

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 505**

21 Número de solicitud: 201131611

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61D 19/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

06.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.05.2013

Fecha de la concesión:

05.03.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.03.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Edif. Gestión del Conocimiento, Avda. de Elvas,
s/n.
06006 Badajoz (Badajoz) ES**

72 Inventor/es:

**PEÑA VEGA, Fernando Juan ;
TAPIA GARCÍA, José Antonio ;
MORILLO RODRÍGUEZ, Antolín;
ORTEGA FERRUSOLA, Cristina;
MACÍAS GARCÍA, Beatriz y
GALLARDO BOLAÑOS, Juan María**

54 Título: **DILUYENTE PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y APLICACIONES**

57 Resumen:

Diluyente para la congelación de semen equino, método de preparación y aplicaciones.
La presente invención contempla un medio para congelar semen equino que comprende a) una solución tampón de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato nativo de leche, b) yema de huevo (0,5-4% v/v), c) HCON(CH₃)₂ (1-4% v/v), y d) glicerol (0,5-2% v/v). Asimismo se refiere al procedimiento para la obtención del medio de la invención que comprende i) abrir un huevo y separar la clara de la yema, ii) centrifugar la yema obtenida en i) a una velocidad entre 2-2500 r.p.m durante un tiempo de entre 15-20 minutos, iii) añadir la yema obtenida en el paso ii) del 0.5 al 4% v:v a la solución tampón de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato nativo de leche, iv) añadir a la solución obtenida en iii), HCON(CH₃)₂ del 1 al 4% v:v, glicerol del 0,5 al 2% v/v, y v) homogenizar la solución obtenida en iv).

ES 2 402 505 B1

DESCRIPCIÓN

Diluyente para la congelación de semen equino, método de preparación y aplicaciones.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención pertenece, de forma general, al campo de la ganadería, en concreto al de la ganadería equina. De forma particular, la presente invención se refiere a un nuevo diluyente para la congelación de semen equino, al método para su obtención y sus aplicaciones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sector de la ganadería equina se caracteriza por la producción y cría de ejemplares de alto valor individual, en la que se buscan características morfológicas y funcionales específicas dependiendo de cada raza.

15

A diferencia de otros sectores ganaderos, en los que la unidad productiva es el grupo de animales "producción del rebaño", en el sector equino la unidad productiva es el individuo. Así, mientras que en el sector ganadero en general, si un individuo no posee eyaculados de una calidad aceptable, la opción que se emplea es la eliminación del individuo de la cadena productiva y su sustitución, en la industria equina esto no es una opción, debido al alto valor individual de los sementales, bien por su morfología, bien por su funcionalidad.

20

Además como resultado de una selección que no ha tenido en cuenta la calidad seminal, nos encontramos con una gran variabilidad individual en dicha calidad y en la respuesta a la congelación entre sementales. Sin embargo, debido a su alto valor, la estrategia de congelar semen de todos los sementales es esencial. Es de destacar que el semen de determinados sementales tienen un valor en el mercado a partir de los 3.000 a 6.000 € por dosis de inseminación.

25

La congelación de semen equino en nuestro país, y en toda Europa, se viene realizando con tres tipos básicos de diluyentes, diluyentes basados en una solución de lactosa al 11% con yema de huevo y glicerol a concentraciones que varían entre el 2 y el 5% (Martin, J.C., Klug, E. and Gunzel, A.R. (1979) *Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J Reprod Fertil Suppl*, 47-51; Tischner, M. (1979) *Evaluation of deep-frozen semen in stallions. J Reprod Fertil Suppl*, 53-59), diluyentes comerciales a base de yema de huevo (Ghent™ Minitüb Landshut, Alemania) o leche desnatada (INRAFreeze™, IMV, L'Aigle Francia). En norte y sudamerica se pueden encontrar otros diluyentes comerciales como BotuCrio™, o E-Z Freezing™. Sin embargo, tanto con los diluyentes comerciales, como con los de laboratorio, se observa una alta mortalidad espermática (Samper, J.C. (2001) *Management and fertility of mares bred with frozen semen. Anim Reprod Sci* 68, 219-228; Samper, J.C., Hellander, J.C. and Crabo, B.G. (1991) *Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. J Reprod Fertil Suppl* 44, 107-114; Samper, J.C. and Morris, C.A. (1998) *Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. Theriogenology* 49, 895-903) y además los espermatozoides supervivientes presentan diverso grado de daño no letal (Ortega Ferrusola, C., Gonzalez Fernandez, L., Morrell, J.M., Salazar Sandoval, C., Macias Garcia, B., Rodriguez-Martinez, H., Tapia, J.A. and Peña, F.J. (2009) *Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. Reproduction* 138, 55-63; Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galan, Y., Varela-Fernandez, E., Gallardo-Bolanos, J.M., Muriel, A., Gonzalez-Fernandez, L., Tapia, J.A. and Peña, F.J. (2008) *Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. J Androl* 29, 213-221) pero que disminuye su vida media en el tracto genital de la yegua dificultando el manejo reproductivo y disminuyendo aún más la fertilidad (Samper 2001). Es decir, disminuye la fertilidad por la alta mortalidad espermática durante la congelación y además por la menor vida media de los que sobreviven el proceso.

