

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 683**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/52** (2015.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2010 E 10801631 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2512494**

54 Título: **Composición de material seminal porcino para la inseminación artificial de cerdas**

30 Prioridad:

**14.12.2009 FR 0958906**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.07.2015**

73 Titular/es:

**GENES DIFFUSION (100.0%)  
3595, route de Tournai  
59500 Douai, FR**

72 Inventor/es:

**LIEGEOIS, LUC**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 539 683 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

Composición de material seminal porcino para la inseminación artificial de cerdas

## 5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a una composición que contiene un material seminal porcino destinado a la inseminación artificial de cerdas, así como al procedimiento de obtención de esta composición.

10 La presente invención es asimismo relativa a un equipo que comprende uno o varios frasco(s) con dicha composición o los elementos de dicha composición y un medio de inseminación (sonda) adecuado para efectuar la inseminación artificial de una cerda mediante esta composición.

## 15 Técnica anterior y estado de la técnica base de la invención

La tecnología de inseminación artificial se utiliza para la inseminación de varias especies domésticas desde hace numerosos años.

20 Para la inseminación artificial porcina, la mayoría de las hembras criadas son llevadas en "bandadas" a fin de agrupar las intervenciones y concentrarlas para reducir el tiempo de observación y de operación sobre los animales. Fisiológicamente, el destete de los lechones genera un reinicio del ciclo de la cerda, que vuelve a estar en celo en una media de cinco días después del destete. Es suficiente por lo tanto destetar juntos los lechones, generalmente los miércoles y los jueves, para que el 10% de las cerdas empiecen su celo el domingo, el 50% el lunes, el 30% el martes y el último 10% el resto de la semana. La duración media del periodo de celo se extiende de 24 a 72 horas.

25 Los celos de las primeras cerdas se manifiestan en general durante más tiempo. Durante estas manifestaciones, el criador puede inseminar, según sus hábitos, cada 12 o 24 horas con numerosos periodos de tiempos variables.

A fin de cubrir las hembras, los criadores utilizan de media, por ciclo, 2,6 dosis que contienen cada una 2,2 mil millones de espermatozoides. Para reducir el número de intervenciones, y asegurar al mismo tiempo una buena disponibilidad del espermatozoide en el tracto genital de la hembra, tienen que ser aplicados unos medios para obtener una inseminación de larga duración.

30 El concepto de encapsulación del esperma con liberación diferida en el tiempo se ha descrito en la patente EP 0 922 451 y se basa en la utilización de cápsulas que comprenden un núcleo líquido que contiene una suspensión de material seminal de cerdo, así como un polímero biodegradable y/o biocompatible, estando el conjunto recubierto de una película que consiste en un alginato y un metal bi o trivalente, eventualmente reticulado. Habitualmente, la película de alginato de metales bivalentes se selecciona de entre el alginato de calcio, de estroncio, y de zinc. Los alginatos de metales trivalentes se seleccionan preferentemente de entre los de aluminio, de hierro y de cromo.

40 Un gran número de polisacáridos tales como el alginato, los quitosanos, las pectinas, los carragenanos, los xantanos, tienen la particularidad de formar unos hidrogeles de manera espontánea por modificación física o química, por ejemplo por una modificación del pH, de la temperatura o por adición de un contraión adecuado. El alginato de sodio es, por ejemplo, un polisacárido polianiónico natural de la pared celular de alga marrón (tal como el *Macrocystis pyrifera*, el *Laminaria digitata*, el *Ascophyllum nodosum*) que representa hasta el 40% del peso seco del alga.

50 El alginato está constituido de una mezcla de ácido manurónico y de ácido gulurónico que es soluble en agua, pero forma un gel en presencia de cationes di- o trivalentes. Unos compuestos como EDTA tienen como acción captar también estos iones y desestructurar los geles obtenidos.

55 El esperma porcino es muy sensible al estrés inducido por un choque térmico brusco, así como por una variación de presión osmótica o de pH, y su motilidad se encuentra rápidamente alterada por unas variaciones del medio. Esta alteración se manifestará por una evolución hacia la apoptosis de los espermatozoides, que sigue el fenómeno de capacitación. Este fenómeno se visualiza por la aparición de aglutinatos, la última fase antes de la muerte de las células.

