

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
23 de Febrero de 2006 (23.02.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/018462 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
G01N 33/543, B01L 3/00

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/000393

(22) Fecha de presentación internacional:
13 de Julio de 2005 (13.07.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200401733 15 de Julio de 2004 (15.07.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; OTRI- Univer-
sidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias
s/n, E-41012 Sevilla (ES).

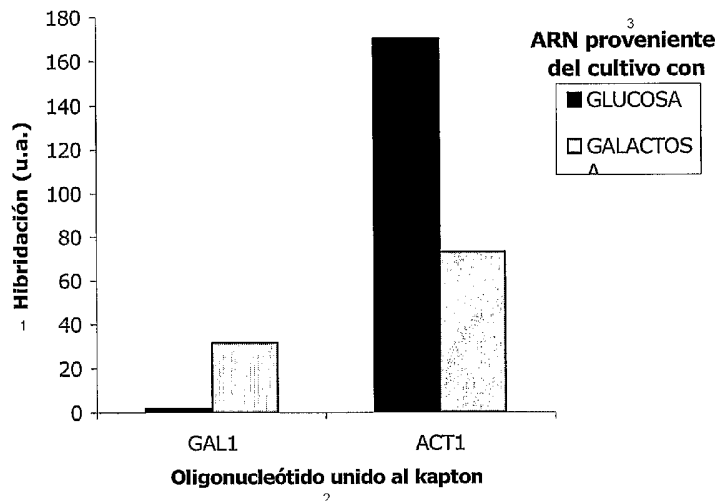
(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **FLO-
RES MOSQUERA, María** [ES/ES]; Dpto. Ingeniería
Energética, y Mecánica de Fluidos, E.T.S. Ingenieros
Industriales, Camino de los Descubrimientos s/n, E-41092
Sevilla (ES). **RODRÍGUEZ GIL, Alfonso** [ES/ES]; Dpto.
Genética, Facultad de Biología, Avda. Reina Mercedes
s/n, E-41012 Sevilla (ES). **GAÑÁN CALVO, Alfonso
M.** [ES/ES]; Dpto. Ingeniería Energética, y Mecánica de
Fluidos, E.T.S. Ingenieros Industriales, Camino de los
Descubrimientos s/n, E-41092 Sevilla (ES). **CHÁVEZ DE
DIEGO, Sebastián** [ES/ES]; Dpto. Genética, Facultad
de Biología, Avda. Reina Mercedes s/n, E-41092 Sevilla
(ES). **CEBOLLA RAMÍREZ, Ángel** [ES/ES]; Dpto.
Ingeniería Energética, y Mecánica de Fluidos, E.T.S.
Ingenieros Industriales, Camino de los Descubrimientos
s/n, E-41092 Sevilla (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: SOLID SUPPORT FOR SOLID-PHASE CHEMICAL SYNTHESIS AND/OR BINDING AND USE METHOD
THEREOF

(54) Título: SOPORTE SÓLIDO PARA LA UNIÓN Y/O SÍNTESIS QUÍMICA EN FASE SÓLIDA Y PROCEDIMIENTO DE
UTILIZACIÓN



1 HYBRIDISATION
2 OLIGONUCLEOTIDE BOUND TO KAPTON
3 RNA FROM CULTURE WITH
GLUCOSE
GALACTOSE

(57) Abstract: The invention relates to the use of a novel support for solid-phase synthesis, immobilisation of organic and bio-organic molecules and the possible use thereof in the production of arrays and microarrays. More specifically, the invention relates to the use of polyamide polymers as solid supports, preferably aromatic polyamide polymers obtained by condensation of dianhydrides with diamines.

[Continúa en la página siguiente]



WO 2006/018462 A1



(81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO

(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) **Resumen:** La presente invención está relacionada con la utilización de un nuevo soporte para síntesis en fase sólida, inmovilización de moléculas orgánicas y bio-orgánicas y la posibilidad de utilizarlo en la fabricación de arrays (matrices) y microarrays (micromatrices). Más particularmente, la presente invención se refiere a polímeros de poliimida como soporte sólido, preferentemente polímeros de poliimida aromática obtenidos por la condensación de dianhídridos con diaminas.

TITULO

Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida y procedimiento de utilización

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con la utilización de un nuevo soporte para síntesis en fase sólida, inmovilización de moléculas orgánicas y bio-orgánicas y, la posibilidad de utilizarlo en la fabricación de arrays (matrices) y microarrays (micromatrices). Más particularmente, la presente
10 invención se refiere a polímeros de poliimida como soporte sólido, preferentemente polímeros de poliimida aromática obtenidos por la condensación de dianhidridos con diaminas.

15 ESTADO DE LA TECNICA

En las dos últimas décadas la biotecnología ha experimentado notables avances en el desarrollo de nuevas tecnologías para aplicaciones médicas y biológicas. En este campo, el esfuerzo por obtener mejores dispositivos de
20 investigación ha aumentado el interés por las aplicaciones de los "arrays" (matrices) y "microarrays" (micromatrices). Los "arrays" y "microarrays" son dispositivos con una alta densidad de biopolímeros (por ejemplo oligonucleótidos, proteínas, péptidos, oligosacáridos y otras pequeñas moléculas orgánicas. Algunas aplicaciones específicas de estos dispositivos
25 son el análisis de mezclas complejas de moléculas, interacciones proteína-proteína, proteína-ADN, investigación toxicológica, descubrimiento de fármacos, etc.