35

40

45

50

Hoy día con los protocolos actuales de congelación no se ha podido solventar el problema de la variabilidad entre sementales en la respuesta a esta tecnología. Esto determina que sementales de un alto valor genético no puedan ver su semen congelado. En general, la Federación Hípica Internacional determina que los eyaculados han de tener al menos un 35% de motilidad progresiva a la descongelación para poder entrar en un programa comercial.

55

Se ha demostrado que el principal daño que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación es debido al shock osmótico que experimentan durante la congelación debido a la pérdida de agua intracelular, y durante la descongelación debido a la rehidratación brusca (Morris, G.J., Faszler, K., Green, J.E., Draper, D., Grout, B.W. and Fonseca, F. (2007) *Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. Theriogenology* 68, 804-812).

60

Los autores de la presente invención, teniendo en cuenta estos problemas, han diseñado un nuevo diluyente para la congelación de semen equino, basado en un crioprotector alternativo, y a una concentración específica, que minimiza el daño osmótico tanto durante la congelación como posterior descongelación, permitiendo obtener unas tasas de supervivencia de los espermatozoides equinos post descongelación muy superiores a los medios actualmente disponibles en el mercado.

65

En el desarrollo de este diluyente se ha tenido además en cuenta el concepto de reducir la toxicidad del crioprotector (Fahy, G.M. (2010) *Cryoprotectant toxicity neutralization. Cryobiology 60, S45-53*; Fahy, G.M., Lilley, T.H., Linsdell, H., Douglas, M.S. and Meryman, H.T. (1990) *Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Cryobiology 27, 247-268*). En este sentido los autores de la presente invención han demostrado que concentraciones muy bajas de glicerol son capaces de dañar significativamente el citoesqueleto del espermatozoide, antes de que se produzcan daños importantes en la membrana.

Así, el diluyente objeto de la invención comprende HCON(CH₃)₂ que, a concentraciones específicas, permite reducir la toxicidad del glicerol, a la vez que se potencia el efecto crioprotector de ambos.

Este diluyente constituye un nuevo medio para la suspensión de los espermatozoides previo a la congelación. Con este medio se mejoran los resultados obtenidos con los medios actualmente disponibles en el mercado. Además se reduce sustancialmente la variabilidad entre sementales, consiguiendo de este modo aumentar el número de sementales que se pueden beneficiar de esta tecnología. El diluyente está basado en el uso de crioprotectores alternativos que reducen el shock osmótico durante el proceso de congelación, y antioxidantes que protegen al espermatozoide durante el proceso de descongelación, como la melatonina y Trolox, cuyo uso en sementales no es conocido hasta el momento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Comparativa de los resultados obtenidos en la congelación y descongelación del semen de 7 sementales distintos empleando como diluyentes a) el diluyente de la presente invención, b) el diluyente comercial INRA96-EY-G y c) el diluyente comercial GHENT.

OBJETIVO DE LA INVENCION

Un objetivo principal de la invención se refiere a un medio para la congelación de semen equino que comprende a) Una solución tampón de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato nativo de leche, b) yema de huevo al 0,5-4% v/v, c) HCON(CH₃)₂ al 1-4% v/v y d) Glicerol al 0,5-2%.

Otro objetivo de la invención es el procedimiento para la obtención de dicho medio.

Finalmente, un tercer objetivo de la invención se refiere al empleo del medio en la congelación de semen equino.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un medio para la congelación de semen equino que comprende:

- a. Una solución tampón de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato nativo de leche,
- b. yema de huevo al 0,5-4% v/v,
- c. HCON(CH₃)₂ al 1-4% v/v y
- d. Glicerol al 0,5-2%.