## Objetivos de la invención

60 La presente invención tiene como objetivo proporcionar una nueva composición que comprenda un material seminal porcino destinado a una inseminación artificial de las cerdas y que no presente los inconvenientes del estado de la técnica.

65 La presente invención tiene asimismo como objetivo proporcionar un procedimiento de obtención de tal composición, así como un equipo que comprenda uno o varios frasco(s) que contienen dicha composición o que contienen los elementos de dicha composición, y un medio de inseminación (sonda) a las cerdas de esta composición.

Un objetivo particular de la presente invención pretende proporcionar una composición tal caracterizada por una toxicidad reducida o estrés reducido) frente a espermatozoides presentes en un material seminal (encapsulado y/o libre), permitiendo al mismo tiempo una administración eficaz y prolongada de dichos espermatozoides a una cerda.

5

Elementos característicos de la invención

Un primer objeto de la invención se refiere a una composición de material seminal porcino destinado a la inseminación artificial de cerdas y que comprende unas cápsulas que incorporan el material seminal porcino, recubiertas de una película de alginato que no presenta los inconvenientes del estado de la técnica.

10

En la composición de la invención, la concentración en espermatozoides del material seminal porcino presente en las cápsulas está comprendida entre 900 millones y 2000 millones de espermatozoides por mililitro.

15

Además, la composición del material seminal porcino de la invención puede comprender una fracción libre de material seminal porcino, es decir una fracción libre de material seminal porcino no presente en unas cápsulas y que no está recubierto de una película de alginato (de un ión bi o trivalente). En este caso, la concentración de espermatozoides presentes en la fracción libre del material seminal porcino comprende entre 25 millones y 35 millones de espermatozoides por mililitro.

20

Esto significa que la composición de la invención comprende entre 1 y 3 mil millones (preferentemente entre 1,5 y 2,5 mil millones) de espermatozoides encapsulados y/o entre 1 y 2,5 mil millones (preferentemente entre 1,5 y 2 mil millones) de espermatozoides libres, es decir unos espermatozoides no encapsulados.

25

Preferentemente, en la composición de la invención, el ión seleccionado es el bario, pero puede ser también otro ión metálico, preferentemente bivalente, tal como calcio u otro ión alcalinotérreo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de la composición de la invención que comprende esencialmente las etapas siguientes:

30

- un material seminal porcino recogido y sometido a una o varias etapas de extracción de más del 50%, preferentemente de más del 65%, aún más preferentemente de más del 75% del plasma seminal presente inicialmente en este material seminal porcino y de recogida del material seminal porcino enriquecido en espermatozoides tras esta extracción,

35

- dicho material seminal porcino es después enriquecido con espermatozoides y adicionado con del 2% al 8% de un ión bi o trivalente, preferentemente de bario, se pone en suspensión y se añade, gota a gota, a una solución de alginato de un ión metálico monovalente, preferentemente de sodio para formar unas cápsulas que recubren dicho material seminal enriquecido con espermatozoides,

40

- dichas cápsulas obtenidas son después recogidas (para formar una fracción encapsulada de material seminal porcino) y son preferentemente mezcladas con una fracción libre de material seminal porcino.

45

En el procedimiento de la invención, las etapas de extracción del plasma seminal porcino comprende(n) o consiste(n) en una o varias etapa(s) de centrifugación del material seminal porcino seguida(s) de una o varias etapa(s) de eliminación del plasma seminal presente en el sobrenadante del medio sometido a la centrifugación y de recogida del material seminal porcino enriquecido en espermatozoides.

50

Otro objeto de la invención se refiere a un equipo de inseminación que comprende uno o varios frasco(s) que contienen la composición o los elementos de la composición de material seminal porcino según la invención, en particular las fracciones libres y/o las fracciones encapsuladas, así como un medio de inseminación capaz de efectuar la inseminación artificial de una cerda por esta composición y opcionalmente un frasco que contiene un diluyente de esta composición, en particular un diluyente de la fracción libre de material seminal porcino, tal como el producto Gedil®.

