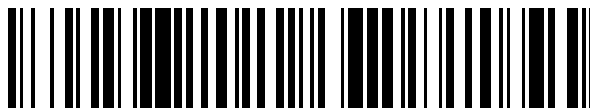


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 659**

21 Número de solicitud: 201400811

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

A61K 35/48 (2015.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

08.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.03.2015

Fecha de la concesión:

01.09.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.09.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
Campus Espinardo, Edificio Rector Soler, 1º
planta oficina de transferencia de resultados de
la investigación
30100 Murcia (Murcia) ES**

72 Inventor/es:

**ROMAR ANDRÉS , Raquel y
COY FUSTER , María Pilar**

54 Título: **Procesado y uso de fluidos del tracto reproductivo para mejorar la producción in vitro de embriones de mamífero**

57 Resumen:

Procesado y uso de fluidos del tracto reproductivo (biofluidos) para mejorar la producción in vitro de embriones de mamífero que comprende las siguientes etapas: a) fraccionamiento y procesado de los biofluidos mediante un tratamiento de selección, purificación, liofilización y su posterior almacenamiento; b) método de capacitación espermática en un medio de cultivo suplementado con biofluidos; c) fecundación in vitro en un medio enriquecido con biofluidos y d) posterior cultivo embrionario con desarrollo in vitro de los embriones obtenidos hasta cualquier fase del desarrollo preimplantacional en medios suplementados con biofluidos.

ES 2 532 659 B2

DESCRIPCIÓN

Procesado y uso de fluidos del tracto reproductivo para mejorar la producción in vitro de embriones de mamífero

5

Objeto de la invención

10 La presente invención contempla un método para aumentar la calidad embrionaria mediante el uso de técnicas de fecundación in vitro (FIV), opcionalmente con preincubación de los ovocitos en fluidos biológicos naturales de fases específicas del ciclo reproductivo, combinado con un método de separación espermática en medio de cultivo suplementado con dichos fluidos y la posterior fecundación y cultivo embrionario (CE) en medios suplementados con fluidos.

Sector de la técnica

15 Esta invención pertenece de forma general, al campo de la Reproducción Asistida en mamíferos, en concreto a las técnicas de Capacitación espermática, Fecundación in vitro y Cultivo embrionario.

Antecedentes de la invención y estado de la técnica

20 El procedimiento actualmente conocido para la obtención in vitro de un embrión supone la realización de distintas técnicas de reproducción asistida (ARTs) que difieren entre laboratorios y especies, y comprende los siguientes pasos: 1) la obtención y maduración in vitro (MIV) de los gametos femeninos (ovocitos); 2) la preparación y capacitación de los gametos masculinos (espermatozoides); 3) el proceso de fecundación in vitro en sí mismo ya sea mediante el cocultivo de los gametos o la microinyección asistida de un espermatozoide en el interior del ovocito, y
25 4) el CE para que los cigotos alcancen el estadio de desarrollo deseado, generalmente el de blastocisto.

30 Una estrategia para incrementar la eficiencia de estas ARTs ha sido imitar en el laboratorio las condiciones que los gametos-cigotos-embryones encuentran in vivo donde, tras la ovulación, el ovocito maduro es captado por el oviducto (trompas de

Falopio) contactando con su medio natural, el fluido oviductal (FO). Por su parte los espermatozoides “nadan” desde la vagina o el cérvix (según la especie) hasta el lugar de la fecundación (oviducto) contactando durante su paso por el útero con el fluido uterino (FU) y luego, cuando se encuentran ya en las proximidades del ovocito, con el FO. Una vez ambos gametos están en el oviducto se produce la fecundación y el desarrollo embrionario temprano siendo el FO el medio natural en el que ocurren estos eventos reproductivos. Posteriormente el embrión pasa al útero, siendo el FU el medio fisiológico donde se desarrollará hasta que ocurre la implantación y placentación. Por ello, con el objetivo de formular y/o adaptar nuevos medios de cultivo empleados in vitro y mejorar los resultados de fecundación y desarrollo embrionario, numerosos trabajos han estudiado la composición de estos fluidos naturales (*Iritani et al. 1974, J Anim Sci 39: 582-588; Leese et al. 2008, Reprod Fertil Dev 20: 1-8*). Sin embargo, no se han realizado investigaciones dirigidas a reproducir de una forma combinada y completa el ambiente fisiológico diseñando sistemas de cultivo integrales (desde la FIV hasta el CE) con medios más próximos a la composición de los fluidos biológicos naturales (FO y FU). Incluso a pesar de que, como se ha comprobado en la especie humana, la adición al medio de cultivo de una “simple” proteína oviductal incrementa en más de un 8% los nacimientos (*Meintjes et al. 2009, Hum Reprod 24: 782-789*).

Sin duda, las secreciones oviductales y uterinas proporcionan mejores condiciones para la fecundación y el desarrollo embrionario que los sistemas in vitro convencionales ya que la composición de estos medios naturales varía a lo largo de las diferentes fases del ciclo reproductivo de la hembra proporcionando al ovocito, cigoto y/o embrión las condiciones idóneas para su desarrollo en cada momento (*Killian et al. 1989, J Reprod Fertil 86: 419-426; Leese et al. 2008, Reprod Fertil Dev 20: 1-8*). De forma genérica los biofluidos contienen sales, electrolitos, aminoácidos, componentes energéticos y proteínas. Entre las más de 150 proteínas oviductales que se han conseguido identificar (*Avilés et al. 2010, Mol Human Reprod. 16: 896-906*), algunas ya se encuentran disponibles comercialmente y se utilizan como suplemento a los medios de cultivo in vitro (*Hao et al. 2006, Biol Reprod 75: 726-733; Meintjes et al. 2009, Hum Reprod 24: 782-789*). Sin embargo, se desconoce la composición completa y la concentración exacta de todos los componentes de los biofluidos por lo que la adición directa de los mismos a los medios de cultivo artificiales supone la estrategia más económica, rápida y fiable de suplementarlos con todo aquello que los gametos, cigotos y/o embriones precisan en cada una de las etapas.

