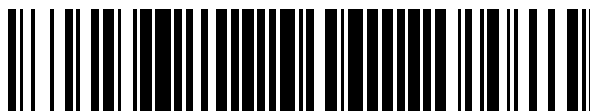


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 437**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08860287 .5**
96 Fecha de presentación: **05.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2229591**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2010**

54 Título: **Estuche y método de ensayo de células**

30 Prioridad:
05.12.2007 US 992624 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2012

73 Titular/es:
ZYOMYX, INC. (100.0%)
6519 Dumbarton Circle
Fremont, CA 94555, US

72 Inventor/es:
ZAUGG, FRANK;
TOBIAS, RENEE;
MCMANUS-MUNOZ, SILVIA;
KERNEN, PETER;
RUIZ-TAYLOR, LAURENCE y
WAGNER, PETER

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, Isabel

ES 2 389 437 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

Estuche y método de ensayo de células.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un estuche y método de ensayo de células para determinar la presencia y/o la concentración de células de un tipo determinado en una muestra de células y en particular la presencia de al menos un nivel umbral seleccionado de las células en la muestra.

10

Antecedentes de la invención

Una variedad de enfermedades, incluyendo la respuesta al tratamiento de una condición patológica, se puede controlar mediante marcadores hematológicos, usando la concentración aproximada de ciertos glóbulos blancos en una muestra de sangre como un indicador de la respuesta corporal a la enfermedad. Por ejemplo, la concentración de células linfocíticas T CD4+ en una muestra de sangre puede proporcionar un marcador para el comienzo de SIDA tras infección por VIH. Un recuento de células de menos de aproximadamente 200 células/ μ l de sangre que indica un sistema inmunitario seriamente debilitado y así la necesidad de comenzar inmediatamente con, por ejemplo, tratamiento antirretroviral (ART, por sus siglas en inglés). Algunas enfermedades, tales como la infección vírica o bacteriana, se caracterizan por una concentración aumentada de leucocitos sanguíneos, por ejemplo, por encima de aproximadamente 10.000 células/ μ l de sangre, que puede servir así como un indicador de una condición patológica infecciosa. A la inversa, la concentración de leucocitos en una muestra de sangre se puede reducir, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 4.000 células/ μ l de sangre, en un individuo que tiene leucemia o que se está sometiendo a quimioterapia o tratamiento con radiación. En estas y otras enfermedades que se caracterizan por niveles reducidos o elevados de un tipo de glóbulos blancos, se puede usar el nivel de las células marcadoras para detectar o confirmar una enfermedad o controlar la respuesta corporal al tratamiento de la afección.

En la actualidad, hay dos métodos hematológicos generales que se emplean comúnmente para determinar la concentración de una célula determinada en una muestra de células. En una primera propuesta, el tipo de célula de interés se marca con un marcador que se une específicamente a ese tipo de célula, típicamente un anticuerpo específico para antígenos. Se analiza después la muestra de células con un contador de células, por ejemplo, un citómetro de flujo o un Separador Celular Activado por Fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) para determinar el porcentaje de células con el marcador ligado a la superficie.

La segunda propuesta general es marcar células de interés y examinar un volumen de células representativo por examen microscópico, contando el número de células marcadas y no marcadas para determinar un porcentaje del tipo de célula de interés.

En las dos propuestas, en particular en el caso en que se desee determinar la concentración de un tipo de células blancas determinado, primero se puede tratar la muestra de células para eliminar los glóbulos rojos u otras células no deseadas.

Los métodos explicados en líneas generales anteriormente son aptos para los marcos de laboratorio o clínicos en que se dispone de personal de laboratorio especializado y equipo de separación celular o histológico. Sin embargo, no se prestan fácilmente a campos, tales como consultorios en centros comerciales o consultorios de campo en países del tercer mundo, donde no hay personal de laboratorio especializado ni equipo sofisticado de separación celular o de microscopía. En áreas más pobres de África, por ejemplo, estos métodos pueden ser inapropiados para ensayar recuentos de células T CD4+ en un gran número de personas, como un indicio del comienzo del SIDA tras infección por VIH o para controlar la respuesta de una persona, por ejemplo, a fármacos antirretrovirales.

Sería así deseable proporcionar un estuche y método económico, rápido, simple, para la determinación de recuentos de células sobre células relacionadas con la enfermedad, por ejemplo, células blancas seleccionadas en una muestra de sangre. En particular, dicho método y estuche deberían ser fácilmente realizables con sólo un mínimo aprendizaje y requerir poco o ningún equipo de laboratorio especial, por ejemplo, más allá de una simple, por ejemplo centrífuga de sobremesa accionada de manera manual.

La patente de EE.UU. A-5646004 desvela métodos de ensayo de muestras de células pero no se desvela una cámara de recogida alargada con dimensiones de ancho y profundidad entre 10 – 500 micrómetros.

60 Sumario de la invención

La invención incluye, en un aspecto, un método para ensayar una muestra de células por la presencia de al menos una concentración umbral de células de un tipo determinado.

La invención, en su forma más amplia, se define por las reivindicaciones independientes 1 y 16. Se definen realizaciones preferidas por las reivindicaciones 2-15 y 17-33:

5 1. Un método para ensayar en una muestra de células la presencia de al menos una concentración umbral de células de un tipo determinado, que comprende:

10 (a) hacer reaccionar una muestra de células que contiene células del tipo de células determinado con partículas capaces de unirse de manera específica a las células y que son eficaces, cuando se unen a las células, para aumentar la densidad o la susceptibilidad magnética de las células, permitiendo que se separen las células ligadas a partículas y las partículas libres de las células no ligadas a partículas en la muestra basándose en su mayor velocidad de migración por un medio seleccionado bajo la influencia de una fuerza gravitatoria o centrífuga aplicada o de campo magnético,

15 (b) hacer que las células ligadas a partículas y las partículas en la muestra de células migren por una cámara de recogida alargada con dimensiones de ancho y profundidad entre 10 - 500 micrómetros y que contiene el medio seleccionado y que tiene a lo largo de su longitud, una pluralidad de regiones de recogida de células, sometiendo la muestra a una fuerza gravitatoria o centrífuga seleccionada o de campo magnético durante un periodo de tiempo suficiente para hacer que sustancialmente todas las células ligadas a partículas y las partículas llenen completamente regiones de recogida de células sucesivas en la cámara de recogida e

20 (c) inspeccionar la cámara para determinar si se llena parcialmente o completamente al menos una región de recogida seleccionada, como prueba de que la muestra de células contiene al menos una concentración umbral de células del tipo de células determinado.

25 16. Un estuche para ensayar en una muestra de células la presencia en la muestra de al menos una concentración umbral de células de un tipo de células seleccionado, que comprende:

30 (a) un dispositivo de ensayo que tiene una cámara de muestra para admitir la muestra de células y, en comunicación de fluido con la misma, una cámara de recogida alargada con dimensiones de ancho y profundidad entre 10 - 500 micrómetros y que contiene un medio seleccionado y que tiene a lo largo de su longitud, una pluralidad de regiones de recogida de células,

35 (b) partículas que, cuando se añaden a la muestra de células, son capaces de unirse de manera específica a células del tipo de células seleccionado, y que son eficaces, cuando se unen a las células, para aumentar la densidad o la susceptibilidad magnética de las células, permitiendo que las células ligadas a partículas y las partículas en la muestra de células migren preferentemente por la cámara de recogida alargada bajo la influencia de una fuerza gravitatoria o centrífuga seleccionada o de campo magnético hasta que sustancialmente todas las células ligadas a partículas y las partículas llenen completamente las regiones de recogida de células sucesivas en la cámara de recogida e

40 (c) indicios asociados con al menos una región de recogida en la cámara de recogida del dispositivo que indiquen la concentración de células del tipo seleccionado eficaz para al menos llenar parcialmente esa región de recogida, cuando se extraen células ligadas a partículas y partículas libres por la cámara de recogida.

45 Las partículas, cuando se unen a las células en la etapa (a), pueden ser eficaces para marcar las células con un indicador detectable y dicha inspección incluye inspeccionar de manera visual en la cámara de recogida la presencia de células marcadas con el indicador detectable.

50 La etapa (b) en el método puede incluir someter las células ligadas a partículas a fuerza gravitatoria poniendo la cámara en una posición dispuesta de manera vertical, sustancialmente de pie o sometiendo a las células ligadas a partículas a una fuerza centrífuga. En estas realizaciones, el medio de densidad seleccionado presenta una densidad mayor que la de la muestra y menor que la de las partículas y las partículas pueden ser partículas de metal sustancialmente esféricas con diámetros preferidos en un intervalo de tamaño seleccionado entre aproximadamente 0,05 y 5 micrómetros, preferiblemente en el intervalo de 0,2 a 5 micrómetros.

55 Alternativamente, la etapa (b) en el método puede incluir someter a las células unidas a partículas a una fuerza de campo magnético. En esta realización, el medio de densidad seleccionada presenta una densidad mayor que la de la muestra y las partículas pueden ser partículas magnéticas (ferromagnéticas o paramagnéticas) sustancialmente esféricas, preferidas, con diámetros entre aproximadamente 5-10.000 nm, preferiblemente en el intervalo 5-50 nm.

60 La etapa (b) en el método puede incluir además añadir la muestra que contiene células ligadas a partículas a una zona de interfase aguas arriba de la cámara de recogida y mezclar de manera física las células en la muestra con un medio de densidad seleccionada en la zona de interfase.

En el caso de que la muestra de células sea una muestra de sangre, las partículas pueden presentar proteína de unión ligada a la superficie capaz de inmunoreaccionar con un antígeno específico de células sanguíneas, es decir, con un antígeno característico de un tipo o tipos de células específicos. Las partículas pueden ser tratadas superficialmente para reducir la agregación de partículas en una muestra de sangre.

5 Para detectar la concentración de células linfocíticas T CD4+ en una muestra de sangre de un individuo que puede estar infectado con VIH, como un indicador de la categoría de células –T del individuo, se puede llevar a cabo la etapa (a) de reacción exponiendo una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de unión anti-CD4+ ligado a la superficie y la etapa (c) puede basarse en la observación de la presencia de células en una
10 región de recogida que indica una concentración de células linfocíticas T CD4+ en un intervalo umbral seleccionado de entre 200-750 células/ μ l de sangre, por ejemplo, un umbral de 250, 350, 450 ó 750 células/ μ l de sangre.