55

Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto de manera inesperada que la encapsulación de un material seminal porcino, tal como se describe en la patente EP 0 922 451, inducía a una "toxicidad" (o un "estrés") para los espermatozoides porcinos presentes en las cápsulas obtenidas o los espermatozoides libres (no encapsulados), pero puestos en contacto con estas cápsulas.

60

En particular, los inventores han descubierto de manera inesperada que al menos dos productos presentes en estas cápsulas son susceptibles de generar esta "toxicidad" (o "estrés") que afectan a las propiedades de los espermatozoides porcinos. Los inventores han demostrado por primera vez, que una solución de bario, en particular los iones de bario presentes en esta solución, así como del alginato de sodio o del alginato polimerizado presentes

65

en estas cápsulas alteran las propiedades esenciales (tal como la motilidad) de los espermatozoides porcinos.

5 Estos efectos perjudiciales sobre los espermatozoides porcinos se demuestran en las tablas 1 y 2, que presentan el resultado de un ensayo de "toxicidad" (o "estrés") obtenido por adición de cloruro de bario ( $BaCl_2$  al 5 o al 10%) sobre un semen libre y muestra después de dos días una reducción significativa de la motilidad de los espermatozoides. Para obtener una fertilización eficaz, más del 50% de los espermatozoides deben ser "móviles" (es decir, presentar una velocidad de desplazamiento individual superior a 20 micrómetros por segundo).

10 Tabla 1: Efecto del cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) al 5 o al 10% sobre la motilidad de los espermatozoides presentes en el semen libre. Los dos valores (X-Y) mencionados en esta tabla son el resultado de dos mediciones:

El primer valor (X) de cada 100 significa que X espermatozoides de cada 100 presentan una motilidad superior a 20 micrómetros por segundo (X espermatozoides denominados "móviles").

15 El segundo valor (Y) de cada 100 significa que Y de estos mismos 100 espermatozoides tienen una misma velocidad de desplazamiento superior o igual a 80 micrómetros por segundo (Y espermatozoides denominados "progresivos")

MUESTRAS	5 % $BaCl_2$	10 % $BaCl_2$
Verraco 1 CG0533	68-19	58-12
Verraco 2 CG6558	45-20	29-07
Verraco 3 Lwc Derby	40-10	24-05
Verraco 4 DB2125	69-30	40-15
Verraco 5 PF2182	50-26	48-28

20 Tabla 2: Efecto del cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) al 2% sobre la motilidad de los espermatozoides presentes en el semen libre

MUESTRAS	CONTROL GEDIL		GEDIL + 2 % $BaCl_2$	
	D+1	D+3	D+1	D+3
Verraco 1	53-23	51-19	54-29	45-23
Verraco 2	85-34	87-42	82-46	78-50
Verraco 3	85-38	82-43	83-54	80-40
Verraco 4	86-27	84-25	84-46	79-45
Verraco 5	80-20	77-24	77-34	73-22
Verraco 6	75-19	72-23	57-28	60-23
Verraco 7	79-33	84-34	79-45	84-45
Verraco 8	75-23	75-48	70-45	73-52
Verraco 9	68-11	60-11	63-17	64-17
Verraco 10	80-41	77-43	No interpretable	60-34

25 La tabla 3 muestra el efecto del número de cápsulas (bolas) que tienen un tamaño comprendido entre 50  $\mu m$  y 8 mm, sobre la motilidad de los espermatozoides después de 1 y 3 días. El Gedil® es un diluyente constituido de un medio biológico favorable a la conservación de los espermatozoides. Los inventores han diluido también los espermatozoides en otros medios diferentes del Gedil® y han observado también una "toxicidad" (o un "estrés") inducido por la adición de  $BaCl_2$ .

