



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 323 993**

② Número de solicitud: 200602334

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/4025 (2006.01)
C07D 207/46 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **14.09.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.07.2009

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta
Edif. de la Convalecencia
30003 Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **Coy Fuster, Pilar y**
Avilés Sánchez, Manuel

⑦ Agente: **Temño Cenicerros, Ignacio**

⑤ Título: **Método para aumentar la monospermia en la fecundación *in vitro*.**

⑤ Resumen:

Método para aumentar la monospermia en la fecundación *in vitro*.

La presente invención se refiere a un método para aumentar la eficacia de la fecundación *in vitro* de mamíferos induciendo el endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos antes de su cocultivo con espermatozoides.

ES 2 323 993 A1

DESCRIPCIÓN

Método para aumentar la monospermia en la fecundación *in vitro*.

5 Esta invención se refiere a un método para aumentar la eficacia de la fecundación *in vitro* de mamíferos mediante la reducción de los niveles de polispermia.

Estado de la técnica anterior

10 La polispermia en mamíferos es una anomalía de la fecundación resultante de la entrada de más de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito (Hunter, 1991, Mol Reprod Dev. 29:385-391).

15 Esta patología se ha descrito en todas las especies de mamíferos en condiciones fisiológicas (coito, monta natural), pero en porcentajes muy bajos. Sin embargo, es más frecuente durante la fecundación *in vitro* (FIV), fundamentalmente en la especie porcina, aunque también ocurre con menor incidencia en otras como la bovina o la humana.

20 En la especie humana, la polispermia suele dar lugar a abortos espontáneos, aunque se han publicado referencias de nacimientos de niños triploides o tetraploides (Dean *et al.*, 1997, J Med Genet 34:246-249; Roberts *et al.*, 1996, Am J Med Genet 62:243-246; Sherard *et al.*, 1986, Am J Med Genet 25:307-312; Shiono *et al.*, 1988, Am J Med Genet 29:543-547; Uchida and Freeman, 1985, Am J Obstet Gynecol 151:65-69). Estos nacimientos poliploides se caracterizan por malformaciones severas y múltiples anomalías (Doshi *et al.*, 1983, Hum Pathol 14:716-723; Kjaer *et al.*, 1997, Am J Med Genet 72:216-221; Pitt *et al.*, 1981, J Med Genet 18:246-249).

25 En la mayoría de los casos en los mamíferos, el apareamiento tiene lugar antes de la ovulación y tras la fecundación se establece rápidamente una defensa contra la polispermia. Este bloqueo es estable y de larga duración (Hunter *et al.*, 1998, J Exp Zool 280:182-188). Después de la penetración del espermatozoide, los gránulos corticales, unas organelas especializadas del ovocito, liberan su contenido al espacio perivitelino mediante un proceso conocido como reacción cortical. El contenido de los gránulos corticales altera las propiedades de la zona pelúcida, lo que se conoce como reacción de zona, y en consecuencia se bloquea la penetración polispermica.

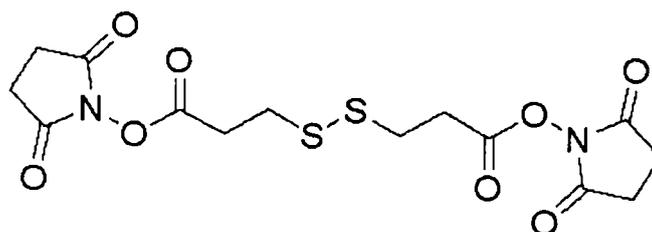
30 La zona pelúcida (ZP), es una matriz de glicoproteínas que sintetiza y segrega el ovocito en crecimiento y que juega un papel fundamental en los primeros momentos de la fertilización. La zona pelúcida está presente en los ovocitos de todos los mamíferos en el momento de la fecundación y desempeña unas funciones básicas en dicho proceso, tales como la unión del espermatozoide, la inducción de la reacción acrosómica, el bloqueo de la poliespermia y la protección frente a fecundaciones interespecíficas, además de desempeñar una función protectora del ovocito y del embrión temprano. La ZP es una cubierta glicoprotéica, espesa y elástica, que rodea al ovocito. En la ZP porcina se han identificado tres familias de glicoproteínas: ZP2, ZP3 y ZP4, con distintos pesos moleculares y diferente distribución. Estas glicoproteínas están altamente glicosiladas, lo que es muy importante para conferirle a la ZP sus funciones biológicas específicas. La composición y las características de la ZP parecen ser muy diferentes *in vivo* e *in vitro*, lo cual podría influir en la eficacia de la fecundación *in vitro*.

35 Entre los cambios que se han descrito en la zona pelúcida tras la fecundación y la reacción cortical, se encuentra el "endurecimiento" de la misma, medido mediante el aumento de su resistencia a la digestión con proteasas (Braden *et al.*, 1954 Aust J Biol Sci 7:391-409; Austin y Braden, 1956 Journal of Experimental Biology 33:358-365; Barros y Yanagimachi, 1971, Nature 24; 233(5317):268-269; Drobins *et al.*, 1988, J Exp Zool 245:206-219). Esta afirmación se basa en numerosos estudios realizados fundamentalmente en el ratón que demuestran una proteólisis selectiva de la glicoproteína de la zona pelúcida ZP2 por una proteasa de los gránulos corticales liberados tras la llegada del espermatozoide (Bleil *et al.*, 1981, Dev Biol 86:189-197; Moller y Wassarman, 1989, Dev Biol 132:103-112). Este cambio en la zona pelúcida tendría como consecuencia la formación de puentes de disulfuro, dependiendo de la especie, que en último término serían los responsables del endurecimiento (Schmell y Gulyas, 1980, Gamete Research 3:279-290; Zhang *et al.*, 1991, Mol Reprod Dev 28:292-296) y por ende, del bloqueo de la polispermia.