En una realización, la etapa (a) puede incluir además hacer reaccionar células en la muestra con, primero, partículas capaces de unirse de manera específica a antígeno CD14 en células monocíticas y con, segundo,
15 partículas capaces de unirse de manera específica a antígeno CD4 en células linfocíticas T y células monocíticas, para conferir así en las células linfocíticas T, densidad aumentada y en las células monocíticas, tanto densidad como susceptibilidad magnética aumentadas y la etapa (b) puede incluir además, primero, eliminar monocitos ligados a partículas de la muestra de células por aplicación de una fuerza magnética eficaz para eliminar de manera selectiva los monocitos ligados a partículas de células linfocíticas T ligadas a partículas. Ambas partículas se pueden aplicar
20 también simultáneamente en relaciones definidas, que asegura que estadísticamente las células monocíticas están ligadas a al menos una partícula con susceptibilidad magnética. Otras posibles soluciones para eliminar células no deseadas con el mismo marcador superficial como las células objetivo son: i) Enmascarar los marcadores superficiales objeto de estudio con perlas estéricamente grandes con una afinidad por otros marcadores superficiales no objeto de estudio, en los tipos de células de interferencia (por ejemplo, usando perlas anti-CD14 no densas y no susceptibles de manera magnética para recubrir primero los monocitos antes de exposición de la muestra a las perlas anti-CD4), evitando así que se unan las perlas anti CD4 a los marcadores CD4 en los monocitos debido al efecto de enmascaramiento de las perlas antiCD14 que recubren los monocitos. ii) Enmascarar los marcadores superficiales objeto de estudio en células no deseadas por otros medios como usando complejos de anticuerpos tetrámeros mediados por anticuerpo que presentan especificidad para ambos, por ejemplo antígeno
25 CD14 y marcadores superficiales de glóbulos rojos, enmascarando así los monocitos cubriéndolos con una capa densa de glóbulos rojos. iii) Las células no objeto de estudio interferentes se pueden eliminar capturando de manera específica estas células mediante una matriz sólida que contiene, por ejemplo, anticuerpos frente a marcadores superficiales sólo presentes en las células interferentes. Por ejemplo, se puede inmovilizar anticuerpo antiCD14 en una matriz de filtro. Después de exponer la muestra de sangre a esa matriz de filtro, se agotan los monocitos de la muestra de sangre por unión a esa matriz, después de lo cual se expone la muestra de sangre a las partículas antiCD4.
35 antiCD4.

Para detectar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener una infección u otra afección que conduzca a una elevación de leucocitos en la sangre, se puede llevar a cabo la etapa
40 (a) de reacción por exposición de una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y la etapa (c) puede estar basada en la observación de la presencia de células en una región de recogida que indica una concentración de leucocitos mayor que aproximadamente 10.000 células/ μ l de sangre.

45 Para controlar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de leucocitos en la sangre, debido a quimioterapia, tratamiento con radiación o leucemia, se puede llevar a cabo la etapa (a) de reacción por exposición de una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y la etapa (c) puede estar basada en la observación de la presencia de células en una región de recogida que indica una concentración de leucocitos menor que
50 aproximadamente 4.000 células/ μ l de sangre.

Para controlar la concentración de neutrófilos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de neutrófilos en la sangre, debido a quimioterapia o tratamiento con interferón, se puede llevar a cabo la etapa (a) de reacción por exposición de una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de
55 unión anti-neutrófilos ligado a la superficie y la etapa (c) puede estar basada en la observación de la presencia de células en una región de recogida que indica una concentración de neutrófilos en un intervalo seleccionado entre 500 y 2.500 células / μ l de sangre, por ejemplo, 500; 2.000 o 2.500 células/ μ l de sangre.

60 Para detectar la concentración de células bacterianas en una muestra de sangre de un individuo infectado, como un indicador de la extensión y el tipo de infección, se puede llevar a cabo la etapa (a) de reacción por exposición de una muestra de fluido de sangre u orina del individuo a partículas con un agente de unión ligado a la superficie capaz de unirse de manera específica a uno o más antígenos de la pared bacteriana seleccionados y la etapa (d) puede estar basada en la observación de la presencia de células en una región de recogida que corresponde a una concentración detectable de células bacterianas en la muestra de sangre.
65

En otro aspecto, la invención incluye un estuche para ensayar en una muestra de células la presencia en la muestra de al menos una concentración umbral de células de un tipo de células seleccionado. El estuche se define en la reivindicación 16.

- 5 En diversas realizaciones: (1) la cámara de recogida incluye una columna de recogida, las regiones de recogida dentro de la columna incluyen segmentos de longitud definida a lo largo de una sección de la columna y las regiones de recogida están adaptadas para llenarse de manera sucesiva en la etapa en una dirección aguas abajo a aguas arriba a lo largo de la longitud de la columna de la cámara de recogida; (2) la cámara de recogida incluye un conducto de recogida alargado y, formando las regiones de recogida dentro del conducto de recogida, una pluralidad de cavidades dispuestas dentro del conducto a lo largo de su longitud y las regiones de recogida están adaptadas para llenarse de manera sucesiva en una dirección aguas arriba a aguas abajo a lo largo de la longitud de la columna; (3) la cámara de recogida incluye un conducto de recogida con una pluralidad de segmentos de flujo orientados en contraposición y, formando las regiones de recogida dentro del conducto de recogida, una pluralidad de cavidades con borde dispuestas entre segmentos de flujo adyacentes, de manera que las células que migran de un segmento de flujo a otro, en una dirección aguas arriba a aguas abajo, son atrapadas en la cavidad entre los dos segmentos de flujo hasta que se llena esa cavidad; (4) la cámara de recogida incluye un conducto de recogida que está orientado con respecto a la dirección de flujo de células unidas a partículas dentro del conducto bajo una fuerza gravitatoria y, formando las regiones de recogida dentro del conducto de recogida, una pluralidad de cavidades dispuestas a lo largo de una porción de la superficie externa del conducto, de manera que las células que migran por el conducto de recogida, en una dirección aguas arriba a aguas abajo, son atrapadas en la cavidad más aguas arriba hasta que se llena y (5) la cámara de recogida incluye un conducto de flujo que se extiende sustancialmente de manera transversal con respecto a la dirección de flujo de células unidas a partículas bajo una fuerza gravitatoria y, formando las regiones de recogida dentro de la cámara de recogida, una pluralidad de cavidades dispuestas a lo largo de una longitud del conducto de flujo, de manera que las células que fluyen por el conducto de flujo, en una dirección aguas arriba a aguas abajo, sedimentan en la cavidad más aguas arriba hasta que se llena, después de lo cual las cavidades se llenan sucesivamente en una dirección aguas arriba a aguas abajo.

El dispositivo puede incluir además una cámara de captación que comunica con la cámara de muestra y las partículas (b) pueden incluir un primer tipo de partículas capaces de unirse específicamente a un antígeno presente en células del tipo seleccionado y en unas células de un tipo no seleccionado y un segundo tipo de partículas capaces de unirse específicamente a un antígeno presente en células del tipo no seleccionado sólo, permitiendo que las partículas ligadas al segundo tipo de partículas se eliminen de manera selectiva por migración a la cámara de captación, antes de la migración de las células del tipo seleccionado, que están ligadas al primer tipo de partícula sólo, para migrar de manera selectiva por la cámara de recogida.

En el caso de que las células unidas a partículas se adapten para migrar por la zona de recogida bajo la influencia de una fuerza gravitatoria o centrífuga aplicada, las partículas pueden ser partículas de metal sustancialmente esféricas con diámetros en un intervalo de tamaños seleccionado preferido entre aproximadamente 0,2 y 2 micrómetros. Para detectar células de un tipo determinado en una muestra de sangre, las partículas pueden tener proteína de unión ligada a la superficie capaz de inmunoreaccionar con un antígeno específico de células sanguíneas. Las partículas pueden estar tratadas superficialmente para reducir la agregación de partículas en una muestra de sangre, por ejemplo, recubiertas con un recubrimiento de polímero hidrófilo tal como cadenas poliméricas de polietilenglicol.

En el caso de que las células ligadas a partículas se adapten para migrar por la zona de recogida bajo la influencia de una fuerza de campo magnético, las partículas pueden ser partículas magnéticas sustancialmente esféricas con diámetros en un intervalo de tamaños seleccionado, preferido, entre aproximadamente 5-50 nm.

Para detectar la concentración de células linfocíticas T CD4+ en una muestra de sangre de un individuo que puede estar infectado con VIH, como un indicador de la categoría de células T del individuo, las partículas pueden tener agente de unión anti-CD4 ligado a la superficie y los indicios se pueden diseñar para indicar una concentración de células linfocíticas T CD4+ de aproximadamente 200 células/ μ l de sangre y/o una concentración de células de aproximadamente 500 células/ μ l de sangre.

Para detectar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener una infección u otra afección que conduzca a una elevación de leucocitos en la sangre, las partículas pueden tener agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y los indicios se pueden diseñar para indicar una concentración de leucocitos mayor que aproximadamente 10.000 células/ μ l de sangre.

Para controlar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de leucocitos en la sangre, debido a quimioterapia, tratamiento con radiación o leucemia, las partículas pueden tener agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y los indicios se pueden diseñar para indicar una concentración de leucocitos menor que aproximadamente 4.000 células/ μ l de sangre.

Para detectar la concentración de neutrófilos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de neutrófilos en la sangre, debido a quimioterapia o tratamiento con interferón, las partículas pueden tener agente de unión anti-neutrófilos ligado a la superficie, tal como CD16 y los indicios se pueden diseñar para indicar una concentración de neutrófilos en un intervalo seleccionado entre 500 y 2.500 células / μ l de sangre.

Para detectar la presencia de una infección bacteriana en una muestra de sangre u orina de un individuo infectado, las partículas pueden tener agente de unión ligado a la superficie capaz de unirse específicamente a un antígeno de la pared bacteriana y los indicios se pueden diseñar para indicar la presencia de células en la muestra de sangre u orina.

El estuche puede incluir además un soporte del dispositivo para soportar el dispositivo y para aplicar al dispositivo soportado una fuerza centrífuga o de campo magnético.

Estas y otras características de la invención llegarán a ser más completamente evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos que se adjuntan.

Breve Descripción de los Dibujos

La Fig. 1 es una vista en planta de un dispositivo de ensayo que forma parte del estuche de la invención, en una realización general;

La Fig. 2 ilustra procesos de unión y migración celular subyacentes al funcionamiento del estuche de ensayo de la invención, en una realización general;

Las Figs. 3A-3C muestran vistas transversales de las cámaras de recogida en una segunda realización general del dispositivo de la invención, en que la cámara de recogida incluye una pluralidad de segmentos de flujo orientados y cavidades con borde dispuestas entre segmentos de flujo adyacentes (Figs. 3A y 3B) y en que la cámara de recogida está orientada con respecto a la dirección de flujo de células unidas a partículas dentro del conducto bajo una fuerza aplicada y con una pluralidad de cavidades dispuestas a lo largo de una porción de la superficie externa del conducto (Fig. 3C);

La Fig. 4 ilustra la acumulación de células unidas a partículas en cavidades en los dispositivos ilustrados en la Fig. 3B, sucesivamente en una dirección aguas arriba a aguas abajo;

La Fig. 5 es una vista transversal de la cámara de recogida en una tercera realización general de la invención;

La Fig. 6 ilustra el uso de un dispositivo de ensayo según la invención usado para detectar niveles umbral de células CD4+ en un individuo;

Las Figs. 7A-7C muestran el punto final de una operación de ensayo realizada según el método de la invención, en vista esquemática (7A), imagen fotográfica (7B) y lectura Fluorescente (7C);

La Fig. 8 muestra resultados del punto final en el método de ensayo de la invención, para perlas solas (línea de la izquierda) y 1×10^5 células, línea media y 5×10^5 células (línea de la derecha);

Las Figs. 9A y 9B ilustran un ensayo usando un dispositivo de dos cámaras que permite la eliminación inicial de un tipo de células no deseado que comparte un antígeno de superficie crítico con el tipo de células de interés y

Las Figs. 10A-10C ilustran un dispositivo de muestra en un soporte adecuado para migración de células por sedimentación (10A) o bajo una fuerza aplicada de centrifugación (10B) o de campo magnético (10C).

