



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 740**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 35/52 (2006.01)

A61K 9/52 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

B01J 13/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08760927 .7**

96 Fecha de presentación : **12.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2167051**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54

Título: **Microcápsulas que contienen unos espermatozoides de mamíferos, dosis de inseminación que las contiene y procedimiento para su obtención.**

30

Prioridad: **14.06.2007 FR 07 04244**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2011

73

Titular/es: **COOPERATIVE BRETONNE
D'INSEMINATION ARTIFICIELLE PORCINE
"Le Val"
35590 Saint Gilles, FR**

72

Inventor/es: **Nihouarn, Bruno**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 362 740 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microcápsulas que contienen unos espermatozoides de mamíferos, dosis de inseminación que las contiene y procedimiento para su obtención.

5 La presente invención se refiere a unas microcápsulas que contienen unos espermatozoides de mamíferos.

Se refiere asimismo a una dosis de inseminación que las contiene, así como a un procedimiento para la obtención de estas microcápsulas.

10 En lo que se refiere al caso particular de la cerda, el inicio del celo tiene lugar como media 30 horas antes de la ovulación y se traduce fisiológicamente por una dilatación del cuello uterino.

15 Se hará referencia a la figura 1A adjunta en la que se traza el eje del tiempo t, un intervalo situado en dos círculos próximos que representan 6 horas.

En este eje, el inicio del celo se ha referenciado DC y el bloque PFO representa el periodo de tiempo durante el cual los óvulos son potencialmente fecundables.

20 Actualmente, la realización de la inseminación artificial se efectúa en dos tiempos, con el fin de cubrir el periodo ovulatorio y el periodo post-ovulatorio, con el fin de tener las mejores posibilidades de fecundación de los óvulos.

25 Una primera inseminación artificial (1ª IA) se practica 12 horas después del inicio del celo DC, lo cual asegura una duración fecundante de 24 horas (primer bloque PFS). Una segunda inseminación artificial (2ª IA) se practica 24 horas después del inicio del celo, lo cual asegura asimismo 24 horas de fecundidad (2º bloque PFS) y que recubre entonces el periodo ovulatorio PFO.

30 Se comprende fácilmente que esta realización de una inseminación artificial en dos tiempos provoca numerosas manipulaciones para el técnico encargado de estas inseminaciones. Por otra parte, esto provoca estrés en la cerda. Por último, estas operaciones necesitan la utilización de varios contenedores para el semen, lo cual, globalmente, aumenta el precio de coste de la operación.

Ya se ha propuesto sustituir las dos operaciones de inseminación por una sola.

35 Para ello, se ha recurrido a la encapsulación de espermatozoides en una matriz no tóxica que forma un gel o un sólido a temperatura de almacenamiento, y que se desagrega a la temperatura corporal.

Así, se describe en el documento US-A-4.840.891 la encapsulación de espermatozoides para la inseminación artificial.

40 En este documento, se usa un polímero no tóxico hidrófilo que se selecciona preferentemente de entre el grupo constituido por los polímeros de poliuretano y de polioxietileno, así como de los polímeros de poliuretano y de poliéster.

45 Se describe por otra parte en el documento EP-B-0 922 451 una técnica de encapsulación de espermatozoides de cerdo con la ayuda de geles de polímeros y, en particular, de alginato.

50 Esta técnica no da buenos resultados en la medida en la que los ensayos realizados no son concluyentes. En efecto, el tamaño de las microcápsulas formadas es del orden de 5 milímetros, lo cual es demasiado grande, y la movilidad de los espermatozoides encapsulados es muy inferior a la de los espermatozoides libres.

