

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 427**

21 Número de solicitud: 201331293

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61D 19/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

02.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.03.2015

Fecha de la concesión:

02.12.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

10.12.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e
Innovación Avda. de Elvas, s/n
06006 Badajoz (Badajoz) ES**

72 Inventor/es:

**PEÑA VEGA, Fernando Juan y
ORTEGA FERRUSOLA, Cristina**

54 Título: **DILUYENTE PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO ADAPTABLE A CADA INDIVIDUO**

57 Resumen:

Diluyente para la congelación de semen equino adaptable a cada individuo.

Esta invención se refiere a un diluyente de congelación para esperma equino que comprende solución salina balanceada de Hank, de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato, de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón y al menos un crioprotector.

ES 2 530 427 B1

Diluyente para la congelación de semen equino adaptable a cada individuo

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a una composición y a su uso como diluyente para la congelación de semen, en particular de semen equino. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la ganadería equina.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

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, se elimina el 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,
20 bien por su morfología, bien por su funcionalidad.

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
25 semen de todos los sementales es esencial.

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 et al.,
30 *J.Reprod. Fertil. Suppl.* 1979, (27):47-51, diluyentes comerciales a base de yema de huevo, como el Ghent™ Minitüb, o leche desnatada, como INRAFreeze™ IMV. Sin embargo, tanto con los diluyentes comerciales como con los de laboratorio se observa una alta mortalidad espermática y además los espermatozoides supervivientes presentan diversos grados de daño no letal (Ortega Ferrusola et al., *J Androl.* 2008, 29(2):213-21), pero que disminuye su
35 vida media en el tracto genital de la yegua, dificultando el manejo reproductivo y

disminuyendo aún más la fertilidad. 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.

- 5 Es conocido 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.
- 10 Los medios de congelación actuales no tienen en cuenta uno de los principales problemas que presenta la congelación de semen equino, la alta variabilidad individual y la necesidad de desarrollar protocolos individualizados para cada semental. Esto causa 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
- 15 motilidad progresiva a la descongelación para poder entrar en un programa comercial.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un diluyente para la congelación de semen equino que

20 puede modularse y adaptarse de forma individual a cada individuo para la congelación de semen equino, basado en combinaciones de crioprotectores alternativos, y a concentraciones específicas que minimizan 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

25 disponibles en el mercado.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- 30 a) solución salina balanceada de Hank;
b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
d) al menos un crioprotector.

35 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición tal y como

se ha descrito anteriormente como diluyente de congelación de esperma.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una dosis de inseminación que comprende la composición tal y como se ha descrito anteriormente.

5

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la preparación de la composición tal y como se ha descrito anteriormente que comprende:

- a) solución salina balanceada de Hank,
- 10 b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
- c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- d) al menos un crioprotector.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- a) solución salina balanceada;
- b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato cálcico;
- 20 c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- d) al menos un crioprotector.

Por solución salina balanceada se entiende una solución hecha a pH fisiológico y a concentración de sales fisiológica. Estas soluciones normalmente incluyen sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro. Normalmente se usan para lavar tejidos y células y se suelen combinar con otros agentes para tratar tejidos y células. Proporcionan agua e iones inorgánicos a las células, y mantienen el pH fisiológico. La solución salina balanceada se selecciona de solución de Alsever, solución de Earle, solución de Gey, solución de Hanks, solución de Dulbecco, solución de Puck, solución de Ringer, solución de Simm y solución de Tyrode, preferiblemente la solución salina balanceada es la solución de Hank.

30

Por solución salina balanceada de Hank (también llamada solución fisiológica de Hank) se entiende una solución que comprende NaCl, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot H_2O$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $NaHCO_3$ y glucosa. Las proporciones de dichas sales son bien conocidas para un experto en la técnica, pero a modo de ilustración, una posible composición de una solución

35

balanceada de Hank comprendería 0,14 g de CaCl₂, 0,40 g de KCl, 0,06 g de KH₂PO₄, 0,2 g de MgSO₄·7H₂O, 8 g de NaCl, 0,35 g de NaHCO₃ y 13,5 g de glucosa. Además, la solución balanceada de Hank comprende de 0,1% a 1% p/v de ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina etanosulfónico, conocido normalmente por su acrónimo en inglés, HEPES. El HEPES
5 permite ajustar el pH.

