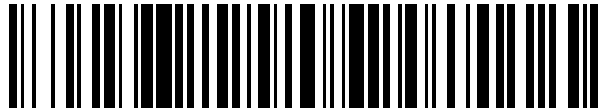


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 873**

21 Número de solicitud: 201830239

51 Int. Cl.:

A61K 35/54 (2015.01)
G01N 27/00 (2006.01)
A61B 5/05 (2006.01)
C12N 5/075 (2010.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.09.2019

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
EDIFICIO RECTOR SOLER, PLANTA 1, CAMPUS
UNIVERSITARIO DE ESPINARDO
30100 ESPINARDO (Murcia) ES

72 Inventor/es:

GARCIA VAZQUEZ, Francisco Alberto;
JIMENEZ MOVILLA, Maria y
CABALLERO SASTRE, Maria

74 Agente/Representante:

DIAZ PACHECO, Maria Desamparados

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE OVOCITOS Y/O EMBRIONES MAGNÉTICOS MEDIANTE NANOPARTÍCULAS PARA TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y USO EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE OVOCITOS Y/O EMBRIONES NO HUMANOS PREPARADOS CON DICHO PROCEDIMIENTO**

57 Resumen:

Procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos mediante nanopartículas para técnicas de reproducción asistida y al uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos preparados con dicho procedimiento, comprendiendo dicho procedimiento: una etapa donde se conjugan nanopartículas magnéticas con proteína oviductina recombinante OVGP1r; una etapa en que se comprueba que la conjugación nanopartículas-OVGP1r se une a la ZP de ovocitos/embriones tras su incubación conjunta; y una etapa en que se comprueba el número de ovocitos/embriones que tienen unidas nanopartículas distribuidas alrededor de la ZP sin ser endocitadas, y se evalúa si la cantidad de las nanopartículas magnéticas unidas a la ZP de ovocitos/embriones son suficientes para que sean atraídos por un campo magnético.

ES 2 724 873 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE OVOCITOS Y/O EMBRIONES MAGNÉTICOS
MEDIANTE NANOPARTÍCULAS PARA TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y USO
5 EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE OVOCITOS Y/O EMBRIONES NO
HUMANOS PREPARADOS CON DICHO PROCEDIMIENTO

OBJETO DE LA INVENCION

10 La invención, tal como expresa el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere a
un procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos mediante
nanopartículas para técnicas de reproducción asistida y al uso en técnicas de reproducción
asistida de ovocitos y/o embriones no humanos preparados con dicho procedimiento, todo lo
cual supone una destacable novedad en el estado actual de la técnica dentro de su campo de
15 aplicación.

Más en particular, el objeto de la invención se centra, por una parte, en un procedimiento para
la magnetización de ovocitos y/o embriones basado en la utilización de nanopartículas
magnéticas y una tecnología de unión proteica entre las nanopartículas y la parte externa de
20 los ovocitos/embriones, denominada zona pelúcida (ZP), ya que dicha magnetización de
ovocitos/embriones puede llegar a ser una propiedad muy útil en el uso de tales
ovocitos/embriones en las diferentes técnicas de reproducción asistida en las diferentes
especies animales.

25 Esencialmente, el proceso comprende una primera etapa en la que se conjugan las
nanopartículas magnéticas con la proteína recombinante del fluido oviductal, oviductina
(OVGP1r); una segunda etapa en la que dicha conjugación de nanopartículas-OVGP1r, a su
vez, se une a la ZP de ovocitos/embriones mediante su incubación conjunta o co-incubación;
y una tercera etapa en la que, mediante un campo magnético se evalúa que la cantidad de
30 nanopartículas magnéticas unidas a la ZP de ovocitos/embriones sea suficiente para que sean
atraídas por un campo magnético.

Asimismo, un segundo aspecto de la invención se refiere al uso concreto en técnicas de
reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos preparados con dicho

procedimiento.

