



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 186 560**

② Número de solicitud: 200101809

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 9/42

G01N 21/64

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **01.08.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2003**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2003

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE ALICANTE**
Crta. San Vicente del Raspeig s/n Otri
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES

⑦ Inventor/es: **Tikhonov, Vladimir;**
López Llorca, Luis Vicente;
Salinas Calvete, Jesús y
Monfort Prieto, Elena

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método para la determinación de la actividad quitinasa basado en la utilización de sustratos fluorescentes.**

⑤ Resumen:

Método para la determinación de la actividad quitinasa basado en la utilización de sustratos fluorescentes.

El método comprende incubar una muestra de una enzima con actividad quitinasa, o de una preparación que contiene dicha enzima con actividad quitinasa, en presencia de un sustrato apropiado para dicha enzima, estando dicho sustrato marcado con un fluorocromo, bajo condiciones en las que se forman los productos de la reacción catalizada por dicha actividad quitinasa, y medir la emisión de fluorescencia.

ES 2 186 560 A1

DESCRIPCION

Método para la determinación de la actividad quitinasa basado en la utilización de sustratos fluorescentes.

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para determinar la actividad quitinasa basado en el empleo de sustratos fluorescentes, que comprende incubar una enzima con dicha actividad enzimática en presencia de un sustrato marcado con fluorocromo y medir la emisión de fluorescencia.

Antecedentes de la invención

La quitina (homopolisacárido constituido por residuos de (1 → 4)-β-N-acetil-D-glucosamina) es el polímero biológico más abundante de la biosfera después de la celulosa (Cohen-Kuplec, R. & Chet, I. 1998. *Current Opinion in Biotechnology*, **9**, 270-277). Forma parte del exo-esqueleto de invertebrados acuáticos (crustáceos) y terrestres (insectos y nematodos, fundamentalmente) (Muzzarelli, R. 1977. *Chitin*. Oxford: Pergamon Press). También forma parte, junto con otros biopolímeros, de la pared celular de las hifas de muchos hongos (Bartnicki-García, S. 1968. *Ann Rev Microbiol*, **22**, 87-108.), entre ellos los que forman setas.

La quitinasa [EC 3.2.1.14] es una enzima que degrada la quitina y polímeros relacionados con la quitina, por ejemplo, quitosano (homopolisacárido constituido por residuos de (1 → 4)-β-D-glucosamina). Las actividades quitinasas tienen gran importancia para los seres vivos, puesto que de ellas depende el crecimiento de los hongos (Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. 1998. *Microbiology* **144**: 2647-2654) y su autólisis. Las actividades quitinasas (en sentido amplio) también están implicadas en el micoparasitismo (Lorito, M., Woo, S.L., García-Fernández, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzum, S., & Scala, F. (1998). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**, 7860-7865; Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M., and Kubicek, C. P. 1999. *Fung. Genet. Biol.* **26**: 131 -140) y en la actividad de bacterias entomopatógenas (Sampson, M.N. & Gooday, G.W. 1999. *Microbiology*, **144**, 2189-2194), hongos entomopatógenos (St-Leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo-N.W.; Roberts, D.W. 1996. *Applied and Environmental Microbiology*. **62** (3) 907-912; Pinto, A. S., Barreto, C. C., Schrank, A., Ulhoa, C. J., and Vainstein, M. H. 1997. *Can. J. Microbiol.* **43**: 322-327; Kang, S. C., Park, S., and Lee, D. G. 1999. *J. Invertebr. Pathol.* **73**: 276-281) y nematófagos (Dackman, C., Chet, I., and Nordbring-Hertz, B. 1989. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**: 201-208; Tikhonov, V.E.; Lopez-Llorca, L.V.; Salinas, J.; Jansson, H.B. 2002. *Fungal Genetics and Biology* **35**, 67-78.) contra sus huéspedes. Por todo ello, parece que juegan un papel importante en el control biológico de enfermedades y plagas y vegetales. Entre los organismos productores de quitinasas se encuentran no solo microorganismos, tales como algunas bacterias (Ilyina, A.V., Tatarinova, Yu. N., Tikhonov, V. E., and Var-

lamov V. P. 2000. *Appl. Biochem. Microbiol.* **36**: 146-149) y hongos (véanse las referencias anteriores), sino, además, se conocen plantas que producen quitinasas (Cohen-Kuplec, R. & Chet, I. 1998. *Current Opinion in Biotechnology*, **9**, 270-277), implicadas en su respuesta a patógenos. Las quitinasas se consideran proteínas PR (del inglés, pathogenesis-related) y se han encontrado en multitud de interacciones entre plantas y distintos patógenos (Agríos, G.N. 1997. *Plant Pathology*. San Diego, California: Academic Press. 104-113.). Además de ello, la acción catalítica de las quitinasas origina oligosacáridos que activan defensas de plantas frente a patógenos.

