilisables sous forme de crèmes, de gels, de laits, de lotions et de sprays.**

26. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 ou 24, **caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations cosméto-capillaires destinées à la prévention et au traitement de la chute des cheveux, applicables localement sous forme de lotions, de sprays, et d'ampoules lyophilisées, avec solvant, pour applications locales.**

27. Conjugué peptidique susceptible d'entrer dans une composition selon l'une quelconque des revendication 1 à 20, 23 à 26, **caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'au moins 3 acides aminés dérivés de la thymuline, les acides aminés pouvant être indépendamment sous forme D, L ou DL,**

ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi :

- les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou ramifié, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ; et

- les acides dicarboxyliques de formule générale



dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant au moins 3 atomes de carbone, droit ou ramifié, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations, R₁ pouvant former un cycle avec l'une des fonctions acides,

et en ce qu'il présente la formule générale



dans laquelle

A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant

- X est : Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Pyr-Ala-Lys-Ser, une liaison ou Glx-Ala-Lys-Ser dans laquelle Glx est : Pyro-Glu, Glu ou Gly et ses dérivés

- Y est : Ser-Asn-OH
Ser-Asn- NH₂
Ser-OH
Ser- NH₂

les acides aminés étant sous forme D, L ou DL.

28. Conjugué peptidique selon la revendication 27, **caractérisée en ce que** R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀ substitué.

29. Conjugué peptidique selon la revendication 27, **caractérisée en ce que** R₁ représente un radical aliphatique divalent comprenant 3 à 10 atomes de carbone.

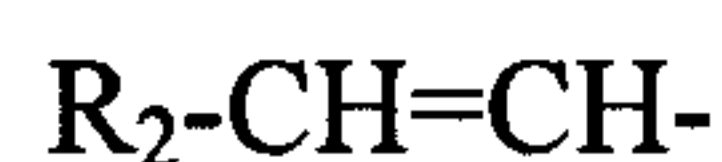
30. Conjugué peptidique selon la revendication 27, **caractérisée en ce que** R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant au moins 3 atomes de carbone, droit ou ramifié, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations substitué.

31. Conjugué peptidique selon la revendication 27, **caractérisé en ce que** R₁ représente un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène.

32. Conjugué peptidique selon l'une quelconque des revendications 27 à 31, **caractérisé en ce que** R₁ représente un radical aliphatique divalent substitué par un ou plusieurs groupes amino, hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C₁-C₃.

33. Conjugué peptidique selon l'une quelconque des revendications 27 à 32, **caractérisé en ce que** dans la formule générale I, R peut représenter :

- un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



dans laquelle R₂ peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone;

- un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C_1 - C_{20} substitué ou non, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :

NH_2 , OH , oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C_1 à C_3 ,

et dans la formule générale II, R_1 représente un reste alkylène en C_4 - C_8 .

34. Conjugué peptidique selon la revendication 33, **caractérisée en ce que** R_2 peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant 6 à 16 atomes de carbone.

35. Conjugué peptidique selon la revendication 33, **caractérisée en ce que** R_1 représente un reste alkylène en C_4 - C_8 substitué par un group amino, hydroxy ou oxo.

36. Conjugué peptidique selon la revendication 33, **caractérisé en ce que** le radical aliphatique linéaire ou ramifié en C_1 - C_{20} soit un radical alkyl, alkényl ou alkynyl.

37. Conjugué peptidique selon la revendication 33, **caractérisé en ce que** lesdits cycles sont substitués par un méthyle.

38. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 27 à 37, **caractérisé en ce que** les acides de formule générale I ou II sont choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide pyroglutamique, l'acide DL lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque et dérivés, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, les acides gras α -mono-insaturés pour lesquels " R_2 " représente un reste alkyle, linéaire ou ramifié en C_7 , et les acides hydroxydécénoïques et décénoïques.

39. Conjugué selon la revendication 38, **caractérisé en ce que** les acides hydroxydécénoïques et décénoïques soient l'acide trans-10-hydroxy- Δ^2 -décénoïque et l'acide trans-oxo-9-décénoïque.

40. Conjugué selon l'une des revendications 27 à 39, **caractérisé en ce que** la séquence d'acides aminés est liée à l'acide ou au dérivé de formule I ou II, sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

41. Conjugué selon l'une des revendications 27 à 40, **caractérisé en ce qu'il** est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

I A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂ ;

II A - Pyr - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂ ;

III A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂ ;

IV A - Ala - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂ ;

V A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂ ;

VI A - Lys - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂ ;

VII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂ ;

VIII A - Ser - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂ ;

IX A - Gln - Gly - Gly - Ser - Asn - NH₂ ;

X A - Gln - Gly - Gly - Ser - NH₂ ; et

XXIII A-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH;

A étant un composé de formule I ou II, ou le radical correspondant, les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou DL, une partie des acides aminés pouvant être sous forme glycosylée.

42. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 27 à 41, **caractérisé en ce qu'il** est sous forme de complexe métallo-peptidique lié chimiquement ou physiquement à un sel de zinc.

43. Utilisation du conjugué selon l'une quelconque des revendications 27 à 42 pour la fabrication d'un médicament destiné à corriger les déficiences du système immunitaire ou au traitement et à la prévention de la chute de cheveux.