Descripción Detallada de la invención

I. Definiciones

A menos que se especifique de otro modo, los términos más adelante presentan el siguiente significado en la presente memoria:

Una "muestra de células" se refiere a cualquier muestra líquida que contiene o se sospecha que contiene uno o más tipos de células en suspensión. Una muestra de células incluye una "muestra de fluido corporal," refiriéndose, por ejemplo, a una muestra de sangre, orina o saliva obtenida del cuerpo de un ser humano u otro animal. Una muestra de sangre puede ser sangre completa o sangre tratada o sangre completa en que se ha retirado todo o el volumen de glóbulos rojos. Otras posibles muestras de células incluyen, por ejemplo, cultivos celulares, extractos celulares obtenidos de muestras de tejido, agua residual. Muestras celulares que se sospecha que contienen células incluyen, por ejemplo, leche y otro alimento que esté contaminado con un tipo, por ejemplo, de célula o bacteria, no deseado.

"Concentración" de células en una muestra de células se refiere al número de células en un volumen de muestra de células determinado. El término se expresa típicamente como el número de células/por volumen de muestra.

5 Un "nivel o concentración umbral de células de un tipo determinado" se refiere a un número umbral de las células contenidas en un volumen determinado de muestra, también expresado como una concentración de células, tal como un número de células CD4+ mayor que 500 células/μl de muestra de sangre o número de células CD4+ menor que 200 células/μl de muestra de sangre.

10 "Sedimentación" de células se refiere a partículas en una suspensión líquida que sedimenta de la suspensión, o hacia el fondo de la suspensión o en otro medio líquido de diferente densidad o viscosidad, bajo la influencia de una fuerza gravitatoria.

15 Células de un tipo determinado" o células de "analito" se refiere a células cuya concentración en una muestra se tiene que ensayar. Las células pueden ser partículas bacterianas o víricas, por ejemplo, de una muestra de fluido corporal, células de mamífero, tales como los tipos de glóbulos blancos enumerados en la tabla más adelante o fragmentos de células tales como plaquetas, de una muestra sanguínea, células de mamífero procedentes de tejido u órgano, tales como células cancerosas procedentes de un tumor sólido u otra masa de tejido, células de plantas o animales cultivadas u otras disociadas, células de eucariotas de una sola célula, tales como células de levadura y células contenidas en muestras industriales, medioambientales o urbanas, por ejemplo, bacterias contenidas en
20 muestras de suelo o aguas residuales. Un tipo determinado de célula blanca puede estar caracterizado típicamente por marcadores de antígeno específico de la superficie celular, tales como CD, los marcadores de antígeno CD característicos de tipos de células blancas indicados en la tabla a continuación.

Tipo de célula	Marcadores CD
<u>células del tallo</u>	<u>CD34+</u> , <u>CD31-</u>
<u>todos grupos leucocitos</u>	<u>CD45+</u>
<u>Granulocito</u>	<u>CD45+</u> , <u>CD15+</u>
<u>Monocito</u>	<u>CD45+</u> , <u>CD14+</u>
<u>Linfocito T</u>	<u>CD45+</u> , <u>CD3+</u>
<u>Célula T ayudante</u>	<u>CD45+</u> , <u>CD3+</u> , <u>CD4+</u>
<u>Célula T citotóxica</u>	<u>CD45+</u> , <u>CD3+</u> , <u>CD8+</u>
<u>Linfocito B</u>	<u>CD45+</u> , <u>CD19+</u> o <u>CD45+</u> , <u>CD20+</u>
<u>Trombocito</u>	<u>CD45+</u> , <u>CD61+</u>
<u>Célula asesina natural</u>	<u>CD16+</u> , <u>CD56+</u> , <u>CD3-</u>

25 La "migración" de células se refiere al movimiento de células por un medio, teniendo típicamente una densidad seleccionada, bajo la influencia de una fuerza gravitatoria, o una fuerza centrífuga aplicada o de campo magnético.

30 Las partículas, tales como partículas de metal, son eficaces para aumentar la densidad de células a las que se unen las partículas. Las células y partículas unidas presentan una densidad mayor combinada que las células solas, como prueba, por ejemplo, la mayor velocidad de migración de las células y partículas unidas por un medio de densidad determinada, bajo la influencia de una fuerza gravitatoria o centrífuga aplicada.

35 Las partículas magnéticas, incluyendo partículas ferromagnéticas y paramagnéticas, son eficaces para aumentar la susceptibilidad magnética de las células a la que se unen las partículas si las células y partículas unidas presentan una susceptibilidad magnética combinada mayor que las células solas, como prueba, por ejemplo, la mayor velocidad de migración de las células y partículas unidas por un medio de densidad y/o viscosidad determinada, bajo la influencia de un campo magnético aplicado.

40 La "susceptibilidad magnética" es una medida de la intensidad de magnetización de un cuerpo colocado en un campo magnético uniforme.

"Microcanal" o canal o columna de microescala" se refiere a un canal o columna con dimensiones en el intervalo de microescala, típicamente entre 10-500, por ejemplo, 50-100 micrómetros en ancho y profundidad.

II. Dispositivo y estuche de ensayo

La Fig. 1 muestra un estuche 20 de ensayo de células construido según una realización de la invención. El dispositivo incluye un sustrato o apoyo 22 en que se montan o al que se incorporan otros componentes del dispositivo. Por ejemplo, ciertos componentes del depósito y canal descritos más adelante se pueden incorporar al sustrato como componentes microfluídicos formados según métodos conocidos entre dos placas de sustrato, por ejemplo, en el caso de que los componentes de depósito y canal se formen como cavidades en una placa 24 inferior que está cubierta por una placa 26 de cubierta superior. En una realización preferida, las cámaras y los microcanales de conexión del dispositivo se construyen de un material de superficie lisa, como vidrio o material polimérico duro y la cámara y las superficies del canal están recubiertas con un recubrimiento para minimizar la unión no específica de células a las paredes del canal. Por ejemplo, las paredes del canal pueden estar recubiertas por copolímeros poliiónicos pegilados como se describe en las Patentes de EE.UU. Nos. 5567440, 6884628 y 5462990. Se pueden emplear otros recubrimientos conocidos en la técnica para reducir o evitar la adhesión no específica o no deseada de células a las paredes del canal tales como recubrimientos basados en silanos específicos, monocapas autoensambladas de alcanotiol, copolímeros PEG, tensioactivos y capas inorgánicas o proteínas adsorbidas de manera pasiva como, por ejemplo, BSA o sueros sanguíneos.

Como se observa en las figuras, el dispositivo incluye una cabeza 28 de muestreo diseñado para absorber una muestra de células, por ejemplo, por capilaridad, por inmersión de la cabeza en la muestra. La cabeza de la muestra puede ser una aguja para punción digital u otra estructura capilar para extraer un volumen fijado de muestra. La cabeza se conecta a una cámara 30 de muestra por un conducto 32 del microcanal. La cámara de muestra se puede llenar previamente con un volumen determinado de una suspensión de partículas (i) capaces de unión específica al tipo determinado de célula que se tiene que ensayar (ii) cuando se unen a las células, aumentando sustancialmente la densidad o susceptibilidad magnética de las células, es decir, imparten una densidad o susceptibilidad magnética sustancialmente mayor a las células a las que se unen las partículas. Partículas adecuadas para uso en la invención se describirán más adelante con referencia a la Fig. 2. El dispositivo mostrado en la Fig. 1 y las partículas contenidas en o añadidas a la cámara de muestra con la muestra, se refiere también en la presente memoria, conjuntamente, como un estuche de ensayo.

Se conecta un depósito 34 de desagüe en el dispositivo a la cámara 30 de muestra por un conducto 36 de microcanal y funciona para admitir líquido de desagüe a medida que se añade al dispositivo un volumen determinado de muestra. La cámara de muestra comunica a lo largo de su extremo inferior con una cámara 38 de interfase. Como se ve, la cámara 38 en la Fig. 1 disminuye gradualmente en una dirección descendente desde un solo lado; una cámara 38' de interfase de función equivalente en la Fig. 2 disminuye gradualmente de manera simétrica desde ambos lados de la cámara de muestra y en la Fig. 6, se forma una zona de interfase como cámaras 38", 39" separadas, respectivamente.

El extremo inferior de la cámara 38 en la Fig. 1 (o cámara 38' en la Fig. 2 o la cámara 39" en la Fig. 6) está en comunicación de fluido con una cámara 40 de recogida alargada. En la realización general mostrada en las Figs. 1, 2 y 6, la cámara de recogida es un microcanal alargado que tiene segmentos de longitud definida a lo largo de una longitud de la columna, tal como el segmento 42 definido por un par de marcadores, o indicios, tales como los marcadores 44 indicados a lo largo de una longitud de la columna. Como se ve en la Fig. 2, estos segmentos o regiones de la columna, que se indican por los indicios indicados, se usan para determinar el número de células, o recuento de células de la muestra, cuando se determina por la altura de la parte superior del tapón de células que ha migrado a la columna. Así los indicios indicados a lo largo de la longitud de la columna proporcionan una lectura de los resultados del ensayo. Aunque no se muestra en la presente memoria, el dispositivo se puede proporcionar con un elemento de lente colocado enfrente de la cámara de recogida para aumentar la detección de células dentro de la región celular. También se considera la detección de los niveles de células dentro de la cámara de recogida por control espectroscópico o electrónico, según métodos conocidos, aunque una ventaja de la realización ilustrada es que la lectura del ensayo puede estar determinada por simple inspección visual de la distribución de células dentro de la cámara de recogida.

Como se apreciará a partir de los procedimientos de ensayo descritos más adelante, el volumen total de células recogidas en la cámara de recogida reflejará el volumen combinado de ambas células con partículas ligadas y partículas libres. En el caso de partículas mayores, por ejemplo, en el intervalo de tamaño de 0,5 a 5 micrómetros, las partículas pueden hacer una contribución mensurable al volumen total de células en la cámara de recogida. En este caso, la contribución al volumen de las partículas puede ser compensada por la proporción en los segmentos de depósito, un segmento "nulo" que corresponde al volumen de las partículas añadidas solas. En esta configuración, el volumen total de células con partículas ligadas más cualquier partícula libre será asumido que es igual al volumen total de partículas libres más el volumen total de células naturales sin partículas ligadas. En el caso de que las partículas sean bastante pequeñas, por ejemplo, para partículas magnéticas pequeñas, la contribución al volumen de las partículas puede ser insignificante, en cuyo caso no puede haber la necesidad de ajustar los volúmenes del

depósito para efectos de volumen de partícula. Sin embargo, incluso en el caso de partículas relativamente pequeñas, si se añade a las células un exceso de partículas en gran número, por ejemplo, para asegurar la reacción completa en una muestra que contiene una alta concentración de células de analito, las partículas pueden hacer una contribución apreciable al volumen de apilamiento o agotamiento medido, que requiere el ajuste de los volúmenes del depósito para compensar el volumen de las partículas. El efecto del volumen de partícula se puede determinar fácilmente, por ejemplo por centrifugación de la cantidad de partículas que se tienen que añadir a la muestra por la cámara de recogida y midiendo la contribución al volumen de las partículas solas.