El trabajo con "arrays" y microarrays" requiere la combinación de muchos componentes. Algunos de los aspectos críticos son el soporte sólido y la
30 forma de inmovilizar las biomoléculas sobre dicho soporte. Hay dos vías fundamentales para la inmovilización de biomoléculas sobre soportes sólidos:

- a) el compuesto puede ser sintetizado "*in situ*" sobre la superficie del soporte sólido (utilizando técnicas de síntesis en fase sólida) o
- b) sintetizar el compuesto fuera del soporte sólido y unirlo posteriormente.

- 5 Cada metodología requiere soportes sólidos con propiedades diferentes, pero, en general, el soporte sólido debe mostrar un equilibrio entre una buena estabilidad bajo condiciones extremadamente desfavorables y una moderada activación superficial para pegar la molécula deseada o sus precursores.
- 10 La inmovilización de ADN en soportes sólidos está siendo un tema muy importante en el desarrollo de sistemas de ADN. Hay muy pocos ejemplos de fabricación de arrays en superficies de plásticos. En general, la mayoría de los trabajos de unión de ADN en este tipo de superficies se han realizado en el formato de placas de microvaloración de 96 pocillos. En estos estudios
- 15 se ha descrito la inmovilización de ADN por adsorción pasiva, por radiación de luz UV, por formación de enlaces covalentes con moléculas adsorbidas previamente en la superficie del plástico o por uniones covalentes a través de las bases nitrogenadas modificadas.
- Otra aproximación es modificar el soporte sólido introduciendo grupos
- 20 funcionales o un conector. Existen numerosos ejemplos en los que se une el ADN de forma covalente a soportes de poliestireno modificado con grupos funcionales reactivos como hidroxilos, carboxilos, aminas, aldehidos, hidrazina, epóxidos, maleimidas, tioles, etc (U.S. Pat. No 5,474,895). Sin embargo, aunque estos soportes tienen una elevada capacidad de carga,
- 25 presentan altos niveles de adsorción inespecífica de los oligonucleótidos. Más recientemente, se ha descrito la unión covalente de moléculas de ADN modificado a soportes de polipropileno activado superficialmente con grupos amino (U.S. Pat. N° 6,013,789), y a un polímero hidrofóbico especialmente diseñado para ello (U.S. Pat. N° 6,403,368).
- 30 El material más utilizado para la fabricación de microarrays mediante síntesis *in situ* de oligonucleótidos es el "vidrio de poro controlado" (Controlled Pore Glass, CPG. U.S. Pat. N° 4,458,066). Sin embargo este material inorgánico

presenta algunos problemas, entre los que se puede destacar su baja capacidad de unión de oligonucleótidos y la posibilidad de obtención de falsos rendimientos de acoplamiento. Se hace necesario por tanto, la búsqueda de nuevos materiales, fundamentalmente de naturaleza orgánica.

- 5 Entre ellos se puede destacar el polipropileno activado con grupos amino desarrollado por Beckman tanto para la unión covalente de oligonucleótidos como para su síntesis *in situ* (U.S. Pat. N° 5,554,501).

Otro de los aspectos que hay que tener en cuenta en el desarrollo de nuevos soportes sólidos que se pueden utilizar en la fabricación de microarrays, es el método de detección de los procesos que se quieren medir en cada caso. Una de las metodologías más extendidas se basa en la medición de la fluorescencia sobre el propio microarray. En general, los ensayos basados en la detección de fluorescencia tienen muchas ventajas frente a otras técnicas, gran sensibilidad y especificidad, posibilidad de detectar
10 simultáneamente varias respuestas, seguridad, simplificación de la instrumentación, etc. Uno de los factores que afectan a la sensibilidad de la detección de la señal fluorescente es el ruido de fondo de la superficie sobre la que se está realizando la detección, por lo que es necesario validar las propiedades ópticas del soporte sólido utilizado.

- 20 Recientemente se ha descrito la utilización de medidas de conductividad en microarrays electroquímicos para la detección de interacciones entre biomoléculas y/o moléculas orgánicas (WO 0121635). La ventaja fundamental de este tipo de técnica es que evita el marcaje de las muestras sin afectar a la sensibilidad del proceso. Sin embargo, es necesario que el
25 soporte sólido presente ciertas propiedades conductoras.

Se hace necesario por lo tanto, el desarrollo de nuevos soportes sólidos que combinen todas las propiedades necesarias para la fabricación de microarrays que se adapten a los continuos avances que tienen lugar en el campo de la biotecnología.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es un soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida que incluye una poliimida capaz de reaccionar con compuestos orgánicos que contengan grupos nucleófilos en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos. La poliimida incluye sustancias dopantes que modifican sus propiedades mecánicas, ópticas, en particular disminuir la emisión de fluorescencia, su conductividad eléctrica o su conductividad térmica. Cuando la sustancia dopante es grafito, carbono o sus derivados y la emisión de fluorescencia disminuye entre un 78% y un 95 % respecto a la poliimida sin dopar.

