

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 140**

51 Int. Cl.:
C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06779694 .6**
- 96 Fecha de presentación: **15.06.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1893742**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **Dispositivo para cultivo celular y tisular**

30 Prioridad:
15.06.2005 GB 0512216

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
**Capsant Neurotechnologies Ltd
24 Cornhill
London, EC3V 3ND, GB**

72 Inventor/es:
STOPPINI, Luc

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 140 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para cultivo celular y tisular.

La invención se refiere al campo del cultivo celular y tisular. En concreto, la invención proporciona un dispositivo nuevo para el cultivo organotípico.

- 5 El cultivo tisular es el mantenimiento *ex vivo* de células que se originaron a partir de un órgano o tejido de un organismo animal o vegetal. Durante muchas décadas se han desarrollado y mejorado los dispositivos de cultivo tisular.

10 El cultivo de las células obtenidas directamente de un órgano o tejido animal o vegetal se denomina cultivo primario. De acuerdo con un procedimiento de cultivo primario, explantes de órganos se introducen en un medio de cultivo estéril adecuado en un vaso de cultivo adecuado con una atmósfera estéril de composición adecuada, de forma que las células crecen a partir de los bordes del explante. Otro abordaje al cultivo primario es disociar las células del órgano o tejido mediante tratamiento enzimático y/o mecánico y cultivar las células disociadas en un ambiente adecuado, como se ha descrito anteriormente;

15 Una desventaja de los cultivos primarios de células animales es que las células tienen un ciclo de vida limitado. Las células en cultivo primario pueden sufrir división celular, pero normalmente sólo lo hacen un número limitado de veces antes de sufrir una forma de muerte celular denominada senescencia. Otra desventaja del cultivo primario de células animales basado en explantes es que las células cultivadas normalmente pierden muchas de las características que son típicas de las células en el órgano fuente *in vivo*, a menos que se realicen etapas específicas para prevenir dicha pérdida de características. La pérdida de características *in vivo* durante el cultivo primario basado en explantes o basado en células disociadas y la aparición de líneas de células inmortales tienen implicaciones importantes para la investigación biológica y médica y el desarrollo del producto porque significa que dichos cultivos celulares primarios no se pueden usar para predecir respuestas *in vivo* con exactitud. Como resultado, se deben llevar a cabo muchos ensayos biológicos para evaluar la seguridad y la eficacia de los fármacos candidatos, *in vivo* en animales enteros. Dichos ensayos con animales enteros son caros, conducen a costes sanitarios mayores y pueden comprometer el bienestar del animal. Por tanto, durante muchos años ha habido un considerable ímpetu en lo referente al desarrollo de ensayos *in vitro* que predican con más exactitud una respuesta *in vivo*.

20 El cultivo de órganos es el mantenimiento de todo o parte de un órgano animal *ex vivo*, en condiciones que mantengan la vida y la función del órgano durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, hay procedimientos establecidos para cultivar hígado (Wicks W., 1968), corazón (Wildenthal K., 1971) e intestino (Corradino R., 1973). El cultivo de órganos posee una ventaja primordial sobre los cultivos celulares primarios basados en explantes y las líneas celulares en cuanto a que se mantienen la mayoría o todas las propiedades fisiológicas. No obstante, el rendimiento del cultivo de órganos está limitado por las manipulaciones necesarias para extraer quirúrgicamente el órgano del huésped y establecer el sistema de cultivo. Adicionalmente, sólo se pueden obtener uno, dos o pocos cultivos por animal donante. Estas limitaciones hacen que el cultivo de órganos sea demasiado lento y caro para la detección selectiva de fármacos y para la detección selectiva dirigida a un fármaco, junto con muchas otras aplicaciones en la investigación biológica.

25 Un gran avance en el campo del cultivo tisular ha sido la introducción de procedimientos de cultivo organotípico para láminas de órganos y de tejidos. Se cultivaron láminas finas (50-500 µm) de un órgano animal en condiciones en las que las láminas conserven la composición celular, la morfología y las propiedades fisiológicas del órgano del que proceden. Las condiciones en las que se cultivan las láminas de órgano son cruciales para conseguir un cultivo organotípico. Las láminas de órgano se cultivan sobre la superficie superior de una membrana porosa y se les suministra nutrientes desde la superficie inferior de dicha membrana porosa, de modo que la lámina de órgano no queda completamente sumergida sino cubierta sólo por una fina película de medio de cultivo (Stoppini L. y col., 1991).

30 La transferencia de gas a la lámina, tanto para la captación de oxígeno como para la eliminación de dióxido de carbono, es mucho más eficiente que cuando la lámina está completamente sumergida en medio de cultivo de acuerdo con los procedimientos del cultivo de explantes. Además, el cultivo organotípico de láminas no sufre las desventajas asociadas con los cultivos primarios basados en explantes y basados en células disociadas tratados con anterioridad. Hay muchos ejemplos de cultivo organotípico de láminas de otros tejidos en base a los mismos principios.

35 El cultivo organotípico de láminas es significativamente más rápido y más flexible que el cultivo de órganos, pero sigue siendo demasiado lento y caro para la detección selectiva a gran escala necesaria para el descubrimiento de fármacos. Los procedimientos usados para diseccionar órganos de animales o para procesar material humano postoperatorio requieren mucho trabajo y en la mayoría de los laboratorios sólo es posible realizar decenas de cultivos en paralelo. Para la detección selectiva de fármacos sería mucho más útil proporcionar miles, decenas de miles o cientos de miles de cultivos en paralelo. Por tanto, el procedimiento ideal para el cultivo organotípico sería uno basado en células disociadas o pequeños agregados de células a partir de un órgano concreto, pero que permitiera el cultivo verdaderamente organotípico.

Sorprendentemente, se ha descubierto que es posible producir un cultivo organotípico a partir de células disociadas o de pequeños agregados de células (microexplantes o explantes) sobre una membrana mediante su compactación. Los nutrientes se suministran por el lado contralateral de la membrana de acuerdo con las instrucciones de Stoppini L. et al, 1991. El procedimiento de producir un cultivo organotípico usando células disociadas o microexplantes se describe en las solicitudes pendientes de tramitación del solicitante tituladas "Procedimiento", presentada en el Reino Unido el 15 de junio de 2005 (documento GB0512214.8) e internacionalmente el 15 de junio de 2006 (documento WO 2006/136953).

Un aspecto de cultivo organotípico de láminas y de cultivo organotípico a partir de células disociadas o de microexplantes es cuando las láminas o células compactadas se colocan sobre una membrana porosa y se suministra un medio nutriente líquido desde el lado contralateral de la membrana porosa, de modo que los cultivos tisulares o celulares se encuentren en la interfaz gas-líquido. Actualmente se dispone de dispositivos que satisfacen estos requisitos. Por ejemplo, las inserciones de Millicell™ CM con membrana Biopore™ fabricadas por Millipore Corporation consisten en una membrana porosa sellada a un soporte de poliestireno. El soporte de poliestireno superado por la membrana se coloca en una placa Petri que contiene medio líquido, de modo que la superficie inferior de la membrana esté en contacto con el medio líquido, y la lámina de órgano se coloca sobre la superficie superior de la membrana porosa (véase la Nota Técnica 062 de Millipore). No obstante, los dispositivos disponibles para cultivo organotípico en la técnica anterior tienen una serie de desventajas y no proporcionan condiciones óptimas para cultivo organotípico. Por ejemplo, los dispositivos disponibles actualmente no permiten añadir medio al lado de la membrana porosa contralateral a la masa celular tras la adición de la masa celular a la membrana porosa no permiten cambiar el medio. Sería útil poder especificar de forma individual la alimentación del medio de cultivo a cada cultivo y cambiar cada medio de cultivo de forma independiente para evaluar los efectos del cambio de medio sobre los cultivos. Sería necesario llevar a cabo dicho cambio de cultivo someter el cultivo organotípico sobre la superficie de la membrana porosa a cambios significativos de presión hidrostática, ya que dichos cambios inducen respuestas de extensión y tensión en los cultivos celulares que podrían confundir los resultados de los ensayos biológicos. Adicionalmente, los dispositivos disponibles actualmente no permiten un rendimiento elevado, es decir no se pueden usar para producir, mantener y detectar múltiples cultivos organotípicos en paralelo.