Completando la descripción de lo que se muestra en la Fig. 1, un puerto 46 lleno comunicado con el extremo inferior de la columna 40 por un microcanal 48, que permite que se llene la columna y la zona de interfase con un medio de densidad adecuada al tiempo de fabricación o justo antes de un ensayo. En una realización general en que las células migran por el medio bajo la gravedad o una fuerza centrífuga aplicada, el medio presenta una densidad específica menor que la de células unidas a partículas formadas en la cámara de la muestra y preferiblemente igual a o mayor que las células de la muestra no unidas a las partículas.

Las Figs. 2 y 3 ilustran la reacción celular y los procesos de migración subyacentes al funcionamiento del dispositivo. En la Fig. 2, se llena la cámara 30 de la muestra con una suspensión preexistente, determinada, de partículas o perlas de reacción y admite un volumen definido de muestra para llenar la cámara o admite un volumen combinado definido de muestra mezclada previamente y reaccionada previamente con un volumen determinado de suspensión de partículas. En el caso de que se permita que las células migren a, y a través de, la cámara de recogida bajo una fuerza gravitatoria o centrífuga aplicada, las partículas añadidas a las células de la muestra son de densidad relativamente alta, típicamente mayor que aproximadamente 5 gm/cc y están compuestas por metal, material cerámico, vidrio de alta densidad y similares. Las partículas se recubren, por ejemplo, por unión covalente, con un agente de unión capaz de unión de alta afinidad específica a un antígeno de superficie celular único para las células de interés en el ensayo. Así, por ejemplo, en un ensayo para células CD4+, las partículas pueden estar recubiertas con anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, específicos para el antígeno CD4+.

Una variedad de anticuerpos específicos de antígeno celular está comercialmente disponible o es fácilmente obtenible por métodos de anticuerpos monoclonales conocidos. Una partícula ejemplar es una micropartícula de oro de 1 micrómetro con anticuerpos monoclonales unidos vía grupos químicos amina o carboxilo en las superficies de las partículas y con una densidad próxima a la del oro, de aproximadamente 19,3 gramos/cc. Otras partículas incluyen partículas de tamaño del micrómetro o coloidales de otros metales, óxidos o polímeros (por ejemplo, hierro, plata, vidrio, silicio o micro o nanopartículas de PTFE), así como partículas SERS (espectroscopía Raman de superficie aumentada) de plata u oro, partículas de metal recubiertas con polímero y puntos cuánticos. Las partículas son también preferiblemente eficaces para marcar las células con un indicador detectable. El informador puede ser la propia partícula, tal como partículas de oro que se pueden visualizar fácilmente en forma concentrada o pueden ser una marca añadida, tal como una marca fluorescente unida a las partículas directamente o al agente de unión que recubre las partículas. Las partículas magnéticas o paramagnéticas adecuadas para uso en aplicación biológica y con grupos químicos superficiales adecuados para adición de agentes de unión específicos de células son conocidos y están fácilmente disponibles, por ejemplo, en invitrogen (Carlsbad, CA).

Las partículas se pueden tratar superficialmente o recubrir, adicionalmente, para reducir la tendencia de las partículas a autoagregarse en suspensión. En un método ejemplar, las partículas se recubren con un polímero hidrófilo, preferiblemente uno que está muy solvatado en un medio acuoso, tal como cadenas poliméricas de polietilenglicol. Se conocen métodos para preparar partículas con grupos reactivos superficiales, tales como grupos alcohol, ácido o amina, uniendo cadenas poliméricas a tales grupos.

En la Fig. 2, las células no del analito, tales como las células 50 se indican por cuadrados vacíos, las células del analito, tales como las células 52, por círculos vacíos, las partículas de unión a las células, tales como las partículas 54, por círculos sólidos y las células unidas a partículas, tales como la célula 56 por círculos vacíos oscurecidos. Inicialmente, la muestra y las partículas se pueden mezclar previamente y hacer reaccionar en un conducto separado, se añaden después juntas a la cámara de la muestra permitiendo que las células reaccionadas sedimenten desde la cámara de la muestra por la zona de sedimentación a la cámara de recogida. Alternativamente, la muestra se puede añadir directamente a la cámara de la muestra por reacción con partículas en la cámara, en cuyo caso el dispositivo se puede poner en una posición horizontal para evitar que sedimenten partículas y células hacia la columna de recogida antes de que se complete la reacción de unión a las células.

Después de un tiempo de reacción adecuado, por ejemplo, 10 minutos, el dispositivo se pone en un soporte adecuado para activar la migración de las células con partículas ligadas para migrar a la cámara de recogida, como se ilustra en las Figs. 10A-10C. En el caso de que la migración de las partículas por la zona de recogida sea por sedimentación bajo la gravedad, el soporte actúa simplemente para poner la cámara de recogida en una posición de pie y preferiblemente de pie de manera vertical, como se muestra en la Fig. 10A, en el caso de que el dispositivo de ensayo con una cámara 140 de recogida se ponga en un soporte 144 de sobremesa adaptado para soportar el dispositivo en una posición de pie, sustancialmente vertical. En el caso de que la migración de partículas sea por centrifugación, el soporte puede ser simplemente un soporte del conducto que está adaptado para poner en la

5 cabeza de una centrífuga, por ejemplo, un soporte del conducto de la centrífuga de sobremesa típico, como se ilustra en la Fig. 10B. En la presente memoria se acopla el dispositivo 146 de ensayo que tiene una cámara 148 de recogida, por ejemplo, admitiendo cavidades en el lado opuesto del dispositivo mediante los brazos 151 extensibles de una horquilla 152 en forma de U que se soporta por rotación sobre el eje 150 de una centrífuga, por rotación
 10 alrededor del eje. La centrífuga puede ser, por ejemplo, una centrífuga de sobremesa accionada manualmente, económica. La centrífuga y la horquilla unida sirven así como soporte del dispositivo en esta realización. En el caso de que la migración de partículas sea por aplicación de un campo magnético, el soporte puede ser simplemente un estante con un imán permanente o electroimán en su base, como se muestra en la Fig. 10C, que ilustra un dispositivo 154 de ensayo que tiene una cámara 156 de recogida montada de pie en un estante 158. Se usa un imán
 15 160 permanente en el extremo inferior del estante para extraer células ligadas a perlas magnéticas en y por la cámara de recogida. En cada modo, el ensayo fomenta que las células ligadas a partículas (y partículas libres) migren a través de la zona de interfase (cámara 38') y a la columna 40, donde se acumulan las células a una profundidad final proporcional al número de células ligadas a partículas en muestra añadida. Las marcas indicadas por la columna se calibran para indicar el número de células, indicado preferiblemente como una concentración de células, correspondiendo a un volumen de muestra determinado. El soporte mostrado en cada realización puede formar parte de un estuche de ensayo, según la presente invención, que también incluye el dispositivo de ensayo y las partículas específicas de células reaccionadas con la muestra de células.

20 En otra realización de la invención, ilustrada en las Figs. 9A y 9B, la muestra de células contiene células de analito con un marcador de superficie celular determinado y células no deseadas que tienen tanto el marcador de células de analito como un segundo marcador específico de células. Para fines de ilustración, se describirá un ensayo de células para células T CD4+ en una muestra de sangre. Las células en la muestra contienen tanto células T CD4+ como monocitos no deseados con antígeno CD4 de superficie, mientras que los monocitos contienen adicionalmente antígeno de superficie CD14. La muestra de células se hace reaccionar con partículas pesadas recubiertas con anticuerpos frente a uno de los dos antígenos, con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos frente al otro de los dos antígenos de superficie celular. El dispositivo de ensayo, mostrado en 130, incluye una muestra receptora y zona o zonas 136 de interfase, una cámara 136 de recogida y una cámara 134 de captación para recoger los monocitos no deseados.

30 En el ensayo ilustrado en la Fig. 9A, la muestra de células se hace reaccionar con una mezcla de partículas pesadas, por ejemplo, partículas de oro, que son inmunoreactivas con antígeno CD4 y, por lo tanto, se unirán tanto a células T CD4+ como a monocitos CD4+ y perlas magnéticas que son inmunoreactivas con CD14, y por lo tanto reaccionarán con los monocitos CD4/CD14. Después de un tiempo de reacción adecuado, se deja que las células ligadas a las partículas sedimenten bajo la gravedad en el dispositivo. A medida que sedimentan las células, un imán 138 aplicado cerca de la cámara de captación extrae los monocitos no deseados a la cámara de captación, liberando las células T CD4+ que sedimentan en la cámara de recogida de monocitos no deseados.

40 En el ensayo ilustrado en la Fig. 9B, los papeles de las dos partículas se invierten, siendo las partículas pesadas inmunoreactivas frente a CD14, y las perlas magnéticas, inmunoreactivas frente a antígeno CD4. Después de reacción de las células con los dos tipos de partículas, el dispositivo de ensayo se orienta como se muestra, permitiendo que los monocitos marcados con las partículas pesadas sedimenten en la cámara 134 de captación, eliminando estas células de las células T CD4+, que son extraídas a la cámara de recogida mediante un imán 138 en el extremo inferior de la cámara.

45 Las Figs. 3A-3C ilustran las configuraciones de la cámara de recogida en un dispositivo de ensayo de sedimentación celular como el descrito anteriormente, pero construido según una segunda realización general de la invención. En todos estos dispositivos, la cámara de recogida incluye un conducto de recogida alargado y, formando las regiones de recogida dentro del conducto de recogida, una pluralidad de cavidades dispuestas a lo largo del conducto. Las cavidades se disponen dentro del conducto de manera que las células que migran por el conducto en una dirección
 50 aguas arriba a aguas abajo son atrapadas en la cavidad más aguas arriba hasta que se llena, después de lo cual las cavidades se llenan sucesivamente en una dirección aguas arriba a aguas abajo.

55 La Fig. 3A muestra un dispositivo 60 de ensayo que tiene una zona 62 de interfase que comunica con un conducto de recogida o cámara 64. El conducto de recogida tiene una pluralidad de segmentos de flujo orientados en contraposición, tales como los segmentos 66, 68. Las regiones de recogida dentro del conducto son una pluralidad de cavidades con borde dispuestas entre segmentos de flujo adyacentes, tal como la cavidad 70 entre segmentos 66, 68 de flujo adyacentes.