En otros documentos se describen unas técnicas de encapsulación de espermatozoides. Se trata, a título no limitativo, de los siguientes documentos:

- 55 - US-B1-6.596.310,
 - US-A-4.840.891,
 - WO 2006/106400,
 60 - NEBEL RAYMOND L *ET AL*: "Spermatozoal microencapsulation for use in artificial insemination of farm animals"
 - APPLICATIONS OF CELL IMMOBILISATION BIOTECHNOLOGY SPRINGER, PO BOX 17, 3300 AA DORDRECHT, NETHERLANDS SERIES: FOCUS ON BIOTECHNOLOGY, 2005, páginas 539-548,
 65 SP009073250 ISSN: 1-4020-3229-3(H),

- TORRE M L *ET AL*: "Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 21, nº 14, julio de 2000 (2000-07), páginas 1493-1498, XP004199070 ISSN: 0142-9612.

5 Por otra parte, en los documentos indicados a continuación, se dan a conocer unas técnicas de encapsulación de materiales no vivos:

- WO 00/61119A,

10 - EP-A-1 693 445,

- TIMBERT R *ET AL*: "Effect of sole and combined pre-treatments on reserve accumulation, survival and germination of encapsulated and dehydrated carrot somatic embryos" PLANT SCIENCE (SHANNON), vol. 120, nº 2, 1996, páginas 223-231, XP002466575 ISSN: 0168-9452,

15 - DINARVAND R *ET AL*: "Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique" JOURNAL OF MICROENCAPSULATION ISSN: 0265-2048,

20 - KHANDARE J N *ET AL*: "Preparation and evaluation of nimesulide niosomes for topical application" INDIAN DRUGS 2001 INDIA, vol. 38, nº 4, 2001, páginas 197-202, XP009094333 ISSN: 0019-462X.

25 La idea de encapsular una parte de dosis de inseminación necesita deber responder a ciertos imperativos. En particular, la integración del semen en unas cápsulas debe permitir una liberación controlada de éste, por consiguiente, la sustitución de la segunda inseminación.

30 Las cápsulas producidas deben mantenerse en el medio líquido de soporte que las contiene (medio isotónico), durante un tiempo mínimo de tres días, y en un medio animal durante 24 horas. Estas cápsulas deben degradarse en 6 horas en el medio animal y deben tener un tamaño de aproximadamente 1 mm.

35 Con fin de simplificar, se utilizará el término "diluyente" para designar el medio isotónico en el que están contenidas las cápsulas. Este diluyente es del tipo bien conocido para asegurar la conservación de semen fresco durante varios días.

40 En resumen, la matriz de encapsulación no debe reaccionar durante 96 horas como mínimo, es decir 72 horas en el medio isotónico y 24 horas en el medio animal.

45 Esta situación se representa en la figura 1B adjunta, que es análoga a la anterior. Se ha referenciado IA la única inseminación realizada, durante la cual se inyectan unos espermatozoides encapsulados SE.

50 La referencia SE' corresponde al periodo a partir del cual la matriz de encapsulación empieza a desagregarse, siendo la liberación completa de los espermatozoides efectiva al cabo de 24h.

55 El presente solicitante ha constatado que la utilización de una matriz no espermicida constituida por lo menos por un glicérido semi-sintético, a saber por lo menos un glicérido de ácidos grasos saturados en C₈ a C₁₈, cuya temperatura de fusión está comprendida entre aproximadamente 35 y aproximadamente 47°C, responde totalmente al objetivo descrito anteriormente.

60 En efecto, dicha matriz de encapsulación es biocompatible con el semen, es estable en el medio isotónico durante tres días, es estable durante 24 horas en el medio animal intra-uterino a unas temperaturas del orden de 38°C, y se degrada en 6 horas aproximadamente en el medio animal.

65 La presente invención se refiere asimismo a una dosis de inseminación que comprende un medio líquido apto para asegurar la conservación de los espermatozoides, conteniendo esta dosis unas microcápsulas de acuerdo con una de las características citadas anteriormente.

