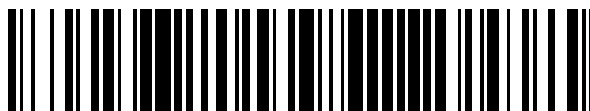


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 867**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2012 E 12152363 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2620764**

54 Título: **Un método de luminiscencia para detectar un analito en una muestra líquida y sistema de análisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.01.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GIESEN, URSULA, DR. y**  
**DONNERBAUER, ERNA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 555 867 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**

Un método de luminiscencia para detectar un analito en una muestra líquida y sistema de análisis

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la detección de un analito en una muestra líquida efectuando luminiscencia, tal como usando un inmunoensayo de luminiscencia y un sistema de análisis respectivo.

## 10 Antecedentes y técnica relacionada

Se han desarrollado numerosos métodos y sistemas para la detección y cuantificación de analitos de interés en sustancias bioquímicas y biológicas. Los métodos y sistemas que son capaces de medir cantidades traza de microorganismos, productos farmacéuticos, hormonas, virus, anticuerpos, ácidos nucleicos y otras proteínas son de gran valor para los investigadores y médicos.

Una parte de la técnica muy sustancial se ha desarrollado basándose en las reacciones de unión bien conocidas, por ejemplo, reacciones antígeno-anticuerpo, técnicas de hibridación de ácido nucleico y sistemas proteína-ligando. El alto grado de especificidad en muchos sistemas de unión bioquímicos y biológicos ha conducido a muchos métodos de ensayo y sistemas valiosos en investigación y diagnóstico. Típicamente, la existencia de un analito de interés está indicada por la presencia o ausencia de una "etiqueta" observable fijada a uno o más de los materiales de unión.

Se han desarrollado técnicas de ensayo quimioluminiscente, donde una muestra que contiene un analito de interés se mezcla con un reactante marcado con una etiqueta quimioluminiscente. La mezcla reactiva se incubaba y alguna porción del reactante marcado se une al analito. Después de la incubación, la concentración de la etiqueta en cualquiera o ambas fracciones puede determinarse por técnicas quimioluminiscentes. El nivel de quimioluminiscencia determinado en una o ambas fracciones indica la cantidad de analito de interés en la muestra biológica.

Las técnicas de ensayo electroquimioluminiscentes (ECL) son una mejora respecto a las técnicas quimioluminiscentes. Proporcionan una medición sensible y precisa de la presencia y concentración de un analito de interés. En tales técnicas, la muestra incubada se expone a un electrodo de trabajo controlado potencioestática o galvanostáticamente para activar la luminiscencia. En el entorno químico apropiado, tal electroquimioluminiscencia se activa mediante una tensión o corriente impresa sobre el electrodo de trabajo en un momento particular y de una manera particular. Se mide la luz producida por la etiqueta e indica la presencia o cantidad de analito. Para una descripción más completa de tales técnicas de ECL, hágase referencia, por ejemplo, a la Patente de Estados Unidos n.º 5.238.808 y el documento WO86/02734.

El documento US 6.881.536 muestra un método de ensayo de unión específica basado en un fenómeno luminescente en el que una materia en forma de micropartículas inertes se une específicamente a uno de los reactantes de unión del sistema de ensayo.

El documento US 6.599.473 B1 divulga un análisis de la reacción de unión electroquimioluminiscente (ECL-BBA).

El documento WO 2005/040759 A describe un aparato y un método para detectar un analito diana en una muestra formando un complejo fluorescente que comprende el analito diana y una sonda, en el que la desintegración de fluorescencia y/o en la vida útil cambia tras la formación del complejo. El aparato comprende una fuente de luz pulsátil y un digitalizador para medir la desintegración fluorescente y/o la vida útil del fluoróforo en el complejo.

El documento US 2011/293154 A describe un método para caracterizar una muestra por formación de imágenes de microscopía de fluorescencia que incluye detectar la intensidad de fluorescencia de una manera resuelta en el tiempo después de desactivar la radiación de excitación para establecer una función de desintegración, que representa la desintegración de la intensidad de fluorescencia con el tiempo, para una multiplicidad de píxeles, comparando las funciones de desintegración asociadas con los píxeles con al menos una función de desintegración de referencia para establecer un valor de error para uno o más píxeles, estando el valor de error asociado con un píxel que es una medida para una desviación de la función de desintegración asociada con el píxel a partir de la función de desintegración de referencia y generar una imagen de la muestra usando los valores de error.

De acuerdo con ECL-BBA se produce un complejo detectable, cuya concentración constituye una medida del resultado analítico buscado. Una sustancia de marcado (etiqueta) capaz de efectuar una reacción ECL se acopla a un reactivo de unión específica lejos del analito, por ejemplo un anticuerpo. Las especies que comprenden las sustancias de marcado y el reactivo de unión se designan como conjugados de etiquetado.

Cuando una sustancia de este tipo se somete a un potencial eléctrico adecuado en un electrodo de trabajo voltamétrico, emite luz que puede medirse fotográficamente. Una segunda sustancia electroquímicamente activa,

designada co-reactando, normalmente contribuye a esta reacción. En la práctica, principalmente un complejo de rutenio (rutenio-tris [bipiridilo] se usa como etiqueta para ECL en combinación con TPA (tripropilamina) como co-reactando. Las dos sustancias electroquímicamente activas se oxidan ambas tras la aplicación de tensión al electrodo. La pérdida posterior de un protón convertirá la TPA en una especie fuertemente reductora. La reacción redox posterior lleva la etiqueta para ECL a un estado excitado desde el cual vuelve al estado inicial con la emisión de un fotón. La reacción ECL-etiqueta preferentemente es una reacción circular, de manera que una molécula de un solo marcador emite una pluralidad de fotones después de la aplicación de una tensión al electrodo. Las moléculas del complejo ECL marcadas características para el análisis se fijan a micropartículas magnéticas (perlas). En la práctica, se usan perlas de poliestireno magnetizadas que tienen un diámetro de típicamente 2 a 3 micrómetros. La fijación se efectúa mediante un par de parejas de unión bioquímica específicas. El par estreptavidina biotina ha resultado particularmente ventajoso. Las perlas se recubren con estreptavidina, a las cuales se unirá un anticuerpo biotinilado.

Las perlas con el complejo marcado unido se introducen en la célula de medición de un aparato de medición. La célula está equipada con electrodos que son necesarios para generar el campo eléctrico requerido para desencadenar la reacción ECL. Las perlas se dirigen sobre la superficie del electrodo de trabajo en el campo magnético de un imán dispuesto por debajo del electrodo de trabajo. Puesto que esto típicamente ocurre en células de flujo a través con fluidos de muestra que fluyen continuamente, la deposición magnética de las perlas se designa como "captura". Un potencial eléctrico requerido para desencadenar la reacción ECL se aplica después al electrodo de trabajo y la luz de luminiscencia resultante se mide usando un detector óptico adecuado. La intensidad de la luz de luminiscencia se mide para la concentración del número de anticuerpos etiquetados acoplados a las perlas en la superficie del electrodo de trabajo que, a su vez, es una medida de la concentración del analito en la muestra. El calibrado permite realizar cálculos de la concentración buscada a partir de la señal de luminiscencia medida.

Se ha analizado y descrito en la bibliografía una pluralidad de diferentes variaciones de este tipo de método ECL-BBA.

#### Sumario de la invención

La invención proporciona un método de luminiscencia mejorado para medir la presencia y concentración de un analito en una muestra líquida y un sistema de análisis de acuerdo con las reivindicaciones independientes. Las realizaciones de la invención se dan en las reivindicaciones dependientes.

De acuerdo con la invención se mide la presencia y concentración de un analito en una muestra líquida marcando el analito con un marcador capaz de efectuar luminiscencia tras la aplicación de energía de excitación, en el que los datos de referencia que son descriptivos de la desintegración de luminiscencia de la luminiscencia que se va a efectuar por el marcador se almacenan en una memoria electrónica, aplicando la energía de excitación para provocar la luminiscencia, realizando una medición resuelta en el tiempo de la luminiscencia durante un periodo de tiempo para adquisición de una señal de medición, leyendo los datos de referencia a partir de la memoria electrónica, comparando la señal de medición con la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia, generando una señal de salida que es indicativa de la presencia del analito en la muestra líquida usando la señal de medición, y en el caso de una no coincidencia de la señal de medición y la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia, generar una señal de error.

Un "analito" como se entiende en este documento es un componente de la muestra líquida que se va a analizar, por ejemplo moléculas de diversos tamaños, proteínas, metabolitos y similares.

Una "muestra líquida" como se entiende en este documento abarca una muestra biológica tal como cualquier clase de tejido o fluido corporal que se ha derivado de un ser humano o cualquier otro organismo. En particular, una muestra biológica puede ser una muestra de sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva, o cualquier derivado de los mismos.

El término "luminiscencia" como se entiende en este documento abarca cualquier clase de luminiscencia tal como luminiscencia inducida por radiación, quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia, en particular ECL-BBA.

La expresión "inmunoensayo de luminiscencia" como se entiende en este documento abarca cualquier inmunoensayo que produzca una señal óptica, es decir, una señal de luminiscencia, que indica la presencia de un analito particular en una muestra líquida.

El punto de partida de la presente invención es el sorprendente descubrimiento de que la aplicación de energía de excitación para provocar la luminiscencia puede provocar también una señal de interferencia en casos raros. Sorprendentemente, tal señal de interferencia tiene una característica de desintegración que difiere de la desintegración de la señal de luminiscencia específica que se origina del marcador. La señal interferente puede superponerse sobre la señal de luminiscencia producida por el inmunoensayo de luminiscencia y, por tanto, puede conducir a un resultado de medición de fallo.

Las realizaciones de la presente invención son particularmente ventajosas puesto que este descubrimiento se utiliza para identificar la presencia de una señal de interferencia en la señal de medición. Si se detecta la presencia de la señal de interferencia, puede generarse una señal de error para informar a un usuario de que la señal de salida que se proporciona en base a la señal de medición puede ser errónea y puede indicar la presencia de un analito que, de hecho, no está presente en la muestra líquida o una concentración errónea del analito en la muestra líquida.

Las realizaciones de la invención son particularmente ventajosas puesto que puede identificarse una señal de interferencia no deseada que está provocada intencionadamente por la aplicación de energía de excitación y que, de lo contrario, conduciría a un resultado de medición de fallo. Por ejemplo, el componente de la señal de interferencia está provocado por alguna propiedad física y/o química de las sustancias que están presentes en la célula de medición.

Se ha descubierto que la aparición de tal señal de interferencia es extremadamente rara. No obstante, la identificación segura de una señal de medición de fallo que resulta de la superposición de una señal de interferencia es crucial para evitar un mal diagnóstico en tales casos extremadamente raros. Tales señales de interferencia indeseada pueden estar provocadas por la presencia de sustancias autoluminiscentes dentro de la célula de medición.

Por ejemplo, en casos raros las moléculas autoluminiscentes pueden estar contenidas en una muestra líquida del paciente en una concentración que es suficientemente alta para provocar que la señal de interferencia con una potencia de señal sustancial tras la aplicación de la energía de excitación, conduciendo así a una señal de medición de fallo. Tal concentración de moléculas autoluminiscentes puede estar causada por alguna condición especial, enfermedad rara o patología del paciente.