60 La cámara de recogida mostrada en la Fig. 3B es similar a la de la Fig. 3A. En la presente memoria, un conducto 72 de recogida en un dispositivo 74 de ensayo está compuesto por segmentos de flujo orientados en contraposición, tal como los segmentos 76, 78 y una serie de cavidades entre elementos de flujo adyacentes, tal como la cavidad 80 entre los segmentos 76, 78 de flujo. Una porción de esta configuración se muestra en la Fig. 4, e ilustra cómo las células que migran por el conducto de recogida son atrapadas en las cavidades sucesivamente en una dirección
 65 aguas arriba a aguas abajo, permitiendo que se determine fácilmente el recuento de células por identificación de la cavidad más aguas abajo que contiene células unidas a partículas. Como se ve en la Fig. 4, las células unidas a

partículas, tales como las células 79, que migran de un segmento de flujo a otro, en una dirección aguas arriba a aguas abajo (arriba a fondo en la figura, a lo largo de una línea de fuerza indicada por la flecha 75, son atrapadas en la cavidad 80 más aguas arriba hasta que se llena esta cavidad, punto en el que las células empezarán a llenar la siguiente cavidad más aguas abajo, etc., hasta que han sido capturadas todas las células. El número de células capturadas en el conducto de recogida se puede determinar, semi-cuantitativamente, por determinación de la cavidad más aguas abajo que contenga células. En un dispositivo de ensayo real, las regiones de recogida se calibran a fin de que cada zona de recogida sucesiva represente un cierto número total de células de la muestra de interés, por ejemplo, aproximadamente 200 células/por cavidad, de manera que la presencia de células en la enésima cavidad de la parte superior indica un recuento de células de entre aproximadamente, por ejemplo, $(n-1) \times 200$ y $n \times 200$ células. Como se describió anteriormente, la relación entre tamaño de la cavidad y número de células se puede ajustar para corregir el volumen de las partículas (partículas tanto ligadas como libres) que llenan los depósitos.

En la Fig. 3C, un conducto 82 de recogida en un dispositivo 84 se orienta con respecto a la dirección de flujo de células unidas a partículas, dentro del conducto bajo un campo gravitatorio o centrífugo aplicado o magnético, indicado por la flecha 86. Las regiones de recogida dentro del conducto de recogida incluyen una pluralidad de cavidades, tales como las cavidades 88, dispuestas a lo largo de una porción 90 de la superficie exterior del conducto, de manera que las células que migran por el conducto de recogida, en una dirección aguas arriba a aguas abajo y en una dirección de fuerza indicada por la flecha 86, son atrapadas en la cavidad más aguas arriba primero y después sucesivamente en cavidades más aguas abajo a medida que se llena cada cavidad. Como con las realizaciones ilustradas en las Figs. 3A y 3B, el dispositivo permite el recuento de células que se tiene que determinar fácilmente por identificación de la cavidad más aguas abajo que contiene células unidas a partículas.

También se muestra en los tres dispositivos un canal 92 de llenado previo que comunica con el extremo inferior del conducto de recogida, proporcionando un puerto por el que se puede llenar el conducto de recogida y la zona de interfase.

La Fig. 5 ilustra la configuración de la cámara de recogida en un dispositivo 94 de ensayo de sedimentación celular como el descrito anteriormente, pero construido según una tercera realización general de la invención. En este dispositivo, la cámara de recogida, indicada en 96, incluye un conducto 98 de flujo que comunica en su extremo aguas arriba con una zona 97 de sedimentación y que se extiende sustancialmente de manera transversal con respecto a la dirección de flujo de células unidas a partículas bajo una fuerza gravitatoria. Esto es, la dirección de flujo por el conducto, indicado por la flecha 100, es sustancialmente perpendicular a la dirección de la fuerza aplicada a las células, por ejemplo, bajo una gravedad, indicada por la flecha 102. La cámara incluye una pluralidad de cavidades 104, espaciadas a lo largo de la cara inferior del conducto 98. En la operación, las células unidas a partículas, tal como las indicadas en 106, fluyen por la cámara a un caudal de manera que las partículas migren primero sustancialmente exclusivamente a la cavidad más aguas arriba, indicado en 108 y cuando se llena esta cavidad, las partículas que se continúan recogiendo en la cavidad 108 se transportarán con el flujo del fluido de manera que se sedimenten en la siguiente cavidad adyacente y asimismo en cada cavidad adyacente hasta que todas las células han sido capturadas en una cavidad. Como con los otros dispositivos en esta realización general, el recuento de células de las células unidas a partículas se puede determinar desde la cavidad más aguas abajo que contiene células.

III. Método de Ensayo

El método de la invención usa el dispositivo de ensayo celular anterior para ensayar en una muestra de células la presencia de al menos una concentración umbral de células de un tipo determinado. Para fines de ilustración, el método se ilustrará con respecto a un método para determinar una concentración umbral (recuento de células) de células T CD4+ presentes en un individuo infectado con VIH que se tiene que controlar por el estado de la infección. En general, un recuento de células CD4+ de entre 500-1500 células T CD4+ / μ l de sangre indica funcionamiento normal de la inmunidad de las células T en el individuo, en el caso de que la migración celular se produzca por sedimentación por un medio de densidad definida bajo fuerza gravitatoria. Cuando el VIH mata células T CD4+ a fin de que haya menos de 200 células T CD4+ / μ l de sangre, se pierde la inmunidad celular, conduciendo a un diagnóstico probable de SIDA. El ensayo ilustrado en la presente memoria se diseña para detectar un nivel umbral de células T CD4+ menor que 250/ μ l de sangre, que significa que se aconseja tratamiento en este umbral. Este umbral se podía ajustar, por ejemplo, dependiendo de la edad del individuo para, digamos, 350, 450, 550 ó 750 / μ l de sangre.

El dispositivo de ensayo empleado en el ensayo se muestra en la Fig. 6. El dispositivo, indicado en 110, incluye, análogo al dispositivo descrito con respecto a las Figs. 1 y 2, una cámara 30 de muestra en comunicación de fluido, en una dirección aguas arriba a aguas abajo, una cámara 38" de sedimentación y que fija la cámara 39" (conjuntamente, una cámara de interfase) y un conducto 40 de recogida, en el caso de que las regiones de recogida se indiquen en el conducto de recogida por las marcas 44 a lo largo de la longitud del conducto. Se asume que el dispositivo se ha llenado previamente con un medio de densidad seleccionada, llenando la interfase y las cámaras de recogida. La cámara de muestra puede contener un volumen seleccionado de una suspensión de partículas

detectables capaces de reaccionar de manera específica con el antígeno CD4+ de células T CD4+ o alternativamente, las partículas se pueden suministrar por separado, por mezcla con la muestra previamente a la adición a la cámara de muestra.

5 Como una primera etapa en el ensayo, se toma una muestra de fluido de sangre del paciente. Antes de la aplicación de la muestra al dispositivo, se pueden eliminar parcialmente o completamente los RBC en la muestra, por ejemplo, por lisis, precipitación de anticuerpos, centrifugación para eliminar de manera específica RBC o centrifugación para aglomerar todas las células de la sangre seguido por suspensión de nuevo de la fracción de células blancas, según métodos conocidos en hematología de laboratorio. En cualquier caso, se ajusta la muestra de glóbulos blancos final
10 en volumen para que corresponda a un volumen conocido de la muestra de sangre original.

La muestra que contiene células blancas se aplica a un volumen determinado a la cámara de muestra en el dispositivo y se permite que las células reaccionen con las partículas de unión a células durante un periodo, por ejemplo, 10 minutos, suficiente para completar la reacción. Alternativamente, esta reacción se realiza en un
15 conducto separado, después se añade junto con la cámara de muestra. En el dispositivo mostrado en la Fig. 6, se indican las partículas de unión CD4+ como pequeños círculos sólidos en 112, las células positivas CD4+ por círculos sombreados en 114, las células negativas CD4+ como círculos vacíos en 116 y las células CD4+ unidas a partículas, como círculos sombreados con un recubrimiento de partícula oscuro, que representa partículas ligadas. Como se indicó anteriormente, las células unidas a partículas presentan una densidad sustancialmente aumentada y son
20 preferiblemente fácilmente detectables a simple vista.

Se deja ahora que las células en la muestra sedimenten bajo fuerza gravitatoria por un medio de sedimentación con una densidad menor que la de las células unidas a partículas en una cámara de recogida con una pluralidad de regiones de recogida, por ejemplo, poniendo el dispositivo en una posición de pie o en una centrífuga de baja
25 velocidad, hasta que sustancialmente todo de las células ligadas a partículas ha sedimentado en el conducto de recogida. La Fig. 6 muestra el procedimiento de sedimentación antes de la terminación, cuando algunas células ligadas a partículas aún tienen que sedimentar en el conducto de recogida.

Una vez que se completa la sedimentación, se inspecciona el dispositivo, preferiblemente por inspección visual, por la presencia de células unidas a partículas en al menos una región de recogida seleccionada. En el dispositivo
30 ilustrado, las regiones de recogida representan segmentos incrementales del conducto que corresponden a las marcas 44 a lo largo del lado del conducto, correspondiendo más o menos a incrementos para 100 células/μl para cada marca.

35 Como una etapa final en el método, se hace una determinación, basada en el número de regiones de recogida llenas o parcialmente llenas, de si el volumen de muestra añadido contiene un número umbral de células seleccionado del tipo de células que se está ensayando. En la presente ilustración, se ve que el recuento de células en el ensayo, a la terminación, será por encima de 500 células/μl, que indica que el individuo ensayado presenta un sistema inmunitario que funciona normal.

40 Las Figs. 7C-7C ilustran los resultados de un método de ensayo ejemplar como se ve esquemáticamente (7A), por fotografía (7B) y por lectura fluorescente (7C). La lectura fluorescente se obtuvo usando marcación fluorescente de PBMC (células mononucleares de sangre periféricas) para dos muestras diferentes, una que contiene $7,6 \times 10^5$ células aplicadas (línea izquierda en la Fig. 7C) y $7,6 \times 10^4$ células aplicadas (línea derecha en la Fig. 7C). Como se ve en la figura, la muestra con el mayor volumen de células produjo más de 2 veces mayor una altura de tapón en el
45 conducto de recogida de ensayo.

La Fig. 8 muestra resultados de un ensayo celular en que las alturas de la columna para muestras que contienen perla sola (línea izquierda), perlas más 1×10^5 células CD4+ (línea central y perla más 5×10^5 células CD4+. Las perlas que sedimentan solas produjeron una altura de columna indicada en 120 en la figura. La adición de 1×10^5 células aumentó la altura por un incremento pequeño, indicado en 122 y la adición de 5×10^5 células aumentó la altura por un incremento, indicado en 124, esto es más o menos cinco veces la de la muestra de recuento de células menor, como se esperaba.

55 Otras aplicaciones para controlar glóbulos blancos como un indicador de un estado de salud o de tratamiento incluyen, pero no se limitan a:

Detectar o controlar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener una infección u otra afección que conduzca a una elevación de leucocitos en la sangre. En esta aplicación, las células reaccionan con partículas con agente de unión anti-leucocitos ligados a la superficie, tales como CD45 y el indicio o los indicios que corresponden a la región o las regiones de recogida umbral de interés indican una concentración de leucocitos mayor que aproximadamente 10.000 células/μl de sangre.

60 Detectar o controlar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener reducido el número de leucocitos en la sangre, debido a quimioterapia, tratamiento con radiación o leucemia. En esta
65

aplicación, las células reaccionan con partículas con agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie, tal como CD45 y el indicio o los indicios que corresponden a la región o las regiones de recogida umbral de interés indican una concentración de leucocitos menor que aproximadamente 4.000 células/ μ l de sangre.

5 Detectar o controlar la concentración de neutrófilos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener reducido el número de neutrófilos en la sangre, debido a quimioterapia o tratamiento con interferón. En esta aplicación, las células reaccionan con partículas con agente de unión anti-neutrófilos ligado a la superficie, tal como CD16 y el indicio o los indicios que corresponden a la región o las regiones de recogida umbral de interés indican una concentración de neutrófilos en un intervalo seleccionado entre 500 y 2.500 células / μ l de sangre.