Según unas formas particulares de realización de esta dosis:

- dicho medio líquido contiene, en suspensión, unos espermatozoides libres, es decir no encapsulados;
- contiene por lo menos dos grupos de microcápsulas, que se diferencian de dos en dos por la naturaleza del medio líquido y/o la de dicha matriz;
- dicho medio líquido no encapsulado contiene un agente apto para permitir la suspensión uniforme de las microcápsulas en el seno de éste;

- dicho agente es un gel;
- dicho agente es una goma gellan.

5 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de fabricación de dichas microcápsulas según el cual se reciben las microcápsulas en un baño de solidificación.

Según la invención, el baño comprende un agente tensoactivo.

10 Según unas características particulares de este procedimiento:

- dicho agente tensoactivo es un monolaurato de sorbitán;
- la temperatura del baño de solidificación está comprendida entre 8 y 25°C.

15 Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la siguiente descripción de ciertos modos de realización preferidos.

Esta descripción está realizada haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 20 - la figura 2 es una vista esquemática de una instalación que permite fabricar las microcápsulas según la invención;
- la figura 3 es una vista detallada de una parte de la instalación de la figura 2.

25 1 - Selección de matrices:

El presente solicitante ha ensayado varias materias grasas y ha seleccionado por último varias matrices aptas para constituir el material de encapsulación de las microcápsulas según la invención.

30 Se trata en cada caso de materiales no espermicidas, constituidos por lo menos por un glicérido de ácidos grasos saturados en C8 a C18, que presentan una temperatura de fusión comprendida entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 47°C.

35 Más precisamente, los productos ensayados seleccionados son los siguientes: (designados con sus referencias comerciales, disponibles en la compañía GATEFOSSE): Gelucire 39/01, Gelucire 43/01 y Suppocire DM.

La composición y las características de estos productos son las siguientes:

	Gelucire 39/01	Gelucire 43/01	Suppocire DM
Punto de goteo (Mettler)	37,5 a 41,5 °C	42,0 a 45,0 °C	42,0 a 45,0 °C
Índice de ácido	< 0,20 mgKOH/g	< 0,20 mgKOH/g	< 0,20 mgKOH/g
Índice de saponificación	225 a 245 mgKOH/g	214 a 236 mgKOH/g	214 a 236 mgKOH/g
Índice de yodo	<2gl2/100g	<2gl2/100g	<2,0gl2/100g
Índice de hidróxilo	< 10 mgKOH/g	< 10 mgKOH/g	< 10 mgKOH/g
Índice de peróxido	< 1,2 meqO ₂ /Kg	< 3,0 meqO ₂ /kg	< 3,0 meqO ₂ /kg
Impurezas alcalinas	< 30 ppm NaOH	< 30 ppm NaOH	< 30 ppm NaOH
Contenido en agua	< 0,50%	< 0,50%	< 0,5 %
Genizas sulfúricas	< 0,05%	< 0,6%	< 0,6%
Contenido en insaponificable	< 0,5%	< 0,05%	< 0,05%
Metales pesados	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm

40 Estas materias resultan totalmente satisfactorias, en términos de biocompatibilidad con el semen y de temperatura de fusión.

45 2 - Formación de bolas a partir de las matrices:

El objetivo de este ensayo es determinar las condiciones favorables para la formación de bolas durante la extrusión de las matrices. La solidificación de las bolas debe ser rápida y dependerá del baño de recepción en el que caen las cápsulas (temperatura, tensoactivo, etc.).

50 Unas microcápsulas de Gelucire 39/01, extruidas con la ayuda de una jeringa, han sido recogidas en un baño de agua destilada a una temperatura de 20°C, y después de 10°C.

En los dos casos, existe sólo la formación de una película plana en la superficie y ninguna bola.

En estas condiciones, varios agentes tensoactivos han sido ensayados en el baño de recepción de bolas, a diferentes concentraciones.

5 Al final, y en particular para su papel de espermicida frente al semen y su ausencia de efecto nefasto sobre la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides, se ha seleccionado el Span 20 (marca registrada) (se trata de monolaurato de sorbitán).