De acuerdo con la invención, los datos de referencia que describen la degradación de luminiscencia de la señal de luminiscencia causada por el marcador son descriptivos de una ley lineal que relaciona la amplitud máxima de la señal de luminiscencia con un nivel de luminiscencia de la señal de luminiscencia alcanzado después de un tiempo de desintegración predefinido. Esto se basa en el sorprendente descubrimiento de una relación lineal de la amplitud máxima de la señal de luminiscencia y el nivel de luminiscencia restante alcanzado después de un tiempo de desintegración predefinido. Si una señal de interferencia está provocada por la aplicación de la energía de excitación, la señal de interferencia se superpone a la señal de luminiscencia de manera que la señal de medición resultante tiene un tiempo de desintegración que no satisface esta ley lineal. Esto posibilita detectar la presencia de la señal de interferencia en la señal de medición.

De acuerdo con las realizaciones de la invención, se almacena un conjunto de datos de referencia para una pluralidad de análisis e inmunoensayos de luminiscencia. Cada conjunto de datos de referencia es descriptivo de una ley lineal que relaciona la amplitud máxima de la luminiscencia con un nivel de luminiscencia alcanzado después de un tiempo de desintegración que es específico para un inmunoensayo que se usa para detectar el analito. Esto está basado en el sorprendente descubrimiento de que tal ley lineal existe independientemente del inmunoensayo específico que se utilice para la detección del analito y que esta ley lineal es específica para un inmunoensayo de luminiscencia dado. En otras palabras, la relación entre la amplitud máxima y el nivel de señal restante después de un tiempo de desintegración dado siempre es lineal, pero la ordenada y la pendiente de la ley lineal es específica para el inmunoensayo de luminiscencia. Las realizaciones de la invención pueden ser aplicables a diversas clases de técnicas de luminiscencia, incluyendo quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia, en particular ECL-BBA.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un sistema de análisis para medir la presencia y concentración de un analito en una muestra líquida como se define en la reivindicación 13.

El sistema de análisis comprende una incubadora para recibir un líquido que comprende el analito y un marcador para marcar el analito, siendo el marcador capaz de efectuar luminiscencia tras la aplicación de energía de excitación, una memoria electrónica que almacena datos de referencia que son descriptivos de la desintegración de luminiscencia de la luminiscencia que se va a efectuar por el marcador, un componente de activación para aplicar la energía de excitación para provocar la luminiscencia, un componente de adquisición para medición resuelta en el tiempo de la luminiscencia durante un periodo de tiempo, siendo el componente de adquisición operativo para proporcionar una señal de medición, un componente de procesamiento de datos que es operativo para leer los datos de referencia a partir de la memoria electrónica, comparar la señal de medición con la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia, generar una señal de salida que es indicativa de la presencia del analito en la muestra líquida usando la señal de medición, generando, en el caso de una falta de coincidencia de la señal de medición y la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia, una señal de error.

De acuerdo con las realizaciones de la invención el tiempo de incubación puede acortarse y la capacidad de producción del sistema de análisis, por tanto, puede mejorarse. Esto se debe al hecho de que no es necesario realizar la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio. En contraste, un tiempo de incubación relativamente corto puede ser suficiente para la formación de un número relativamente pequeño de intercalaciones que contribuyen a la señal de luminiscencia. Esto se debe a que la señal de luminiscencia producida por las intercalaciones puede ser relativamente débil en comparación con la señal de interferencia cuando las realizaciones

de la invención posibilitan detectar con seguridad la presencia de una señal de interferencia en la señal de medición, incluso aunque la señal de luminiscencia sea relativamente débil.

5 De acuerdo con las realizaciones de la invención se utiliza un inmunoensayo de luminiscencia de intercalación o de tipo competitivo.

Breve descripción de los dibujos

10 En las siguientes realizaciones la invención se describe con mayor detalle a modo de ejemplo, haciendo solo referencia a los dibujos, en los que:

- La Fig. 1 es un diagrama de bloques de una realización de un sistema de análisis de la invención,
- 15 la Fig. 2 es un diagrama que es ilustrativo de la técnica ECL-BBA,
- la Fig. 3 es un diagrama de bloques de otra realización de un sistema de análisis que comprende un componente robótico,
- 20 la Fig. 4 es un diagrama de flujo que es ilustrativo de una realización de un método de la invención,
- la Fig. 5 es ilustrativa de la desintegración de luminiscencia de una señal de luminiscencia que tiene diversas amplitudes,
- 25 la Fig. 6 es un diagrama que es ilustrativo de la ley lineal que relaciona la amplitud máxima de las señales de luminiscencia representadas en la Fig. 5 con un nivel de señal de luminiscencia restante alcanzado después de un tiempo de desintegración  $t$ ,
- la Fig. 7 es ilustrativa de las características de desintegración de una señal de interferencia sin la presencia de una señal de luminiscencia específica para el analito para diversas amplitudes de la señal de interferencia,
- 30 la Fig. 8 es ilustrativa de la ley lineal que relaciona la amplitud máxima de la señal de interferencia con un nivel de señal alcanzado después de un tiempo de desintegración  $t$ ,
- 35 la Fig. 9 es ilustrativa de las características de desintegración de las señales de luminiscencia y las señales de interferencia,
- la Fig. 10 es ilustrativa de una señal de luminiscencia sin una señal de interferencia superpuesta en comparación con una señal de medición que es el resultado de la superposición de una señal de luminiscencia y una señal de interferencia,
- 40 la Fig. 11 es ilustrativa de las leyes lineales específicas para el ensayo que relaciona la amplitud máxima de la señal de luminiscencia con un nivel de señal de luminiscencia alcanzado después de un tiempo de desintegración  $t$  desde la señal de activación.

45 Descripción detallada

A lo largo de la siguiente descripción de realizaciones de la invención los elementos iguales o idénticos se designarán con números de referencia idénticos.

50 La Fig. 1 muestra un sistema de análisis 100 para detectar un analito en una muestra líquida. El sistema de análisis 100 comprende una incubadora 102 para recibir un líquido 104 que es una mezcla de una alícuota de la muestra líquida y un marcador para marcar el analito, tal como un inmunoensayo de luminiscencia.

55 El sistema de análisis 100 comprende un depósito 106 que contiene el co-reactante de la reacción electroquímica que provoca la luminiscencia. La incubadora 102 y el depósito 106 están acoplados a una célula de medición 108 del sistema de análisis por un sistema de tuberías 110 a través del cual una porción del líquido 104 y el co-reactante puede fluir hacia la célula de medición 108.

60 La célula de medición 108 comprende un cuerpo de la célula 112 que tiene un conducto 114 para recibir una porción del líquido 104 y del co-reactante a través del sistema de tuberías 110. La célula de medición 108 tiene un componente magnético 116, tal como un imán permanente, para proporcionar un campo magnético en la célula de medición. El componente magnético 116 puede acoplarse a un accionador 118 para hacer girar el componente magnético 116 hacia y desde el conducto 114 para conectar o desconectar el campo magnético dentro del conducto.

65

El componente magnético 116 está situado por debajo de un electrodo de trabajo 120 que está acoplado a una fuente de tensión 122. Se forma un área de excitación 124 en el conducto 114 dentro del campo magnético provocado por el componente magnético 116 sobre el electrodo de trabajo 120.

5 La luminiscencia provocada en el área de excitación 124 por la aplicación de la energía de excitación, es decir, la aplicación de un pulso de activación voltaico sobre el electrodo de trabajo 120, se mide mediante un sensor óptico, tal como un fotomultiplicador 126. El sensor óptico es sensible dentro de un cierto intervalo de frecuencia, de manera que proporciona una señal de medición a la cual puede contribuir una señal de interferencia, tal como una señal de luminiscencia causada por moléculas autoluminiscentes que pueden estar presentes en la célula de medición, con la condición de que la luminiscencia esté dentro del intervalo de frecuencia del sensor.

10 El fotomultiplicador 126 está situado enfrente del área de excitación 124 sobre una ventana formada por contraelectrodos 128 del electrodo de trabajo 120 a través de los cuales los fotones de luminiscencia y cualquiera de los fotones de interferencia provocados por la energía de excitación chocan sobre el fotomultiplicador 126. Se proporciona una señal de medición resuelta en el tiempo resultante 130 desde el fotomultiplicador 126 a una unidad de control 132 del sistema de análisis 100.

15 Después de que se haya realizado una medición el líquido contenido dentro del conducto 114 se retira a un recipiente de residuos líquidos 134 y la célula de medición 108 se regenera para una adquisición posterior de una señal de medición.

20 La unidad de control 132 está acoplada a la fuente de tensión 122 para controlar la fuente de tensión 122 para aplicar la señal de inicio al electrodo de trabajo 120. La unidad de control 132 está acoplada también al accionador 118 para controlar el accionador 118 para conectar y desconectar el campo magnético moviendo el imán permanente de forma correspondiente.

25 Además, la unidad de control 132 puede acoplarse a una "unidad de succión", es decir, una bomba 136 para extraer una porción del líquido 104 de la incubadora 102 y una porción del co-reactante del depósito 106 así como para retirar el líquido de la célula de medición 108 y la regeneración de la célula de medición. Además, la unidad de control 132 puede acoplarse a los componentes robóticos adicionales tales como una estación de pipeteado (cf. realización de la Fig. 3).

30 La célula de medición 108 puede adaptarse para realizar ECL-BBA usando diversos inmunoensayos de luminiscencia.

35 Por ejemplo, el líquido 104 puede contener una mezcla de una alícuota de la muestra líquida, partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, anticuerpos biotinilados y anticuerpos rutenilados para formar lo que se denomina "intercalado" mientras que el co-reactante contenido en el depósito 106 es tripropilamina. Por tanto, las partículas magnéticas 138 con una etiqueta unida fluyen dentro del conducto 114. Las partículas magnéticas 138 se inmovilizan sobre el electrodo de trabajo 120 cuando el campo magnético está conectado. A continuación, se aplica un pulso de activación sobre el electrodo de trabajo 120 para provocar la electroquimioluminiscencia de acuerdo con la técnica ECL-BBA.

40 La unidad de control 132 tiene una memoria electrónica 140 para almacenar datos de referencia 142 que describen la degradación de luminiscencia de una señal de medición válida sin una señal de interferencia superpuesta. Estos datos de referencia son específicos para el inmunoensayo de luminiscencia que se utiliza para la detección del analito.

45 En la realización considerada en este caso los datos de referencia 142 se almacenan en una tabla de consulta o tabla de base de datos. Los datos de referencia comprenden un conjunto de datos de referencia para cada inmunoensayo de luminiscencia soportado por el sistema de análisis 100. Por ejemplo, para cada inmunoensayo soportado se almacenan dos coeficientes a y b, así como un tiempo t, en la memoria 140. Los coeficientes a y b describen una ley lineal que relaciona la amplitud máxima de la señal de luminiscencia con un nivel de luminiscencia alcanzado después de un tiempo de desintegración t. Almacenar el tiempo de desintegración t como parte de los datos de referencia puede ser superfluo si el tiempo de desintegración t considerado es siempre el mismo.

