

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 159**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12706273 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2681305**

54 Título: **Placa para gotitas suspendidas**

30 Prioridad:

03.03.2011 EP 11156741

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.09.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FATTINGER, CHRISTOF;
IAIZA, PATRICK;
KISSLING, TOM;
VOEGELIN, DIETER;
ZUMSTEIN, THOMAS y
MCGINNIS, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 546 159 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

Placa para gotitas suspendidas

[0001] La presente invención se refiere a una placa para gotitas suspendidas de acuerdo con la reivindicación
5 independiente.

[0002] Se acepta en general que las células cultivadas en una configuración tridimensional son fisiológicamente más relevantes que las células en cultivos bidimensionales (monocapa) clásicos en una serie de aplicaciones y ensayos, por ejemplo en el descubrimiento de medicamentos o en los ensayos de toxicidad. Se ha
10 propuesto que las placas para gotitas suspendidas formen dichos agregados celulares tridimensionales. Se colocan gotas de un medio de cultivo de células con células suspendidas en un compartimento o pozo de cultivo de dicha placa, y a continuación se invierte la placa. Dado que no hay disponible ningún sustrato sobre el que se puedan adherir las células, éstas se acumulan en el vértice de la gotita suspendida y forman un agregado celular tridimensional. En caso de que se utilicen células madre embrionarias, éstas células madre se hunden hasta el
15 vértice de la gotita, donde se encuentran para formar el agregado celular tridimensional, que se denomina un cuerpo embriode.

[0003] Se muestra una placa para gotitas suspendidas que evita la necesidad de invertir la placa en el documento WO 2010/031194. La placa mostrada en esta referencia comprende un cuerpo de la placa, una primera y
20 una segunda superficies coplanarias, y una serie de conductos que penetran todo el cuerpo perpendicularmente desde la primera superficie (superior) hasta la segunda superficie (inferior). El conducto comprende un compartimento de entrada en forma de embudo cerca de la primera superficie (superior), un compartimento de cultivo en forma de embudo invertido próximo a la segunda superficie (inferior), y una parte capilar dispuesta entre el compartimento de entrada y el compartimento de cultivo. Están dispuestas estructuras de relieve en forma de
25 rebordes individuales que sobresalen desde la segunda superficie (inferior) del cuerpo y rodean cada compartimento de cultivo. Estos rebordes impiden que las gotitas se extiendan más allá de los rebordes.

[0004] La introducción del líquido que contiene las células en el compartimento de cultivo se realiza a través del compartimento de entrada y de la parte capilar. A modo de ejemplo, un medio de cultivo líquido que contiene
30 células madre se puede introducir de este modo en los compartimentos de cultivo, y la placa con las gotitas suspendidas puede ser incubada a continuación durante un intervalo de tiempo predeterminado, de tal modo que las células se agreguen para formar los cuerpos embrioides tridimensionales. En caso de que sea necesario suministrar medio de cultivo líquido nuevo después de algún tiempo, esto se lleva a cabo aspirando el medio de cultivo líquido "antiguo" a través del compartimento de entrada y de la parte capilar (por ejemplo, con la ayuda de una pipeta) y
35 suministrando a continuación medio de cultivo líquido "nuevo" de la manera descrita anteriormente.

[0005] Si bien la placa descrita en el documento WO 2010/031194 es adecuada en general para cultivar células para formar agregados celulares tridimensionales, presenta margen para mejoras. Por ejemplo, para aspirar el medio de cultivo líquido antiguo a través del compartimento de entrada y de la parte capilar, se requiere un
40 dispositivo de aspiración (por ejemplo, una pipeta) que tiene que estar incorporado de modo que se ajuste fuertemente en las paredes del compartimento de entrada para efectuar una aspiración adecuada. Lo mismo se tiene para el suministro posterior de medio de cultivo líquido nuevo. Sin embargo, más importante aún es que la estabilidad de la gotita suspendida en el respectivo compartimento de cultivo es solamente limitada. Otro inconveniente es que el líquido se puede evaporar a una velocidad incontrolada a través del compartimento de
45 entrada abierto.

[0006] Por lo tanto, un objetivo de la invención es proponer una placa para gotitas suspendidas que supere los problemas mencionados anteriormente relacionados con la estabilidad de las gotitas suspendidas y con la evaporación del líquido. Además, el suministro adicional o la sustitución del medio de cultivo líquido debería ser fácil
50 de llevar a cabo.

[0007] Para conseguir el objetivo u objetivos mencionados anteriormente, la presente invención propone una placa para gotitas suspendidas, tal como se especifica mediante las características de la reivindicación independiente dirigida a dicha placa para gotitas suspendidas. Otras realizaciones de la placa para gotitas
55 suspendidas acorde con la invención son el objeto de las reivindicaciones dependientes.

[0008] En particular, la invención propone una placa para gotitas suspendidas que comprende un número predeterminado de compartimentos de gotita, cada uno de los cuales puede recibir una gotita de un líquido. El

compartimento de gotita respectivo comprende una barrera humectante microfluídica circunferencial dispuesta rodeando una cavidad respectiva y que impide que una gotita se extienda más allá de la barrera humectante microfluídica. Además, el compartimento respectivo comprende un fondo cerrado y por lo menos una barrera humectante microfluídica circunferencial adicional, estando dispuesta cada barrera humectante microfluídica circunferencial adicional para rodear una barrera humectante microfluídica circunferencial precedente, estando dispuesta un área humectable entre dos barreras humectantes microfluídicas dispuestas de manera adyacente.

[0009] La configuración de fondo cerrado de los compartimentos de cultivo conjuntamente con la barrera humectante circunferencial sirve para una mayor estabilidad de las gotitas suspendidas hacia abajo desde los respectivos compartimentos de cultivo, en particular en comparación con la placa para gotitas suspendidas mostrada en el documento WO 2010/031194, y se considera que esto se debe a la ausencia de acceso para aire en contraste con la placa para gotitas suspendidas del documento WO 2010/031194, en la que hay acceso para aire en el compartimento de entrada. Asimismo, debido a la ausencia de acceso para aire se reduce sensiblemente la evaporación del líquido.

[0010] Además, aunque es necesario volver a invertir la placa para gotitas suspendidas con el fin de suministrar una gotita de un medio de cultivo líquido adicional a la gotita ya contenida en el compartimento de cultivo para formar una gotita mayor, esto se puede realizar de manera fácil y cómoda. Esto se debe en primer lugar a la buena estabilidad de las gotitas, y se debe en segundo lugar a la barrera humectante microfluídica circunferencial adicional y al área humectable entre la barrera humectante microfluídica adicional y la barrera humectante microfluídica precedente, que permite el fácil suministro de una gotita adicional del medio de cultivo líquido. Se impide mediante dicha barrera microfluídica adicional que la gotita mayor así formada se extienda, de tal modo que se mantiene una buena estabilidad de la gotita mayor después de que la placa se vuelve a invertir a la configuración de gotitas suspendidas. En general, el número de barreras humectantes microfluídicas adicionales no está limitado, si bien en las realizaciones prácticas pueden estar presentes solamente una o dos barreras humectantes microfluídicas adicionales.

[0011] En una realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, los compartimentos de gotita respectivos son pozos, mientras que en otra realización los compartimentos de gotita pueden estar formados mediante una superficie plana (rodeada mediante barreras humectantes microfluídicas, respectivamente).

[0012] En otra realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, la barrera humectante microfluídica circunferencial comprende un borde circunferencial y por lo menos una barrera humectante microfluídica circunferencial adicional comprende por lo menos un borde circunferencial adicional. Cada borde circunferencial adicional está dispuesto para rodear un borde circunferencial precedente, estando dispuesta el área humectable entre dos bordes circunferenciales dispuestos de manera adyacente. En otra variante de esta realización, dos bordes circunferenciales adyacentes están dispuestos de manera escalonada.

[0013] En una realización adicional, la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención está realizada de una placa fabricada por separado, que tiene un número predeterminado de orificios en la misma, y de un correspondiente número predeterminado de pozos fabricados por separado que forman los compartimentos de gotita, estando cada pozo fabricado por separado ajustado a presión en un respectivo orificio de la placa fabricada por separado. Esto permite una fabricación sencilla tanto de la placa como de los pozos, que se pueden fabricar de poliestireno o de cualquier otro material adecuado. La placa y los pozos fabricados por separado se pueden montar fácilmente ajustando a presión los pozos en los orificios. Aunque generalmente es también una opción la soldadura ultrasónica de los pozos a la superficie interior de la placa (en este caso, la placa puede no comprender orificios), es preferible ajustar a presión los pozos en los orificios debido a que la soldadura ultrasónica puede hacer más difícil el análisis microscópico de los contenidos de los pozos.

[0014] En otra realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, los pozos fabricados por separado se ajustan a presión en los orificios del lado de la placa que forma la superficie exterior de la placa. Esto permite un montaje simple de la placa y de los pozos, que se puede llevar a cabo automáticamente. En una realización preferida, la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención puede comprender una serie de 24 pozos, 96 pozos o 384 pozos.

[0015] En otra realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, la barrera humectante microfluídica circunferencial comprende un reborde circunferencial y por lo menos una barrera humectante microfluídica adicional comprende un reborde circunferencial adicional, rodeando cada reborde

circunferencial adicional un reborde circunferencial precedente, estando dispuesta el área humectable entre dos rebordes circunferenciales dispuestos de manera adyacente. En una variante de esta realización, los rebordes circunferenciales dispuestos de manera adyacente están dispuestos de manera escalonada, mientras que en otra variante de esta realización los rebordes circunferenciales están dispuestos sobre una superficie plana.

5

[0016] Otro aspecto de la invención se refiere a un conjunto de placa para gotitas suspendidas que comprende una placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, tal como se ha descrito anteriormente, y una placa receptora. La placa para gotitas suspendidas tiene un número predeterminado de pozos o compartimentos de gotita, y la placa receptora tiene un número de pozos correspondiente al número predeterminado de pozos o compartimentos de gotita de la placa para gotitas suspendidas. La placa para gotitas suspendidas y la placa receptora se montan de tal modo que en la situación montada a los pozos de la placa receptora están dispuestos alineados con los pozos o compartimentos de gotita de la placa para gotitas suspendidas. Este conjunto permite transferir fácilmente los agregados celulares tridimensionales desde la placa para gotitas suspendidas hasta los pozos de la placa receptora mediante el centrifugado del conjunto.

10

[0017] Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de examen de la toxicidad de una sustancia sobre las células. El procedimiento comprende las etapas de:

- a) introducir un número predeterminado de gotitas de líquido en un número correspondiente de compartimentos de cultivo de una placa para gotitas suspendidas, conteniendo cada gotita un volumen predeterminado de la sustancia a examinar y de un medio de cultivo líquido, así como una serie de células;
- b) invertir e incubar la placa para gotitas suspendidas durante un intervalo de tiempo predeterminado, conteniendo la placa para gotitas suspendidas las gotitas de tal modo que están suspendidas de los respectivos compartimentos de cultivo para permitir que las células formen los agregados celulares tridimensionales en las respectivas gotitas,
- c) suministrar en los compartimentos de cultivo medio de cultivo líquido adicional a las gotitas de los compartimentos de cultivo para fomentar el crecimiento adicional de los agregados celulares tridimensionales; y
- d) analizar los agregados celulares tridimensionales para determinar si la sustancia a examinar es tóxica para los agregados celulares tridimensionales.