Se prefiere particularmente una concentración del orden de 0,5 a 1% en peso.

10 Una síntesis de ensayos efectuados anteriormente se proporciona en la tabla al final de la descripción.

3 - Formación de cápsulas:

15 El equipo utilizado para los ensayos de encapsulación es un aparato denominado "Inotech encapsulator IER -20", que está representado esquemáticamente en la figura 2.

El principio de esta técnica se basa en la desintegración de un chorro laminar en gotitas aplicándole una vibración.

20 La instalación utilizada comprende un generador de frecuencias 1, asociado a un dispositivo que produce unas vibraciones 10.

Las materias primas de las microcápsulas están almacenadas respectivamente en un tanque 2 y en una jeringa 3, y están vehiculadas hasta una boquilla 4 conectada a una cámara de pulsaciones 11.

25 Las microcápsulas son recogidas en un reactor 5 de tipo cristizador o vaso de precipitados, en el fondo del cual está previsto un agitador magnético 50 de baja potencia para mantener las partículas en movimiento.

30 Un generador de tensión eléctrica 12 acoplado a un electrodo 13 permite cargar las microcápsulas muy finas, impidiendo así que se peguen antes de la gelificación.

La boquilla 5 se denomina de "doble boquilla", a saber que comprende una boquilla "interna" 50 que genera el núcleo de la microcápsula, y una boquilla "externa" 51 que genera la matriz de la microcápsula (véase la figura 3).

35 a) Encapsulación del medio isotónico: diluyente:

Los primeros ensayos de encapsulación han sido realizados con un diluyente (constituido por un medio de conservación de semen animal, enriquecido con moléculas anti-oxidantes y que contiene un antibiótico) y el Gelucire 39/01. Se han debido ajustar diferentes parámetros para obtener las condiciones óptimas para la formación de cápsulas de tamaño homogéneo, minimizando la pérdida de diluyente durante la producción.

40 cápsulas de tamaño homogéneo, minimizando la pérdida de diluyente durante la producción.

b) Encapsulación del semen:

1) Preparación del semen:

45 El eyaculado se recoge en fracción rica y después se filtra sobre una gasa estéril. Un control sobre el semen puro se efectúa en la concentración (Nucleocounter), la movilidad (SCA) y la morfología (recuento). El semen se prediluye (v:v) a 30°C con diluyente de larga duración suplementado con agente de viscosidad. La dilución final se realiza con el mismo diluyente a 20°C. El semen diluido se estabiliza durante una hora a temperatura ambiente antes de ser almacenado a 17°C en espera del proceso de encapsulación.

50 almacenado a 17°C en espera del proceso de encapsulación.

2) Optimización de las condiciones de realización:

Se han realizado varios ensayos de encapsulación con el fin de optimizar los parámetros de realización siguientes:

55 Se han realizado varios ensayos de encapsulación con el fin de optimizar los parámetros de realización siguientes:

- El caudal del semen;
- El caudal de la matriz de encapsulación;
- La frecuencia de corte;
- El voltaje;

60 Distancia del baño de solidificación con relación a las boquillas.

Esta optimización se ha basado en parte en unos cálculos teóricos que permiten predecir los caudales para una frecuencia dada y en función de las características físico-químicas de los materiales utilizados (viscosidad, tensión de superficie, densidad, etc.).

65 Las cápsulas formadas para cada experimento son visualizadas con el microscopio (tamaño interno y externo,

distribución de tamaño, forma).

4 - Resultados y discusión:

5 Se han realizado *in situ* varios ensayos de encapsulación del semen porcino para evitar que el semen sufra los cambios de temperatura debidos al transporte.

a) Movilidad de los espermatozoides encapsulados:

10 El método utilizado (corte con un bisturí de hoja) para liberar los espermatozoides de la cápsula no es muy preciso y puede provocar la destrucción del semen durante la manipulación. Sin embargo, se ha observado en ciertos casos que la movilidad de los espermatozoides encapsulados puede alcanzar los 65%.