Por fosfocaseinato cálcico se entiende fosfocaseinato nativo de leche. Preferiblemente el fosfocaseinato nativo de leche se obtiene a partir de leche desnatada según lo descrito en Puliot et al "On the conventional cross flow microfiltration of skim milk for the production of
10 native phosphocaseinate" (*International Dairy Journal*, 6(1), 1996, pp. 105-11. El fosfocaseinato cálcico tiene la función de protección de membrana.

El hidroxietilalmidón son polímeros naturales de la amilopectina, modificados químicamente por una hidroxietilación en la subunidad de los carbonos C2, C3 y C6 de la glucosa. La
15 amilopectina, molécula ramificada, puede proceder del almidón de maíz o de la patata. El hidroxietilalmidón permite reducir la concentración o sustituir a la yema de huevo como protector de membrana durante la criopreservación. Así como la yema de huevo, el hidroxietilalmidón tiene la función de protección de membrana.

20 La principal ventaja de esta invención es que se pueden preparar diluyentes sin o con muy poca yema de huevo, y es por tanto una alternativa por bioseguridad. Actualmente la legislación en muchos países prevé la retirada de la yema de huevo debido al riesgo biológico (principalmente la trasmisión de patógenos) que supone en diluyentes de congelación.

25 En una primera realización del primer aspecto de la presente invención, la composición comprende de 0,5% a 7% p/v de fosfocaseinato, preferiblemente de 1% a 5% p/v de fosfocaseinato.

30 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición comprende de 1% a 40% en peso de hidroxietilalmidón.

Aunque el hidroxietilalmidón sustituye a la yema de huevo, sería posible también usarlos en combinación. En otra realización del primer aspecto de la presente invención la composición
35 además comprende de 0,1% a 5% v/v de yema de huevo. La yema de huevo normalmente

se somete a una centrifugación, preferiblemente durante aproximadamente 15 min y 2000 rpm, y se escoge la fracción superior del tubo.

5 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición además comprende de 0,5 mM a 3 mM de cafeína.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición además comprende de 0,1 nm a 5 μ M de melatonina.

10 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición además comprende de 1 mM a 100 mM de taurina.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición además comprende de 1 mM a 100 mM de cisteína.

15 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición además comprende de 1 mM a 100 mM de penicilamina.

La cafeína, melatonina, taurina, cisteína y penicilamina actúan como antioxidantes.

20 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el crioprotector se selecciona de N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, 1,2,3-propanotriol y cualquiera de sus mezclas.

25 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la concentración del crioprotector es 0,1% a 15% v/v, preferiblemente de 0,5% a 10% v/v.

30 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el crioprotector comprende N-metilformamida, preferiblemente la concentración de N-metilformamida es de 0,5% a 8% v/v, más preferiblemente de 1% a 6% v/v.

35 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el crioprotector comprende N,N-dimetilformamida, preferiblemente la concentración de N,N-dimetilformamida es de 0,5% a 7% v/v, más preferiblemente de 1% a 5% v/v.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el crioprotector comprende 1,2,3-propanotriol, preferiblemente concentración de 1,2,3-propanotriol es de 0,3% a 5% v/v, más preferiblemente de 0,5% a 3% v/v.

- 5 Otra ventaja de la presente invención es que este diluyente puede comprender diversas combinaciones de crioprotectores. Esto proporciona la posibilidad de preparar una gran variedad de diluyentes diferentes, lo que permite adaptarse a la variabilidad natural presente en el semen de diferentes ejemplares.
- 10 En una realización particular del primer aspecto de la presente invención, la composición que comprende:
- a) solución salina balanceada de Hank;
 - b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
 - 15 c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
 - d) de 1 a 5% v/v de N,N-dimetilformamida

En una realización particular del primer aspecto de la presente invención, la composición que comprende:

- 20
- a) solución salina balanceada de Hank;
 - b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
 - c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
 - d) de 1% a 5% v/v de , N,N-dimetilformamida y de 0,5% a 2% v /v de 1,2,3-propanotriol.

- 25
- En una realización particular del primer aspecto de la presente invención, la composición que comprende:

- a) solución salina balanceada de Hank;
- 30 b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
- c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- d) de 1% a 6% v/v de N-metilformamida.