La poliimida se forma mediante condensación de anhídridos de ácido carboxílico bifuncionales con diaminas aromáticas primarias seleccionándose los anhídridos entre los siguientes: anhídrido maleico, anhídrido piromelítico, anhídrido trimelítico, dianhidrido 2,3,6,7-naftalen tetracarboxílico, dianhidrido 1,2,5,6-naftalen tetracarboxílico, dianhidrido 2,2',3,3'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido 3,3',4,4'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido bis(2,3-dicarboxifenil) metano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) metano, dianhidrido 1,1-bis(2,3-dicarboxifenil) etano, dianhidrido 1,1-bis(3,4-dicarboxifenil) etano, dianhidrido 2,2-bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido 3,4,9,10-perilen tetracarboxílico, dianhidrido 4,4'-oxidiftalico, dianhidrido 3,3',4,4'-benzofenona tetracarboxílico, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) sulfona y similares. Las aminas aromáticas se seleccionan entre las siguientes: *o*-diaminobenceno, *m*-diaminobenceno, *p*-diaminobenceno, tolueno diamino, 1,5-diamino naftalene, benzidina, 3,3'-dicloro benzidina, metilendianilina, 2,2-bis(4-aminofenil) propano, oxidianilina, 4,4'-diamino difenil sulfuro, 3,3'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil N-metil amina, 4,4'-diamino difenil N-fenil amina, 4,4'-diamino difenil silano, 4,4'-diamino difenil dietilsilano, óxido de 4,4'-diamino difenil etil fosfina y

similares. Particularmente preferida es la poliimida formada mediante condensación de anhídrido piromelítico (PMDA) y oxidianilina (ODA).

La poliimida puede adoptar geometría diversa tal como películas, membranas, filamentos, capilares, canales, partículas, placas de microvaloración, espumas, hilos, mallas, tamices, hojas, varillas o manguitos.

Constituye otro objeto de la presente invención un procedimiento de utilización del soporte sólido que incluye una poliimida que incluye las siguientes etapas:

- 10 - poner en contacto la superficie del soporte sólido que tiene grupos imida reactivos con una disolución de un compuesto orgánico que tiene un grupo nucleófilo en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos.
- 15 - llevar a cabo el análisis objetivo de los compuestos unidos covalentemente al soporte sólido.

Alternativamente, el compuesto orgánico unido covalentemente al soporte sólido constituye un producto de partida para procesos de síntesis química que dan lugar al compuesto final unido covalentemente a dicho soporte sólido. El enlace covalente se produce entre los grupos nucleófilos del compuesto orgánico que se va a unir y los carbonos carbonílicos del grupo imida de la superficie del soporte sólido. La formación de dicho enlace covalente entre el grupo nucleófilo del compuesto orgánico y la superficie del soporte sólido da lugar a la apertura del grupo imida generando enlaces amida repartidos homogéneamente a lo largo de la superficie del soporte sólido.

El grupo nucleófilo del compuesto orgánico tiene un par de electrones libres que son compartidos para formar un nuevo enlace y se selecciona preferentemente entre aminas, alcoholes, tioles, derivados de P, éteres y tio-éteres.

La disolución del compuesto orgánico puede ser neutra o básica, en disolventes orgánicos o agua. Cuando las disoluciones son básicas incluyen

bases orgánicas o inorgánicas, seleccionándose la base orgánica del grupo de aminas alifáticas terciarias. Cuando la base es inorgánica se selecciona del grupo de los carbonatos. Cuando el disolvente es orgánico se selecciona de entre DMF, NMP, CH₃CN y MeOH.

- 5 Opcionalmente, los compuestos orgánicos incluyen polímeros de interés biológico (biopolímeros), los productos de partida necesarios para la síntesis de esos biopolímeros, y pequeñas moléculas que se pueden utilizar como espaciadores y/o conectores tanto para los biopolímeros como para los productos de partida para realizar la síntesis en fase sólida. Los
- 10 biopolímeros incluyen péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNAs, LNAs, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos y están modificados con un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.
- 15 Alternativamente, los biopolímeros están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido o son los propios biopolímeros los que están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector
- 20 unido al soporte sólido.
- Los posibles productos de partida para la síntesis de biopolímeros incluyen aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, monosacáridos y los monómeros y sus derivados que se utilizan en la síntesis de dichos biopolímeros. Dichos productos de partida están modificados con un grupo nucleófilo capaz de
- 25 formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido o bien con un espaciador y/o conector que contiene un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido. Alternativamente, los productos de partida están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el
- 30 grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido. En este caso, los espaciadores y/o conectores incluyen moléculas orgánicas con un

grupo nucleófilo que reacciona con la poliimida y otro grupo reactivo donde se une covalentemente el biopolímero o su producto de partida.

Por último, también pueden los biopolímeros y sus productos de partida estar modificados con un espaciador y/o conector que contenga un grupo
5 capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.

El proceso de síntesis química que se lleva a cabo sobre los productos de partida incluye las reacciones químicas específicas para la obtención del compuesto orgánico de interés y particularmente las reacciones químicas
10 habituales en la síntesis de oligonucleótidos.

Dicho proceso de síntesis química incluye uno o varios ciclos que constan de:

- desprotección de la posición sobre la que se va a elongar la cadena.
- 15 - acoplamiento del monómero concreto en cada momento.
- inactivación de las posiciones libres que no han reaccionado.
- oxidación a fosfato.

Opcionalmente se lleva a cabo tras los ciclos de elongación de la cadena
20 la desprotección de las bases y/o la separación del soporte sólido.

Sobre el soporte sólido de poliimida con biomoléculas unidas covalentemente se realizan experimentos de interacción entre los compuestos unidos y otras biomoléculas y/o compuestos orgánicos. Dichas interacciones se pueden medir por fluorescencia, radioactividad o
25 cualquier otro método utilizado habitualmente.

Los soportes sólidos pueden utilizarse para la preparación de matrices ("arrays") y micromatrices ("microarrays") de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, y cualquier tipo de librerías de compuestos químicos ordenados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un soporte sólido formado por un polímero que contiene al menos un grupo funcional imida capaz de reaccionar con compuestos orgánicos que contengan grupos nucleófilos en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos. Dicho polímero incluye sustancias dopantes que modifican sus propiedades mecánicas, ópticas, su conductividad eléctrica o su conductividad térmica y se forma mediante condensación de anhídridos de ácido carboxílico bifuncionales con diaminas aromáticas primarias.