Hasta la fecha, los métodos más utilizados para detectar la actividad quitinolíticas de una quitinasa se basan en la valoración colorimétrica de los monosacáridos obtenidos de la actividad de las quitinasas frente a su sustrato (Reissig, J.L.; Strominger, J.L.; Leloir, L.F. 1955. *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966.). Estos métodos son lentos y poco sensibles. Por este motivo se han desarrollado métodos de medida más sensibles basados en quitina marcada radiactivamente (Molano, J., Durán, A., & Cabib, E. 1977. *Analytical Biochemistry*, **83**, 648-656.), en sustratos cromogénicos (Aribisala, O.A. & Gooday, G.W. 1978. *Biochemical Society transactions* **6**, 568-569; Appel, M.; Ries-G-F-De-W; Hofmeyr, J.H.S.; Bellstedt, D.U. 1995. *Journal of Phytopathology* (Berlin) **143** (9), 525-529) o fluorescentes (Cottaz, S.; Brasme, B.; Driguez, H. 2000. *Eur. J. Biochem.* **267**(17), 593-600; Hodge, A., Alexander, I.J., & Gooday, G.W. 1995. *Mycol Res.* **99**, 935-941; Omero, C.; Horwitz, B.A.; Chet, I. 2001 *Journal of Microbiological Methods* **43**, 165-169). Estos métodos requieren sustratos específicos cuya síntesis es compleja o, en el caso de los métodos radiactivos, se requieren instalaciones especiales y el sustrato se degrada con el tiempo.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un método para la determinación de actividad quitinasa que supere la totalidad o parte de los problemas previamente mencionados.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de desarrollar un método para determinar la actividad quitinasa en una preparación que contiene una enzima con actividad quitinasa.

La solución proporcionada por esta invención se basa en el empleo de un sustrato fluorescente y comprende incubar una enzima con actividad quitinasa, o una preparación que contiene dicha enzima, en presencia de un sustrato apropiado, tal como quitina o un polímero relacionado con la quitina, marcado con un fluorocromo, y medir la fluorescencia.

Un método para la determinación de actividad quitinasa como el proporcionado por esta invención presenta, entre otras, las ventajas de su elevada sensibilidad, muy superior a la de otros métodos convencionales [véase el Ejemplo 3].

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para determinar la actividad quitinasa basado en el empleo de sustratos fluorescentes, en adelante método de la invención. que comprende incubar una muestra de una enzima con actividad qui-

tinasa, o de una preparación que contiene dicha enzima con actividad quitinasa, en presencia de un sustrato apropiado para dicha enzima, estando dicho sustrato marcado con un fluorocromo, bajo condiciones en las que se forman los productos de la reacción catalizada por dicha actividad quitinasa, y medir la emisión de fluorescencia.

La enzima con actividad quitinasa puede proceder de cualquier origen, tanto natural (animal, vegetal, fúngico o bacteriano) como sintético o recombinante. Para la realización del método de la invención la enzima puede utilizarse purificada o sin purificar. La preparación que contiene la enzima con actividad quitinasa puede contener, además, de dicha enzima otros componentes y/o actividades enzimáticas.

El sustrato de la enzima con actividad quitinasa a utilizar en el método de la invención puede ser quitina, o un polímero relacionado con la quitina, marcado con un fluorocromo. En el sentido utilizado en esta descripción, el término polímero relacionado con la quitina incluye a cualquier compuesto que contiene residuos de N-acetil-D-glucosamina o de D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ por ejemplo, quitosano.

Como fluorocromo puede utilizarse cualquier colorante fluorescente, por ejemplo, fluoresceína, eosina, naranja de acridina, etc.

En una realización particular, el sustrato de la enzima con actividad quitinasa se selecciona entre quitina y quitosano marcados con fluoresceína.

El sustrato fluorescente a utilizar en el método de la invención puede obtenerse haciendo reaccionar un sustrato de la enzima con actividad quitinasa con un reactivo que aporte un grupo fluorescente a dicho sustrato. En el Ejemplo 1 se describe la obtención de quitina y quitosano fluorescentes.

La reacción catalizada por la enzima con actividad quitinasa rinde productos de degradación del sustrato, tales como oligosacáridos que contienen residuos de N-acetil-D-glucosamina o de D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$.