- En una realización particular del primer aspecto de la presente invención, la composición que comprende:
- 35

- a) solución salina balanceada de Hank;
- b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
- c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- 5 d) de 1% a 6% v/v de N-metilformamida y de 0,5% a 2% v/v de 1,2,3-propanotriol.

En una realización particular del primer aspecto de la presente invención, la composición que comprende:

- 10 a) solución salina balanceada de Hank;
- b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
- c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- d) de 1% a 3% v/v de 1,2,3-propanotriol.

15 En una realización particular del primer aspecto de la presente invención, la composición que comprende:

- a) solución salina balanceada de Hank;
- b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
- 20 c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- d) de 1% a 5% v/v de N,N-dimetilformamida y de 1% a 6% v/v de N-metilformamida.

En una realización particular del primer aspecto de la presente invención, la composición que comprende:

- 25 a) solución salina balanceada de Hank;
- b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
- c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- d) de 1% a 5% v/v de N,N-dimetilformamida, de 1% a 5% v/v de N-metilformamida y de 1%
- 30 a 3% v/v de 1,2,3-propanotriol.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha descrito anteriormente como diluyente de congelación de esperma, preferiblemente de esperma equino.

35

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una dosis de inseminación que comprende el diluyente de congelación tal y como se ha descrito anteriormente. Por dosis de inseminación se entiende una dosis utilizada para inseminar yeguas, que comprende semen equino del ejemplar deseado y el diluyente de la invención.

5

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la preparación de la composición tal y como se ha descrito anteriormente que comprende:

- a) solución salina balanceada de Hank,
- 10 b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato;
- c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
- d) al menos un crioprotector.

En una realización del cuarto aspecto de la presente invención, la a) solución salina balanceada de Hank, b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato y c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón están premezclados formando parte de una única solución.

En otra realización del cuarto aspecto de la presente invención, el crioprotector se selecciona de N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, 1,2,3-propanotriol y cualquiera de sus mezclas. Preferiblemente los crioprotectores están separados en distintos recipientes.

Para la preparación de la composición de la invención con el kit, la persona interesada mezclará parte de la disolución que comprende a) solución salina balanceada de Hank, b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato y c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón (solución A) con al menos uno de los crioprotectores (soluciones B, C y D, respectivamente, cada letra (B, C o D) designando un crioprotector).

Por tanto, sin tener en cuenta la variabilidad que además se puede obtener variando las concentraciones, con este kit se pueden obtener 7 composiciones de la invención diferentes: AB, AC, AD, ABC, ABD, ACD, ABCD.

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.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Fig. 1 representa los valores de motilidad total (MT) y velocidad circular (VCL) de diferentes soluciones. AC: 97,5 ml solución base + 2,5 ml 1,2,3,propanotriol; AB: 96 ml solución base + 4 ml N,N-dimetilformamida; ABC: 96 ml solución base + 2,5 ml N-dimetilformamida + 1,5 ml 1,2,3, propanotriol; AD: 96 ml solución base + 4 ml N-metilformamida.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Procedimiento de obtención de un diluyente de la invención

15 En primer lugar se preparó la solución base:

- a) se añadieron 5% p:v de fosfocaseinato nativo de leche a una solución salina balanceada de Hank tamponada con HEPES;
- b) posteriormente se añadió HES 10% p:v a la solución obtenida en (a);
- 20 c) a la solución obtenida en (b) se añadió cafeína 1 mM, penicilamina 5 mM, melatonina en 5 nM, taurina 5 mM;
- d) por último se homogenizó la solución obtenida en (c).

25

Posteriormente se realizaron diversas mezclas con los crioprotectores, según indicado:

Composición	ml solución base (A)	Crioprotector/es
AB	96 ml	4 ml N,N-dimetilformamida
AC	97,5 ml	2,5 ml 1,2,3,propanotriol
AD	96 ml	4 ml N-metilformamida
ABC	96 ml	2,5 ml N,N-dimetilformamida + 1,5 ml 1,2,3, propanotriol
ABD	96 ml	2 ml N,N-dimetilformamida + 2 ml N-metilformamida
ACD	96 ml	1 ml 1,2,3 propanotriol + 4 ml N-metilformamida ,

ABCD	95 ml	1 ml 1,2,3 propanotriol + 2 ml N-metilformamida + 2 ml N,N-dimetilformamida
------	-------	---

Tabla 1. Composición de diferentes diluyentes de congelación de la invención

Ejemplo 2. Tasas de supervivencia de los espermatozoides equinos post 5 descongelación

Se prepararon mezclas que comprenden de un 5% a un 20% de plasma seminal en los diluyentes de congelación de la invención, para que la concentración sea de aproximadamente 100 millones de espermatozoides por ml total.