Además el polímero de la presente invención podría estar dopado con diferentes sustancias que modificasen alguna de sus propiedades químico-físicas. Entre estas sustancias se encuentran el carbono, la alúmina, mezcla de ambas, derivados de plata, oro o estaño, titanato de bario o cualquier otra sustancia que modifique las propiedades ópticas, mecánicas, la conductividad térmica o electrónica, etc.

La geometría que pueden adoptar dichos soportes es diversa: películas, membranas, filamentos, capilares, canales, partículas, placas de microvaloración, espumas, hilos, mallas, tamices, hojas, varillas, manguitos, etc.

La metodología de la presente invención aprovecha la reactividad química de los grupos funcionales imida que contiene el polímero con un nucleófilo. Este tipo de reacciones da lugar a la formación de un enlace covalente entre el soporte sólido de poliimida y la molécula que contiene el grupo nucleófilo. La formación del nuevo enlace provoca la apertura del grupo imida generando enlaces amida en el soporte sólido. Los enlaces amida se sitúan a lo largo de la superficie del polímero. Los grupos nucleófilos reactivos pueden ser aminas, tioles, derivados de fósforo, éteres, tioéteres, y otros similares bien conocidos.

Constituye igualmente objeto de la presente invención el desarrollo de un procedimiento para unir a la superficie de poliimida de un soporte sólido cualquier tipo de molécula orgánica que posea funcionalidad química que la

haga comportarse como nucleófila. Como ejemplos de estas moléculas pueden mencionarse: biopolímeros, monómeros de dichos biopolímeros, moléculas orgánicas que hagan el papel de espaciadores o conectores y en general cualesquiera otras moléculas orgánicas de interés.

- 5 Una vez unida la molécula orgánica al soporte sólido, constituye otro objeto de la presente invención la utilización del sistema para llevar a cabo síntesis química sobre la molécula pegada. En relación con esto, dicha molécula pegada puede ser usada como material de partida para la realización de síntesis en fase sólida y/o como conector o espaciador para unir las
- 10 moléculas orgánicas referidas anteriormente. Este ciclo puede llevarse a cabo todas las veces que se requiera.

La presente invención puede aplicarse a la inmovilización sobre dichos polímeros de poliimida de ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos como LNAs, PNAs, polipéptidos, oligonucleótidos, proteínas, glicoproteínas,

15 lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos, y otras macromoléculas.

Más concretamente, la presente invención tiene como ejemplo de aplicación preferente la síntesis *in situ* de oligonucleótidos. Esta se puede llevar a cabo mediante dos aproximaciones diferentes:

- unión directa al soporte sólido de un nucleótido modificado con un grupo
- 20 nucleófilo terminal.
- unión de un espaciador y/o conector con un grupo nucleófilo en uno de los extremos y un grupo reactivo en el otro. El grupo nucleófilo une la molécula al soporte sólido y el grupo reactivo se unirá al nucleótido sobre el que se
- 25 reaccione con el espaciador y/o conector.

En general y salvo que se indique otra cosa, todos los términos científicos y técnicos que se emplean en este documento tienen el mismo significado que lo que se entiende habitualmente cuando se utilizan en entornos

30 relacionados con la química de polímeros, química orgánica, bioquímica y biología molecular.

El soporte sólido de poliimida tiene suficiente estabilidad térmica, compatibilidad con solventes y es químicamente inerte frente a un amplio espectro de reactivos. En particular, el polímero de poliimida es estable frente a todas las condiciones de reacción requeridas en los distintos pasos de la síntesis de oligonucleótidos.

Constituye un objeto de esta invención la utilización de polímeros de poliimida como soportes sólidos óptimos para la utilización de diversos métodos de detección de resultados. Más concretamente, la utilización de poliimidas dopadas con distintas sustancias, que se pueden incluir en la síntesis del polímero de forma individual o como mezclas, que les confieran distintas propiedades físico-químicas útiles en el proceso de detección final. Alguna de las propiedades que se pueden optimizar teniendo en cuenta la posterior aplicación del sistema del que forma parte el soporte sólido, son: las propiedades ópticas, la opacidad del sustrato aumenta la sensibilidad en la detección de la fluorescencia; - la conductividad eléctrica, pudiéndose utilizar el soporte en la fabricación de microarrays electrónicos, etc.

Constituye el último objeto de la presente invención el uso de estos soportes sólidos para la fabricación de "arrays" y "microarrays" y para sus aplicaciones.

20

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

EJEMPLO 1

El presente ejemplo muestra la fluorescencia (ruido de fondo) de 2 polímeros de poliimida medida en un Typhoon 9410 (Amersham Pharmacia Biotech). La tabla I presenta los valores relativos de la fluorescencia (ruido de fondo) emitida por kapton® HN (25µm) y kapton® CB (25µm), respecto a la fluorescencia emitida por un portaobjetos de vidrio estándar (filas 1 y 2) y relacionándolas entre sí (fila 3). El valor por debajo de 1 de la razón entre el kapton® CB (25µm) y el vidrio indica su menor fluorescencia en todas las combinaciones de radiaciones de excitación y emisión usadas. Otras

variantes de material como el kapton® HN muestran mayor fluorescencia que el vidrio salvo cuando se usa luz de excitación de 532 nm y se registra la luz emitida con un filtro de 526 nm.