1 / 7

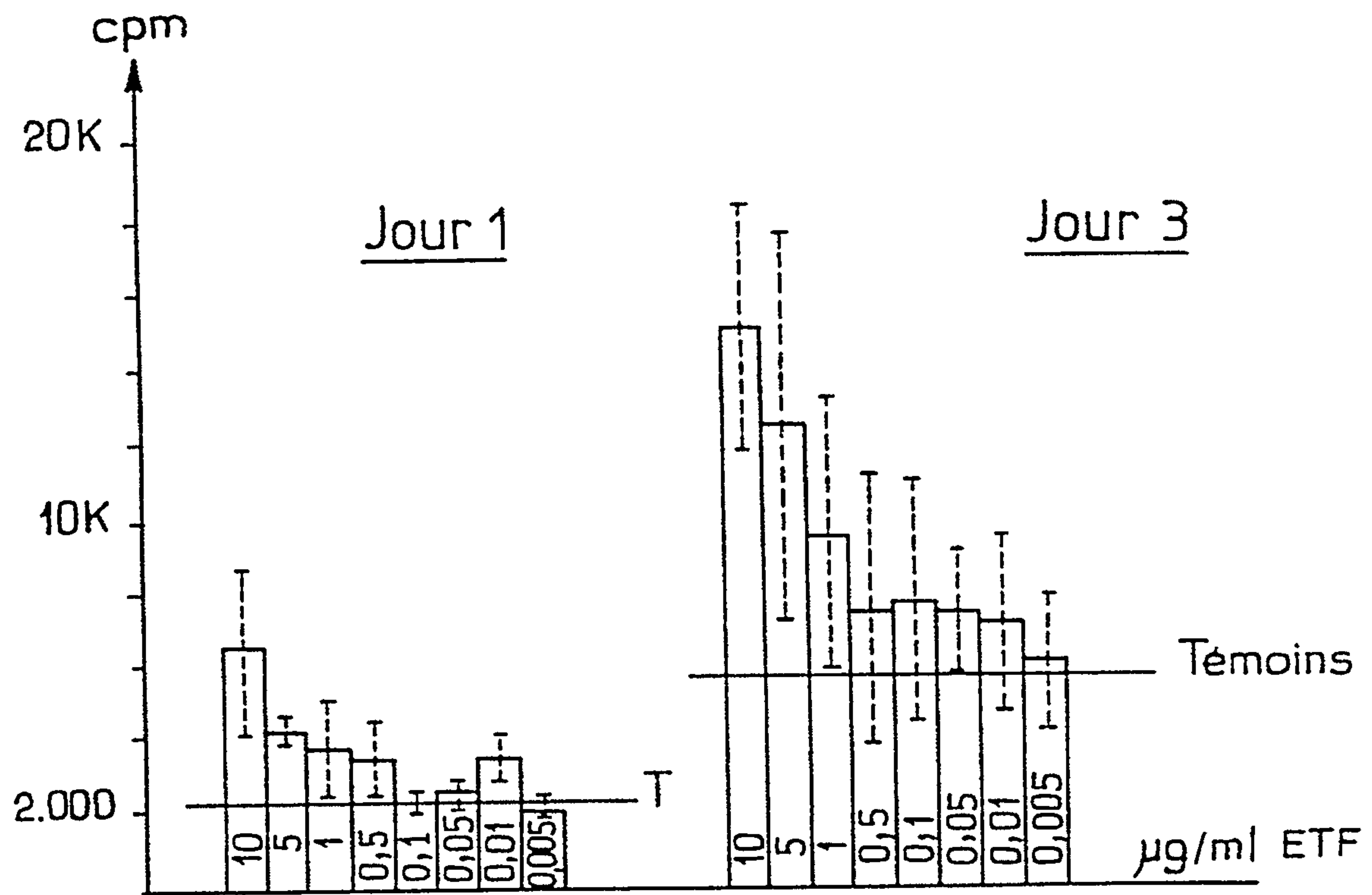


FIG. 1A