10

Una vez mezclado, se dejó durante una hora a 5°C (periodo de equilibrado), y posteriormente se congeló.

15

Al cabo de 7 días las muestras se descongelaron y se evaluó la motilidad total (MT) y la velocidad circular (VCL) medidas mediante sistema computerizado de análisis seminal.

Los valores mostrados en la tabla 2 a continuación son medias de 42 eyaculados (de 42 ejemplares diferentes) divididos en 4 alícuotas y congelados en 4 de los medios descritos (AC, AB, ABC y AD):

20

	MT	Error estándar	VCL	Error estándar
AC	28,8	3,8	38,5	1,6
AB	34,8	2,4	44,1	1,9
ABC	42	3	47,2	2,2
AD	44,9	3,2	42,9	1,7

Tabla 2. Motilidad total (MT) y velocidad circular (VCL).

En la figura 1 están representados estos valores. Como se puede observar, la respuesta
25 varía entre medios y en todo ellos se alcanzan los mínimos requeridos para la comercialización de semen equino (motilidad progresiva superior al 30%).

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

- 5
- a) solución salina balanceada;
 - b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato cálcico;
 - c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
 - d) al menos un crioprotector.

10 2. La composición según la reivindicación anterior, donde la solución salina balanceada es la solución salina de Hank.

3. La composición según la reivindicación anterior caracterizada porque comprende de 0,5% a 7% p/v de fosfocaseinato cálcico.

15

4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque comprende de 1% a 5% p/v de fosfocaseinato cálcico.

20 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende de 2% a 10% en peso de hidroxietilalmidón.

6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque además comprende de 0,1% a 5% v/v de yema de huevo.

25 7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque además comprende de 0,5 mM a 3 mM de cafeína.

8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque además comprende de 0,1 nM a 5 μ M de melatonina.

30

9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque además comprende de 1 mM a 100 mM de taurina.

35 10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque además comprende de 1 mM a 100 mM de cisteína.

11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque además comprende de 1 mM a 100 mM de penicilamina.
- 5 12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el crioprotector se selecciona de N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, 1,2,3-propanotriol y cualquiera de sus mezclas.
13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la
10 concentración del crioprotector es 0,1% a 15% v/v respecto al volumen total.
14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el crioprotector comprende N-metilformamida.
- 15 15. La composición según la reivindicación anterior, donde la concentración de N-metilformamida es de 0,5% a 8% v/v respecto al volumen total.
16. La composición según la reivindicación anterior, donde la concentración de de N-metilformamida es de 1% a 6% v/v respecto al volumen total.
20
17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el crioprotector comprende N,N-dimetilformamida.
18. La composición según la reivindicación anterior, donde la concentración de N,N-
25 dimetilformamida es de 0,5% a 7% v/v respecto al volumen total.
19. La composición según la reivindicación anterior, donde la concentración de N,N-dimetilformamida es de 1% a 5% v/v respecto al volumen total.
- 30 20. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el crioprotector comprende 1,2,3-propanotriol.
21. La composición según la reivindicación anterior, donde la concentración de 1,2,3-propanotriol es de 0,3% a 5% v/v respecto al volumen total.
35

22. La composición según la reivindicación anterior, donde la concentración de 1,2,3-propanotriol es de 0,5% a 3% v/v respecto al volumen total.
23. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores como diluyente de congelación de esperma.
5
24. Uso según la reivindicación anterior donde el esperma es esperma equino.
25. Dosis de inseminación que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
10
26. Kit para la preparación la composición según las reivindicaciones 1 a 22 que comprende:
- a) solución salina balanceada,
 - b) de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato cálcico;
 - c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón;
 - d) al menos un crioprotector.
- 15
27. Kit según la reivindicación anterior, donde la a) solución salina balanceada de Hank, b) de de 0,1% a 10% p/v de fosfocaseinato cálcico y c) de 1% a 10% p/v de hidroxietilalmidón están premezclados formando parte de una única solución.
20
28. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27 donde el crioprotector se selecciona de N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, 1,2,3-propanotriol y cualquiera de sus mezclas.
25