En mamíferos, incluida la especie humana, los FO y/o FU se obtienen mediante distintas técnicas y generalmente se procesan con una única centrifugación y posterior congelación de la fracción líquida (*Carrasco et al. 2008a, Reprod Fertil Dev 20: 808-817; Carrasco et al. 2008b, Reproduction 136: 833-842; Faulkner et al. 2012, Proteomics 12: 2014-223; Lippes y Wagh 1993, Fertil Steril 59: 157-162; Velazquez et al. 2010, Theriogenology 73: 758-767*). Estos biofluidos mejoran las tasas de fecundación y aumentan la calidad embrionaria (*Aitken 1977, J Embryol Exp Morphol 41: 295-300; Cebrian-Serrano et al. 2013, ReprodDomestAnim 48: 331-338; Coy et al. 2008a, PNAS 105: 15809-15814; Lloyd et al. 2009, Reproduction 137: 679-687*). A pesar de estos resultados alentadores, hasta la fecha no se han empleado los biofluidos como aditivos en las ARTs humanas lo que abre un campo nuevo de investigación, especialmente si consideramos que, en la mayoría de ocasiones, el efecto beneficioso sobre gametos y embriones es interespecífico, es decir, que los biofluidos de una especie de mamífero pueden utilizarse para las ARTs de otra especie diferente (*Mondéjar et al. 2013, HumReprod 28: 718-728; Rondeau et al. 1996, Can J Vet Res 60:14-20*). Hasta ahora el procesado de los biofluidos, el almacenamiento y el transporte de las muestras requieren una temperatura controlada para mantener la cadena de frío, condicionando la implementación y extensión de su uso en el campo de la biología reproductiva.

Se ha descrito el efecto beneficioso del contacto de los gametos con los componentes del FO antes de la FIV (*Coy et al. 2008b, Reproduction 135: 19-27; Coy et al. 2010, Theriogenology 74: 632-642*) y se ha comprobado que los espermatozoides recogidos mediante Swim-up muestran una mayor integridad del ADN y un menor porcentaje de morfoanomalías que los obtenidos con centrifugaciones tipo Percoll (*Menkveld et al. 1990, Andrologia 22: 152-158; Zini et al. 2000, Urology 56: 1081-1084*). Aunque el proceso de capacitación espermática pueda parecer un mero trámite en las ARTs (dura apenas 45-60 minutos), el estrés que sufren los espermatozoides se transmite a la descendencia con alteraciones metabólicas y de comportamiento (*Gapp et al. 2014, Nat Neurosci 17: 667-669*).

Se han encontrado 5 documentos relacionados con el uso de sustancias específicas en los protocolos de FIV y/o CE pero ninguna describe el uso combinado de FO y FU de fases específicas del ciclo en la generación de embriones. Tampoco se describe en estas patentes ningún método de purificación o fraccionamiento de biofluidos ni su uso en métodos de capacitación espermática.

Patente-1 (ES 2 323 993 A1, Pilar Coy Fuster y Manuel Avilés Sánchez), donde se describe un Método para aumentar la monospermia en la FIV.

5 Patente-2 (ES 2 439 424 A1, Ignacio Santiago Álvarez Miguel y Mario Javier Perianes Carrasco) donde se describe un Método para aumentar el potencial implantatorio de embriones de mamíferos obtenidos por FIV.

Patente-3 (WO2006/012177, Randall Prather) "Method to decrease the rate of polyspermy in IVF".

10 Patente-4 (US 2013/0344595 A1, David K. Gardner, Mark G. Larman y Donald Linck) "Culture media for developmental cells containing elevated concentrations of lipoic acid".

Patente-5 (CN103333855 (A), ZouXiangang y Zhao Yalin) "Sheep embryonic cell culture fluid".

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención contempla un método para aumentar la calidad de los embriones mamíferos obtenidos in vitro mediante un sistema que incluye la adición de fluidos biológicos naturales (FO y/o FU) de fases específicas del ciclo reproductivo en las fases de capacitación espermática, FIV y CE.

20 Los autores de la presente invención han desarrollado por un lado, un sistema de capacitación espermática que no requiere centrifugaciones, empleando como aditivo proteico los FO y/o FU, que supone grandes ventajas a la hora de reducir el estrés al que se ven sometidos los gametos masculinos durante el procedimiento de separación del plasma seminal, y que ayuda así a seleccionar aquellos espermatozoides con
25 mejor calidad e integridad de ADN. Se ha conseguido aunar ambas estrategias formulando un nuevo medio de cultivo para seleccionar espermatozoides mediante la técnica de Swim-up que ofrece mejores resultados que los medios convencionales. Por otro lado, se ha llevado a cabo un nuevo proceso que permite obtener muestras purificadas y liofilizadas (deshidratadas) de ambos biofluidos sin que pierdan su
30 actividad biológica beneficiosa, pudiendo ser almacenadas muestras en seco y transportadas a temperatura ambiente, lo que supone una ventaja al método convencional utilizado hasta ahora (muestras líquidas).