CAMPO DE APLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

- 5 El campo de aplicación de la presente invención se enmarca dentro del sector de la bioquímica y en el de la nano-biotecnología o nano-medicina, abarcando más concretamente el ámbito de las técnicas de reproducción asistida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10

El uso de nanopartículas magnéticas está muy extendido hoy en día en el campo de la biotecnología y la biomedicina ya que supone un procedimiento no invasivo para diagnóstico y terapia de algunas enfermedades, tales como el cáncer, el Alzheimer o en el trasplante de células madre en enfermedades como el infarto de miocardio. En la rama de la reproducción asistida, estas nanopartículas magnéticas se utilizan actualmente en células espermáticas, por un lado, para la detección de espermatozoides dañados al conjugar dichas nanopartículas con diferentes anticuerpos y lectinas que se unen a dichos gametos, y por otro lado para su uso en la transgénesis mediada por espermatozoides.

15

20

Sin embargo, la presente invención trata del uso de nanopartículas magnéticas en ovocitos y/o embriones a través de una novedosa tecnología de unión proteica entre las nanopartículas conjugadas con la proteína recombinante OVGP1r y la parte externa de los ovocitos/embriones, denominada zona pelúcida (ZP), lo que hace que dicha unión sea muy específica. De manera natural, la proteína OVGP1 presente en el fluido oviductal se une a la ZP de ovocitos y embriones.

25

Como referencia al estado actual de la técnica, cabe señalar que, se conocen patentes y documentos relacionados con el objeto de la presente invención, siendo los más relevantes los siguientes:

30

El documento EP2237039A1, que hace referencia a una micropartícula codificada de un material biocompatible para etiquetar y/o rastrear un ovocito o un embrión aislado. Dicha micropartícula se fija a la ZP de la célula y puede ser rastreada, mediante microscopía óptica, por su forma externa la cual constituye un código de identificación particular.

El documento US2016091410A1, que divulga un método para procesar espermatozoides animales para mejorar su motilidad, viabilidad y fertilidad que comprende composiciones con partículas magnéticas.

5

El documento "*Barcode tagging of human oocytes and embryos to prevent mix-ups in assisted reproduction technologies*" publicado en 2014 por Novo Sergi; Nogues Carme; Penon Oriol; Barrios Leonardo; Santalo Josep; Gomez-Martinez Rodrigo; Esteve Jaume; Errachid Abdelhamid; Antonio Plaza Jose; Perez-Garcia Lluisa; Ibanez Elena, que describe la aplicación en las tecnologías de reproducción asistida de ovocitos y embriones humanos etiquetados en la zona pelúcida con códigos de barras de polisilicio biofuncionales.

10

El documento "*Direct embryo tagging and identification system by attachment of biofunctionalized polysilicon barcodes to the zona pellucida of mouse embryos*", publicado en 2013 por Novo Sergi; Penon Oriol; Barrios Leonardo; Nogues Carme; Santalo Josep; Duran Sara; Gomez-Matinez Rodrigo; Samitier Josep; Antonio Plaza Jose; Perez-Garcia Luisa; Ibanez Elena, que describe un sistema directo de etiquetado e identificación de embriones mediante el acoplamiento de códigos de barras de polisilicio biofuncionales a la zona pelúcida de embriones de ratón.

20

El documento "*Biomolecule screening for efficient attachment of biofunctionalized microparticles to the zona pellucida of mammalian oocytes and embryos*", publicado en 2013 por Novo S; Ibañez E; Barrios L; Castell O; Nogues C, que describe la selección de biomoléculas para la fijación eficiente de micropartículas biofuncionales a la ZP de ovocitos y embriones de mamíferos. El etiquetado individual de ovocitos y embriones mediante la fijación de códigos de barras de polisilicio a la ZP es una técnica que se aplica en la reproducción asistida humana y en los programas de producción animal. Para proporcionar códigos de barras con la capacidad de fijarse a la ZP, éstos deben ser sometidos primero a un proceso de biofuncionalización mediante su conjugación a una biomolécula capaz de fijarse a la ZP de ovocitos y embriones. Las biomoléculas analizadas son un anticuerpo anti-ZP2, las dos lectinas de germen de trigo aglutinina (WGA) y fitohemaglutinina-I.

