

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 075**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01R 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2009 PCT/IB2009/054372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010 WO10044005**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09808959 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 2338052**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo de determinación de la cantidad de componentes diana marcados magnéticamente**

30 Prioridad:

16.10.2008 EP 08166810

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

09.07.2020

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE NEDERLAND B.V.
(100.0%)
Prinses Beatrixlaan 800
2595 BN s'-Gravenhage, NL**

72 Inventor/es:

**EVERS, TOON, H. y
DITTMER, WENDY, U.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 773 075 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

Procedimiento y dispositivo de determinación de la cantidad de componentes diana marcados magnéticamente

5 La invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de un componente diana en una muestra, en el que las partículas magnéticas pueden enlazarse específicamente a una superficie de contacto con una cinética que depende de la cantidad de muestra del componente diana. Además, se refiere a un dispositivo sensor para ejecutar dicho procedimiento y un programa informático asociado.

10 El documento US 6991938 B1 divulga un procedimiento en el que el enlace de una sustancia diana en una muestra a una superficie se monitoriza y se correlaciona continuamente con la cantidad de dicha sustancia diana en la muestra. Sin embargo, un problema de este enfoque es que las mediciones generalmente se ven afectadas por partes enlazadas no específicamente de la sustancia diana.

El documento WO2005/111615 A1 divulga un sistema detector de partículas magnéticas que comprende una pluralidad de superficies de reacción; una pluralidad correspondiente de bobinas eléctricas, cada una ubicada adyacente a una superficie de reacción respectiva; y un sistema de medición para medir el efecto de partículas magnéticas enlazadas a una superficie de reacción sobre la inductancia de la bobina eléctrica asociada.

15 El documento WO03049530 A2 divulga un aparato y procedimientos para lavar partículas que responden magnéticamente, tales como perlas paramagnéticas. Un aparato ejemplar incluye una cámara de flujo que tiene una entrada y una salida; y al menos un primer inductor de campo magnético. El aparato está configurado de tal manera que se puede aplicar selectivamente un primer campo magnético en la cámara de flujo. El aparato también puede aplicar un flujo de fluido a la cámara en coordinación con la aplicación selectiva del campo magnético.

20 El documento WO02/29411 A2 divulga procedimientos, ensayos y componentes para la detección y análisis del enlace entre especies biológicas o químicas, y puede usarse específicamente para el descubrimiento de fármacos. En un ejemplo en el que se realiza el descubrimiento de fármacos, se pueden unir diferentes fármacos candidatos a diferentes artículos, tales como perlas magnéticas. Las perlas pueden exponerse a partículas coloides que transportan entidades de señalización, u otras entidades de señalización, inmovilizadas con respecto a las dianas proteicas de los fármacos candidatos. Después de la incubación, todas las perlas son atraídas magnéticamente a ubicaciones de superficie diferentes. Las perlas se liberan de las ubicaciones de superficie donde se determina que las entidades de señalización no existen y se eliminan del ensayo. Las perlas que se mantienen en otras ubicaciones de superficie se liberan, redistribuyen y atraen nuevamente a las ubicaciones de la superficie. Esto se repite con las etapas de lavado apropiadas, hasta que se puedan aislar e identificar los candidatos a fármacos individuales.

30 El documento WO2009/007797A1 divulga un dispositivo sensor microelectrónico para manipular una muestra en un portador intercambiable, por ejemplo, para detectar ópticamente partículas diana en un líquido de muestra que se proporciona en una cámara de muestra del portador. El dispositivo sensor microelectrónico comprende varios, $n > 1$, generadores de campo magnético, por ejemplo, bobinas electromagnéticas, con las cuales se pueden generar campos magnéticos en una región diana. Se proporciona una unidad de control que puede determinar y evaluar el acoplamiento mutuo o la autoinductancia de los generadores de campo magnético y/o las señales de los sensores de campo magnético unidos al portador con respecto a la presencia y/o estado de un portador en la región diana. De esta forma, la unidad de control puede detectar, por ejemplo, si el portador está colocado correctamente en el dispositivo sensor y/o donde se encuentra una sustancia magnéticamente interactiva.

40 El documento WO2008/102218 A1 divulga un dispositivo sensor para detectar partículas magnéticas, el dispositivo sensor comprendiendo un sustrato y una unidad de detección proporcionada sobre y/o dentro y/o cerca del sustrato y que está adaptada para detectar una señal de detección indicativa de la presencia de las partículas magnéticas, y una unidad de control de campo magnético proporcionada fuera del sustrato y adaptada para generar un campo magnético dependiente del tiempo para la interacción con las partículas magnéticas.

45 El documento WO2006/134569 A2 divulga un procedimiento, un dispositivo y un sistema para determinar una concentración de al menos un tipo de marcadores magnéticos polarizables o polarizados en un fluido, comprendiendo la superficie de detección al menos un tipo de sitios de enlace capaces de unirse específicamente a al menos un tipo de entidades biológicas vinculadas a los marcadores magnéticos, el dispositivo sensor además comprende al menos un elemento sensor magnético, el dispositivo de detección además comprende primero, medios para determinar la concentración de marcadores magnéticos unidos a los sitios de enlace y segundo, medios para determinar el tiempo de llegada del fluido.

50 En base a estos antecedentes, era un objeto de la presente invención proporcionar medios para determinar de manera confiable la cantidad de un componente diana en una muestra.

55 Este objetivo se logra de acuerdo con la invención mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y un dispositivo sensor de acuerdo con la reivindicación 8. Las realizaciones preferentes son materia de estudio de las reivindicaciones dependientes.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención sirve para la determinación de la cantidad de un componente diana en una muestra, en el que las partículas magnéticas pueden enlazarse específicamente a una superficie de contacto de una cámara de muestra que se llena con la muestra y en la que dicho enlace tiene lugar con cinética que depende de la cantidad de muestra del componente diana. La cantidad de componente diana que se busca se denominará brevemente "cantidad de muestra". Por lo general, se mide como una concentración, por ejemplo, como masa por volumen o número de partículas por volumen. El "componente diana" puede comprender, por ejemplo, sustancias biológicas como biomoléculas, complejos, fracciones celulares o células.

El término "partícula magnética" denotará una partícula magnetizada o magnetizable (molécula, complejo, nanopartícula, micropartícula, etc.), por ejemplo, una perla superparamagnética. Las partículas magnéticas a menudo se utilizarán como marcadores para el componente diana de interés y se enlazarán químicamente a ellas.