50 La unidad de control 132 tiene al menos un procesador electrónico 144 para ejecutar los módulos de programación 146 y 148. El procesador 144 ejecuta el módulo de programa 146 para la adquisición de la señal de medición 130 mientras que el procesador 144 ejecuta el módulo de programa 148 para la evaluación de la señal de medición adquirida 130.

55 La unidad de control 132 tiene una interfaz 150 para acoplar una pantalla 152 u otra interfaz hombre-máquina a la unidad de control 132. La interfaz 150 puede implementarse como un interfaz de usuario gráfico para mostrar una ventana 154 para una selección de usuarios de uno de los inmunoensayos de luminiscencia soportados por el sistema de análisis 100 así como una ventana 156 para mostrar un resultado del análisis.

El resultado del análisis realizado por el sistema de análisis 100 puede producirse como datos tabulares como se representa en la Fig. 1, en la que la columna A indica el analito se va a detectar y la columna C indica la concentración del analito que se ha detectado. La columna E sirve para indicar si la concentración detectada puede ser errónea, tal como mostrando una marca u otra señal o símbolo de aviso, tal como un signo de interrogación o exclamación rojo.

Durante el funcionamiento un usuario selecciona uno de los inmunoensayos de luminiscencia soportados por el sistema de análisis 100 introduciendo una selección respectiva en la ventana 154. El análisis de la muestra líquida se inicia por ejecución del módulo de programa 146, de manera que la bomba 136 está controlada para transportar una parte del líquido 104 y del co-reactivo al conducto 114.

A continuación, el accionador 118 se controla para llevar el imán permanente a una posición tal que su campo magnético se aplique al conducto 114 para inmovilización de las partículas magnéticas con sus etiquetas unidas sobre el electrodo de trabajo 120. A continuación, la fuente de tensión 122 se controla para aplicar el pulso de activación sobre el electrodo de trabajo para excitación de la luminiscencia, de manera que se obtiene como resultado la señal de medición 130.

La señal de medición 130 se adquiere muestreando la salida del fotomultiplicador 126 durante un periodo de tiempo dado, tal como 2 segundos después de la aplicación del pulso del disparador por la fuente de tensión 122, para medición resuelta en el tiempo de la luminiscencia.

Las muestras de datos que constituyen la señal de medición 130 se almacenan dentro de la memoria 140 de la unidad de control 132 y el módulo de programa 148 se inicia para evaluación de la señal de medición 130 adquirida. Por ejecución del módulo de programa 148 se determina la amplitud de la señal de medición 130. A continuación, el módulo de programa 148 realiza un acceso de lectura a los datos de referencia 142 leyendo los coeficientes a y b del inmunoensayo seleccionado por el usuario así como el tiempo t.

Mediante la ley lineal descrita por a y b el nivel de señal esperada alcanzado por la señal de medición 130 después del tiempo t se calcula y se compara con el nivel de señal real de la señal de medición 130 después de ese tiempo t. En caso de que no haya coincidencia, es decir, si el nivel de señal real de la señal de medición 130 es un margen predefinido por debajo o por encima del nivel de señal esperado, se detecta una falta de coincidencia y, por tanto, la presencia de una señal de interferencia superpuesta.

A continuación, se determina la concentración C del analito, si la hubiera, en el líquido por el módulo de programa 148 mediante la señal de medición 130 y la concentración C determinada se marca mediante una señal de error E si se ha detectado una falta de coincidencia. A continuación, la bomba 136 se controla por la unidad de control 132 para retirar el líquido del conducto 114 y se regenera la célula de medición 108.

La Fig. 2 es ilustrativa del "intercalado" que se forma dentro de la incubadora 102 y al que se aplica el pulso de activación dentro del área de excitación 124 en el electrodo de trabajo 120. En la realización considerada en este caso, cada una de las partículas magnéticas 138 tiene un diámetro de aproximadamente 2,8 micrómetros. La partícula magnética 138 se une a un anticuerpo biotinilado 156 del inmunoensayo que se elige dependiendo del analito 160 que se va a detectar. Un complejo de rutenio (rutenio-tris [bipiridilo]) unido a un anticuerpo 162, que se elige dependiendo del analito 160, se utiliza como un marcador luminiscente en la realización considerada en este caso.

Tras la aplicación del pulso de activación voltaica se induce una reacción electroquímica con la tripropilamina de acuerdo con la técnica ECL-BBA de manera que se provoca luminiscencia.

La Fig. 3 muestra una realización adicional del sistema de análisis 100. El sistema de análisis 100 tiene un rotor 164 para recibir receptáculos, tal como tubos de muestra, donde cada tubo de muestra contiene una muestra líquida. El rotor 164 puede mantener un número de tubos de muestra para proporcionar acceso aleatorio a un pipeteador 176.

El sistema de análisis 100 tiene un segundo rotor 166 para recibir los receptáculos 168 que contienen micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, los receptáculos 170 que contienen anticuerpos biotinilados y los receptáculos 172 que contienen anticuerpos rutenilados. El segundo rotor puede implementarse como un disco de reactivos, como se muestra en la Fig. 3, para proporcionar acceso del pipeteador 176 a los diversos reactivos contenidos en los receptáculos 168, 170 y 172.

El sistema de análisis 100 tiene un componente robótico para proporcionar una mezcla a la incubadora 102. En la realización considerada en este caso, la unidad de control 132 controla el componente robótico y comprende una estación de pipeteado 174 que tiene el pipeteador 176.

Durante el funcionamiento la unidad de control 132 controla el pipeteador 176 para extraer una alícuota de la muestra líquida de uno de los tubos de muestra sostenidos por el rotor 164 y extraer porciones de las partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, los anticuerpos biotinilados y los anticuerpos rutenilados de los

receptáculos 168, 170 y 172, respectivamente, para proporcionar la mezcla que después se pone en la incubadora 102 para incubación durante una cantidad de tiempo predeterminada, tal como de 9 a 27 min.

La unidad de control 132 controla la "succión", por ejemplo la bomba 136 (cf. Fig. 1), de manera que la mezcla líquida fluye desde la incubadora 102 hasta el conducto 114 de la célula de medición 108 junto con el co-reactante, es decir tripropilamina. A continuación, la unidad de control 132 controla el accionador 118 (cf. Fig. 1) para conectar el campo magnético y después la fuente de tensión 122 para aplicar el pulso de activación voltaica.

La señal de medición 130 resultante se adquiere por la unidad de control 132 muestreando la salida del fotomultiplicador 126.

En caso de que la señal de error se genere por el módulo de programa 148 (cf. Fig. 1) se realiza una re-ejecución para intentar una adquisición correcta de la señal de medición 130 sin una señal de interferencia superpuesta. Esto se realiza por limpieza y regeneración de la célula de medición 108, seguido de una ejecución repetida de la secuencia completa empezando con la extracción de otra alícuota de la muestra líquida que se va a analizar.

La Fig. 4 muestra un diagrama de flujo respectivo. En la etapa 200 el pipeteador del sistema de análisis funciona para proporcionar la mezcla de una alícuota de la muestra líquida que se va a analizar, las micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, los anticuerpos biotinilados y los anticuerpos rutenilados. Esta mezcla se incuba durante un periodo de tiempo predefinido en la etapa 202 antes de que se transporte junto con tripropilamina (TPA) a la célula de medición en la etapa 204.

En la etapa 206, el campo magnético se intercambia de manera que las micropartículas magnéticas unidas se atraen hacia el electrodo de trabajo en el área de excitación 124 (cf. Fig. 1). En la etapa 208 se aplica un potencial eléctrico al electrodo de trabajo para proporcionar un pulso de activación que provoca la luminiscencia. En la etapa 210 la luminiscencia resultante se mide durante un periodo de tiempo dado, tal como muestreando la señal de salida proporcionada por el fotomultiplicador. En casos raros una señal de interferencia también está provocada por el pulso de activación. En tal caso raro la señal de medición resulta de la superposición de la señal de luminiscencia y la señal de interferencia.

En la etapa 212 se determina la amplitud máxima, es decir, el nivel de señal máximo, de la señal de medición adquirida y en la etapa 214 se lee un conjunto de datos de referencia a partir de la memoria electrónica del sistema de análisis. El conjunto de datos de referencia especifica una ley lineal que relaciona una amplitud máxima medida con un nivel de señal restante esperado después de un tiempo de desintegración predefinido  $t$ .

En la etapa 216 se calcula el nivel de señal esperado después del tiempo  $t$  usando el conjunto de datos de referencia y la amplitud medida de la señal de medición. En la etapa 218 se determina si hay una falta de coincidencia entre el nivel de señal esperado y el nivel de señal real de la señal de medición después del tiempo  $t$  existente. Si este es el caso, se genera una señal de error en la etapa 220 que se produce junto con el resultado de la medición en la etapa 222. Si no ocurre falta de coincidencia, el control pasa directamente de la etapa 218 a la etapa 222. El resultado de medición, es decir, la presencia y concentración del analito, se obtiene de la señal de medición usando una información de calibrado apropiada, tal como se conoce de la técnica anterior.

La Fig. 5 muestra diversas señales de medición 130 que se adquieren en un intervalo de tiempo de 2 segundos desde el pulso de activación a  $t=0$  segundos. Las señales de medición mostradas en la Fig. 5 son señales de luminiscencia que no tienen una señal de interferencia superpuesta.

La Fig. 6 muestra un diagrama que se obtiene de las señales de medición representadas en la Fig. 5 que relaciona la amplitud ("señal máxima") de las señales de medición con el nivel de señal restante en el tiempo  $t$ . Como resulta evidente a partir de la Fig. 6 hay una ley lineal que relaciona la amplitud de la señal de luminiscencia con el nivel de señal restante después del tiempo  $t$ , donde se dan tres curvas ejemplares en la Fig. 6 para los tiempos de desintegración  $t_1=385$  milisegundos,  $t_2=885$  milisegundos y  $t_3=1385$  milisegundos.

La Fig. 7 muestra otro conjunto de señales de medición que se han adquirido sin la presencia de un marcador y, de esta manera, sin una señal de luminiscencia. De esta manera, las señales de medición representadas en la Fig. 7 son señales de interferencia puras que no están causadas por un marcador. La Fig. 7 muestra el nivel de señal de cada señal de interferencia que empieza con el pulso de activación con el tiempo. Como se muestra en la Fig. 7, las señales de interferencia que están provocadas por el pulso de activación tienen también una desintegración de señal característica que, sin embargo, es diferente de las señales de luminiscencia representadas en la Fig. 5, puesto que la desintegración de señal es más lenta para la señal de interferencia.

La Fig. 8 es un diagrama basado en los datos mostrados en la Fig.7 análoga a la Fig. 6. Como resulta evidente de la Fig. 8, la relación entre las amplitudes de las señales de interferencia con la señal restante después de un tiempo dado también es de una naturaleza lineal.