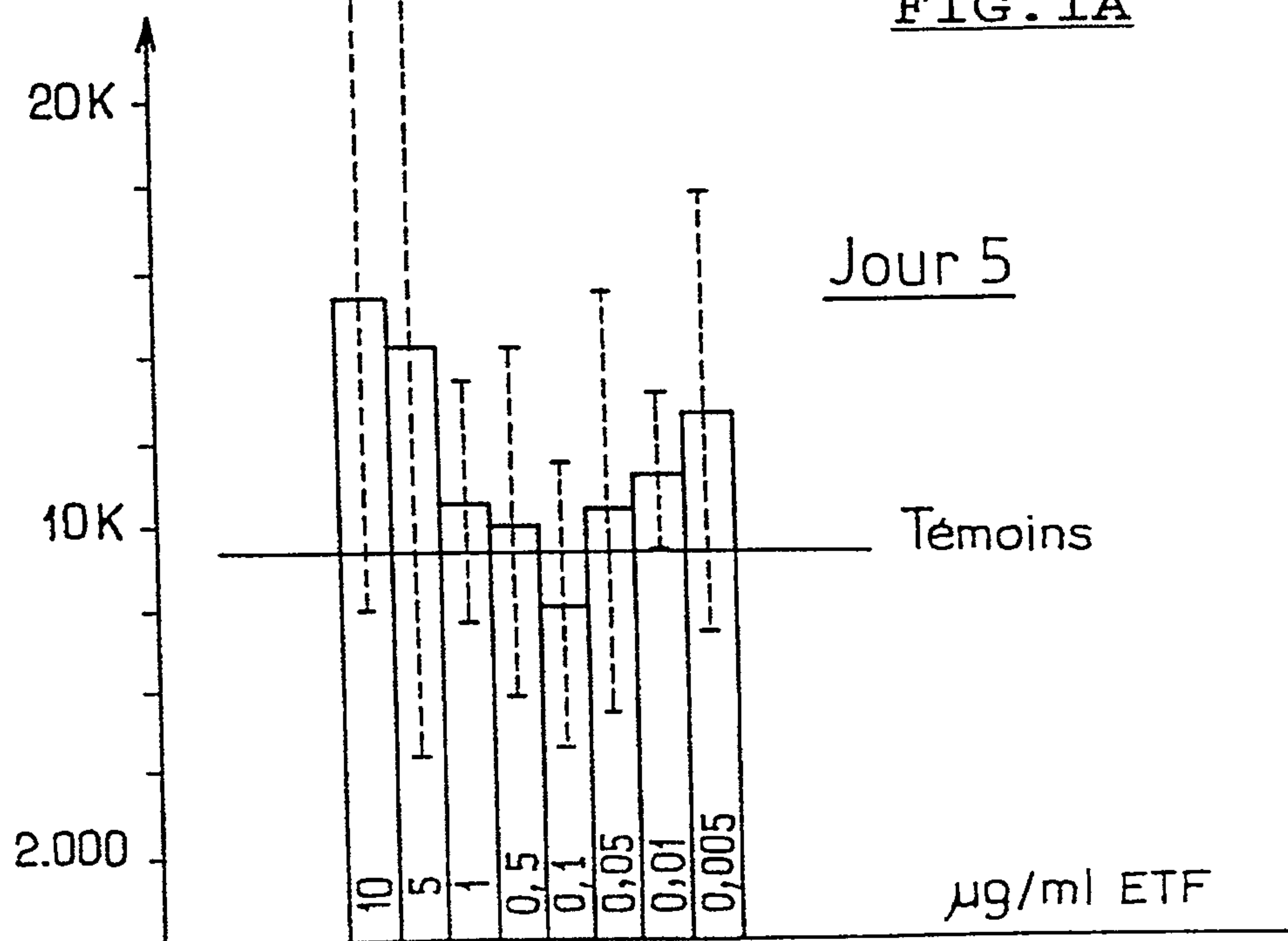
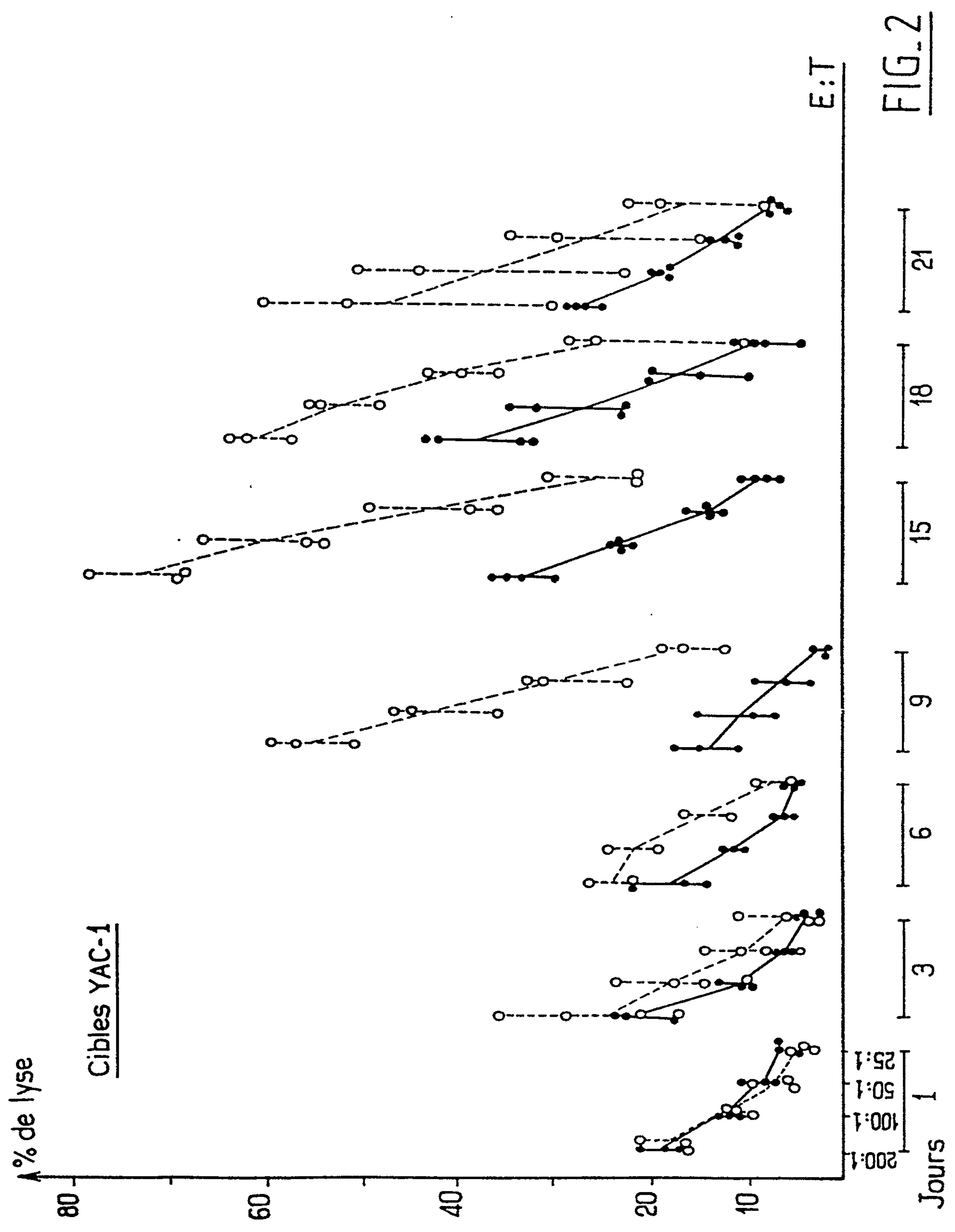