40 Desde que se obtuvieron los primeros lechones nacidos por fecundación *in vitro* (Cheng *et al.*, 1986, Theriogenology 25:146) se hizo evidente el problema de la polispermia en el cerdo. Por este motivo han sido numerosas las publicaciones orientadas a la búsqueda de las condiciones ideales durante la FIV para evitar la entrada masiva de espermatozoides en el ovocito de esta especie. Los esfuerzos investigadores se han centrado en el estudio de los medios de cultivo empleados (Dobrinsky *et al.*, 1996, Biol Reprod 55:1069-1074; Abeydeera *et al.*, 1998, Mol Reprod Dev 51:395-401; Coy *et al.*, 2002, Reproduction 124:279-288), la estandarización de las condiciones de trabajo (Coy *et al.*, 1993a, Theriogenology 39: 1201-1208; Coy *et al.*, 1993b, Theriogenology 40: 539-546; Coy *et al.*, 1993c, Zygote 1: 209-213), el empleo de espermatozoides criopreservados, y a ser posible de origen epididimario (Rath y Niemann 1997 Theriogenology 547:785-793; Romar *et al.*, 2003a, Theriogenology 59:975-986), la comparación de los resultados entre los distintos sistemas de capacitación (Jeong y Yang, 2001, Mol Reprod Dev 59:330-335; Matás *et al.*, 2003 Reproduction 125: 133-141), o el empleo de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) como técnica alternativa a la FIV (Probst *et al.*, 2002, Theriogenology 57:752; García-Roselló *et al.*, 2005, J Androl 27:268-275). Sin embargo, como señalan diversas revisiones sobre el tema (Abeydeera 2002, Theriogenology 57:257-273; Coy y Romar, 2002, Reprod Fert Dev 14:275-286; Wheeler *et al.*, 2004, Reprod Fert Dev 16:15-25), el problema persiste y las soluciones pasan por intentar imitar, en condiciones *in vitro*, el mecanismo fisiológico de bloqueo de la polispermia que tiene lugar en el oviducto.

Se ha demostrado que en la especie porcina los ovocitos madurados *in vitro* poseen la misma capacidad para liberar los gránulos corticales (GC) tras la fecundación que los madurados *in vivo* (Wang *et al.*, 1998, Mol Reprod Dev 49:308-316). Sin embargo, tanto en el cerdo como en la vaca se ha observado una ausencia de endurecimiento o “hardening” tras la reacción cortical en ovocitos madurados y fecundados *in vitro* (Coy *et al.*, 2002, Reproduction 124:279-288; Romar *et al.*, 2003b, Anim Reprod Sci 85:287-300, Coy *et al.*, 2005, Reproduction 129: 19-26). Una hipótesis posible sería que la anormalmente alta incidencia de polispermia en la especie porcina tras la penetración *in vitro* no fuera debida a una incompleta reacción cortical (exocitosis de los gránulos corticales), sino a la necesidad prioritaria del endurecimiento de la zona pelúcida como mecanismo de bloqueo de la polispermia frente a otros mecanismos como la proteólisis o remoción de receptores para el espermatozoide mediada por glicosidasas o proteasas de los gránulos corticales.

El DTSP o agente de Lomant (ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester) cuya estructura química es:



es un reactivo químico usado para conjugar moléculas por medio de un enlace covalente. Para ello el grupo químico N-hidroxisuccinimidil (NHS) reacciona con los grupos aminos presentes en los aminoácidos lisina de las proteínas (Lomant y Fairbanks 1976, J Mol Biol 104: 243; Jaraus y Kadenbach 1985, Eur J Biochem 146: 211). Este compuesto químico se encuentra disponible comercialmente.

Otros compuestos que actúan de forma similar, conjugando moléculas por medio de un enlace covalente, son el EGS (Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato]), el Sulfo-EGS (Etilen glicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato]), el BSO-COES (Bis[2 succinimidooxicarboniloxi] etil] sulfone), el DSP (Ditiobis[succinimidilpropionato]), el DTSSP (3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate]), el DSS (Disuccinimidil suberato), el BS³ (Bis[sulfosuccinimidil] suberate), el DSG (Disuccinimidil glutarato), el DST (Disuccinimidil tartarato), el DFDNB (1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzeno), el DPDPB (1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano), el BM[PEO]₃(1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol), el BMH (Bis-Maleimidohexano), el BM [PEO]₂ (1, 8-bis-Maleimidodietilenglicol), el HBVS (1,6-Hexano-bis-vinilsulfona), el DTME (Ditio-bis-maleimidoetano), el BMB (1,4-bis-Maleimidobutano), el BMDB (1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxitbutano), o el BMOE (Bis-Maleimidoetano).

Entre las sustancias antipolispermicas descubiertas figuran principalmente las denominadas oviductinas (Kouba *et al.*, Biol Reprod 2000, 63: 242-250; McCauley *et al.*, 2003, Biol Reprod 69:828-834) que son proteínas específicas secretadas por las células oviductales. Antes de descubrir su efecto beneficioso sobre la reducción de la polispermia, se realizaron numerosos trabajos utilizando medios condicionados con secreciones oviductales o con diferentes proporciones de fluido oviductal, así como cocultivos con células epiteliales del oviducto (Nagai y Moor 1990, Mol Reprod Dev 26:377-382; Funahashi y Day, 1993, J Reprod Fert 99:97-1038; Kano *et al.* 1994, Theriogenology: 42:1061-1068; Dubuc y Sirard, 1995, Mol Reprod Dev 41:360-367; Kim *et al.* 1997, Zygote 5: 61-65; Vatzias y Hagen 1999, Biol Reprod 60: 42-48; Romar *et al.* 2001, Anim Rep Sci 68:85-98). Finalmente, se ha observado el efecto beneficioso de la osteopontina, una proteína de la matriz extracelular también presente en el oviducto, sobre la polispermia (Prather, WO2006/012177).

Explicación de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, ésta proporciona un método para fecundación *in vitro* mediante el aumento de la resistencia de la zona pelúcida de los ovocitos de mamífero a la digestión con proteasas y, como consecuencia, la inducción de uno de los mecanismos fisiológicos de bloqueo de la polispermia.

Hasta ahora se pensaba que el endurecimiento de la zona pelúcida era una consecuencia de la fecundación (Moller y Wassarman, 1989, Dev Biol 132:103-112), es decir, que se debía a una respuesta del ovocito a la entrada del espermatozoide. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se ha podido constatar que esto no es siempre así y que es posible inducir el endurecimiento de la zona pelúcida y así aumentar muy significativamente la monospermia. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, ésta proporciona un método para aumentar la monospermia en la fecundación *in vitro* que comprende la inducción del endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos previo a la fecundación.

De acuerdo con una realización de la invención, dicho endurecimiento previo a la fecundación de la zona pelúcida de los ovocitos se lleva a cabo empleando medios químicos, físicos y/o biológicos.