Todo ello aumenta las posibilidades de que el uso de este sistema integrado de obtención de embriones in vitro pueda ser implementado y desarrollado en laboratorios de todo el mundo.

5 En la actualidad, tanto el número como la calidad de los embriones mamíferos obtenidos mediante técnicas in vitro son menores al obtenido in vivo. En el procedimiento in vivo los gametos entran en contacto con los biofluidos de manera aislada antes de producirse la fecundación y el desarrollo embrionario, por lo que un protocolo integral de obtención de embriones de alta calidad debería incluir este
10 contacto de los gametos, de manera individual, con los biofluidos, sustituyendo los sistemas de selección espermática tipo Percoll (que implican centrifugaciones) por modelos tipo Swim-up donde los espermatozoides nadan libremente.

El uso de los propios fluidos naturales con los que los gametos y embriones van encontrándose específicamente en el tracto reproductivo a lo largo de su desarrollo
15 puede incrementar la calidad de los embriones obtenidos in vitro. Así pues, esta invención propone la introducción de estos fluidos naturales del tracto reproductivo, como son el FO y el FU, en las ARTs para mejorar la calidad de los embriones obtenidos in vitro.

La invención describe un método de obtención de embriones in vitro mediante la
20 adición de biofluidos a los medios de cultivo en cada una de las fases del proceso. Los biofluidos son obtenidos de aparatos genitales de hembras de mamífero en fases concretas del ciclo reproductivo y son sometidos previamente a un proceso de purificación y tratamiento para su conservación y transporte.

La invención comprende las siguientes etapas:

25 a) un método de clasificación de los FO y FU en función del etapa del ciclo reproductivo en la que se obtienen, seguido de su fraccionamiento mediante doble centrifugación y posterior procesado mediante liofilización y pasteurización.

b) un método de capacitación espermática sin centrifugaciones en un medio de cultivo específico suplementado con FO y/o FU.

30 c) FIV en un medio enriquecido con FO y/o FU.

d) cultivo con desarrollo in vitro de los embriones obtenidos hasta cualquier fase del desarrollo en medios suplementados con FO y/o FU.

Para la realización del método de fraccionamiento mediante doble centrifugación y posterior procesado de los biofluidos mediante liofilización, obtenemos los FO y FU de animales sacrificados en matadero (especies porcina, bovina, ovina, caprina, cunícula y equina). Los tractos reproductivos se clasifican en las distintas fases del ciclo estral: folicular temprana (F1), folicular tardía (F2), luteal temprana (L1) y luteal tardía (L2) atendiendo al aspecto y la morfología ovárica (*Carrasco et al. 2008b, Reproduction 135: 19-27*). En la especie humana se pueden obtener de pacientes sometidas a ligadura de trompas, salpingectomías o histerectomías por razones de salud, o bien de donantes.

El FO se obtiene por aspiración introduciendo por la ampolla oviductal la punta de una pipeta automática y ejerciendo una presión manual aspirando así todo el contenido oviductal. Para su fraccionamiento, dicho contenido se centrifuga (entre 4000-10000g durante 1-10 minutos a 4 °C) y se descarta el pellet celular y la fase mucosa. El sobrenadante de FO se recentrifuga en las mismas condiciones quedando en la parte superior la fase acuosa y en la inferior la fase mucosa (fondo del tubo). Se aspira únicamente la fase acuosa del FO. Por su parte, el FU se obtiene por aspiración introduciendo en el cuerno uterino la punta de una pipeta automática, ejerciendo una presión manual ascendente. Dicho contenido se fracciona mediante una doble centrifugación en las mismas condiciones que el FO.

Una vez fraccionados, los biofluidos se liofilizan entre -50°C y -60°C, durante 20-24h con una presión de 0.040-0.010 milibares. Una vez finalizado el proceso se conservan refrigerados hasta su uso. Los biofluidos obtenidos de las distintas especies y fases del ciclo se almacenan en un biobanco y pueden utilizarse tanto de forma inter o intraespecífica así como de manera autóloga o heteróloga. Antes de usarlos como aditivos en un medio de cultivo, los biofluidos se redisuelven con agua purificada hasta su volumen original. Una de las ventajas que presenta este nuevo método de fraccionamiento es que los biofluidos se pueden transportar a temperatura ambiente, mantienen sus propiedades biológicas al rehidratarse y pueden pasteurizarse a 72-80°C durante 10-20 segundos antes de su uso, lo que resulta necesario para las garantías sanitarias del producto.

Las pruebas de actividad del producto se han realizado evaluando la capacidad de los biofluidos para endurecer la zona pelúcida (ZP) del ovocito (*Coy et al. 2008b, Reproduction 135: 19-27*). Para ello ovocitos maduros desnudados se sometieron a una

digestión con proteasa. Los resultados demuestran que los biofluidos sometidos al proceso de fraccionamiento y conservación descrito en esta patente mantienen su actividad biológica una vez son resuspendidos y pasteurizados.

