

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 172 363**

21 Número de solicitud: 009900697

51 Int. Cl.<sup>7</sup>: C30B 7/00

C30B 29/58

C30B 30/08

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **07.04.1999**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2002**

Fecha de concesión: **28.11.2003**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2004**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.01.2004**

73 Titular/es: **Consejo Superior De Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Garcia Ruiz, Juan Manuel y  
Otalora Muñoz, Fermin**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión.**

57 Resumen:

Dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión.

El dispositivo ha sido concebido para llevar a cabo procesos de cristalización macromolecular en los cuales de transferencia de materia se controla por difusión. La difusión tiene lugar junto con la cristalización en un dispositivo de geometría unidimensional (capilares). El dispositivo es una caja compuesta por un cuerpo de caja (2) y una tapa (3) ajustables. El cuerpo de caja (2) contiene una barra (4) en la que están perforados unos agujeros que sirven de guía para introducir capilares (5). En ellos se coloca la solución (8). En un volumen comprendido entre el fondo del cuerpo de la caja (2) y una altura determinable, se coloca un gel inerte (6) de forma que los extremos de los capilares (5) penetren en el interior de dicha capa de gel inerte entre dicha capa (6) y el extremo abierto de la caja se coloca un agente precipitante (7).

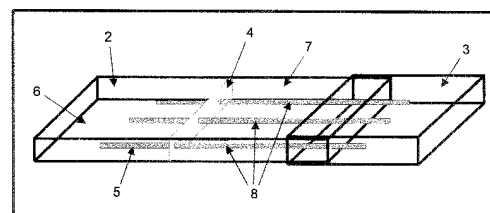


Figura 1

ES 2 172 363 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión.

### Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un dispositivo que permite el crecimiento de cristales en contradifusión. Mediante el dispositivo de la invención se facilita la obtención de cristales más perfectos que los obtenidos mediante otros procedimientos convencionales al optimizar automáticamente y en un solo experimento las condiciones de crecimiento de los cristales, lo cual es de gran interés para algunas aplicaciones, como por ejemplo la cristalización de macromoléculas biológicas y en particular proteínas.

### Estado de la técnica

La obtención de cristales de proteínas se lleva a cabo por diferentes métodos que pueden dividirse en dos grandes grupos. El primero de ellos agrupa a las técnicas en las que la cristalización tiene lugar en un pequeño volumen quasi-esférico y por tanto podemos llamarlas de geometría cero-dimensional. Entre ellas están las clásicas técnicas de gota colgante (hanging drop), gota sedente (sitting drop) y microdiálisis de botón. Por otra parte, existe otro grupo de técnicas donde la cristalización se lleva a cabo en espacios capilares alargados y constituyen el grupo que denominamos técnicas de geometría unidimensional. Entre estas últimas se encuentran las técnicas de diálisis de membrana, la difusión con interfase libre y la técnica de acupuntura en geles. En todas estas tres últimas técnicas, la cristalización se lleva a cabo en capilares, tubos u otros contenedores unidimensionales de diámetro interior menor de 1,2 mm. En estas técnicas de geometría longitudinal se pretende conseguir un cambio continuo en el espacio y en el tiempo de las condiciones de sobresaturación a lo largo del eje del reactor donde se lleva cabo el crecimiento de los cristales. Debido a la geometría y a las condiciones de transporte de masa, en este tipo de reactores se emplean las denominadas técnicas de contradifusión. En estas técnicas de contradifusión las disoluciones que van a reaccionar se colocan una frente a la otra bien en contacto directo o separadas mediante una membrana o por una cámara intermedia que actúa como buffer físico, es decir como una cámara que hace más lenta la cinética del proceso de transporte. Esta cámara puede llenarse con un buffer químico o con un líquido cualquiera, por ejemplo agua. Por definición, las técnicas de contradifusión requieren que se evite la convección en la zona de cristalización. Hay dos formas de reducir la convección: desarrollar los experimentos en condiciones de microgravedad en el espacio o bien llevarlos a cabo dentro de capilares. Por tanto se pueden utilizar técnicas de contradifusión en tierra mediante capilares (Zeppezauer, M, et al Arch. Biochem. Anal., 126, 564, (1968); Caspar et al., J. Mol Biol, 41 87, (1969)) o bien en microgravedad en el espacio (Chayen et al., Acta Cryst D52, 156, 1996; Sjolín et al., ESA Special Publications SP-1 132, 2, 92 (1992)) o en medios gelificados (García-Ruiz, 1985).