30 Tabla 3: Efecto del número de bolas (cápsulas) sobre el semen libre:

MUESTRAS	CONTROL GEDIL	GEDIL + 4 bolas por tubos		GEDIL + 20 bolas por tubo	
		D+1	D+3	D+1	D+3
Verraco 1	73-15	69-26	66-09	51-16	51-05
Verraco 2	81-45	77-52	73-13	50-26	58-10
Verraco 3	82-39	75-49	71-15	47-20	60-11
Verraco 4	85-41	82-36	83-18	41-07	51-08
Verraco 5	57-18	64-30	69-10	55-17	57-05
Verraco 6	67-25	70-33	80-17	55-12	57-05
Verraco 7	86-36	86-37	82-12	51-12	69-09
Verraco 8	78-41	85-49	87-14	56-31	60-13
Verraco 9	72-15	61-15	70-08	49-18	62-09

MUESTRAS	CONTROL GEDIL	GEDIL + 4 bolas por tubos		GEDIL + 20 bolas por tubo	
Verraco 10	78-41	66-37	74-07	68-23	59-03

Observación: la motilidad de los espermatozoides se ve afectada: los movimientos obtenidos son fluidos con la adición de 4 bolas (cápsulas) y los movimientos son bruscos con la adición de 20 bolas (cápsulas). Los inventores han diluido también los espermatozoides en otros medios distintos del Gedil® y han observado también una toxicidad proporcional al número de bolas (cápsulas) añadidas.

A fin de recudir los efectos nocivos de estos productos (tóxicos), los inventores han obtenido una reducción de la proporción global de estos elementos tóxicos en la composición de la invención, realizando una concentración del líquido seminal porcino y de los espermatozoides presentes en estas cápsulas. Esta operación se obtiene retirando una importante proporción del plasma seminal presente en este material seminal porcino a encapsular. De este modo, la concentración de los espermatozoides porcinos en las cápsulas aumenta de manera significativa, lo que lleva a reducir la cantidad de estas cápsulas y de los elementos (tóxicos) procedentes de estas cápsulas en la composición final obtenida, compuesta de espermatozoides encapsulados y de espermatozoides libres (es decir de espermatozoides no encapsulados), y eventualmente de diluyente.

La presente invención se describirá en detalle en los ejemplos siguientes presentados a título de ilustración no limitativa de la invención.

Ejemplo1:

Un semen porcino se recoge y lleva al laboratorio a una temperatura del orden de 33°C a 35°C. Se mide por su concentración, su volumen y su color, y después se introduce en una centrifugadora que gira a aproximadamente 800 g, durante un tiempo de aproximadamente 10 minutos. Mediante esta centrifugación, aproximadamente los 2/3 del sobrenadante (que contienen plasma seminal) se retiran y se miden en cuanto a su concentración por sustracción a fin de conocer la cantidad de espermatozoides restantes, el 1/3 del volumen conservado, que contiene lo esencial de los espermatozoides, está destinado a ser encapsulado.

La concentración en espermatozoides dentro del material seminal destinada a ser encapsulada puede también realizarse mediante otras técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, tales como una sedimentación (por ejemplo en el momento de un cambio de temperatura de aproximadamente 17°C) o por una filtración sobre membrana (por ejemplo una membrana de aproximadamente 0,1 µm) a fin de eliminar o reducir una importante proporción (es decir más del 50%, preferentemente más del 65%, aún más preferentemente más del 75% o más del 85%) del plasma seminal.

Esta fracción se mezcla previamente con una solución de bario (adición de una solución (acuosa) saturada de cloruro de bario -215 g de cloruro de bario en polvo por litro- a fin de obtener una concentración final en iones de bario de 25 mmoles/l), después se inyecta gota a gota en una solución de alginato de sodio en agitación (alginato de sodio en solución; del 0,01% al 1% en peso por volumen). Se pueden inyectar así aproximadamente 500 ml de esperma adicionado de cloruro de bario en un baño de 20 litros de alginato de sodio.

Las cápsulas (bolas) se forman instantáneamente en contacto con la periferia de la gota y se espesan durante varias decenas de minutos. El material espermático encapsulado en la película (gel) de alginato de sodio, y que comprende más de 900 millones de espermatozoides por mililitro, es después separado por simple filtración. Después del lavado, las cápsulas (bolas) son recuperadas en una cesta de separación, y después se cuantifican en volumen. Después, se mezclan con una fracción de material seminal libre diluido (que comprende aproximadamente 33 millones de espermatozoides por mililitro). Esta mezcla de una fracción libre combinada con una fracción encapsulada permite fecundar una cerda, si la ovulación de la cerda tiene lugar dentro de pocas horas después, y permite también obtener la fecundación durante un periodo más largo gracias a la liberación pospuesta de los espermatozoides encapsulados más tarde. La composición obtenida se inyecta después en una sonda, cuyos orificios de entrada y de salida se han adaptado para el paso de las cápsulas (diámetro de 0,8 cm aproximadamente).