En el procedimiento acorde con la invención, se utiliza una placa para gotitas suspendidas acorde con la invención tal como se ha descrito anteriormente, y la etapa c) se lleva a cabo invirtiendo de nuevo la placa para gotitas suspendidas, añadiendo una gotita del medio de cultivo líquido adicional a las gotitas respectivas que contienen el agregado celular tridimensional de tal modo que formen respectivas gotitas mayores en los respectivos compartimentos de cultivo. A continuación, se vuelve a invertir la placa para gotitas suspendidas con el fin de permitir que crezcan los agregados celulares tridimensionales en las respectivas gotitas mayores suspendidas de los compartimentos de cultivo. Las ventajas se han mencionado ya anteriormente con la discusión de las ventajas de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención. Además, permite la automatización de, por lo menos, algunas de las etapas del proceso, por ejemplo el suministro del medio de cultivo líquido adicional.

[0018] Una realización del procedimiento acorde con la invención, comprende además las etapas de

- e) transferir los agregados celulares tridimensionales cultivados, de los compartimentos de cultivo de la placa para gotitas suspendidas al número correspondiente de pozos de una placa receptora;
- f) incubar la placa receptora con los pozos que contienen los agregados celulares tridimensionales durante otro intervalo de tiempo predeterminado; y
- g) después de la incubación, analizar los agregados celulares tridimensionales para determinar si la sustancia a examinar es tóxica para los agregados celulares tridimensionales. En una variante preferida de esta realización del procedimiento acorde con la invención, la etapa e) se lleva a cabo montando la placa para gotitas suspendidas y la placa receptora de tal modo que los respectivos pozos de la placa receptora están dispuestos frente a los respectivos compartimentos de cultivo de la placa para gotitas suspendidas, y a continuación se lleva a cabo el centrifugado de las placas montadas. Esto permite una transferencia cómoda y automática de los agregados celulares tridimensionales desde la placa para gotitas suspendidas hasta los respectivos pozos de la placa receptora.

[0019] En otra realización del procedimiento acorde con la invención, las células son células madre embrionarias y los agregados celulares tridimensionales son cuerpos embrioides. La etapa de analizar los agregados celulares tridimensionales para determinar si la sustancia a examinar es tóxica para los agregados celulares tridimensionales se lleva a cabo analizando si los cuerpos embrioides contienen células miocárdicas. Esta

realización es práctica debido a que la presencia de células miocárdicas en los agregados celulares tridimensionales se puede detectar fácilmente, dado que las células miocárdicas laten.

[0020] Resultarán evidentes otros aspectos ventajosos de la invención a partir de la siguiente descripción
5 detallada de realizaciones con la ayuda de los dibujos, en los cuales:

- la figura 1 muestra una vista en perspectiva de una primera realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, con un pozo que contiene una gotita y con otro pozo que contiene una gotita a la que se ha añadido una gotita adicional.
- 10 la figura 2 muestra una vista superior de la realización de la placa para gotitas suspendidas de la figura 1;
- la figura 3 muestra una vista en sección transversal a lo largo de la línea III-III de la figura 2, estando la placa para gotitas suspendidas invertida de nuevo;
- 15 la figura 4 muestra una vista en sección transversal a lo largo de la línea III-III de la figura 2, estando la placa para gotitas suspendidas invertida;
- la figura 5 muestra una vista a mayor escala del detalle V de la figura 4;
- 20 la figura 6 muestra una vista a mayor escala de un pozo de la realización de la placa para gotitas suspendidas de la figura 1;
- la figura 7 muestra una vista en sección transversal de un pozo de una segunda realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, conteniendo el pozo una gotita;
- 25 la figura 8 muestra el pozo de la segunda realización de la placa para gotitas suspendidas, habiéndose añadido una gotita adicional;
- 30 la figura 9 muestra el pozo de la segunda realización de la placa para gotitas suspendidas, habiéndose añadido otra gotita adicional;
- la figura 10 muestra una vista en sección transversal de una tercera realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, conteniendo una gotita el compartimento de gotita;
- 35 la figura 11 muestra la tercera realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, habiéndose añadido una gotita adicional;
- la figura 12 muestra la tercera realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, habiéndose añadido otra gotita adicional;
- 40 la figura 13 muestra la tercera realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, habiéndose añadido otra gotita adicional más;
- 45 la figura 14 muestra la cuarta realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, habiéndose añadido otra gotita adicional;
- la figura 15 muestra una realización de un ensayo de células madre embrionarias, en el que se utiliza una placa para gotitas suspendidas acorde con la invención;
- 50 la figura 16 muestra un pozo fabricado por separado, de una realización de una placa para gotitas suspendidas de 24 pozos acorde con la invención, en una vista en perspectiva;
- la figura 17 muestra el pozo de la figura 16 en una vista en sección transversal;
- 55 la figura 18 muestra una vista superior de una placa fabricada por separado de la realización de la placa para gotitas suspendidas de 24 pozos acorde con la invención, en cuyos orificios se pueden introducir los pozos fabricados por separado de la figura 16;

- la figura 19 muestra una vista inferior de la placa de la figura 18;
- la figura 20 muestra una vista a mayor escala de un detalle de la placa de la figura 18 y de la figura 19, que
5 incluye uno de los orificios en los que se deben introducir los pozos;
- la figura 21 muestra una vista superior de la placa para gotitas suspendidas de 24 pozos, estando introducidos los pozos de la figura 16 en los orificios de la placa de la figura 18;
- 10 la figura 22 muestra una sección transversal a través de la placa para gotitas suspendidas de 24 pozos de la figura 21;
- la figura 23 muestra una vista inferior de la placa para gotitas suspendidas de 24 pozos de la figura 21;
- 15 la figura 24 muestra un detalle de la vista en sección transversal de la figura 22 que incluye un pozo introducido en un orificio;
- la figura 25 muestra una vista en perspectiva de una realización de otra placa de 24 pozos en la que se puede montar (de manera similar al conjunto mostrado en la figura 15) la placa para gotitas suspendidas de 24 pozos de la
20 figura 21;
- la figura 26 muestra una vista en sección transversal de la realización de la otra placa de 24 pozos de la figura 25;
- la figura 27 muestra una vista en perspectiva de la placa para gotitas suspendidas de 24 pozos de la figura 21
25 montada en la otra placa de 24 pozos mostrada en la figura 25;
- la figura 28 muestra una vista en sección del conjunto de placa mostrado en la figura 27;
- la figura 29 muestra un pozo fabricado por separado, de una realización de una placa para gotitas suspendidas de
30 96 pozos acorde con la invención, en una vista en perspectiva a mayor escala;
- la figura 30 muestra el pozo de la figura 29 en una vista en sección transversal;
- la figura 31 muestra un detalle del pozo del figura 29, que incluye los rebordes circunferenciales escalonados que
35 forman las barreras humectantes microfluídicas;
- la figura 32 muestra una vista superior de una placa fabricada por separado de la realización de la placa para gotitas suspendidas de 96 pozos acorde con la invención, en cuyos orificios se pueden introducir los pozos fabricados por separado de la figura 29;
- 40 la figura 33 muestra una vista en sección transversal de la placa de la figura 32, que incluye los orificios en los que se pueden introducir los pozos de la figura 29;
- la figura 34 muestra una vista inferior de la placa de la figura 32;
- 45 la figura 35 muestra una vista superior de la placa para gotitas suspendidas de 96 pozos, estando introducidos los pozos de la figura 29 en los orificios de la placa de la figura 32;
- la figura 36 muestra una sección transversal a través de la placa para gotitas suspendidas de 96 pozos de la
50 figura 35;
- la figura 37 muestra una vista inferior de la placa para gotitas suspendidas de 96 pozos de la figura 35;
- la figura 38 muestra un detalle de la vista en sección transversal de la figura 36 que incluye un pozo introducido en
55 un orificio;
- la figura 39 muestra una vista superior de una realización de otra placa de 96 pozos en la que se puede montar (de manera similar al conjunto mostrado en la figura 15) la placa para gotitas suspendidas de 96 pozos de la figura

35;

la figura 40 muestra una vista en sección transversal de la realización de la otra placa de 96 pozos de la figura 39;
y

5

la figura 41 muestra una vista en perspectiva de la placa para gotitas suspendidas de 96 pozos de la figura 35 montada en la otra placa de 96 pozos mostrada en la figura 39.

[0021] Las figuras 1 a 6 muestran una primera realización de una placa para gotitas suspendidas 1 acorde con la invención, o detalles de la misma en diversas vistas (ver más arriba). La placa 1 comprende un número predeterminado de compartimentos de gotita en forma de pozos 10. La realización mostrada es una placa de 24 pozos, si bien se puede concebir cualquier otro número de pozos. Son preferibles las placas que tienen un número estandarizado de pozos que están dispuestos de acuerdo con placas de micropozos estándar, tales como placas de 96 pozos o placas de 384 pozos.

15

[0022] Aunque en general son concebibles diferentes realizaciones de los pozos, los pozos 10 de la realización de la placa para gotitas suspendidas 1 están realizados tal como se muestra en una vista a mayor escala en la figura 6. El pozo 10 comprende una primera barrera humectante circunferencial en forma de un borde circunferencial agudo 102 que rodea una primera cavidad 100 que tiene un fondo cerrado 101. El primer borde circunferencial 102 está rodeado por un segundo borde circunferencial agudo 104, estando dispuesta un área humectable 103 entre el primer borde circunferencial 102 y el segundo borde circunferencial. Tal como se puede observar en la figura 6, los bordes circunferenciales están dispuestos de manera escalonada, aunque esto no es obligatorio. Está dispuesto un recorte anular 105 de tal modo que rodea el segundo borde circunferencial 104.

[0023] La razón para la configuración geométrica de los pozos 10 se aclara al analizar la figura 3, la figura 4 y la figura 5, que representan el proceso de suministrar gotitas a los pozos 10 y suspenderlas de dichos pozos 10. En la figura 3, se muestra la placa para gotitas suspendidas 1 en posición invertida de nuevo, es decir, con los pozos 10 orientados hacia arriba. En el pozo 10 que está dispuesto en la posición extrema izquierda, se puede reconocer una gotita pequeña de líquido 20. En el segundo pozo 10 desde la izquierda se puede reconocer una gotita mayor 21 que se ha obtenido al haber suministrado otra gotita de líquido a la gotita 20, de manera que se forma una gotita mayor 21. Se puede observar que el suministro de gotitas a los pozos 10 se puede llevar a cabo, por ejemplo, con la ayuda de una pipeta. En particular, la colocación de gotitas en los pozos 10 se puede llevar a cabo con la ayuda de un robot de pipeteado pero se puede realizar asimismo manualmente. Asimismo, en caso de que se tenga que aspirar algún líquido desde un pozo (por ejemplo, en caso de que se prevea sustituir un medio de cultivo líquido "antiguo" con medio de cultivo líquido "nuevo") esto se puede realizar fácilmente dado que las gotitas son accesibles fácilmente.

[0024] La figura 4 muestra la placa para gotitas suspendidas 1 en la posición en la que la gotita menor 20 y la gotita mayor 21 están suspendidas de los pozos respectivos 10, y esto se puede ver mejor en la figura 5 que muestra el detalle V de la figura 4. La gotita menor 20 está suspendida del pozo extremo izquierdo 10, mientras que la gotita mayor 21 está suspendida del segundo pozo 10 desde la izquierda.