25

30

El documento "*Bioluminescent magnetic nanoparticles as potential imaging agents for mammalian spermatozoa*", publicado en 2016 por Vasquez E S; Feugang J M; Willard S T;

Ryan P L; Walters K B, que describe nanopartículas magnéticas bioluminiscentes como potenciales agentes para la bioimagen de espermatozoides de mamíferos. Los compuestos bioluminiscentes que comprenden nanopartículas magnéticas y la luciferase de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) son analizados como potenciales agentes emisores de luz para la
5 proyección de imagen, detección y seguimiento de los espermatozoides de mamíferos.

El documento "*Lectin-Functionalized Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Reproductive Improvement*", publicado en 2015 por Feugang J M; Shengfa F L; Crenshaw M A; Clemente H; Willard S T; Ryan P L, describe la utilización de nanopartículas magnéticas de óxido de
10 hierro biofuncionalizadas mediante lectinas como una nueva estrategia de purificación y selección de células espermáticas para incrementar la fertilidad del semen en métodos de reproducción asistida.

El documento "The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pellucida and modifies
15 fertility parameters", publicado en 2016 por Algarra B; Han L; Soriano-Ubeda C; Aviles M; Coy P; Jovine L; Jimenez-Movilla M. analiza la función de la región C-terminal de la proteína OVGP1 ('Oviduct-specific glycoprotein 1') en el proceso de unión de OVGP1 a la zona extracelular pelúcida del ovocito y en la actividad de la proteína durante la fecundación.

20 No obstante, no se observa que ninguna de las patentes o documentos anteriores, tomadas por separado o en combinación, describa la presente invención, según se reivindica.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

25 El procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos mediante nanopartículas para técnicas de reproducción asistida y al uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos preparados con dicho procedimiento que la invención propone se configuran, pues, como destacable novedad dentro de su campo de aplicación, estando los detalles caracterizadores que los distinguen convenientemente
30 recogidos en las reivindicaciones finales que acompañan a la presente descripción.

Como se ha apuntado anteriormente, lo que la invención propone es un procedimiento para la magnetización de ovocitos y/o embriones de las diferentes especies animales basado en la utilización de nanopartículas magnéticas conjugadas con proteína OVGP1 presente en el

fluido oviductal y en este caso expresada de manera recombinante (OVGP1r) que presenta afinidad por la parte externa de los ovocitos/embriones, denominada zona pelúcida (ZP), lo cual proporciona una propiedad muy útil en el manejo de tales ovocitos/embriones en las diferentes técnicas de reproducción asistida.

5

De manera concreta, el procedimiento que la invención propone comprende, al menos, las siguientes etapas:

10 - Una primera etapa en que se conjugan (proceso de unión) las nanopartículas magnéticas con la proteína recombinante oviductina (OVGP1r). Dicha proteína se utiliza por su capacidad de interactuar con la matriz extracelular, ZP, del ovocito/embrión de manera natural cuando se produce el tránsito de los ovocitos y embriones por el oviducto.

15 Concretamente, se utiliza una proteína recombinante OVGP1r truncada, es decir, que carece de la región D del extremo C-terminal, región responsable de la endocitosis de esta proteína, ya que esta forma truncada de OVGP1r se une mejor a la zona externa de la ZP del ovocito/embrión que la proteína completa y además no es endocitada.

20 A través de diferentes experimentos, se comprueba que dicha conjugación (unión entre las nanopartículas y la proteína OVGP1r) es una unión fuerte y estable en el tiempo.