El conjunto de la mezcla de reacción, que comprende la enzima con actividad quitinasa y el sustrato marcado con el fluorocromo, se incuba bajo condiciones en las que se lleva a cabo la reacción enzimática y se forman los productos de la reacción. En general, la incubación se puede realizar a una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C, preferentemente a 37°C ya que dicha temperatura corresponde a la temperatura óptima de la enzima, durante un período de tiempo comprendido entre 30 y 60 minutos, para una cantidad de enzima en el bioensayo comprendida entre 0,2 y 1 μg . En una realización particular, las condiciones de reacción comprenden incubar la mezcla de reacción con agitación, a 37°C durante 1 hora, a pH ligeramente ácido. Finalizada la reacción, por ejemplo, mediante la adición de un reactivo que pare la reacción, tal como una base, se retira el precipitado (que comprende el sustrato fluorescente que no ha sido hidrolizado por la quitinasa) por métodos convencionales, por ejemplo, por centrifugación, y se mide la emisión de fluorescencia en el sobrenadante. En una rea-

lización particular, cuando el fluorocromo es la fluoresceína, la emisión de fluorescencia se mide a 525 nm [Ejemplo 2].

La eficacia y reproducibilidad del método de la invención se ha comparado con la de otros métodos convencionales para determinar actividad quitinasa, resultando que el método de la invención es más sensible que cualquiera de los otros métodos convencionales ensayados [véase el Ejemplo 3]. Los resultados obtenidos permiten afirmar que el método de la invención es un método fiable y sensible para medir la actividad quitinasa, además, de rápido y sencillo.

El método de la invención puede ser utilizado para determinar actividad quitinasa en cualquier preparación que contenga una enzima con dicha actividad.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Preparación de sustratos fluorescentes

1.1 Preparación de FITC-Quitosano

Se suspendieron 1,5 g de quitosano (Sigma) en 25 ml de 1% (v/v) ácido acético y se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 25 ml de metanol. A continuación, a la suspensión de quitosano resultante se añadió una disolución recién preparada de 65 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) en 25 ml de metanol. La mezcla se agitó durante 12 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 7.800 g durante 20 minutos. Se añadieron 35 ml de Na_2CO_3 al 10% en agua al sobrenadante obtenido para conseguir un pH básico y precipitar el FITC-Quitosano. El precipitado de FITC-Quitosano se filtró y lavó primero con tampón TrisHCl 0,05 M (pH 8,5) y luego con agua. El FITC-Quitosano se disolvió en 100 ml de ácido acético al 0,5% (v/v) y se liofilizó. Rendimiento: 0,57 g.

El FITC-Quitosano se conservó a temperatura ambiente en oscuridad. El grado de sustitución se calculó a partir de la absorbancia del FITC-Quitosano en ácido acético al 0,5% (v/v) a 490 nm. El Coeficiente de Extinción se tomó como 12.200 L/Mxcm. El grado estimado de sustitución fue de 2,3 mol%.

Para preparar al sustrato FITC-Quitosano para su empleo en un ensayo basado en el método de la invención, se resuspendieron 6 mg de FITC-Quitosano en 1,5 ml de 1% (v/v) ácido acético, se mezcló y se incubó a 4°C de 2 a 4 h en oscuridad. La mezcla se diluyó 1/10 en agua destilada (se tomaron 100 μl de la solución anterior y se añadieron 900 μl de agua destilada), con lo que se obtuvo una concentración de FITC-Quitosano de 0,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

1.2 Preparación de FITC-Quitina

Se siguió el protocolo descrito previamente en el Ejemplo 1.1 pero reemplazando el quitosano por la quitina. En este caso, después de la reacción de la quitina con el FITC y la centrifugación, la suspensión de FITC-Quitina resultante se enfrió a 5°C se mezcló con 5 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se incubó a 5°C durante 1 h. El gel obtenido se disgregó y se ta-

mizó por tamices de 1,0, 0,2 y 0,1 mm de tamaño de malla. Las partículas tamizadas de FITC-Quitina se lavaron con tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) y con agua y se ajustó la concentración final de FITC-Quitina a 1,4 mg.ml⁻¹. El sustrato se conservó en 0,05% de NaN₃ a 6°C en oscuridad. El grado de sustitución de la FITC-Quitina fue similar al del FITC-Quitosano.