La combinación de HCON(CH₃)₂ a esas concentraciones específicas permite reducir la toxicidad del glicerol, a la vez que se potencia el efecto crioprotector de ambos. El medio descrito en a) permite lograr el máximo efecto.

En realizaciones preferidas, el HCON(CH₃)₂ se emplea en un rango de 1,5-2,5% v/v y el glicerol en un rango de 1-1.5% v/v.

En una realización particular, el medio comprende además melatonina, en un rango de 0.5 a 5µM, cafeína, en un rango de 0.5 a 3 mM y/o TROLOX, en un rango de 50 a 200 µM, como antioxidantes. Estos ingredientes opcionales mejoran la motilidad post descongelación de los espermatozoides y sus velocidades en sementales que muestran un exceso de peroxidación de las membranas de sus espermatozoides.

Las propiedades de este nuevo diluyente permiten la congelación a largo plazo de semen equino, por lo que en otro aspecto principal de la invención se contempla el empleo del medio de la invención para la congelación de semen equino. En realizaciones particulares, tras la eliminación del plasma seminal y evaluación del eyaculado, se resuspenden los espermatozoides lentamente en el medio de la presente invención a 22°C y, tras un periodo de equilibrado a 5°C, se envasa el semen y se procede a su congelación y almacenado en nitrógeno líquido.

En otro aspecto principal de la invención se contempla un procedimiento para la obtención del medio de la invención que comprende los siguientes pasos:

- i. abrir un huevo y separar la clara de la yema,

- 5
- ii. centrifugar la yema obtenida en i) a una velocidad comprendida entre 2-2500 r.p.m durante un tiempo comprendido entre 15-20 minutos,
 - iii. añadir la yema obtenida en el paso ii) al 0.5 al 4% v:v a la solución tampón de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato nativo de leche,
 - iv. añadir a la solución obtenida en iii) HCON(CH₃)₂ al 1-4% v:v y glicerol al 0,5-2% v/v, y
 - v. homogenizar la solución obtenida en iv).

10 En realizaciones preferidas, en el paso iv) se añade cafeína a una concentración comprendida entre 0.5 y 3 mM, TROLOX a una concentración comprendida entre 50 y 200 μM y/o melatonina a una concentración comprendida entre 0.5 y 5μM.

EJEMPLO

15 El diluyente o medio para la congelación de semen equino de la presente invención se preparó a partir de una solución tampón de Hank, suplementada con HEPES, medio compuesto por 0.14 g de CaCl₂, 0.40g de KCl, 0.06 g de KH₂PO₄, 0.2g de MgSO₄ 7H₂O, 8g de NaCl, 0.35g de NaHCO₃, 4.76 g de HEPES, 13.5 g de glucosa y un 3% de BSA, agua ultrapura 500 ml, y diluido 1:1 con un medio conteniendo 27 gr de fosfocaseinato nativo de leche y un 11% de lactosa (v:v) disuelto en 500 ml de agua. Posteriormente se preparó la yema de huevo mediante centrifugación durante 15 minutos a 2000 r.p.m. La solución anterior se suplementó con un 4% v/v de la yema de huevo de la fracción superior del tubo. Posteriormente esta solución así obtenida se suplementó con un 2.5% v/v de HCON(CH₃)₂ en combinación con glicerol al 1.5% v/v. Se homogenizó bien la solución obteniendo el diluyente de congelación de la presente invención (CACERES-2).

20 El diluyente así preparado se comparó con los dos diluyentes comerciales disponibles en Europa. Para ello se obtuvieron eyaculados de 7 sementales, que se diluyeron 1:1 a 1:3 en el diluyente comercial INRA96 y el eyaculado se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. Tras la centrifugación se eliminó la mayoría del plasma seminal dejando sólo un 5%. El eyaculado se había dividido en tres partes y tras la centrifugación se resuspendió cada una de las partes en los dos diluyentes comerciales (GHENT e INRA96 suplementado con yema de huevo y glicerol) y en el diluyente de la presente invención. En todos ellos la concentración final de espermatozoides fue de 100 millones por mililitro. Una vez resuspendidos en los correspondientes diluyentes, los eyaculados se equilibraron a 4 °C durante una hora, y se envasó el semen en pajuelas de 0.5 ml.

25 En la figura 1 se comparan los resultados obtenidos en la congelación y descongelación de semen de los 7 sementales distintos, a los que se repitió el proceso de congelación y descongelación en 6 ocasiones (42 eyaculados en total).