- Una segunda etapa en que se comprueba si dicha conjugación nanopartículas-OVGP1r, a su vez, se une a la ZP de ovocitos/embriones tras su incubación conjunta.

25 Para ello, se co-incuban los ovocitos/embriones con las nanopartículas-OVGP1r a diferentes concentraciones a lo largo del tiempo (hasta 24 h de co-incubación).

30 - Y, una vez transcurrido el tiempo correspondiente de co-incubación, una tercera etapa en que, tras comprobar el número de ovocitos/embriones que tienen unidas las nanopartículas y que éstas se encuentran distribuidas, de manera más o menos homogénea, alrededor de la ZP sin ser endocitadas, se evalúa si la cantidad de las nanopartículas magnéticas unidas a la ZP de ovocitos/embriones son suficientes para que dichos ovocitos/embriones sean atraídos por un campo magnético.

Para ello, se utiliza un dispositivo magnético donde se comprueba que, aproximadamente, el 80% de ovocitos/embriones con las nanopartículas adheridas sean atraídos por el campo magnético.

- 5 Cabe mencionar que, preferentemente, el diámetro de las nanopartículas está comprendido entre 1 y 500 nanómetros y que, también de modo preferido, la temperatura de conjugación entre las nanopartículas y la OVGP1r se encuentra comprendida entre los 4°C y los 38°C.

10 En cualquier caso, esta capacidad magnética supone un gran avance en la manipulación de ovocitos y embriones, ya sea para su desplazamiento hacia lugares específicos a través de la aplicación de un campo magnético móvil o para mantenerlos inmóviles mediante un campo magnético fijo. El uso de esta tecnología es de gran interés en técnicas de reproducción asistida en las diferentes especies animales. Una de las grandes limitaciones en las técnicas de reproducción consiste en el propio manejo y manipulación de ovocitos y embriones, ya que
15 requieren unas condiciones de máximo control para preservar su calidad fecundante en el caso del ovocito o de desarrollo en el caso del embrión. Procesos como la maduración *in vitro* de ovocitos, inseminación artificial, fecundación *in vitro*, cultivo y desarrollo embrionario o vitrificación requieren la manipulación de los ovocitos y embriones, tanto para desplazarlos y proporcionar las modificaciones de medios y reactivos o para inmovilizarlos en soportes que
20 permitan su traslado. Por otro lado, la determinación de la mejor calidad embrionaria para la elección del embrión que va a ser implantado requiere la observación de su desarrollo durante varias horas mediante técnicas de visualización (*time-lapse*) donde la inmovilización del embrión es fundamental para su enfoque durante largo tiempo. Por último, la naturaleza magnética de las partículas adheridas a la ZP podría utilizarse para la localización del embrión
25 en el tracto genital de la hembra mediante resonancia magnética u otras técnicas de diagnóstico por imagen.

Es importante destacar el hecho diferenciador de la técnica de adhesión de las nanopartículas a los ovocitos y embriones. A diferencia de metodologías utilizadas en el marcaje de ovocitos
30 en la que se usa como elemento de unión una lectina (proteínas exógenas provenientes de plantas) o anticuerpo, en este caso usamos una proteína recombinante endógena propia de la especie y que se encuentra en condiciones naturales unida a la parte externa de ovocitos y embriones *in vivo*. El hecho de que sea una proteína recombinante hace que la metodología sea fácilmente trasladable a cualquier especie, ya que solo se tendría que usar la proteína

recombinante OVGP1r propia de la especie. Por otro lado, este mismo hecho, hace que esta proteína se pueda generar fácilmente unida a proteínas fluorescente lo que permitirá su fácil detección.