15 Se estima por lo tanto que el semen resiste bien al procedimiento de encapsulación y a las variaciones térmicas provocadas durante la manipulación.

Se ha observado en otros casos, una movilidad muy baja, lo cual se puede deber a la no-resistencia de ciertos sémenes (tipo de verraco) al procedimiento de encapsulación o al método de bisturí utilizado.

20 b) Peso de la cápsula:

La masa de una cápsula ha sido estimada mediante el peso de una centena de cápsulas de diferentes lotes. El peso de una cápsula está comprendido entre 0,8 y 1,2 mg.

25 c) Control de liberación de espermatozoides encapsulados (ensayo *in vitro*):

Se ha revelado que los espermatozoides se liberan de la cápsula a partir de la primera hora de incubación. La concentración máxima se alcanza al cabo de 20 a 30 horas para unas cápsulas que tienen un diámetro de núcleo de 0,6 a 0,9 mm y un diámetro total de 1 mm.

30 5. Suspensión de las cápsulas durante la conservación:

35 Se ha observado que cuando las bolas estaban incubadas en presencia del semen, no se repartían de manera homogénea en la dosis y formaban una capa en la superficie del semen diluido. Esto puede tener un efecto nefasto en la conservación del semen.

El objetivo de este estudio es añadir unos texturantes al medio (diluyente) para poder mantener las bolas en suspensión.

40 Se ha seleccionado una goma gellan (en inglés "gellan gum") debido a sus características no espermicidas. Conviene perfectamente la conocida con la marca de KELCOGEL LT (compañía Kerico). Permite un excelente mantenimiento de las bolas en suspensión a partir del momento en el que está presente a una concentración del orden de 0,05%.

Ensayos	Tensoactivo*	Concentración del tensoactivo	Matriz	Formación de cápsulas	Forma	Biocompatibilidad	Retenido
1	NI 24-7	1%	Gelucire 43/01	Sí	Esférica	No	No
2	NI 45-8	1%	Gelucire 43/01	Sí	Esférica	No	No
3	Tween 85	0,5%	Gelucire 43/01	No	Semi-Esférica	Sí	No
4	Tween 85	0,5%	Gelucire 43/01	No	Plana	Sí	No
5	Tween 85	1%	Suppocire 43/01	No	Plana	Sí	No
6	Tween 85	1%	Suppocire 43/01	No	Plana	Sí	No
7	Tween 20	1%	Gelucire 43/01	No	Plana	Sí	No
8	Tween 20	0,5%	Gelucire 43/01	No	Plana	Sí	No
9	Span20	1%	Gelucire 43/01	Sí	Esférica	Sí	Sí
10	Span 20	1%	Suppocire DM	Sí	Esférica	Sí	Sí
11	Span20	0,5%	Suppocire DM	Sí	Esférica	Sí	Sí

*: El tensoactivo se identifica por la referencia comercial o la marca registrada bajo la cual está disponible

REIVINDICACIONES

1. Microcápsulas que comprenden:

- 5 - un núcleo que contiene unos espermatozoides de mamíferos, con la excepción del ser humano, en suspensión en un diluyente, es decir un medio líquido apto para asegurar la conservación de los espermatozoides;
- una matriz de encapsulación constituida por un material polimérico, caracterizadas porque dicha matriz es no espermicida y está constituida por lo menos por un glicérido semi-sintético, a saber por lo menos un glicérido de
10 ácidos grasos saturados en C₈ a C₁₈, que presenta una temperatura de fusión comprendida entre aproximadamente 35 y aproximadamente 47°C.

2. Dosis de inseminación que comprende un medio líquido apto para asegurar la conservación de espermatozoides, caracterizada porque contiene unas microcápsulas según la reivindicación 1.

