(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 313 116**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/12 (2006.01)
C07K 11/02 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)
C07K 5/12 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04805493 .6**
(96) Fecha de presentación : **19.11.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1684788**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

(54) Título: **Péptido que aumenta la capacidad fusogénica de un gameto.**

(30) Prioridad: **19.11.2003 FR 03 13545**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

(73) Titular/es: **Université Paris 13**
avenue Jean-Baptiste Clement
93430 Villetaneuse, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

(72) Inventor/es: **Bomsel, Morgane y**
Wolf, Jean-Philippe

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Péptido que aumenta la capacidad fusogénica de un gameto.

Campo técnico

La presente invención se refiere a unos péptidos cíclicos que aumentan la capacidad fusogénica del ovocito y/o del espermatozoide, a unas composiciones farmacéuticas que los comprenden y a sus usos, en particular para suplementar unos medios de cultivo usados para la realización de la fecundación *in vitro*. Los péptidos de la invención comprenden típicamente un campo que procede del bucle desintegrina de la fertilina beta.

Estado de la técnica

La fecundación es un proceso complejo que conduce a la fusión de los gametos (espermatozoide y ovocito) para formar un embrión. Este proceso natural tiene lugar en la zona ampular de la trompa de Falopio y provoca un embarazo después de la migración del embrión a la cavidad uterina.

Cuando la pareja es estéril, se utilizan unas técnicas de Asistencia Médica para la Procreación para obtener *in vitro* unos embriones. Éstos se transfieren entonces por vía vaginal en el útero en el que se implantan.

La fecundación *in vitro* consiste simplemente en poner en presencia, en un medio de cultivo adaptado y en unas condiciones de pH y de temperatura apropiadas, los ovocitos y los espermatozoides para que pueda producirse la fecundación. Las técnicas se han desarrollado ampliamente desde hace 25 años (Bavister 2002).

Cuando, por razones a veces no elucidadas, tienen lugar unos fracasos de fecundación, los biólogos recurren a las técnicas de fecundación asistida que consisten en microinyectar un espermatozoide directamente en el citoplasma del ovocito. La evolución de los embriones microinyectados no es, sin embargo, tan buena como la observada después de la fecundación espontánea. En efecto, los porcentajes de embarazo obtenidos mediante la transferencia de estos embriones son inferiores a los obtenidos después de la fecundación *in vitro* simple (25,4% contra 26,5%, sobre más de 20.000 intentos) (FIVNAT, 2001). Asimismo, los embriones que proceden de una microinyección soportan menos la congelación que los que proceden de FIV (BLEFCO 2001, Simon *et al.*, 1998). Así, una lisis embrionaria más importante se produce en el momento de la descongelación y se obtiene un índice de implantación más bajo.

Por último, se sabe que la activación del ovocito consecutiva a la fecundación es mediada por unas ondas cálcicas inducidas por un factor espermático (Swan 1999). Estas ondas tienen una amplitud y una frecuencia reguladas de las que depende la calidad embrionaria (Swan 1999). El cortocircuito de las etapas membranarias de la interacción de los gametos modifica el régimen de estas ondas cálcicas por dos razones. La interacción fisiológica entre las membranas no tiene lugar, y el traumatismo celular debido al paso de la pipeta de microinyección en el citoplasma provoca la salida de calcio de los pools de reserva (Tésarik *et al.*; 2002). Esta salida, aunque asegura la activación del ovocito, también puede perturbar el desarrollo ulterior del embrión.

El estudio del proceso de fusión de las membranas espermática y ovocitaria en el momento de la fecundación ha permitido demostrar en parte el mecanismo de la fusión.

La formación de un complejo molecular membranario tiene lugar en la superficie del ovocito. Este complejo es inducido por el espermatozoide en el momento de la fecundación. Su composición y su mecanismo de acción se conocen parcialmente, pero se sabe que la inhibición de su formación conlleva la inhibición de la fusión de los gametos. Por lo tanto, la fecundación está realmente relacionada con la formación de estos parches en la superficie del ovocito.

La hipótesis comúnmente admitida es que el espermatozoide interactúa mediante un primer receptor con la membrana y que después de la transducción de una señal transmembranaria un mecanismo celular permite la constitución de estos parches sobre los cuales se fijará el espermatozoide.

Se han realizado unos estudios para determinar la naturaleza del ligando espermático y del receptor ovocitario implicados. Existe una proteína de membrana espermática denominada Fertilina (Evans 2002). Esta molécula es un dímero alfa beta cuyas moléculas pertenecen a la familia de las proteínas ADAM (A Disintegrine And Metalloprotease) (Evans 2001). Se ha demostrado la presencia de integrinas sobre el ovocito. Mediante su sitio de unión putativo, la fertilina espermática es susceptible de interactuar con una o unas integrinas ovocitaria(s).

Las moléculas de membranas denominadas integrinas son unas moléculas de enlace que intervienen en los enlaces célula-matriz extracelular y célula-célula. Sus ligandos se enlazan a su dominio extracelular mediante un sitio de unión constituido por un tripéptido situado en el vértice de un bucle.

Los espermatozoides poseen una molécula de membrana que tiene un sitio desintegrina capaz de enlazarse a una integrina. Esta molécula, descubierta en la cobaya, pero presente en todos los mamíferos estudiados incluyendo el ser humano y el ratón se denomina Fertilina. Se ha secuenciado la Fertilina humana, lo que hace que se conozca su sitio

putativo de unión. Se trata del tripéptido FEE (Fenilalanina, ácido glutámico, ácido glutámico) (Gupta *et al.*, 1995, Vidaeus *et al.*, 1997) Un octapéptido lineal que contiene la secuencia FEE inhibe la adherencia de los espermatozoides al ovocito y su penetración (Bronson 1999). Se han observado unos efectos comparables en otras especies con unos péptidos lineales y cíclicos (Mwethera 1999; Gupta 2000; Li 2002; Myles 1994). Evans (1995) describe una ausencia de efecto inhibidor de los péptidos cíclicos en el ratón.

Exposición de la invención

Durante investigaciones de inhibidores de la fecundación, los inventores han sintetizado un péptido cíclico, denominado FEEc, que reproduce el sitio de unión de la fertilina humana beta, y han ensayado su acción sobre los ovocitos humanos. Contrariamente a sus expectativas y de manera sorprendente, los inventores han demostrado así que (1) el péptido cíclico FEEc se fija sobre la membrana del ovocito humano, (2) que induce una relocalización de las proteínas de adhesión en la superficie del ovocito, siendo esta relocalización normalmente inducida por los espermatozoides, (3) que aumenta la capacidad fusogénica de los ovocitos. Estos resultados han sido corroborados por unos experimentos en el ratón.