La "cámara de muestra" es generalmente una cavidad vacía o una cavidad llena de alguna sustancia como un gel que puede absorber una sustancia de muestra; puede ser una cavidad abierta, una cavidad cerrada o una cavidad conectada a otras cavidades por canales de conexión de fluido. Una parte de la pared de la cámara de muestra es la "superficie de contacto" a la que se pueden enlazar específicamente las partículas magnéticas. Generalmente, la superficie de contacto estará recubierta para este fin con sitios de enlace (por ejemplo, anticuerpos) a los que las partículas magnéticas (que comprenden los antígenos correspondientes) pueden enlazarse específicamente.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) Al menos dos "etapas de lavado", en las que se ejerce una fuerza magnética sobre las partículas magnéticas en la superficie de contacto de manera que las partículas magnéticas no enlazadas se alejan de la superficie de contacto. Si bien el movimiento a menudo se dirige perpendicularmente lejos de la superficie de contacto, también puede comprender componentes laterales o incluso un enfoque (al menos intermedio) a la superficie. Las fuerzas magnéticas apropiadas pueden ejecutarse particularmente generando un campo magnético en la superficie de contacto con un gradiente distinto de cero dirigido lejos de la superficie. Opcionalmente, la fuerza magnética puede ser lo suficientemente grande como para eliminar también partículas magnéticas de la superficie de contacto que están enlazadas, pero no enlazadas específicamente, por ejemplo, no a través de una hibridación con sitios de enlace específicos, sino solo a través de fuerzas más débiles. Las al menos dos ejecuciones de una etapa de lavado están separadas por intervalos de tiempo (distintos de cero) en los que no se produce la eliminación de partículas magnéticas que serían equivalentes a un lavado.

b) Al menos dos "etapas de medición" (cada una de ellas asociada a otra de las etapas de lavado mencionadas anteriormente) en las que se mide la cantidad total de partículas magnéticas en la superficie de contacto durante la etapa de lavado asociada. Debe observarse que la "cantidad total de partículas magnéticas" comprende partículas magnéticas enlazadas específicamente, así como partículas no específicamente enlazadas y no enlazadas. Además, la duración de la medición es independiente de la duración de la etapa de lavado. Por lo tanto, una medición "durante" la etapa de lavado significa típicamente una medición instantánea en cualquier punto de tiempo en el intervalo de la etapa de lavado, en el que este intervalo también comprenderá, por definición, el momento después de que haya finalizado la eliminación activa de partículas magnéticas. Cabe señalar además que la cantidad de partículas magnéticas puede medirse magnéticamente, es decir, mediante la detección de su magnetismo, o mediante cualquier otro procedimiento adecuado, por ejemplo, la detección de un marcador fluorescente unido a las partículas magnéticas.

c) Una "etapa de estimación" en la que la cantidad de muestra deseada del componente diana se estima con la ayuda de los resultados de medición de las etapas de medición.

El procedimiento descrito tiene la ventaja de que permite determinar la cantidad del componente diana en una muestra ("cantidad de muestra") a partir de mediciones en una superficie de contacto que puede ejecutarse durante un proceso continuo de enlace de partículas magnéticas a la superficie de contacto. Esto se debe al hecho de que se utiliza un lavado magnético de partículas magnéticas no enlazadas, que proporciona mediciones precisas sin un intercambio de la muestra. El procedimiento es rápido ya que no es necesario esperar hasta que se alcance, quizás muy lentamente, un estado estacionario. Además, el procedimiento proporciona un intervalo dinámico aumentado al permitir la determinación de altas cantidades de muestra del componente diana, lo que conduce a una saturación del enlace en la superficie de contacto en un estado estacionario y que, por lo tanto, no puede determinarse de manera confiable en el estado estacionario. Esta extensión del límite dinámico superior permite utilizar partículas magnéticas más grandes que a su vez mejora el límite de sensibilidad inferior.

Las partículas magnéticas son atraídas preferiblemente a la superficie de contacto por una fuerza magnética de atracción, por ejemplo generada por un gradiente de campo magnético orientado apropiadamente, antes y/o después de una etapa a) de lavado. De esta manera, se puede acelerar el enlace de partículas magnéticas a la superficie de contacto. La fuerza de la atracción magnética debe conocerse y/o controlarse exactamente porque afecta el resultado de una etapa b) de medición que se realiza durante un proceso no estacionario.

La medición de la cantidad total de partículas magnéticas en la superficie de contacto en la etapa b) de medición se realiza preferiblemente al final de la etapa a) de lavado asociada, para garantizar que se eliminen de la superficie de

contacto tantas partículas magnéticas no enlazadas como sea posible. La etapa a) de lavado puede repetirse varias veces, en la que las ejecuciones de la etapa de lavado están separadas por intervalos de tiempo (distintos de cero) en los que no tiene lugar la eliminación de partículas magnéticas no enlazadas. Generalmente, los intervalos de tiempo intermedios se usarán para una atracción magnética de partículas a la superficie de contacto.

- 5 Cabe señalar que todas las observaciones y modificaciones explicadas anteriormente y en lo que sigue con respecto a "una etapa a) de lavado" se aplican también a todas las repeticiones de esta etapa. Aunque la etapa a) de lavado se ejecuta varias veces en la realización mencionada anteriormente de la invención, una etapa b) de medición asociada puede ejecutarse solo dos veces, es decir, para dos etapas individuales de las varias etapas de lavado. Sin embargo, preferiblemente, las etapas b) de medición se ejecutan para todas las ejecuciones de una etapa a) de lavado.
- 10 Cabe señalar que todas las observaciones y modificaciones explicadas anteriormente y en lo que sigue con respecto a "una etapa b) de medición" se aplican también a todas las repeticiones de esta etapa.

Los al menos dos resultados de medición obtenidos por el procedimiento se explotan preferiblemente en base a la etapa c) de estimación en una pluralidad de resultados de medición obtenidos en diferentes etapas b) de medición. Esto puede hacerse, por ejemplo, estimando un valor de la cantidad de muestra del componente diana a partir de cada medición individual y posteriormente calculando un promedio estadístico apropiado de estos valores. En otro enfoque, la pluralidad de resultados de medición obtenidos en diferentes etapas de medición puede usarse para basar la estimación de la cantidad de muestra en el cambio de los resultados de medición. Así, por ejemplo, es posible calcular la tasa de cambio (pendiente) de los resultados de la medición, que se relaciona con la cinética del proceso de enlace y, por lo tanto, también es un indicador confiable de la cantidad de muestra del componente diana que se busca.