ES 2 323 993 A1

En el contexto de la invención, el término “medios químicos” hace referencia al uso de al menos un compuesto químico, capaz de provocar el endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos. De acuerdo con la invención, el término “medios físicos” hace referencia a la aplicación de agentes físicos (cambios de temperatura, presión, humedad, densidad, etc) que pudieran endurecer la zona pelúcida. De acuerdo con la invención, el término “medios biológicos” hace referencia a la utilización de fluidos o sólidos corporales (humanos o animales) o de sus componentes (como puede ser el fluido oviductal, alguna de las proteínas que contiene o proteínas recombinantes), a la utilización de medios de cultivo condicionados u obtenidos a partir de secreciones de células oviductales o endometriales, que provoquen un endurecimiento de la zona pelúcida.

De modo preferente, dicho endurecimiento se lleva a cabo empleando compuestos químicos o biológicos, inductores de dicho endurecimiento. En el caso de emplearse compuestos biológicos, se utilizan de manera preferentemente componentes oviductales.

De modo preferido, dicho endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos se lleva a cabo mediante la incubación de éstos con al menos un compuesto químico o biológico capaz de formar uniones entre los diferentes componentes de dicha zona pelúcida. Dichos compuestos químicos son compuestos capaces de formar enlaces covalentes entre proteínas y más preferiblemente compuestos que forman enlaces covalentes entre los aminoácidos lisina de las glicoproteínas de la zona pelúcida. Dichos compuestos biológicos son compuestos capaces de unirse a la zona pelúcida por fuerzas electrostáticas o de Van der Waals y restringir el paso de espermatozoides a través de la misma, aumentando su resistencia a la digestión con proteasas (endurecimiento).

Así, de acuerdo con una realización preferida de la invención, ésta proporciona un método para aumentar la monospermia en la fecundación *in vitro* que comprende la inducción del endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos con al menos un compuesto químico que forman enlaces covalentes entre proteínas o un compuesto biológico que se une a la zona pelúcida, y el posterior cocultivo de los ovocitos tratados con dicho agente con espermatozoides. De acuerdo con una realización preferida, dicho compuesto forma enlaces covalentes entre los aminoácidos lisina de las glicoproteínas de la zona pelúcida de los ovocitos.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, tras el tratamiento de los ovocitos con el compuesto inductor del endurecimiento de la zona pelúcida de éstos, se lleva a cabo un lavado del medio para la eliminación de dichos compuestos del medio antes de iniciar el cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides.

De acuerdo con una realización preferida, el agente inductor del endurecimiento de la zona pelúcida del ovocito se selecciona entre el grupo formado por ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilen glicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato](Sulfo-EGS), Bis[2 succinimidooxicarboniloxi etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis[succinimidilpropionato](DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), Bis[sulfosuccinimidil] suberate (BS³), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol (BM[PEO]₃), Bis-Maleimidoheptano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]₂), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE), y mezcla de los mismos. En una realización más preferida el agente es el ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP).

El método resulta beneficioso para la fecundación *in vitro*, ya que incrementa su rendimiento al reducir el número de fecundaciones anómalas (polispermicas). El método es especialmente adecuado para la especie porcina pero también mejora los resultados en la especie bovina y podría utilizarse en otros mamíferos, incluyendo la especie humana.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, ésta proporciona el uso de agentes que forman enlaces covalentes entre proteínas como inductores del endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos de mamífero *in vitro*. De acuerdo con una realización preferida de la invención, dichos agentes son responsables de la formación de enlaces covalentes entre los aminoácidos lisina de las glicoproteínas de la zona pelúcida.

En una realización preferida, dichos agentes se seleccionan entre el grupo formado por ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilen glicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato](Sulfo-EGS), Bis[2 succinimidooxicarboniloxi etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis[succinimidilpropionato](DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), Bis[sulfosuccinimidil] suberate (BS³), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol (BM[PEO]₃), Bis-Maleimidoheptano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]₂), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE) y mezcla de los mismos. En una realización más preferida el agente es el ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP).

Dicho endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos tiene como consecuencia un efecto sobre el bloqueo de la polispermia. Por lo tanto, de acuerdo con éste aspecto de la invención, éste puede ser también referido como el uso de agentes formadores de enlaces covalentes entre proteínas como agentes antipolispermicos.

ES 2 323 993 A1

Así, de acuerdo con la invención, el DTSP (al igual que el resto de agentes formadores de enlaces covalentes entre proteínas) produce un endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos semejante al que se produce en condiciones fisiológicas y permite que el ovocito establezca un mecanismo eficaz de defensa contra la entrada masiva de espermatozoides en su citoplasma (polispermia) en ensayos de fecundación *in vitro*.

5 Del mismo modo, de acuerdo con la invención, el agente formador de enlaces covalentes entre proteínas, que de modo preferido es el DTSP, produce un incremento en la resistencia de la zona pelúcida de los ovocitos a la digestión con proteasas. Este endurecimiento, que también ocurre en condiciones fisiológicas, se puede inducir en el laboratorio con el DTSP y de este modo potenciar el mecanismo de defensa del ovocito contra la entrada masiva de espermatozoides (polispermia), que es frecuente en la fecundación *in vitro*.

10 El uso de agentes formadores de enlaces covalentes entre proteínas, como agente antipolispermico, dada su capacidad de producir un endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos puede ser utilizado con grandes ventajas en la especie porcina pero también en otras como la humana, bovina, equina, ovina, caprina, felina, canina o en roedores y lagomorfos.

De acuerdo con la invención, el método para aumentar la resistencia de la zona pelúcida de los ovocitos de mamífero a la digestión con proteasas comprende las etapas siguientes:

- 20 i) inducir el endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos por medios químicos, físicos y/o biológicos;
- ii) opcionalmente, lavar los ovocitos tratados en la etapa i);
- 25 iii) cocultivo de los ovocitos con espermatozoides.

Según una realización preferida, el endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos se lleva a cabo mediante el tratamiento con un agente formador de enlaces covalentes entre proteínas. De modo más preferido, el método comprende:

- 30 i) introducir los ovocitos en una solución que contiene al menos un agente formador de enlaces covalentes entre proteínas y opcionalmente un tampón;
- ii) opcionalmente, lavar dicha solución para eliminar la presencia de dicho agente; y
- 35 iii) transferir los ovocitos tratados previamente a otra solución a la que se añaden los espermatozoides para permitirles fecundar los ovocitos.

De modo que en el medio de maduración (solución de la etapa i) del método descrito en la presente invención, se introducen los ovocitos, el compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas y opcionalmente un tampón.