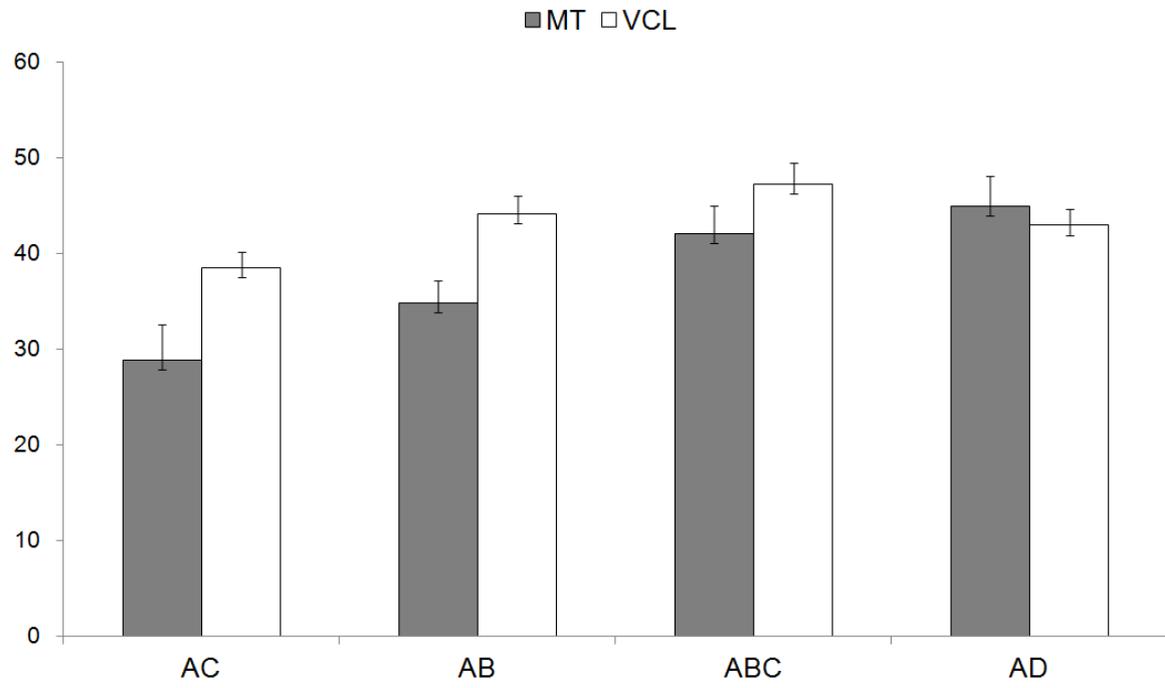


FIG. 1



- ②① N.º solicitud: 201331293
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.09.2013
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
Y	ES 2402505 A1 (UNIV. EXTREMADURA) 06/05/2013 , Todo el documento.	1-28
Y	OLDENHOF, H. et al., 'Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents', BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2013 Mar 21, Vol. 88, No. 3, página 68. ISSN: 0006-3363(print), ISSN: 1529-7268(electronic), Materiales y Métodos, Resultados, Discusión.	1-28
A	MORILLO RODRIGUEZ, A. et al., 'Dimethylformamide improves the in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage', REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS, 2012 Dec, Vol. 47, No. 6, páginas 995-1002, ISSN: 0936-6768(print), ISSN: 1439-0531(electronic), todo el documento.	1-28
A	LEBOEUF, B. et al., 'Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen', THERIOGENOLOGY, 2003, Vol. 60, No. 5, páginas 867-877, ISSN: 0093-691X, todo el documento.	1-28

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
25.06.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/6



- ②¹ N.º solicitud: 201331293
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 02.09.2013
 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	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AURICH, C. et al., 'Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C', REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS, 2007, Vol. 42, No. 4, Páginas 445-448, ISSN: 0936-6768 (Print), todo el documento.	1-28
A	ALVARENGA, M.A. et al., 'Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review', ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, 2005, Vol. 89, Nos 1-4, páginas 105-113, ISSN: 0378-4320, todo el documento.	1-28
A	SQUIRES, E.L., 'Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa', THERIOGENOLOGY, 2004, Vol. 62, No. 6, páginas 1056-1065, ISSN: 0093-691X(print), ISSN: 1879-3231(electronic), todo el documento.	1-28
A	CELEGHINI, E.C. et al., 'Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin', ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, 2008, Vol. 104, Nos 2-4, Páginas 119-131, ISSN: 0378-4320, todo el documento.	1-28