5 Para el desarrollo del método de capacitación espermática sin centrifugaciones y en medios suplementados con biofluidos la presente invención incluye la formulación de un nuevo medio de cultivo para la selección espermática que denominamos Swim-up-biofluidos. Para ello nos basamos en los medios descritos en la literatura (*Alvarez et al. 1993, Hum Reprod 8: 1087-1092; García-López et al. 1996, J Chromatogr B Biomed Appl 680: 137-143*) pero realizando los siguientes cambios sobre la
10 composición:

- Ajuste de la concentración de sales: dentro de este grupo podemos englobar NaHCO_3 , NaCl , KCl , MgSO_4 , K_2HPO_4 , y CaCl_2 . Son los responsables de mantener la
15 osmolaridad y pH del medio por lo que su concentración se ajustó a niveles similares a los descritos en el FO. La osmolaridad final del medio se mantuvo en el rango fisiológico de 280-320mOsm. La concentración de sales inorgánicas estuvo comprendida entre 90 y 130 mM.

- Ajuste de pH: se ajustó en torno a 7.2-7.8 utilizando HEPES como agente
20 tamponador para evitar las oscilaciones de pH en el medio durante el tiempo que los espermatozoides están en contacto con él.

- Ajuste de la concentración de sustratos energéticos: dentro de este grupo se encuentran glucosa, piruvato sódico, lactato sódico y sacarosa. Se ajustaron las
25 concentraciones para conseguir una densidad y viscosidad óptimas que permitieran la movilidad de los espermatozoides a través del medio. La concentración de sustratos energéticos estuvo comprendida entre 120 y 160 mM.

- Proteínas: en el nuevo medio que diseñamos, Swim-up-biofluidos, la fuente de
30 proteínas consistió en la adición de 0.1-5% de FO preferentemente de fase F2 fraccionado y tratado como se ha descrito en la etapa a). Este tratamiento se comparó con BSA, fuente proteica habitualmente empleada en los medios de capacitación.

El método de capacitación Swim-up-biofluidos se realizó mezclando 0.5-1.5ml de
35 semen con 0.5-1.5ml de medio Swim-up-biofluidos y permitiendo a los espermatozoides nadar hacia la parte superior del tubo durante un tiempo de 10-50 min a una temperatura de 37-38°C. Pasado este tiempo se recogieron 0.5-1ml del medio de la parte superior conteniendo los espermatozoides que se utilizaron para

FIV. El nuevo método de capacitación espermática se comparó con el método de centrifugaciones tradicional (Percoll; *Matas et al. 2003, Reproduction 125: 133-1141*). Gracias a su trabajo de experimentación, los autores de la invención han demostrado que cuando los espermatozoides son capacitados en el sistema Swim-up-biofluidos con un medio suplementado con FO se mejora significativamente la monospermia y por tanto el número de cigotos capaces de desarrollarse hasta embrión.

En la realización del método FIV que incluye la adición de biofluidos al medio de fecundación, los ovocitos porcinos se maduran in vitro durante 42-44h según los protocolos descritos (*Coy et al. 2008b, Reproduction 135: 19-27*). Pasado este tiempo se decumulan mecánicamente y se transfieren 50-55 ovocitos por cada pocillo de fecundación conteniendo sólo 500 ul de medio TALP (grupo control) (*Matas et al. 2003, Reproduction 125: 133-1141*) o TALP suplementado con 0.1 al 5 % de FO, preferentemente de fase F2 ó L1, fraccionado y tratado como se describe en la etapa a) (grupo biofluidos). Los espermatozoides utilizados para la FIV se obtuvieron y procesaron mediante el sistema Swim-up-biofluidos descrito en la etapa b). Opcionalmente, antes de ser inseminados los ovocitos decumulados pueden incubarse 30-60 minutos con FO preferentemente de fase F2 ó L1. Los gametos se cocultivaron durante 18 horas pasadas las cuales los presuntos cigotos se fijaron y tiñeron para evaluar los resultados de fecundación. Con este método se mejoran las tasas de monospermia tras la fecundación.

En el desarrollo del CE en medios suplementados con biofluidos, los ovocitos se maduraron según los protocolos descritos (*Coy et al. 2008b, Reproduction 135: 19-27*). Se compararon dos métodos de CE, el método control y el método biofluidos con líquidos fraccionados y tratados como se describe en la etapa a). Para el grupo biofluidos los espermatozoides empleados para la FIV se capacitaban mediante el método Swim-up-biofluidos descrito en la etapa b) y los ovocitos se fecundaron en medio suplementado con 0.1-5 % de FO, como se describe en la etapa c). Una vez obtenidos los cigotos éstos se transfirieron a medio de cultivo embrionario NCSU-23 (*Petters y Wells 1993, J Reprod Fertility Suppl 48: 61-73*) suplementado los dos-tres primeros días con 0.1-5 % de FO, preferentemente de fase L1 ó L2. Tras las primeras 48 horas de cultivo se evaluó la división embrionaria y posteriormente los embriones se transfirieron a medio NCSU-23 suplementado con 0.1-5% de FU preferentemente de fase L1 ó L2 hasta el estadio de blastocisto. En el grupo control no se emplearon los biofluidos en ninguna de las fases del método, los espermatozoides se capacitaban

con el método Swim-up-BSA, los ovocitos se fecundaron en medio TALP y los cigotos se transfirieron a medio NCSU-23 para su cultivo embrionario. Una vez terminado el cultivo se evaluó la calidad de los embriones obtenidos en ambos grupos atendiendo a la morfología (*Bó y Mapletoft 2013, Anim Reprod 10: 344-348*) y número de células por blastocisto. Con el trabajo de experimentación se ha demostrado que los embriones producidos in vitro con el método biofluidos se dividen más rápidamente que el control y son de mejor calidad (evaluada como número de células por blastocisto y capacidad para eclosionar).