40 Los protocolos de maduración *in vitro* de los ovocitos, preparación de los espermatozoides, fecundación *in vitro*, cultivo y transferencia de embriones son conocidos y se han descrito en numerosas publicaciones (por ejemplo, Rath, 1992, *Theriogenology* 37:885-896; Abeydeera *et al.*, *Biol Reprod* 1998, 58:1316-1320; Coy *et al.*, 2005, *Reproduction* 129:747-755).

45 De acuerdo con una realización preferida, la concentración del compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas, por ejemplo DTSP, en el medio con el tampón y los ovocitos puede oscilar desde 0'03 hasta 1'2 mg/ml de DTSP y el tiempo de incubación de los ovocitos con dicho compuesto puede variar desde 1 minuto hasta 2 horas.

50 Sin la presencia de dicho compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas, el tiempo de digestión de la zona pelúcida con una solución de proteasa al 0'5% oscila entre uno y dos minutos, los porcentajes de polispermia (con concentraciones de espermatozoides que permitan penetraciones superiores al 90%) pueden superar el 90% en el cerdo y el 50% en la vaca (ver ejemplos, Tablas 1, 2, 3 y 4), y el número medio de espermatozoides que penetra por ovocito puede alcanzar valores de 12 en el caso del cerdo o de 1'7 en el caso de la vaca. Sin embargo, la adición de dicho compuesto aumenta el tiempo de resistencia de la zona pelúcida a la digestión con pronasa hasta 3700 segundos en el caso del cerdo y 1700 segundos en el caso de la vaca, la polispermia (en condiciones de saturación de espermatozoides en el medio) disminuye al 64% en el cerdo y al 36% en la vaca, y el número medio de espermatozoides por ovocito se sitúa en 2'8 en el cerdo y 1'6 en la vaca (Tablas 1, 2, 3 y 4).

60 En otro ejemplo (Tabla 5), la polispermia disminuye hasta el 54% cuando la penetración es del 94% y hasta el 30% cuando la penetración es del 63%.

Obtención y tratamiento de los ovocitos

65 Los ovocitos pueden ser obtenidos del oviducto mediante una intervención quirúrgica o bien de ovarios obtenidos en matadero, en el caso de animales de abasto. En la especie humana, se pueden obtener mediante punción de los folículos ováricos por vía transvaginal. Suele resultar más fácil obtener ovocitos de folículos ováricos y, en el caso de los animales, someterlos a un proceso de maduración *in vitro* que obtenerlos en el oviducto por vía quirúrgica.

ES 2 323 993 A1

Para la maduración *in vitro* existen numerosos protocolos y sistemas descritos (ver por ejemplo, Funahashi *et al.*, 1997, *Biol Reprod* 57:49-53; Coy *et al.*, 1999, *Theriogenology* 51: 799-812). Todos ellos utilizan un medio de cultivo más o menos complejo que contiene diferentes sales, sustratos energéticos, antibióticos, hormonas, etc. Los ovocitos en este medio de cultivo se mantienen durante un periodo de tiempo variable (por ejemplo, 24 horas en la vaca, 44 horas en el cerdo), en condiciones adecuadas de temperatura (entre 37-39°C, normalmente) y humedad. El volumen de medio de cultivo puede variar. Por ejemplo, pueden emplearse microgotas de 50 o 100 μl cubiertas con aceite mineral conteniendo 25-50 ovocitos, o pueden emplearse pocillos con 500 μl de medio y un número variable de ovocitos (20-70, por ejemplo).

El DTSP y otros compuestos que incrementan la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con proteasa pueden introducirse en el medio de maduración de los ovocitos a una concentración de 0'03 a 1'2 mg/ml desde el inicio del proceso de maduración o al final del mismo. De esta manera el DTSP puede estar en contacto con los ovocitos desde 1 minuto hasta 48 horas en el caso del cerdo o desde 1 minuto hasta 28 horas en el caso de la vaca.

15 *Obtención y tratamiento de los espermatozoides*

Los espermatozoides que se van a utilizar en la fecundación *in vitro* pueden ser obtenidos a partir de muestras de eyaculados de las que se emplean para inseminación artificial, o a partir de testículos obtenidos en matadero en el caso de los animales de abasto, mediante la extracción de los mismos desde el epidídimo. Estos espermatozoides, a su vez, pueden ser o no criopreservados, seleccionados en función de que porten el cromosoma X o el Y (sexados), pueden también ser portadores de ADN exógeno que luego introducirán en el ovocito (Lavitrano *et al.*, 2003, *Mol Reprod Dev* 64:284-297), etc.

Los tratamientos a los que se somete a los espermatozoides para inducir la capacitación pueden variar. Por ejemplo, se han usado sistemas que incluyan un proceso con tres lavados en solución salina y una preincubación de 40 minutos en medio TCM-199 a un pH de 7.8, habiendo sometido previamente a los espermatozoides a un periodo de conservación de 16 horas a 20°C. Posteriormente, Mattioli *et al.* (1989, *Theriogenology* 31:1201-1207) refirieron también el nacimiento de lechones por FIV sometiendo a los espermatozoides a un proceso de selección a través de un gradiente de Percoll[®], sistema semejante al empleado en la especie humana. Este método permite aislar de manera rápida y eficiente a los espermatozoides móviles, que son liberados de contaminación por otros constituyentes seminales (Ng FLH, *Human Reproduction* 1992, 7: 261-266.). También Yoshida sometió a los espermatozoides a tres lavados por centrifugación, aunque sin preincubación, antes de introducirlos en las placas de cultivo para la FIV, obteniendo éxito en cuanto a la producción de descendencia viva (*Theriogenology* 1993, 39:1303-1311). Estudios posteriores demostraron que no eran necesarios ni los lavados ni las preincubaciones previas a la introducción de los espermatozoides en las placas de cultivo para conseguir penetraciones (Martínez *et al.*, 1996, *Biol Reprod* 55:134-140; Matás *et al.*, 2003, *Reproduction* 125: 133-141).

Los espermatozoides, pues, de diferentes orígenes y sometidos a distintos tratamientos son transferidos a un medio de fecundación (solución de la etapa ii) del método de la invención) al que también son transferidos los ovocitos previamente tratados con el compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas. El tiempo de fecundación puede variar desde 5 minutos hasta 18-20 horas.