[0025] A partir de la figura 5 y la figura 6 se aclara la función del primer y el segundo bordes circunferenciales 102 y 104 como barreras microfluidicas que impiden que la gotita 20 y la gotita mayor 21 se extiendan más allá de los bordes. El primer y segundo bordes circunferenciales 102 y 104 contribuyen por lo tanto la estabilización de la gotita suspendida del pozo respectivo 10. Con respecto al segundo borde circunferencial 104, este efecto se mejora por medio del recorte anular 105. El área humectable 103 dispuesta entre el primer y el segundo bordes circunferenciales 102 y 104 (ver la figura 6) permite añadir fácilmente una gotita de líquido adicional a la gotita 20 para formar una gotita mayor 21 (ver la figura 4 y la figura 5). El fondo cerrado 100 de los pozos 10 impide que se evapore líquido a través de un orificio o canal que pase a través del fondo, y sirve asimismo para estabilizar las gotitas suspendidas de los pozos debido a que impide que el aire empuje la gotita "desde detrás".

[0026] En las figuras 7 a 9 se muestra una segunda realización de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, en la que se muestra solamente un único pozo 30 de la placa para gotitas suspendidas 3, respectivamente. Esta realización está relacionada de algún modo con la primera realización descrita en detalle anteriormente, porque comprende asimismo una configuración escalonada de las barreras microfluidicas que impide que una gotita se extienda más allá de la respectiva barrera microfluidica. Sin embargo, la segunda realización es diferente de la primera realización porque en lugar de los bordes agudos, los pozos 30 comprenden una cavidad 301

que tiene un fondo cerrado 300 que está rodeado por un primer reborde circunferencial 302 que rodea la cavidad 301 y sobresale más allá de la cavidad hacia el extremo abierto del pozo 30. La figura 7 muestra una gotita pequeña de líquido 40 suspendida del pozo 30. La gotita 40 está retenida en la cavidad 301 mediante el primer reborde circunferencial 302 que forma una barrera microfluidica.

5

[0027] La figura 8 difiere de la figura 7 en que se ha añadido otra gotita de líquido a la gotita de líquido 40 para formar una gotita mayor 41. La gotita mayor 41 está retenida mediante un segundo reborde circunferencial 304 que rodea el primer reborde circunferencial 302, estando dispuesta un área humectante 303 entre el primer reborde circunferencial 302 y el segundo reborde circunferencial 304. De nuevo, el segundo reborde circunferencial 304 actúa como una barrera microfluidica que impide que la gotita mayor 41 se extienda más allá del reborde 304.

10

[0028] La figura 9 difiere de la figura 8 en que se ha añadido otra gotita de líquido más a la gotita mayor 41 para formar una gotita aún mayor 42. La gotita 42 está retenida mediante un tercer reborde circunferencial 306 que rodea el segundo reborde circunferencial 304, estando dispuesta otra área humectante 305 entre el segundo reborde circunferencial 304 y el tercer reborde circunferencial 306. De nuevo, el tercer reborde circunferencial 306 actúa como una barrera microfluidica que impide que la gotita aún mayor 42 se extienda más allá del reborde 306.

15

[0029] Las figuras 10 a 14 muestran un solo compartimento de gotita 50 de una tercera realización de una placa para gotitas suspendidas 5 acorde con la invención. Esta realización de la placa para gotitas suspendidas 5 es diferente de la primera y la segunda realizaciones descritas en detalle anteriormente, porque el compartimento 50 no comprende las barreras microfluidicas en una configuración escalonada, sino que están dispuestas barreras microfluidicas en forma de rebordes circunferenciales sobre una superficie inferior plana de la placa 5. Si bien el compartimento 50 comprende de nuevo un fondo cerrado 500, la cavidad 501 está limitada por un primer reborde circunferencial 502 que rodea la cavidad 501 y sobresale de la superficie inferior de la placa 5. La figura 10 muestra una gotita pequeña de líquido 64 suspendida del compartimento 50. La gotita 64 está retenida en la cavidad 501 mediante el primer reborde circunferencial 502 que forma una barrera microfluidica.

20

[0030] La figura 11 difiere de la figura 10 en que se ha añadido otra gotita de líquido a la gotita de líquido 64 para formar una gotita mayor 65 (asimismo, una gotita mayor 41 se puede introducir en el compartimento de gotita 50, tal como en la primera etapa). La gotita mayor 65 está retenida mediante un segundo reborde circunferencial 504 que rodea el primer reborde circunferencial 502, estando dispuesta un área humectante 503 entre el primer reborde circunferencial 502 y el segundo reborde circunferencial 504. De nuevo, el segundo reborde circunferencial 504 actúa como una barrera microfluidica que impide que la gotita mayor 65 se extienda más allá del reborde 504.

30

[0031] La figura 12 muestra una gotita aún mayor 66 que está retenida por un tercer reborde circunferencial 506 que rodea el segundo reborde circunferencial 504 estando dispuesta otra área humectable 505 entre el segundo reborde circunferencial 504 y el tercer reborde circunferencial 506. El tercer reborde circunferencial 506 actúa de nuevo como una barrera microfluidica para impedir que la gotita 66 se extienda más allá del reborde 506.

35

[0032] La figura 13 muestra una gotita aún mayor 67 que está retenida mediante un cuarto reborde circunferencial 508 que rodea el tercer reborde circunferencial 506, estando dispuesta otra área humectable más 507 entre el tercer reborde circunferencial 506 y el cuarto reborde circunferencial 508. El cuarto reborde circunferencial 508 actúa de nuevo como una barrera microfluidica para impedir que la gotita aún mayor 67 se extienda más allá del reborde 508.

40

45

[0033] Finalmente, la figura 14 muestra una gotita aún mayor 68 que está retenida mediante un quinto reborde circunferencial 510 que rodea el cuarto reborde circunferencial 508, estando dispuesta otra área humectable 509 entre el cuarto reborde circunferencial 508 y el quinto reborde circunferencial 510. Del mismo modo que se ha descrito anteriormente, el quinto reborde circunferencial 510 actúa como una barrera microfluidica para impedir que la gotita aún mayor 68 se extienda más allá del reborde 510.

50

[0034] En la figura 15, se muestra una realización de un ensayo con células madre embrionarias, que representa una realización del procedimiento acorde con la invención, en la que se pueden utilizar cualesquiera de las realizaciones descritas anteriormente de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención. Para la siguiente descripción del ensayo, se asume que se utiliza la primera realización de la placa para gotitas suspendidas 1 acorde con la invención. En esta realización del ensayo, se examina la toxicidad de una sustancia sobre los cuerpos embrioides. A tal efecto, se introduce un número predeterminado de gotitas de líquido en un número correspondiente de pozos o compartimentos de gotita. Cada gotita contiene un volumen predeterminado de la

55

sustancia a examinar así como un medio de cultivo líquido, así como una serie de células madre 82. En el caso de la primera realización de la placa para gotitas suspendidas 1, se pueden introducir veinticuatro gotitas 20 en los correspondientes pozos 10 mientras la placa 1 está en la posición invertida de nuevo (ver la figura 4). Después de que se han introducido las gotitas 20 en los pozos 10, la placa 1 se invierte y se monta con otra placa 7 que tiene un número correspondiente de pozos 70 que están dispuestos frente a los pozos 10 de la placa para gotitas suspendidas 1, de tal modo que se forma un conjunto cerrado. Los pozos 70 pueden también contener el medio de cultivo. El conjunto conformado de este modo puede ser tal que las gotitas 20 están suspendidas de los pozos 10, tal como se ha explicado en detalle anteriormente. El conjunto formado de este modo (ver la figura 15, esquina superior izquierda) se incuba durante un intervalo de tiempo predeterminado, por ejemplo durante tres días. Durante este periodo de incubación, las células madre 82 contenidas en las gotitas respectivas se asientan y forman un cuerpo embriode tridimensional 83 (de manera más general, un agregado celular tridimensional) en la gotita respectiva 20 en el vértice de dicha gotita, es decir en el punto más bajo de la gotita 20 (ver la figura 15, esquina superior derecha).

15 **[0035]** Después del primer periodo de incubación, puede ser necesario suministrar medio de cultivo líquido adicional a la gotita 20 para fomentar el crecimiento adicional de los cuerpos embrioides 83. A tal efecto, el conjunto se vuelve a abrir y la placa 1 se vuelve a invertir. En esta posición invertida de nuevo, se suministra medio de cultivo líquido adicional a las gotitas respectivas 20 en los pozos respectivos 10 para formar gotitas mayores 21. Una vez que se ha suministrado el medio de cultivo líquido adicional para formar las gotitas mayores 21, la placa 1 se invierte de nuevo y se vuelve a montar con la otra placa 7 (cuyos pozos 70 contienen asimismo medio de cultivo líquido nuevo). El conjunto así formado se incuba durante otro intervalo de tiempo predeterminado, por ejemplo durante dos días, para permitir el crecimiento adicional de los cuerpos embrioides.

25 **[0036]** Después del periodo de incubación adicional, los cuerpos embrioides 83 se pueden transferir a los pozos 70 de la placa 7 (placa receptora) mediante centrifugado, lo que se puede realizar con un dispositivo de centrifugado bien conocido en la técnica. Después de que los cuerpos embrioides 83 han sido centrifugados a los pozos 70 de la placa 7 que contiene el medio de cultivo líquido, el conjunto se puede incubar durante otro intervalo de tiempo predeterminado, por ejemplo durante cinco a siete días. Los cuerpos embrioides 83 se asientan en los fondos planos de los respectivos pozos 70 de la placa 7.

30 **[0037]** A continuación de este periodo de incubación, el conjunto se puede volver a abrir y los agregados celulares se pueden examinar para comprobar si la sustancia a examinar es tóxica para las células. Aunque se contemplan diversos tipos de análisis, un tipo de análisis consiste en analizar los agregados celulares con la ayuda de un microscopio. Dado que los agregados celulares reposan sobre los fondos planos de los pozos de la placa 7, es posible el análisis microscópico. Por ejemplo, los agregados celulares se pueden examinar para comprobar si contienen células miocárdicas, dado que este tipo de células se pueden identificar fácilmente bajo el microscopio, debido a que estas células se contraen y se expanden (laten).

40 **[0038]** La transferencia descrita anteriormente de los cuerpos embrioides o agregados celulares tridimensionales a los pozos 70 de la otra placa 7 por medio de centrifugado es opcional. Alternativamente, el conjunto se puede volver a abrir y la placa 1 se puede montar en una centrifugadora de tal modo que, tras el centrifugado, los cuerpos embrioides o los agregados celulares tridimensionales celulares se desplazan desde el vértice de las gotitas hacia el fondo 101 del pozo 10 (ver la figura 6). A continuación, los cuerpos embrioides se pueden analizar en los pozos 10 de la placa con la ayuda del microscopio, dado que están dispuestos sobre el fondo 45 101 del pozo 10, que forma un contexto estable para el análisis microscópico.

50 **[0039]** Las figuras 16 a 24 muestran otra realización de la placa para gotitas suspendidas 6 (figuras 21 a 23) acorde con la invención. Esta realización comprende pozos fabricados por separado 60 (ver la figura 16 y la figura 17) que se pueden ajustar a presión en orificios 610 de una placa fabricada por separado 61 (ver las figuras 18 a 20). Tal como se puede ver a partir de la vista en sección transversal del pozo fabricado por separado 60 mostrado en la figura 17, el pozo 60 comprende un primer reborde circunferencial 602, un segundo reborde circunferencial 604 y un tercer reborde circunferencial 606. Las estructuras y funciones del pozo, y del primer, el segundo y el tercer reborde circunferencial se han descrito ya en detalle con la ayuda de la figura 7, la figura 8 y la figura 9 y, por lo tanto, se hace referencia a estas partes de la descripción anterior. En la realización mostrada, los pozos 60 se 55 ajustan a presión en orificios 610 de la placa 61 desde el lado de la placa 61 que forma la superficie exterior 611 de la placa 61. Una vez que los pozos 60 están ajustados a presión en orificios 610, se acoplan de manera fija a la placa 61 y se completa la formación de la placa para gotitas suspendidas 6 (figuras 21 a 24).