10 Ejemplo de realización de la invención

Método utilizado para obtener embriones por fecundación y cultivo in vitro utilizando biofluidos de distintas etapas del ciclo comprobando la mejora en la calidad embrionaria

a.- Obtención, fraccionamiento y control de actividad de los biofluidos

15 En animales de abasto los FO y FU se obtienen de genitales procedentes de animales sacrificados en matadero para consumo cárnico. En la especie humana se pueden obtener de donantes, de pacientes sometidas a ligadura de trompas o de mujeres sometidas a salpingectomías o histerectomías por razones de salud. Los biofluidos se centrifugan (4000-10000g durante 1-10 minutos a 4°C) y la fase acuosa se
20 recentrifuga con las mismas condiciones. Este líquido se liofiliza y pasteuriza quedando listo para su uso como aditivo de medios de cultivo previa resuspensión con agua purificada. La eficacia del tratamiento se estimó por la capacidad del FO para provocar el endurecimiento de la zona pelúcida. Para ello los ovocitos madurados in vitro se desnudan mecánicamente y se incuban en FO durante 30-60 minutos a 38.5°C.
25 Pasado este tiempo los ovocitos se incuban con una solución de proteasa al 0.5% y se contabiliza el tiempo que tarda en digerirse la ZP. Como muestra la tabla 1 los biofluidos tratados mantuvieron su actividad biológica con respecto a biofluidos no tratados (control):

30 Tabla 1. Tiempo de digestión de la zona pelúcida (tdZP) de ovocitos madurados in vitro tras ser incubados 30-60 minutos en FO de fase F2 fraccionado, liofilizado y pasteurizado. Los datos se expresan como media \pm SEM. Distintas letras indican diferencias significativas con $P < 0.001$.

Tratamiento del fluido oviductal	N	tdZP (segundos)
Control (no fraccionado)	14	3750.0±665.2a
Fraccionado	14	7995.0±70.8b
Fraccionado y liofilizado	14	9432.8±534.2b
Fraccionado, liofilizado y pasteurizado	10	8874.0±445.6b

N es el número de ovocitos empleado

b.- Capacitación espermática sin centrifugaciones en un nuevo medio enriquecido con biofluidos

5 El nuevo medio de cultivo se formuló ajustando la osmolaridad, pH y sustratos energéticos y sustituyendo la albúmina sérica bovina (BSA) por biofluidos. La capacitación se realizó con espermatozoides eyaculados procedentes de machos de fertilidad probada (12-24 meses de edad). Para el método de capacitación Swim-up-biofluidos se depositó el semen sobre el medio Swim-up-biofluidos durante 15-30 minutos a 37-38°C. Pasado este tiempo se recogieron las células de la parte superior y se ajustó la concentración espermática a 25.000 espermatozoides/ml utilizando para ello medio de cultivo TALP (*Matas et al. 2003, Reproduction 125: 133-1141*). Este nuevo método de capacitación espermática se comparó con el método de centrifugaciones tradicional (Percoll) (*Matás et al. 2003, Reproduction 125: 133-1141*).

10 La calidad de los espermatozoides obtenidos se valoró por su capacidad para fecundar ovocitos porcinos previamente madurados in vitro durante 42-44 horas con los protocolos convencionales (*Coy et al. 2008b, Reproduction 135: 19-27*). Los ovocitos se cocultivaron con los espermatozoides capacitados en los distintos métodos durante 18 horas. Pasado este tiempo los presuntos cigotos se fijaron y tiñeron para evaluar los resultados de fecundación (*Coy et al. 2008b, Reproduction 135: 19-27*). Los resultados mostraron que los espermatozoides capacitados en el sistema Swim-up-biofluidos con un medio suplementado con FO mejoran significativamente la monospermia, gracias a la reducción del número de espermatozoides que se unen a la zona pelúcida del ovocito (SPZ/ZP) y del número de espermatozoides que penetra al interior del ovocito (SPZ/OO), obteniéndose así un mayor rendimiento de la técnica (REN) que con el sistema convencional de centrifugaciones tal y como se muestra en la tabla 2.

30 Tabla 2. Resultados de la FIV tras capacitar los espermatozoides en un método tradicional con centrifugaciones (Percoll) o un método sin centrifugaciones con un

nuevo medio de cultivo en el que se ha empleado como fuente proteica la albúmina (Swim-up-BSA) o los biofluidos (Swim-up-biofluidos). PEN (porcentaje de ovocitos penetrados), MONO (porcentaje de monospermia), SPZ/OO (número medio de espermatozoides por ovocito penetrado), SPZ/ZP (número medio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida) y REN (rendimiento, porcentaje de cigotos viables sobre el total de los ovocitos). Los datos se expresan como media \pm SEM. Distintas letras indican diferencias significativas con $P < 0.05$.