Fecundación in vitro

De acuerdo con el método de la invención, la fecundación *in vitro* puede realizarse de modo convencional, es decir, introduciendo los ovocitos y los espermatozoides en un medio de cultivo (TCM-199, TBM, TALP, etc). El número de ovocitos por pocillo o por microgota de medio puede variar, pero un ejemplo puede consistir en depositar 50 ovocitos pretratados con DTSP en 250 μl de medio TALP y añadir 250 μl de espermatozoides pretratados con Percoll[®] como describen Matás *et al* (Matás *et al.*, 2003, *Reproduction* 125: 133-141). El tiempo de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides puede oscilar desde 5 minutos (Funahashi y Romar 2004, *Reproduction* 128:789-800) hasta 20-24 horas.

En los ejemplos descritos, el tiempo de coincubación es de 4 horas. Después de este tiempo, los ovocitos se lavan muy bien mediante sucesivos pases a través de una pipeta Pasteur adelgazada para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida y se introducen en un medio de cultivo de embriones, o se mantienen en el medio de fecundación hasta el día siguiente.

Para evaluar los resultados, entre las 12 y las 24 horas después del inicio del cocultivo, los ovocitos se fijan y se tiñen para observar el número de espermatozoides que han penetrado y el estadio de desarrollo en el que se encuentran. Se puede emplear glutaraldehído como fijador y Hoechst para teñir el ADN, o etanol acético como fijador y orceína o lacmoid para teñir el núcleo. El porcentaje de ovocitos penetrados, el estadio nuclear del ovocito (vesícula germinal, metafase, anafase, telofase, pronúcleo femenino) y el estadio nuclear del espermatozoide (cabezas compactas, descondensadas o pronúcleo masculino) se pueden valorar en microscopio de contraste de fases o de fluorescencia.

Se consideran ovocitos monospermicos aquellos que solo presentan un espermatozoide en su interior. El tratamiento con al menos un compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas, y especialmente el DTSP, incrementa la eficacia total del sistema (porcentaje de ovocitos penetrados monospermicos) hasta un 40%, y los porcentajes de

ES 2 323 993 A1

monospermia pueden pasar de un 4% en el grupo control a un 70% en el grupo tratado con 0'60 mg/ml de DTSP (Tabla 5).

5 Otra posibilidad es evaluar los resultados a las 48 horas de la fecundación. En este caso, lo que valoraremos es el porcentaje de ovocitos que han alcanzado el estadio de "embrión" de dos células, es decir que han sido fecundados y han progresado en su desarrollo hasta este estadio.

Además del tratamiento con DTSP se pueden introducir en el sistema otras variaciones que ayudan a mejorar los porcentajes de monospermia como pueden ser la adición de glicoproteínas oviductales (McCauley *et al.*, 2003, Biol Reprod 69:828-834), el pretratamiento de los espermatozoides con adenosina y posterior coincubación de los gametos con cafeína (Funahashi y Romar 2004, Reproduction 128:789-800), la adición de osteopontina (Prather, WO2006/012177 A2), etc.

Producción de embriones

15 Tras el periodo de tiempo de cocultivo con los espermatozoides, los ovocitos fecundados pueden transferirse a un medio de cultivo de embriones. En el caso del cerdo, por ejemplo, el más utilizado es el NCSU (Petters y Wells, 1993, J. Reprod. Fertil. 48, 61-73) en diferentes versiones, como el NCSU-23, que contiene taurina e hipotaurina (Abeydeera *et al* 1998, Theriogenology 50: 747-56; Machaty *et al.*, 1998, Biol. Reprod. 59: 451-55), o el NCSU-37, que contiene sorbitol (Hajdu *et al.*, 1994, J Anim Sci 72:1299-1305; Kikuchi *et al.*, 1999, Biol. Reprod. 60:336-340). En la vaca se emplean, por ejemplo, el medio KSOM (Lawrence *et al.*, 2004, J Dairy Sci 87:2449-2454; Coy *et al.*, 2005, Reproduction 129:19-26) o el SOF (Carolan *et al.*, 1995, Theriogenology 43:1115-1128; Lonergan *et al.*, 1997, J Reprod Fert 109:355365), entre otros. Los medios de cultivo de embriones pueden llevar numerosos aditivos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), células oviductales (Katska *et al.*, 1995, Theriogenology 43:859-70; Katska *et al.*, 1998, J Anim Feed Sc 7:353-362) o endometriales (Katsuragawa *et al.*, 1995, Hum. Reprod. 10:3028-3034; Conway-Myers 1998, Semin Reprod Endocrinol 16:175-182), pueden o no contener proteínas o suero (Dobrinisky *et al.*, 1996, Koo *et al.*, 1997), etc.

Independientemente del medio de cultivo utilizado, los embriones se mantienen en el incubador entre 1 y 9 días, alcanzando en este último caso el estadio de blastocisto. Los embriones pueden ser transferidos a hembras receptoras por métodos quirúrgicos o no quirúrgicos, pueden ser congelados o vitrificados, pueden ser clonados o modificados genéticamente por diferentes métodos antes de ser transferidos, etc. Las variaciones en el método descrito pueden ser numerosas, pero en general, el rendimiento final de las diferentes técnicas puede ser mejorado con el empleo de DTSP u otra molécula de mecanismo de acción similar para aumentar la resistencia de la zona pelúcida del ovocito a la digestión proteolítica.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, ésta proporciona una solución para inducir el endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos *in vitro*, caracterizada porque incluye ovocitos y al menos un agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre proteínas. Entre los agentes químicos capaces de formar enlaces covalentes entre proteínas se encuentran aquellos citados anteriormente en la presente invención. De modo preferido se emplea el DTSP.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, ésta proporciona el uso de un compuesto que forma enlaces covalentes entre proteínas en la inducción del endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos *in vitro*.

Del mismo modo, la invención se refiere de modo preferido al uso del ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxi-succinimida ester (DTSP) como agente anti-polispermico *in vitro*.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Exposición detallada de un modo de realización

Ejemplo 1

60 *Maduración in vitro de ovocitos*

Maduración de ovocitos porcinos

Los ovocitos se obtuvieron de cerdas prepúberes sacrificadas en matadero. Los complejos células cúmulus-ovocito se recogieron de folículos no atrésicos (3 a 6 mm diámetro) y se maduraron en grupos de 50-55 en 500 μ l de medio de maduración NCSU-37 durante 22 h a 38'5°C y 5% CO₂ en aire. El medio NCSU-37 (Petters & Wells, 1993) se suplementó con cisteína 0.57 mmol, dibutiril AMP 1 mmol, 5 μ g/ml de insulina, β -mercaptoethanol 50 μ mol, 10 UI de eCG/ml (Foligon, Intervet International B.V., Boxmeer, Holland), 10 UI de hCG/ml (Chorulon, Intervet

ES 2 323 993 A1

International B.V., Boxmeer, Holland), y 10% de fluido folicular porcino (v/v). Tras este tiempo, los ovocitos se lavaron y transfirieron a medio sin hormonas durante 22 h (Funahashi y Day, 1993).