5 Por todo ello, un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de ovocitos y/o embriones magnéticos no humanos, preparados según el procedimiento descrito anteriormente, en técnicas de reproducción asistida en las diferentes especies animales, como son la manipulación de gametos o maduración *in vitro* de ovocitos, inseminación artificial, fecundación *in vitro* en tratamientos de fertilidad, vitrificación o cultivo, seguimiento y
10 desarrollo embrionario, por la capacidad magnética que adquieren los ovocitos y/o embriones con dicho procedimiento, permite su desplazamiento hacia lugares específicos a través de la aplicación de un campo magnético móvil o para mantenerlos inmóviles mediante un campo magnético fijo, su inmovilización para su visualización mediante técnicas de microscopía e imagen (*time-lapse*), por la capacidad de retención del campo magnético de los ovocitos y/o
15 embriones magnetizados, así como su detección, seguimiento y visualización a través del tracto genital femenino mediante resonancia magnética, por la naturaleza férrica y magnética de las nanopartículas.

Visto lo que antecede, se constata que el procedimiento de preparación de ovocitos y/o
20 embriones magnéticos mediante nanopartículas para técnicas de reproducción asistida y al uso de dichos ovocitos y/o embriones no humanos en técnicas de reproducción asistida representan una innovación de características desconocidas hasta ahora para el fin a que se destina, razones que unidas a su utilidad práctica, la dotan de fundamento suficiente para obtener el privilegio de exclusividad que se solicita.

25

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A continuación, se describen ejemplos concretos del procedimiento de la invención aplicados en ovocitos porcinos.

30

- Conjugación de la OVGP1r con las nanopartículas magnéticas (MNPs):

En este experimento se utilizó un modelo de MNPs *Small Carboxyl-Modified Paramagnetic Microspheres* (-COOH) (Estapor®). Estas MNPs férricas presentan una alta capacidad

magnética, con un diámetro de 0.365 μm y una concentración de 1 mg/ml. Para su manejo se utilizó un rack magnético (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

Para la conjugación de la OVG1r con las MNPs se utilizaron 10 μl (1 mg MNPs/ml) de MNPs.

5 Primero, las MNPs se lavaron dos veces en 500 μl de agua milli-Q y se resuspendieron en 240 μl de buffer de activación (Fosfato Sódico 100 mM, pH 6.2), 30 μl de buffer de conjugación 1-(3-dimetilaminopropil)-3-ethylcarbodiimide HCl o EDC (50 mg/ml diluidos en agua) y 30 μl de buffer de conjugación Sulfo NHS (50 mg/ml diluidos en agua). A continuación, se mantuvieron 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las MNPs
10 se lavaron dos veces en 500 μl de buffer de acoplamiento (Bicarbonato Sódico 0.1 M, pH 8) y se incubaron con 15 μl (correspondiente a 6 μg) de OVG1r (0.4 mg/ml) en 300 μl de buffer de acoplamiento (Bicarbonato Sódico 0.1 M, pH 8) durante toda la noche a 4°C o a temperatura ambiente durante 2 horas.

15 Al día siguiente (o pasadas las 2 horas) las MNPs se lavaron dos veces en PBS (buffer de fosfato sódico 20 mM). Todos los experimentos se realizaron con una batería de buffers para mejorar las condiciones de conjugación y almacenaje del complejo MNPs-OVG1r.

- Electroforesis y Western Blot:

20

Con el fin de verificar que la conjugación de la OVG1r con las MNPs se había llevado a cabo con éxito, se realizaron una electroforesis y un Western Blot.

Primero, las MNPs se incubaron con el buffer de carga 10 minutos a 100°C. A continuación,
25 se realizó la electroforesis a 400 miliamperios y 200 voltios durante 40 minutos. Se utilizó un gel comercial de acrilamida-bisacrilamida polimerizado: el gel Novex™ WedgeWell™ 4-20% Tris-glicina 1.0 mm x 100 Well (Invitrogen™).

Tras la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de
30 polivinilidenedifluoride (PVDF) con un tamaño de poro de 0.45 μm (Millipore Corporation, Bedford) previamente tratada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo en XCell II™ Blot Module (Invitrogen™) a 30 voltios y 400 miliamperios durante 1 h y 6 minutos.