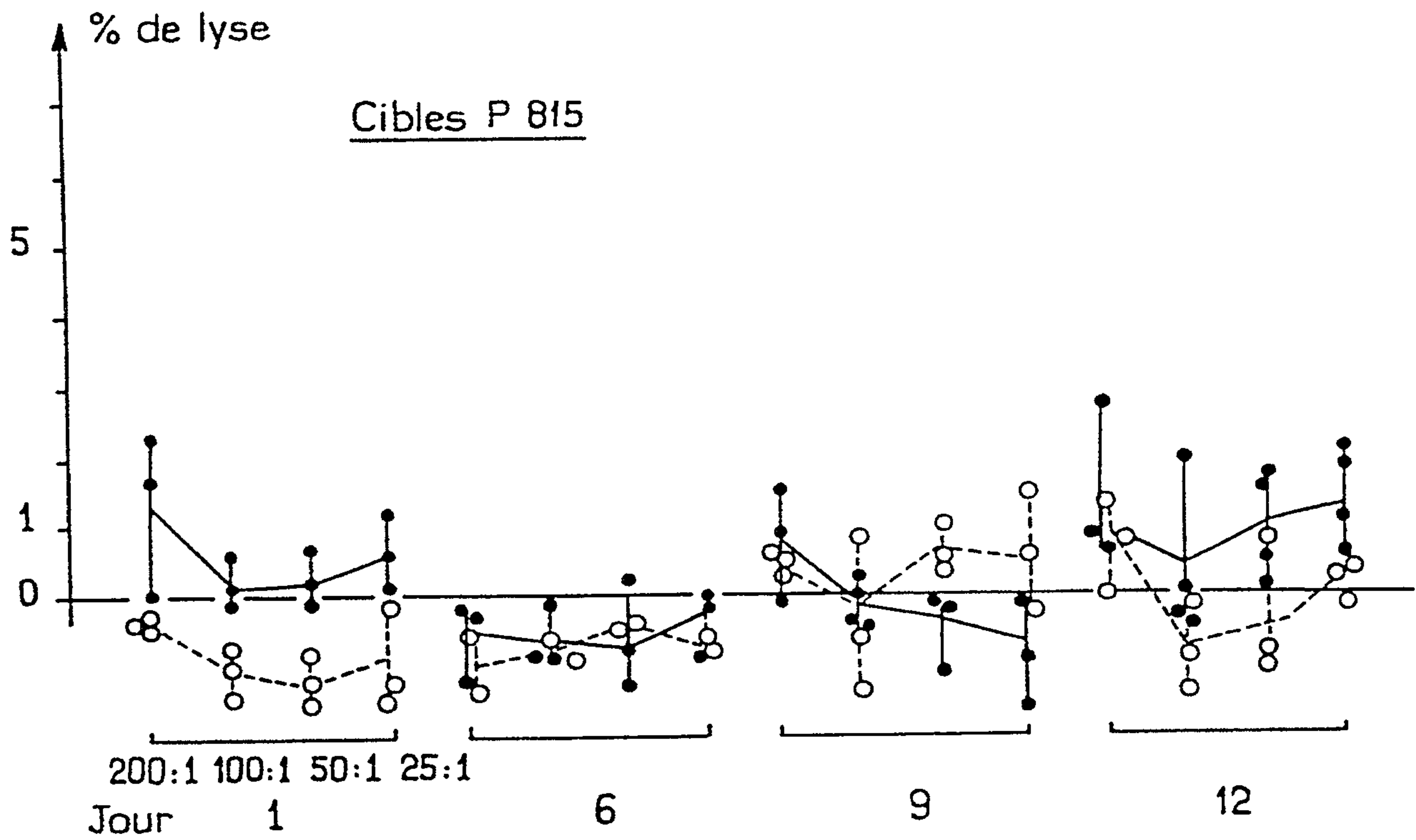
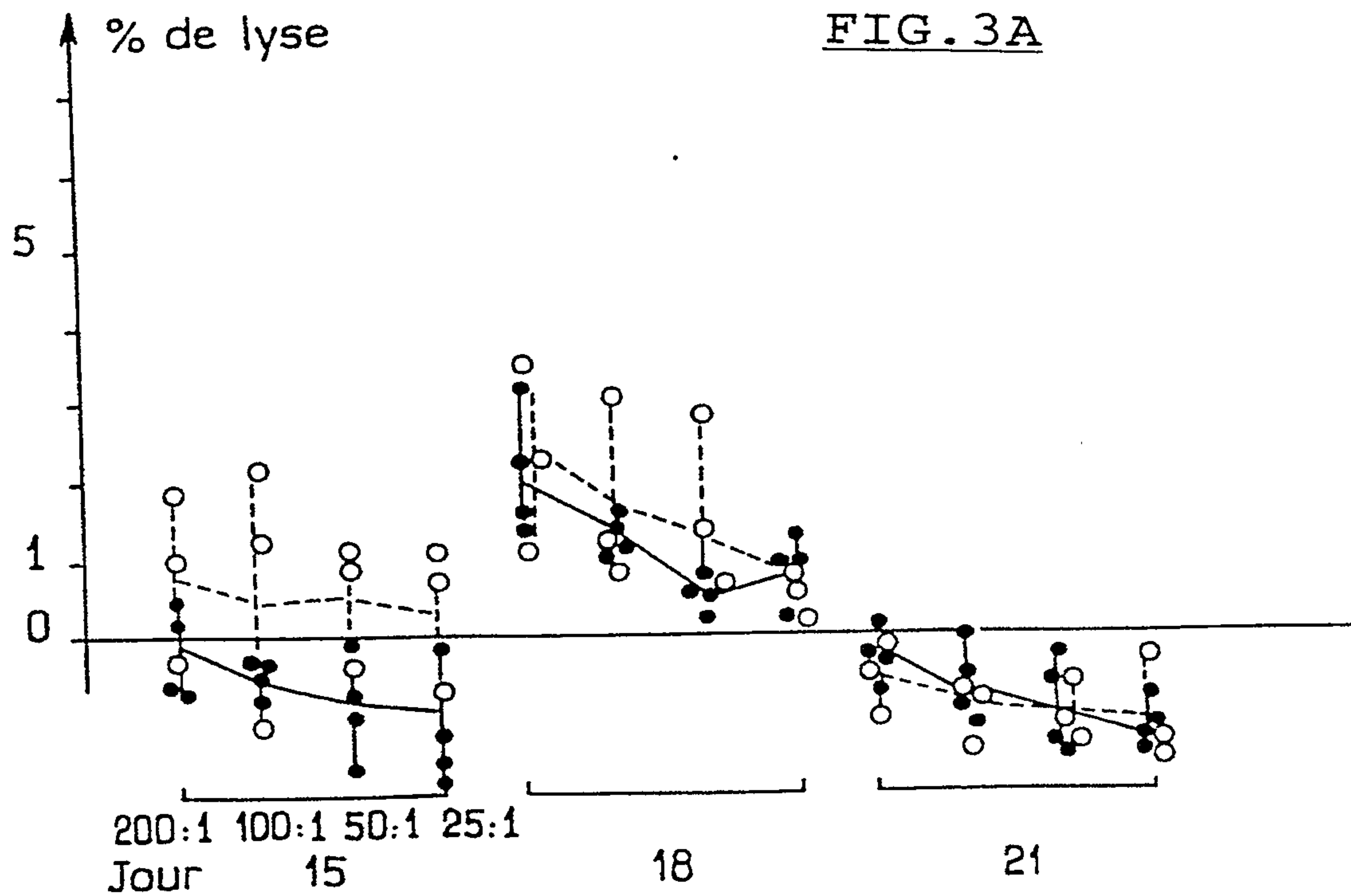