10 Detectar o controlar la concentración de células bacterianas en una muestra de fluido corporal de un individuo infectado, como un indicador de la extensión y el tipo de infección. En esta aplicación, las células reaccionan con partículas con un agente de unión ligado a la superficie capaz de unirse específicamente a uno o más antígenos de pared bacteriana seleccionados y el indicio o los indicios que corresponden a la región o las regiones de recogida umbral de interés indican una concentración detectable de células bacterianas en la muestra de sangre.

15 De lo anterior, se puede ver cómo se satisfacen diversos objetos y características de la invención. El principio del ensayo y dispositivo se basa en la migración preferente de las células ligadas a partículas en una disposición microcapilar especial o de recogida de células de tipo escala. El dispositivo se calibra de tal manera que la altura de apilamiento de células o número de regiones de recogida llenas corresponde a recuento de células, en particular cuando se ajusta para volumen de partículas. Este método no requiere recubrimiento de anticuerpo de superficies del dispositivo y la lectura se puede conseguir a simple vista sin ninguna etapa de coloración adicional o instrumentación lectora. Así, el método combina la precisión del recuento de células en un hemacitómetro con la facilidad de una lectura sin lector, inequívoca y simple. Debido a su simplicidad, este método puede ser idealmente
20
25 adecuado para las condiciones medioambientales duras en algunos de los países en vías de desarrollo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para ensayar una muestra de células por la presencia de al menos una concentración umbral de células de un tipo determinado, que comprende:
- 5 (a) hacer reaccionar una muestra de células que contiene células del tipo de células determinado con partículas capaces de unión específica a las células y que son eficaces, cuando se unen a las células, para aumentar la densidad o susceptibilidad magnética de las células, permitiendo que se separen células ligadas a partículas y partículas libres de células no ligadas a partículas en la muestra basado en su mayor velocidad de migración por un medio seleccionado bajo la influencia de una fuerza gravitatoria o centrífuga aplicada o de campo magnético,
- 10 (b) hacer que las células unidas a partículas y las partículas en la muestra de células migren por una cámara de recogida alargada con dimensiones de ancho y profundidad entre 10 - 500 micrómetros y que contiene el medio seleccionado y que tiene a lo largo de su longitud, una pluralidad de regiones de recogida de células, sometiendo la muestra a una fuerza gravitatoria o centrífuga seleccionada o de campo magnético durante un periodo de tiempo suficiente para causar sustancialmente que todas las células unidas a partículas y las partículas llenen completamente regiones de recogida de células sucesivas en la cámara de recogida e
- 15 (c) inspeccionar la cámara para determinar si al menos una región de recogida seleccionada se llena parcialmente o completamente, como demuestra que la muestra de células contenga al menos una concentración umbral de células del tipo de células determinado.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en el que la cámara de recogida incluye una columna de recogida de microcanales, donde las regiones de recogida dentro de la columna incluyen segmentos de longitud definida a lo largo de una sección de la columna y las regiones de recogida se llenan sucesivamente en la etapa (b) en una dirección aguas abajo a aguas arriba a lo largo de la longitud de la columna de la cámara de recogida.
- 25 3. El método según la reivindicación 2, en el que la muestra de células reacciona en la etapa (a) con una cantidad determinada de partículas capaces de unión específica al tipo de células determinado, donde las partículas hacen una contribución mensurable al volumen de células ligadas a partículas que migran a la cámara de recogida en la etapa (b) y la etapa (c) incluye ajustar el volumen de células ligadas a partículas en las regiones de recogida de la cámara de recogida para compensar el volumen de partículas.
- 30 4. El método según la reivindicación 1, en el que dichas partículas, cuando se unen a las células en la etapa (a) son eficaces para marcar las células con un indicador detectable y dicha inspección incluye inspeccionar de manera visual en la cámara de recogida la presencia de células marcadas con el indicador detectable.
- 35 5. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) incluye someter las células ligadas a partículas a fuerza gravitatoria poniendo la cámara en una posición dispuesta de manera vertical, sustancialmente de pie, el medio de densidad seleccionado presenta una densidad menor que la de las células ligadas a partículas y las partículas son partículas de metal sustancialmente esféricas.
- 40 6. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) incluye someter las células unidas a partículas a una fuerza centrífuga, el medio de densidad seleccionado presenta una densidad menor que la de las células unidas a partículas y las partículas son partículas de metal sustancialmente esféricas.
- 45 7. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) incluye someter las células ligadas a partículas a una fuerza de campo magnético y las partículas son partículas magnéticas o paramagnéticas sustancialmente esféricas.
- 50 8. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) incluye además añadir la muestra que contiene células ligadas a partículas a una zona de interfase aguas arriba de la cámara de recogida y mezclar de manera física la muestra con un medio de densidad seleccionada en la zona de interfase.
- 55 9. El método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de sangre, teniendo dichas partículas proteína de unión ligada a la superficie capaz de inmunoreaccionar con un antígeno específico de células sanguíneas y las partículas son tratadas superficialmente para reducir la agregación de partículas en una muestra de sangre.
- 60 10. El método según la reivindicación 9, para detectar la concentración de células linfocíticas T CD4+ en una muestra de sangre de un individuo que puede estar infectado con VIH, como un indicador de la categoría de células T del individuo, en el que la etapa (a) de reacción se realiza por exposición de una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de unión anti-CD4+ ligado a la superficie y la etapa (c) se basa en la observación de la presencia de células en una región de recogida que indica una concentración de células linfocíticas T CD4+ con un valor umbral seleccionado entre 200-750 / μ l de sangre.

- 5 11. El método según la reivindicación 9, en el que la etapa (a) incluye además hacer reaccionar células en la muestra con partículas capaces de unirse específicamente a antígeno CD14 en células monocíticas simultáneamente o seguido por reacción con segundas partículas capaces de unirse específicamente a antígeno CD4 en células linfocíticas T, para conferir así en las células linfocíticas T, densidad o susceptibilidad magnética aumentada y en las células monocíticas, tanto densidad como susceptibilidad magnética aumentada y la etapa (b) incluye además primero eliminar monocitos ligados a partículas de la muestra de células por aplicación de una fuerza eficaz para eliminar de manera selectiva los monocitos ligados a partículas de células linfocíticas T ligadas a partículas.
- 10 12. El método según la reivindicación 9, para detectar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener una infección u otra afección que conduzca a una elevación de leucocitos en la sangre, en el que la etapa (a) de reacción se realiza por exposición de una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y la etapa (c) se basa en observar la presencia de células en una región de recogida, que indica una concentración de leucocitos mayor que aproximadamente 10.000 células/ μ l de sangre.
- 15 13. El método según la reivindicación 9, para controlar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de leucocitos en la sangre, debido a quimioterapia, tratamiento con radiación o leucemia, en el que la etapa (a) de reacción se realiza por exposición de una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y la etapa (c) se basa en observar la presencia de células en una región de recogida que indica una concentración de leucocitos menor que aproximadamente 4.000 células/ μ l de sangre.
- 20 14. El método según la reivindicación 9, para controlar la concentración de neutrófilos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de neutrófilos en la sangre, debido a quimioterapia o tratamiento con interferón, en el que la etapa (a) de reacción se realiza por exposición de una muestra de fluido de sangre del individuo a partículas con agente de unión anti-neutrófilos ligado a la superficie y la etapa (c) se basa en observar la presencia de células en una región de recogida que indica una concentración de neutrófilos en un intervalo seleccionado entre 500 y 2.500 células / μ l de sangre.
- 25 15. El método según la reivindicación 9, para detectar la concentración de células bacterianas en una muestra de fluido corporal de un individuo infectado, como un indicador de la extensión y el tipo de infección, en el que la etapa (a) de reacción se realiza por exposición de una muestra de fluido corporal del individuo a partículas con un agente de unión ligado a la superficie capaz de unirse específicamente a uno o más antígenos de pared bacteriana seleccionados y la etapa (c) se basa en observar la presencia de células en una región de recogida que corresponde a una concentración detectable de células bacterianas en la muestra de sangre.
- 30 35 16. Un estuche para ensayar una muestra de células por la presencia en la muestra de al menos una concentración umbral de células de un tipo de células seleccionado, que comprende:
- 40 (a) un dispositivo de ensayo con una cámara de muestra para admitir la muestra de células y, en comunicación de fluido con la misma, una cámara de recogida alargada con dimensiones de ancho y profundidad entre 10 - 500 micrómetros y que contiene un medio seleccionado y que tiene a lo largo de su longitud, una pluralidad de regiones de recogida de células,
- 45 (b) partículas que, cuando se añaden a la muestra de células, son capaces de unirse de manera específica a células del tipo de células seleccionado y que son eficaces, cuando se unen a las células, para aumentar la densidad o susceptibilidad magnética de las células, permitiendo que células ligadas a partículas y partículas en la muestra de células migren de manera preferente por la cámara de recogida alargada bajo la influencia de una fuerza gravitatoria o centrífuga seleccionada o de campo magnético hasta que sustancialmente todas las células ligadas a partículas y las partículas llenen completamente regiones de recogida de células sucesivas en la cámara de recogida e
- 50 (c) indicios asociados con al menos una región de recogida en la cámara de recogida del dispositivo, que indica la concentración de células del tipo seleccionado eficaz para llenar al menos parcialmente esa región de recogida, cuando se extraen células ligadas a partículas y partículas libres por la cámara de recogida.
- 55 17. El estuche según la reivindicación 16, en el que la cámara de recogida incluye una columna de recogida de microcanales, las regiones de recogida dentro de la columna incluyen segmentos de longitud definida a lo largo de una sección de la columna y las regiones de recogida están adaptadas para llenarse de manera sucesiva en la etapa en una dirección aguas abajo a aguas arriba a lo largo de la longitud de la columna de la cámara de recogida.
- 60 18. El estuche según la reivindicación 17, en el que la cámara de recogida incluye un conducto de recogida alargado y, formando las regiones de recogida dentro del conducto de recogida, una pluralidad de cavidades dispuestas dentro del conducto a lo largo de su longitud y las regiones de recogida están adaptadas para llenarse de manera sucesiva en una dirección aguas arriba a aguas abajo a lo largo de la longitud de la columna.
- 65