5 Tabla I.

λ_{exc} λ_{em}	532 526	532 555	532 560	532 610	633 670
kapton® HN/ vidrio	0.47	1.57	1.44	5.75	8.36
kapton® CB/ vidrio	0.07	0.16	0.32	0.29	0.59
kapton® CB/ kapton® HN	0.14	0.10	0.22	0.05	0.07

EJEMPLO 2

Unión de oligonucleótidos 1

El presente ejemplo muestra como se puede inmovilizar covalentemente un oligonucleótido sobre un polímero de poliimida. Para realizar el ejemplo se puede obtener un oligonucleótido sintético de 60 bases modificado en la posición 3' con un grupo amino y se marca radiactivamente con ^{32}P . Una lámina de kapton® CB de 25 μm (DuPont) a temperatura ambiente, se impregna con una disolución acuosa 0.16 mM del oligonucleótido anterior.

Pasadas 5 h se elimina la solución de la lámina, se lava con agua 5 veces y se mide la radiactividad. La unión obtenida es de 31.1 pmol/cm², lo que corresponde a una densidad de moléculas de 1.87×10^{13} moléculas/cm².

EJEMPLO 3

Unión de oligonucleótidos 2

Un oligonucleótido sintético de 60 bases modificado en la posición 3' con un grupo amino, se marca radiactivamente con ^{32}P . Se prepara una disolución 0.23 mM del oligonucleótido marcado en tampón carbonato pH 8.5. Con esta

disolución se impregna una lámina de kapton® CB de 25µm (DuPont). Pasadas 5 h se elimina la solución con el oligonucleótido de la lámina, se lava con agua 5 veces y se mide la radiactividad como indicación de las moléculas unidas a la superficie. La unión obtenida es de 4.9 pmol/cm², lo
5 que corresponde a una densidad de moléculas de 2.97x10¹² moléculas/cm².

EJEMPLO 4

Unión directa de nucleótidos modificados 1

El ejemplo siguiente presenta como se puede unir a un sustrato de poliimida
10 oligonucleótidos marcados. Sobre una superficie de kapton® CB de 25µm (DuPont), se hace circular una disolución 0.33 mM de dT-Tamra-NH₂ comercial en DMF con un 0.09% DIPEA. Transcurridas 5h se lava la lámina con DMF y se mira la fluorescencia en un microscopio Leica DMR (modelo DC-350F). Se obtiene una superficie repleta de puntos fluorescentes
15 discretos distribuidos homogéneamente por la zona donde se hizo pasar la solución del oligonucleótido marcado. Para descartar la adsorción se realiza el mismo experimento pero sin añadir DIPEA a la disolución. En este caso no se observa nada de fluorescencia en la superficie.

EJEMPLO 5

Unión directa de nucleótidos modificados 2

En un primer paso se sintetiza dT-fluoresceína modificada en 3' con un grupo amino a partir de dT-fluoresceína comercial. Sobre una superficie de kapton® CB de 25µm (DuPont), se hace circular una disolución 0.33 mM de
25 dT-fluoresceína-NH₂ en DMF con un 0.09% DIPEA. Transcurridas 5h se lava la lámina con DMF y se mira la fluorescencia en un microscopio Leica DMR (modelo DC-350F). Se obtiene una superficie fluorescente homogénea en la zona dónde se hizo pasar la solución del oligonucleótido marcado.

EJEMPLO 6**Unión de nucleótidos modificados a través de un conector**

El siguiente ejemplo muestra como la unión al sustrato de distintas moléculas puede hacerse a través de un conector intermediario. Más concretamente, como puede unirse un conector a la superficie del polímero de poliimida para posteriormente realizar enlaces a las moléculas de interés, como puede ser un oligonucleótido. Las láminas de kapton® HN 125µm (DuPont) se sumergen, con agitación, en una disolución 10mM de N,N'-dimetil-1,6-hexanodiamina en CH₃CN. Transcurridas 22h 30 min, la superficie se lava con CH₃CN, se secan a vacío y se guardan a 4°C bajo argon.

Sobre el grupo amino introducido en el paso anterior se lleva a cabo la reacción de acoplamiento de un nucleótido mediante la aproximación del fosforamidito. Una lámina de kapton "activado" según se ha explicado anteriormente, se impregna con una disolución de dT-Tamra (1.4 mM) y 5-etiltio-1H-tetrazol (9.25 mM) en CH₃CN. Transcurridos 30 min se lava la superficie con MeOH y CH₃CN y se seca a vacío. Se impregna entonces la lámina con una disolución 1M de ^tBuOOH/CH₃CN con agitación constante. Pasados 15 min, se lava con CH₃CN, se seca a vacío y se mira en el microscopio de fluorescencia. Se obtiene una superficie fluorescente homogénea en la zona donde se hizo pasar la solución del oligonucleótido marcado.

EJEMPLO 7**Síntesis sobre kapton**

El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de síntesis, preferentemente de oligonucleótidos sobre el sustrato de poliimida. Las reacciones se llevan a cabo sobre las láminas de kapton® CB de 25 µm de espesor del ejemplo 5, a las que se ha unido a su superficie dT-fluoresceína-NH₂ preparada sintéticamente. La lámina se introduce en un sistema fluido especialmente diseñado para el proyecto. Los reactivos circulan sobre la

muestra con flujo constante que puede ser diferente en cada paso. Los pasos de reacción se realizan consecutivamente, bajo Argon y separados por etapas de lavado con CH₃CN. Las condiciones de reacción de cada paso se indican a continuación:

- 5 - Desprotección del OH-5: 3% Cl₂CHCO₂H/(ClCH₂)₂, 5 min
- Acoplamiento: dT-tamra (1.4 mM), 5-etiltio-1H-tetrazol (9.2 mM) en CH₃CN, 20 min
- Oxidación: 1M tBuOOH en CH₃CN, 10 min

Tras el último lavado, se saca la lámina del sistema y se mira la
10 fluorescencia en condiciones de excitación y detección específicas para la rodamina, que es el fluoróforo introducido en el paso de elongación de la cadena. Se obtiene una superficie con puntos fluorescentes discretos distribuidos homogéneamente en la zona bañada por los reactivos.