FIG. 1B

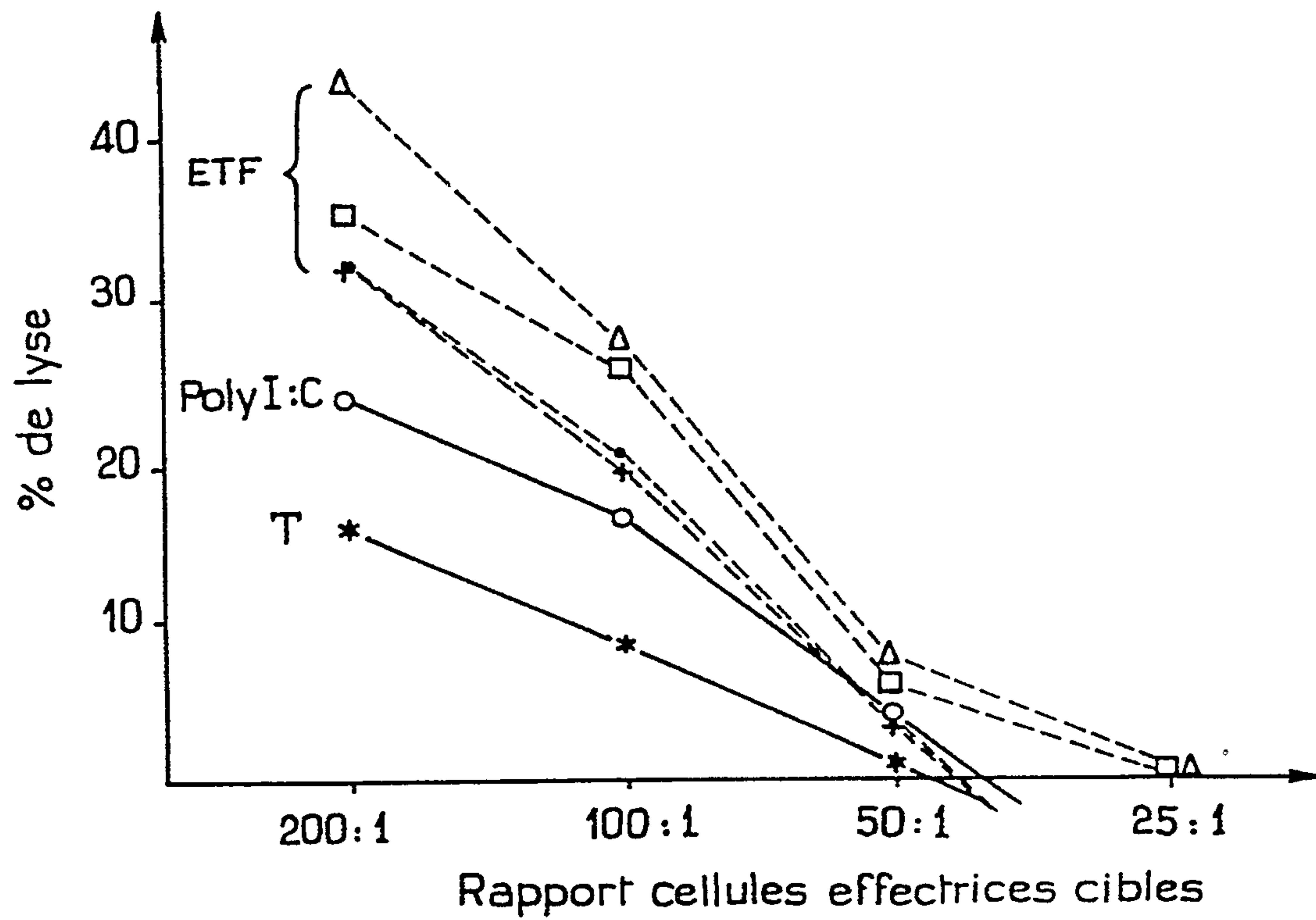
2 / 7