- 5 19. El estuche según la reivindicación 16, en el que la cámara de recogida incluye un conducto de recogida con una pluralidad de segmentos de flujo orientados en contraposición y, formando las regiones de recogida dentro del conducto de recogida, una pluralidad de cavidades con borde dispuestas entre segmentos de flujo adyacentes, de manera que las células que migran de un segmento de flujo a otro, en una dirección aguas arriba a aguas abajo, son atrapadas en la cavidad entre los dos segmentos de flujo hasta que se llena esa cavidad.
- 10 20. El estuche según la reivindicación 16, en el que la cámara de recogida incluye un conducto de recogida que está orientado con respecto a la dirección de flujo de las células unidas a partículas dentro del conducto bajo una fuerza gravitatoria y, formando las regiones de recogida dentro del conducto de recogida, una pluralidad de cavidades dispuestas a lo largo de una porción de superficie externa del conducto, de manera que las células que migran por el conducto de recogida, en una dirección aguas arriba a aguas abajo, son atrapadas en la cavidad más aguas arriba hasta que se llena.
- 15 21. El estuche según la reivindicación 16, en el que la cámara de recogida incluye un conducto de flujo que se extiende sustancialmente de manera transversal con respecto a la dirección de flujo de células unidas a partículas bajo una fuerza gravitatoria y, formando las regiones de recogida dentro de la cámara de recogida, una pluralidad de cavidades dispuestas a lo largo de una longitud del conducto de flujo, de manera que las células que fluyen por el conducto de flujo, en una dirección aguas arriba a aguas abajo, sedimentan en la cavidad más aguas arriba hasta que se llena, después de lo cual las cavidades se llenan sucesivamente en una dirección aguas arriba a aguas abajo.
- 20 22. El estuche según la reivindicación 16, en el que el dispositivo (a) incluye además una cámara de captación que comunica con la cámara de muestra y las partículas (b) incluyen un primer tipo de partículas capaces de unirse específicamente a un antígeno presente en células del tipo seleccionado y en células de un tipo no seleccionado y un segundo tipo de partículas capaces de unirse específicamente a un antígeno presente en células del tipo no seleccionado sólo, permitiendo que partículas ligadas al segundo tipo de partículas que se tienen que eliminar de manera selectiva por migración a la cámara de captación, antes de la migración de las células del tipo seleccionado, que están ligadas al primer tipo de partícula sólo, para migrar de manera selectiva a la cámara de recogida.
- 25 23. El estuche según la reivindicación 16, en el que dichas células ligadas a partículas son aptas para migrar por la zona de recogida bajo la influencia de una fuerza gravitatoria o centrífuga, en el que dichas partículas son partículas de metal sustancialmente esféricas.
- 30 24. El estuche según la reivindicación 16, para detectar células de un tipo determinado en una muestra de sangre, teniendo dichas partículas proteína de unión ligada a la superficie capaz de inmunoreaccionar con un antígeno específico de células sanguíneas.
- 35 25. El estuche según la reivindicación 24, en el que las partículas son tratadas de manera superficial para reducir la agregación de partículas en una muestra de sangre.
- 40 26. El estuche según la reivindicación 25, en el que dichas partículas se recubren con recubrimiento de polímero hidrófilo.
- 45 27. El estuche según la reivindicación 16, en el que dichas células ligadas a partículas son aptas para migrar por la zona de recogida bajo la influencia de una fuerza de campo magnético, en el que dichas partículas son partículas magnéticas o paramagnéticas sustancialmente esféricas.
- 50 28. El estuche según la reivindicación 16, para detectar la concentración de células linfocíticas T CD4+ en una muestra de sangre de un individuo que puede estar infectado con VIH, como un indicador de la categoría de células T del individuo, en el que dichas partículas tienen un agente de unión anti-CD4+ ligado a la superficie y dichos indicios se diseñan para indicar una concentración de células linfocíticas T CD4+ con un valor umbral seleccionado entre 200-750 / μ l de sangre.
- 55 29. El estuche según la reivindicación 16, para detectar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener una infección u otra afección que conduzca a una elevación de leucocitos en la sangre, en el que dichas partículas tienen un agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y dichos indicios se diseñan para indicar una concentración de leucocitos mayor que aproximadamente 10.000 células/ μ l de sangre.
- 60 30. El estuche según la reivindicación 16, para controlar la concentración de leucocitos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de leucocitos en la sangre, debido a quimioterapia, tratamiento con radiación o leucemia, en el que dichas partículas tienen un agente de unión anti-leucocitos ligado a la superficie y dichos indicios se diseñan para indicar una concentración de leucocitos menor que aproximadamente 4.000 células/ μ l de sangre.
- 65

- 5 31. El estuche según la reivindicación 16, para controlar la concentración de neutrófilos en una muestra de sangre de un individuo que puede tener números reducidos de neutrófilos en la sangre, debido a quimioterapia o tratamiento con interferón, en el que dichas partículas tienen un agente de unión anti-neutrófilos ligado a la superficie y dichos indicios se diseñan para indicar una concentración de neutrófilos en un intervalo seleccionado entre 500 y 2.500 células / μ l de sangre.
- 10 32. El estuche según la reivindicación 16, para detectar la presencia de una infección bacteriana en una muestra de sangre u orina de un individuo infectado, en el que dichas partículas tienen un agente de unión ligado a la superficie capaz de unirse específicamente a un antígeno de la pared bacteriana y dichas regiones de recogida están diseñadas para indicar la presencia de células en la muestra de sangre u orina.
33. El estuche según la reivindicación 16, que incluye además un soporte de dispositivo para soportar el dispositivo y aplicar al dispositivo soportado, una fuerza centrífuga o de campo magnético.