[0040] Alternativamente, es concebible que los pozos fabricados por separado 60 estén acoplados a la superficie interior 612 de la placa 61 (por ejemplo, mediante soldadura ultrasónica o mediante encolado). En este caso, la placa 61 puede no comprender orificios. Sin embargo, las posiciones en las que se ha producido la soldadura ultrasónica o el encolado de los pozos 60 a la superficie interior 612 de la placa 61 pueden ser visibles y pueden dificultar el análisis microscópico de los contenidos de los pozos. Por lo tanto, es preferible el ajuste a presión de los pozos 60 en los orificios 610 de la placa 61.

[0041] Las figuras 25 y 26 muestran una realización de otra placa 8 que comprende una serie de pozos 80 correspondiente al número de pozos 60 de la placa para gotitas suspendidas 6. Asimismo, los pozos 80 de la otra placa 8 están dispuestos de una manera correspondiente a la disposición de los pozos 60 de la placa para gotitas suspendidas 6.

[0042] Tal como se puede ver en la figura 27 y la figura 28, la placa para gotitas suspendidas 6 se puede montar de manera apilada sobre otra placa 8, de tal modo que cada pozo 60 de la placa para gotitas suspendidas 6 está dispuesto sobre un pozo correspondiente 80 de la otra placa 8. Un objetivo de dicho conjunto ya se ha descrito en detalle anteriormente con respecto a la figura 15 y, por lo tanto, se hace referencia a estas partes de la descripción anterior.

[0043] Con la ayuda de las figuras 16 a 28 se describen solamente placas de 24 pozos o conjuntos de placas de 24 pozos, si bien son aplicables consideraciones similares a las placas de 96 pozos, tal como resultará evidente en lo que sigue.

[0044] Las figuras 29 a 38 muestran otra realización más de la placa para gotitas suspendidas 9 (figuras 35 a 37) acorde con la invención, que está realizada como una placa para gotitas suspendidas de 96 pozos. De manera similar a la realización de 24 pozos, la realización de 96 pozos comprende pozos fabricados por separado 90 (ver las figuras 29 a 31) que se pueden ajustar a presión en orificios 910 de una placa fabricada por separado 91 (ver las figuras 32 a 34). Tal como se puede ver a partir de las vistas en sección transversal del pozo fabricado por separado 90 mostrado en la figura 30 y la figura 31, el pozo 90 comprende un primer reborde circunferencial 902, un segundo reborde circunferencial 904 y un tercer reborde circunferencial 906. Las estructuras y funciones del pozo, y del primer, el segundo y el tercer reborde circunferencial se han descrito ya en detalle con la ayuda de la figura 7, la figura 8 y la figura 9 y, por lo tanto, se hace referencia a estas partes de la descripción anterior. En la realización mostrada, los pozos 90 se ajustan a presión en orificios 910 de la placa 91 desde el lado de la placa 91 que forma la superficie exterior 911 de la placa 91. Una vez que los pozos 90 están ajustados a presión en orificios 910, se acoplan de manera fija a la placa 91 y se completa la formación de la placa para gotitas suspendidas 9 (figuras 35 a 38).

[0045] Las figuras 39 a 41 muestran una realización de otra placa 92 que comprende una serie de pozos 920 correspondiente al número de pozos 90 de la placa para gotitas suspendidas 9. Asimismo, los pozos 920 de la otra placa 92 están dispuestos de una manera correspondiente a la disposición de los pozos 90 de la placa para gotitas suspendidas 9.

[0046] Tal como se puede ver a partir de la figura 41, la placa para gotitas suspendidas 9 se puede montar de manera apilada sobre otra placa 92, de tal modo que cada pozo 90 de la placa para gotitas suspendidas 9 está dispuesto sobre un pozo correspondiente 920 de otra placa 92.

[0047] Por supuesto, las realizaciones descritas anteriormente son solamente ejemplos de diversas aplicaciones del procedimiento, de la placa para gotitas suspendidas y de la placa para gotitas suspendidas acorde con la invención, de modo que no pretenden limitar la invención a las mismas. Por el contrario, está previsto que el alcance de la invención se defina mediante las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9) que comprende un número predeterminado de compartimentos de gotita (10; 30; 50; 60; 90) cada uno de los cuales puede recibir una gotita (20, 21; 40, 41, 42; 60, 61, 52, 63, 64) de un líquido, comprendiendo el respectivo compartimento de gotita (10; 30; 50; 60; 90) una barrera humectante microfluidica circunferencial (102; 302; 502; 702; 902) dispuesta para rodear una respectiva cavidad (100; 500) e impidiendo que una gotita se extienda más allá de la barrera humectante microfluidica, en el que el respectivo compartimento de gotita (10; 30; 50; 60; 90) comprende un fondo cerrado (101; 501) y por lo menos una barrera humectante microfluidica circunferencial adicional (104; 304, 306; 504, 506, 508, 510; 604, 606; 904, 906), estando dispuesta cada barrera humectante microfluidica circunferencial adicional (104; 304, 306; 504, 506, 508, 510; 604, 606; 904, 906) para rodear una barrera humectante microfluidica circunferencial precedente (102; 302, 304; 502, 504, 506, 508; 604, 606; 904, 906), estando dispuesta un área humectable (103; 303, 305; 503, 505, 507, 509) entre dos barreras humectantes microfluidicas dispuestas de manera adyacente.
- 15 2. Placa para gotitas suspendidas acorde con la reivindicación 1, en la que los respectivos compartimentos de gotita son pozos (10; 30; 60; 90).
3. Placa para gotitas suspendidas acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la barrera humectante microfluidica circunferencial comprende un borde circunferencial (102), y en la que dicha por lo menos una barrera humectante microfluidica circunferencial adicional comprende por lo menos un borde circunferencial adicional (104), estando dispuesto cada borde circunferencial adicional (104) para rodear un borde circunferencial precedente (102), estando dispuesta al área humectable (103) entre dos bordes circunferenciales dispuestos de manera adyacente (102, 104).
- 25 4. Placa para gotitas suspendidas acorde con la reivindicación 3, en la que dos bordes circunferenciales adyacentes (102, 104) están dispuestos de manera escalonada.
5. Placa para gotitas suspendidas acorde con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la barrera humectante microfluidica circunferencial comprende un reborde circunferencial (302; 502; 602; 902), y en la que dicha por lo menos una barrera humectante microfluidica adicional comprende un reborde circunferencial adicional, rodeando cada reborde circunferencial adicional (304, 306; 504, 506, 508, 510; 604, 606; 904, 906) un reborde circunferencial precedente (302, 304; 502, 504, 506, 508; 602, 604; 902, 904), estando dispuesta el área humectable (303, 305; 503, 505, 507, 509) entre dos rebordes circunferenciales dispuestos de manera adyacente.
- 35 6. Placa para gotitas suspendidas acorde con la reivindicación 5, en el que los rebordes circunferenciales dispuestos de manera adyacente (302, 304, 306; 602, 604, 606; 902, 904, 906) están dispuestos de manera escalonada.
7. Placa para gotitas suspendidas (6; 9) acorde con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la placa para gotitas suspendidas está realizada de una placa fabricada por separado (61; 91) que tiene un número predeterminado de orificios (610; 910) en la misma, y de un número predeterminado correspondiente de pozos fabricados por separado (60; 90) que forman los compartimentos de gotita, estando ajustado a presión cada pozo fabricado por separado (60; 90) en un orificio respectivo (610; 910) de la placa fabricada por separado (61; 91).
- 40 8. Placa para gotitas suspendidas (6; 9) acorde con la reivindicación 7, en la que los pozos fabricados por separado (60; 90) están ajustados a presión en los orificios (610; 910) desde el lado de la placa (6; 9) que forma la superficie exterior (611, 911) de la placa (6; 9).
9. Placa para gotitas suspendidas acorde con la reivindicación (7) o la reivindicación 8, que comprende un número de 24 pozos, 96 pozos o 384 pozos.
10. Placa para gotitas suspendidas acorde con la reivindicación (5), en la que los rebordes circunferenciales (503, 504, 506, 508, 510) están dispuestos sobre una superficie plana.
- 55 11. Un conjunto de placa para gotitas suspendidas, que comprende una placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9) acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que tiene un número predeterminado de pozos o compartimentos de gotita (10; 30; 50; 60, 90), y una placa receptora (7) que tiene una serie de pozos (70) correspondiente al número predeterminado de pozos o compartimentos de gotita (10; 30; 50; 60; 90) de la placa

para gotitas suspendidas, estando montadas la placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9) y la placa receptora (7) de tal modo que en la situación montada, los pozos (70) de la placa receptora están dispuestos alineados con los pozos o compartimentos de gotita (10; 30; 50; 60; 90) de la placa para gotitas suspendidas.

5 12. Procedimiento para examinar la toxicidad de una sustancia sobre las células, que comprende las etapas de:

- a) introducir un número predeterminado de gotitas de líquido (20; 40; 64) en un número correspondiente de compartimentos de gotita (10; 30; 50; 60; 90) de una placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9), conteniendo cada
10 gotita un volumen predeterminado de la sustancia examinar y de un medio de cultivo líquido, así como una serie de células (82);
- b) invertir e incubar la placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9) durante un intervalo predeterminado de tiempo, conteniendo la placa para gotitas suspendidas las gotitas (20; 40; 64), de tal modo que están suspendidas de los compartimentos de gotita respectivos (10; 30; 50; 60; 90) para permitir que las células (82) formen agregados
15 celulares tridimensionales (83) en las respectivas gotitas (20; 40; 64),
- c) suministrar medio de cultivo líquido adicional a las gotitas (20; 40; 64) en los compartimentos de gotita respectivos (10; 30; 50; 60; 90) para fomentar el crecimiento adicional de los agregados celulares tridimensionales (83); y
- d) analizar los agregados celulares tridimensionales (83) para determinar si la sustancia a examinar es tóxica para los agregados celulares tridimensionales (83), en el que se utiliza una placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9)
20 acorde con cualquiera de las reivindicaciones anteriores; y

en el que la etapa c) se lleva a cabo volviendo a invertir la placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9), añadiendo una gotita del medio de cultivo líquido adicional a las respectivas gotitas que contienen los agregados celulares tridimensionales de tal modo que formen respectivas gotitas mayores (21; 41, 42; 65, 66, 67, 68) en los
25 compartimentos de gotita respectivos (10; 30; 50; 60; 90), y a continuación invirtiendo de nuevo la placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9) para permitir que los agregados celulares tridimensionales (83) crezcan en las respectivas gotitas mayores (21; 41, 42; 65, 66, 67, 68) suspendidas de los compartimentos de gotita (10; 30; 50; 60; 90).

13. Procedimiento acorde con la reivindicación 12, que comprende además las etapas de
30

- e) transmitir los agregados celulares tridimensionales cultivados (83) desde los compartimentos de gotita (10; 30; 50; 60; 90) de la placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9) a un número correspondiente de pozos (70) de una placa receptora (7);
- f) incubar la placa receptora (7) con los pozos (70) que contienen los agregados celulares tridimensionales (83)
35 durante otro intervalo de tiempo predeterminado; y
- g) después de la incubación, analizar los agregados celulares tridimensionales para determinar si la sustancia a examinar es tóxica para los agregados celulares tridimensionales.