- 20 Se divulga (no es parte de la invención) que la estimación de la cantidad de muestra del componente diana puede tener como base un único resultado de medición obtenido en la etapa b), que es un procedimiento simple y rápido para determinar dicha cantidad en muchas situaciones.

- En la práctica resulta que las variantes alternativas descritas de hacer la estimación de la cantidad de muestra del componente diana en base a (i) un cambio de los resultados de medición (es decir, en la cinética), o (ii) un único resultado de medición, logran su mayor precisión para diferentes cantidades de muestra del componente diana. Cuando se proporciona un valor para una cantidad de muestra esperada del componente diana, esto puede explotarse para seleccionar automáticamente la variante más apropiada del procedimiento, es decir, basar la estimación en un cambio de varios resultados de medición, o en un solo resultado de medición, o una combinación de ambos enfoques. En los ensayos en los que la cantidad de partículas magnéticas enlazadas aumenta con la cantidad de muestra del componente diana (por ejemplo, en un ensayo tipo emparedado), la primera variante generalmente se preferirá para valores altos de la cantidad de muestra esperada y la segunda variante para valores más bajos. Una regla inversa es válida para, por ejemplo, ensayos de inhibición, en los que cantidades bajas de muestra del componente diana corresponden a cantidades altas de partículas magnéticas enlazadas y viceversa. En general, se puede decir que para los ensayos con un enlace rápido y/o con muchas partículas magnéticas enlazadas, se prefiere una medición en base a la cinética, mientras que para los ensayos con enlace lento y/o pocas partículas magnéticas enlazadas, se usan favorablemente mediciones individuales.

- La cantidad de muestra esperada mencionada anteriormente del componente diana se puede dar por adelantado, por ejemplo, a través de información adicional que está disponible acerca de la muestra a probar. Preferiblemente, la cantidad de muestra esperada del componente diana se estima, sin embargo, en base a los primeros resultados de medición obtenidos durante un ensayo en curso. Por lo tanto, el procedimiento puede hacerse autoadaptable y seleccionar automáticamente el procedimiento óptimo para tratar con muestras de un contenido completamente desconocido del componente diana.

- De acuerdo con otra divulgación (que no forma parte de la invención), el momento (es decir, inicio, finalización) de las etapas de lavado y las etapas de medición restantes se determina en función de los resultados de las etapas de lavado y las etapas de medición ya ejecutadas.

Si los primeros resultados de medición indican una alta cantidad de muestra del componente diana, por ejemplo, es posible programar etapas de medición óptimas para una determinación de la cinética; si indican una baja cantidad de muestra del componente diana, es posible programar de manera óptima una sola etapa de medición para una "medición de punto final".

- 50 Una etapa a) de lavado magnético puede ser tal que aproximadamente todas (es decir, más del 80 %, preferiblemente más del 90 %) las partículas magnéticas que no están enlazadas específicamente a la superficie de contacto se eliminen de la superficie de contacto al final de esta etapa. Esto se puede lograr aplicando fuerzas magnéticas apropiadas que son, por ejemplo, lo suficientemente altas y duran lo suficiente. Una medición al final de la etapa de lavado incluirá sustancialmente solo la cantidad de partículas magnéticas enlazadas específicamente.
- 55 Alternativamente, una etapa a) de lavado puede ser tal que solo una fracción de las partículas magnéticas que no están específicamente enlazadas se eliminen de la superficie de contacto durante esta etapa. Tal lavado parcial se puede preferir si un lavado completo llevaría demasiado tiempo, particularmente si se ejecutan una pluralidad de etapas de lavado que permitan determinar un cambio en los resultados de medición.

Dependiendo de la cantidad de muestra predominante del componente diana y el comportamiento de enlace de las partículas magnéticas, se puede alcanzar una saturación de los enlaces disponibles en la superficie de contacto más o menos rápidamente. El momento de las etapas de lavado y las etapas de medición asociadas preferiblemente tendrán en cuenta este hecho para evitar que las mediciones se realicen demasiado pronto (cuando no hay suficientes partículas magnéticas enlazadas a la superficie de contacto) o demasiado tarde (cuando ya se alcanza la saturación en la superficie de contacto). Esto se puede lograr, por ejemplo, si se ejecuta al menos una etapa de lavado y la etapa de medición asociada

i) después de una fracción inferior dada y/o

ii) antes de una fracción superior dada de un tiempo total esperado necesario para alcanzar la saturación de la superficie. La fracción inferior puede corresponder, por ejemplo, a aproximadamente el 20 % y la fracción superior a aproximadamente el 80 % del tiempo total hasta que se alcanza la saturación de la superficie. Si no hay una estimación disponible para el tiempo total esperado para alcanzar la saturación de la superficie en una muestra particular, se pueden tomar valores límite válidos globalmente. Por lo tanto, el momento de la última etapa de medición ("medición de punto final") generalmente dependerá de la cantidad más baja de componente diana que deba medirse, mientras que las "mediciones de punto medio" anteriores se cronometran para poder determinar la cantidad más alta de componente diana que necesita ser medido.

La etapa de estimación c) explota el hecho de que el enlace de partículas magnéticas a la superficie de contacto se rige por leyes físicas/químicas que dependen de la cantidad de muestra del componente diana. Por lo tanto, los resultados de medición obtenidos durante las etapas de lavado intermedias están relacionados de forma reproducible con la cantidad de muestra del componente diana, lo que permite inferir la cantidad de muestra del componente diana a partir de las mediciones. La relación matemática entre los resultados de medición y la cantidad de muestra que se necesita para la estimación podría derivarse de consideraciones teóricas. Sin embargo, esta relación se determina preferiblemente a partir de un procedimiento de calibración realizado con muestras de prueba que tienen diferentes cantidades de muestra conocidas del componente diana. Por lo tanto, se divulga que la etapa de estimación se basa en datos de calibración obtenidos con muestras de prueba. Los datos de calibración obtenidos de esta manera se pueden usar como base para la etapa de estimación. Por ejemplo, se pueden proporcionar como una tabla de búsqueda o como una fórmula matemática con parámetros ajustados.