15 3. Dosis según la reivindicación 2, caracterizada porque dicho medio líquido contiene, en suspensión, unos espermatozoides libres, es decir no encapsulados.

20 4. Dosis según una de las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizada porque contiene por lo menos dos grupos de microcápsulas, que se diferencian de dos en dos por la naturaleza del medio líquido y/o la de dicha matriz.

5. Dosis según una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada porque dicho medio líquido no encapsulado contiene un agente apto para permitir la suspensión uniforme de las microcápsulas en el seno de éste.

25 6. Dosis según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho agente es un gel.

7. Dosis según la reivindicación 6, caracterizada porque dicho agente es una goma gellan.

30 8. Procedimiento de fabricación de microcápsulas según la reivindicación 1, según el cual se reciben dichas microcápsulas en un baño de solidificación, caracterizado porque dicho baño comprende un agente tensoactivo.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho agente tensoactivo es un monolaurato de sorbitán.

35 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 y 10, caracterizado porque la temperatura del baño de solidificación está comprendida entre 8 y 25°C.

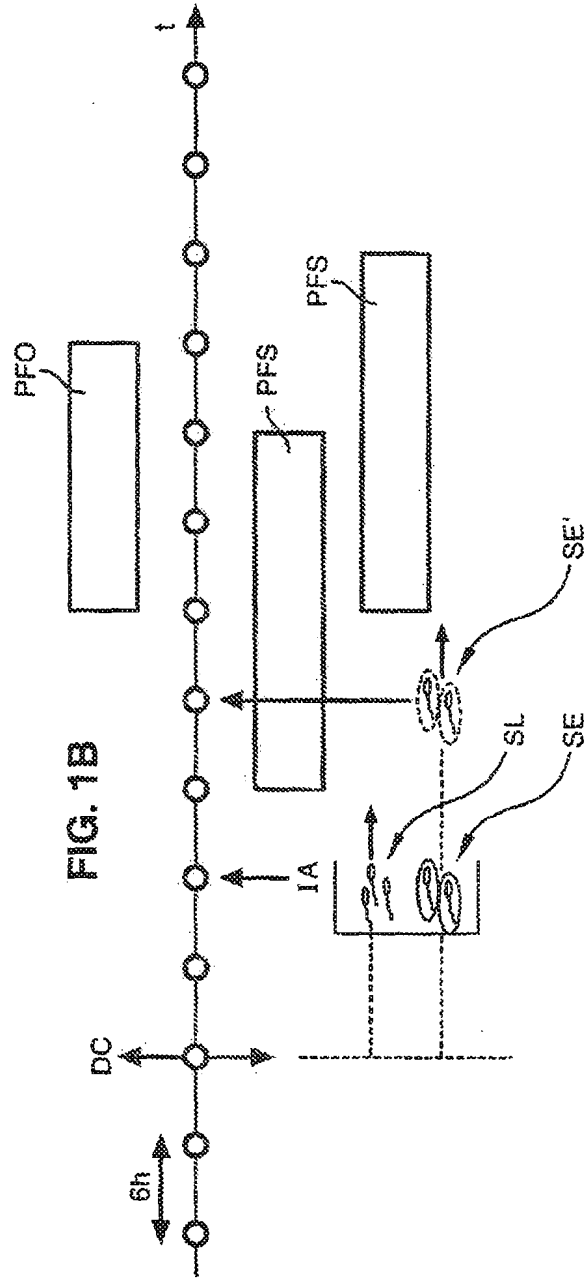
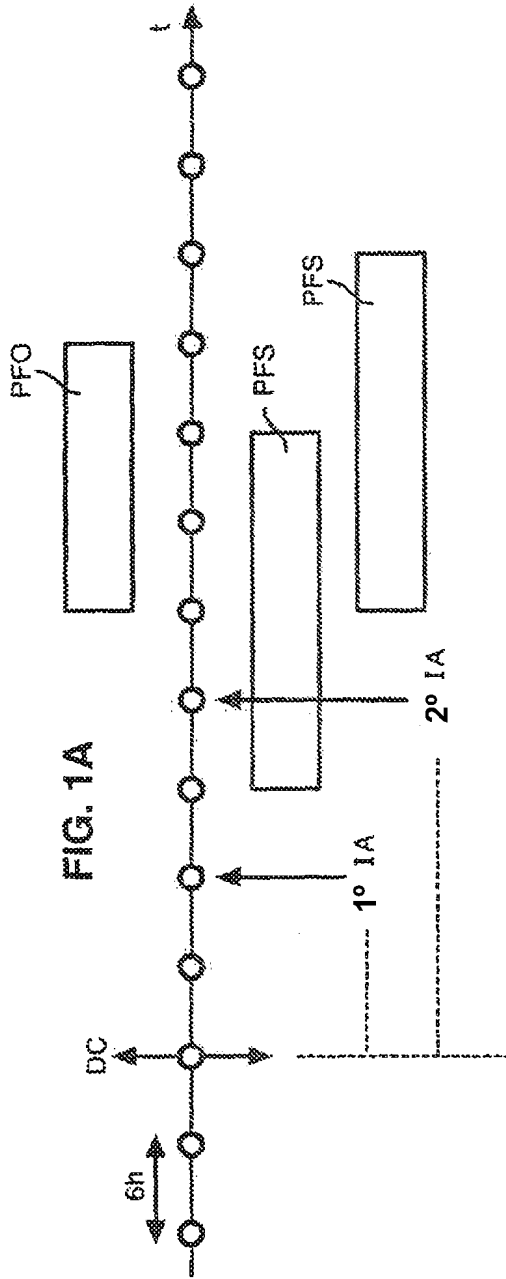