Así, los inventores han identificado una nueva clase de péptidos cíclicos capaces de aumentar la capacidad fusogénica de los ovocitos y/o de los espermatozoides. Además, esta clase de péptidos cíclicos sería capaz de activar el ovocito.

La invención se refiere al uso de un péptido cíclico que comprende el sitio de unión de la fertilina beta (ADAM 2) a la integrina del ovocito para aumentar la capacidad fusogénica y/o para activar un ovocito, típicamente *in vitro* o *ex vivo*. Este sitio de unión se conoce en el bucle desintegrina de la fertilina beta. Este péptido cíclico comprende como mínimo el tripéptido indispensable para esta unión. Este tripéptido varía según las especies. Sin embargo, la organización del bucle desintegrina está muy bien conservada entre las especies (véase la Tabla 1). Por lo tanto, será fácil para el experto en la materia definir el bucle desintegrina de la fertilina beta e identificar el tripéptido.

TABLA 1

Bucle desintegrina

Ser humano	$_{(436)}$**C**LFMSKERM**C RPSFEECDLP EYCNGSSASC**$_{(465)}$	SEC ID nº 1
Ratón	$_{(440)}$**C**KLKRKGEV**C RLAQDECDVT EYCNGTSEVC**$_{(469)}$	SEC ID nº 2
Cobaya	$_{(433)}$**C**EFKTKGEV**C RESTDECDLP EYCNGSSGAC**$_{(462)}$	SEC ID nº 3
Conejo	$_{(435)}$**C**TFKERGQS**C RPPVGECDLF EYCNGTSALC**$_{(464)}$	SEC ID nº 4
Macaco	$_{(436)}$**C**LFMSQERC**C RPSFDECDLP EYCNGTSASC**$_{(465)}$	SEC ID nº 5
Bovino	$_{(435)}$**C**AFIPKGHI**C RGSTDECDLH EYCNGSSAAC**$_{(464)}$	SEC ID nº 6
Rata	$_{(441)}$**C**NLKAKGEL**C RPANQECDVT EYCNGTSEVC**$_{(470)}$	SEC ID nº 7
Cerdo	$_{(435)}$**C**SFMAKGQT**C RLTLDECDLL EYCNGSSAAC**$_{(464)}$	SEC ID nº 8

Las posiciones indicadas entre paréntesis corresponden a las posiciones en las secuencias fertilinas beta cuya referencias se indican más adelante. Los residuos en negrita subrayados corresponden al tripéptido. Lo residuos en negrita se conservan perfectamente entre las especies.

Se puede deducir de la Tabla 1 una secuencia consenso del bucle integrina.

C-X_2-(F/L)-(K/M/I)-X_5-(KJR/Q)-(G/E)-X_8-X_9-C-R-X_{12}-X_{13}-**TriPépt**-C-D-(L/V)-X_{20}-E-Y-C-N-(G/E)-(T/S)-S-(A/E/G)-X_{29}-C

en la que los grupos X representan, independientemente unos de otros, un aminoácido y "TriPépt" el tripéptido indispensable para la unión de la fertilina a la integrina. Preferentemente, X^8 es un aminoácido cargado. Más particularmente, se selecciona de entre E, R y Q. Preferentemente, X_{12} se selecciona de entre P, L, E y G. Preferentemente, X_{13} es un aminoácido poco voluminoso y no cargado, más particularmente seleccionado de entre S, A, P y T. Preferentemente, X_{29} es un aminoácido poco voluminoso y no cargado, más particularmente seleccionado de entre S, A y V.

El péptido cíclico se puede ciclizar por cualquier medio conocido por el experto en la materia. El péptido se puede ciclizar mediante una unión covalente entre la cadena principal y la cadena principal, entre la cadena principal y una cadena lateral, o entre una cadena lateral y otra cadena lateral. Esta unión puede ser una unión disulfuro, amida o tioéter.

Por ejemplo, el péptido se puede ciclizar mediante una unión peptídica entre el residuo N-terminal y el residuo C-terminal, o con unos grupos aminas o carbocílixos de cadenas laterales de residuos.

Preferentemente, el péptido se cicliza mediante dos residuos de cisteína, más particularmente mediante un puente disulfuro entre estos dos residuos de cisteína. La localización de los residuos de cisteína debe permitir la ciclización del péptido. Los residuos de cisteína se pueden disponer de tal forma que después de la ciclización, el péptido presente una cola polipeptídica. Preferentemente, estos residuos de cisteína estarán dispuestos en los extremos del péptido.

El péptido cíclico según la presente invención se puede describir por lo tanto mediante la fórmula siguiente:



en la que X representa un aminoácido, m y n están comprendidos entre 0 y 14. Tal como se ha indicado anteriormente, en las fórmulas de la invención, los grupos X son independientes unos de otros y pueden representar, dentro de una misma molécula, unos aminoácidos diferentes o idénticos. Preferentemente, cuando m o n es igual a 0, el otro es por lo menos 1. Preferentemente, m+n es inferior a 10, preferentemente inferior o igual a 5. En un modo de realización preferido, m+n es igual a 3. Preferentemente, el tripéptido presenta una secuencia X-(Q/D/E)-E, preferentemente X-(D/E)-E. Por ejemplo, el tripéptido se puede seleccionar de entre el grupo constituido por (Q-D-E), (F-E-E), (T-D-E), (V-G-E), (F-D-E), (T-D-E), (N-Q-E), (L-D-E). En un modo de realización preferido, el tripéptido es (F-E-E-).

Preferentemente, el péptido cíclico según la presente invención se describe mediante la siguiente fórmula:



Los residuos de cisteína implicados en la ciclización del péptido pueden encontrarse naturalmente en el bucle desintegrina o se pueden introducir en la secuencia del péptido. Los bucles desintegrinas son ricos en cisteínas. En efecto, se conservan unos residuos de cisteína en las posiciones 1, 10, 17, 23 y 30 de estos bucles. Así, los péptidos se pueden ciclar por medio de un puente disulfuro seleccionado de entre el grupo siguiente: C1-C17, C1-C23, C1-C30, C10-C17, C10-C23, y C10-C30. Preferentemente, los péptidos se ciclizan por medio de un puente disulfuro seleccionado de entre C10-C17 y C10-C23.

Los péptidos cíclicos según la presente invención pueden, por lo tanto, presentar una de las siguientes estructuras:

C_1-X2-(F/L)-(K/M/I)-X_5-(K/R/Q)-(G/E)-X_8-X_9C-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C_{17};

C_1-X2-(F/L)-(K/M/I)-X_5-(K/R/Q)-(G/E)-X_8-X_9C-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C-D-(L/V)-X_{20}-E-Y-C_{23};

C_1-X2-(F/L)-(K/M/I)-X_5-(K/R/Q)-(G/E)-X_8-X_9C-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C-D-(L/V)-X_{20}-E-Y-C-N-(G/E)-(T/S)-S-(A/E/G)-X_{29}-C_{30};

C_{10}-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C_{17};

C_{10}-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C-D-(L/V)-X_{20}-E-Y-C_{23};

C_{10}-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C-D-(L/V)-X_{20}-E-Y-C-N-(G/E)-(T/S)-S-(A/E/G)-X_{29}-C_{30};

en las que X representa un aminoácido y los residuos de cisteína de los extremos forman unos puentes disulfuro.