30 Para establecer la calidad del semen se valoraron parámetros de calidad seminal mediante citometría de flujo, como integridad y cambios iniciales de membrana, estado del acrosoma, y motilidad progresiva mediante sistema computerizado de análisis seminal. Todas las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas a favor del diluyente de la presente invención. Así la motilidad postdescongelación se incrementó entre un 11 a un 17% comparado con los dos diluyentes comerciales actualmente en uso, también las velocidades de los espermatozoides fueron superiores al descongelar. También tras la descongelación el porcentaje de espermatozoides que mantuvieron la integridad de la membrana fue superior en el diluyente aquí descrito, incrementándose en más de 10 puntos porcentuales en comparación con los diluyentes comerciales actualmente en uso en España. Una

35 40 45

representación de estas mejoras puede verse en la figura 1.

REIVINDICACIONES

1. Medio para la congelación de semen equino caracterizado porque comprende:
- 5
- a) Solución tampón de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato nativo de leche,
 - b) yema de huevo a una concentración comprendida entre 0,5-4% v/v,
 - c) HCON(CH₃)₂ a una concentración comprendida entre 1-4% v/v, y
 - d) glicerol a una concentración comprendida entre 0,5-2% v/v.
- 10
2. Medio, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende adicionalmente:
- 15
- e) cafeína a una concentración comprendida entre 0.5 y 3 mM, TROLOX a una concentración comprendida entre 50 y 200 µM y/o melatonina a una concentración comprendida entre 0.5 y 5µM.
3. Procedimiento para la obtención del medio de la reivindicación 1, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
- 20
- i. abrir un huevo y separar la clara de la yema,
 - ii. centrifugar la yema obtenida en i) a una velocidad comprendida entre 2-2500 r.p.m durante un tiempo comprendido entre 15-20 minutos,
 - iii. añadir la yema obtenida en el paso ii) del 0.5 al 4% v:v a la solución tampón de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato nativo de leche,
 - 25
 - iv. añadir a la solución obtenida en iii), HCON(CH₃)₂ del 1 al 4% v:v, glicerol del 0,5 al 2% v/v, y
 - v. homogeneizar la solución obtenida en iv).
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque en el paso d) se añade cafeína 0.5 y 3 mM, TROLOX a una concentración comprendida entre 50 y 200 µM y/o melatonina a una concentración comprendida entre 0.5 y 5µM.
- 30
5. Empleo del medio de las reivindicaciones 1 ó 2 para la congelación del semen equino.