14. Procedimiento acorde con la reivindicación 13, en el que la etapa e) se lleva a cabo montando la placa
40 para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9) y la placa receptora (7) de tal modo que los pozos respectivos (70) de la placa receptora (7) estén dispuestos frente a los compartimentos de gotita respectivos (10; 30; 50; 60; 90) de la placa para gotitas suspendidas (1; 3; 5; 6; 9), y mediante el centrifugado subsiguiente de las placas montadas.

15. Procedimiento acorde con cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que las células (82) son
45 células madre embrionarias y los agregados celulares tridimensionales (82) son cuerpos embrioides, y en el que la etapa de analizar los agregados celulares tridimensionales (83) para determinar si la sustancia a examinar es tóxica para los agregados celulares tridimensionales se lleva a cabo analizando si los cuerpos embrioides contienen células miocárdicas.

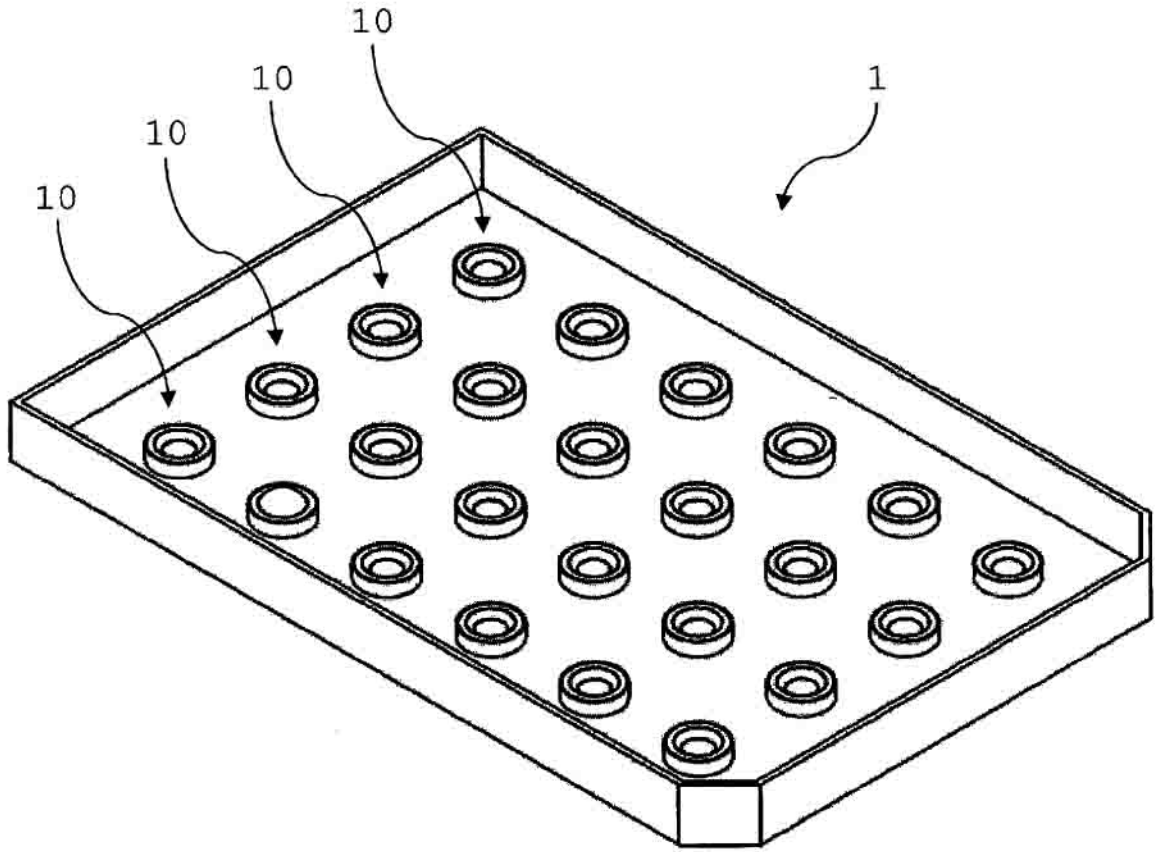


Fig. 1

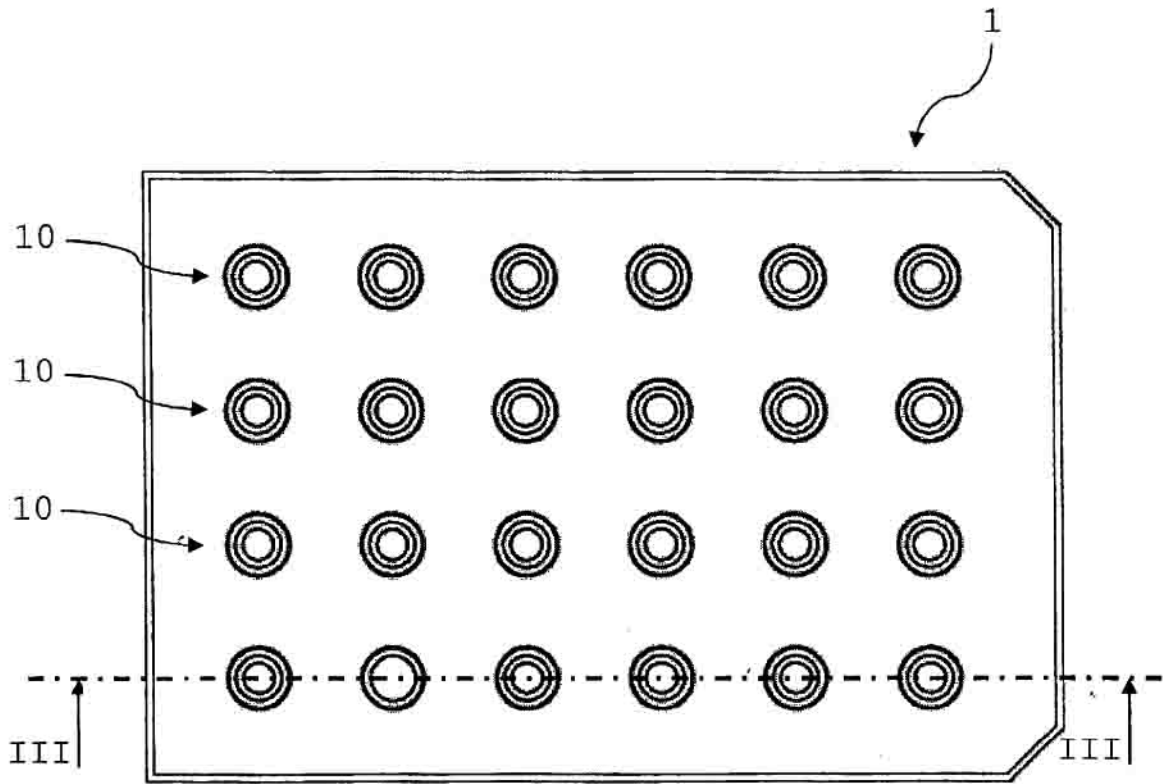


Fig. 2

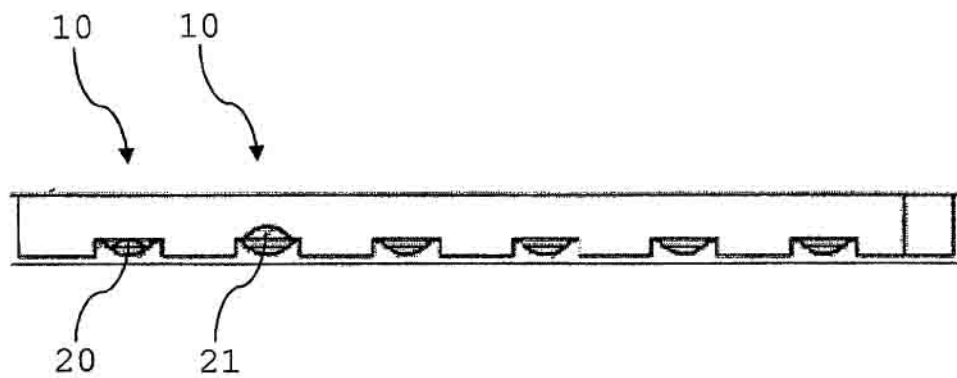


Fig. 3

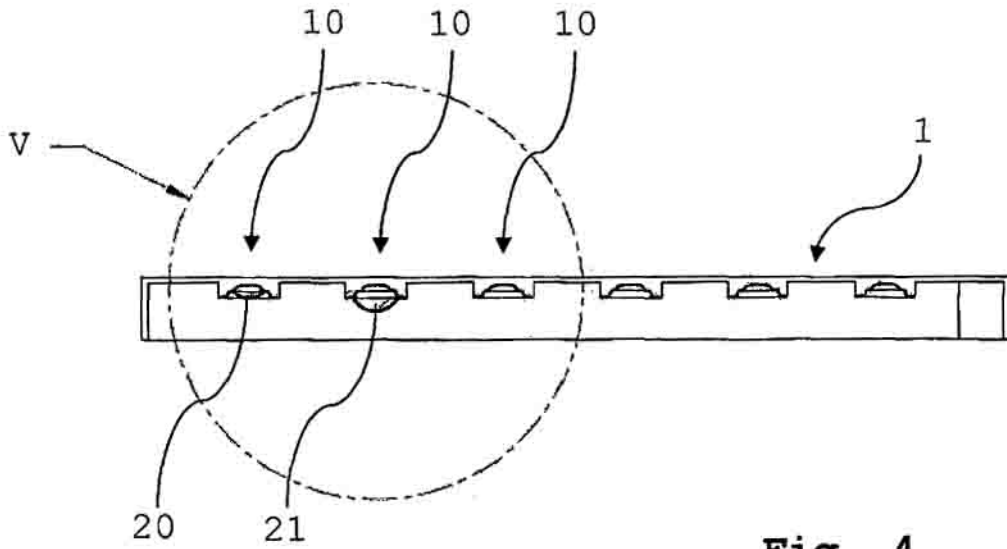


Fig. 4

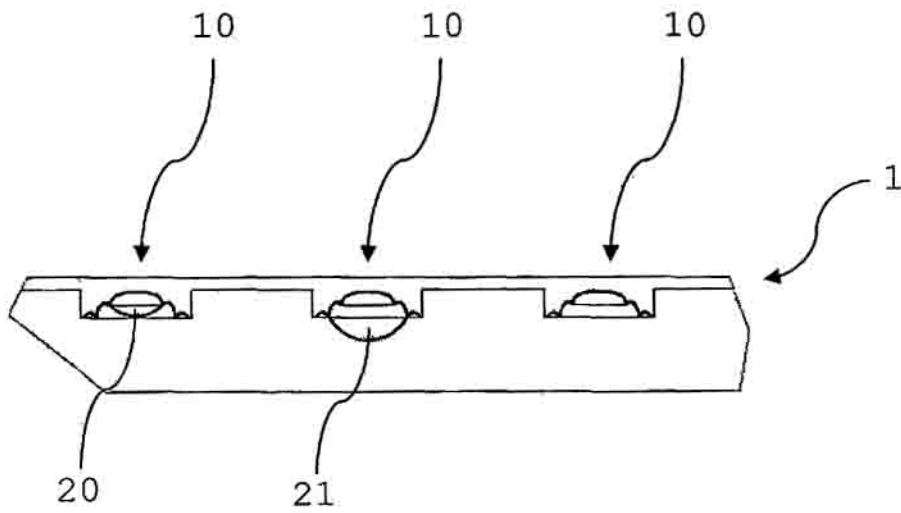


Fig. 5

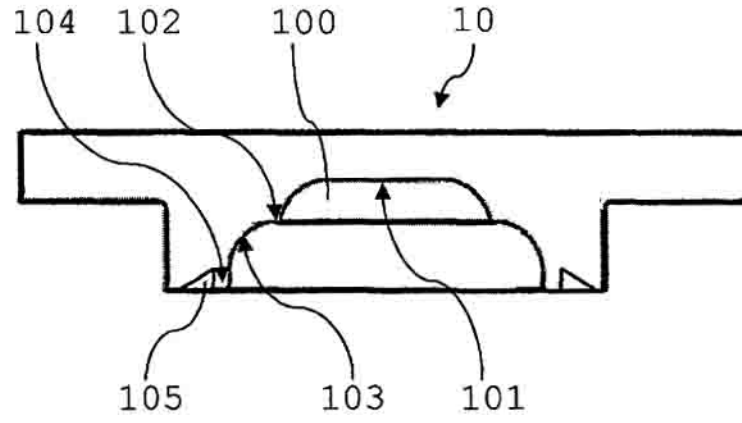


Fig. 6

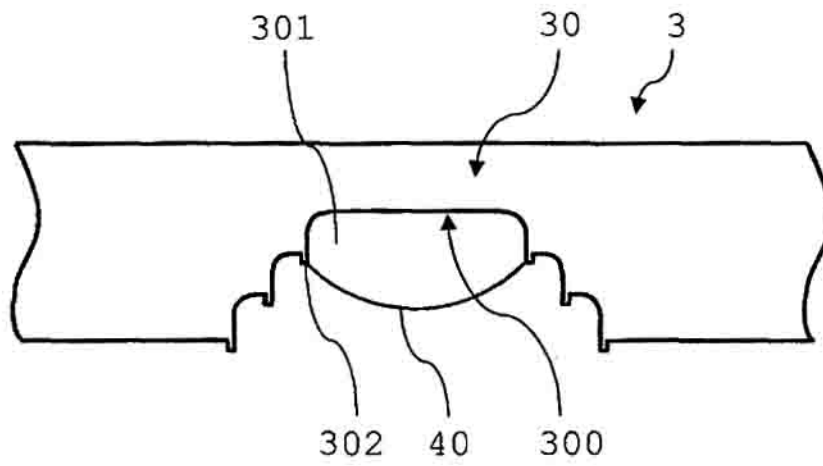


Fig. 7

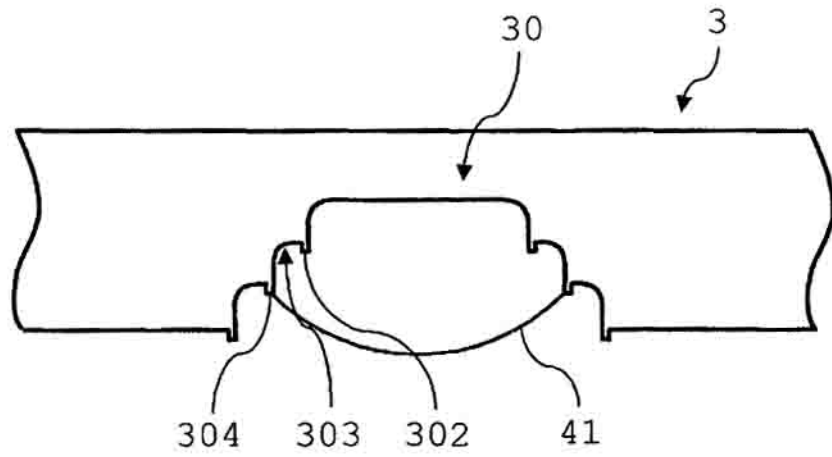


Fig. 8

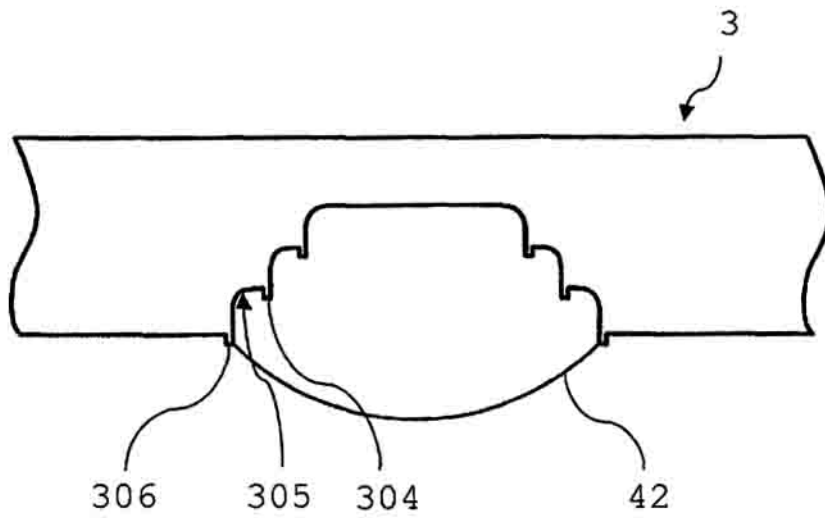


Fig. 9

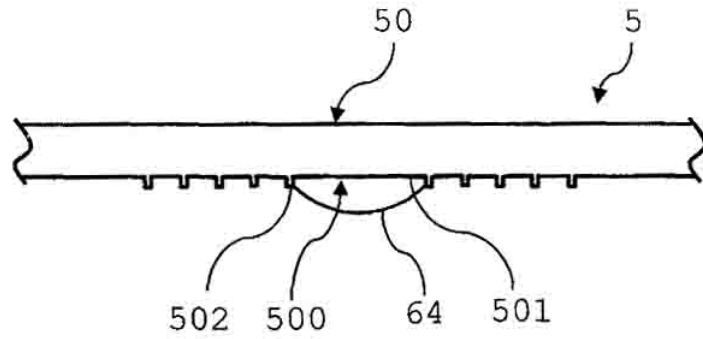


Fig. 10