Los estudios clásicos con capilares se hicieron con el propósito de alcanzar la sobresaturación

crítica para la formación de núcleos de forma muy lenta buscando el menor número posible de eventos de nucleación, en el óptimo caso, un único evento de nucleación. El método de acupuntura en gel se basa en las propiedades de los geles que se usan para sujetar los capilares que contienen la solución de proteína sin gelificar así como un medio para la transferencia de materia del agente precipitante. El agente precipitante y la proteína se desplazan en contradifusión a través del gel poroso que sujeta los capilares. La solución de proteína se desplaza a menor velocidad debido a que la constante de difusión de las grandes macromoléculas es uno o dos órdenes de magnitud menor que las pequeñas moléculas que se utilizan como agente precipitante. Cuando entran en contacto va aumentando la sobresaturación de la proteína hasta que se provoca la formación de cristales.

Los experimentos de cristalización en el espacio (US-5641681) comparten con la técnica de crecimiento en geles la reducción de la convección provocada por flotación, la reducción de la concentración de impurezas en superficie cristalina y la eliminación de la sedimentación de cristales y la nucleación secundaria de agregados de proteínas. Además, la microgravedad elimina la necesidad de usar geles, con lo que se elimina la posible interacción química de estos con los reactivos incluyendo las propias proteínas.

Otros estudios más recientes (García-Ruiz et al. "Teaching protein crystallization by the gel acupuncture method"; Journal of Chem, Education 75, 442-446 (1998)) sin embargo han ensayado comenzar los experimentos de cristalización con condiciones lejanas al equilibrio buscando eventos múltiples de nucleación bajo condiciones que se acercan progresivamente al equilibrio. Estos experimentos se han desarrollado tanto por el método de acupuntura en gel (F Otálora et al., "Computer model of the diffusion/reaction interplay in the Gel Acupuncture Method", Journal of Crystal Growth 169, 361-367 (1996)) como en condiciones de microgravedad (García-Ruiz, J.M, et al "Crystal Growth Studies in microgravity with the APCF. II; Image Analysis Studies", Journal of Crystal Growth 182, 155-167 (1997)). Con este procedimiento, el sistema experimenta fenómenos de precipitación que tienen lugar a diferentes valores de sobresaturación. Los primeros eventos de nucleación tienen lugar en condiciones muy lejanas al equilibrio dando lugar a precipitación amorfa. Los siguientes eventos ocurrirán en condiciones más cercanas al equilibrio con precipitación policristalina. De esta forma y conforme avanza el proceso, el sistema se acerca lentamente al equilibrio dando lugar a cristales más escasos y de mayor calidad. Cada una de estas precipitaciones ocurre en diferentes localizaciones del capilar. Este procedimiento de cristalización ha sido probado recientemente en microgravedad en el vuelo STS-95 de la nave Discovery.

Este dispositivo presenta sin embargo el inconveniente de requerir una gran cantidad de volumen y de medios experimentales para la realización de experimentos en un único volumen unidimensional. Dados los problemas de espacio que se plantean en la realización de experimentos en

misiones espaciales, el desarrollo de un dispositivo alternativo que permita la realización de múltiples experimentos y además sea de bajo coste supone una importante ventaja.

#### Explicación de la invención

El objeto de la presente invención es un dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión que permite la realización de múltiples experimentos y además es de bajo coste, lo que constituye una importante ventaja para la realización de experimentos en misiones espaciales.