Las Figs. 9a a 9d muestran diagramas que ilustran las diferentes características de desintegración de luminiscencia con el tiempo de una señal de luminiscencia 176 que se origina del marcador y de una señal de interferencia 178 que también está provocada por la energía de excitación, por ejemplo el pulso de activación voltaica, pero tiene otro origen, tal como una impureza. Como es evidente a partir de la Fig. 9, la desintegración de la señal de la señal de interferencia 178 es más lenta en comparación con la señal de luminiscencia 176, independientemente de las amplitudes de señal en el tiempo  $t=0$ .

Cada una de las Figs. 10a y 10b muestra una señal de luminiscencia 176 que se ha medido usando los inmunoensayos para la detección de los analitos Troponina T y CEA, respectivamente.

La señal de superposición 180 que se representa también en las Fig. 10a y b tiene aproximadamente la misma amplitud que la señal de luminiscencia 176 y consiste en la superposición de una señal de luminiscencia 176 con la señal de interferencia 178. Como es evidente a partir de las Figs. 10a y b, la señal de superposición 180 tiene una característica de desintegración más lenta en comparación con la señal de luminiscencia 176, debido a la señal de interferencia superpuesta 178.

Las diferentes características de desintegración de la señal de luminiscencia 176 y la señal de superposición 180 posibilitan identificar una medición de fallo que es el resultado de la excitación no solo de la señal de luminiscencia 176 sino también de una señal de interferencia 178. Esto posibilita identificar una señal de superposición 180 que contiene un error, de manera que el resultado de medición respectivo puede ignorarse y puede realizarse una re-ejecución.

La Fig. 11a ilustra la relación lineal entre la amplitud de una señal de luminiscencia 176 en el tiempo  $t=0$  cuando se aplica la energía de excitación y el nivel de señal restante después de un tiempo de desintegración  $t$  para tiempos de desintegración  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ . La Fig. 11a muestra esta ley lineal para el inmunoensayo de Troponina T mientras que las Fig. 11b y c muestran esta relación lineal para los inmunoensayos CEA y CA 15-3. Como resulta evidente a partir de las Figs. 11a, b y c al menos las pendientes de las relaciones lineales son específicas para el ensayo y la relación tal cual siempre es de una naturaleza lineal.

tiempo de desintegración $t$ [ms] después del pulso de activación	Troponina T			CEA		
	385 = $t_1$	885 = $t_2$	1385 = $t_3$	385 = $t_1$	885 = $t_2$	1385 = $t_3$
a	1,27	1,63	1,96	1,42	1,53	2,03
b	0,33	0,16	0,10	0,29	0,14	0,08

La tabla anterior muestra conjuntos de datos de referencia de esta ley lineal para los inmunoensayos de troponina T y CEA. Cada conjunto de datos de referencia comprende el coeficiente a y b para los tiempos  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$  donde a es la ordenada y b es la pendiente, de manera que el nivel de señal restante y después de un tiempo de desintegración  $t$  dado se calcula como  $y=a+bx$  donde x es la amplitud de la señal medida en el tiempo  $t=0$ , es decir, el tiempo cuando se aplica la energía de excitación.

Para determinar una falta de coincidencia entre la señal de medición real y la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia se determina la amplitud de la señal de medición y se calcula el nivel de señal restante esperado, tal como el tiempo  $t_1$ , que produce el nivel de señal restante esperado y para ese tiempo  $t_1$ . Si el nivel de señal restante real de la señal de medición difiere más que un margen predefinido del nivel de señal esperado, se identifica una falta de coincidencia y, por tanto, la presencia de una señal de interferencia 178.

Lista de números de referencia

45	Sistema de análisis	100
	Incubadora	102
	Líquido	104
	Depósito	106
	Célula de medición	108
50	Un sistema de tuberías	110
	Cuerpo de la célula	112
	Conducto	114
	Componente magnético	116
	Accionador	118
55	Electrodo de trabajo	120
	Fuente de tensión	122
	Área de excitación	124
	Fotomultiplicador	126
	Contraelectrodo	128
60	Señal de medición	130

	Unidad de control	132
	Recipiente	134
	Bomba	136
	Partícula	138
5	Memoria	140
	Datos de referencia	142
	Procesador	144
	Módulo de programa	146
	Módulo de programa	148
10	Interfaz	150
	Pantalla	152
	Ventana	154
	Ventana	156
	Anticuerpo biotinilado	158
15	Analito	160
	Anticuerpo rutenilado	162
	Rotor	164
	Rotor	166
	Receptáculos	170
20	Receptáculos	172
	Estación del pipeteado	174
	Señal de luminiscencia	176
	Señal de interferencia	178
	Señal de superposición	180
25		

## REIVINDICACIONES

1. Un método de luminiscencia para medir la presencia y concentración de un analito en una muestra líquida, comprendiendo el método
- 5 a) marcar el analito con un marcador capaz de efectuar luminiscencia tras la aplicación de energía de excitación, en el que los datos de referencia (142), que son descriptivos de la desintegración de luminiscencia de la luminiscencia que se va a efectuar por el marcador, se almacenan en una memoria electrónica (140),
- 10 b) aplicar la energía de excitación para provocar la luminiscencia,
- c) realizar una medición resuelta en el tiempo de la luminiscencia durante un periodo de tiempo para la adquisición de una señal de medición,
- d) leer los datos de referencia de la memoria electrónica,
- e) comparar la señal de medición con la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia,
- 15 f) generar una señal de salida que es indicativa de la presencia y concentración del analito en la muestra líquida usando la señal de medición,
- g) en el caso de que haya una falta de coincidencia de la señal de medición y la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia, generar una señal de error,
- en el que los datos de referencia son descriptivos de una ley lineal que relaciona la amplitud máxima de la luminiscencia con un nivel de luminiscencia alcanzado después de un periodo de desintegración predefinido, comprendiendo el método además
- 20 - determinar la amplitud máxima de la señal de medición,
- usar los datos de referencia para calcular el nivel esperado de luminiscencia después del tiempo de desintegración predefinido,
- 25 - comparar el nivel esperado y la señal de medición al tiempo de desintegración predefinido para determinar si existe la falta de coincidencia.
2. El método de luminiscencia de la reivindicación 1, comprendiendo los datos de referencia conjuntos de datos de referencia para una pluralidad de analitos, teniendo cada analito un conjunto de datos de referencia asignado y que comprende además
- 30 - recibir una señal que es indicativa de uno de los analitos que se van a detectar en la muestra líquida,
- seleccionar uno de los conjuntos de datos de referencia de los datos de referencia que están asignados al analito indicado por la señal recibida, y
- 35 - usar el conjunto de datos de referencia seleccionado para realizar la comparación entre la señal de medición y la desintegración de luminiscencia descrita por el conjunto de datos de referencia.
3. El método de luminiscencia de la reivindicación 1 o 2, que comprende además asignar la señal de error a la señal de salida y mostrar la señal de salida y la señal de error asignada como datos tubulares.
- 40 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la señal de salida está etiquetada como señal de error.
- 45 5. El método de luminiscencia de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además, en respuesta a la señal de error, realizar una re-ejecución repitiendo la ejecución de al menos las etapas b) a g).
6. El método de luminiscencia de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la energía de excitación se aplica aplicando energía eléctrica, energía de radiación y/o energía química.
- 50 7. El método de luminiscencia de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el marcador capaz de efectuar electroquimioluminiscencia, en el que una sustancia electroquímicamente activa contribuye a una reacción de electroquimioluminiscencia con el marcador resultante en la luminiscencia.
- 55 8. El método de luminiscencia de la reivindicación 7, que comprende además
- llevar a cabo una secuencia de reacción que comprende al menos una reacción de unión bioquímica específica para formar un complejo como resultado de la presencia del analito en la muestra líquida, comprendiendo el complejo el marcador y estando unido dicho complejo además a una micropartícula magnética (138),
- 60 - llevar a cabo un ciclo de detección en una célula de medición que tiene un electrodo de trabajo (120) para la determinación de la presencia de dicho analito, comprendiendo dicho ciclo de detección una etapa de captura durante la cual el complejo entra en contacto con el electrodo de trabajo (120) de tal manera que dicha micropartícula se ve atraída por el campo magnético de un componente magnético (116) situado en el lado del electrodo de trabajo orientado hacia el lado contrario de la muestra, depositándose de esta manera sobre la
- 65 superficie de dicho electrodo de trabajo orientado hacia la muestra, y aplicar un potencial al electrodo de trabajo para

iniciar la reacción de electroquimioluminiscencia del marcador, provocando la sustancia electroquímicamente activa la luminiscencia del marcador para determinar así la presencia de un analito en la muestra líquida.

5 9. El método de luminiscencia de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el marcador un complejo de rutenio y siendo tripropilamina la sustancia electroquímicamente activa.

10 10. El método de luminiscencia de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la luminiscencia se mide usando un sensor óptico (126), y en el que la señal de medición se adquiere muestreando una señal de salida del sensor óptico.

11. El método de luminiscencia de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además

- mezclar una porción de la muestra líquida con micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, anticuerpos biotinilados y anticuerpos rutenilados,
- 15 - incubar la mezcla que comprende el analito, las micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, los anticuerpos biotinilados y los anticuerpos rutenilados en una incubadora (102), de manera que se forma una intercalación,
- transportar una porción de la mezcla de la incubadora a una célula de medición y transportar tripropilamina a la célula de medición,
- 20 - aplicar un campo magnético a la célula de medición para adhesión magnética de las micropartículas magnéticas a un electrodo de trabajo de la célula de medición antes de la aplicación de la energía de excitación.

25 12. El método de luminiscencia de la reivindicación 11, en el que la mezcla de incuba durante una cantidad de tiempo predeterminada sin alcanzar un estado de equilibrio antes de que la porción de la mezcla se transporte a la célula de medición para realizar la medición resuelta en el tiempo.