Una vez la transferencia hubo terminado, la membrana se lavó tres veces con TBS-T (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl y 0.1% de Tween 20). Posteriormente, la membrana se bloqueó con TBS-T con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) al 1% durante 1 hora en agitación lenta a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche. Después, la membrana se lavó con TBS-T tres veces durante 10 minutos cada lavado y se incubó con el anticuerpo anti-conejo-HRP (Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 1:40.000 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con TBS-T y se reveló usando el reactivo Pierce ECL-Plus (Thermo Scientific). Para detectar la proteína, se utilizó el analizador de imagen ImageQuant™ LAS 500®.

- Obtención y maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos:

Los ovocitos usados se obtuvieron de cerdas pre-púberes provenientes de matadero. Los ovarios se transportaron al laboratorio en una solución salina estéril a 38.5°C dentro de la primera hora desde el sacrificio de los animales. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron con hexadeciltrimetilamonio de bromidio (CTAB) y solución salina a 38.5°C.

Para la obtención de ovocitos, se aspiraron folículos con un tamaño de entre 3 y 6 mm utilizando jeringas de 10 ml y agujas estériles de 18x40 mm. El fluido folicular se depositó en tubos cónicos de 15 ml colocados en una placa térmica a 38.5°C.

Pasados 5 min, se retiró el sobrenadante, se lavó el pellet con PBS a 38.5°C y se depositó en una placa Petri. La selección de los complejos cúmulo-ovocitos (COCs) se realizó mediante aspiración, usando un estereoscopio (Motic SMZ-168) y una pipeta Pasteur de cristal alargada por calor y conectada a una cánula de silicona. Se seleccionaron los ovocitos con un citoplasma homogéneo y por lo menos tres capas de células del cúmulo.

Los COCs seleccionados se lavaron dos veces en PBS templado antes de pasarlos al medio de cultivo NCSU-37, previamente equilibrado a 38.5°C en el incubador con un 5% de CO₂ y una atmósfera saturada de humedad durante al menos 3 horas. Los COCs se cultivaron en grupos de 50-55 en un volumen de medio de cultivo de 0.5 ml. Las primeras 20-22 horas de cultivo, los COCs se cultivaron en presencia de gonadotropina sérica de yegua gestante

(PMSG), gonadotropina coriónica humana (HCG) y dibutilil cAMP. Pasadas estas horas iniciales, los COCs se transfirieron a un medio NCSU-37 sin hormonas, donde primero se lavaron una vez y luego se cultivaron durante otras 20-22 horas. Cuando finalizaron las 40-44 horas del cultivo de los COCs, se decumularon mecánicamente mediante pipeteo suave hasta que las células del cúmulo se separaron. A continuación, solo los ovocitos sin células del cúmulo se seleccionaron y se lavaron en medio Tyroide's albúmina-lactato-piruvato (TALP).

- Experimento 1. Conjugación de la OVGP1r con MNPs

En el primer experimento, las MNPs se conjugaron con OVGP1r durante 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche. Para el manejo de las MNPs, es importante mezclar bien el contenido mediante agitación.

A continuación, se cogieron 10 µl de MNPs y se mezclaron con 500 µl de agua milli-Q en un Eppendorf. Usando un rack magnético (GE Healthcare) se separaron las MNPs del medio. Tras la conjugación, el volumen total de MNPs conjugadas (MNPs-OVGP1r) era de 300 µl a una concentración final de 0.033 mg de MNPs/ml.

Una vez terminó la conjugación, se comprobó mediante electroforesis y Western Blot. Las fracciones analizadas fueron: (A) 25 µl de agua con 6 µg de OVGP1r, (B) 25 µl del medio que se recogió una vez realizada la conjugación (para evaluar la cantidad de proteína que no se había unido), (C1 y C2) 25 µl de los lavados que se realizaron tras la conjugación (para asegurar que la proteína no se estaba perdiendo en estos lavados) y (D) 25 µl del medio con la OVGP1r que se había unido a las MNPs. Se añadió el buffer de carga (8.33 µl) en cada fracción y se incubó 10 minutos a 100°C. Antes de cargar el gel de electroforesis se lavaron las fracciones con las nanopartículas de dos a cuatro veces para asegurar que el medio quedase limpio.