Por tanto, existe la necesidad de un dispositivo para la preparación y mantenimiento de cultivos organotípicos que esté diseñado para facilitar el cambio de medio sin someter el cultivo organotípico a una tensión innecesaria y que esté diseñado para facilitar el alto rendimiento de la producción y detección selectiva de los cultivos organotípicos.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un dispositivo para cultivo organotípico como se define en la reivindicación 1. Aspectos adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones restantes.

Durante el cultivo organotípico, el cultivo se mantiene sobre la superficie de la membrana porosa que está dispuesta en un extremo del conducto. Una característica clave de la presente invención es que el conducto está diseñado de un modo tal que, durante el cultivo organotípico, la fuerza de la capilaridad mantiene el contacto entre la superficie de la membrana porosa contralateral al cultivo celular, es decir la superficie de la membrana en el conducto, y el medio de cultivo.

El uso de la fuerza de capilaridad para mantener el medio de cultivo en el conducto permite la retirada y reemplazo del medio de cultivo a través de una etapa de pipeteo. Para suministrar el medio, se colocará la punta de la pipeta lo más cerca como sea posible de la superficie de la membrana.

Preferentemente, el conducto se adapta de tal modo que retenga un volumen suficiente de medio de cultivo líquido por capilaridad para mantener el contacto entre la superficie de la membrana porosa en el conducto y el medio de cultivo cuando el dispositivo esté en posición vertical o invertida. En el presente documento, dicho conducto se puede denominar conducto del medio.

Por posición vertical se quiere decir que el marco sujeta el conducto en posición sustancialmente vertical con el extremo sellado por la membrana porosa colocada en la parte más alta de modo que, cuando se está usando el dispositivo, el cultivo organotípico se cultiva sobre la superficie superior de la membrana. Por posición invertida se quiere decir que el marco sujeta el conducto en posición sustancialmente vertical con el extremo abierto colocado en la parte más alta y el extremo cerrado por la membrana porosa en la parte más baja, de modo que, cuando se está usando el dispositivo, el cultivo organotípico está sobre la superficie inferior de la membrana. En contraste con los dispositivos disponibles en la técnica, el dispositivo de la invención permite, de este modo, la incubación del cultivo organotípico y el cambio del medio para el cultivo organotípico con el dispositivo en la posición vertical o invertida. Esta flexibilidad en la orientación del cultivo y el dispositivo significa que, para estudiar el cultivo, se pueden usar de forma intercambiable tanto microscopios con las lentes objetivas hacia arriba como microscopios con las lentes objetivas hacia abajo, y que los dispositivos de manipulación de líquidos se pueden usar en cualquier orientación para añadir o extraer el medio.

Preferentemente, el conducto es un cilindro. El conducto también puede ser de sección transversal rectangular o asimétrica. Las dimensiones y la composición exactas del conducto se seleccionan de tal modo que, durante el

cultivo organotípico, retenga un volumen suficiente de medio de cultivo líquido por capilaridad para mantener el contacto entre la superficie de la membrana porosa en el conducto y el medio de cultivo, preferentemente con independencia de si el dispositivo está en posición vertical o invertida. El volumen de líquido retenido deberá ser suficiente de modo que, durante el uso, se suministren suficientes nutrientes al cultivo organotípico sin necesidad de cambiar el medio a intervalos irrazonablemente cortos.

La capilaridad depende de varios parámetros. La fuerza de capilaridad es una función inversa del diámetro de un vaso cilíndrico o la anchura o amplitud de un conducto de sección rectangular. La fuerza de capilaridad sobre una solución acuosa también depende de la tensión superficial de la solución soportada por dicha fuerza, que puede debilitarse con la presencia en la solución de tensioactivos, tales como detergentes. La capilaridad se ve afectada por el grado de atracción entre las moléculas del líquido y las moléculas de la superficie. En el caso de un líquido acuoso, la capilaridad se ve afectada por el grado de hidrofiliidad de la superficie del conducto. Un factor adicional que afecta a la retención del medio de cultivo líquido en un conducto es el volumen del medio de cultivo. Por tanto, se tienen que tener en cuenta estos factores para asegurar que este dispositivo de la invención pueda retener un volumen de medio líquido en contacto con la superficie de la membrana porosa por capilaridad.

En el dispositivo de la presente invención actúan dos fuerzas capilares diferentes para mantener el medio de cultivo en el conducto en contacto con la membrana porosa. La fuerza de capilaridad ejercida por la atracción entre el medio líquido y el tubo es una de las fuerzas. La otra fuerza se ejerce mediante atracción entre el medio líquido y las paredes en los poros de la membrana. Si es suficientemente fuerte, la primera contrarrestará la gravedad para mantener el líquido en el conducto, con independencia de si está en posición vertical o invertida, y la última mantendrá el líquido en contacto con la membrana. A un cierto umbral, la fuerza de capilaridad sobre el medio de cultivo superará la fuerza de gravedad y el medio de cultivo no sujetado por una fuerza adicional saldrá del conducto.

Cuando el conducto es un cilindro, la masa del líquido contenido en el cilindro y, por tanto, la fuerza de gravedad que actúa para eliminar el líquido del cilindro es directamente proporcional al cuadrado del radio del cilindro, mientras que la fuerza de capilaridad que actúa para conservar el líquido en el cilindro es inversamente proporcional al radio. Por tanto, para un líquido y una longitud de cilindro dados, existe un radio máximo por encima del cual el líquido en un cilindro de una composición de superficie dada no se retendrá en contra de la fuerza de gravedad, pero no hay un radio mínimo por debajo del cual el líquido no se retendrá en contra de la fuerza de gravedad.

Preferentemente, el conducto es un cilindro que tiene un radio de 0,5 cm o menor, preferentemente de 0,3 cm o menor, preferentemente de 0,25 cm, 0,2 cm, 0,15 cm o menor. Preferentemente, el cilindro tiene un radio de aproximadamente 0,3 cm, 0,15 cm o 0,075 cm. Se ha descubierto que los conductos cilíndricos que tienen un radio de 0,5 cm o menor están adaptados para mantener una columna de 1 cm de un medio de cultivo líquido estándar, tal como medio mínimo esencial de Dulbecco, en contacto con la superficie de la membrana porosa en el conducto, con independencia de si el dispositivo está en posición vertical o invertida. Preferentemente, el conducto, preferentemente un cilindro, tiene una longitud de aproximadamente 1 cm, para que pueda retener una columna de 1 cm de líquido. Preferentemente, el conducto tiene una longitud ligeramente superior a 1 cm, preferentemente una longitud de aproximadamente 1,1 cm o 1,2 cm.

Preferentemente, el conducto está hecho de un material hidrofílico, preferentemente un polímero hidrofílico, para incrementar la fuerza de capilaridad ejercida sobre el medio líquido cuando está en el conducto. Los polímeros hidrófilos serán bien conocidos para los expertos en la técnica. La hidrofiliidad de los polímeros a partir de los que se ha fabricado el conducto se puede aumentar adicionalmente mediante, por ejemplo, la inclusión de grupos de polietilenglicol.

La invención no está limitada a cilindros con un radio inferior a 0,5 cm, ya que está dentro de la capacidad de un experto en la técnica determinar las dimensiones de otros conductos que se pueden usar en el dispositivo. Específicamente, el experto podrá calcular las fuerzas de capilaridad y de gravedad ejercidas sobre un volumen dado de medio de cultivo líquido en conductos de diferentes dimensiones y, por tanto, determinar qué dimensión del conducto debería emplearse en el dispositivo para garantizar que las fuerzas de capilaridad superan las fuerzas de gravedad, de modo que el líquido quede retenido en el conducto. Además, en el conducto se pueden incluir restricciones, plataformas u otras obstrucciones para incrementar la resistencia a la fuerza de gravedad que actúa para retirar el medio del conducto.

De acuerdo con la ecuación de Laplace-kelvin.

$$\text{Fuerza de capilaridad} = \text{tensión superficial} / (R_1 - R_2),$$

en la que R_1 = el radio del tubo o poro (en este caso el conducto) en cm y R_2 = el espesor de la capa de menisco en contacto con la pared del tubo o poro.