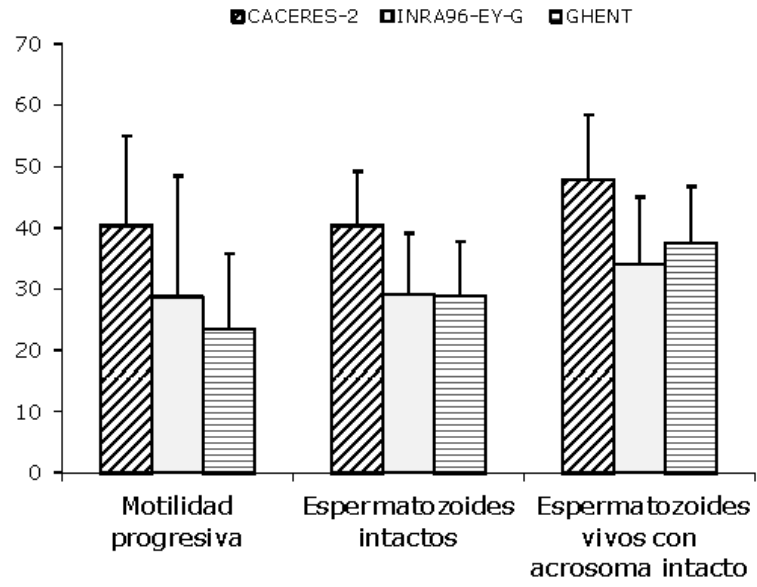


FIGURA 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201131611

22 Fecha de presentación de la solicitud: 06.10.2011

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A01N1/02** (2006.01)
A61D19/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 101418282 A (ZHENGZHOU COLLEGE OF ANIMAL HU) 29/04/2009, (resumen) BASE DE DATOS EPODOC [en línea], Recuperado de: EPOQUENET , E.P.O., [recuperado el 08.01.2013].	1
A	WO 2008117026 A1 (ROYAL VETERINARY COLLEGE ET AL.) 02/10/2008, todo el documento.	1-5
A	MOTA FILHO A C et al. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. THERIOGENOLOGY, 05/05/2011 VOL: 76 No: 7 Pags: 1367 - 1372 ISSN 0093-691X Doi: doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.010	1-5
A	Dimethyl formamide improves the post-thaw characteristics of sex-sorted and non-sorted stallion spermatozoa. ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, 01/01/2010 VOL: 121 No: 1-2 Pags: 216 - 217 ISSN 0378-4320	1-5
A	Abstracts. ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, 01/10/2005 VOL: 89 No: 1-4 Pags: 199 - 321 ISSN 0378-4320	1-5
A	MOORE et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE, 01/05/2006 VOL: 26 No: 5 Pags: 215 - 218 ISSN 0737-0806 Doi: doi:10.1016/j.jevs.2006.03.003	1-5

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
10.01.2013

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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

A01N, A61D

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.01.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-5	SI
	Reivindicaciones 1	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 se publica.

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	CN 101418282 A (ZHENGZHOU COLLEGE OF ANIMAL HU)	29.04.2009
D02	WO 2008117026 A1 (ROYAL VETERINARY COLLEGE et al.)	02.10.2008
D03	MOTA FILHO A C et al. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. THERIOGENOLOGY, 05/05/2011 VOL: 76 No: 7 Pags: 1367 - 1372 ISSN 0093-691X Doi: doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.010	05.05.2011
D04	Dimethyl formamide improves the post-thaw characteristics of sex-sorted and non-sorted stallion spermatozoa. ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, 01/01/2010 VOL: 121 No: 1-2 Pags: 216 - 217 ISSN 0378-4320	01.01.2010
D05	Abstracts. ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, 01/10/2005 VOL: 89 No: 1-4 Pags: 199 - 321 ISSN 0378-4320	01.10.2005
D06	MOORE et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE, 01/05/2006 VOL: 26 No: 5 Pags: 215 - 218 ISSN 0737-0806 Doi: doi:10.1016/j.jevs.2006.03.003	01.05.2006

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 reivindica un procedimiento para obtener un medio para la congelación de semen equino. El medio contiene una disolución de tampón de Hank suplementada con HEPES y una serie de sustancias como glucosa, lactosa, etc. Contiene, asimismo, yema de huevo y como agentes crioprotectores, glicerol y dimetilformamida.

Se reivindica, además, tanto el medio obtenido por este procedimiento, así como el uso del mismo en la congelación de semen equino.

El medio puede contener de forma opcional cafeína, para mejorar la motilidad de los espermatozoides y antioxidantes como la melatonina y el TROLOX (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

D01-D06 representan el estado de la técnica anterior. Se refieren a distintos medios para congelar muestras de semen de caballos o de otros mamíferos.

D01 es el más cercano a la solicitud. Se refiere a un medio para congelar semen porcino y a su procedimiento de obtención. El medio contiene glicerol, dimetil formamida, yema de huevo y cafeína. Contiene, además, otras sustancias secundarias como glucosa, lactosa, antibiótico, etc.

Tanto el objeto de la invención en la reivindicación 1 de la solicitud como en D01 es obtener un medio para preservar semen de un mamífero en las mejores condiciones posibles. Las diferencias entre la solicitud y D01 son que en la solicitud el mamífero es un caballo y en D01 un cerdo. Y que en la solicitud, la disolución que contiene la dimetil formamida y el glicerol es tampón de Hank suplementada, mientras que en D01 no es así.

La idea que subyace en la solicitud es la de añadir dimetil formamida a la composición que servirá de vehículo para congelar el semen, de manera que se eviten los problemas conocidos al utilizar glicerol como único crioprotector. Esto ya se ve anticipado por D01. Por otro lado, desde el punto de vista de un experto en la materia, no parecería descabellado utilizar unos crioprotectores para semen de caballo que se han utilizado para semen de cerdo.

El empleo de tampón de Hank, a primera vista, no parece ser una diferencia importante a la hora de valorar la actividad inventiva de la solicitud, siendo conocido ampliamente en el estado de la técnica como disolución base en suspensiones de células vivas.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-5 de la solicitud cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986. Asimismo, se considera que las reivindicaciones 2-5 cumplen el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986. Sin embargo, la reivindicación 1, no lo cumple.