Ejemplo 2

Ensayo de actividad quitinasa utilizando los sustratos fluorescentes

2.1 Ensayo de actividad quitinasa utilizando FITC-Quitosano

Un ensayo típico consiste en mezclar 50 µl de FITC-Quitosano (0,4 mg.ml⁻¹) con 300 µl de tampón acetato 1M pH 4,7, añadir el volumen de muestra (enzima o preparación que contiene la enzima con actividad quitinasa a determinar), completar hasta 1 ml con agua destilada e incubar durante 1 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se detiene la reacción añadiendo 50 µl de NaOH 10 M. A continuación, se agita y centrifuga durante 15 minutos a 14.200 g, se toman 25 µl del sobrenadante y se añaden 2 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 8,5.

En un espectrofluorímetro (Perkin-Elmer 650-10S) se ajusta la longitud de onda de excitación a 490 nm y se mide la emisión de fluorescencia a 525 nm.

2.2 Ensayo de actividad quitinasa utilizando FITC-Quitina

Un ensayo típico consiste en mezclar 50 µl de FITC-Quitina (1,4 mg.ml⁻¹) con 900 µl de tampón acetato 1M pH 4,7, añadir el volumen de muestra (enzima o preparación que contiene la enzima con actividad quitinasa a determinar), completar hasta 1 ml con agua destilada e incubar durante 1 h a 37°C. A continuación, se agita y centrifuga durante 10 minutos a 14.200 g, se toman 50 µl del sobrenadante y se añaden 2 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 8,5.

En un espectrofluorímetro (Perkin-Elmer 650-10S) se ajusta la longitud de onda de excitación a 490 nm y se mide la emisión de fluorescencia a 525 nm.

Ejemplo 3

Ensayos comparativos de determinación de actividad quitinasa

Se realizó este ejemplo para comparar la eficacia y reproducibilidad del método de la invención frente a la de otros métodos pertenecientes al estado de la técnica. Para ello, se ensayó la actividad quitinolítica de la quitinasa CHI43, purificada del hongo nematófago *Verticillium suchlasporium* (Tikhonov, V.E.; Lopez-Llorca, L.V.; Salinas, J.; Jansson, H.B.2002. *Fungal Genetics and Biology* 35, 67-78) frente a 3 sustratos: FITC-Quitina (método de la invención), carboximetilquitina-Remazol Violeta Brillante 5R (método CM-Quitina-RBV) y quitina coloidal (método NAGA).

3.1 Métodos

3.1.1 Método de la invención (ensayo utilizando FITC-Quitina)

Para la realización de este ensayo se siguió el protocolo descrito en el Ejemplo 2.2.

3.1.2 Método CM-Quitina-RBV

Este método se basa en la utilización de carboximetilquitina-Remazol Violeta Brillante 5R (CM-Quitina-RBV) (Loewe Biochemica G.m.b.H., Otterfing, Germany) como sustrato en un ensayo colorimétrico. Un ensayo típico consiste en mezclar 100 µl de CM-Quitina-RBV (2 mg.ml⁻¹) con 10 µl de NaN₃ (5 mg.ml⁻¹), añadir el volumen de muestra (100 µl normalmente) para determinar su actividad quitinasa, completar hasta 1 ml con tampón Tris-HCl 0,15 M, e incubar durante 1 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detiene añadiendo 10 µl de HCl. Seguidamente se agita y centrifuga durante 10 minutos a 14.200 g, se toman el sobrenadante y se mide la Absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro.

3.1.3 Método NAGA

Este método se basa en la estimación de la actividad quitinolítica de la quitinasa por la liberación de azúcares reductores a partir de quitina coloidal. Un ensayo típico consiste en mezclar 200 µl de quitina coloidal con 200 µl de tampón acetato sódico 1M (pH 4,7), añadir el volumen de muestra (100 µl normalmente) para determinar su actividad quitinasa, completar hasta 1 ml con agua destilada e incubar durante 1 ó 24 h a 37°C. A continuación, se agita y centrifuga durante 5 minutos a 12.225 g a 6°C, se toma una alícuota de 500 µl del sobrenadante y se mezcla con 165 µl de ácido dinitrosalicílico al 1% en NaOH 0,7 M y 65 µl de NaOH 10 M en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, se calienta a 100°C durante 5 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y, se mide la Absorbancia de la mezcla de reacción a 582 nm (A₅₈₂).