Maduración in vitro de ovocitos bovinos

Los ovocitos se obtuvieron de vacas sacrificadas en matadero. Los complejos células cúmulus-ovocito se recogieron por aspiración de folículos no atrésicos y se cultivaron en medio TCM-199 con glutamina, sales de Earle's y bicarbonato a pH 7.4. Seis horas antes de su utilización al medio se le adicionó suero fetal bovino (10% v/v), 10 UI de hCG/ml (Chorulon, Intervet Internacional B.V., Boxmeer, Holanda), 10 UI de eCG/ml (Foligon, Intervet Internacional B.V., Boxmeer, Holanda), piruvato de sodio 0.2 mM, y L-glutamina 2 mM, y se equilibró en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 38.5°C y 5% de CO₂. Se maduraron en grupos de 50-55 en 500 µl de medio durante 22-24 h a 38.5°C y 5% CO₂ en aire.

15 Ejemplo 2

Efecto del DTSP sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con proteasa

Al final del periodo de maduración, los ovocitos se transfirieron a un medio de lavado (PBS) y se pipetearon repetidamente o se sometieron a vortex para eliminar las células del cumulus que tengan adheridas a la zona pelúcida. Posteriormente se transfirieron a medio de maduración fresco con 0 (grupo control) ó 0.60 mg/ml de DTSP y se mantuvieron 30 minutos en el incubador en atmósfera humidificada a 38.5°C y 5% de CO₂. A continuación, se introdujeron en grupos de 5 en gotas de 50 µl de pronasa (0.5% (w/v) en PBS). Las zonas pelúcidas se observaron ininterrumpidamente en el estereomicroscopio a 200 x con una placa calefactora a 37°C hasta su disolución, anotando el tiempo que tarda ésta en producirse (ver Tablas 1 y 2).

TABLA 1

30 *Efecto del DTSP sobre la resistencia de la zona pelúcida de ovocitos porcinos madurados in vitro a la digestión con proteasa. Los valores con superíndices diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticas significativas*

CERDO		
	N	Tiempo digestión (seg.)
Control	50	65,38±4,9 ^a
DTPS (0.60 mg/ml)	54	3743,63±169,41 ^b

N es el número de ovocitos empleado

TABLA 2

50 *Efecto del DTSP sobre la resistencia de la zona pelúcida de ovocitos bovinos madurados in vitro a la digestión con proteasa. Los valores con superíndices diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticas significativas*

VACA		
	N	Tiempo digestión (seg.)
Control	70	124,17±5,86 ^a
DTPS (0.60 mg/ml)	74	1777,93±63,91 ^b

N es el número de ovocitos empleado

ES 2 323 993 A1

Ejemplo 3

Fecundación in vitro (FIV) de ovocitos porcinos y bovinos

5 *FIV porcina*

Los ovocitos maduros tratados con DTSP o no tratados (grupo control) se transfirieron en grupos de 50 a pocillos con 250 μ l de medio TALP. La fecundación se realizó mediante un periodo de cocultivo entre gametos de 4 horas. La fracción rica del eyaculado de verracos de fertilidad probada se transportó al laboratorio inmediatamente después de la recogida diluida en BTS 1:8. Una muestra alícuota de semen de 0'5 ml se depositó cuidadosamente sobre un gradiente discontinuo de Percoll® de 45 y 90% (v/v) y se centrifugó a 700 g durante 30 min. Las células recogidas en el fondo de la fracción 90% se lavaron en medio de fecundación mediante centrifugación a 100 g durante 10 min. El precipitado de espermatozoides se resuspendió de nuevo en medio de fecundación hasta alcanzar una concentración de 10⁵ células/ml. El medio de fecundación *in vitro* es básicamente el descrito por Rath *et al.* 1999 (Rath *et al.*, en 15 1999, J Anim Sci 77: 3346-3352).

FIV bovina

Tras el periodo de maduración *in vitro*, los ovocitos tratados con DTSP o no tratados (grupo control) se transfirieron en grupos de 50 a pocillos con 500 μ l de medio TALP. La fecundación se realizó con 1x10⁶ espermatozoides/ml con un periodo de cocultivo entre gametos de 18 horas. Los espermatozoides procedían de pajuelas congeladas-descongeladas de toros de fertilidad probada. Las muestras de semen se centrifugaron en un gradiente discontinuo de Percoll® de 45 y 90% (v/v) durante 15 minutos a 600 g. El precipitado se resuspendió en Sperm-TALP (Parrish *et al.*, 1988, Biol Reprod 38:1171-1180) y se lavó de nuevo durante 8 minutos a 300 g. Finalmente, los espermatozoides se resuspendieron en medio FIV-TALP (Parrish *et al.*, 1988) y se añadieron al pocillo que contiene los ovocitos a una concentración final de 10⁵ células/ml.

Ejemplo 4

30

Efecto del DTSP sobre los resultados de fecundación

18-20 horas después de la fecundación, los ovocitos se lavaron por pipeteo o mediante vortex para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida y se fijaron en glutaraldehído (2% en PBS) durante 30 minutos. A continuación se tiñeron durante 15 min (1% Hoechst 33342 in PBS), se lavaron en PBS con 1 mg/ml polivinilpirrolidona y se montaron en portaobjetos. Los ovocitos se consideran penetrados (PEN) cuando se observa al menos un espermatozoide en el interior del citoplasma, esté descondensado o en estadio pronuclear. El número total de espermatozoides en el interior de cada ovocito también se evaluó (E/O). Los ovocitos con un pronúcleo masculino y otro femenino en su interior se consideraron monospermicos (MON), mientras que todos aquellos con dos o más espermatozoides en cualquier estadio se consideraron polispermicos.