También se evaluó si la OVGP1r continuaba unida a las MNPs tras 72 horas almacenada a 4°C en tampón fosfato sódico (PBS) 20 mM.

- Experimento 2. Co-incubación de las MNPs OVGP1r con los ovocitos porcinos

Una vez las MNPs se conjugaron adecuadamente con la proteína OVGP1r, se procedió a la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

Los ovocitos fueron divididos en tres grupos e incubados de la siguiente manera:

- Grupo control: los ovocitos se incubaron con 20 μ l (concentración de 1.33 μ g MNPs/ml) de MNPs sin la OVGP1r conjugada.
- Grupo de 10 μ l: los ovocitos se incubaron con 10 μ l (0.67 μ g MNPs/ml) de MNPs-OVGP1r.
- 5 • Grupo de 20 μ l: se incubaron los ovocitos con 20 μ l de MNPs-OVGP1r.

Cada grupo se colocó en un pocillo con medio TALP y se guardó en el incubador a 38.5°C y un 5% de CO₂.

- 10 La unión entre los ovocitos y las MNPs se evaluó a diferentes tiempos: 0.5, 1, 6 y 24 h de co-incubación. Pasados estos tiempos, se separaron algunos ovocitos de cada grupo, se lavaron en medio TALP y se transfirieron a un pocillo con 0.5 ml de medio TALP.

- 15 A continuación, se sometieron a los ovocitos a un campo magnético con el fin de evaluar el número de ovocitos magnetizados. Para ello, se transfirieron los 0.5 ml de medio TALP con los ovocitos a un tubo Eppendorf que se colocó en un rack magnético. A continuación, se recogió el medio lentamente (con una micropipeta automática de 500 μ l) sin quitar el Eppendorf del rack magnético, y se volvió a colocar en el pocillo. Se contó y anotó el número de ovocitos que había en el pocillo ya que estos representan el número de ovocitos que no
- 20 habían sido retenidos por el imán. Por último, se retiró el imán y se volvió a pasar el medio TALP (con los ovocitos) por el tubo Eppendorf para recuperar los ovocitos que se habían unido en presencia del imán (referido como el porcentaje de ovocitos magnetizados).

- 25 Descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, así como la manera de ponerla en práctica, no se considera necesario hacer más extensa su explicación para que cualquier experto en la materia comprenda su alcance y las ventajas que de ella se derivan, haciéndose constar que, dentro de su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, y a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba siempre que no se altere, cambie o
- 30 modifique su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos mediante nanopartículas para técnicas de reproducción asistida en diferentes especies animales, está
5 **caracterizado** por comprender las siguientes etapas:
- Una primera etapa en que se conjugan, mediante proceso de unión, nanopartículas magnéticas con proteína oviductina (OVGP1); concretamente, con una proteína recombinante
10 OVGP1r.
 - Una segunda etapa en que, tras su incubación conjunta, se comprueba que la conjugación nanopartículas-OVGP1r, a su vez, se une a la ZP de ovocitos/embriones.
 - Y, una vez transcurrido el tiempo de co-incubación, una tercera etapa en que se comprueba
15 el número de los ovocitos/embriones que tienen unidas las nanopartículas y que éstas se encuentran distribuidas, de manera más o menos homogénea, alrededor de la ZP sin ser endocitadas, y que la cantidad las nanopartículas magnéticas unidas a la ZP de ovocitos/embriones son suficientes para que los ovocitos/embriones sean atraídos por un campo magnético.
20
- 2.- Procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque, para comprobar que la conjugación nanopartículas-OVGP1r se une a la ZP de ovocitos/embriones, se co-incuban los ovocitos/embriones con las nanopartículas-OVGP1r a diferentes concentraciones a lo largo de un tiempo de hasta 24
25 horas de co-incubación.
- 3.- Procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** porque, para evaluar si la cantidad de nanopartículas magnéticas unidas a la ZP de ovocitos/embriones son suficientes para que los
30 ovocitos/embriones sean atraídos, éstas se someten a un campo magnético.
- 4.- Procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la cantidad de nanopartículas magnéticas unidas a la ZP de ovocitos/embriones es suficiente para que los ovocitos/embriones sean atraídos cuando