La invención se refiere además a un dispositivo sensor que comprende los siguientes componentes:

a) Una cámara de muestra en la que se puede proporcionar una muestra que comprende un componente diana y partículas magnéticas, teniendo la cámara de muestra una superficie de contacto en la que las partículas magnéticas pueden enlazarse específicamente.

b) Un manipulador magnético para ejercer una fuerza magnética sobre partículas magnéticas en la superficie de contacto de manera que las partículas magnéticas no enlazadas se alejen de la superficie de contacto. El manipulador magnético puede realizarse, por ejemplo, mediante un electroimán que genera un gradiente de campo magnético en la superficie de contacto.

c) Una unidad de sensor para medir la cantidad total de partículas magnéticas en la superficie de contacto. La unidad de sensor puede ser, por ejemplo, una unidad de sensor óptico, magnético, mecánico, acústico, térmico y/o eléctrico. Una unidad de sensor magnético puede comprender particularmente una bobina, sensor Hall, sensor Hall plano, sensor de puerta de flujo, SQUID (dispositivo de interferencia cuántica superconductora), sensor de resonancia magnética, sensor magnetorrestrictivo o sensor magnetorresistente del tipo descrito en los documentos WO 2005/010543 A1 o WO 2005/010542 A2, especialmente una GMR (magnetorresistencia gigante), una TMR (magnetorresistencia túnel) o una AMR (magnetorresistencia anisotrópica). Una unidad de sensor óptico puede adaptarse particularmente para detectar variaciones en un haz de luz de salida que surgen de una reflexión interna total frustrada debido a partículas en una superficie de detección. Otros conceptos de sensores ópticos, mecánicos, acústicos y térmicos se describen en el documento WO 93/22678, que se incorpora al presente texto como referencia.

d) Una unidad de control que está conectada al manipulador magnético y la unidad de sensor para determinar la cantidad de muestra del componente diana con un procedimiento del tipo descrito anteriormente. Esto significa que la unidad de control está adaptada a

(i) ejecutar al menos dos etapas de lavado (haciendo que el manipulador magnético ejerza una fuerza magnética sobre las partículas magnéticas para eliminar las partículas magnéticas no enlazadas de la superficie de contacto),

(ii) ejecutar al menos dos etapas de medición asociadas (haciendo que la unidad de sensor mida la cantidad total de partículas magnéticas en la superficie de contacto durante una etapa de lavado),

(iii) estimar la cantidad de muestra del componente diana con la ayuda de los resultados de medición mencionados anteriormente. La unidad de control puede realizarse mediante hardware electrónico dedicado, hardware de procesamiento de datos digitales con software asociado, o una combinación de ambos.

El dispositivo sensor comprende los componentes necesarios para ejecutar un procedimiento del tipo descrito anteriormente. Por lo tanto, se hace referencia a la descripción anterior para obtener más información sobre los detalles, ventajas y mejoras de ese dispositivo.

5 El procedimiento descrito generalmente se realizará con la ayuda de un dispositivo informático, por ejemplo, un microprocesador o un FPGA en la unidad de control del dispositivo sensor mencionado anteriormente. Por consiguiente, la presente invención incluye además un producto de programa informático que proporciona la funcionalidad de cualquiera de los procedimientos de acuerdo con la presente invención cuando se ejecuta en un dispositivo informático.

10 Además, la presente divulgación incluye un portador de datos, por ejemplo, un disquete, un disco duro, una EPROM o un disco compacto (CD-ROM), que almacena el producto informático en un formato legible por máquina y que ejecuta al menos uno de los procedimientos de la invención cuando el programa almacenado en el portador de datos se ejecuta en un dispositivo informático. El portador de datos puede ser particularmente adecuado para almacenar el programa del dispositivo informático mencionado en el párrafo anterior.

15 Hoy en día, dicho software a menudo se ofrece en Internet o en una empresa Intranet para su descarga, por lo tanto, la presente invención también incluye la transmisión del producto informático de acuerdo con la presente invención a través de una red de área local o amplia.

La invención se refiere además al uso del dispositivo microelectrónico descrito anteriormente para diagnóstico molecular, análisis de muestras biológicas o análisis de muestras químicas, análisis de alimentos y/o análisis forense.

20 El diagnóstico molecular puede realizarse, por ejemplo, con la ayuda de partículas magnéticas que se unen directa o indirectamente a las moléculas diana.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de y se dilucidarán con referencia a la realización o realizaciones descritas de aquí en adelante. Estas realizaciones se describirán a modo de ejemplo con la ayuda de los dibujos adjuntos en los que:

25 Las Figuras 1-5 muestran etapas consecutivas de un procedimiento de acuerdo con la presente invención;

La Figura 6 muestra el curso de las señales de medición a lo largo del tiempo para dos muestras ejemplares con diferentes cantidades de un componente diana; La Figura 7 muestra otro curso ejemplar de señales de medición a lo largo del tiempo con tres etapas de lavado magnético;

30 La Figura 8 ilustra curvas de dosis-respuesta determinadas experimentalmente que describen la relación entre los valores de medición durante las etapas de lavado de la Figura 7 y la cantidad de muestra asociada del componente diana; La Figura 9 ilustra diferentes intervalos dinámicos asociados con mediciones en base a puntos medios y mediciones en base a pendientes.

Los números de referencia similares en las Figuras se refieren a componentes idénticos o similares.

35 En muchos ensayos biológicos es deseable un amplio intervalo dinámico (es decir, el intervalo de concentraciones de componentes diana que se puede determinar de manera confiable). Los siguientes ejemplos ilustran una solución de cómo se puede extender el intervalo dinámico de los ensayos en base a (nano)partículas magnéticas.

40 Las partículas o perlas magnéticas se pueden usar como marcadores para, por ejemplo, componentes biológicos diana (átomos, iones, biomoléculas, células, virus o fracciones de células o virus, extracto de tejidos, etc.) para lograr un diagnóstico molecular rápido, sensible y fácil de usar. En muchos dispositivos biosensor, las partículas magnéticas están enlazadas a una superficie de contacto del dispositivo sensor en presencia/ausencia del componente diana, en el que la cantidad de partículas magnéticas enlazadas a la superficie depende de la concentración del componente diana en la solución.