$1 \cdot 10^{-5}$ N es la fuerza requerida para acelerar 1 gramo a 1 cm s^{-2} . La tensión superficial de un medio acuoso es de aproximadamente $73 \cdot 10^{-5} \text{ N cm}^{-2}$, a menos que se incluyan tensioactivos, tal como detergentes. No es una práctica habitual incluir detergentes en los medios de cultivo, pero las proteínas también pueden afectar a la tensión superficial y las proteínas normalmente se incluyen en los medios, particularmente en forma de suero. En general, la

- 5 tensión superficial de un medio de cultivo líquido es al menos $50 \cdot 10^{-5}$ N/cm. La fuerza de gravedad total que actúa sobre un volumen dado de medio de cultivo líquido es $98 \cdot 10^{-5}$ x (volumen en cm^3) N. El espesor de la capa de menisco (R2) normalmente no tiene que tenerse en cuenta al calcular la capilaridad para los fines de la presente invención. Cuando R2 es pequeña, tiene un efecto insignificante sobre la capilaridad y a medida que R2 se acerca a R1, la fuerza de capilaridad se convierte en mayor. Como solo es necesario determinar si los requisitos de la fuerza de capilaridad mínima se cumplen para un conducto y un medio acuoso dados para los fines de la presente invención, no es necesario medir la R2. No obstante, por supuesto, es posible medir R2 si se desea calcular la fuerza de capilaridad con más precisión.
- 10 Para un cilindro de 1 cm de longitud y un radio de 6,5 cm, se necesitaría una fuerza de capilaridad total de al menos $77 \cdot 10^{-5}$ N para contrarrestar la fuerza de gravedad y mantener una columna de 1 cm de líquido con una tensión superficial de $50 \cdot 10^{-5}$ N/cm² en el cilindro por capilaridad cuando se invierte. Si la hidrofiliidad de la superficie del cilindro es suficientemente alta, la fuerza de capilaridad puede aplicar una fuerza superior a $100 \cdot 10^{-5}$ N a dicha columna de líquido.
- 15 Para un cilindro de 1 cm de longitud y un radio de 0,3cm, se necesitaría una fuerza de capilaridad total de al menos $28 \cdot 10^{-5}$ N para contrarrestar la fuerza de gravedad y mantener una columna de 1 cm de líquido con una tensión superficial de $50 \cdot 10^{-5}$ N/cm² en el cilindro cuando se invierte. Si la hidrofiliidad de la superficie del cilindro es suficientemente alta, la fuerza de capilaridad puede aplicar una fuerza superior a $170 \cdot 10^{-5}$ N a dicha columna de líquido.
- 20 Estas fuerzas de capilaridad son suficientes para retener dicha columna de líquido cuando se invierte, siempre que el dispositivo no se mueva o vibre, porque las aceleraciones causadas por el movimiento o la vibración cambian el momento de la columna de líquido y pueden superar la fuerza restrictiva. Preferentemente, las dimensiones del conducto son tales que ningún cambio razonable en el momento como los que pueden ser causados por la manipulación manual normal o robótica tenga como resultado pérdida de líquido del conducto.
- 25 Preferentemente, las dimensiones del conducto se seleccionan de modo que la fuerza de capilaridad que actúa para retener un volumen dado de medio líquido en la superficie de la membrana porosa es al menos 6 veces la fuerza de gravedad que actúa para liberar el medio. Se ha encontrado que una fuerza de capilaridad de 6 veces la fuerza de gravedad es adecuada para garantizar la conservación del medio líquido en el conducto del dispositivo en la manipulación normal, incluso cuando el medio contiene componentes proteicos, tales como los del suero que disminuyen la tensión superficial del medio.
- 30 Preferentemente, la membrana porosa se fusiona en un extremo del conducto mediante cola, termosellado o mediante sellado ultrasónico. La membrana porosa aplica una fuerza de capilaridad al líquido del conducto de acuerdo con la ecuación de Laplace-Kelvin (véase anteriormente) en función del radio y de la composición superficial de los poros de la membrana. Esta fuerza de capilaridad ejercida por la membrana debería ser suficiente para humidificar la membrana y mantener el líquido en contacto con la membrana.
- 35 Preferentemente, la membrana porosa en el dispositivo de la invención comprende poros de un tamaño de $\sim 0,4 \mu\text{m}$. Las membranas adecuadas para usar en el dispositivo de la invención incluyen, entre otras, membrana de politetrafluoroetileno (PTFE, también conocido como la marca de DuPont Teflon®) hidrófilo producido por Millipore Corporation, que, opcionalmente, es transparente, membranas hechas de policarbonato, PET (tereftalato de polietileno) o Anopore™ (óxido de aluminio inorgánico, una marca de Whatman Corp).
- 40 Preferentemente, la membrana porosa es, opcionalmente, transparente. Esta característica permite acceder a los cultivos de ensayo en todo momento mediante inspección microscópica y toma de muestras para ensayos bioquímicos. Preferentemente, la membrana porosa produce baja fluorescencia de fondo a las longitudes de onda usadas para la excitación, normalmente en el intervalo de 400-750 nm. Preferentemente, la membrana porosa está compuesta por politetrafluoroetileno (PTFE) hidrófilo.
- 45 Preferentemente, el marco sujeta el conducto en orientación vertical de modo que ni el extremo del conducto cerrado por la membrana ni el extremo abierto del conducto está en contacto con ninguna superficie. Preferentemente, el dispositivo comprende además un anillo de sellado que garantiza que el marco está sujeto firmemente en contacto con el conducto. Preferentemente, el dispositivo comprende dos anillos de sellado de este tipo. El dispositivo puede comprender además medios adicionales para asegurar que el marco está sujeto firmemente en contacto con el
- 50 conducto de modo que el conducto no se suelta cuando se invierte. Dichos medios adicionales pueden comprender, por ejemplo, medios de fricción, como muelles entre el marco y el conducto.
- 55 Preferentemente, el dispositivo comprende además una cámara que encierra el extremo abierto del conducto. La cámara puede formar parte del marco que sujeta el conducto en orientación vertical. Cuando se está usando el dispositivo, la cámara contiene una atmósfera de una composición gaseosa adecuada que pone en contacto el medio en el conducto para mantener la acidez óptima y los niveles de oxígeno en el medio. Preferentemente, la cámara se sella para asegurar que el medio líquido no queda expuesto a la atmósfera externa durante el uso. La cámara puede comprender además una entrada para gas y una salida para gas, para permitir el control de las condiciones atmosféricas en la cámara.

Preferentemente, la cámara sellada comprende además una abertura para poder cambiar el medio de cultivo. Preferentemente, la abertura está diseñada para minimizar la exposición del medio de cultivo a la atmósfera cuando se cambia el medio. La abertura puede sellarse mediante un tabique o válvula que normalmente está sellado, pero puede atravesarse con la punta de una pipeta para extraer el medio e introducir medio nuevo. El tabique puede estar fabricado de caucho o neopreno. La abertura puede usarse también para introducir componentes específicos en el medio existente, como factores de crecimiento o antibióticos o toxinas, en lugar de cambiar el medio completamente. Preferentemente, la etapa de pipeteo se realiza sin someter al cultivo a un cambio significativo de la presión hidrostática.

Será evidente para los expertos en la técnica de la construcción de pipetas manuales y automáticas que, para extraer líquido del conducto, debe aplicarse una presión negativa que sea superior a la presión que retiene el líquido en el conducto. Será importante evitar los daños producidos por la punta de la pipeta en la membrana porosa y, por este motivo, la no se hará avanzar la punta de la pipeta hasta el contacto con dicha membrana. Por tanto, no será posible retirar todo el medio líquido de un conducto con una única etapa de pipeteo. El líquido se puede conservar en el conducto en la región del conducto entre el punto más lejano al que puede llegar la punta de la pipeta y la membrana. Es más probable que dicha retención de líquido en el conducto mediante la fuerza capilaridad se aplique con un radio de cilindro muy pequeño, aunque también dependerá de las propiedades precisas de la punta de la pipeta y el líquido. Si se produce retención de líquido, en la mayoría de los casos no afectará a la salud del cultivo.