Método capacitación	N	PEN (%)	MONO (%)	SPZ/OO	SPZ/ZP	REN (%)
Percoll	105	84.3 \pm 3.6a	17.4 \pm 4.1a	8.4 \pm 0.7a	17.3 \pm 2.3a	14.6 \pm 0.1a
Swim-up-BSA	180	69.6 \pm 3.5b	42.7 \pm 4.6ab	2.1 \pm 0.1b	7.2 \pm 0.5b	29.7 \pm 0.2b
Swim-up- biofluidos	183	71.1 \pm 3.4b	49.6 \pm 4.5b	2.7 \pm 0.1b	8.6 \pm 0.5b	35.2 \pm 0.2c

N es el número de ovocitos inseminados

c.- Obtención de embriones por FIV en medios suplementados con biofluidos

Una vez capacitados los espermatozoides en el sistema Swim-up-biofluidos la FIV se realiza en un medio de cultivo (TALP) con o sin biofluidos. Los ovocitos se maduran bajo los protocolos habituales descritos con anterioridad y se transfieren al medio de fecundación. Los resultados de esta invención han demostrado que cuando los ovocitos se inseminan en un medio de cultivo suplementado con FO se aumentan los porcentajes de penetración manteniéndose niveles elevados de monospermia (Tabla 3). Esto hace que el rendimiento (REN) del método de FIV con biofluidos sea significativamente mayor obteniéndose un mayor número de posibles embriones.

Tabla 3. Resultados de FIV suplementando el medio de FIV con biofluidos. PEN (porcentaje de ovocitos penetrados), MONO (porcentaje de monospermia), SPZ/OO (número medio de espermatozoides por ovocito penetrado), SPZ/ZP (número medio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida) y REN (rendimiento, porcentaje de cigotos viables sobre el total de los penetrados). Los datos se expresan como media \pm SEM. Distintas letras indican diferencias significativas con $P < 0.05$.

Método capacitación	N	PEN (%)	MONO (%)	SPZ/OO	SPZ/ZP	REN (%)
Control	32	43.7±0.1a	78.6±0.1	1.2±0.1	13.4±2.1	34.4±0.1a
Biofluidos	33	66.6±0.1b	72.7±0.1	1.3±0.1	19.3±3.2	48.5±0.1b

N es el número de ovocitos inseminados

d.- Cultivo embrionario con biofluidos y valoración de la calidad de los embriones obtenidos

5 Tras el periodo de fecundación, los cigotos fueron trasladados a medio de cultivo (NCSU-23) suplementado o no con FO de fase luteal temprana durante 48 horas donde fueron cultivados hasta estadio de 2-4 células. Pasado este tiempo los embriones se transfirieron a medio NCSU-23 suplementado o no con FU de fase luteal temprana donde fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto. Para comprobar los
10 efectos del sistema con biofluidos sobre la calidad embrionaria se valoraron los parámetros de división, número de blastocistos en cada una de las etapas de desarrollo (desde blastocisto temprano a blastocisto eclosionado), número medio de células por blastocisto y funcionalidad de los mismos, evaluada como su capacidad para eclosionar (contraerse y expandirse rítmicamente hasta conseguir salir de la zona
15 pelúcida). Se comprobó que los embriones obtenidos mediante el sistema biofluidos eran significativamente de mejor calidad que los embriones que no habían estado en contacto con estos fluidos naturales, como lo demuestra el mayor número de células por blastocisto (Tabla 4) y el mayor porcentaje de blastocistos que comienzan y completan el proceso de eclosión(Tabla 5).

20 Tabla 4. Resultados del cultivo embrionario con el método biofluidos. Los datos se expresan como media ± SEM. Distintas letras indican diferencias significativas con P<0.05. REN (rendimiento del método; porcentaje de blastocistos con respecto a los embriones divididos).

Grupo	N	División embrionaria (%)	Blastocistos (%)*	REN (%)	Células/ blastocisto
Control	903	47.5±1.6a	41.4±2.4	19.6±1.3	49.9±3.7a
Biofluidos	961	42.1±1.6b	44.5±2.5	18.7±1.2	81.8±7.2b

25 *Con respecto a los embriones divididos. N es el número de cigotos empleados

Tabla 5. Estadio de desarrollo de los blastocistos (Blasto) obtenidos in vitro con el método biofluidos. Los datos se expresan como media \pm SEM. Distintas letras indican diferencias significativas con $P < 0.05$.

Grupo	N	Blasto temprano	Blasto	Blasto expandido	Blasto eclosionando	Blasto eclosionado
Control	903	31.7 \pm 6.1a	28.3 \pm 5.9	40.0 \pm 6.4	0a	0a
Biofluidos	961	12.8 \pm 5.4b	30.8 \pm 7.5	35.9 \pm 7.8	15.4 \pm 5.9b	5.1 \pm 3.6b

5 N es el número de cigotos empleados

10 Cuando se compara el número medio de células de los blastocistos obtenidos in vitro con blastocistos obtenidos in vivo, se observa que el número de células de los embriones obtenidos con el método biofluidos es similar a los embriones in vivo, mientras que los del método control tienen aproximadamente la mitad de células (Tabla 6). Este resultado refleja que la calidad embrionaria que se obtiene con el método biofluidos es similar a la obtenida de forma natural, al menos en lo referente a este parámetro de calidad.