45 Es deseable que un dispositivo sensor pueda medir de manera sensible y en un intervalo dinámico lineal grande, es decir, en un intervalo de concentración grande para el cual la señal es proporcional a la concentración. Sin embargo, a menudo se observa que el intervalo dinámico es limitado. Para partículas magnéticas de más de 100 nm, el intervalo lineal está, por ejemplo, generalmente limitado a aproximadamente 1-2 órdenes de magnitud. El intervalo dinámico para una técnica de detección de superficie está limitado por:

- la densidad más baja de partículas magnéticas (marcador) que se puede detectar;
 - la densidad más alta de partículas magnéticas (marcador) que puede caber en la superficie (suponiendo que
- 50 múltiples capas de marcadores en la superficie no produzcan un aumento lineal en la señal).

El uso de partículas magnéticas más grandes es ventajoso porque esto disminuye la densidad más baja de partículas que se pueden detectar; sin embargo, la densidad de partículas más alta, por lo tanto, también se reduce debido al impedimento estérico debido al tamaño de las partículas.

Como un ejemplo, la prueba de troponinas cardíacas requiere mediciones extremadamente sensibles del orden de 1 pM, lo que implica el uso de partículas magnéticas grandes (300-500 nm de diámetro). Esto viene a expensas del intervalo dinámico que es bajo (2 órdenes), porque la señal se satura a altas concentraciones. Sin embargo, para cumplir con los requisitos clínicos, es necesario poder medir al menos tres décadas de concentración.

5 Una forma de extender el intervalo dinámico a altas concentraciones es realizar varias determinaciones a diversas diluciones de la muestra original. Otro procedimiento es introducir las muestras en diferentes momentos para cambiar el tiempo de incubación (véase documento WO/2006/092036). Sin embargo, estos procedimientos son engorrosos, propensos a errores y requieren varias etapas de manejo.

10 Otro problema que debe tenerse en cuenta es que las mediciones a menudo también contienen una parte que no es proporcional a la concentración de partículas magnéticas enlazadas, por ejemplo, enlace no específico de partículas a la superficie del sensor o señal derivada del fluido a granel sobre la superficie.

15 Para abordar los problemas anteriores, aquí se propone una combinación de mediciones cinéticas y de punto final que combina la sensibilidad de las mediciones de punto final con el intervalo dinámico extendido de las mediciones cinéticas. Esto se puede lograr mediante un procedimiento de ensayo que utiliza múltiples etapas de lavado. Este procedimiento se describirá a continuación con más detalle.

En los dispositivos sensores, las etapas de lavado pueden llevarse a cabo mediante la sustitución (micro) fluídica del fluido de muestra que contiene el componente diana (analito) sobre el área del sensor con otro fluido que no contenga el componente diana. Esto puede ser complicado y difícil de lograr. Además, a menudo es imposible reintroducir el fluido de muestra para reanudar la reacción, lo que permite realizar una medición cinética.

20 Una característica única de los ensayos que usan partículas magnéticas es la capacidad de realizar una etapa de lavado magnético. Las partículas magnéticas que están cerca de la superficie del sensor (y por lo tanto generan una señal) pero que no se han enlazado pueden eliminarse simplemente usando un imán que dirige las partículas lejos de la superficie. Además, al ajustar la fuerza magnética, las partículas que están enlazadas por enlaces no específicos débiles también se pueden eliminar dejando intactos los enlaces específicos. Tal etapa de lavado magnético puede ser muy rápida y completarse en un segundo. Además, no es necesario eliminar el líquido de muestra de la cámara de muestra/área del sensor. Después de la etapa de lavado, se puede determinar la señal generada por las partículas específicamente enlazadas y simplemente se puede reanudar la reacción. De esta manera, la cantidad de partículas específicamente enlazadas se puede determinar varias veces en un solo ensayo.

30 Las figuras 1 a 5 ilustran el concepto anterior para un dispositivo 100 sensor magnético. El dispositivo 100 sensor magnético comprende una cámara 1 de muestra en la que se puede proporcionar una muestra líquida que comprende un componente diana y partículas 2 magnéticas. La cámara 1 de muestra está en el fondo confinada por una superficie 4 de contacto que porta sitios 3 de enlace a los que las partículas 2 magnéticas pueden enlazarse específicamente. La superficie 4 de contacto puede ser la superficie de un sustrato, por ejemplo, un sustrato de silicio en el que están integrados circuitos microelectrónicos, o un sustrato de vidrio en el caso de mediciones ópticas. En general, las partículas 2 magnéticas se usan como marcadores para algún componente diana en el que uno está realmente interesado. Por simplicidad, en lo siguiente se supondrá que las partículas 2 magnéticas son al mismo tiempo el componente diana de interés. Debe observarse que en algunos ensayos hay partículas magnéticas que no se pueden enlazar a la superficie 4 de contacto, por ejemplo, porque no se enlazaron previamente a una molécula diana; lo que se determinará a continuación es solo la cantidad de partículas magnéticas en la muestra que pueden enlazar.

40 Debajo y encima de la cámara 1 de muestra, se disponen un imán 11 de atracción y un imán 12 de repulsión, respectivamente. Cuando se activa el imán 11 de atracción, genera un gradiente B de campo magnético que atrae partículas 2 magnéticas a la superficie 4 de contacto.

45 Una unidad 10 sensor magnético debajo de la superficie 4 de contacto detecta la cantidad de partículas 2 magnéticas en la superficie de contacto. Esta detección puede lograrse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, óptica o magnéticamente. Una unidad 13 de control está conectada a la unidad 10 sensor y a los imanes 11, 12 para controlar su actividad y leer las señales s del sensor. Un curso temporal típico de las señales s del sensor se ilustra en el diagrama en la caja de la unidad 13 de control.

50 La figura 1 muestra la situación en la que las partículas 2 magnéticas acaban de ser introducidas en la cámara 1 de muestra llenando esta última con la muestra. Las partículas 2 son atraídas a la superficie 4 de contacto por el imán 11 de atracción activado. Como todavía no hay partículas 2 magnéticas en la superficie 4 de contacto, la señal s del sensor correspondiente tiene un valor bajo.

En la Figura 2, las primeras partículas 2 magnéticas han alcanzado la superficie 4 de contacto.

La señal s del sensor aumenta en consecuencia.