No obstante, por ejemplo, en algunas circunstancias, si se está analizando la exposición del cultivo a una sustancia tóxica, la retención del líquido podría, potencialmente, influir sobre los datos experimentales. En este caso, las etapas de pipeteo de retirada y reemplazo de líquido con líquido fresco se pueden repetir tantas veces como sea necesario para eliminar la sustancia tóxica por dilución. Por ejemplo, si el cilindro tiene una longitud de 1 cm y la punta de la pipeta puede hacerse avanzar de un modo seguro a 0,1 cm de la membrana, como máximo se retendrá en el cilindro el 10 % del volumen. La adición de líquido fresco a toda la longitud de 1 cm diluiría la toxina al 10% de su concentración original. La repetición de este procedimiento diluiría la toxina al 1 % de su concentración original. La programación del tiempo de las etapas de pipeteo tendría en cuenta la necesidad de permitir el equilibrado de la toxina para maximizar la eficiencia de la eliminación mediante dilución.

Preferentemente, el dispositivo comprende además uno o más conductos, preferentemente conductos extraíbles, para contener las células antes y durante la compactación por un campo gravitacional, estando dichos conductos o conductos extraíbles colocados sobre el lado contralateral de la membrana del conducto que contiene el medio de cultivo. El dispositivo de esta realización permite que la compactación de las células mediante centrifugación y transferencia de las células a la superficie se lleven a cabo de forma simultánea. Se proporciona un condujo para sujetar la suspensión celular en la orientación correcta con respecto a la superficie para compactación por un campo gravitacional. La orientación óptima es con la superficie distal a la suspensión celular desde el punto de fuerza mínima del campo gravitacional. En el caso de un campo gravitacional generado dentro de una centrífuga, la superficie se coloca distal al eje de rotación del rotor de la centrífuga con respecto a la suspensión celular. Preferentemente, en la unión del conducto y la superficie se proporciona un sello entre la superficie y el borde del conducto que está adyacente a dicha superficie, para asegurar que las células se transfieren de forma eficiente a dicha superficie y no se pierden del conducto. Tras la compactación de las células mediante centrifugación, el medio líquido se transfiere al conducto proporcionado para contener el medio en el lado contralateral de la membrana porosa al conducto proporcionado para contener la suspensión celular. Después se produce compactación adicional por capilaridad. El conducto que contiene la suspensión celular se denomina en el presente documento conjugado de la suspensión celular y el conducto que contiene el medio líquido se denomina el conducto de medio. El uso de más de un conducto de suspensión celular antes y durante la compactación permite establecer más de un cultivo en puntos diferentes dentro de la región de la membrana en contacto con cada conducto de medio. Si los conductos de suspensión celular no son extraíbles, se pueden sellar permanentemente a la membrana porosa mediante cola o termosellado o sellado ultrasónico. Si los conductos de suspensión celular son extraíbles, están sellados a la membrana porosa de un modo no permanente. Ejemplos de sellos no permanentes incluyen bordes conformados que enfocan la presión y silicona y otras sustancias compresibles, que pueden comprender todo el conducto o el borde de sellado del conducto. Los familiarizados con la centrifugación apreciarán que la aplicación de un campo gravitacional a un dispositivo que incluye un conducto proximal a la membrana porosa con respecto al eje de rotación del rotor de la centrífuga presionará el borde de sellado del conducto contra la membrana porosa. En el caso de un conducto extraíble, esto potencia las propiedades de sellado del borde sellante. Los expertos en la técnica del diseño de dispositivos para uso en los campos gravitacionales también apreciarán que las superficies de soporte de carga deben estar soportados por estructuras de la fuerza adecuada para evitar los fallos. Por ejemplo, la membrana porosa de la invención no tiene la profundidad adecuada para soportar un conducto, incluso en un campo gravitacional débil, sin daños en la membrana porosa. Por tanto, se han efectuado las etapas para garantizar que los conductos de la invención están soportados por estructuras de la fuerza adecuada dentro del marco del dispositivo. Si se usa un sello compresible entre un conducto y una membrana porosa, el grado de compresión bajo la influencia de un campo gravitacional está, en todos los casos, limitado por el contacto del conducto con una estructura de la fuerza adecuada dentro del marco del dispositivo. Estas consideraciones son obvias para los expertos en la técnica del diseño de dispositivos para usar en campos gravitacionales.

De acuerdo con esto, la invención comprende, preferentemente, un conducto de suspensión celular que tiene un extremo abierto y un extremo cerrado por la superficie de dicha membrana porosa contralateral a la superficie de

dicha membrana porosa sellada a dicho conducto de medio. Después, el marco, preferentemente, sujeta el conducto de medio y el conducto de suspensión celular en una orientación sustancialmente vertical.

5 Preferentemente, el dispositivo comprende además una tapa que cubre la superficie de la membrana porosa por fuera del conducto. La tapa cubre la superficie de la membrana porosa sobre la cual se localiza el cultivo cuando el dispositivo se está usando. Cuando un dispositivo comprende una tapa, la cámara y el marco comprenden, preferentemente, puertos adicionales para dejar que el gas fluya entre la cámara y el espacio Encima de la membrana encerrada por la tapa, lo que permite controlar la atmósfera que rodea al cultivo durante periodos de varias semanas o más.

10 El dispositivo del primer aspecto de la invención se adapta, preferentemente, para usar en procedimientos de alto rendimiento que implican preparar y mantener múltiples cultivos organotípicos de forma simultánea. De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, de este modo se proporciona un dispositivo para cultivo organotípico de alto rendimiento que comprende múltiples dispositivos de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Preferentemente, el dispositivo para cultivo organotípico de alto rendimiento comprende 96, 384, 1536 o más dispositivos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

15 El dispositivo del segundo aspecto de la invención puede contener, por tanto, miles de conductos de medio y, en algunas realizaciones, miles de conductos de suspensión celular, y cada conducto de medio se puede suministrar de forma independiente con medio de cultivo y para el cual el medio de cultivo se puede cambiar de forma intercambiable. Preferentemente, el cambio de medio se lleva a cabo mediante una pipeta o robot multicanal, tal como se ha descrito anteriormente.

20 Preferentemente, el dispositivo de alto rendimiento comprende una única tapa que cubre todos los conductos individuales dentro del dispositivo.

25 Preferentemente, las cámaras que encierran los extremos abiertos de cada conducto de medio en el dispositivo de alto rendimiento están conectadas por una abertura, lo que permite que el gas fluya entre las cámaras de modo que el flujo de gas a todas las cámaras dentro del dispositivo se pueda controlar mediante una única entrada y una salida para el flujo de gas en el dispositivo de alto rendimiento.

30 Los múltiples dispositivos en el dispositivo de alto rendimiento se pueden fabricar como una unidad única. Como alternativa, el dispositivo de alto rendimiento se puede suministrar como dispositivos individuales de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que cada uno de ellos contiene un único conducto de medio y, en algunas realizaciones, uno o más conductos de suspensión celular permanentes o extraíbles que se pueden ensamblar en un dispositivo de alto rendimiento que contiene el número deseado de conductos por el usuario. El dispositivo de alto rendimiento se puede suministrar también como tiras de dispositivos individuales de acuerdo con el primer aspecto de la invención, por ejemplo, en los lotes de 2, 4, 8 o 12 que se pueden ensamblar en un dispositivo de alto rendimiento que contiene el número deseado de conductos, opcionalmente por el usuario. Los dispositivos de alto rendimiento que comprenden tiras que contienen un conjunto de pocillos se conocen en la técnica del cultivo celular, aunque no para el cultivo organotípico. Un dispositivo de múltiples pocillos de este tipo ha sido descrito por Dynatech en Thorne A. (1979) en la patente de EE.UU. 4.154.795.