El dispositivo para el crecimiento de cristales objeto de la presente invención está constituido por una caja (1) que se compone de un cuerpo de caja (2) y una tapa (3) ajustables mediante un cierre a presión. El cuerpo de la caja (2) contiene en su interior una barra (4) que lo atraviesa transversalmente y en la están perforados unos agujeros que sirven de guía para introducir capilares (5) a través de ellos, de forma que en un determinado volumen comprendido entre el fondo del cuerpo de la caja (2) y una altura determinable libremente por el experimentador en función de las necesidades experimentales, se coloca un gel inerte (6), en el espacio que queda entre dicho gel inerte (6) y el extremo abierto del cuerpo de la caja (2) se coloca un agente precipitante para cristalización (7) y en los capilares (5) que se introducen en los orificios de la barra (4) se introduce la solución (8) que contiene el producto que se quiere cristalizar.

La caja y la barra (4) que la atraviesa transversalmente pueden ser de materiales poliméricos, cerámicos, metálicos, vidrio y en general de cualquier material que no interaccione con el compuesto a cristalizar. Los capilares (5) son de cualquier material que no interaccione con el compuesto a cristalizar y que permita el examen posterior de los mismos mediante rayos X. Cada dispositivo puede contener entre 1 y 50 capilares.

El gel inerte utilizado (6) puede ser agarosa y materiales derivados, gel de sílice poliácridamida y, en general, un agente químicamente inerte.

El agente precipitante es una sal inorgánica o polímero, siendo algunos de los más utilizados sulfato amónico, cloruro sódico y polietilenglicol.

La solución que contiene el producto que se quiere cristalizar está formada por un disolvente orgánico ó inorgánico apropiado para el compuesto que se quiere cristalizar.

El disolvente más utilizado es agua, agua con un tampón de pH ó agua con un producto tensioactivo y los compuestos a cristalizar de más interés mediante el dispositivo de la invención son macromoléculas biológicas.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión mediante el dispositivo indicado que comprende las siguientes etapas:

- a) rellenar un determinado volumen comprendido entre el fondo del cuerpo de la caja (2) y la barra perforada (4) con un gel inerte (6).
- b) Introducir los capilares (5) que contienen la solución (8) con el producto que se quiere cristalizar en los agujeros de la barra perforada

(4) de forma que los extremos de dichos capilares (5) penetren en la capa de gel inerte (6).

- c) En el espacio que queda entre el gel inerte (6) y el extremo abierto del cuerpo de la caja (2) colocar un agente precipitante (7) para cristalización en concentración suficiente para que se den condiciones de sobresaturación dentro de los capilares por difusión del agente precipitante (7) a través del gel inerte (6).
- d) A partir de ese momento se empieza a producir la difusión del agente precipitante (7) hacia el extremo abierto de los capilares (5), produciéndose el contacto entre el agente precipitante (7) y la solución (8) con el producto que se quiere cristalizar.
- e) Cristalización en el interior de los capilares (5) de forma que a medida que avanza el proceso se obtienen cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

El procedimiento puede llevarse a cabo en condiciones de gravedad normal o bien en microgravedad, como es el caso de las misiones espaciales. En este último caso puede acoplarse a la caja de cristalización un dispositivo mecánico con un pistón que permita una activación (esto es el paso c de la anterior enumeración) mecanizada del dispositivo.

Por último, constituye asimismo otro objeto de la presente invención la utilización de los dispositivos para el crecimiento de cristales en contradifusión para su integración en un bloque que agrupe varios de dichos dispositivos lo cual permita la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones. Dicho bloque puede incorporar opcionalmente un dispositivo mecánico provisto de un pistón que sirva para conseguir la activación mecanizada en los términos previamente expuestos permitiendo una adecuada difusión del agente precipitante (7) hacia el extremo abierto de los capilares (5).

#### Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es un dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión. Con este dispositivo se pretende conseguir cristales que sean adecuados a los requerimientos comerciales. El dispositivo ha sido concebido para llevar a cabo procesos de cristalización macromolecular en los cuales de transferencia de materia se controla por difusión. Para ello, la difusión tiene lugar junto con la cristalización en un dispositivo de geometría unidimensional (capilares), preferentemente en tubos que permiten el examen posterior con rayos X.