Preferentemente, los péptidos según la presente invención presentan una de las siguientes estructuras:

C_{10}-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C_{17}; o

C_{10}-R-X_{12}-X_{13}-**TriPept**-C-D-(L/V)-X_{20}-E-Y-C_{23}.

Más particularmente, los péptidos cíclicos según la invención se seleccionan de entre un grupo constituido por los fragmentos 1-17, 1-23, 1-30, 10-17, 10-23, y 10-30 de una de las secuencias SEC ID nº 1-8, preferentemente de la secuencia SEC ID nº 1. Preferentemente, los péptidos cíclicos según la invención se seleccionan de entre un grupo constituido por los fragmentos 10-17, 10-23 de una de las secuencias SEC ID nº 1-8, preferentemente de la secuencia SEC ID nº 1.

Los residuos de cisteína se pueden introducir en el péptido a ciclizar. En un modo de realización preferido, el péptido según la invención tiene la siguiente estructura:



en la que X es un aminoácido. Se privilegiará un aminoácido poco voluminoso y no cargado. Preferentemente, X se selecciona de entre A, S o T. Más particularmente, X es A o S. en un modo de realización preferido, X es la serina y el tripéptido presenta la secuencia (F-E-E) (SEC ID nº 9). La invención se refiere muy particularmente a este péptido cíclico (denominado FEEc en los ejemplos) y a su uso para aumentar la capacidad fusogénica y/o de activar los ovocitos.

Los aminoácidos del péptido cíclico según la presente invención pueden ser naturales o no. Mediante la expresión "aminoácido no natural" se entiende un análogo o un derivado de un aminoácido natural. Por ejemplo, un aminoácido no natural puede presentar una cadena lateral alargada, más corta, o variante que presenta unos grupos funcionales apropiados. Evidentemente, se prevén los estereoisómeros L y D. Además, los enlaces peptídicos se pueden modificar para hacerlos resistentes a la proteolisis. Por ejemplo, por lo menos un enlace peptídico (-CO-NH)- se puede sustituir por un enlace divalente seleccionado de entre ($-CH_2-NH-$), (-NH-CO-), ($-CH_2-O-$), ($-CH_2-S-$), ($-CH_2-CH_2-$), ($-CO-CH_2-$), ($-CHOH-CH_2-$), (-N=N-), y (-CH=CH-).

Los residuos de las secuencias descritas anteriormente pueden variar de manera conservadora. Por el término "conservadora" se entiende que el residuo variante presentará unas características físico-químicas comparables. Entre las características físico-químicas tenidas en cuenta, se encuentra la voluminosidad estérica, la polaridad, la hidrofobia o la carga.

Por consiguiente, la presente invención se refiere asimismo a las variantes y/o a los derivados de estos péptidos cíclicos y a su uso, en particular para aumentar la capacidad fusogénica y/o para activar los ovocitos. Estas variantes y derivados conservan la capacidad de unión a la integrina del ovocito, más particularmente a la integrina $\alpha 6\beta 1$.

La invención se refiere asimismo a un multímero de péptido cíclico según la invención. Esta polimerización del péptido cíclico se puede realizar mediante cualquier medio disponible para el experto en la materia. Preferentemente, el péptido cíclico está acoplado a una molécula portadora que permite la polimerización del péptido. La unión entre el péptido cíclico y la molécula portadora puede ser covalente o no covalente. Los procedimientos para fijar los péptidos cíclicos a la molécula portadora son bien conocidos por el experto en la materia y comprenden la química de las aminas, el enlace carbodiimida de los derivados carboxilo y amino, la activación del bromuro de cianógeno, de N-hidroxisuccinimida, de epóxido, de sulfhidrilo, o de hidrazida. El enlace entre la molécula portadora y los péptidos cíclicos puede ser directo o indirecto. Cuando es indirecto, se puede realizar a través de un vínculo. Este vínculo puede tener una función de espaciador que evita una interacción de la molécula portadora sobre las propiedades del péptido cíclico, en particular las propiedades fusogénicas y/o activadoras. Este vínculo puede ser un péptido. El péptido cíclico debe ser fijado a la molécula portadora de manera que se mantiene la accesibilidad del tripéptido. El número de péptidos cíclicos comprendido en el multímero está preferentemente comprendido entre 2 y 1.000. La forma multimérica del péptido según la presente invención permite aumentar el efecto del péptido cíclico sobre la relocalización de las proteínas de adhesión del ovocito.

Por ejemplo, la polimerización se puede realizar por medio del par biotina/estreptavidina que permite preparar un tetrámero del péptido cíclico. Así, cada péptido cíclico esta enlazado a una biotina, y cuatro biotinas pueden enlazarse a una molécula de estreptavidina.

Alternativamente, varios péptidos cíclicos según la presente invención pueden ser portados por una proteína transportadora. Preferentemente, esta proteína no tiene ningún efecto biológico sobre el ovocito. El experto en la materia conoce varias proteínas usadas como proteína portadora incluyendo la albúmina sérica bovina (SAB) y la hemocianina de lapa.

Por otro lado, varios péptidos cíclicos según la presente invención se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido. El soporte sólido puede ser de manera no exhaustiva agarosa, vidrio, resinas celulósicas, resinas de sílice, poliestireno, poliacrilamida. El soporte sólido se puede modificar con unos grupos funcionales que permiten la fijación de los péptidos cíclicos, por ejemplo por medio de los grupos carboxilo, amino, sulfhidrilo, hidroxilo y/o carbohidrato contenidos en estos péptidos.

La presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido cíclico según la presente invención o a un multímero de éste. Esta composición puede ser un medio destinado al cultivo de gametos. Esta composición puede comprender además un soporte farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede ser una composición farmacéutica, preferentemente adaptada a una aplicación local. Preferentemente, esta aplicación local se realiza a nivel del tracto genital femenino.

La presente invención se refiere al uso *in vitro* o *ex vivo* de un péptido cíclico según la presente invención, de un multímero de éste o de una composición según la presente invención para aumentar la capacidad fusogénica de un gameto, en particular del ovocito, o para activar un ovocito, así como a un procedimiento correspondiente.