13. Un sistema de análisis para medir la presencia y concentración de un analito en una muestra líquida que comprende

- 30 - una incubadora (102) para recibir un líquido (104) que comprende el analito y un marcador para marcar el analito, siendo capaz el marcador de efectuar luminiscencia tras la aplicación de la energía de excitación,
- una memoria electrónica (140) que almacena datos de referencia que son descriptivos de la desintegración de luminiscencia de la luminiscencia que va a efectuar el marcador,
- 35 - un componente de activación (122) para aplicar energía de excitación para provocar la luminiscencia,
- un componente de adquisición (126) para realizar una medición resuelta en el tiempo de la luminiscencia durante un periodo de tiempo, siendo operativo el componente de adquisición para proporcionar la señal de medición,
- un componente de procesamiento de datos (144) que es operativo para

- 40 • leer los datos de referencia de la memoria electrónica,
- comparar la señal de medición con la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia,
- generar una señal de salida que es indicativa de la presencia y concentración del analito en la muestra líquida usando la señal de medición,
- 45 • en caso de una falta de coincidencia de la señal de medición y la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia, generar una señal de error,

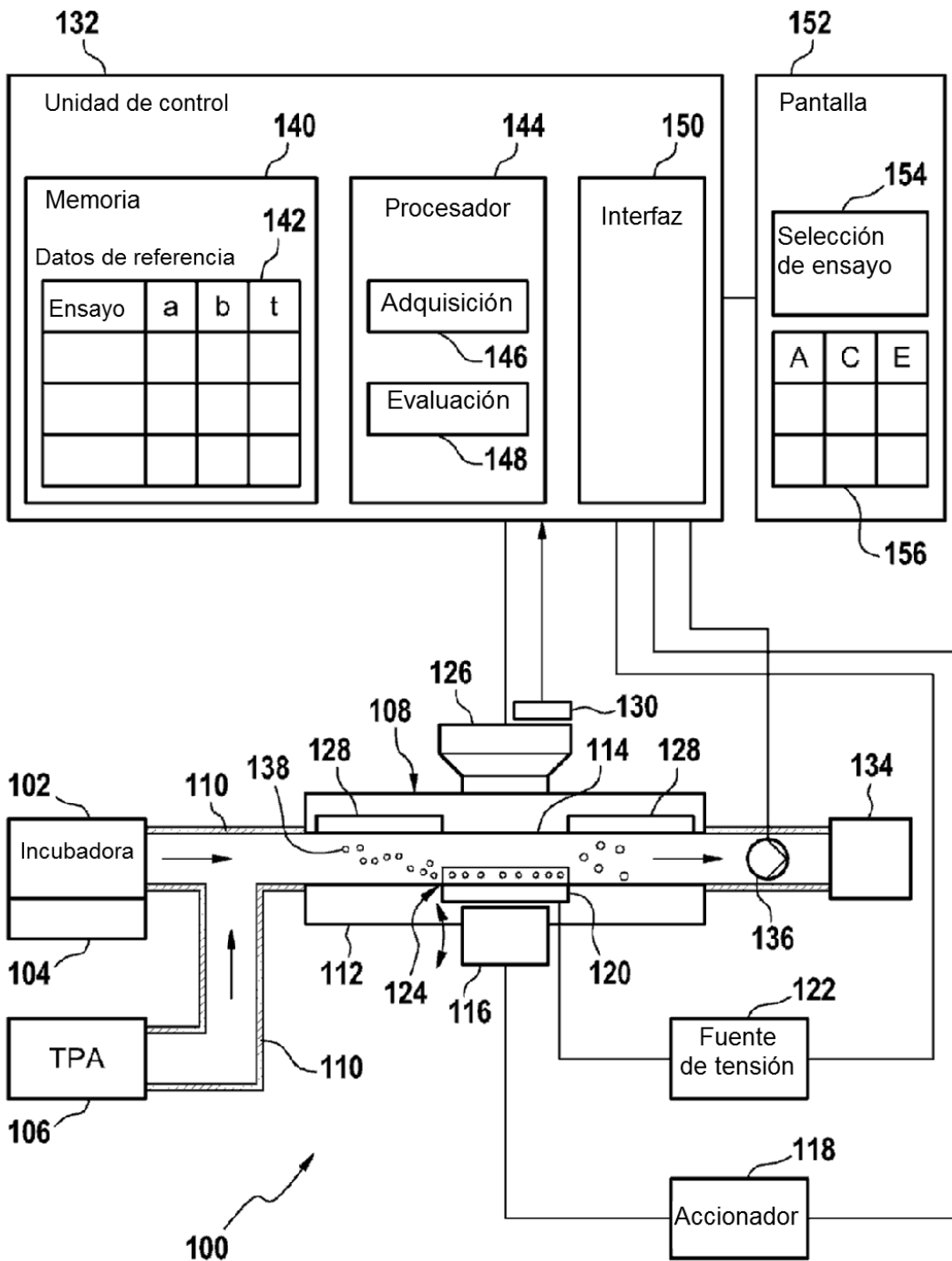
50 en el que los datos de referencia son descriptivos de una ley lineal que relaciona la amplitud máxima de la luminiscencia con un nivel de luminiscencia alcanzado después de tiempo de desintegración predefinido y el componente de procesamiento de datos es operativo para comparar la señal de medición con la desintegración de luminiscencia descrita por los datos de referencia realizando las etapas de

- determinar la amplitud máxima de la señal de medición,
- usar los datos de referencia para calcular un nivel esperado de luminiscencia después del tiempo de desintegración predefinido usando la amplitud máxima,
- 55 - comparar el nivel esperado y la señal de medición en el tiempo de desintegración predefinido para determinar si existe una falta de coincidencia.

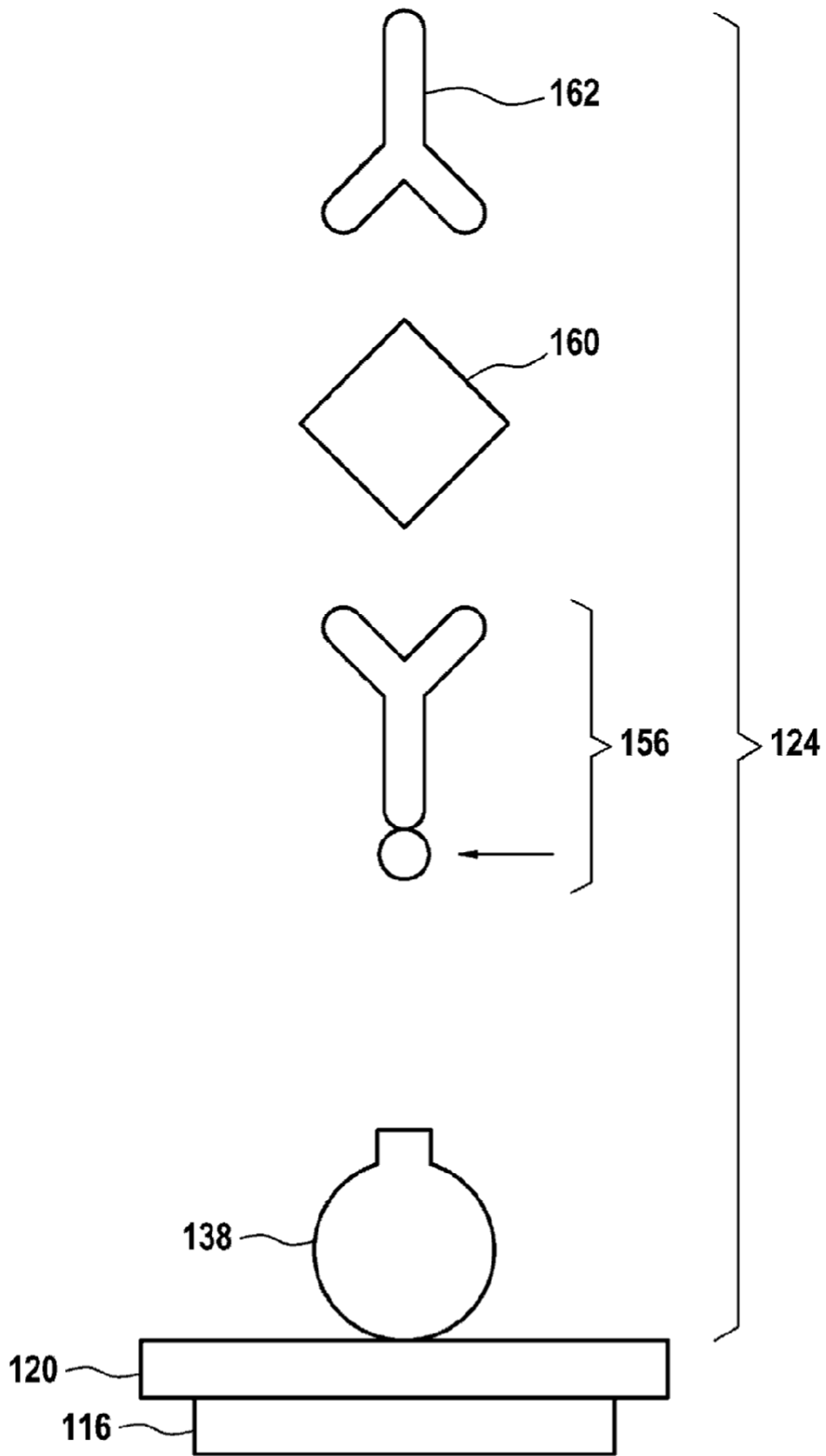
60 14. El sistema de análisis de la reivindicación 13, comprendiendo los datos de referencia un conjunto de datos de referencia para una pluralidad de analitos, teniendo cada analito un conjunto de datos de referencia asignado, y que comprende además una interfaz (150) para recibir una señal que es indicativa de uno de los analitos que se quiere detectar en la muestra líquida, siendo operativo el componente de procesamiento de datos para seleccionar uno de los conjuntos de datos de referencia de los datos de referencia que están asignados al analito indicado por la señal recibida y para usar el conjunto de datos de referencia seleccionado para realizar la comparación entre la señal de medición y la desintegración de luminiscencia descrita por el conjunto de datos de referencia.

65

15. El sistema de análisis de la reivindicación 14, siendo cada conjunto de datos de referencia descriptivo de una ley lineal específica para el ensayo que es descriptiva de la desintegración de luminiscencia.
- 5 16. El sistema de análisis de la reivindicación 14 o 15, siendo cada conjunto de datos de referencia descriptivo de un nivel de señal esperado de la señal de medición a un intervalo de tiempo predefinido después de la aplicación de la energía de excitación como una función de la amplitud máxima de la señal de medición.
- 10 17. El sistema de análisis de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que comprende además un primer receptáculo (168) que contiene micropartículas magnéticas (138) recubiertas con estreptavidina, un segundo receptáculo (170) que contiene anticuerpos biotinilados (156), un tercer receptáculo (172) que contiene anticuerpos rutenilados (162), un componente robótico (176) para proporcionar una mezcla que comprende una porción de la muestra líquida, las micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, los anticuerpos biotinilados, y el anticuerpo rutenilado a la incubadora, de manera que se forma en la incubadora una intercalación que comprende el analito, las micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, los anticuerpos biotinilados y los anticuerpos rutenilados, un componente de transporte (110, 136) para transportar una porción de la mezcla de la incubadora a una célula de medición y para transportar tripropilamina a la célula de medición, un componente magnético (116) para proporcionar un campo magnético en la célula medición para la adhesión magnética de las micropartículas magnéticas, y un componente de control (132) para controlar el componente robótico, el componente de transporte, el componente magnético, el componente de activación y el componente de adquisición, de manera que la mezcla se incuba en la incubadora durante una cantidad de tiempo predeterminada sin alcanzar un estado de equilibrio antes de que la porción de la mezcla se transporte a la célula de medición para realizar la medición resuelta en el tiempo.
- 15 20 25 18. El sistema de análisis de la reivindicación 17, siendo el componente de control operativo para realizar una re-ejecución como respuesta a la señal de error, en el que el componente robótico se controla para proporcionar a la mezcla, otra porción de la muestra líquida para la re-ejecución.