15 **EJEMPLO 8**

Hibridación de oligonucleótidos sobre kapton 1

El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de hibridación y su posterior detección, sobre el sustrato de poliimida. La hibridación se lleva a cabo sobre las láminas de kapton® CB de 25 µm de
20 espesor a las que se ha unido a su superficie un oligonucleótido de 60 bases modificado con un grupo amino. En la hibridación se utilizan dos oligonucleótidos diferentes de 40 bases cada uno: el antisense como complementario del oligo previamente unido, y el sense como blanco para detectar la adsorción. Ambos oligos están marcados con ³²P. La hibridación
25 se realiza en 1 x SSC a 66°C durante 14h. La radiactividad se detecta con un phosphorimager (FUJI FLA-3000) durante 24h con el fin de visualizar los resultados de la hibridación. En el experimento que se hibrida con el oligonucleótido complementario se observan altos niveles de radiactividad, mientras que en el que se hibrida con el "sense" se observan niveles de
30 ruido de fondo.

EJEMPLO 9**Hibridación de oligonucleótidos sobre kapton 2**

- El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de hibridación de oligonucleótidos y su posterior detección con muestras biológicas, sobre el sustrato de poliimida. La hibridación se lleva a cabo sobre dos láminas de kapton® CB de 25 µm de espesor a las que se ha unido a su superficie los oligonucleótidos Gal1-NH₂, ACT1-NH₂ respectivamente; una tercera lámina de kapton® CB se utiliza como blanco. En la hibridación se utilizan dos muestras de ARN provenientes del cultivo de una estirpe silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* en dos medios diferentes, YPD (medio rico con glucosa, el gen GAL1 se encuentra reprimido) e YPGAL (medio rico con galactosa, el gen GAL1 se encuentra activado). Antes de su extracción el ARN se marca radiativamente tras permeabilizar las células y añadir UTP marcado con ³²P en su fosfato α.
- Cada uno de los fragmentos de kapton se dividió en dos partes iguales, para hibridar una de ellos con la muestra proveniente del cultivo crecido en YPD y la otra con la proveniente de YPGAL. Tras una prehibridación realizada durante 1 h. a 65°C en un horno de hibridación rotatorio, se lleva a cabo la hibridación con las muestras radiactivas durante 12 h (SSC1x, SDS 0'1%, tRNA 100µg/ml).
- La radiactividad se detecta y cuantifica con un phosphorimager FUJI FLA-3000. Los datos de radiactividad, detraído en nivel de fondo, se muestran en la tabla II y están representados en la figura 1.

25 Tabla II

		Kapton con	
		GAL1	ACT1
ARN proveniente del cultivo con	GLUCOSA	1,88	170,4
	GALACTOSA	31,62	73,27

EJEMPLO 10**Unión de una proteína al kapton**

El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de unión de una proteína sobre el sustrato de poliimida. Se prepara una disolución 1 mg/mL de BSA MaxiBind (Abkem Iberia) en tampón borato pH 9.23 (Panreac). Con esta disolución se impregna una lámina de kapton® CB de 25µm (DuPont). Pasadas 15 h a TA se elimina el líquido con la proteína, se lava 3 veces con Tween-20 (1%) durante 30 seg y 3 veces con agua durante 30 seg. La detección de la unión de la proteína a la superficie del kapton® CB se realiza de forma indirecta por fluorescencia.

Una lámina de Kapton con proteína unida a su superficie obtenida según se ha explicado anteriormente, se sumerge en una disolución de isotiocianato de fluoresceína en tampón borato pH 9.23 (1 mg/mL). Pasados 75 min se elimina la disolución sobrante y la lámina se lava con tampón borato pH 9.23 y agua. La fluorescencia se mide en un microscopio Leica DMR (modelo DC-350F), obteniéndose una superficie fluorescente en la zona que estuvo en contacto con la proteína.

Como blanco se utiliza una lámina de kapton® CB de 25µm (DuPont) sometida al mismo proceso de unión del isotiocianato de fluoresceína. En este caso, en el que la lámina no ha estado en contacto con la proteína, no se observa fluorescencia en el microscopio en las mismas condiciones utilizadas anteriormente.

REIVINDICACIONES

- 1.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida que incluye una poliimida capaz de reaccionar con compuestos orgánicos que contengan grupos nucleófilos en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos y caracterizado porque la poliimida incluye sustancias dopantes que modifican sus propiedades mecánicas, ópticas, su conductividad eléctrica o su conductividad térmica.
- 2.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 1, caracterizado porque la poliimida incluye una sustancia dopante que permite disminuir la emisión de fluorescencia.
- 3.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 2, caracterizado porque cuando la sustancia dopante es grafito, carbono o sus derivados y la emisión de fluorescencia disminuye entre un 78% y un 95 % respecto a la poliimida sin dopar.
- 4.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la poliimida se forma mediante condensación de anhídridos de ácido carboxílico bifuncionales con diaminas aromáticas primarias.
- 5.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 4, caracterizado porque los anhídridos se seleccionan entre los siguientes: anhídrido maleico, anhídrido piromelítico, anhídrido trimelítico, dianhidrido 2,3,6,7-naftalen tetracarboxílico, dianhidrido 1,2,5,6-naftalen tetracarboxílico, dianhidrido 2,2',3,3'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido 3,3',4,4'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido bis(2,3-dicarboxifenil) metano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) metano, dianhidrido 1,1-bis(2,3-dicarboxifenil) etano, dianhidrido 1,1-bis(3,4-dicarboxifenil) etano, dianhidrido

2,2-bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido 3,4,9,10-perilen tetracarboxílico, dianhidrido 4,4'-oxidifalico, dianhidrido 3,3',4,4'-benzofenona tetracarboxílico, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) sulfona y similares.