En particular, los péptidos cíclicos según la presente invención se pueden usar para la fecundación *in vitro*, para la inseminación artificial, y para la transferencia nuclear (clonación) en los mamíferos, preferentemente no-humanos. Preferentemente, estos péptidos se usarán para realizar o mejorar una fecundación *in vitro*, más particularmente en el ser humano. Con este fin, la invención se refiere asimismo a un medio de cultivo de gametos suplementado con un péptido cíclico según la presente invención o un multímero de éste. En un modo de realización particular, el ovocito se pone en presencia del péptido cíclico según la invención antes de ser incubado en presencia de los espermatozoides. En otro modo de realización, el ovocito se pone en presencia simultáneamente con el péptido cíclico según la presente invención y el gameto masculino.

Los péptidos de la invención se pueden usar asimismo en un tratamiento destinado a aumentar la fecundidad. Así, la presente invención se refiere al uso de un péptido según la presente invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los problemas de fecundidad, así como a un procedimiento correspondiente.

Los péptidos cíclicos según la presente invención se pueden usar asimismo para potencializar los espermatozoides.

Los diferentes procedimientos y usos de la invención se pueden realizar *in vitro* o *ex vivo*. Se practican ventajosamente *in vitro* o *ex vivo* con el fin de producir unas células o unos materiales biológicos tratados.

Los péptidos cíclicos según la presente invención se pueden usar para cualquier especie cuya reproducción necesita unos gametos. La invención presenta un interés particular para las especies en vías de desaparición, las especies poco fecundas o las especies de gran valor. Más particularmente, la invención considera el uso de los péptidos cíclicos en los mamíferos. Preferentemente, la presente invención puede aplicarse a la reproducción o a la clonación de los ovinos, de los bovinos, de los equinos, etc. Evidentemente, la presente invención se aplica asimismo en la ayuda de la procreación humana.

Este péptido añadido a los medios de cultivo de los gametos humanos es susceptible de potenciar su capacidad fusogénica y llegar a la constitución de embriones respetando al mismo tiempo las interacciones fisiológicas membranarias. Existen dos intereses potenciales por su uso: la reducción del uso de la microinyección intracitoplásmica como técnica de fecundación y la mejora de la calidad de los embriones obtenidos.

Otros aspectos y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la lectura de los ejemplos siguientes, que deben ser considerados ilustrativos y no limitativos.

Ejemplos

Resultados del estudio del FEE cíclico sobre la fusión gamética en el ser humano

Material y métodos

Los ovocitos humanos

Los ovocitos humanos usados para los experimentos tenían dos orígenes: los ovocitos fracasados de fecundación después de FIV y los ovocitos no microinyectados puesto que son inmaduros en el momento de la ICSI y madurados *in vitro*. Los pacientes habían donado estos ovocitos para la investigación y habían firmado para ello un consentimiento previsto por el CCPPRB del hospital de *Aulnay sous Bois*.

Estos ovocitos de 48 horas o madurados *in vitro* no son o ya no son capaces de proporcionar ningún embrión. Por otro lado, el mecanismo del bloqueo a la polispermia que asegura la calidad diploide del embrión está situado a nivel de la zona pelúcida del ovocito. Eliminando la zona pelúcida de estos ovocitos se anula el mecanismo protector, lo que conduce en caso de fusión gamética a unos zigotos polispérmicos no viables. Por último, al realizarse el desarrollo embrionario en el interior de la zona pelúcida durante los 6 primeros días, su ausencia impide que tenga lugar dicho desarrollo.

Para mantener la membrana ovocitaria tan próxima como sea posible de su estado natural, la eliminación de la zona pelúcida que los inventores han realizado se ha efectuado de manera mecánica con la ayuda de tijeras de microcirugía.

Los espermatozoides

Se recolectó el esperma de donantes fecundos después de 3 días de abstinencia, y se preparó como para los FIV. Brevemente, el eyaculado se ha guardado a 37º hasta licuefacción y después se seleccionó sobre un gradiente de Puresperm 2 capas (90 y 45%). El esperma se guardó entonces en unas condiciones capacitantes hasta la inseminación de los ovocitos.

El péptido sintético cíclico FEEc

La secuencia completa del dominio desintegrina de la Fertilina humana que constituye el bucle se representa a continuación:

CLFMSKERMCRP**SFEECD**LPEYCNGSSASC SEC ID nº 1

El péptido sintético cíclico FEEc usado en este ejemplo es el siguiente:

C**SFEEC** SEC ID nº 9

El péptido FEEc que los inventores han sintetizado comprende la secuencia del tripéptido FEE. Comprende la serina que le precede y la cisteína que le sigue. Los inventores han añadido una cisteína suplementaria corriente arriba del sitio de unión. Las dos cisteínas situadas en los extremos del péptido permiten ciclizar el péptido.

Inmunofluorescencia

La subunidad integrina alfa 6 está presente sobre la membrana del ovocito humano. Ésta forma parte del complejo multimolecular de fusión. Es la razón por la que los inventores la han tomado como control de la remodelación membranaria.

Se han incubado los ovocitos sin zona pelúcida en unas gotas de 20 μl de medio de cultivo Ferticult con aceite a temperatura ambiente. Se ha suplementado el medio con un anticuerpo de ratón anti alfa 6 humano a 20 μM (Chemicon International, Londres, GB). Entonces, se han lavado los ovocitos y se han fijado a continuación en PFA al 2% durante una hora. Se han incubado a continuación durante 45 minutos con un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con FITC o con rodamina elevada en el asno (FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG o Rhodamine-conjugated donkey anti-mouse IgG 10 μg/ml; Jackson laboratories). Después del lavado, se han montado por último los ovocitos en Immumount antifade (Shandon Laboratories) entre el portaobjetos y la lámina y examinado con microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot) o bien con microscopio confocal (Leica Lasertechnik, GmbH).

Ensayos funcionales de fusión

Se han realizado los ensayos funcionales de inhibición de la fusión en unas condiciones similares a las usadas para la FIV: es decir, en unas condiciones suficientemente próximas a las condiciones fisiológicas puesto que permiten la obtención de embarazos y de niños. Brevemente, se han incubado los ovocitos en unas gotas de 20 μl de Ferticult con aceite durante 18 horas en una incubadora al 5% de CO2 a 37º con 4.000 espermatozoides móviles. Los ensayos se han realizado suplementando el medio con el péptido FEEc a una concentración de 200 μM. Al final de la incubación, se han lavado los ovocitos y se han incubado durante 20 minutos en Hoechst 33342 (Sigma) a 5 μg/ml. Después de la fijación en PFA al 4% PBS-BSA al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente, se han montado los ovocitos en immumount entre el portaobjetos y la lámina antes de ser examinados con UV. Los espermatozoides fusionados eran fluorescentes. Se han analizado los portaobjetos en un microscopio Zeiss Axiophot equipado con una cámara conectada a un programa de análisis de imágenes Imaging System Package (Applied Imaging, Newcastle-upon-Tyne, UK).