55 En la Figura 3, el imán 11 de atracción se ha desactivado y el imán 12 de repulsión se ha activado. Esto genera un gradiente de campo magnético que separa las partículas 2 magnéticas de la superficie 4 de contacto. Por lo tanto, se realiza una etapa de lavado en la que las partículas 2 magnéticas enlazadas no específicamente se eliminan de la

superficie 4 de contacto. Como consecuencia, la señal s del sensor cae hasta que alcanza un valor que corresponde a la cantidad de partículas magnéticas enlazadas específicamente. En una etapa de medición, la unidad 13 de control puede muestrear y almacenar el valor de medición correspondiente proporcionado por el sensor 10.

5 En la Figura 4, la etapa de lavado ha finalizado y el imán 11 de atracción se ha activado nuevamente para atraer partículas magnéticas a la superficie 4 de contacto. Con la llegada de partículas 2 magnéticas a la superficie de contacto, la señal s del sensor aumenta en consecuencia.

10 La Figura 5 muestra la situación después de varias repeticiones de las etapas de lavado y medición magnéticas (Figura 3) y las etapas de atracción intermedias (Figura 4). La señal s de los sensores durante el lavado ha aumentado de forma oscilante hasta que finalmente se aproxima a un nivel de estado estacionario. A partir de uno o varios de los resultados de medición obtenidos al final de las etapas de lavado, se puede estimar la cantidad de muestra de partículas magnéticas dentro de la cámara 1 de muestra. Las diferentes formas de hacerlo se explicarán con más detalle a continuación.

15 En una primera realización, la activación de atracción que está dirigida a proporcionar un enlace eficiente del componente diana marcado con partículas magnéticas a la superficie 4 de contacto se interrumpe mediante una o más etapas de lavado magnético, posiblemente combinados con una etapa de lectura separada de la señal s del sensor. La Figura 6 muestra un diagrama correspondiente con señales s de sensor para una concentración de componente diana de cero (curva gris "0 pM") y 100 pM (curva negra sólida "100 pM"), respectivamente. La señal s se define aquí de tal manera que el 0 % corresponde a una superficie de contacto libre de partículas magnéticas.

20 En ausencia del componente diana, la señal del sensor vuelve a 0 durante las etapas de lavado introducidas, porque las partículas magnéticas que no están unidas a una molécula diana no pueden enlazarse a la superficie de contacto. En presencia de 100 pM del componente diana, se puede observar un cambio dependiente del tiempo en la señal durante las etapas de lavado. Es evidente del diagrama que durante las etapas de lavado se eliminan muchas partículas no enlazadas y enlazadas no específicamente. Incluso en ausencia de componente diana, la superficie de contacto se satura rápidamente con perlas no enlazadas, que se eliminan durante las etapas de lavado.

25 En cada etapa de lavado, se puede hacer una "medición de punto medio" y correlacionarla con la cantidad de muestra (conocida) del componente diana. De esta manera, se puede trazar una curva dosis-respuesta (concentración del componente diana en función de la señal) para cada una de estas "mediciones de punto medio".

30 Las Figuras 7 y 8 muestran esto con más detalle para el componente diana ejemplar troponina. La Figura 7 representa la curva de medición para una muestra con troponina 500 pM y para tres etapas de lavado y medición W1, W2 y W3. La Figura 8 muestra las curvas de dosis-respuesta correspondientes obtenidas de una pluralidad de tales mediciones para las dos mediciones de punto medio W1, W2 y la medición de punto final W3 (debe tenerse en cuenta que el término "medición de punto medio" denota una medición durante una etapa de lavado que es seguido de un enlace adicional de partículas magnéticas, mientras que una "medición de punto final" es solo la última medición de un ensayo).

35 Para las concentraciones de componentes diana que resultan en una evolución lenta de la señal, se pueden utilizar mediciones posteriores del punto medio. Para las concentraciones de componentes diana para las cuales la superficie 4 de contacto se satura rápidamente (durante las etapas de lavado), se pueden usar mediciones de punto medio anteriores. Esto da como resultado un intervalo dinámico mucho más amplio del ensayo.

40 En una segunda realización similar a la primera, se introducen múltiples etapas de lavado durante el enlace a la superficie. Sin embargo, en lugar de usar una sola medición de punto medio y/o punto final para una determinada respuesta del sensor, la pendiente de los cambios de señal después de la etapa de lavado en función del tiempo puede usarse como una medida para la cinética y, por lo tanto, la cantidad de componente diana presente en la muestra. Este procedimiento se puede combinar fácilmente con la medición de punto medio/final descrita. Para las concentraciones de componentes diana donde la señal está saturada al final del ensayo, se puede usar la cinética/pendiente del ensayo, mientras que para las concentraciones donde el sensor no está saturado, se puede usar la medición del punto final, lo que permite mediciones sensibles y un amplio intervalo dinámico del ensayo.

45 Cabe señalar que las realizaciones mencionadas anteriormente se pueden combinar. La Figura 9 muestra a este respecto un ejemplo donde, dentro de un ensayo, tanto la cinética (es decir, la pendiente ds/dt) como la señal (s) de punto final se usaron como dos mediciones separadas para muestras de prueba con diferentes concentraciones C del componente diana troponina. Como se puede observar fácilmente, las mediciones de punto final (indicadas con diamantes y en el eje izquierdo) cubren linealmente un intervalo de concentraciones C más bajas, mientras que las mediciones en base a la pendiente (indicadas con cuadrados y en el eje derecho) cubren el intervalo de concentraciones más altas. Por lo tanto, los intervalos dinámicos de cada tipo de medición son completamente diferentes, mejorando el intervalo dinámico de todo el ensayo. Esto no se limita a la combinación de mediciones cinéticas con mediciones de punto final, sino que cualquier combinación de una o más mediciones cinéticas y una o más mediciones de punto medio y una medición de punto final es en principio posible.

55 El software que se ejecuta en la unidad 13 de control puede hacer automáticamente la distinción de qué medición usar para la lectura final del instrumento (donde una señal o pendiente determinada debe traducirse a la cantidad

desconocida de componente diana presente en la muestra). Por ejemplo, para los experimentos en la Figura 9, si la medición del punto final produce una señal por encima de un cierto valor, se puede usar la medición cinética. O viceversa, si la pendiente está por debajo de cierto valor, se puede usar la medición del punto final. Dicha selección se puede hacer preferiblemente "en línea" durante el comienzo de un ensayo con una muestra desconocida. Por ejemplo, si la primera medición cinética o de punto medio indica un alto valor de troponina, el ensayo podría completarse en un minuto en lugar de cinco.