5

6.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 4., caracterizado porque las aminas aromáticas se seleccionan entre los siguientes: *o*-diaminobenceno, *m*-diaminobenceno, *p*-diaminobenceno, tolueno diamino, 1,5-diamino naftalene, benzidina, 3,3'-dicloro benzidina, metilendianilina, 2,2-bis(4-aminofenil) propano, oxidianilina, 4,4'-diamino difenil sulfuro, 3,3'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil N-metil amina, 4,4'-diamino difenil N-fenil amina, 4,4'-diamino difenil silano, 4,4'-diamino difenil dietilsilano, óxido de 4,4'-diamino difenil etil fosfina y similares.

15

7.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según las reivindicaciones 4-6, caracterizado porque la poliimida se forma mediante condensación de anhídrido piromelítico (PMDA) y oxidianilina (ODA).

8.- Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la poliimida puede adoptar geometría diversa tal como películas, membranas, filamentos, capilares, canales, partículas, placas de microvaloración, espumas, hilos, mallas, tamices, hojas, varillas o manguitos.

25

9.- Procedimiento de utilización del soporte sólido que incluye una poliimida según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque incluye las siguientes etapas:

- poner en contacto la superficie del soporte sólido que tiene grupos imida reactivos con una disolución de un compuesto orgánico que tiene un grupo nucleófilo en su estructura bajo

30

condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos.

- llevar a cabo el análisis objetivo de los compuestos unidos covalentemente al soporte sólido.

5

10.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 9, caracterizado porque el compuesto orgánico unido covalentemente al soporte sólido constituye un producto de partida para procesos de síntesis química que den lugar al compuesto final unido covalentemente a dicho soporte sólido.

10

11.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 9, caracterizado porque el enlace covalente se produce entre los grupos nucleófilos del compuesto orgánico que se va a unir y los carbonos carbonílicos del grupo imida de la superficie del soporte sólido.

15

12.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9 y 11, caracterizado porque la formación del enlace covalente entre el grupo nucleófilo del compuesto orgánico y la superficie del soporte sólido da lugar a la apertura del grupo imida generando enlaces amida repartidos homogéneamente a lo largo de la superficie del soporte sólido.

20

13.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9, 11 y 12 caracterizado porque el grupo nucleófilo del compuesto orgánico tiene un par de electrones libres que son compartidos para formar un nuevo enlace.

25

14.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 13, caracterizado porque el grupo nucleófilo se selecciona preferentemente entre aminas, alcoholes, tioles, derivados de P, éteres y tio-éteres.

30

15.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 9, caracterizado porque la disolución del compuesto orgánico puede ser neutra o básica, en disolventes orgánicos o agua.

5 16.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 15, caracterizado porque las disoluciones básicas incluyen bases orgánicas o inorgánicas.

10 17.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 16, caracterizado porque la base orgánica se selecciona del grupo de aminas alifáticas terciarias.

15 18.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 16, caracterizado porque la base inorgánica se selecciona del grupo de los carbonatos.

19.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 15, caracterizado porque el disolvente orgánico se selecciona de entre DMF, NMP, CH₃CN y MeOH.

20 20.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9 y 10, caracterizado porque los compuestos orgánicos incluyen polímeros de interés biológico (biopolímeros), los productos de partida necesarios para la síntesis de esos biopolímeros, y pequeñas
25 moléculas que se pueden utilizar como espaciadores y/o conectores tanto para los biopolímeros como para los productos de partida para realizar la síntesis en fase sólida.

30 21.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 20, caracterizado porque los biopolímeros incluyen péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNAs, LNAs, proteínas,

glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos.

5 22.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 21, caracterizado porque los biopolímeros están modificados con un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.

10 23.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 21, caracterizado porque los biopolímeros están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.

15 24.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 21, caracterizado porque los biopolímeros están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.

20 25.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 20, caracterizado porque los productos de partida incluyen aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, monosacáridos y los monómeros y sus derivados que se utilizan en la síntesis de dichos biopolímeros.

25 26.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 25, caracterizado porque los productos de partida están modificados con un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.

30 27.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 25, caracterizado porque los productos de partida están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo

nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.

5 28.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 25, caracterizado porque los productos de partida están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.

10 29.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 20, caracterizado porque los espaciadores y/o conectores incluyen moléculas orgánicas con un grupo nucleófilo que reacciona con la poliimida y otro grupo reactivo donde se une covalentemente el biopolímero o su producto de partida.

15 30.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 23 y 27 caracterizado porque los biopolímeros y sus productos de partida están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.

20 31.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 10, caracterizado porque el proceso de síntesis química que se lleva a cabo sobre los productos de partida incluye las reacciones químicas específicas para la obtención del compuesto orgánico de
25 interés.