Resultados

Inmunofluorescencia y microscopia confocal

Se han incubado los ovocitos con péptido FEEc biotinilado a 200 μM durante 45 minutos. El examen en microscopia confocal ha permitido demostrar una marcación membranaria con el péptido FEEc tal como es visible sobre la sección ecuatorial del ovocito (Figura 1A). La superposición informática ha mostrado además que esta marcación corresponde a unos parches membranarios (Fig. 1B).

Inducción de parches de fusión por el péptido FEEc sobre el ovocito humano

El espermatozoide induce unos parches multimoleculares. Incubando unos ovocitos madurados *in vitro* con una suspensión de péptido FEEc a 200 μM durante 18 horas, los inventores han demostrado una redistribución de la subunidad integrina α6. En efecto, mientras que sobre el ovocito intacto la distribución de la subunidad α6 es homogénea sobre la superficie del ovocito (Fig. 2A), el péptido FEEc induce su redistribución en forma de pequeños agregados membranarios. En el ratón, el espermatozoide induce efectivamente dichos parches durante la fecundación. Se puede concluir entonces que el péptido FEEc induce una redistribución membranaria de proteínas de adhesión comparable a la inducida por el propio espermatozoide durante la fecundación.

Ensayo funcional de fusión con unos gametos humanos

En unas condiciones parecidas, se han incubado unos ovocitos sin zona pelúcida en presencia de 200 μM de péptido FEEc y de espermatozoides. En los ovocitos de control, se ha observado una veintena de espermatozoides fusionados en el seno del citoplasma ovocitario (Fig. 3A). En presencia de 200 μM de péptido FEEc, el número de

espermatozoides citoplásmicos fue mucho más importante (Fig. 3B). El experimento reproducido sobre un mayor número de ovocitos hizo aparecer un aumento medio de 60% aproximadamente del número de espermatozoides que se han fusionado con el ovocito (26,1 ± 8,3 contra 16,4 ± 5,2; P < 0,001). El aumento del número de espermatozoides es por lo tanto estadísticamente significativo. Este efecto es específico puesto que la incubación con el mismo péptido aleatorio no tiene ningún efecto. La acción del péptido FEEc es reversible puesto que los ovocitos preincubados con el péptido FEEc y después lavados e inseminados no muestran ninguna variación de su capacidad fusogénica. Por lo tanto, no existe tampoco ningún efecto tóxico sobre los ovocitos sino que la co-incubación es necesaria para que aparezca el efecto del péptido.

Discusión

El péptido FEEc presenta por lo tanto la propiedad de aumentar la capacidad fusogénica del ovocito humano. Reproduce el mecanismo por el cual el espermatozoide presente en contacto con la membrana ovocitaria induce los complejos moleculares de fusión ovocitarios y permite por lo tanto un proceso de fusión más fácil.

Puede servir para suplementar los medios de cultivo usados para la reacción de la fecundación *in vitro*. Por lo tanto, debería poder mejorar los porcentajes de fecundación de las FIV realizadas para la esterilidad idiopática o para la deficiencia espermática. Habría entonces una disminución del recurso a las técnicas de microinyección y una mejora de la calidad de los embriones obtenidos.

Resultados del estudio del QDE cíclico sobre la fusión gamética en el ratón

De manera parecida a lo que se ha observado en la especie humana, se ha estudiado el efecto de un tripéptido cíclico en el modelo de ratón. Por analogía, el motivo del tripéptido reproducía esta vez el sitio de fijación de la desintegrina de la fertilina β del ratón, es decir, el tripéptido QDE. Este péptido se denominó QDEc.

Material y método

Se han sobreovulado unos ratones C56b1/CBA de 6 semanas mediante 5 Ul de PMSG y 5 Ul de hCG administradas con 48 horas de intervalo. Trece horas después de la última inyección, se han sacrificado los ratones y se han recuperado los oviductos y después se han lacerado en un medio de M2. Los ovocitos recuperados se han inseminado entonces en su cumulus o bien se han descoronado mediante un rápido paso por hialuronidasa. Después, se ha eliminado la zona pelúcida de los ovocitos descoronados mecánicamente con la ayuda de tijeras de microdisección bajo una lupa binocular.

Se han preincubado los ovocitos sin zona pelúcida durante 30 min. y después se han inseminado en presencia; 1) de un grupo de control de medio M16; 2) de medio suplementado con 10 μM de QDEc; 3) de 100 μM de QDEc y 4) de 1 mM de QDEc. En todos los casos, se han inseminado los ovocitos durante 3 horas con una concentración de 10^6 espermatozoides móviles por ml.

Se han incubado los ovocitos intactos con QDE cíclico a 100 μM y 10^5 espermatozoides/ml.

Después de la incubación, se han lavado los ovocitos cuidadosamente y se han incubado a continuación en Hoescht a 10 μM durante 30 min., se han aclarado y después examinado en UV en un microscopio Zeiss. Se han analizado los datos con la ayuda del programa Statview®.

Resultados

1- *Ovocitos sin zona pelúcida*

Durante 5 experimentos, se han estudiado 170 ovocitos en 4 grupos. Mientras que la media del número de espermatozoides fusionados por ovocito es de 2,2 ± 0,1 (med±ES) en el grupo de control, ésta aumenta de manera dependiente de la dosis con la presencia del QDE en el medio de incubación (Figura 5). Alcanza unas diferencias estadísticas para unas concentraciones de 100 μM (P < 0,05) y de manera significativa para 1 mM (P < 0,004) con un aumento de 32% del número de los espermatozoides fusionados.

2- *Ovocitos intactos*

En FIV habitual: los tres experimentos han dado unos resultados coherentes con una media de fecundación de 32,1 + 7,6% para el control y 56,3 + 16,0% para el grupo ensayado (P < 0,001) (Figura 6).

Discusión

El número de espermatozoides que se fusionan con un ovocito sin zona pelúcida es de una veintena en la especie humana mientras que no supera en general 2 espermatozoides en el ratón. El aumento de este número, menos importante que en la especie humana, bajo el efecto del QDE alcanza rápidamente un nivel de significación estadística. Además, en la fecundación *in vitro* de ovocitos intactos, el QDE cíclico provoca un aumento del 75% del porcentaje de ovocitos normalmente fecundados. El esquema de interacción del espermatozoide con la membrana ovocitaria parece

ser por lo tanto comparable en el ratón a lo que ocurre en la especie humana. La versión ciclizada del péptido que reproduce el sitio de fijación del dominio desintegrina de la fertilina β aumenta bien las capacidades fusogénicas de los gametos.