35 Preferentemente, para los dispositivos de alto rendimiento, el tamaño global del dispositivo y la posición de los conductos individuales dentro del dispositivo deberá concordar con el tamaño de una placa de microtitulación estándar para permitir usar el dispositivo con la robótica diseñada para las placas de microtitulación estándar. Por ejemplo, en un dispositivo de alto rendimiento que comprende 96 dispositivos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, los dispositivos se disponen, preferentemente, en una matriz de 8 por 12 dispositivos, simulando una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos. Los conductos en los 96 dispositivos que forman el dispositivo de alto rendimiento son, preferentemente, cilindros. Preferentemente, cada cilindro que comprende un conducto de medio tiene un radio de aproximadamente 0,3 cm, que es el radio de un pocillo en una placas de microtitulación estándar de 96 pocillos. Las fuerzas de capilaridad y gravitacional que actúan en tal cilindro se han descrito anteriormente. Las dimensiones de los conductos de suspensión celular no están limitadas por la necesidad de retener líquido por capilaridad contra la fuerza de gravedad, porque siempre se usan con la membrana porosa en el punto de máxima fuerza del campo gravitacional. Preferentemente, cada cilindro que comprende un conjugado de suspensión celular se puede llenar y aspirar simplemente pipeteando dispositivos diseñados para las placas de microtitulación estándar. Por ejemplo, si el dispositivo contiene un conducto de suspensión celular para cada conducto de medio y hay 96 conductos de medio, el eje de cada conducto de suspensión celular deberá estar, óptimamente, co-lineal con el eje del conducto de medio colocado directamente enfrente del lado contralateral de la membrana porosa. Si el dispositivo 4 contiene 4 conductos de suspensión celular para cada uno de los 96 conductos de medio, el espacio entre los conductos de suspensión celular debería ser equivalente a los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos. Si el dispositivo 16 contiene 4 conductos de suspensión celular para cada uno de los 96 conductos de medio, el espacio entre los conductos de suspensión celular debería ser equivalente a los pocillos de una placa de microtitulación de 1536 pocillos. El radio de cada conducto de suspensión celular deberá ser lo suficientemente mayor que el radio de la punta de una pipeta adecuada o aguja de pipeta para permitir un pipeteo conveniente.

En un dispositivo de alto rendimiento que comprende 384 dispositivos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, el conducto de medio en cada dispositivo es, preferentemente, un cilindro y el radio del cilindro es, preferentemente, aproximadamente 0,15 cm, el radio de un pocillo en una placa de microtitulación estándar de 384 pocillos. El peso del líquido en este cilindro de la misma longitud de 1 cm es sólo el 25 % del peso correspondiente con un diámetro del cilindro de 0,3 cm, pero la fuerza de capilaridad es el doble de la del cilindro más grande citado anteriormente. En un dispositivo de alto rendimiento que comprende 1536 dispositivos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, el conducto de medio en cada dispositivo es, preferentemente, un cilindro y el radio del cilindro es, preferentemente, aproximadamente 0,075cm, el radio de un pocillo en una placa de microtitulación estándar de 1536 pocillos. En este caso, el peso del líquido en el cilindro de la misma longitud de 1 cm es sólo el 6,25% del peso correspondiente con un diámetro del cilindro de 0,3 cm, pero la fuerza de capilaridad es cuatro veces mayor. En un dispositivo de alto rendimiento que comprende 96, 384 o 1536 conductos de medio, puede haber uno o más conductos de suspensión celular para cada conducto de medio, estando el número y la posición de dichos conductos de suspensión celular limitado únicamente por la capacidad para usar instrumentos adecuados para pipeteo de alto rendimiento. Por tanto, los dispositivos de 96, 384 o 1536 conductos de medio fabricados de acuerdo con la invención con respecto al tamaño global de una placa de microtitulación estándar, todos retienen líquido en los conductos de medio en la posición invertida y todos pueden contener conductos de suspensión celular permanentes o extraíbles.

A continuación se describirán con más detalla varios aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo.

Breve descripción de las figuras:

La figura 1 muestra una sección transversal de un dispositivo sin un conducto de suspensión celular de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La figura 2 muestra una sección transversal de un dispositivo con un conducto de suspensión celular de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La figura 3 muestra una sección transversal de un dispositivo de alto rendimiento sin conductos de suspensión celular para cultivo organotípico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

La figura 4 muestra una sección transversal de un dispositivo de alto rendimiento y conductos extraíbles para un dispositivo de alto rendimiento, que incluye 4 conductos por pocillo para contener las células antes y durante la compactación.

La figura 5 muestra una sección transversal de un dispositivo modificado para cultivo organotípico de acuerdo con el primer aspecto de la invención con componentes adicionales que sujetan el conducto en su lugar.

Ejemplos:

Como se muestra en la Figura 2, un dispositivo preferido de la invención comprende un cilindro como conducto de medio y una membrana porosa pegada o termosellada o sellada ultrasónicamente a un extremo del cilindro y un marco que sujeta el cilindro en posición vertical y crea una cámara que rodea al extremo abierto del cilindro.

El cilindro contiene un volumen de medio de cultivo líquido que se retiene por capilaridad en el cilindro, de modo que está en contacto con la superficie inferior de la membrana porosa. Se muestra el menisco líquido del volumen del medio líquido.

Como se muestra en la Figura 2, un dispositivo adicional preferido de la invención comprende un cilindro como conducto de medio y una membrana porosa pegada o termosellada o sellada ultrasónicamente a un extremo del conducto de medio y otro cilindro como conducto de suspensión celular que está sellado al lado contralateral de la membrana porosa al cilindro del medio y un marco que sujeta ambos cilindros en posición vertical y crea una cámara que rodea al extremo abierto del cilindro del conducto de medio.

El cilindro del conducto de suspensión celular contiene suspensión celular antes y durante la compactación mediante centrifugación. Se muestra la masa celular obtenida tras la centrifugación. Tras la centrifugación, el cilindro del conducto de medio contiene un volumen de medio de cultivo líquido que se retiene por capilaridad en el cilindro, de modo que está en contacto con la superficie inferior de la membrana porosa. Se muestra el menisco líquido del volumen del medio líquido.

Los dispositivos de las Figuras 1 y 2 comprenden además una tapa que encierra el extremo sellado de la membrana del vaso y proporciona control de la atmósfera que rodea al cultivo organotípico, en el que es posible el intercambio gaseoso, pero se evita la contaminación microbiana.

En el caso de un ensamblaje de dispositivos para alto rendimiento, la tapa cubriría, preferentemente, todo el ensamblaje. La tapa puede ajustarse de forma holgada para permitir la difusión de gas, teniendo un faldón que solapa los bordes de la placa o el montaje para minimizar la contaminación en presencia de ligeras turbulencias de

aire. Los que realizan cultivos tisulares saben bien que las turbulencias de aire se tienen que minimizar. Como alternativa, la tapa se puede ajustar de forma hermética, en cuyo caso los puertos se pueden proporcionar integrados de modo que el gas pueda circular entre las cámaras y el espacio entre la tapa y la membrana.

5 Preferentemente, la cámara comprende una forma de plástico prefabricada que incorpora dos anillos de sellado que colocan la cámara firmemente alrededor de la base del cilindro del conducto de medio. Adicionalmente, si hay un cilindro de conducto de suspensión celular, se usan dos anillos de sellado para colocar el cilindro del conducto de suspensión celular dentro de la forma de plástico prefabricada. Preferentemente, los sellos son anillos de sellado fabricados de neopreno. Preferentemente, el cilindro del conducto de suspensión celular está fabricado de silicona, un material semirígido, para garantizar el sellado contra la membrana porosa durante la centrifugación.

10 La base de la cámara comprende además un tabique que puede atravesar una pipeta, para facilitar el cambio del medio en la cámara sin exponer el medio al ambiente que la rodea.

15 El interior de la cámara es, preferentemente, accesible para la difusión o perfusión de gas, y la cámara comprende dos orificios o puertos para el flujo de gas para controlar las condiciones atmosféricas. La cámara y el marco comprenden, preferentemente, puertos adicionales para permitir el flujo de gas entre la cámara y el espacio por encima de la membrana cubierta por la tapa.

20 Como se muestra en la Figura 3, un dispositivo de alto rendimiento para múltiples cultivos organotípicos de acuerdo con la invención comprende múltiples dispositivos para un único cultivo organotípico mostrado en la Figura 1. Cada cilindro del conducto de medio en el dispositivo de alto rendimiento contiene su propio suministro de medio líquido retenido en contacto con la membrana por capilaridad. Como se muestra en la Figura 4, otro dispositivo de alto rendimiento para múltiples cultivos organotípicos de acuerdo con la invención comprende múltiples dispositivos para un cultivo organotípico mostrado en la Figura 2. Cada cilindro del conducto de medio en el dispositivo de alto rendimiento contiene su propio suministro de medio líquido retenido en contacto con la membrana por capilaridad. Correspondiente a cada cilindro de conducto de medio, hay uno o más cilindros de conducto de suspensión celular que contienen la suspensión celular antes y durante la centrifugación. En el ejemplo mostrado en la Figura 4, hay
25 cuatro cilindros de conducto de suspensión celular y, por tanto, cuatro cultivos organotípicos, para cada cilindro de conducto de medio.