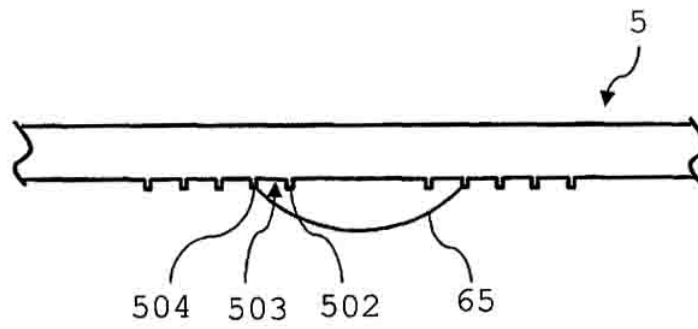


Fig. 11

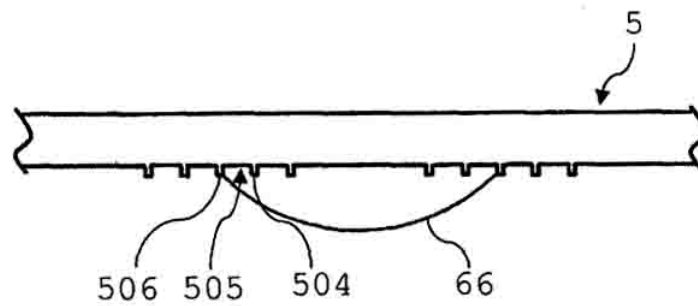


Fig. 12

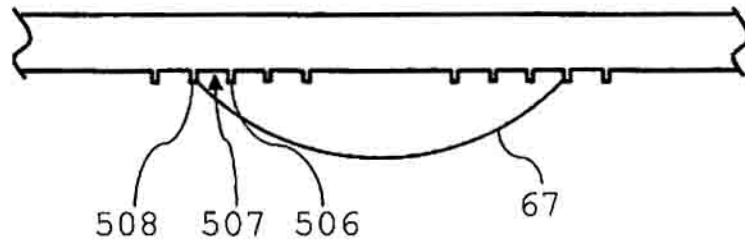


Fig. 13

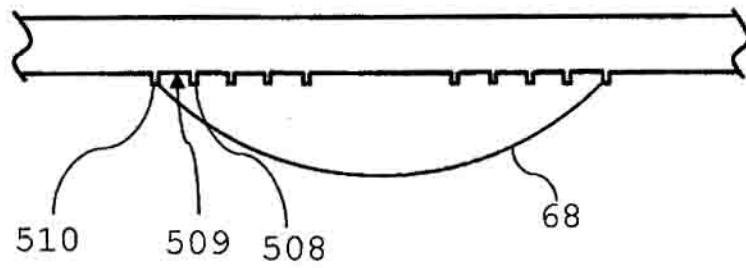


Fig. 14

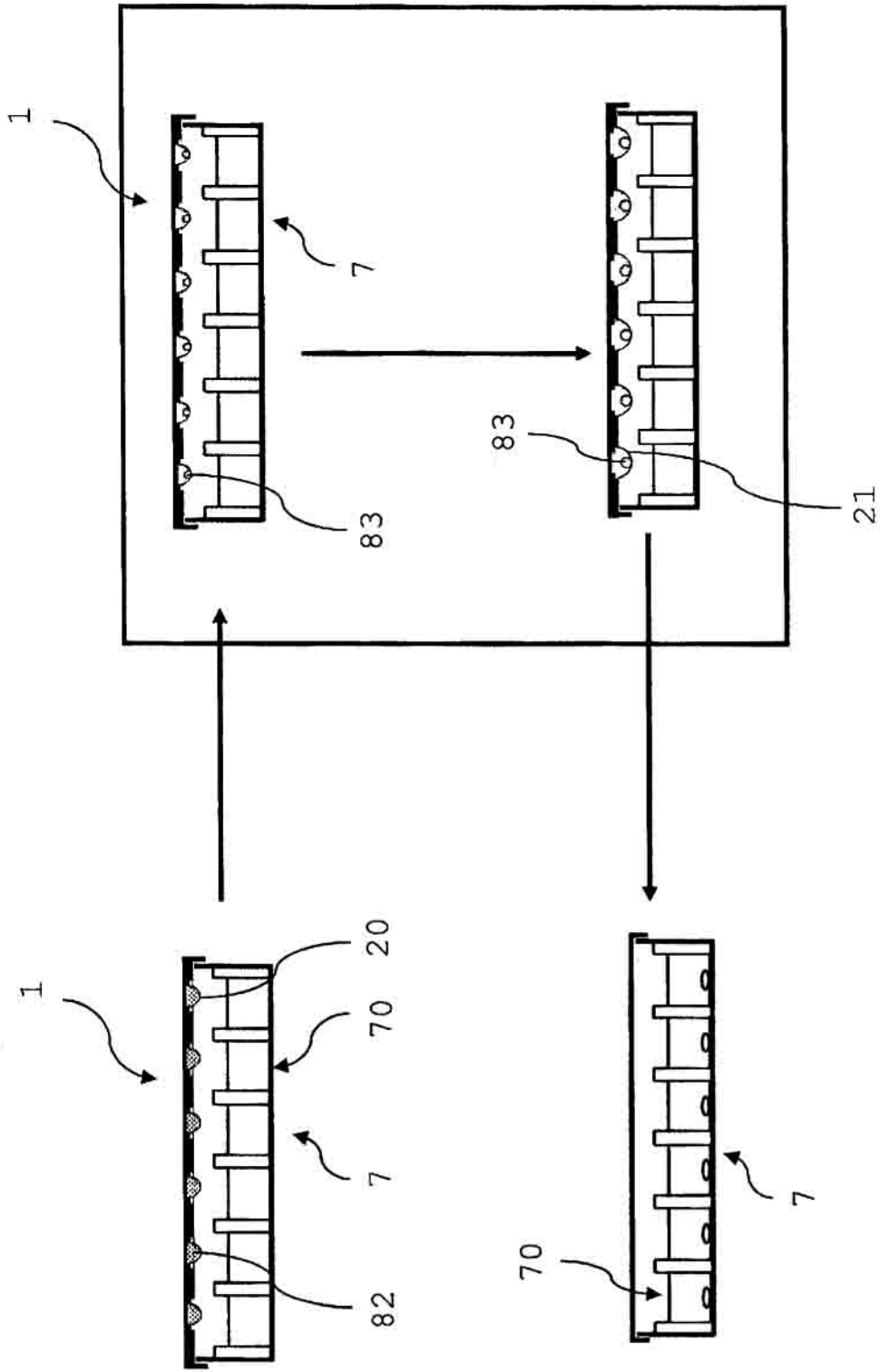


Fig. 15

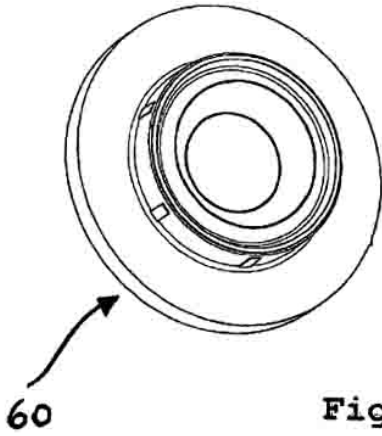


Fig. 16

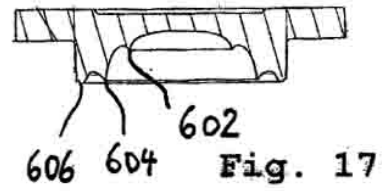


Fig. 17

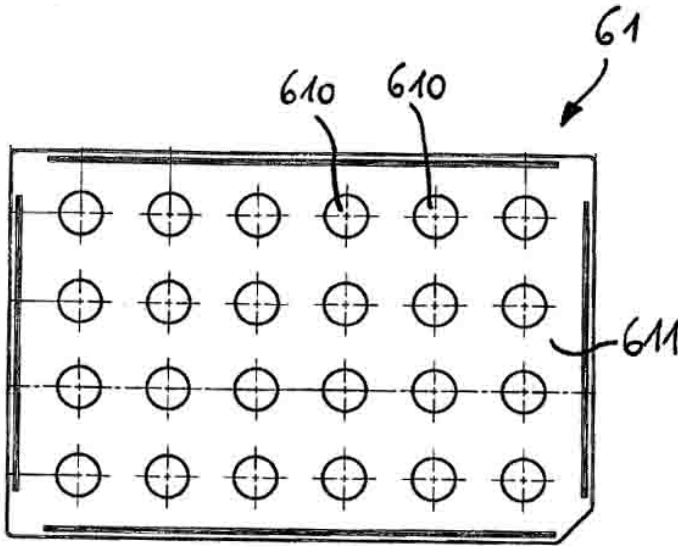


Fig. 18

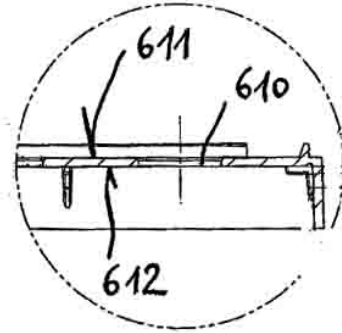


Fig. 20

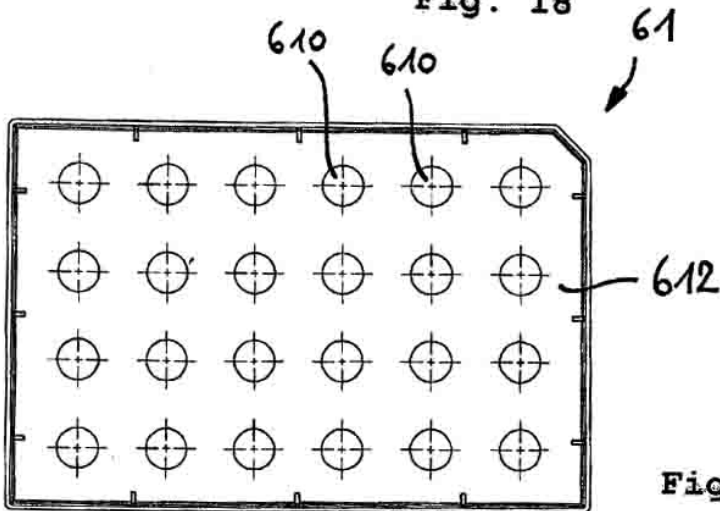


Fig. 19

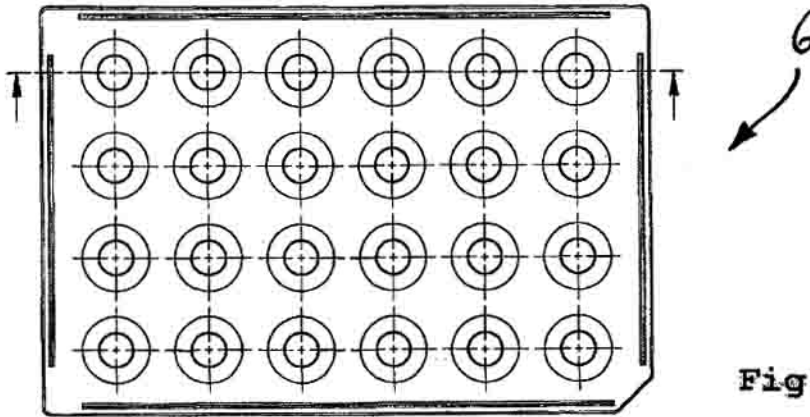


Fig. 21

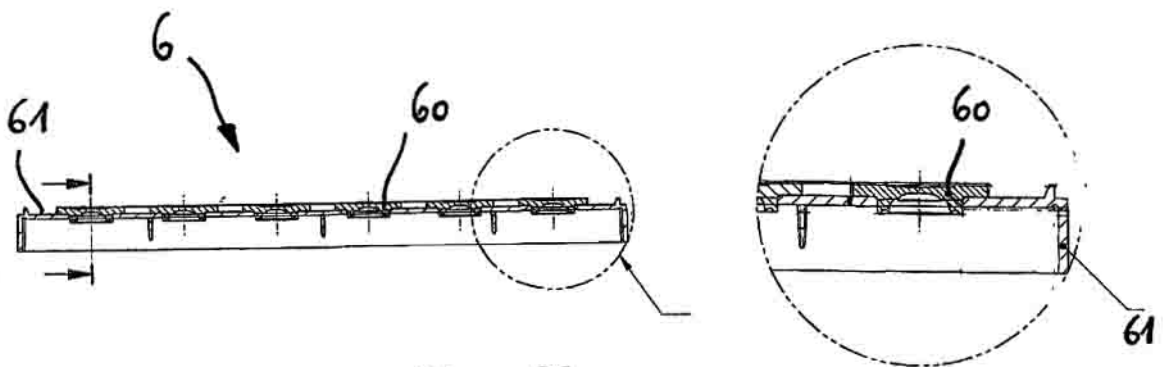


Fig. 22

Fig. 24

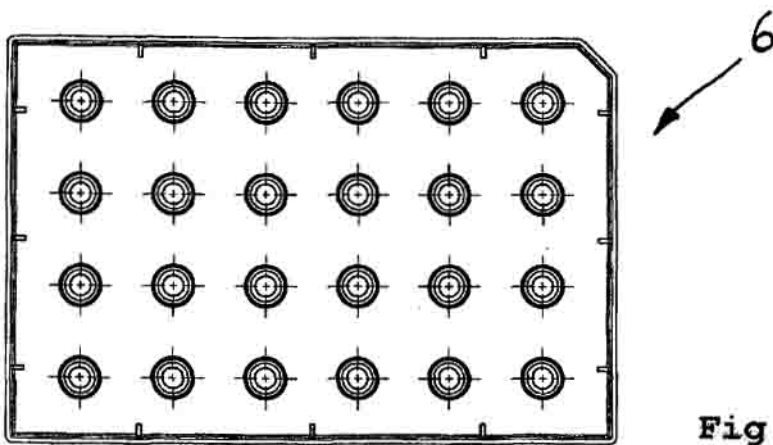


Fig. 23

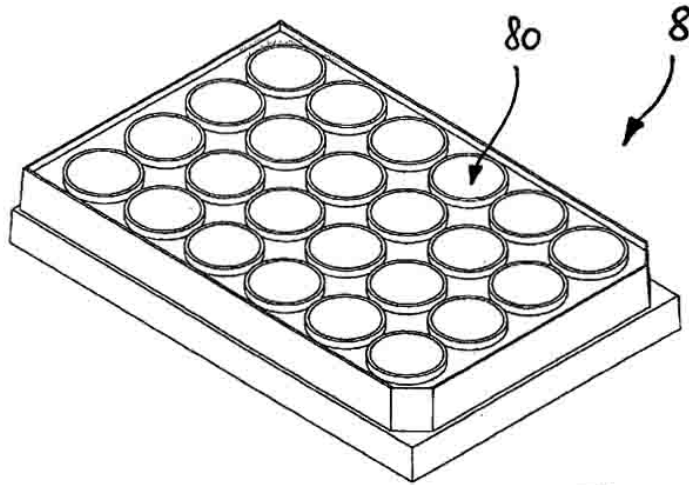


Fig. 25