**Fig. 1**



**Fig. 2**

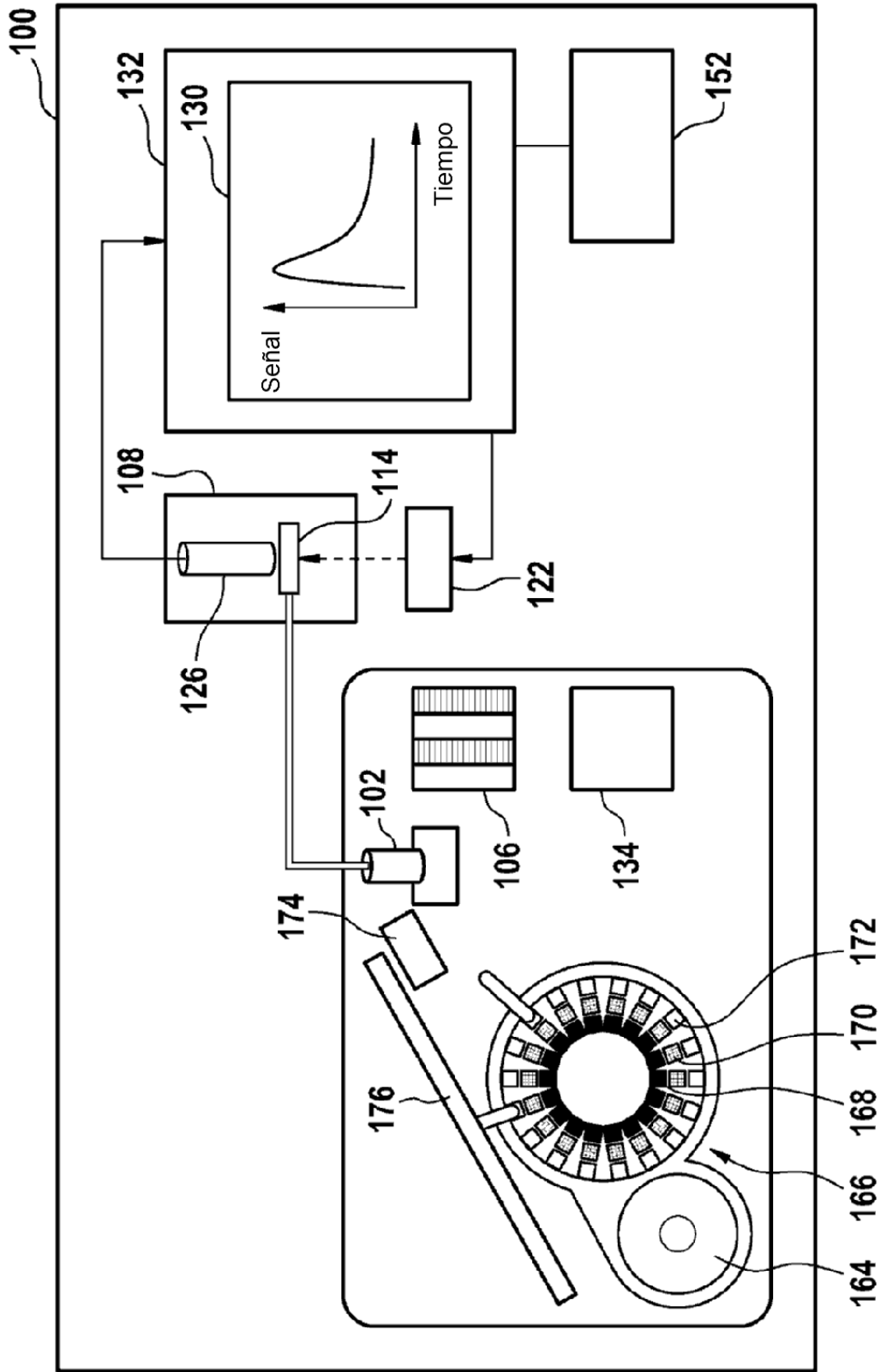
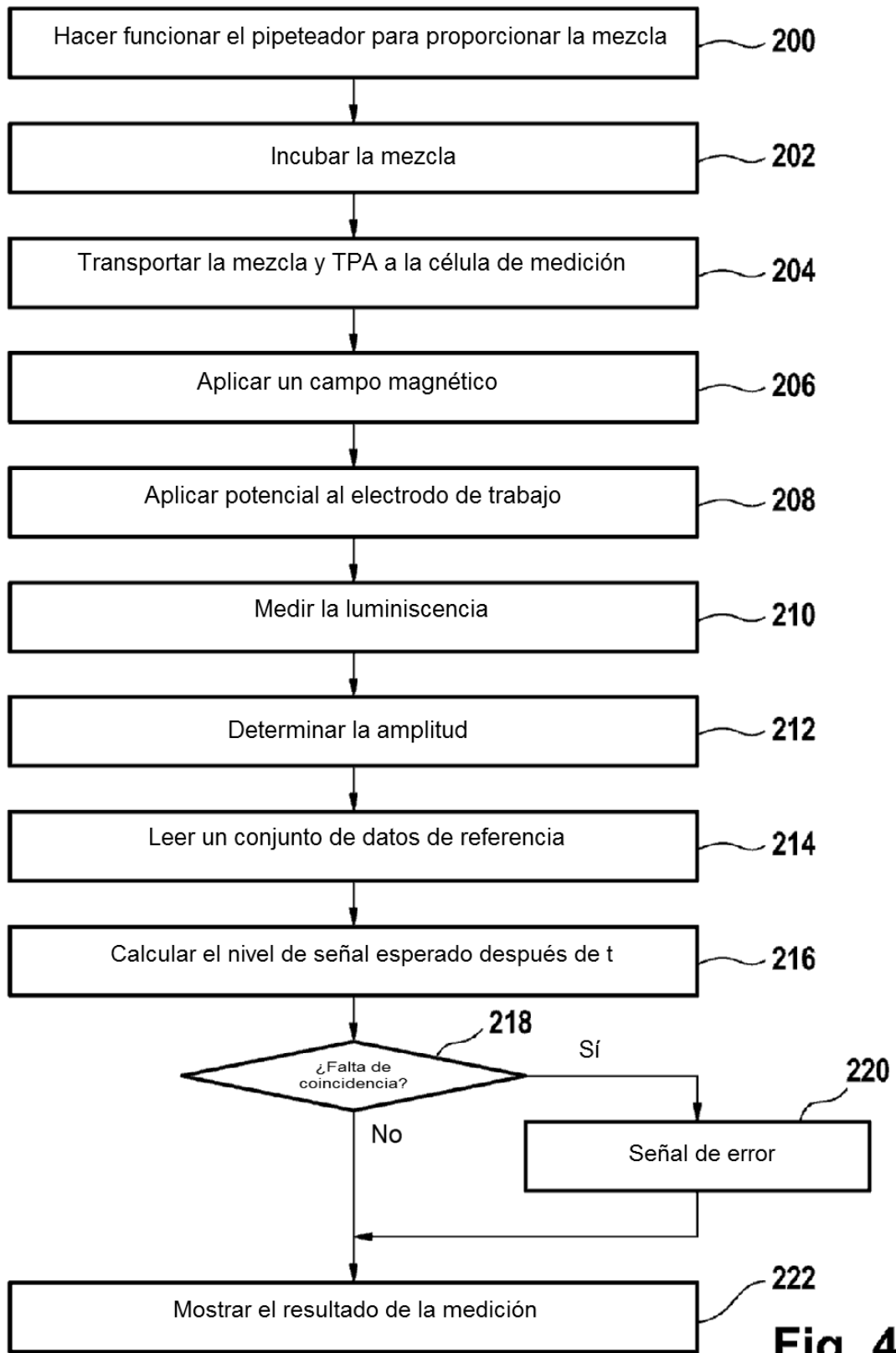
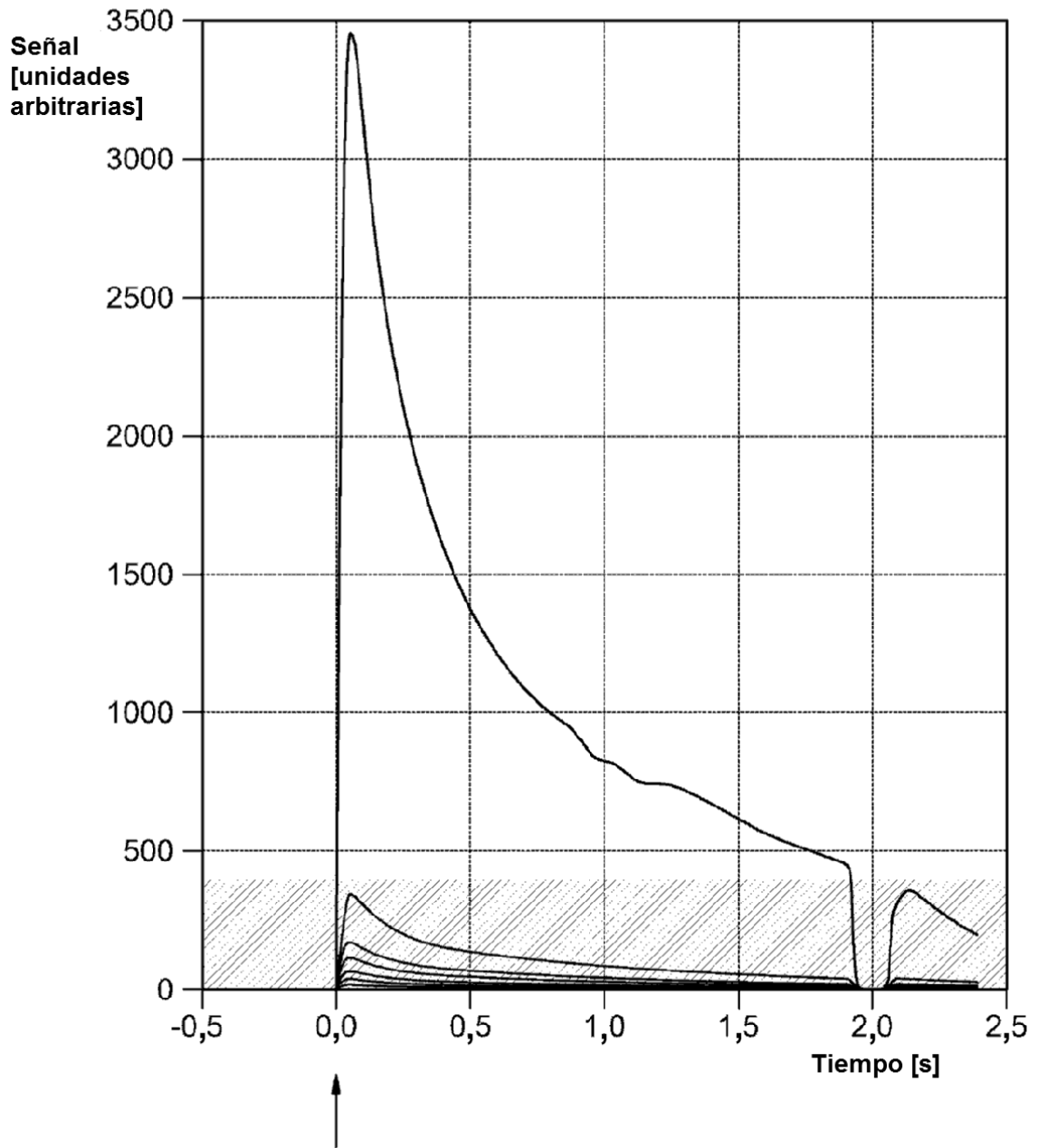