30 Las cámaras en la base de los cilindros de conducto de medio en las Figuras 3 y 4 están en comunicación y el flujo de gas entre las cámaras es posible, de modo que se permite el control de las condiciones atmosféricas en todas las cámaras a través de los puertos de flujo de gas en cualquier extremo del dispositivo. Además, el espacio entre la tapa y el cultivo se hace contiguo con las cámaras por medio de los puertos en el marco, de modo que se permite el control de las condiciones atmosféricas que rodea a los cultivos sobre las membranas.

Como se muestra en la Figura 5, los dispositivos de las Figuras 2 y 2 pueden comprender otros elementos que sujetan el conducto en su lugar respecto al marco, tal como, por ejemplo, muelles entre el conducto y el marco.

Referencias:

35 Corradino R., 1973, J. Cell Biol., Vol 58, pp64-78, Embryonic chick intestine in organ culture. A unique system for the study of the intestinal calcium absorptive mechanism.

Stoppini L. y col., 1991, Neurosci. Methods, Vol 37 pp173-82, A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.

40 Wicks W., 1968, J. Biol. Chem., Vol 243, pp900-6, Induction of tyrosine-alpha-ketoglutarate transaminase in fetal rat liver.

Wildenthal K., 1971, J. Appl. Physiol., Vol 30, pp153-7, Long-term maintenance of spontaneously beating mouse hearts in organ culture.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para cultivo organotípico, en el que dicho dispositivo comprende:
- 5 un conducto de medio que tiene un extremo abierto y un extremo cerrado por una membrana porosa fusionada a su través; y un marco que sujeta el conducto de medio en una orientación sustancialmente vertical en el que el conducto de medio está adaptado para permitir la retención por capilaridad de un volumen suficiente del medio de cultivo líquido en el conducto de medio para contactar la superficie de la membrana porosa y, de este modo, suministrar nutrientes a las células que se pueden cultivar sobre la membrana porosa,
- en el que el dispositivo comprende además
- 10 un conducto de suspensión celular que tiene un extremo abierto y un extremo cerrado por la superficie de dicha membrana porosa contralateral a la superficie de dicha membrana porosa sellada a dicho conducto de medio;
- en el que dicho marco sujeta el conducto de medio y el conducto de suspensión celular en una orientación sustancialmente vertical.
- 15 2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conducto de medio se adapta para permitir la retención por capilaridad de un volumen suficiente de medio de cultivo líquido para el contacto entre la superficie de la membrana porosa en el conducto cuando el dispositivo está en posición vertical o invertida.
3. dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el conducto de medio es un cilindro.
4. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el conducto de suspensión celular es un cilindro.
- 20 5. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conducto de medio es un cilindro que tiene un radio de 0,5 cm o menor.
6. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la membrana porosa se fusiona en un extremo del conducto de medio mediante cola, termosellado o mediante sellado ultrasónico.
- 25 7. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el conducto de suspensión celular se sella a la membrana porosa por un borde presionado contra dicha membrana porosa por un campo gravitacional.
8. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el conducto de suspensión celular se sella a la membrana porosa mediante un sello de neopreno.
- 30 9. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el conducto de suspensión celular se sella a la membrana porosa mediante un sello de silicona.
10. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el conducto de suspensión celular se puede eliminar del dispositivo antes del cultivo celular.
11. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el conducto de suspensión celular se sella a la membrana porosa mediante cola, termosellado o sellado ultrasónico.
- 35 12. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el conducto de suspensión celular está compuesto por silicona.
13. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el área transversal interna del conducto de suspensión celular es menor que el área transversal interna del conducto de medio.
- 40 14. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la membrana porosa es ópticamente transparente.
15. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la membrana porosa está compuesta por politetrafluoroetileno (PTFE).
- 45 16. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el marco sujeta el conducto en orientación sustancialmente vertical de modo que ni el extremo del conducto cerrado por la membrana ni el extremo abierto del conducto está en contacto con ninguna superficie.
17. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el marco sujeta el conducto en orientación sustancialmente vertical de modo que ni el extremo del conducto de suspensión celular en contacto con la membrana esté soportado en un campo gravitacional por dicho marco, impidiendo que se dañe a

dicha membrana.

18. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el dispositivo comprende además una cámara que encierra el extremo abierto del conducto de medio.

5 19. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la cámara comprende una abertura para poder cambiar el medio de cultivo.

20. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende una tapa que cubre la superficie de la membrana porosa contralateral al mediante de cultivo líquido.

21. Un dispositivo para cultivo organotípico de alto rendimiento, que comprende múltiples dispositivos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

10 22. Un dispositivo para cultivo organotípico de alto rendimiento de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende los dispositivos 96, 384, 1536 o más de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

23. Un dispositivo para cultivo organotípico, en el que dicho dispositivo comprende:

15 un conducto de medio que tiene un extremo abierto y un extremo cerrado por una membrana porosa fusionada a su través; y un marco que sujeta el conducto de medio en una orientación sustancialmente vertical en el que el conducto de medio está adaptado mediante la presencia de una restricción para permitir la retención por capilaridad de un volumen suficiente del medio de cultivo líquido en el conducto de medio para contactar la superficie de la membrana porosa y, de este modo, suministrar nutrientes a las células que se pueden cultiva sobre la membrana porosa.