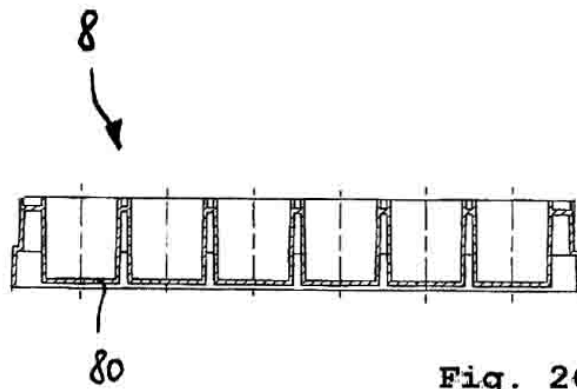


Fig. 26

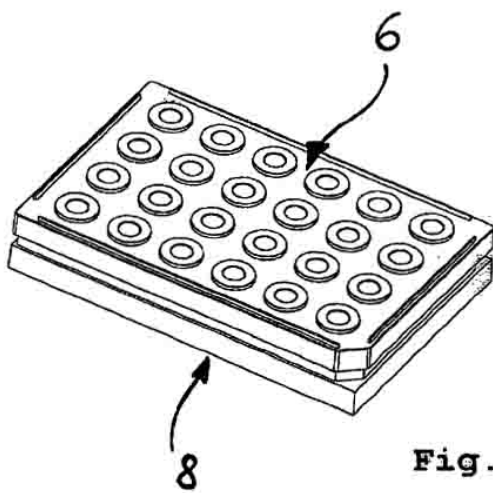


Fig. 27

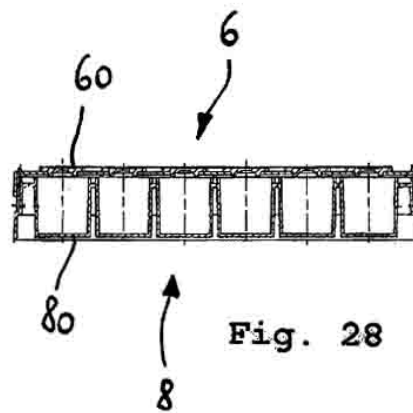


Fig. 28

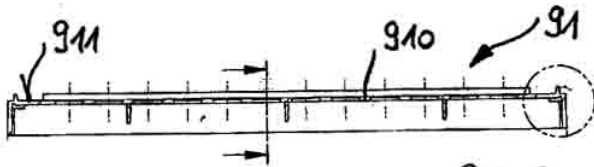
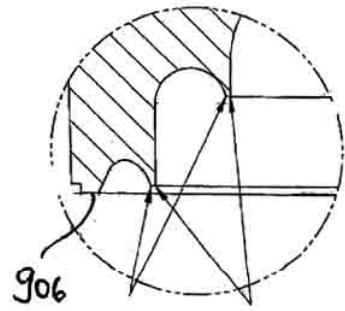
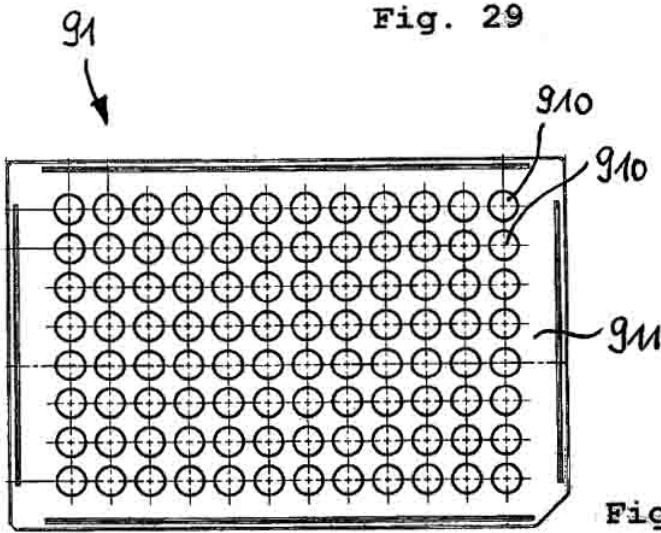
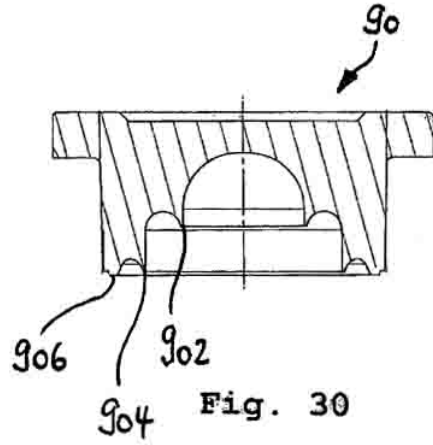
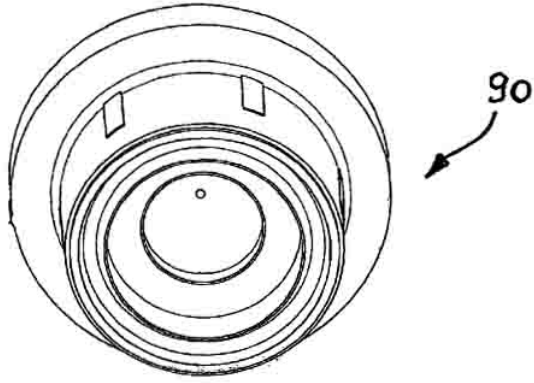


Fig. 33

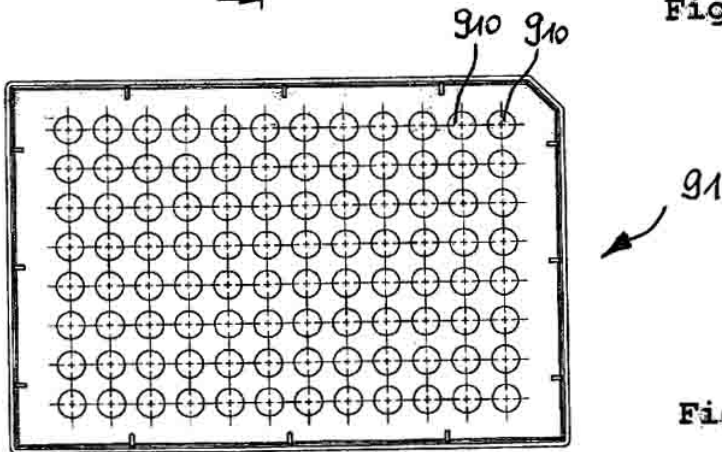


Fig. 34

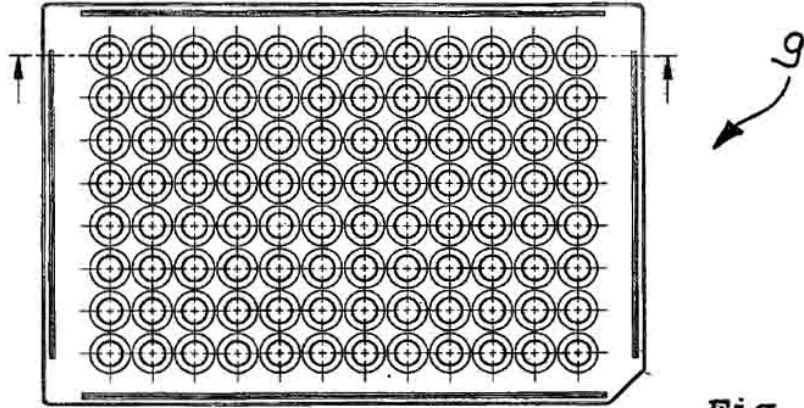


Fig. 35

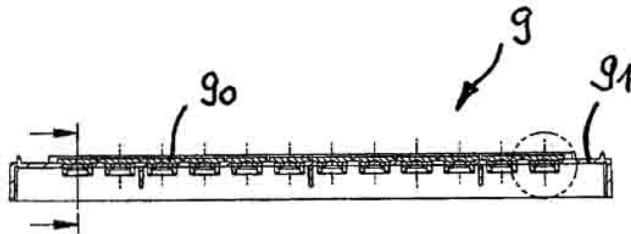


Fig. 36

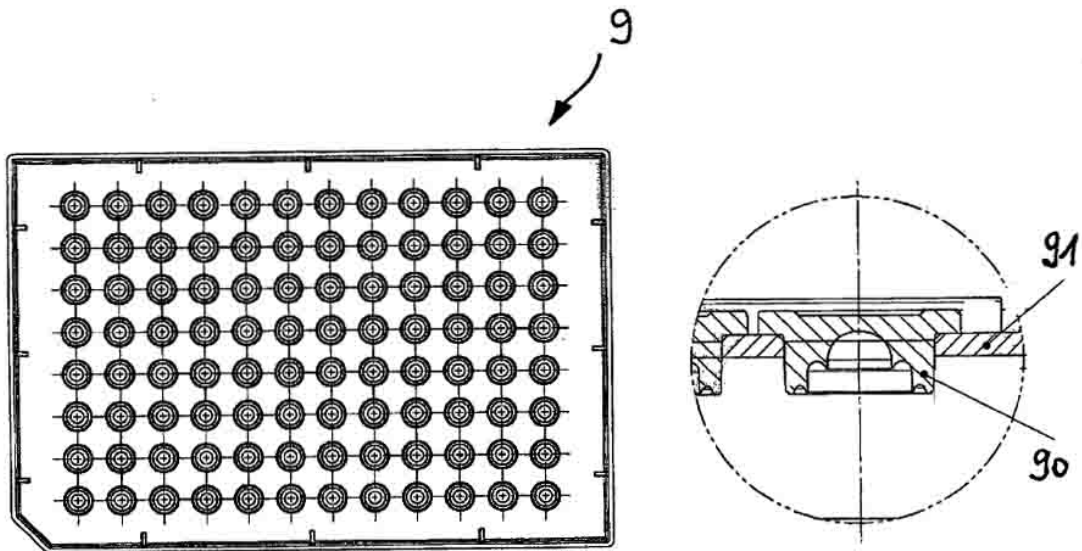


Fig. 37

Fig. 38

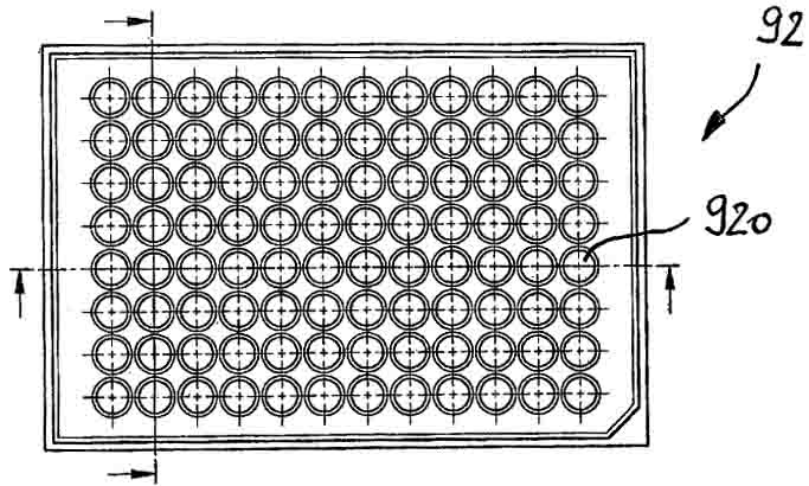


Fig. 39

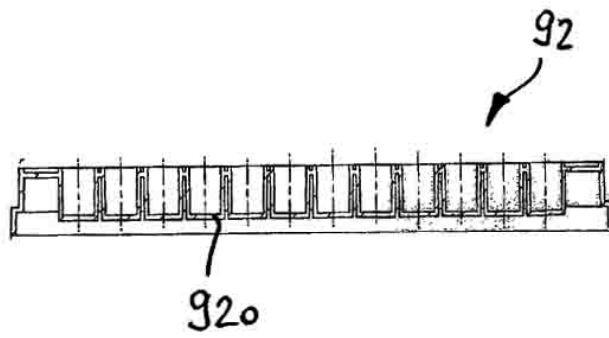


Fig. 40

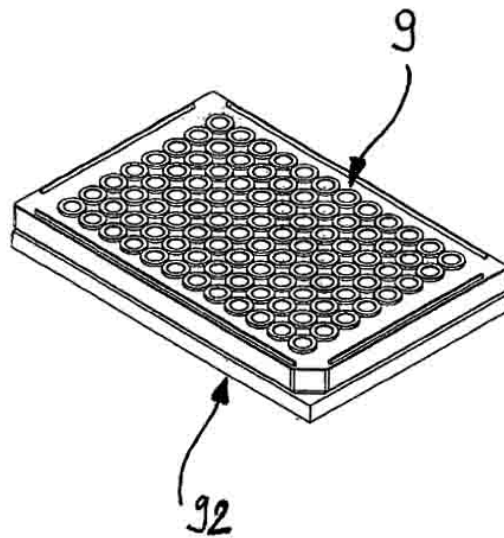


Fig. 41