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
25.06.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/6

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, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.06.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-28	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-28	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	ES 2402505 A1 (UNIV. EXTREMADURA)	06.05.2013
D02	OLDENHOF, H. et al., <i>Biol. Reprod.</i> , (2013 Mar), <u>88</u> (3): 68.	2013 Mar
D03	MORILLO RODRIGUEZ, A. et al., <i>Reprod. Domest. Anim.</i> , (2012 Dec), <u>47</u> (6): 995-1002.	2012
D04	LEBOEUF, B. et al., <i>Theriogenology</i> , (2003), <u>60</u> (5): 867-77.	2003
D05	AURICH, C. et al., <i>Reprod. Domest. Anim.</i> , (2007), <u>42</u> (4): 445-8.	2007
D06	ALVARENGA, M.A. et al., <i>Anim. Reprod. Sci.</i> , (2005), <u>89</u> (1-4): 105-13.	2005
D07	SQUIRES, E.L., <i>Theriogenology</i> , (2004), <u>62</u> (6): 1056-65.	2004
D08	CELEGHINI, E.C. et al., <i>Anim. Reprod. Sci.</i> , (2008), <u>104</u> (2-4): 119-31.	2008

En D01-D08 se divulgan diferentes diluyentes para la congelación de semen equino.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicaciones independientes 1, 23 y 26.

1.1.1.El objeto de la reivindicación 1 consiste en una composición que comprende una solución salina balanceada, fosfocaseinato cálcico (de 0,1 a 10% p/v), hidroxietilalmidón (de 1 a 10% p/v) y al menos un crioprotector. En particular, el crioprotector se selecciona de N-metilformamida, N,N-dimetilformamida o 1,2,3-propanotriol o sus posibles combinaciones (cf. Reivindicaciones 12-22). Además, el medio puede contener de forma opcional yema de huevo y antioxidantes como cafeína, taurina, cisteína o penicilamina (cf. Reivindicaciones 6-11). Se reivindica, además, el uso de la composición de la reivindicación 1 como diluyente para la congelación de semen y un kit para la preparación de dicha composición (cf. reivindicaciones 23 y 26).

En el estado de la técnica se han divulgado diferentes composiciones diluyentes para la congelación de semen (cf. D01-D08). Sin embargo, ninguna de tales composiciones comparte las características técnicas de la reivindicada en la solicitud de patente.

Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones independientes 1, 23 y 26, y el de las dependientes 2-22, 24, 25, 27 y 28 se considera que es nuevo sobre la base de los documentos D01-D08.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-28 es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicaciones independientes 1, 23 y 26.

2.1.1.Los documentos D01-D02 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D01 se divulga una composición para la congelación de semen equino que comprende una solución salina balanceada (solución tampón de Hank), fosfocaseinato nativo de leche, yema de huevo y como agentes crioprotectores, glicerol y dimetilformamida. En D02 se describe el uso del hidroxietilalmidón como crioprotector en la congelación de semen equino (cf. D01: Reivindicaciones. D02: Resultados, Discusión).

2.1.2.El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevas composiciones diluyentes para la congelación de semen equino.

2.1.3. La solución propuesta en la reivindicación 1 consiste en una composición caracterizada por que comprende hidroxietilalmidón como uno de los crioprotectores que la componen. Según la descripción, este compuesto permite reducir la concentración o sustituir a la yema de huevo como protector de membrana durante la criopreservación (cf. Página 5, líneas 15-22). Esta característica representa la principal ventaja técnica de la composición reivindicada frente a la divulgada en D01 (cf. D01: Reivindicación 1). Sin embargo, en D02 se describe el efecto ventajoso del uso de hidroxietilalmidón como protector de membrana en diluyentes para la congelación de semen equino frente al uso de otros crioprotectores tales como la yema de huevo (cf. D02: Figura 3).

Por consiguiente, se estima que, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D01 y D02 llegando como resultado a la solución propuesta en la reivindicación 1 o a una equivalente. Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1, 23 y 26, y las reivindicaciones dependiente 2-22, 24, 25, 27, 28 no son inventivas sobre la base de los documentos D01-D02.

2.1. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-28 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.