20

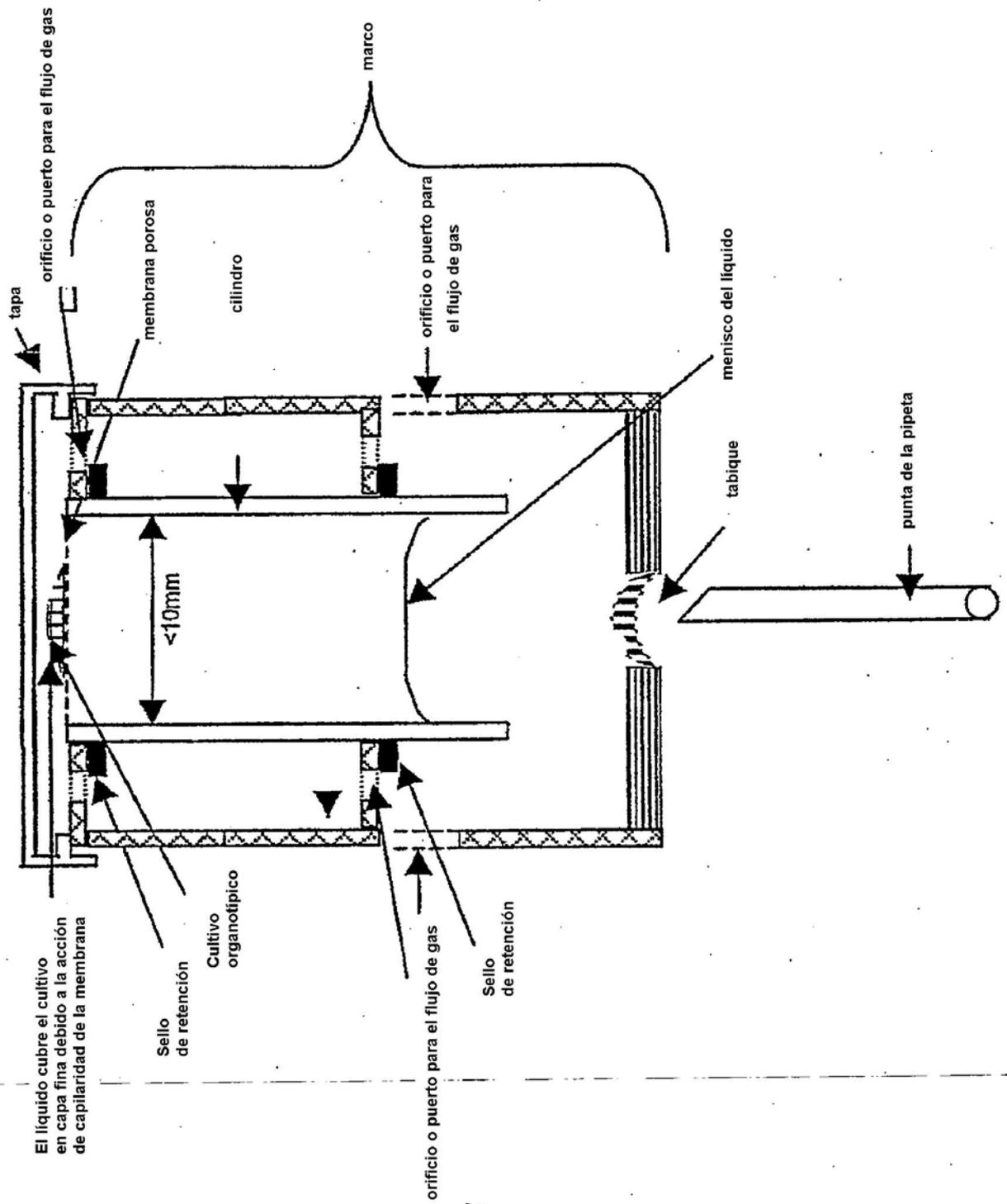
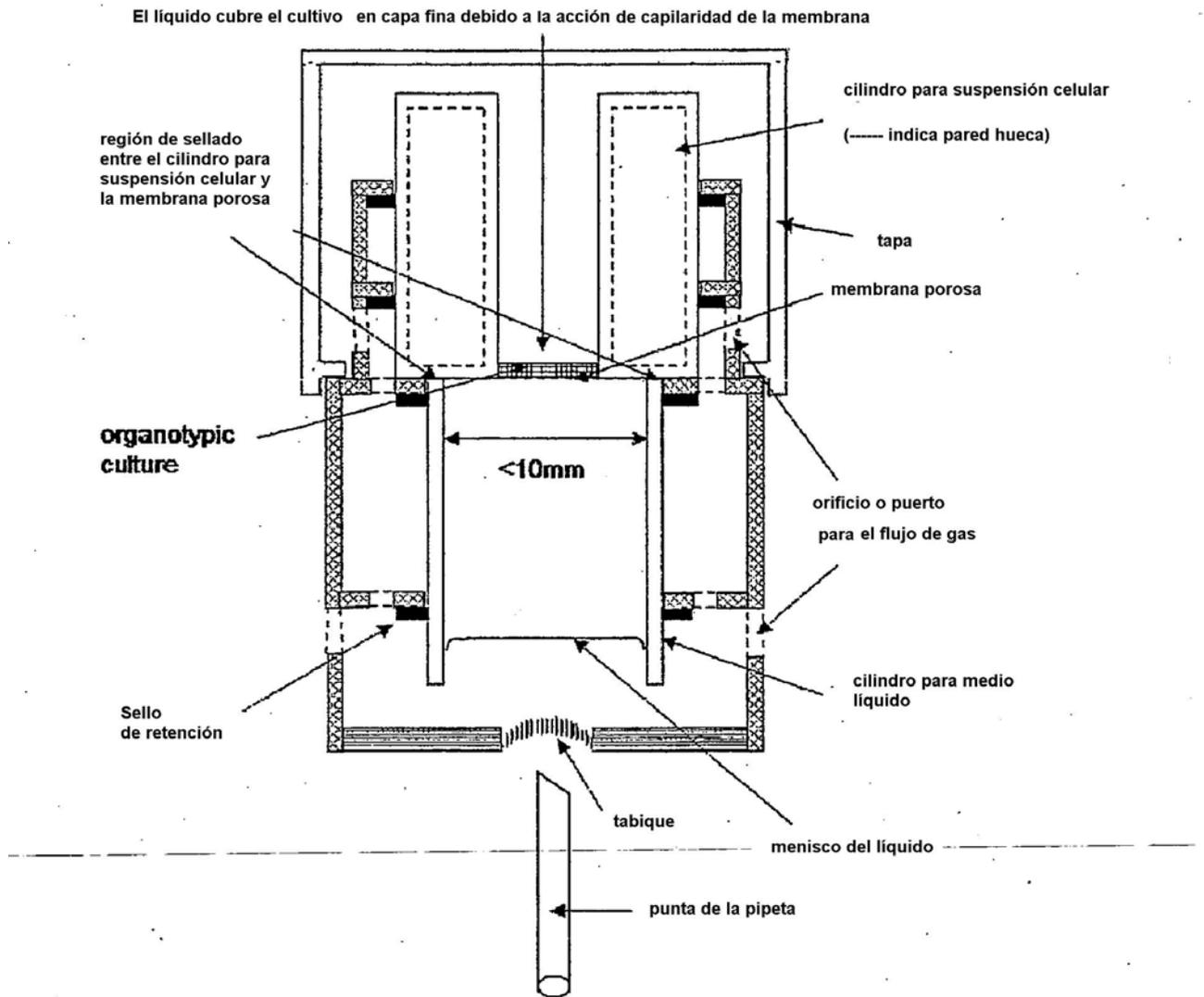