Fig. 3

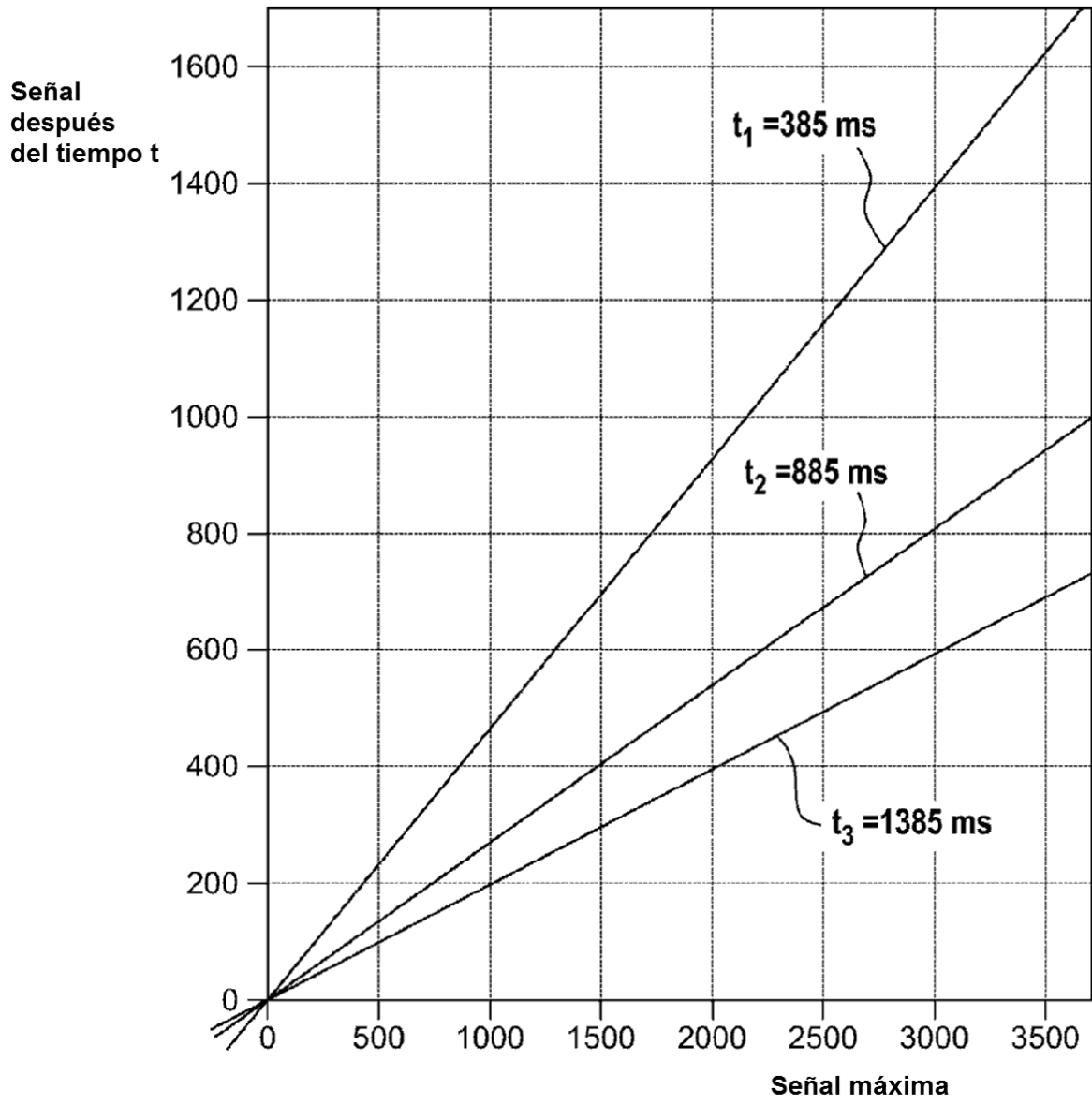




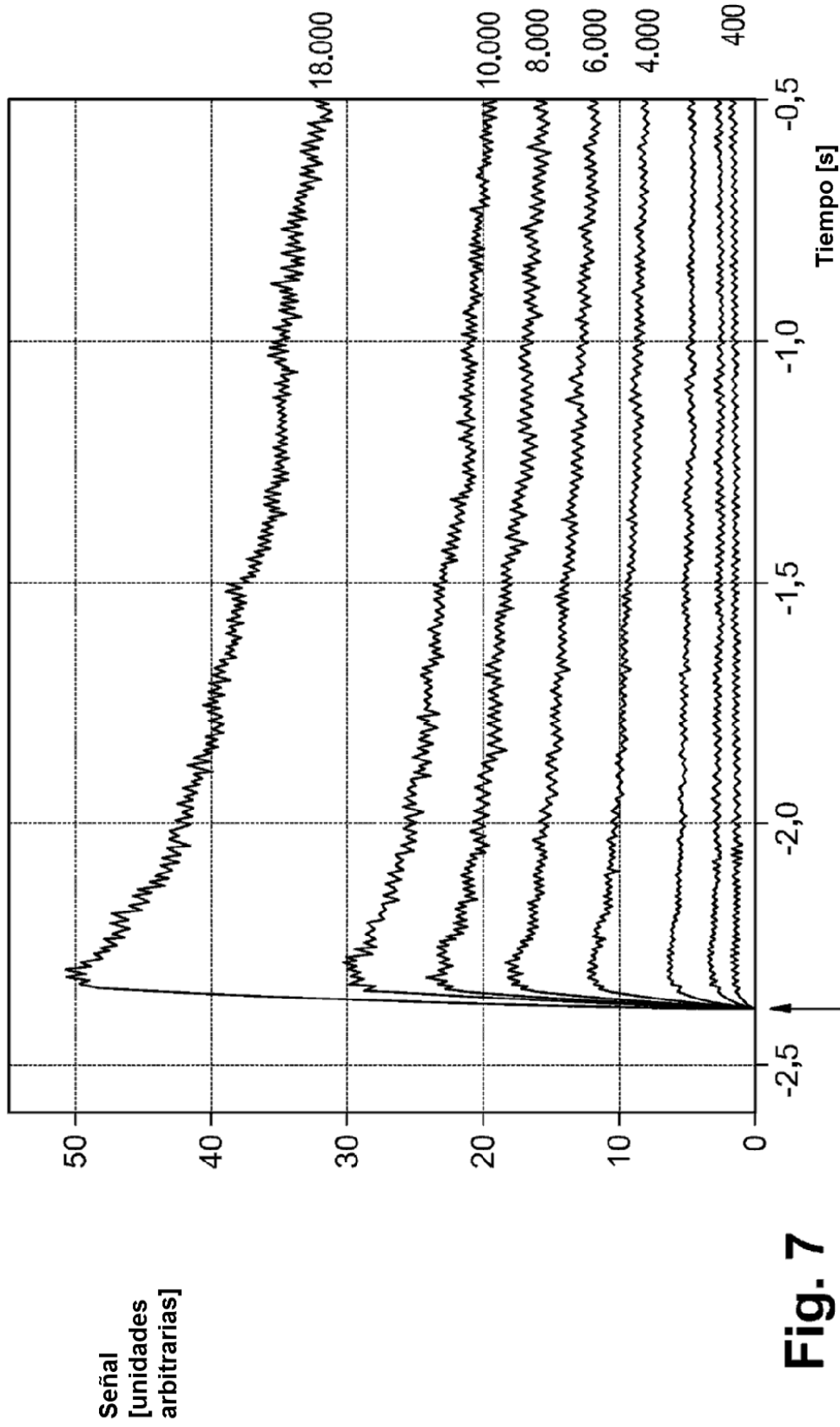
**Fig. 4**



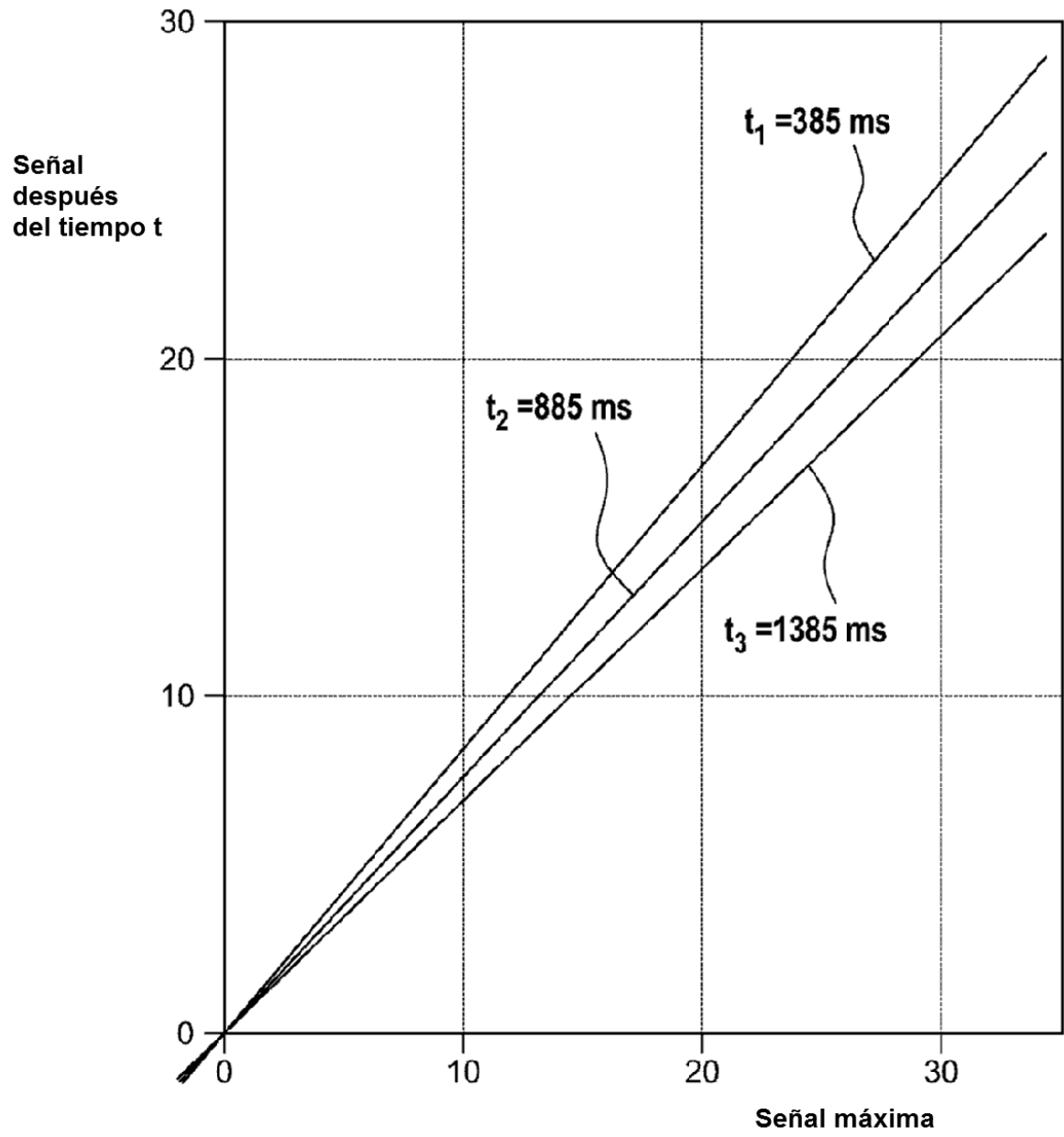
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