El uso de bobinas electromagnéticas para accionar las partículas magnéticas ofrece un control excelente sobre la manipulación de las partículas magnéticas. La tasa con la que las partículas magnéticas pueden enlazarse a la superficie y, por lo tanto, la tasa a la que evoluciona la señal se puede controlar por la forma en que se operan las bobinas magnéticas. En otras palabras, la tasa de enlace puede adaptarse a las necesidades específicas de un ensayo individual. Esto a su vez significa que, mediante activación, se puede ajustar el intervalo dinámico del ensayo. Esto es cierto para mediciones de punto final, punto medio y cinéticas. Además, mediante el uso de diferentes protocolos de activación para los diferentes tipos de mediciones DENTRO DE UN ENSAYO, el intervalo dinámico de cada uno de los tipos de medición puede ajustarse (semi) independientemente. Por ejemplo, los intervalos dinámicos de dos tipos de medición se pueden adaptar de manera que se superpongan (ligeramente), lo que da como resultado un gran intervalo dinámico general del ensayo.

Si bien la invención se describió anteriormente con referencia a realizaciones particulares, son posibles diversas modificaciones y extensiones, por ejemplo:

la unidad de sensor puede ser cualquier sensor adecuado para detectar la presencia de partículas magnéticas en o cerca de la superficie del sensor, en función de cualquier propiedad de las partículas, por ejemplo, puede detectar mediante procedimientos magnéticos, procedimientos ópticos (por ejemplo, imágenes, fluorescencia, quimioluminiscencia, absorción, dispersión, técnicas de campo evanescente, resonancia de plasmón de superficie, Raman, etc.), detección sónica (por ejemplo, onda acústica de superficie, onda acústica a granel, voladizo, cuarzo cristal, etc.), detección eléctrica (por ejemplo, conducción, impedancia, amperométrica, ciclo de reducción-oxidación), combinaciones de los mismos, etc.

Una unidad de sensor magnético puede ser, por ejemplo, una bobina, un sensor magnetorresistente, un sensor magnetorrestrictivo, un sensor Hall, un sensor Hall plano, un sensor de puerta de flujo, SQUID, un sensor de resonancia magnética, etc.

Las dianas moleculares a menudo determinan la concentración y/o presencia de fracciones más grandes, por ejemplo, células, virus o fracciones de células o virus, extracto de tejido, etc.

Además de los ensayos moleculares, también se pueden detectar fracciones más grandes con dispositivos sensor de acuerdo con la invención, por ejemplo, células, virus o fracciones de células o virus, extracto de tejido, etc. La detección puede ocurrir con o sin escaneo del elemento sensor con respecto a la superficie del sensor.

Las partículas que sirven como marcadores se pueden detectar directamente por el procedimiento de detección. Además, las partículas pueden procesarse más, antes de la detección. Un ejemplo de procesamiento adicional es que se agregan materiales o que las propiedades (bio)químicas o físicas del marcador se modifican para facilitar la detección.

El dispositivo y el procedimiento se pueden usar con varios tipos de ensayos bioquímicos, por ejemplo, ensayo de enlace/desenlace, ensayo tipo emparedado, ensayo de competencia, ensayo de desplazamiento, ensayo enzimático, etc. Es especialmente adecuado para la detección de ADN porque la correlación múltiple a gran escala es fácilmente posible y se pueden detectar diferentes oligos mediante la impresión por inyección de tinta en un sustrato.

El dispositivo y el procedimiento son adecuados para la correlación múltiple de sensores (es decir, el uso paralelo de diferentes sensores y superficies de sensores), la correlación múltiple de marcadores (es decir, el uso paralelo de diferentes tipos de marcadores) y la correlación múltiple de cámaras (es decir, el uso paralelo de diferentes cámaras de reacción)

El dispositivo y el procedimiento se pueden utilizar como biosensores de punto de atención rápidos, robustos y fáciles de usar para pequeños volúmenes de muestra. La cámara de reacción puede ser un artículo desechable para ser usado con un lector compacto, que contiene el uno o más medios de generación de campo y uno o más medios de detección. Además, el dispositivo, los procedimientos y los sistemas de la presente invención pueden usarse en pruebas automatizadas de alto rendimiento. En este caso, la cámara de reacción es, por ejemplo, una placa de pocillos o cubeta que se adapta a un instrumento automatizado.

Con nanopartículas se entiende partículas que tienen al menos una dimensión que oscila entre 3 nm y 5.000 nm, preferiblemente entre 10 nm y 3.000 nm, más preferiblemente entre 50 nm y 1.000 nm.

Finalmente, se señala que en la presente solicitud el término "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, que "un" o "uno/una" no excluye una pluralidad, y que un único procesador u otra unidad pueden cumplir las funciones de varios medios. La invención reside en todos y cada uno de los rasgos característicos novedosos y en todas y cada