Un esquema del dispositivo de la invención se muestra en la figura 1 Como ya se ha indicado el dispositivo es una caja compuesta por un cuerpo de caja (2) y una tapa (3) ajustables mediante un cierre a presión. El cuerpo de caja (2) contiene en su interior una barra (4) que lo atraviesa transversalmente y en la que están perforados unos agujeros que sirven de guía para introducir capilares (5) a través de ellos. En esos capilares es en los

que se coloca la solución que contiene el producto que se quiere cristalizar (8). En un volumen comprendido entre el fondo del cuerpo de la caja (2) y una altura determinable libremente por el experimentador en función de las necesidades experimentales, se coloca un gel inerte (6) de forma que los extremos de los capilares (5) penetren en el interior de dicha capa de gel inerte. En el espacio que queda entre dicha capa de gel inerte (6) y el extremo abierto de la caja se coloca un agente precipitante (7) para la cristalización.

El proceso de difusión puede comenzar de inmediato o bien puede acoplarse a la caja un dispositivo mecánico de pistón que contenga el agente precipitante (7) y activar el proceso cuando se considere conveniente. El agente precipitante (7) y el producto a cristalizar (8) se desplazan en contradifusión a través del gel inerte (6). Debido a la mucha mayor velocidad de difusión de las moléculas del agente precipitante con respecto a las del producto a cristalizar (en general, macromoléculas), el agente precipitante llega al extremo abierto de los capilares antes que la macromolécula y comienza entonces a difundirse en los capilares, creando una serie de condiciones de sobresaturación que son cambiantes en el tiempo en cada punto a lo largo del capilar. En un momento determinado se alcanza el valor crítico para la nucleación y la macromolécula comienza a precipitar en los capilares. Las primeras nucleaciones tienen lugar en condiciones muy lejanas al equilibrio, dando lugar a precipitación amorfa. Posteriormente se dan precipitaciones policristalinas y conforme avanza el proceso en el tiempo y en el capilar, el sistema se va acercando lentamente al equilibrio dando lugar a cristales de mayor tamaño. Si se tienen unas condiciones óptimas de partida puede llegar a obtenerse un único cristal que ocupe todo el diámetro del capilar.

Las principales variables que afectan al proceso de cristalización son a) la longitud de penetración del capilar en el gel, b) la relación entre los coeficientes de difusión del agente precipitante y de la macromolécula, c) la concentración inicial del compuesto a cristalizar y d) la concentración inicial de agente precipitante. La longitud de penetración del capilar en el gel afecta fundamentalmente a la duración del proceso. Cuanto mayor sea la penetración el proceso será más largo. La concentración inicial del compuesto a cristalizar es una variable fundamental. Si se quiere obtener cristales de gran tamaño, que suele ser el objetivo para la realización de estudios estructurales posteriores, debe partirse de altas concentraciones de compuesto, lo cual resulta sorprendente si

se compara con los procedimientos convencionales de cristalización. Ello se debe a que el sistema inicialmente producirá precipitados amorfos, pero evolucionará posteriormente hacia condiciones óptimas, normalmente al cabo de días. Por último, la concentración de agente precipitante es igualmente importante. Concentraciones demasiado altas agotarían el compuesto a cristalizar en la fase de precipitación amorfa, mientras que concentraciones demasiado bajas darían lugar a una precipitación discontinua.