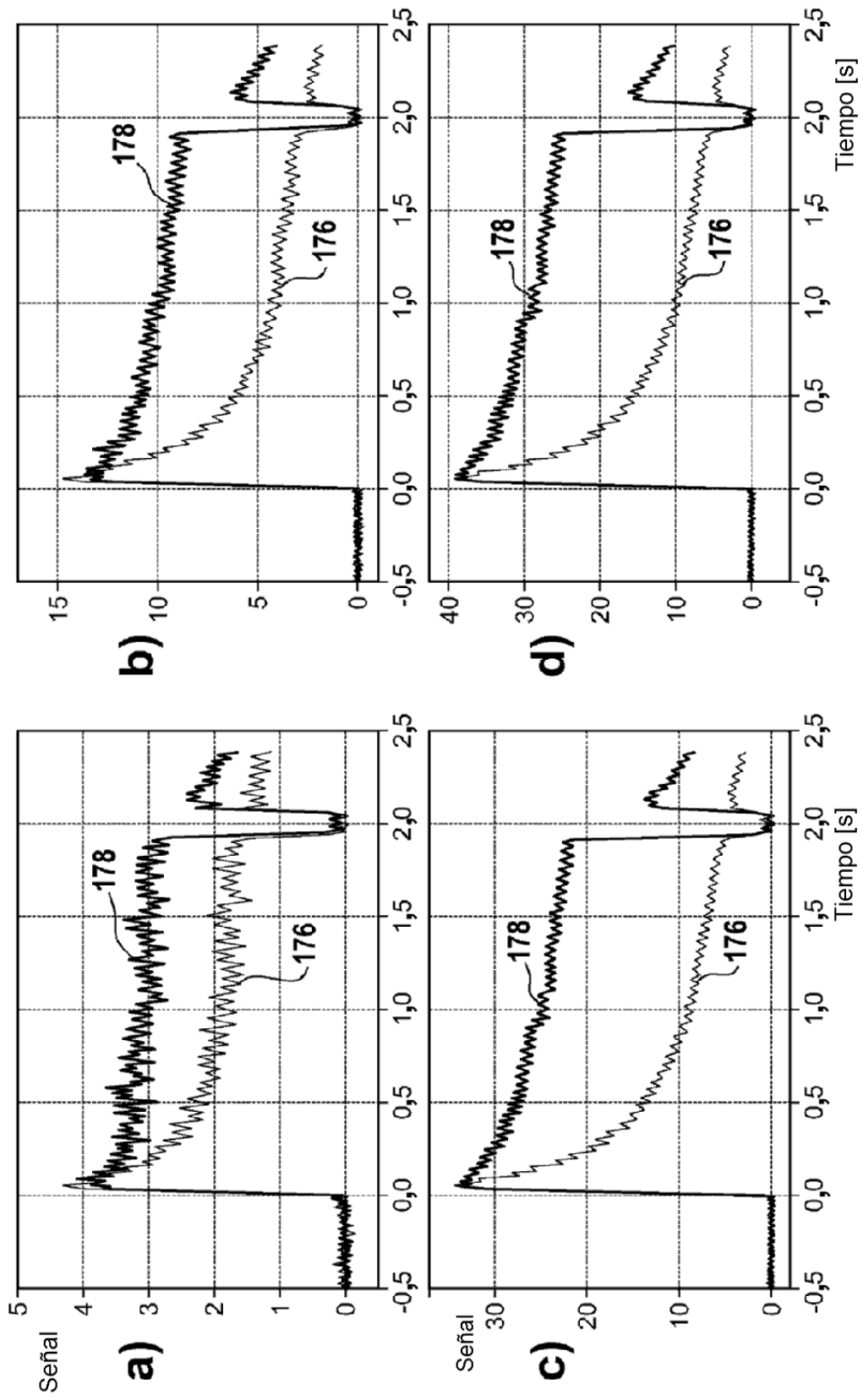
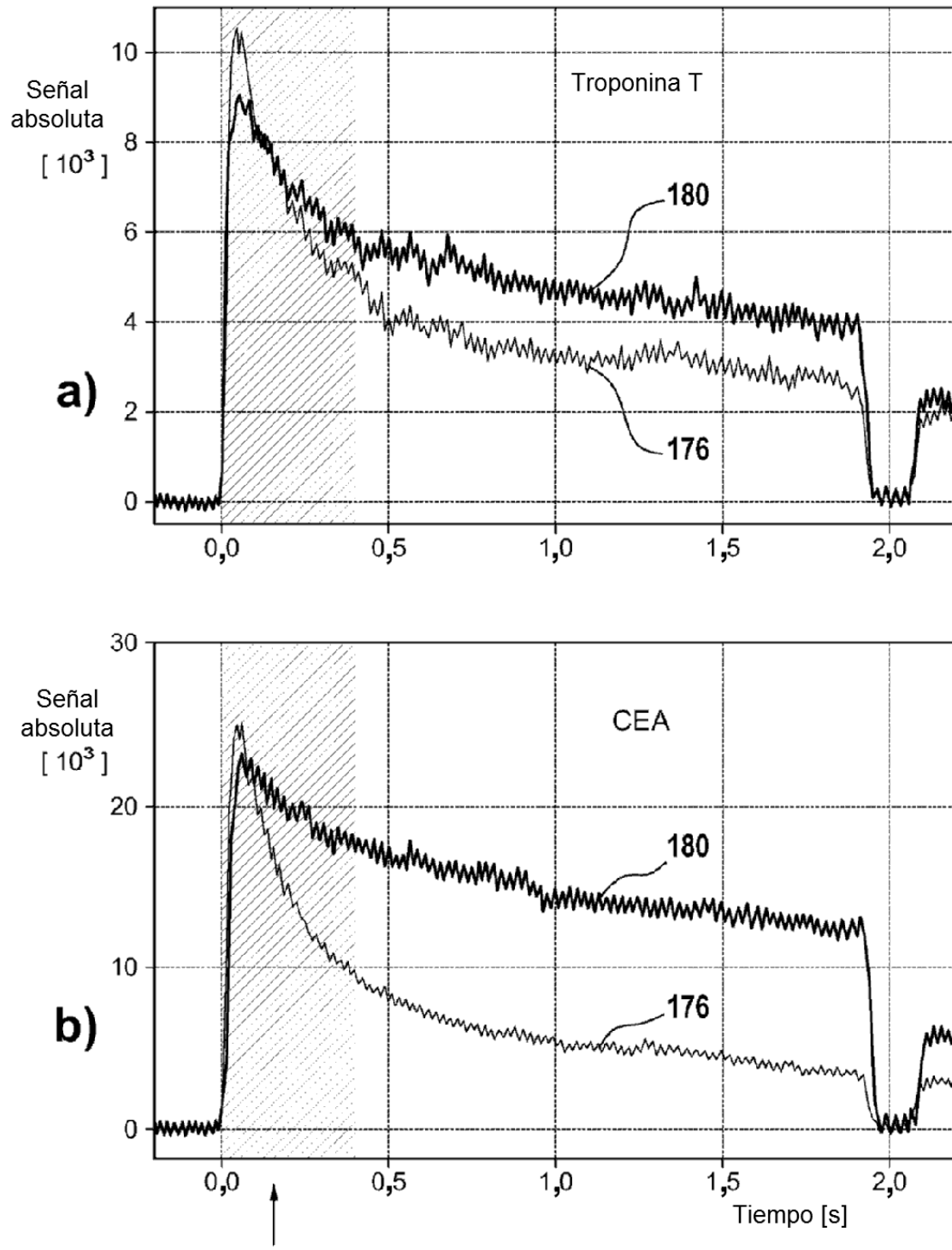


Fig. 9



**Fig. 10**

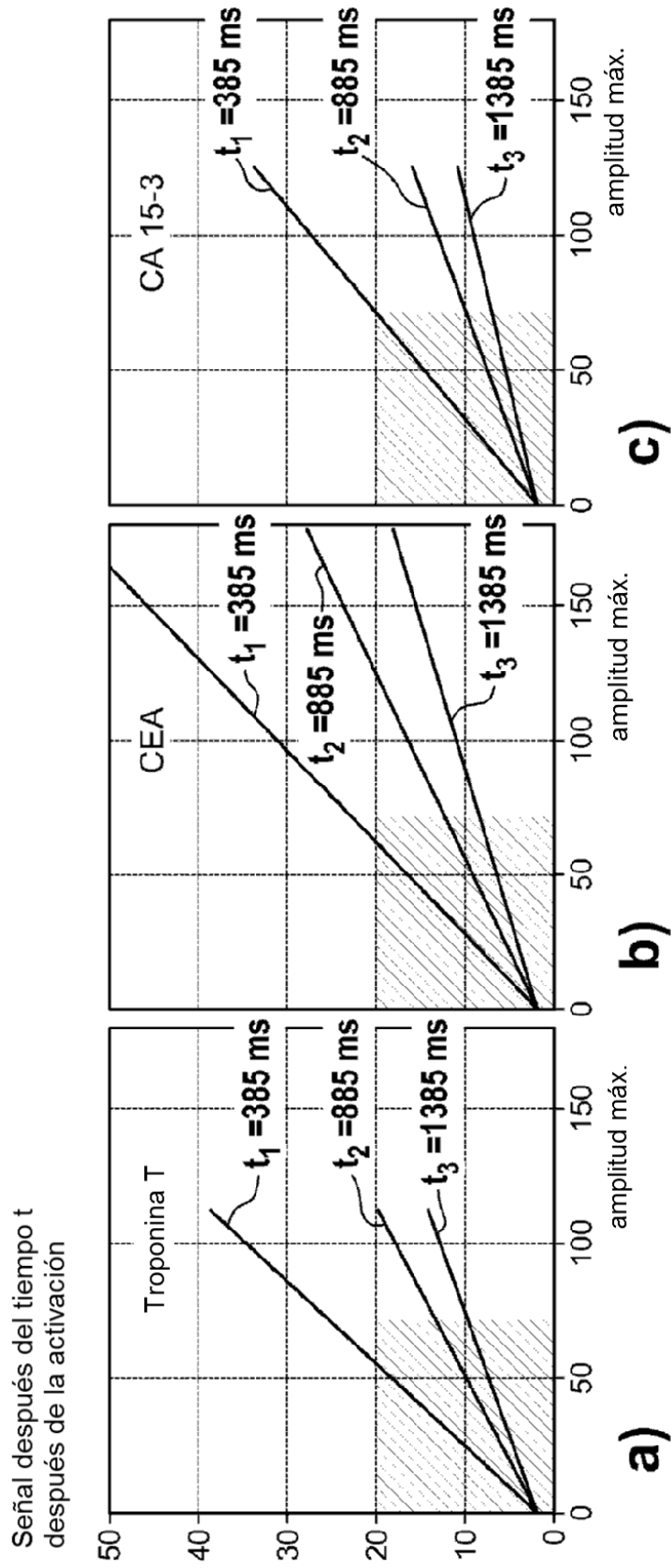


Fig. 11