Fig. 1

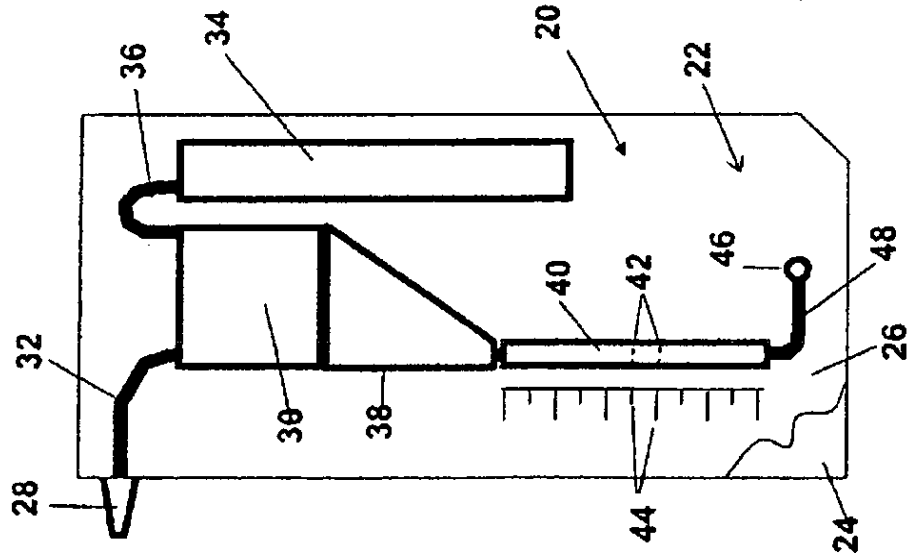


Fig. 2

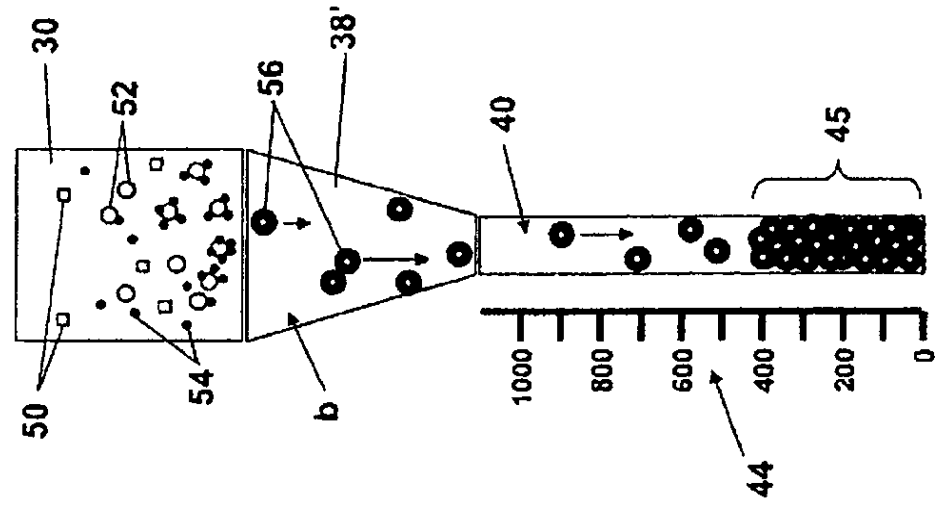


Fig. 3A Fig. 3B Fig. 3C

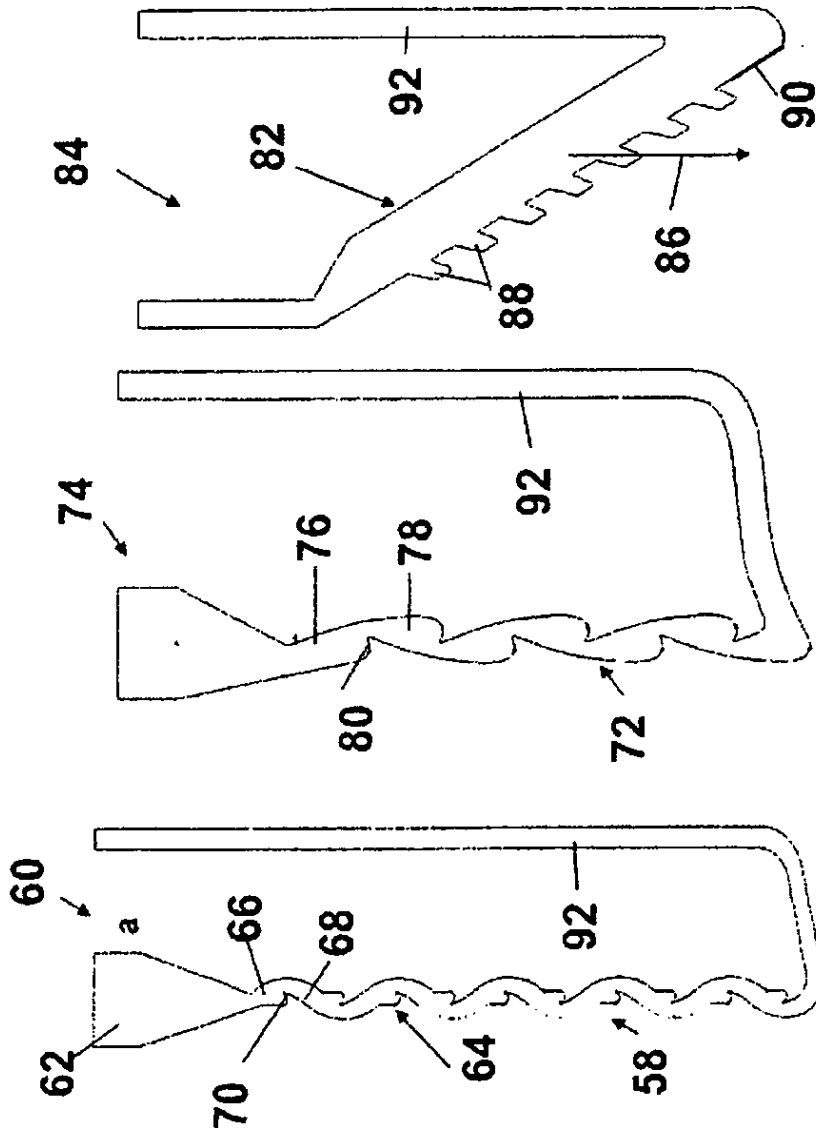


Fig. 4

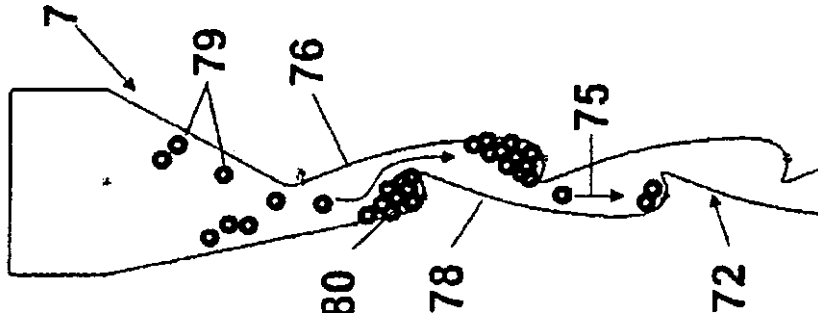
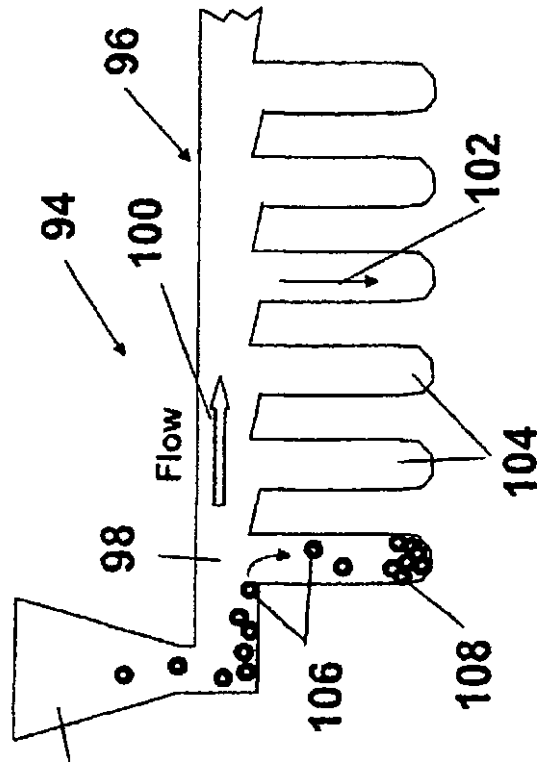


Fig. 5



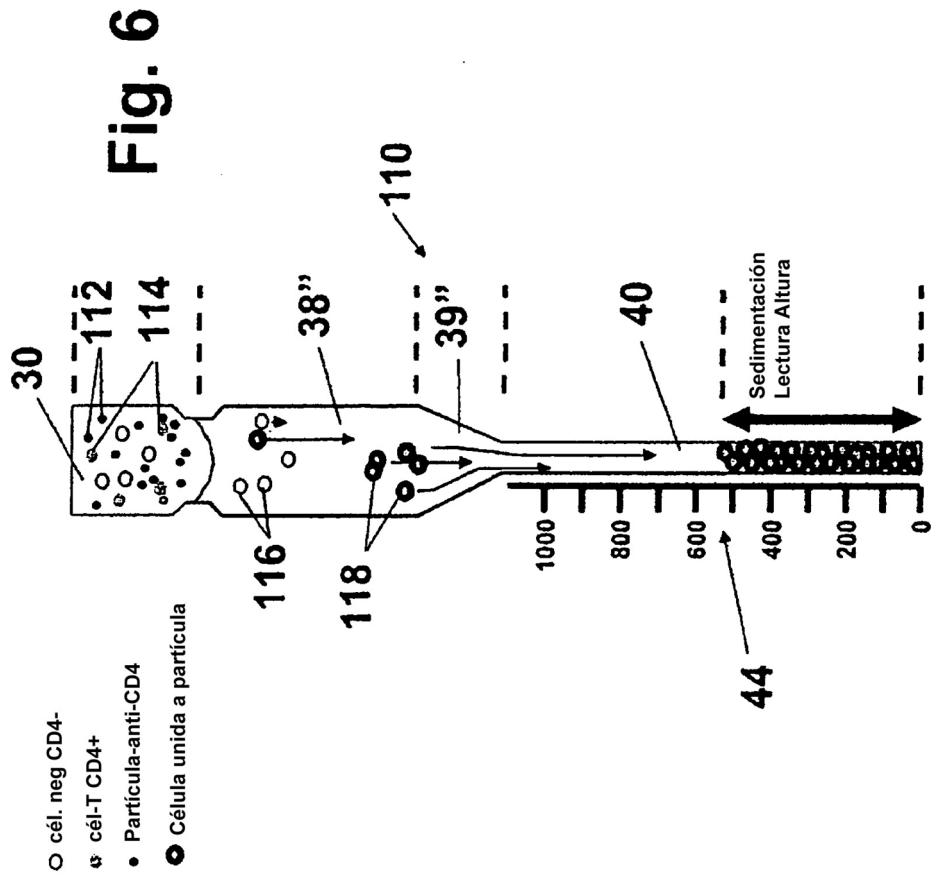


Fig. 7A Fig. 7B Fig. 7C

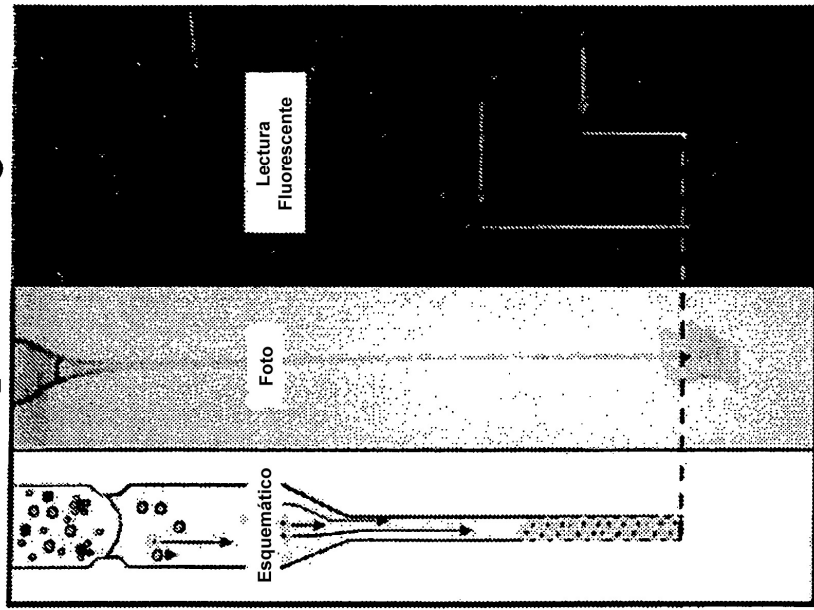
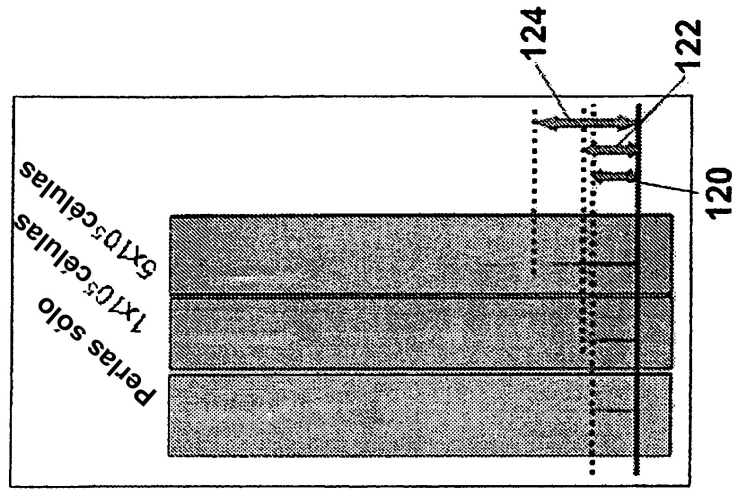


Fig. 8



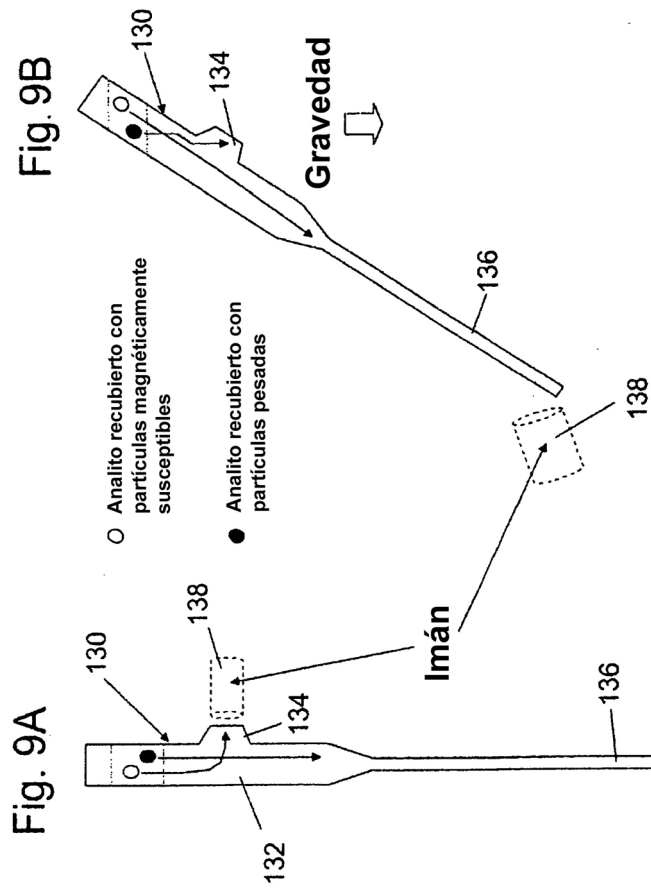


Fig. 10A

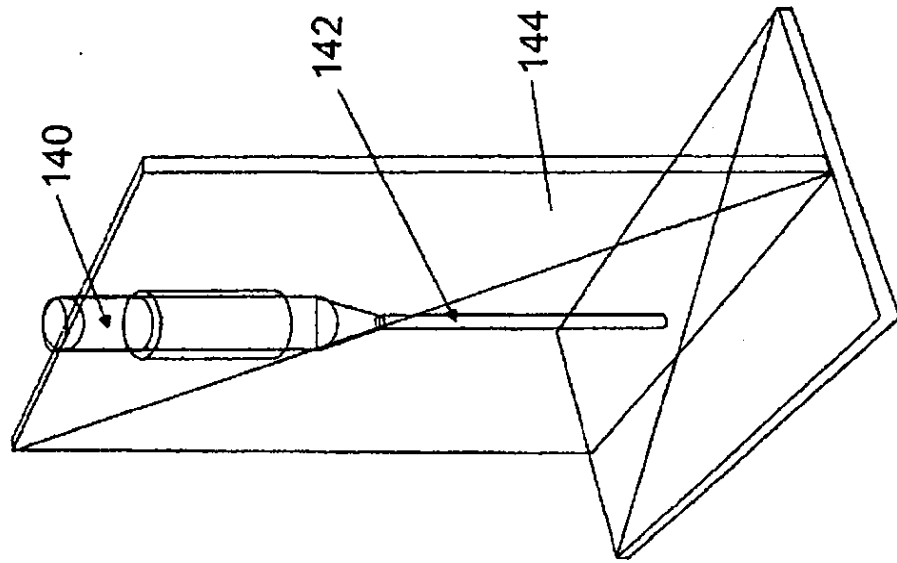


Fig. 10B