El dispositivo y el procedimiento de la invención pueden usarse para cristalizar diversos tipos de compuestos, pero especialmente macromoléculas biológicas y en particular proteínas. Se expone a continuación un ejemplo concreto de realización de la invención:

En una caja hecha de metacrilato de dimensiones 100 mm (largo) x 70 mm (ancho) x 8 mm (espesor) se introduce gel de sílice, obtenida a partir de silicato de sodio y ácido acético, hasta formar una capa de aproximadamente 30 mm en dicha caja. Se pincha en el gel 1 capilar de vidrio de diámetro inferior a 0,5 mm y que contiene una disolución de lisozima en agua a una concentración de 100 mg/ml en la capa de gel de sílice. La longitud de penetración es de aproximadamente 1 cm, tapándose el extremo que sobresale de los capilares que debe ser una longitud suficiente para posibilitar su manipulación posterior. A continuación se vierte encima de la capa de gel una disolución al 2% peso/volumen de cloruro sódico en agua.

A partir de ese momento comienza el proceso de difusión, que se manifiesta inicialmente por la formación de unas fases amorfas en la interfase entre el gel y la solución de proteína. Aproximadamente a las 10 horas de empezar la difusión se observa la aparición de microcristales en la parte inferior del capilar. A los dos días aparecen cristales de mayor tamaño en la parte central del capilar y al cabo de una semana se obtiene uno o dos cristales de gran tamaño que ocupan por completo el capilar.

La realización de procesos de cristalización mediante el dispositivo y el procedimiento de la invención en condiciones de microgravedad presenta la ventaja sobre los realizados en condiciones normales de gravedad de que para una misma longitud de capilar se pueden usar concentraciones más altas del compuesto a cristalizar, con lo que se pueden obtener cristales de mayor tamaño. Asimismo se reduce la convección por flotación y se reduce la concentración de impurezas en las superficies de los cristales.

## REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión constituido por una caja que se compone de un cuerpo de caja (2) y una tapa (3) ajustables mediante un cierre a presión, **caracterizado** porque el cuerpo de la caja (2) contiene en su interior una barra (4) que lo atraviesa transversalmente y en la que están perforados unos agujeros que sirven de guía para introducir capilares (5) a través de ellos, de forma que en un determinado volumen comprendido entre el fondo del cuerpo de la caja (2) y una altura a determinar por el experimentador según las necesidades experimentales, se coloca un gel inerte (6), en el espacio que queda entre dicho gel inerte (6) y el extremo abierto del cuerpo de la caja (2) se coloca un agente precipitante para cristalización (7), y en los capilares (5) que se introducen en los orificios de la barra (4) se introduce la solución (8) que contiene el producto que se quiere cristalizar.

2. Dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la caja y la barra (4) que la atraviesa están hechas de alguno de los siguientes materiales: poliméricos, cerámicos, metálicos, vidrio y en general cualquiera que no interaccione con el compuesto a cristalizar y permita observar los capilares que están en su interior.

3. Dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque los capilares (5) son de cualquier material que no interaccione con el compuesto a cristalizar y que permita el examen posterior de los mismos mediante rayos X y porque cada dispositivo contiene entre 1 y 50 capilares.

4. Dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 1-3, **caracterizado** porque se acopla a la caja de cristalización un dispositivo mecánico provisto de un pistón y que sirve para activar el vertido del agente precipitante y conseguir una adecuada difusión del mismo (7) hacia el extremo abierto de los capilares (5), en condiciones de microgravedad.

5. Procedimiento para crecimiento de cristales en contradifusión mediante un dispositivo según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) Rellenar un determinado volumen comprendido entre el fondo del cuerpo de la caja (2) y la barra perforada (4) con un gel inerte (6).
- b) Introducir los capilares (5) que contienen la solución (8) con el producto que se quiere cristalizar, en los agujeros de la barra perforada (4) de forma que los extremos de dichos capilares (5) penetren en la capa de gel inerte (6).
- c) En el espacio que queda entre el gel inerte (6) y el extremo abierto del cuerpo de la caja (2) colocar un agente precipitante (7) para cristalización en concentración suficiente para que se den condiciones de sobresaturación.

d) A partir de ese momento se empieza a producir la difusión del agente precipitante (7) hacia el extremo abierto de los capilares (5), produciéndose el contacto entre el agente precipitante (7) y la solución (8) con el producto que se quiere cristalizar.

e) Cristalización en el interior de los capilares (5) de forma que a medida que avanza el proceso se obtienen cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

6. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque todo el proceso se lleva a cabo en condiciones normales de gravedad.

7. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el contacto entre el agente precipitante (7) y la solución (8) con el producto que se quiere cristalizar y la consiguiente cristalización en el interior de los capilares (5) se lleva a cabo en condiciones de microgravedad.

8. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el gel inerte (6) es un agente químicamente inerte tal como agarosa y materiales derivados, gel de sílice o poliacrilamida, o cualquier medio poroso que sirva para evitar la convección.

9. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el agente precipitante (7) es en general cualquier compuesto que reduzca la solubilidad de la proteína.

10. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el agente precipitante (7) es una sal inorgánica, por ejemplo cloruro sódico o sulfato amónico.

11. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el agente precipitante (7) es un polímero o un alcohol, por ejemplo polietilenglicol.

12. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la solución (8) que contiene el producto que se quiere cristalizar esta formada por un disolvente orgánico o inorgánico.

13. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el disolvente utilizado para la solución (8) que contiene el producto que se quiere cristalizar es agua, agua con un tampón de pH o agua con un producto tensioactivo.

14. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el compuesto a cristalizar es una macromolécula biológica.

15. Utilización del dispositivo para el crecimiento de cristales en contradifusión según las reivindicaciones 1-4 para su integración en un bloque que agrupe varios de dichos dispositivos lo cual permita la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

16. Bloque integrado por dispositivos para el crecimiento de cristales en contradifusión según

las reivindicaciones 1-4 que permite la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

17. Bloque según la reivindicación 16 **caracterizado** porque incorpora un dispositivo mecá-

5

nico provisto de un pistón que sirve para activar el vertido del agente precipitante y conseguir una adecuada difusión del mismo (7) hacia el extremo abierto de los capilares.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

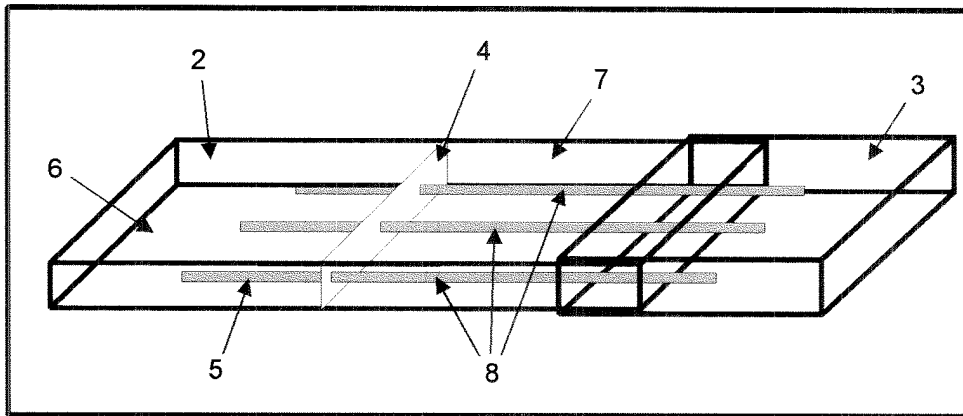


Figura 1



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C30B 7/00, 29/58, 30/08

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA-RUIZ, J.M. et al. "Supersaturation patterns in counter-diffusion crystallisation methods followed by Mach-Zehnder interferometry". JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH. Volumen 196 (2-4), 1999, páginas 703-710, todo el documento.	1-17
X	GARCÍA-RUIZ, J.M. et al. "Growth kinetics of protein single crystals in the gel acupuncture technique". JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH. Volumen 178 (3), 1997, páginas 393-401, todo el documento.	1-17
X	GARCÍA-RUIZ, J.M. et al. "Reinforced protein crystals". MATERIALS RESEARCH BULLETIN. Volumen 33, nº 11, 1998, páginas 1593-1598, todo el documento.	1-17
A	EP 482946 A1 (FUJITSU LIMITED) 29.04.1992, todo el documento.	1-17

#### 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

13.08.2002

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1