FIG. 1

FIG.2



5

10

FIG. 3

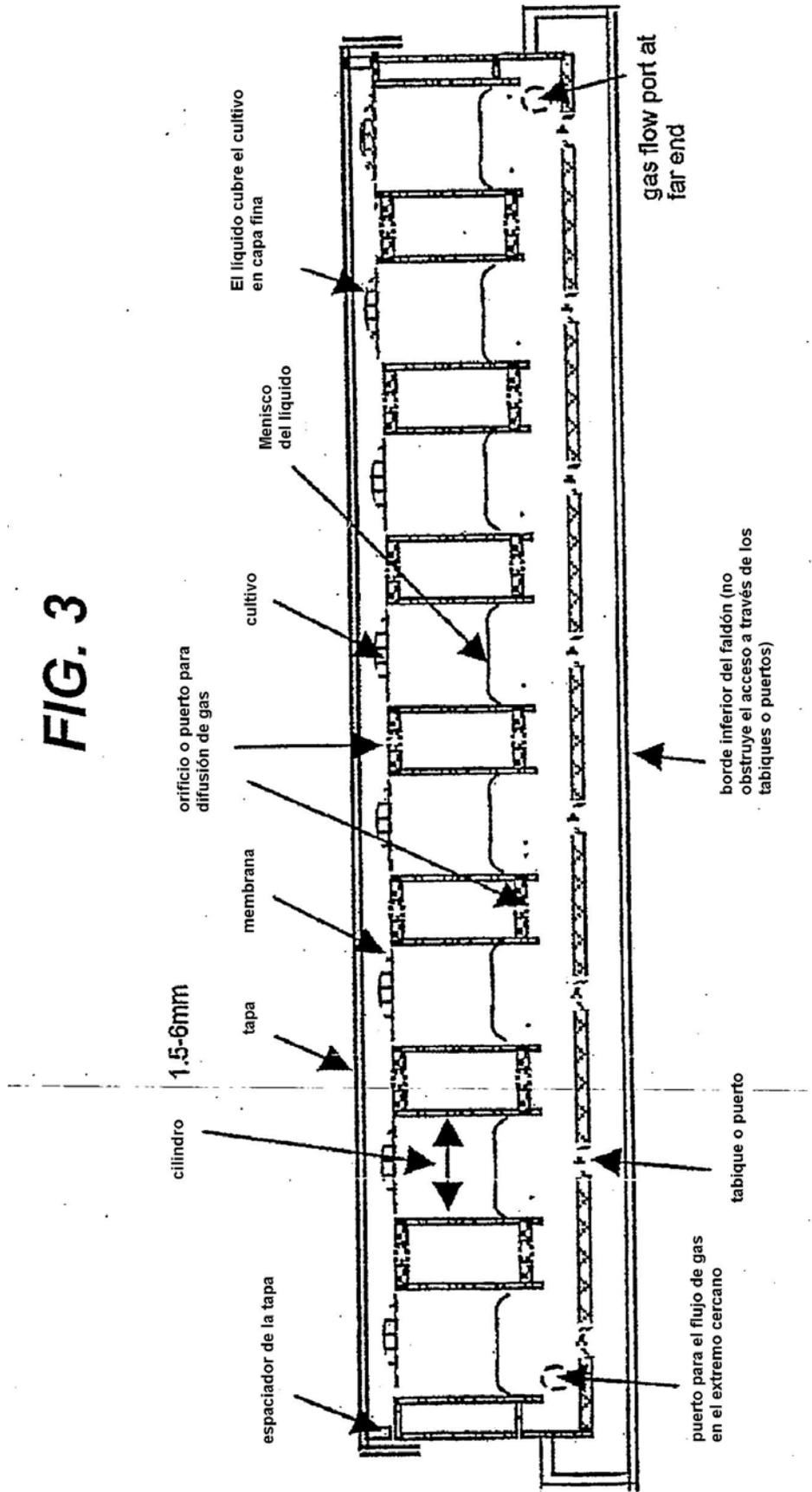
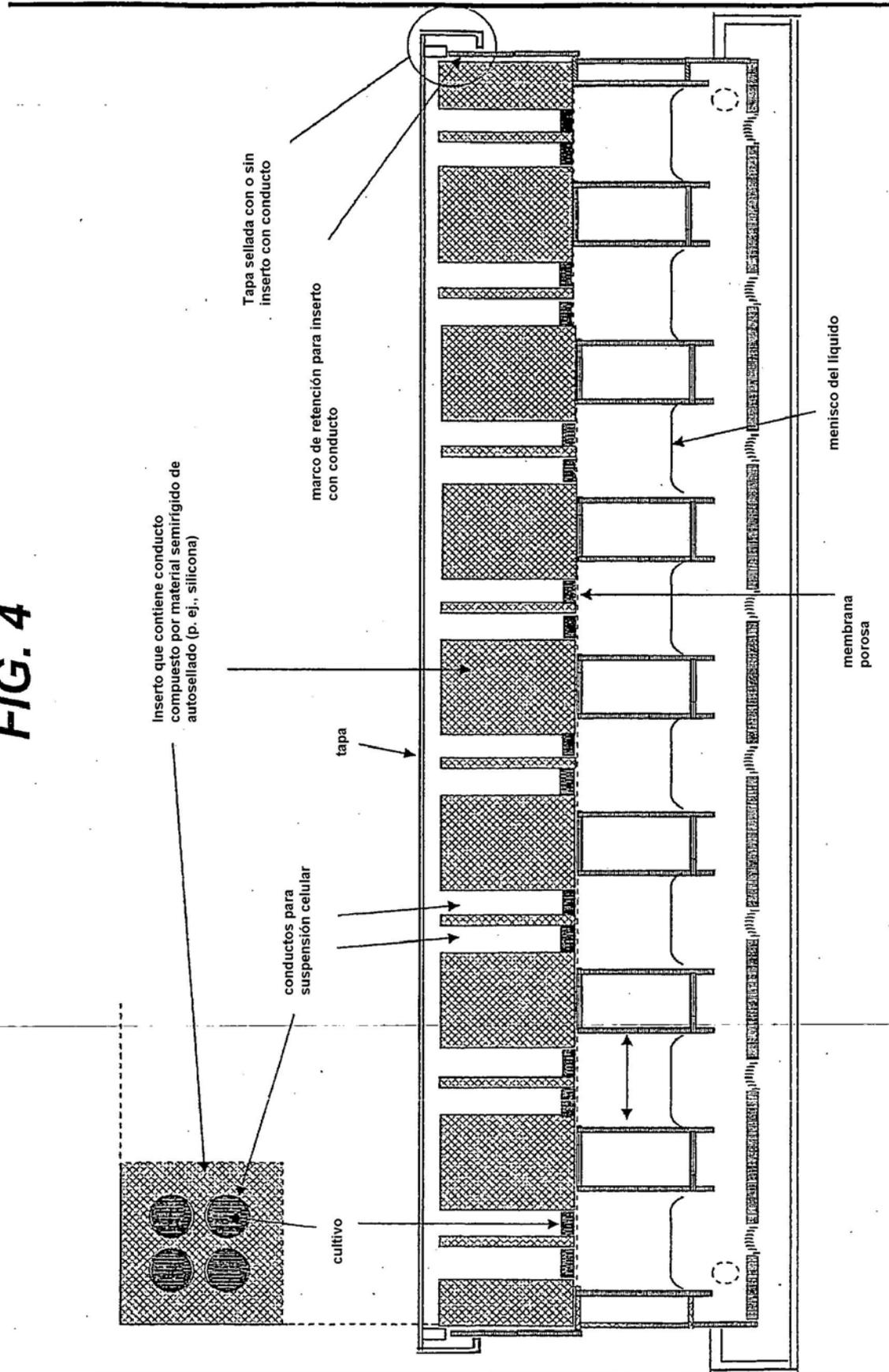


FIG. 4



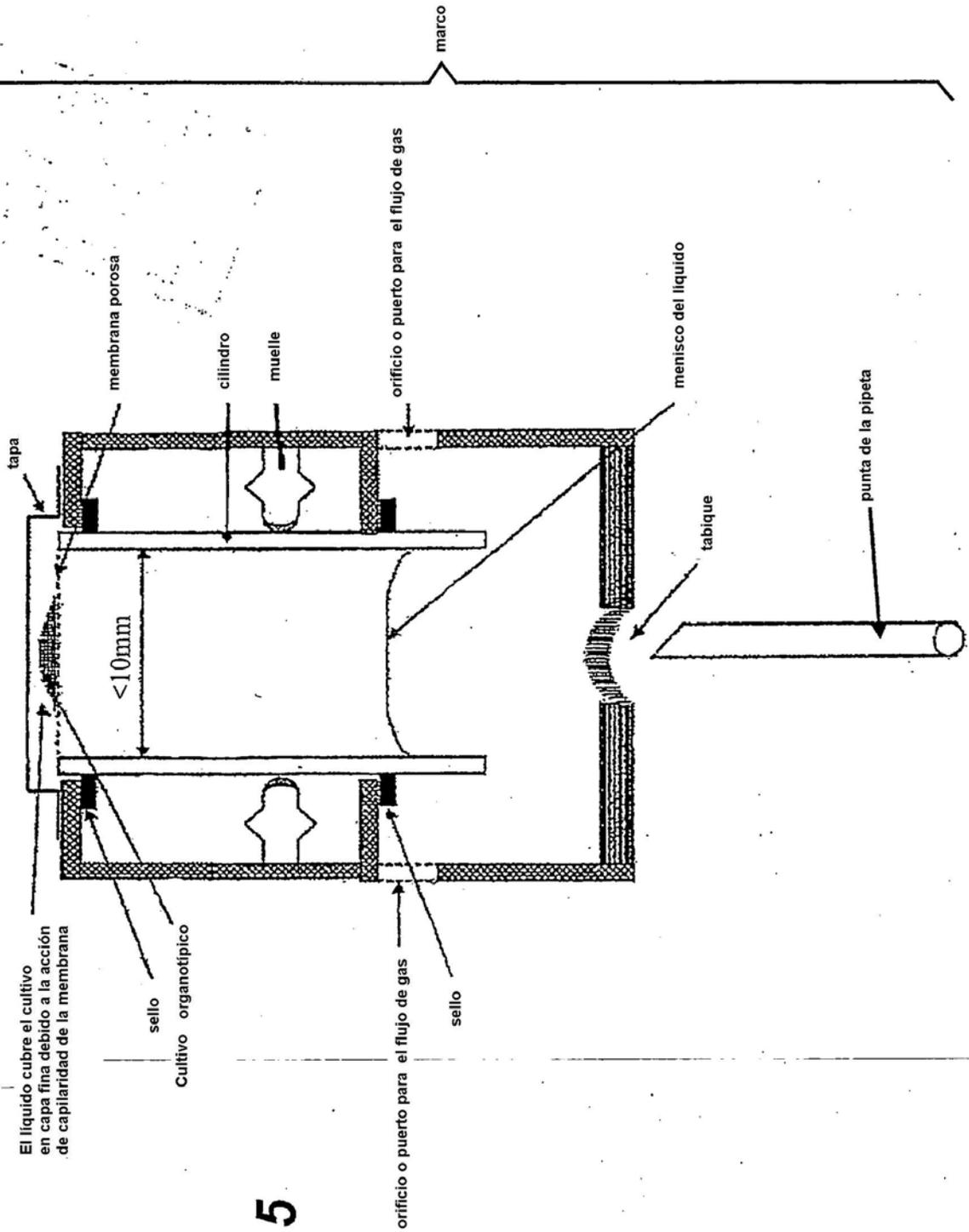


FIG. 5