FIG. 2

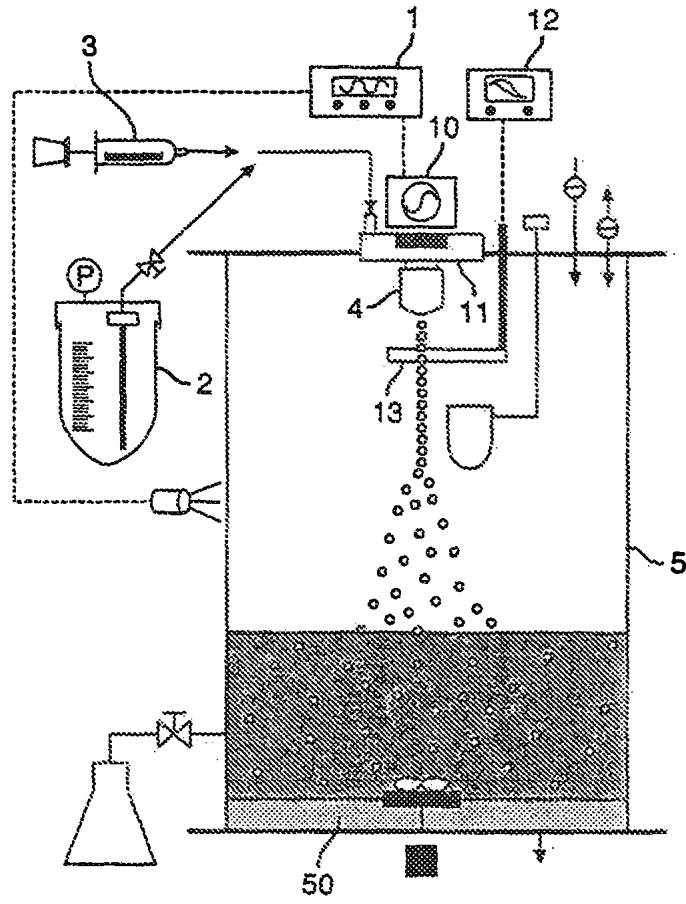


FIG. 3