30 32.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 31, caracterizado porque el proceso de síntesis química incluye las reacciones químicas habituales en la síntesis de oligonucleótidos.

33.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 31, caracterizado porque el proceso de síntesis química incluye uno o varios ciclos que constan de:

- 5 - desprotección de la posición sobre la que se va a elongar la cadena.
- acoplamiento del monómero concreto en cada momento.
- inactivación de las posiciones libres que no han reaccionado.
- oxidación a fosfato.

10 34.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 33, caracterizado porque opcionalmente se lleva a cabo tras los ciclos de elongación de la cadena la desprotección de las bases y/o la separación del soporte sólido.

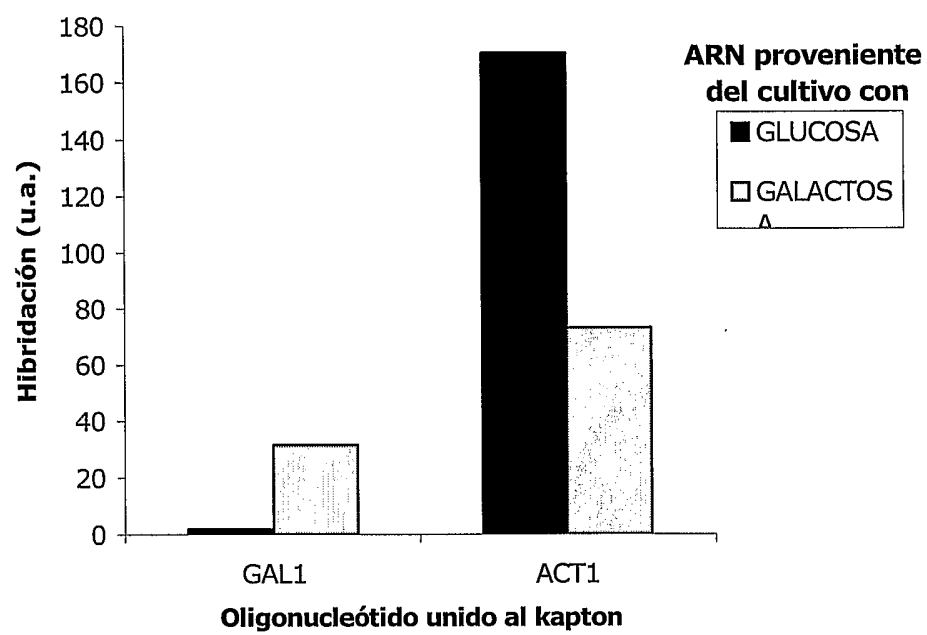
15 35.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9-34, caracterizado porque sobre el soporte sólido de poliimida con biomoléculas unidas covalentemente se realizan experimentos de interacción entre los compuestos unidos y otras biomoléculas y/o compuestos orgánicos.

20 36.- Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 35, caracterizado porque esas interacciones se pueden medir por fluorescencia, radioactividad o cualquier otro método utilizado habitualmente.

25 37.- Procedimiento de utilización de un soporte sólido según las reivindicaciones 9 a 36 para la preparación de matrices ("arrays") y micromatrices ("microarrays") de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, y cualquier tipo de librerías de compuestos
30 químicos ordenados.

1/1

Figura 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/000393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/543 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N, B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT.EPODOC, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ES 2190897 A (16.08.2003) example 1	1
A	WO 9959722 A (25.11.1999)	1-37
A	US 5356374 A (18.10.1994)	1-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

(20.09.2005)

Date of mailing of the international search report

(30.09.2005)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/000393

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2190897 A1	16.08.2003	WO 03066217 A1 AU 2003215684 A1	14.08.2003 02.09.2003
-----	-----	-----	-----
WO 9959722 A1	25.11.1999	EP 1085943 A1 EP 19990923278 JP 2002515330 T US 6541211 B1 US 2003068644 A1 US 6872535 B US 2003143630 A1 US 2003198999 A1 US 2004058391 A1	28.03.2001 20.05.1999 28.05.2002 01.04.2003 10.04.2003 29.03.2005 31.07.2003 23.10.2003 25.03.2004
-----	-----	-----	-----
US 5356374 A	18.10.1994	EP 0447143 A2 EP 19910301980 JP 4218372 A AT 138204 T DE 69119457 D DE 69119457 T	18.09.1991 11.03.1991 07.08.1992 15.06.1996 20.06.1996 12.12.1996
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2005/000393

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N, B01L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ES 2190897 A (16.08.2003), ejemplo 1	1
A	WO 9959722 A (25.11.1999)	1-37
A	US 5356374 A (18.10.1994)	1-37

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

20 Septiembre 2005 (20.09.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

30 Septiembre 2005 (30.09.2005)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Ojanguren Fernández

Nº de teléfono + 34 91 3495474

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/000393

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2190897 A1	16.08.2003	WO 03066217 A1 AU 2003215684 A1	14.08.2003 02.09.2003
WO 9959722 A1	25.11.1999	EP 1085943 A1 EP 19990923278 JP 2002515330 T US 6541211 B1 US 2003068644 A1 US 6872535 B US 2003143630 A1 US 2003198999 A1 US 2004058391 A1	28.03.2001 20.05.1999 28.05.2002 01.04.2003 10.04.2003 29.03.2005 31.07.2003 23.10.2003 25.03.2004
US 5356374 A	18.10.1994	EP 0447143 A2 EP 19910301980 JP 4218372 A AT 138204 T DE 69119457 D DE 69119457 T	18.09.1991 11.03.1991 07.08.1992 15.06.1996 20.06.1996 12.12.1996

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)