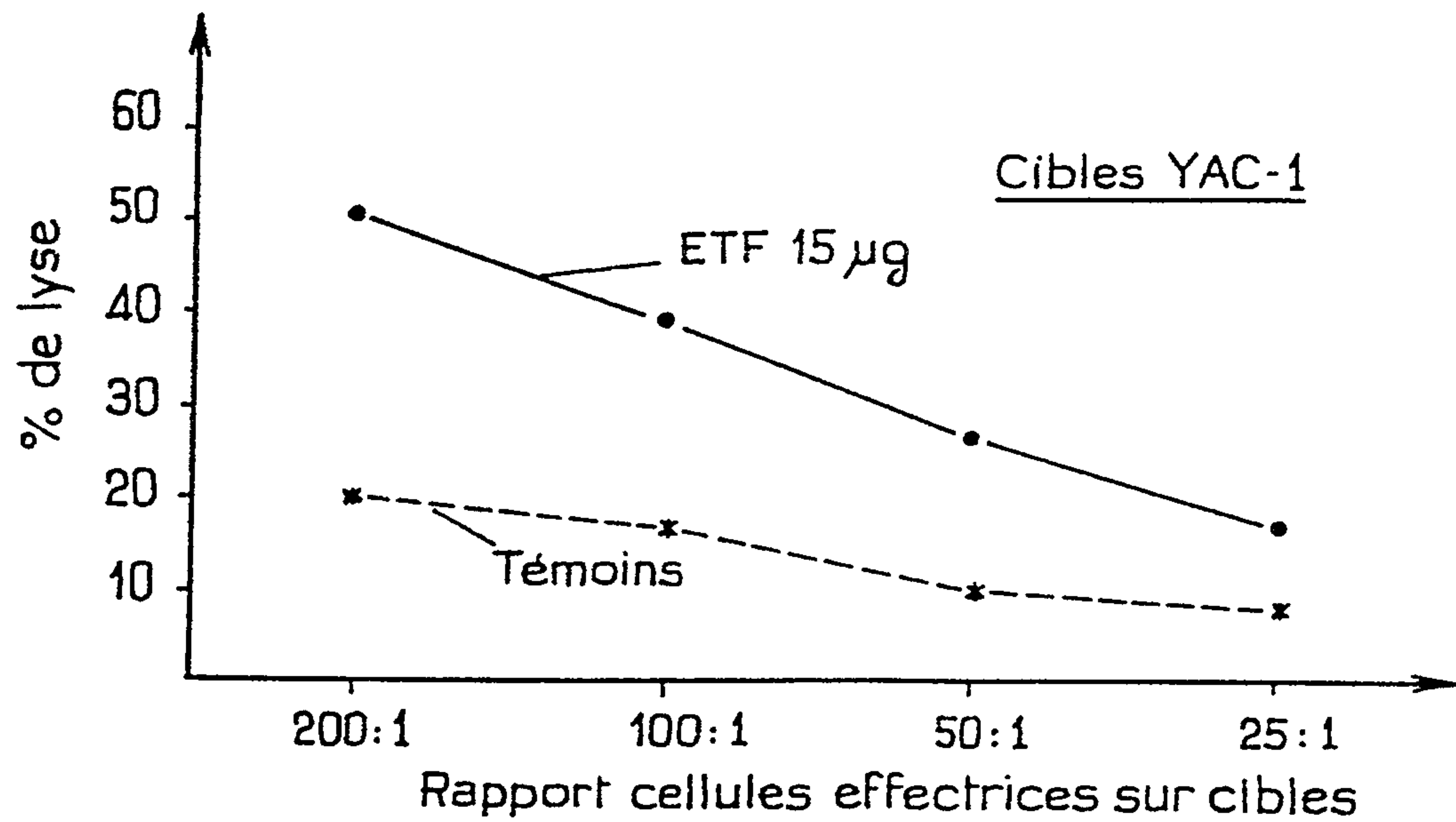
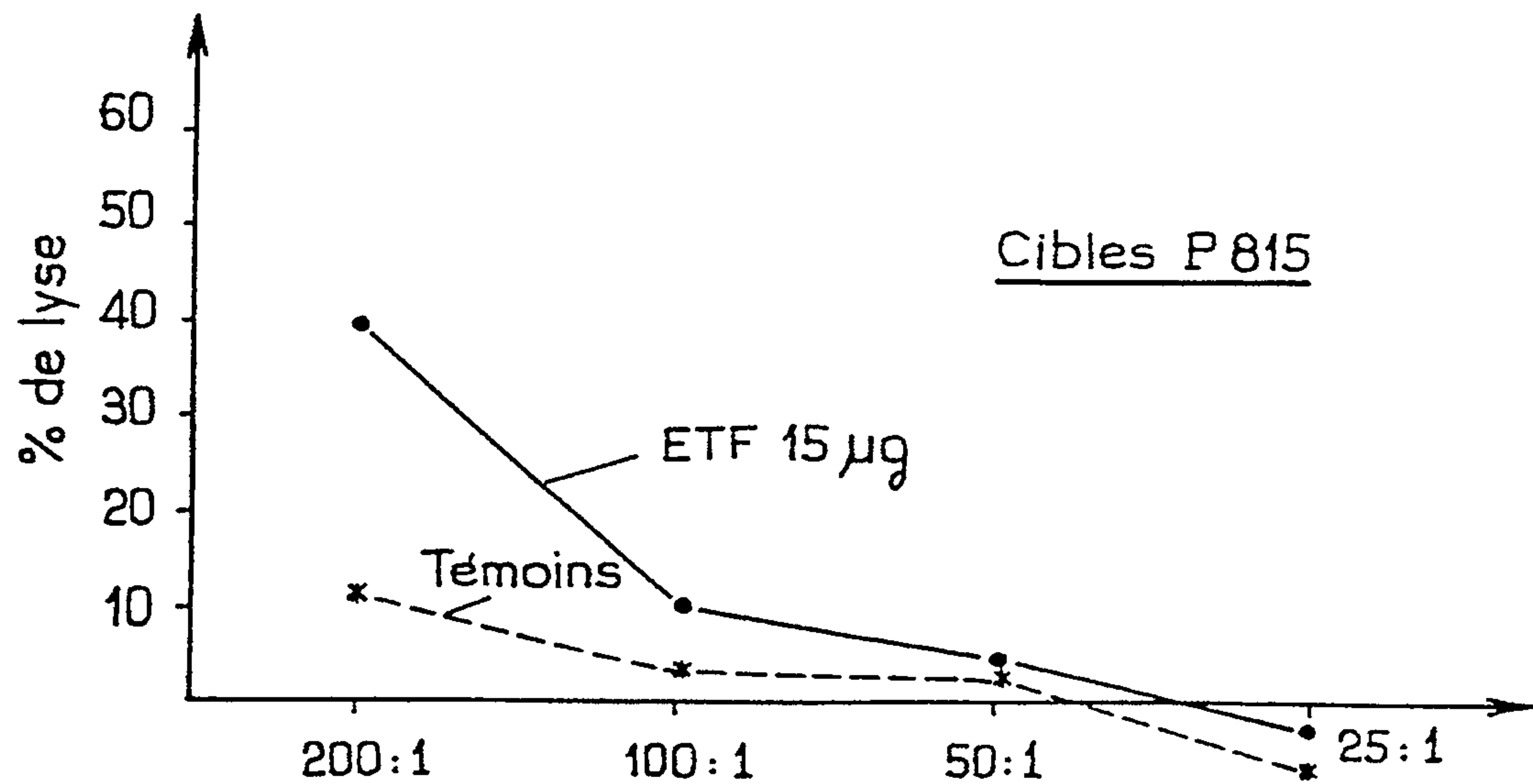
3 / 7