Leyenda de las figuras

Figura 1. *Detección del péptido FEEc biotinilado en la superficie del ovocito humano*

Se ha eliminado la zona pelúcida de unos ovocitos mecánicamente y después se han incubado durante 45 min. con el péptido biotinilado a 100 μM. Se ha detectado el péptido FEEc mediante un anticuerpo de ratón anti-biotina reconocido por un anticuerpo biotinilado anti-inmunoglobulina de ratón y después mediante la estreptavidina-FITC. Entonces, se han montado los ovocitos en immumount entre el portaobjetos y la lámina y se han examinado con microscopio confocal. A: sección ecuatorial del ovocito, B: superposición de las secciones que corresponden a un hemi-ovocito.

Figura 2. *Inducción de parches de fusión mediante el péptido FEEc sobre el ovocito humano*

Se han incubado unos ovocitos intactos con péptido FEEc a 200 μM durante 45 minutos. Después del lavado, se han incubado con un anticuerpo anti subunidad integrina α6 a 20 μM durante 45 minutos y después se han fijado (PFA 4% durante 30 minutos). Después del lavado, se han incubado con un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con rodamina. Después, se han examinado en inmunofluorescencia. Fig. 2A: ovocito de control que muestra una fluorescencia difusa y homogénea sobre la superficie del ovocito. Fig. 2B: después de la incubación con el péptido FEEc, existe una redistribución de la subunidad α6 en forma de agregados membranarios.

Figura 3. *Ensayo funcional de fusión con unos gametos humanos*

Se han incubado los ovocitos sin zona pelúcida en unas gotas de 20 μl con aceite en un medio de cultivo con 4.000 espermatozoides móviles durante 18 horas. Después, se han lavado e incubado a continuación en una disolución de Hoechst 33342 10 μM durante 30 minutos antes de ser lavados de nuevo, montados en immumount entre el portaobjetos y la lámina y examinados bajo UV. Fig. 3A: ovocito de control que muestra la presencia de una veintena de espermatozoides fusionados en el citoplasma ovocitario. Fig. 3B: ovocito co-incubado con el péptido a 100 μM que presenta una sesentena de espermatozoides fusionados.

Figura 4. *Efectos del péptido FEEc sobre la capacidad de fecundación del ovocito humano*

Comparación de los índices de fecundación obtenidos en ausencia y en presencia del péptido FEEc a 100 μM en el medio de incubación.

Figura 5. *Efectos del péptido QDEc sobre la fusión gamética en el ratón*

Los números entre paréntesis representan el número de ovocitos en cada grupo. Diferencia estadística con los valores del grupo de control: * ($P < 0,05$); ** ($P < 0,04$).

Figura 6. *Efecto de QDE cíclico sobre la fecundación in vitro de ovocitos intactos de ratones*

Referencias

Número de acceso: Ratones Q60718; Ser humano Q99965; Cobaya Q60411; Conejo Q28660; Macaco Q28478; Bovino 077780; Rata Q63202; Cerdo CAC84225.

Aytoz A, Van den **Abbeel** E, **Bonduelle** M, **Camus** M, **Joris** H, **Van Steirteghem** A, **Devroey** P. Obstetric outcome of pregnancies after the transfer of cryopreserved and fresh embryos obtained by conventional *in-vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. Octubre 1999; 14(10):2619-24.

Bavister BD. Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*. Agosto 2002; 124(2):181-96.

Bronson RA, **Fusi** FM, **Calzi** F, **Doldi** N, **Ferrari** A. Evidence that a functional fertilin-like ADAM plays a role in human sperm-oolemmal interactions. *Mol Hum Reprod*. mayo 1999; 5(5):433-40.

Evans JP. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update*. Julio-Agosto 2002; 8(4):297-311. Review.

Evans JP. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays*. Julio 2001; 23(7):628-39. Review.

Evans JP, **Schultz** RM, y **Kopf** GS. Mouse sperm-egg plamsa membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) p. *J Cell Sci*. 1995, 108, 3267-3278.

Gupta SK, **Alves** K, **Palladino** LO, **Mark** GE, **Hollis** GF. Molecular cloning of the human fertilin beta subunit. *Biochem Biophys Res. Commun*. 1996 Jul. 16; 224(2):318-26.PMID: 8702389.

Gupta S, **Li** H, **Sampson** NS. Characterization of fertilin beta-disintegrin binding specific in sperm-egg adhesion. *Bioorg Med. Chem*. Abril 2000; 8(4):723-9

Kowalik A, **Palermo** GD, **Barmat** L, **Veeck** L, **Rimarachin** J, **Rosenwaks** Z. Comparison of clinical outcome after cryopreservation of embryos obtained from intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. Oct. 1998; 13(10):2848-51.

Li H, **Sampson** N. Structural analysis of fertilin(beta) cyclic peptide mimics that are ligands for alpha6betal integrin. *J Pept Res* Feb. 2002; 59(2):45-54

Myles DG, **Kimmel** LH, **Bolbel** CP, **White** JM, y **Primakoff** P. Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc Natl Acad Sci* USA 1994, 91, 4195-4198.

Mwethera PG, **Makokha** A, **Chai** D. **Fertilin** beta peptides inhibit sperm binding to zona-free egg in a homologous baboon *in vitro* fertilization system. *Contraception*. Feb. 1999; 59(2):131-5

Simon A, **Holzer** H, **Hurwitz** A, **Revel** A, **Zentner** BS, **Lossos** F, **Laufer** N. Comparison of cryopreservation outcome following intracytoplasmic sperm injection and conventional *in vitro* fertilization. *J Assist Reprod Genet*. Agosto 1998; 15(7):431-7.

Swann K. Ca(2+) oscillations and sperm factors at fertilization in mammals. *Hum Fertil* (Camb). 1999; 2(1):61-66.

Swann K, **Parrington** J, **Jones** KT. Potential role of a sperm-derived phospholipase C in triggering the egg-activating Ca2+ signal at fertilization. *Reproduction*. Dic. 2001; 122(6):839-46. Review.

Tesarik J, **Mendoza** C, **Greco** E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod*. Enero 2002; 17(1):184-9.

Vidaeus CM, **von Kapp-Herr** C, **Golden** WL, **Eddy** RL, **Shows** TB, **Herr** JC. uman fertilin beta: identification, characterization, and chromosomal mapping of an ADAM gene family member. *Mol Reprod Dev*. Marzo 1997; 46 (3):363-9.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* o *ex vivo* de un péptido cíclico que comprende el tripéptido que forma un sitio de unión de la fertilina beta a la integrina del ovocito para aumentar las capacidades fusogénicas de un gameto.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el tripéptido es X-(Q/D/E)-E, siendo X un aminoácido.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el tripéptido es FEE.

4. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho péptido presenta la siguiente fórmula:



en la que X representa un aminoácido, m y n están comprendidos entre 0 y 14, y "TriPept" designa dicho tripéptido.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que m+n es inferior a 10, preferentemente inferior o igual a 5.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho péptido presenta la siguiente fórmula:



en la que X es un aminoácido.

7. Uso según la reivindicación 6, en el que X es un aminoácido poco voluminoso y no cargado, preferentemente seleccionado de entre A, S o T.

8. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido cíclico está en forma de multímero.

9. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el gameto es un ovocito.

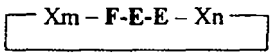
10. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el gameto es un espermatozoide.

11. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, destinado a mejorar la fecundación *in vitro*.

12. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, destinado a mejorar la inseminación artificial y/o la transferencia nuclear en unos animales no humanos.

13. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 10, destinado a mejorar la fecundación *in vitro* y la inseminación artificial en el ser humano.

14. Péptido cíclico que presenta la siguiente fórmula:



en la que X representa un aminoácido, m y n están comprendidos entre 0 y 14, una variante o un derivado de éste.

15. Péptido cíclico según la reivindicación 14, en el que m+n es inferior a 10, preferentemente inferior o igual a 5.

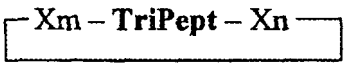
16. Péptido cíclico según la reivindicación 15, presentando dicho péptido la siguiente fórmula:



en la que X es un aminoácido, siendo X preferentemente seleccionado de entre A, S o T.

17. Péptido cíclico según la reivindicación 16, en el que X es S.

18. Multímero de péptidos cíclicos, presentando dichos péptidos la siguiente fórmula:



en la que X representa un aminoácido, m y n están comprendidos entre 0 y 14 y "TriPept" designa el tripéptido X-(Q/D/E)-E que forma un sitio de unión de la fertilina beta a la integrina del ovocito.

19. Multímero según la reivindicación 18, en el que el tripéptido es FEE.

20. Multímero según la reivindicación 18 ó 19, presentando dicho péptido la fórmula siguiente:



en la que X es un aminoácido, siendo X preferentemente seleccionado de entre A, S o T.

21. Composición destinada a aumentar las capacidades fusogénicas de gametos, que comprende un péptido según una de las reivindicaciones 14 a 17, o un multímero según una de las reivindicaciones 18 a 20.

22. Uso de un péptido según una de las reivindicaciones 14 a 17, o un multímero según una de las reivindicaciones 18 a 20, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los problemas de fecundidad.