el 80% de ovocitos/embriones con las nanopartículas adheridas son atraídos por el campo magnético.

5.- Procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el diámetro de las nanopartículas está comprendido entre 1 y 500 nanómetros.

6.- Procedimiento de preparación de ovocitos y/o embriones magnéticos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque la temperatura de conjugación entre las nanopartículas y la OVGP1r se comprende entre 4°C y 38°C.

7.- Uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos preparados con un procedimiento como el descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8.- Uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos, según la reivindicación 7, **caracterizado** por comprender la manipulación de gametos.

9.- Uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos, según la reivindicación 7, **caracterizado** por comprender la maduración *in vitro* de ovocitos,

10.- Uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos, según la reivindicación 7, **caracterizado** por comprender la inseminación artificial.

11.- Uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos, según la reivindicación 7, **caracterizado** por comprender la fecundación *in vitro* en tratamientos de fertilidad, vitrificación o cultivo.

12.- Uso en técnicas de reproducción asistida de ovocitos y/o embriones no humanos, según la reivindicación 7, **caracterizado** por comprender el seguimiento y desarrollo embrionario.



- ②① N.º solicitud: 201830239
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.03.2018
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	NOVO S <i>et al.</i> Biomolecule screening for efficient attachment of biofunctionalized microparticles to the zona pellucida of mammalian oocytes and embryos. Biomedical Microdevices October 2013 Springer New York usa. , 30/09/2013, Vol. 15, Páginas 801 - 809, ISSN 1387-2176 (print) ISSN 1572-8781 (electronic), <DOI: doi:10.1007/s10544-013-9766-8> páginas 48-50 y 53.	1-12
A	US 2016091410 A1 (KRUG KRISTIE) 31/03/2016, Párrafos [0011], [0039], [0041], [0042], [0185], reivindicación 1.	1-12
A	ALGARRA B <i>et al.</i> The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pellucida and modifies fertility parameters. Scientific Reports SEP 7 2016. , 31/08/2016, Vol. 6, Páginas Article No.: 32556, ISSN 2045-2322(print) ISSN 2045-2322(electronic), <DOI: doi: 10.1038/srep32556>. Página 3, último párrafo; página 5, último párrafo.	1-12
A	EP 2237039 A1 (UNIV BARCELONA AUTONOMA <i>et al.</i>) 06/10/2010, párrafos [0008], [0009], [0011], [0053], figura 19.	1-12
A	JEAN M FEUGANG <i>et al.</i> Lectin-Functionalized Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Reproductive Improvement. Journal of Fertilization : <i>In Vitro</i> , IVF-Worldwide Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology, 2015, Vol. 3, Páginas 1-5 Recuperado de Internet <URL: http://dx.doi.org/10.4172/2375-4508.1000145 >, ISSN 2375-4508, <DOI: doi.org/10.4172/2375-4508.1000145> páginas 2 y 3.	1-12

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
11.10.2018

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K35/54 (2015.01)

G01N27/00 (2006.01)

A61B5/05 (2006.01)

C12N5/075 (2010.01)

G01N33/48 (2006.01)

G01N15/10 (2006.01)

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

A61K, A61B, C12N, G01N

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, EMBASE, NPL, BIOSIS, MEDLINE, INTERNET