15 Tabla 6. Número medio de células por blastocisto obtenidos in vivo o in vitro mediante el método control y el biofluidos. Los datos se expresan como media \pm SEM. Distintas letras indican diferencias significativas con $P < 0.001$

Método	Células/blastocisto
Control	49.9 \pm 3.6a
Biofluidos	81.8 \pm 7.2b
In vivo	87.0 \pm 7.2b

REIVINDICACIONES

1.- Método para aumentar la calidad biológica y la supervivencia de los embriones de mamífero producidos in vitro mediante la incorporación de biofluidos de fases específicas del ciclo a los medios de cultivo caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- i) Fraccionamiento y procesado de los fluidos oviductal y uterino de cada una de las fases del ciclo mediante un proceso de selección, doble centrifugación con posterior liofilización, opcionalmente pasteurización y refrigeración para su uso en técnicas de reproducción asistida o para biotecnología en general.
- ii) Procesado de los espermatozoides en un medio de cultivo suplementado con los biofluidos obtenidos en i) caracterizado porque la selección de los espermatozoides para fecundación in vitro se basa en su capacidad fisiológica de nadar libremente atravesando dicho medio de cultivo que contiene agua, sales inorgánicas, compuestos energéticos, antibióticos y fluido oviductal fraccionado y tratado, obtenido durante la fase folicular tardía del ciclo.
- iii) Fecundación in vitro utilizando los espermatozoides obtenidos en ii) en un medio enriquecido con fluido oviductal.
- iv) Cultivo de los embriones obtenidos en iii) hasta cualquier fase del desarrollo preimplantacional en medios suplementados con fluido oviductal en una primera fase (variable desde 24 hasta 72 horas) y con fluido uterino en una segunda fase (variable desde 48 hasta el estadio de mórula o blastocito).

2.- Método según la reivindicación 1 ii), caracterizado porque en el medio de cultivo la concentración de sales inorgánicas está comprendida entre 90 y 130 mM, la concentración de sustratos energéticos está comprendida entre 120 y 160 mM y la concentración de fluido oviductal fraccionado y tratado está comprendida entre 0.1 y 5%.

3.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de fluido oviductal fraccionado y tratado de fase folicular tardía o luteal temprana del ciclo reproductor en el medio de fecundación in vitro está comprendida entre 0.1 y 5%.

- 4.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa iv) se realiza cultivando los embriones durante las primeras 24-72 horas desde la fecundación en medio de cultivo suplementado con fluido oviductal fraccionado y tratado, obtenido preferentemente durante la fase luteal temprana del ciclo a una concentración entre 0.1 y 5%.
- 5
- 5.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa iv) se realiza cultivando los embriones hasta estadio de mórula o blastocisto en medio de cultivo suplementado con fluido uterino fraccionado y tratado, obtenido preferentemente durante la fase luteal del ciclo a una concentración entre 0.1 y 5%.
- 10
- 6.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los biofluidos se obtienen de mamíferos.
- 15
- 7.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque los gametos, cigotos o embriones se obtienen de mamíferos.
- 8.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde los biofluidos utilizados son de la misma o de distintas especies.
- 20
- 9.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde los biofluidos utilizados pueden ser de un mismo sujeto o de un sujeto diferente (donante).
- 25
- 10.- El uso de biofluidos fraccionados y tratados en la elaboración de medios de cultivo, suplementos o medicamentos para mejorar la funcionalidad espermática, la fecundación in vitro, el cultivo embrionario, la criopreservación de gametos o embriones o la transferencia embrionaria a una hembra receptora según las reivindicaciones anteriores.
- 30



- ②① N.º solicitud: 201400811
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.10.2014
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RONGFENG, L., <i>et al.</i> Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. <i>Theriogenology United States</i> 15 Jul 2006 VOL: 66 No: 2 Págs: 404-414 ISSN 0093-691X (Impreso) Doi: pubmed:16420958. Ver todo el documento.	1-10
A	KIM N. H., <i>et al.</i> Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro. <i>Journal of reproduction and fertility ENGLAND</i> Mayo 1996 (05.1996) VOL: 107 No: 1 Págs: 79-86 ISSN 0022-4251 (Impreso) Doi: pubmed:8699438. Ver todo el documento.	1-10
A	LLOYD R. E., <i>et al.</i> Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. <i>Reproduction (Cambridge, England) England</i> Abril 2009 VOL: 137 No: 4 Págs: 679-687 ISSN 1741-7899 (Electrónico) Doi: doi:10.1530/REP-08-0405 pubmed:19153191. Ver todo el documento.	1-10
A	ELHASSAN Y. M. <i>et al.</i> Amino acid concentrations in fluids from the bovine oviduct and uterus and in KSOM-based culture media. <i>Theriogenology United States</i> 1 Jun 2001 VOL: 55 No: 9 Págs: 1907-1918 ISSN 0093-691X (Impreso) Doi: pubmed:11414495. Ver todo el documento.	1-10

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:

<p>Fecha de realización del informe 20.03.2015</p>	<p>Examinador B. Pérez Esteban</p>	<p>Página 1/5</p>
---	---	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/073 (2010.01)

A61K35/48 (2015.01)

A61P15/08 (2006.01)

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

C12N, A61K, A61P

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

INVENES WPIAP EPODOC TXPEA TXPEB TXPEC TXPEE TXPEF TXPEH TXPEI TXPEP TXPEPEA TXPES TXPUSE0A
TXPUSE1A TXPUSEA TXPUSEB TXPW0EA BIOSIS COMPDX EMBASE INSPEC MEDLINE NPL XPESP XPOAC.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.03.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	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 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	RONGFENG, L., <i>et al.</i> Theriogenology United States 15 Jul 2006 VOL: 66 No: 2 Págs: 404-414 ISSN 0093-691X (Impreso) Doi: pubmed:16420958.	15.07.2006
D02	KIM N. H., <i>et al.</i> Journal of reproduction and fertility ENGLAND Mayo 1996 (05.1996) VOL: 107 No: 1 Págs: 79-86 ISSN 0022-4251 (Impreso) Doi: pubmed:8699438.	Mayo 1996
D03	LLOYD R. E., <i>et al.</i> Reproduction (Cambridge, England) England Abril 2009 VOL: 137 No: 4 Págs: 679-687 ISSN 1741-7899 (Electrónico) Doi: doi:10.1530/REP-08-0405 pubmed:19153191.	Abril 2009
D04	ELHASSAN Y. M. <i>et al.</i> Theriogenology United States 1 Jun 2001 VOL: 55 No: 9 Págs: 1907-1918 ISSN 0093-691X (Impreso) Doi: pubmed:11414495.	01.06.2001