FIG. 3AFIG. 3B

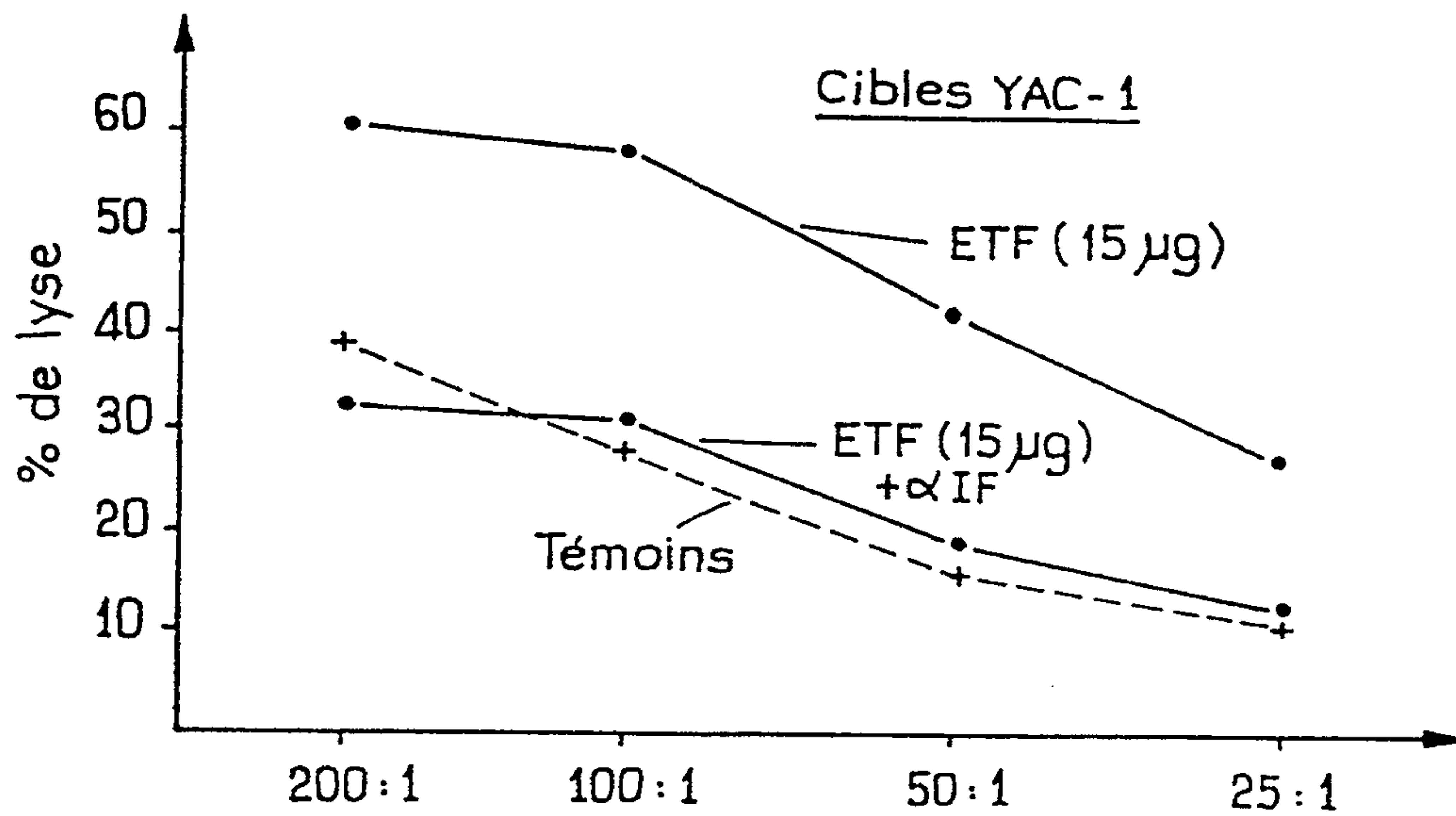
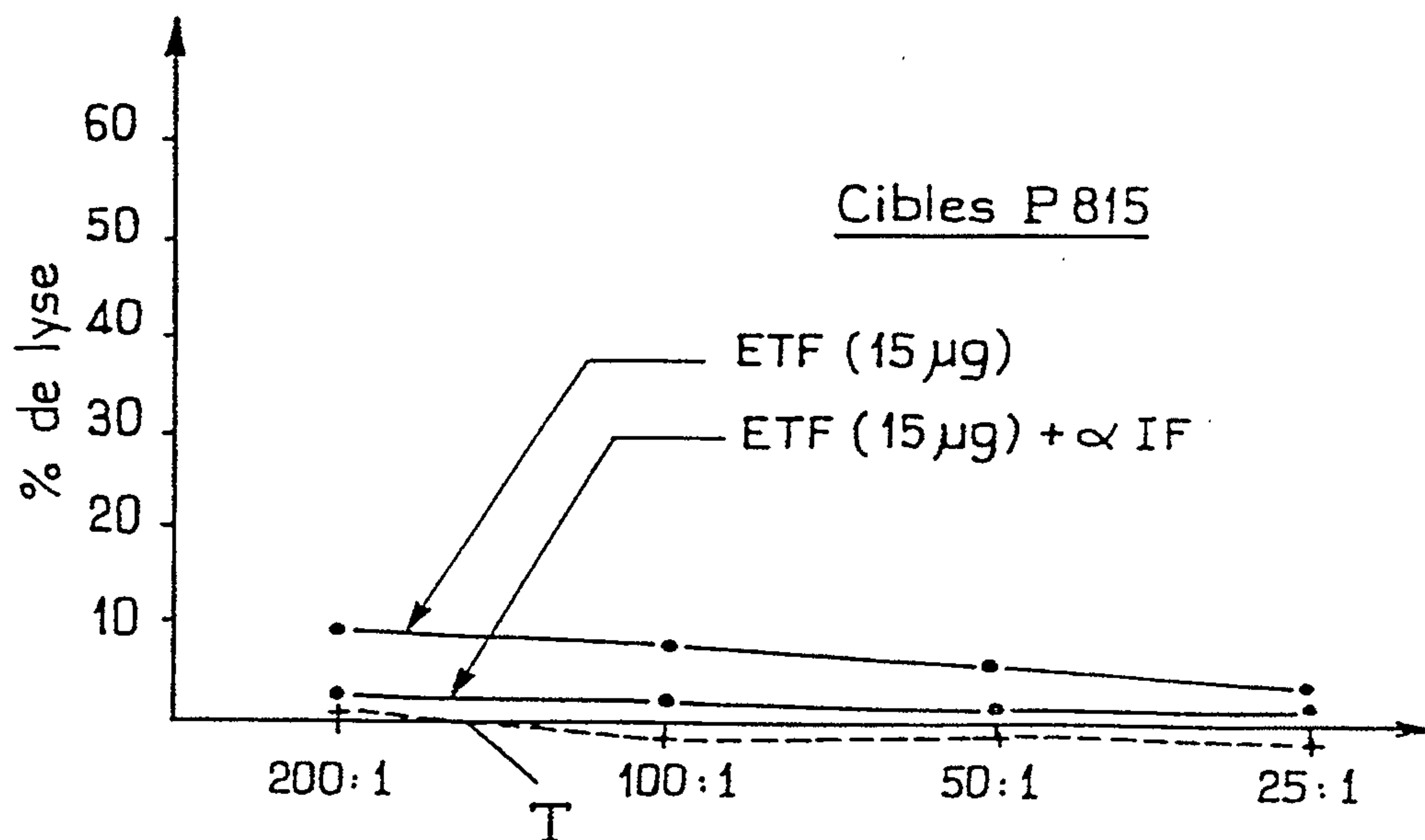
4 / 7