TABLA 3

45 *Efecto del DTSP sobre los parámetros de fecundación in vitro (penetración, PEN, monospermia, MON, y número de espermatozoides por ovocito, E/O) de ovocitos porcinos. Los valores con superíndices diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticas significativas*

50

CERDO				
	N	% PEN	% MON*	E/O*
Control	149	97,9±1,15 ^a	7,5±2,17 ^a	12,68±0,55 ^a
DTSP (0'60 mg/ml)	149	71,1±3,72 ^b	36,8±4,7 ^b	2,8±0,21 ^b

60

N es el número de ovocitos empleado

65

ES 2 323 993 A1

TABLA 4

Efecto del DTSP sobre los parámetros de fecundación in vitro (penetración, PEN, monospermia, MON, y número de espermatozoides por ovocito, E/O) de ovocitos bovinos. Los valores con superíndices diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticas significativas

VACA

	N	% PEN	% MON*	E/O*
Control	74	91,9±3,19 ^a	54,4±6,08 ^a	1,68±0,12
DTSP (0'60 mg/ml)	64	57,8±6,22 ^b	63,9±8,11 ^{ab}	1,58±0,16

N es el número de ovocitos empleado

TABLA 5

Efecto de diferentes concentraciones del DTSP sobre los parámetros de fecundación in vitro (penetración, PEN, monospermia, MON, y número de espermatozoides por ovocito, E/O) de ovocitos porcinos. Los valores con superíndices diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticas significativas

CERDO

	N	% PEN	% MON*	E/O*
Control	73	100±0 ^a	4,35±2,47 ^a	5,49±0,36 ^a
DTSP (0'015 mg/ml)	85	94,12±2,56 ^a	26,76±5,29 ^b	3,01±0,20 ^b
DTSP (0'30 mg/ml)	73	94,52±2,68 ^a	46,15±6,23 ^b	2,03±0,15 ^c
DTSP (0'60 mg/ml)	69	63,32±5,87 ^b	70,73±9,39 ^c	1,53±0,14 ^c

N es el número de ovocitos empleado

REIVINDICACIONES

1. Un método para fecundación *in vitro* **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
- 5 i) inducir el endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos;
 - ii) opcionalmente, lavar los ovocitos tratados en la etapa i);
 - 10 iii) cocultivo de los ovocitos con espermatozoides.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el proceso de endurecimiento de la etapa i) se lleva a cabo utilizando medios químicos, físicos, biológicos o mezcla de estos.
- 15 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 2, **caracterizado** porque la etapa i) se lleva a cabo mediante la incubación de los ovocitos con al menos un compuesto químico o biológico capaz de formar uniones entre los diferentes componentes de la zona pelúcida.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, **caracterizado** porque la etapa i) se lleva a cabo mediante la introducción de los ovocitos en una solución que contiene al menos un agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre proteínas y, opcionalmente un tampón.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicho agente formador de enlaces covalentes entre proteínas es un agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre los aminoácidos lisina de las glicoproteínas de la zona pelúcida de los ovocitos.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado** porque el agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre proteínas se selecciona entre el grupo formado por ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilen glicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato](Sulfo-EGS), Bis[2 succinimidooxicarbonilo] etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis [succinimidilpropionato](DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), Bis[sulfosuccinimidil] suberato (BS³), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimido-triethyleneglycol (BM[PEO]₃), Bis-Maleimidohexano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]₂), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE) y mezcla de los mismos.
- 35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 3 a 6, **caracterizado** porque el compuesto formador enlaces covalentes entre proteínas es el ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP).
- 40 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 3 a 7, **caracterizado** porque la etapa i) comprende la incubación de los ovocitos en presencia de 0'03 hasta 1'2 mg/ml de al menos un compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas.
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 3 a 8, **caracterizado** porque comprende la incubación de los ovocitos en presencia de al menos un compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas bien desde el inicio del proceso de maduración o bien al final del mismo.
- 50 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, **caracterizado** porque además incluye el paso de cultivar los ovocitos fecundados hasta producir un embrión.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque incluye el paso de transferir el embrión producido al aparato reproductor de un animal receptor.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque incluye el paso de clonar el embrión por transferencia nuclear.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado** porque incluye el paso de transferir el embrión clonado al aparato reproductor de un animal receptor.
- 60 14. El método de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque el nivel de polispermia es menor del 60%.
15. El método de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque los ovocitos se seleccionan entre ovocitos humanos, porcinos, bovinos, caninos, equinos, ovinos, aviáres o de roedores.
- 65 16. Una solución para inducir el endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos *in vitro*, **caracterizada** porque incluye ovocitos y al menos un agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre proteínas.

ES 2 323 993 A1

17. La solución de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque el agente químico se selecciona entre el grupo formado por ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilen glicol bis [sulfosuccinimidilsuccinato] (Sulfo-EGS), Bis [2 succinimidooxicarboniloxi) etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis[succinimidilpropionato](DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), *Bis*[sulfosuccinimidil] suberate (BS³), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol (BM[PEO]₃), Bis-Maleimidohexano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]₂), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxitbutano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE) y mezcla de los mismos.

18. La solución de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, **caracterizado** porque el compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas es el ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP).

19. El uso de un compuesto que forma enlaces covalentes entre proteínas en la inducción del endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos *in vitro*.

20. El uso del ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilen glicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato](Sulfo-EGS), Bis[2 succinimidooxicarboniloxi) etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis[succinimidilpropionato](DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), *Bis*[sulfosuccinimidil] suberate (BS³), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol (BM[PEO]₃), Bis-Maleimidohexano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]₂), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxitbutano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE) y mezcla de los mismos en la inducción del endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos *in vitro*.

21. El uso del ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP) como agente inductor del endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos *in vitro*.