Esta "fracción encapsulada" representa un volumen de cápsulas que contienen aproximadamente de 1,5 a aproximadamente 2,5 mil millones de espermatozoides.

Alternativamente, la fracción encapsulada, que representa un volumen de bolas de cápsulas que contienen desde aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mil millones de espermatozoides se mezcla con la fracción libre, diluida y que contiene entre aproximadamente 1,5 mil millones y aproximadamente 2,5 mil millones de espermatozoides presentes en un diluyente adecuado. Estas 2 fracciones son globalmente mezcladas bajo agitación.

La ovulación se ha introducido por destete sin adición de hormonas. La detección de celo en las cerdas se mide dos veces por día a partir del 3<sup>er</sup> día después del destete. La inseminación se lleva a cabo después de la detección de la

ovulación. Un eventual estado de gestación se mide por ecografía y se mide el conjunto de los datos. En general, los inventores constatan un aumento del número de gestaciones en las cerdas fecundadas por la composición de la invención (en la que los espermatozoides se han concentrado antes de la encapsulación) con respecto a las cerdas fecundadas por una composición sin concentración, para un mismo número de espermatozoides (tanto libres como encapsulados).

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición de material seminal porcino destinado a la inseminación artificial de las cerdas y que comprende unas cápsulas que incorporan un material seminal porcino, recubierto con una película de alginato de un ión bi o trivalente, caracterizada por que la concentración en espermatozoides del material seminal porcino presente en las cápsulas está comprendida entre 900 millones y 2000 millones de espermatozoides por mililitros.
- 10 2. La composición de material seminal porcino según la reivindicación 1, que comprende además una fracción libre de material seminal porcino.
3. La composición según la reivindicación 2, caracterizada por que la concentración de espermatozoides presentes en la fracción libre del material seminal porcino comprende entre 25 millones y 35 millones de espermatozoides por mililitro.
- 15 4. La composición según las reivindicaciones 2 o 3, que comprende:
- entre 1 y 3 mil millones de espermatozoides encapsulados, y
  - entre 1 y 2,5 mil millones de espermatozoides libres (no encapsulados).
- 20 5. La composición según la reivindicación 4, que comprende entre 1,5 y 2,5 mil millones de espermatozoides encapsulados y entre 1,5 y 2 mil millones de espermatozoides libres (no encapsulados).
- 25 6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho ión bivalente se selecciona de entre el grupo que consiste en iones  $Ba^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ .
7. Un procedimiento de obtención de la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas siguientes:
- 30 - un material seminal porcino recogido y sometido a una o varias etapas de extracción de más del 50% del plasma seminal presente en este material seminal porcino,
- dicho material seminal porcino enriquecido en espermatozoides y adicionado del 2% al 8% de un ión bi o trivalente, puesto en suspensión en un diluyente apropiado y añadido, gota a gota, a una solución de alginato de sodio para formar unas cápsulas que recubren dicho material seminal enriquecido en espermatozoides,
- 35 - las cápsulas obtenidas son después recogidas, y
- las cápsulas recogidas son opcionalmente mezcladas con una fracción libre de material seminal porcino.
- 40 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que un material seminal porcino recogido se somete a una o varias etapas de extracción de más del 75% del plasma seminal presente en este material seminal porcino.
- 45 9. El procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que las etapas de extracción del plasma seminal porcino comprenden una o varias etapas de centrifugación del material seminal porcino seguidas de eliminación del plasma seminal presente en el sobrenadante obtenido y de recogida del material seminal porcino enriquecido con espermatozoides.
- 50 10. Un equipo de inseminación que comprende uno o varios frascos que contienen la composición o los elementos de la composición de material seminal porcino según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, un medio de inseminación capaz de efectuar la inseminación artificial de una cerda por esta composición.
- 55 11. El equipo según la reivindicación 10 que comprende además un frasco que contiene un diluyente de la composición.