FIG. 4

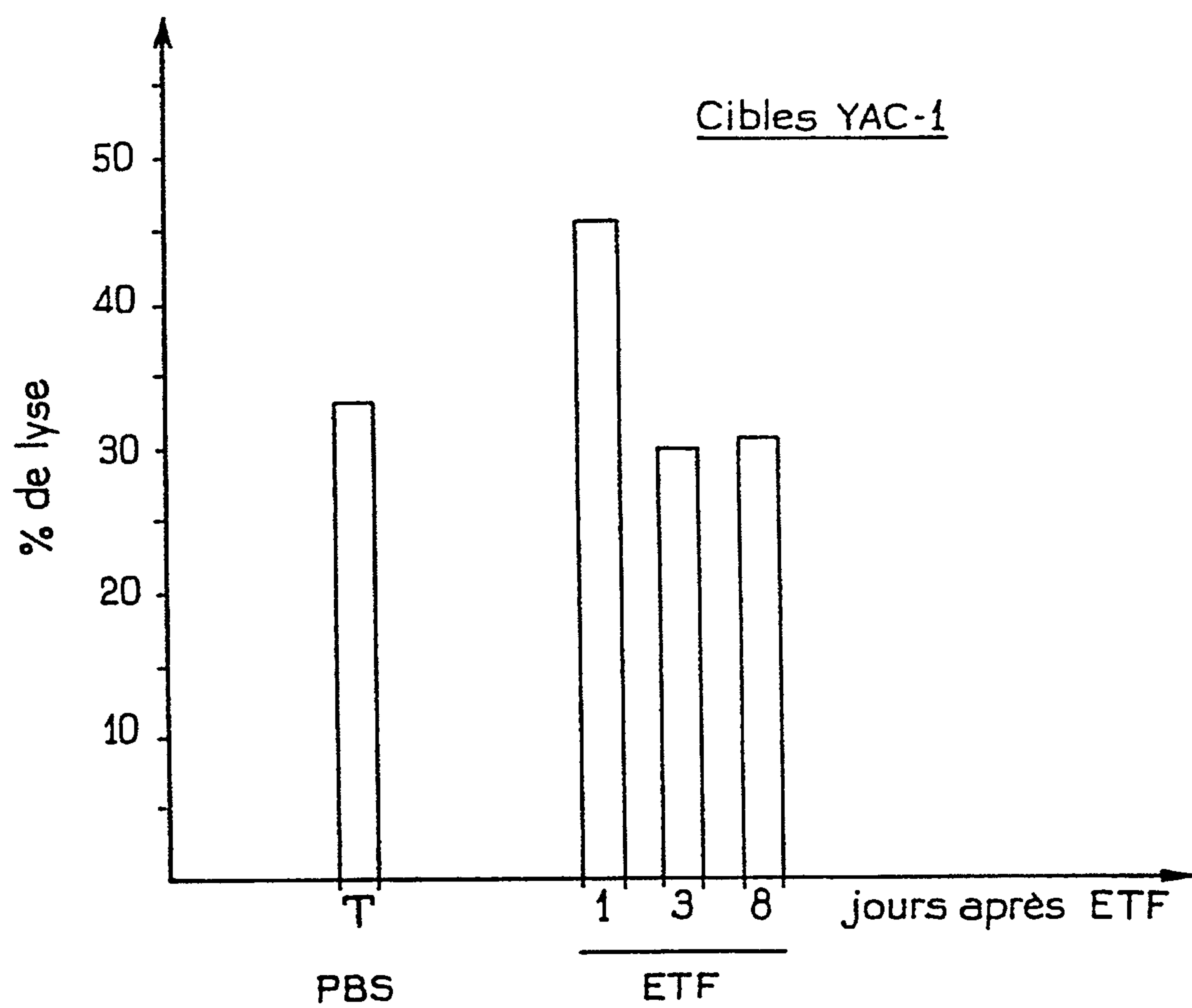
5 / 7

FIG. 5AFIG. 5B

6 / 7

FIG. 6AFIG. 6B

7 / 7

FIG. 7