22. El uso del ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP) como agente anti-polispermico *in vitro*.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 323 993

② Nº de solicitud: 200602334

③ Fecha de presentación de la solicitud: **14.09.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/4025** (2006.01)
C07D 207/46 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RATH D. et al. "Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa" Theriogenology. Enero 2005 vol 63. pag. 352-362, todo el documento.	1-19
A	WO 2006012177 A2 (THE CURTORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 02.02.2006, todo el documento.	1-19
A	IWAMOTO K. et al. "Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization: evidence for the involvement of cysteine cross-linkages in hardening of the zona pellucida" Journal of Reproduction and Fertility. Nov. 1999 vol. 117 pag. 395-402, todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.06.2009

Examinador

M. Cortés Duro

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, XPESP, STN

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.06.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RATH D. et al. Theriogenology. Enero 2005 vol 63. pag. 352-362	15-01-2005
D02	WO 2006/012177 A2	02-02-2006
D03	IWAMOTO K.et al. Journal of Reproduction and Fertility. Nov. 1999 vol.117 pag. 395-402	11-1999

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud describe un método para aumentar la eficacia de la fecundación in vitro mediante la reducción de la poliespermia. El método propuesto recoge el tratamiento de los ovocitos con un agente químico, que modifica las proteínas de la zona pelúcida de los ovocitos y su cocultivo con espermatozoides. Las modificaciones mencionadas son originadas por un compuesto químico que forma enlaces covalentes, en la realización preferente este agente de químico el ácido 3,3'-ditiodipropionico di (N-hidroxisuccinimida) ester. Estas modificación

es de la pelúcida de los ovocitos dificultan la entrada de los espermatozoides al ovocito reduciendo así la poliespermia.

El documento D01 recoge como la formación de enlaces disulfuro en las proteínas de la zona pelúcida en los oocitos contribuyen al endurecimiento de esta zona y a la prevención de la poliespermia.

El documento D02 recoge un método para reducir la polispermia en fertilizaciones in-vitro. Dicho método consiste en la utilización una mezcla de fertilización que contiene osteopontina, ovocitos y esperma.

El documento D03 indica como la formación de puentes disulfuro modifica la estructura de la zona pelúcida, provocando una serie de cambios en la misma que hacen que sea responsable del bloqueo de la poliespermia.

Los documentos anteriormente citados, divulgan cuestiones relativas al estado general de la técnica, pero no afectan a la novedad o actividad inventiva de la solicitud.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N° de publicación : ES 2 323 993 A1

② Número de solicitud: 200602334

CORRECCIÓN DE ERRATAS DEL FOLLETO DE PATENTE

Páginas	Errata	Corrección
11 y 12	Reivindicaciones	Nuevas reivindicaciones aceptadas en la contestación del suspenso publicado en fecha 1-5-2008 (Páginas siguientes)

REIVINDICACIONES

1. Un método para fecundación in vitro **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
 - i) inducir el endurecimiento de la zona pelúcida de los ovocitos;
 - ii) opcionalmente, lavar los ovocitos tratados en la etapa i);
 - iii) cocultivo de los ovocitos con espermatozoides.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el proceso de endurecimiento de la etapa i) se lleva a cabo utilizando medios químicos, físicos, biológicos o mezcla de estos.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 2, **caracterizado** porque la etapa i) se lleva a cabo mediante la incubación de los ovocitos con al menos un compuesto químico o biológico capaz de formar uniones entre los diferentes componentes de la zona pelúcida.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, **caracterizado** porque la etapa i) se lleva a cabo mediante la introducción de los ovocitos en una solución que contiene al menos un agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre proteínas y, opcionalmente un tampón.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicho agente formador de enlaces covalentes entre proteínas es un agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre los aminoácidos lisina de las glicoproteínas de la zona pelúcida de los ovocitos.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado** porque el agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre proteínas se selecciona entre el grupo formado por ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilen glicol bis [sulfosuccinimidilsuccinato] (Sulfo-EGS), Bis[2 succinimidooxicarbonilo] etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis[succinimidilpropionato] (DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), Bis[sulfosuccinimidil] suberate (BS3), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)- propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol (BM[PEO]3), Bis-Maleimidoheptano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]2), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxi-butano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE) y mezcla de los mismos.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 3 a 6, **caracterizado** porque el compuesto formador enlaces covalentes entre proteínas es el ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP).
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 3 a 7, **caracterizado** porque la etapa i) comprende la incubación de los ovocitos en presencia de 0'03 hasta 1'2 mg/ml de al menos un compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 3 a 8, **caracterizado** porque comprende la incubación de los ovocitos en presencia de al menos un compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas bien desde el inicio del proceso de maduración o bien al final del mismo.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, **caracterizado** porque además incluye el paso de cultivar los ovocitos de origen animal no-humano fecundados con espermatozoides de origen animal no-humano hasta producir un embrión.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque incluye el paso de clonar el embrión animal no-humano por transferencia nuclear.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque los ovocitos se seleccionan entre ovocitos porcinos, bovinos, caninos, equinos, ovinos, aviares o de roedores.
13. Una solución para inducir el endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos in vitro, **caracterizada** porque incluye ovocitos y al menos un agente químico capaz de formar enlaces covalentes entre proteínas.
14. La solución de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado** porque el agente químico se selecciona entre el grupo formado por ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilenglicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato] (Sulfo-EGS), Bis[2 succinimidooxicarbonilo] etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis[succinimidilpropionato] (DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), Bis[sulfosuccinimidil] suberate (BS3), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)- propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol (BM[PEO]3), Bis-Maleimidoheptano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]2), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxi-butano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE) y mezcla de los mismos.

15. La solución de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, **caracterizado** porque el compuesto formador de enlaces covalentes entre proteínas es el ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimida ester (DTSP).
16. El uso de un compuesto que forma enlaces covalentes entre proteínas en la inducción del endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos in vitro.
17. El uso del ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di (N- hidroxisuccinimida ester (DTSP), Etilen glicol bis [succinimidilsuccinato] (EGS), Etilen glicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato] (Sulfo-EGS), Bis[2 succinimidooxicarbonilo] etil] sulfone (BSOCOES), Ditiobis[succinimidilpropionato](DSP), 3,3'-Ditiobis [sulfosuccinimidilpropionate] (DTSSP), Disuccinimidil suberato (DSS), Bis[sulfosuccinimidil] suberate (BS3), Disuccinimidil glutarato (DSG), Disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB), 1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano (DPDPB), 1,11-bis Maleimidotriethyleneglycol (BM[PEO]3), Bis-Maleimidoheptano (BMH), 1,8-bis-Maleimidodietilenglicol (BM[PEO]2), 1,6-Hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), Ditio-bis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-Maleimidobutano (BMB), 1,4 bis-Maleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), Bis-Maleimidoetano (BMOE) y mezcla de los mismos en la inducción del endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos in vitro.
18. El uso del ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di (N- hidroxisuccinimida ester (DTSP) como agente inductor del endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos in vitro.
19. El uso del ácido 3,3'-Ditiodipropiónico di (N- hidroxisuccinimida ester (DTSP) como agente anti-polispermico in vitro.