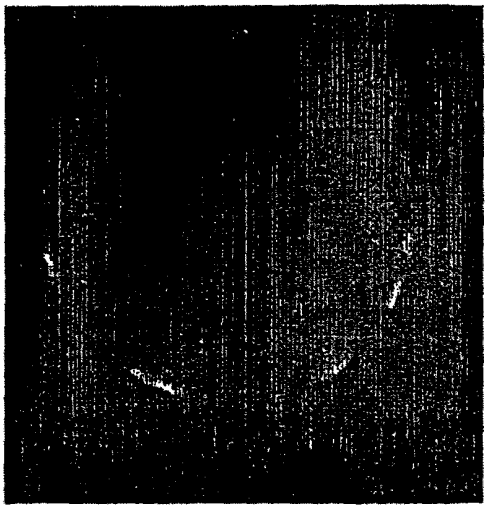




Fig. 1A **Fig. 1B**

Figura 1

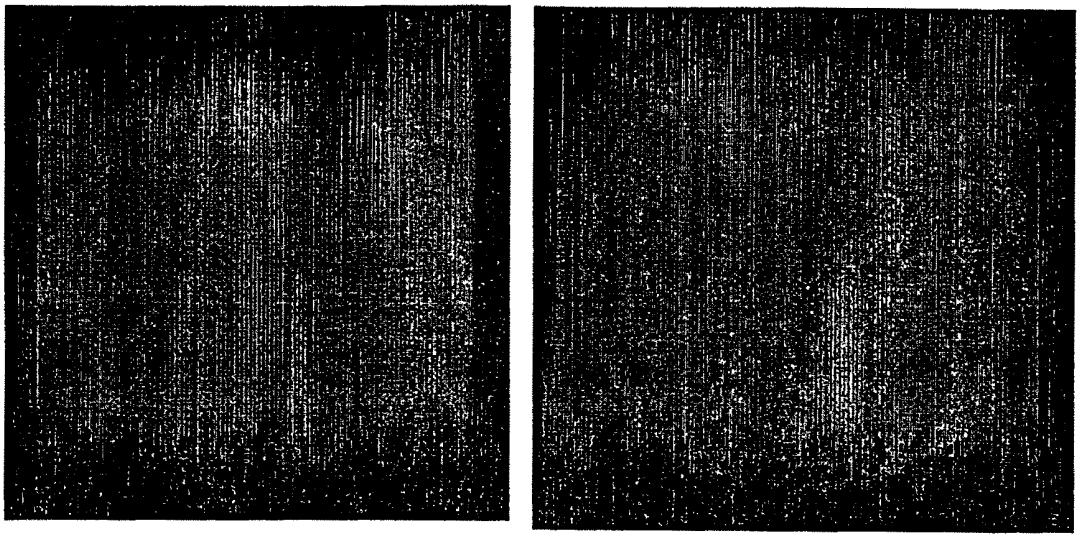


Fig. 2A Fig. 2B

Figura 2



Control FEE 100 µM

Fig. 3A Fig. 3B

Figura 3

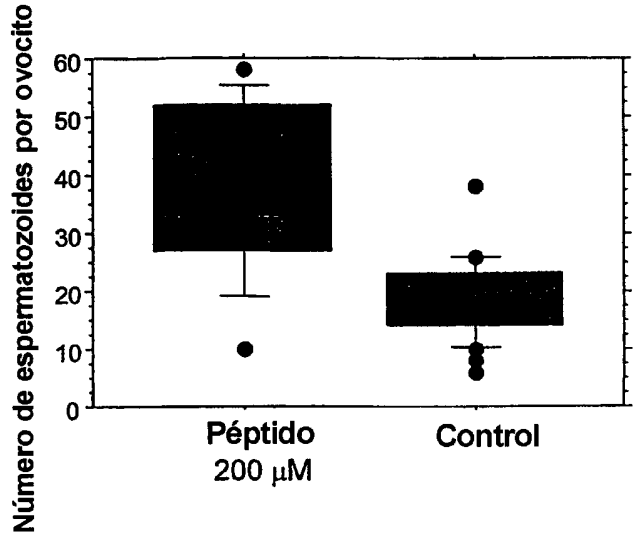


Figura 4

Figura 5

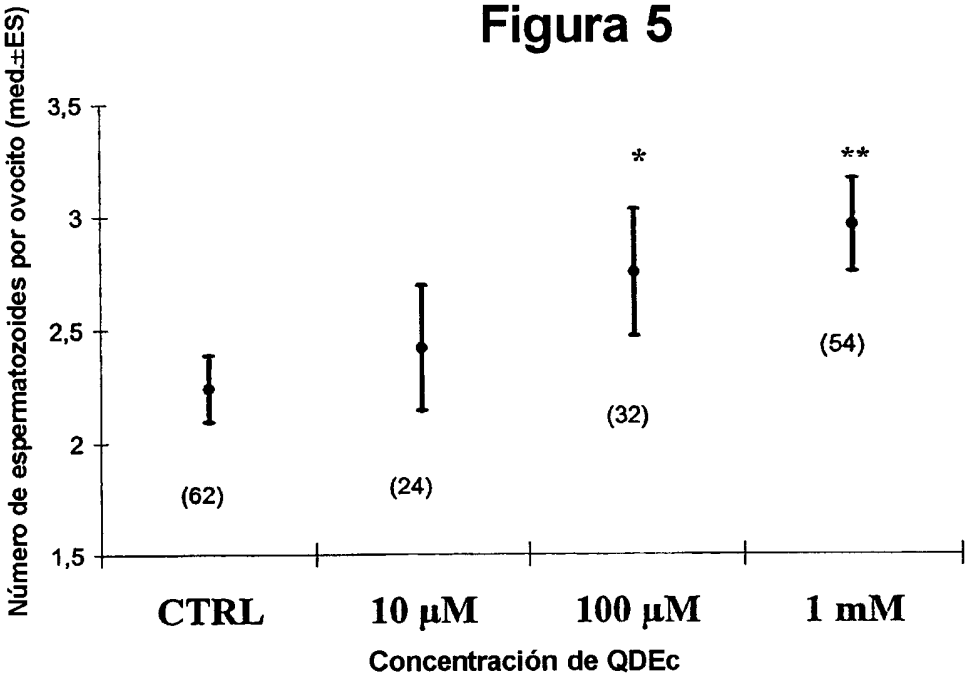
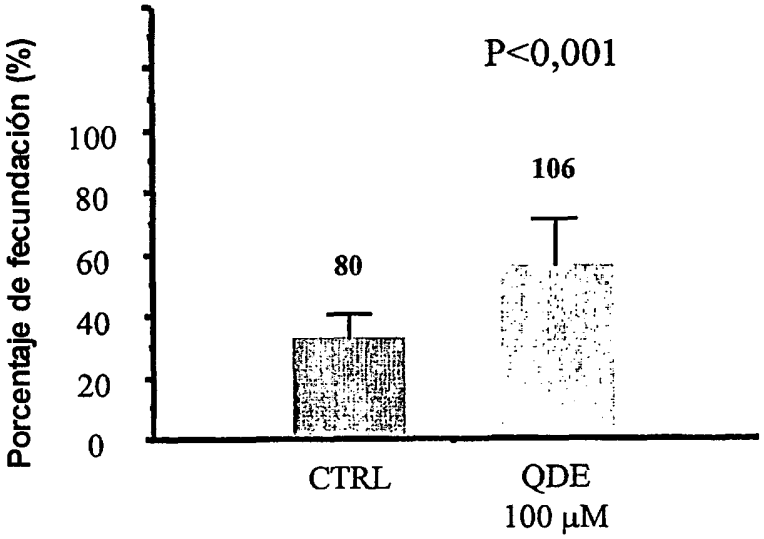


Figura 6


Porcentaje de fecundación (%)
100
80
60
40
20
0
P<0,001
106
80
CTRL
QDE
100 µM

LISTA DE SECUENCIAS

<110> université Paris 13, Centre National de Recherche scientifique

<120> PÉPTIDO QUE AUMENTA LA CAPACIDAD FUSOGÉNICA DE UN GAMETO

<130> B0200WO

<150> FR 03-13545

<151> 19-11-2003

<160> 9

<170> Patentln version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SITE

<222> (14)..(16)

<223> Tripéptido

<400> 1

```
Cys Leu Phe Met Ser Lys Glu Arg Met Cys Arg Pro Ser Phe Glu Glu
1               5                   10                  15

Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Ala Ser Cys
            20                  25                  30
```

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> SITE

<222> (14)..(16)

<223> Tripéptido

<400> 2

```
Cys Lys Leu Lys Arg Lys Gly Glu Val Cys Arg Leu Ala Gln Asp Glu
1               5                   10                  15

Cys Asp Val Thr Glu Tyr Cys Asn Gly Thr Ser Glu Val Cys
            20                  25                  30
```

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

<220>

<221> SITE

<222> (14)..(16)

<223> Tripéptido

<400> 3

Cys Glu Phe Lys Thr Lys Gly Glu Val Cys Arg Glu Ser Thr Asp Glu
1 5 10 15

Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Gly Ala Cys
20 25 30

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> *oryctolagus cuniculus*

<220>
<221> SITE
<222> (14)..(16)
<223> Tripéptido

<400> 4

Cys Thr Phe Lys Glu Arg Gly Gln Ser Cys Arg Pro Pro Val Gly Glu
1 5 10 15

Cys Asp Leu Phe Glu Tyr Cys Asn Gly Thr Ser Ala Leu Cys
20 25 30

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*

<220>
<221> SITE
<222> (14)..(16)
<223> Tripéptido

<400> 5

Cys Leu Phe Met Ser Gln Glu Arg Cys Cys Arg Pro Ser Phe Asp Glu
1 5 10 15

Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Thr Ser Ala Ser Cys
20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<220>
<221> SITE
<222> (14)..(16)
<223> Tripéptido

<400> 6

Cys Ala Phe Ile Pro Lys Gly His Ile Cys Arg Gly Ser Thr Asp Glu
1 5 10 15

Cys Asp Leu His Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Ala Ala Cys
20 25 30

<210> 7
<211> 30
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<220>
<221> SITE
<222> (14)..(16)
<223> Tripéptido

<400> 7

Cys Asn Leu Lys Ala Lys Gly Glu Leu Cys Arg Pro Ala Asn Gln Glu
1 5 10 15

Cys Asp Val Thr Glu Tyr Cys Asn Gly Thr Ser Glu Val Cys
20 25 30

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> *Sus scrofa*

<220>
<221> SITE
<222> (14)..(16)
<223> Tripéptido

<400> 8

Cys Ser Phe Met Ala Lys Gly Gln Thr Cys Arg Leu Thr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Cys Asp Leu Leu Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Ala Ala Cys
20 25 30

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido FEEc
<220>

<221> DISULFID
<222> (1)..(6)
<223>

<400> 9

Cys Ser Phe Glu Glu Cys
1 5