3.2 Resultados

Utilizando los protocolos estándar previamente descritos (apartado 3.1), se realizaron ensayos para determinar la actividad quitinolítica de la quitinasa CHI43 con cantidades crecientes de dicha enzima (0,2-3 µg). Los resultados de tres réplicas (excepto para 2 y 3 µg, una réplica) se muestran en la Tabla 1, donde puede observarse que utilizando la misma cantidad de enzima purificada (1 µg), de los tres métodos ensayados, el método NAGA es el menos sensible ya que requirió un período de incubación de 24 h para detectar actividad quitinolítica (A₅₈₂) en 500 µl de muestra (0.085 ± 0.005 UA, Unidades de Absorbancia), mientras que, al contrario, los otros 2 métodos ofrecieron medidas de actividad después de tan sólo 1 h de incubación (Tabla 1). El método CM-Quitina-RBV detectó una medida de absorbancia (A₄₉₀) de 0,154 ± 0,006 UA en 1.000 µl de muestra, mientras que con sólo 50 µl de muestra la FITC-Quitina obtuvo una emisión de

fluorescencia a 525 nm de $48,6 \pm 11,8$ UF (Unidades de Fluorescencia). Por el contrario la enzima inactivada térmicamente (100 C, 10 min) no mostró actividad alguna. Por tanto, sin otras consideraciones, el método de la invención es, al menos, 20 veces más sensible que el método CM-Quitina-RBV (atendiendo a la cantidad de muestra a utilizar) y ya que este último utiliza tres veces más sustrato que el método de la invención, éste sería, al menos, 60 veces más sensible que aquél. Los resultados obtenidos indican, además, que a la concentración de sustrato (FITC-Quitina) utilizada, existe una alta correlación ($r=0,997$) entre las cantidades (0,2 a 3 μg) de enzima (CHI43) y emisión de fluorescencia a 525 nm.

TABLA 1

Comparación del método de la invención (FITC-Quitina) con otros dos métodos de ensayo de actividad quitinolítica (CM-Quitina-RBV y NAGA)

CHI43 (μg)	Métodos utilizados		
	FITC	RBV	NAGA
0,2	9,3 \pm 2,5	0,061 \pm 0,013	nd
1	48,6 \pm 11,8	0,154 \pm 0,006	0
2	124	nd	nd
3	186	nd	nd

nd= no determinado

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad quitinasa, que comprende incubar una muestra de una enzima con actividad quitinasa, o de una preparación que contiene dicha enzima con actividad quitinasa, en presencia de un sustrato apropiado para dicha enzima, estando dicho sustrato marcado con un fluorocromo, bajo condiciones en las que se forman los productos de la reacción catalizada por dicha actividad quitinasa, y medir la emisión de fluorescencia.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato se selecciona entre quitina y un compuesto que contiene residuos de N-acetil-D-glucosamina o de D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$, marcado con un fluorocromo.

3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho compuesto que contiene residuos de N-acetil-D-glucosamina o de D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ es quitosano.

4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho fluorocromo es un colorante fluorescente.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho colorante fluorescente se selecciona entre fluoresceína, eosina y naranja de acridina.

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato marcado con un fluorocromo se se-

lecciona entre quitina y quitosano marcados con fluoresceína.

7. Método según la reivindicación 1, en el que la incubación de la muestra de enzima con actividad quitinasa, o de preparación que contiene dicha enzima con actividad quitinasa, en presencia de dicho sustrato marcado con un fluorocromo, se realiza a una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C , durante un período de tiempo comprendido entre 30 y 60 minutos, para una cantidad de enzima en el bioensayo comprendida entre 0,2 y 1 μg .

8. Método según la reivindicación 1, que comprende

- a) incubar una muestra de una enzima con actividad quitinasa, o de una preparación que contiene dicha enzima con actividad quitinasa, en presencia de un sustrato fluorescente seleccionado entre quitina y quitosano marcados con fluoresceína, a 37°C durante 1 hora, a pH ligeramente ácido;
- b) retirar, por centrifugación, el sustrato fluorescente que no ha sido hidrolizado por la quitinasa; y
- c) medir la emisión de fluorescencia a 525 nm en el sobrenadante.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 9/42, G01N 21/64

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HONDA, Y. et al.: "Chemo- and enzymatic synthesis of partially and fully N-deacetylated 4-methylumbelliferyl chitobiosides: fluorogenic substrates for chitinase", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, (2000), Vol. 10, páginas 827-829, todo el documento.	1,2,4
X	HONDA, Y. et al.: "Kinetic analysis of the reaction catalyzed by chitinase A1 from Bacillus circulans WL-12 toward the novel substrates, partially N-deacetylated 4-methylumbelliferyl chitobiosides", FEBS Lett., (2000), Vol. 476, páginas 194-197, todo el documento.	1,2,4
A	US 5587292 A (LAINE, R.A. et al.) 24.12.1996	

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 n.º:

Fecha de realización del informe

26.03.2003

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1