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 presente solicitud de patente describe y reivindica un método para aumentar la calidad biológica y la supervivencia de embriones de mamífero producidos por fecundación in vitro mediante la incorporación de biofluidos de las fases oviductal y uterina del ciclo, y que comprende las etapas de: i) fraccionar y procesar los fluidos mediante selección, doble centrifugación y posterior liofilización y congelación; ii) procesar los espermatozoides basándose en su capacidad de nadar libremente (método "swim-up") en medio suplementado con fluido oviductal; iii) llevar a cabo la fecundación in vitro en un medio enriquecido con fluido oviductal; y iv) cultivar los embriones obtenidos en medio suplementado con fluido oviductal en una primera fase (de 24 a 72 horas), y en medio suplementado con fluido uterino en una segunda fase (hasta el estadio de mórula o blastocisto). Los biofluidos se pueden obtener de la misma especie que los gametos y/o embriones o de otra especie donante, y se utilizan a concentraciones entre 0,1 y 5%. Se reivindica también el uso de biofluidos fraccionados para mejorar la funcionalidad espermática, la fecundación in vitro, el cultivo embrionario, la criopreservación de gametos o la transferencia embrionaria a una hembra receptora.

NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el método y usos de la solicitud tal y como están reivindicados, ni se han encontrado documentos que, solos o en combinación con otros, pudieran conducir al experto en la materia a los mencionados método y usos, por lo que las reivindicaciones 1 a 10 de la solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

Se citan en este informe cuatro documentos del campo técnico de la solicitud que se consideran cercanos a la misma pero que no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se preparan medios químicamente definidos consistentes en fluido oviductal sintético suplementado con aminoácidos a las concentraciones encontradas en los fluidos oviductal o uterino, y se analiza la capacidad de desarrollo de embriones bovinos empleando distintas combinaciones de estos medios sintéticos. Para la fecundación in vitro se emplean ovocitos maduros y espermatozoides obtenidos mediante el método "swim-up", igual que en la solicitud; sin embargo, en los cultivos del documento D01 no se añaden biofluidos en el proceso de capacitación de espermatozoides. El suplemento de los medios de cultivo con los aminoácidos presentes en los fluidos oviductal y uterino mejoró el desarrollo de los embriones. De la misma manera que en la solicitud de patente, en el documento D01 una de las condiciones de cultivo se basa en cultivar los embriones obtenidos por fecundación in vitro en medio suplementado con los aminoácidos del fluido oviductal y posteriormente (tras 72 horas) en medio suplementado con aminoácidos del fluido uterino, condiciones que resultan muy favorables para el desarrollo embrionario. A pesar de estas coincidencias en los métodos de cultivo de D01 con los de la solicitud, no se considera que este documento afecte la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 10 de la solicitud, ya que las diferencias con el método reivindicado son suficientemente importantes para considerarse dos procedimientos distintos.

En los documentos D02 y D03 se estudia el efecto positivo que el tratamiento de los ovocitos porcinos con fluido oviductal tiene en el posterior desarrollo de los embriones tras la fecundación in vitro de estos ovocitos (no se estudia el efecto del fluido uterino). En ambos documentos se obtienen los espermatozoides mediante centrifugación (en la solicitud se emplea el método "swim-up"), y no se añaden biofluidos en este proceso. El método de purificación del fluido oviductal es el mismo que se emplea en la solicitud, pero este fluido se utiliza en etapas del método diferentes de las de la invención: en D02 se añade fluido oviductal, bien durante la fecundación in vitro, o bien a los ovocitos maduros antes de la fecundación in vitro, y en D03 se añade el fluido oviductal a los ovocitos maduros en la etapa previa a la fecundación. Por tanto, a pesar de que ambos documentos divulgan la mejoría que el fluido oviductal produce en los procesos de fecundación in vitro, puesto que en ninguno de los dos artículos se menciona el fluido uterino, y que las etapas del método son diferentes, los documentos D02 y D03 no afectan la novedad ni actividad inventiva de la reivindicaciones 1 a 10 de la presente solicitud, según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

Por último, se cita el documento D04, considerado como un documento general del estado de la técnica cercano a la solicitud, pero que no afecta su novedad ni su actividad inventiva. En este documento se analizan las concentraciones de aminoácidos presentes en los fluidos oviductal y uterino bovinos, y se concluye que para el desarrollo in vitro de embriones los medios de cultivo estándar son deficientes en la mayoría de los aminoácidos, y que tales cultivos deberían realizarse en dos fases, debiendo realizarse un primer cultivo en medio suplementado con los aminoácidos presentes en el fluido oviductal, para a continuación, pasar los embriones a medio de cultivo suplementado con los aminoácidos del fluido uterino, del mismo modo que se lleva a cabo en la solicitud.