una de las combinaciones de rasgos característicos. Además, los signos de referencia en las reivindicaciones no se interpretarán como limitativos de su alcance.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la cantidad de un componente diana en una muestra en el que las partículas (2) magnéticas se enlazan específicamente a los sitios de enlace de una superficie (4) de contacto de una cámara (1) de muestra llena con la muestra, con cinética que depende de la cantidad de muestra del componente diana, en el que las partículas (2) magnéticas se usan como marcadores para el componente diana y se enlazan químicamente a él, el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 5 a) al menos dos "etapas de lavado" en las que se ejerce una fuerza magnética sobre las partículas (2) magnéticas de modo que las partículas magnéticas no enlazadas se alejan de la superficie (4) de contacto;
- 10 b) al menos dos "etapas de medición" asociadas en las que la cantidad total de partículas (2) magnéticas en la superficie (4) de contacto se mide durante una etapa a) de lavado;
- 15 c) una "etapa de estimación" en la que la cantidad de componente diana en la muestra se estima con la ayuda de los resultados de medición de las etapas b) de medición, en el que en la etapa de estimación se explotan el al menos dos resultados de medición obtenidos en base a la etapa de estimación en una pluralidad de resultados de medición obtenidos en las diferentes etapas b) de medición, en el que la etapa de estimación comprende estimar un valor de la cantidad de muestra del componente diana a partir de cada medición individual y posteriormente calcular un promedio estadístico apropiado de estos valores o en el que la pluralidad de los resultados de medición obtenidos en las diferentes etapas b) de medición se utilizan para basar la estimación de la cantidad de muestra en el cambio de los resultados de medición, o en el que la estimación de la cantidad de muestra del componente diana se basa en un solo resultado de medición
- 20 obtenido en la etapa b),
- además, en el que se estima una cantidad de muestra esperada del componente diana en función de los primeros resultados de medición obtenidos durante un ensayo en curso y, por lo tanto, el procedimiento es autoadaptivo, y en el que el procedimiento selecciona automáticamente el procedimiento óptimo de la etapa c) de estimación para tratar con las muestras de un contenido completamente desconocido del componente diana, en el que la relación matemática entre los resultados de medición y la cantidad de muestra que se necesita para la estimación se determina a partir de un procedimiento de calibración realizado con muestras de prueba que tienen diferentes cantidades de muestra conocidas del componente diana.
- 25
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** las partículas (2) magnéticas son atraídas a la superficie (4) de contacto por una fuerza magnética atractiva antes y/o después de las etapas de lavado.
- 30 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la etapa de medición se ejecuta al final de la etapa de lavado, en el que el final de la etapa de lavado es el momento después de que ha finalizado una eliminación activa de partículas magnéticas.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la estimación se basa en el cambio de los resultados de la medición.
- 35 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** aproximadamente todas las partículas (2) magnéticas que no están enlazadas específicamente se eliminan de la superficie (4) de contacto durante una etapa de lavado.
- 40 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** solo una fracción de las partículas (2) magnéticas que no están enlazadas específicamente se eliminan de la superficie (4) de contacto durante una etapa de lavado.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** al menos una etapa de lavado y la etapa de medición correspondiente se ejecutan después de una fracción inferior dada y/o antes de una fracción superior dada de un tiempo total esperado necesario para alcanzar una saturación de enlaces.
- 45 8. Un dispositivo (100) sensor configurado para realizar el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-7, que comprende
- 50 a) una cámara (1) de muestra en la que se puede proporcionar una muestra que comprende un componente diana y partículas (2) magnéticas, teniendo la cámara de muestra una superficie (4) de contacto con sitios de enlace en los que las partículas (2) magnéticas pueden enlazarse específicamente con una cinética que depende de la cantidad del componente diana en la muestra, y en la que las partículas (2) magnéticas se usan como marcadores para el componente diana y se enlazan químicamente al mismo;
- b) un manipulador magnético (11, 12) para ejercer una fuerza magnética sobre partículas (2) magnéticas en la superficie (4) de contacto, de modo que las partículas magnéticas no enlazadas se alejen de la superficie (4) de contacto;

c) una unidad (10) de sensor para medir la cantidad total de partículas (2) magnéticas en la superficie (4) de contacto;

5 d) una unidad (13) de control conectada al manipulador (11, 12) magnético y la unidad (13) de sensor para estimar la cantidad de componente diana en la muestra, de modo que esta estimación se base en una pluralidad de resultados de medición obtenidos en las diferentes etapas de medición, en las que la estimación comprende estimar un valor de la cantidad de muestra del componente diana de cada medición individual y posteriormente calcular un promedio estadístico apropiado de estos valores o en el que se usa la pluralidad de los resultados de medición obtenidos en las diferentes etapas de medición para basar la estimación de la cantidad de muestra en el cambio de los resultados de medición, o en el que la estimación de la cantidad de muestra del componente diana se basa en un único resultado de medición obtenido,

10 en el que el dispositivo (100) sensor está configurado para estimar una cantidad de muestra esperada del componente diana en base a los primeros resultados de medición obtenidos durante un ensayo en curso y, por lo tanto, el procedimiento es autoadaptivo, y en el que el procedimiento selecciona automáticamente el procedimiento óptimo de estimación para tratar con muestras de un contenido completamente desconocido del componente diana, en el que la relación matemática entre los resultados de medición y la cantidad de muestra que se necesita para la estimación se determina a partir de un procedimiento de calibración realizado con muestras de prueba que tienen diferentes cantidades de muestra conocidas del componente diana.

15 9. Uso del dispositivo sensor de acuerdo con la reivindicación 8 para diagnósticos moleculares, análisis de muestras biológicas o análisis de muestras químicas.

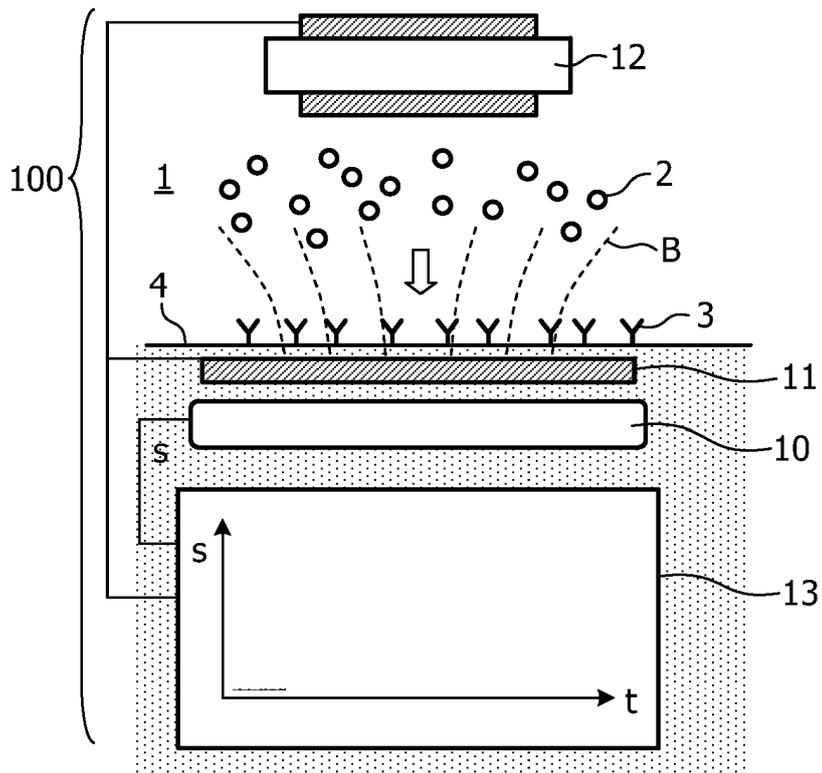


FIG. 1

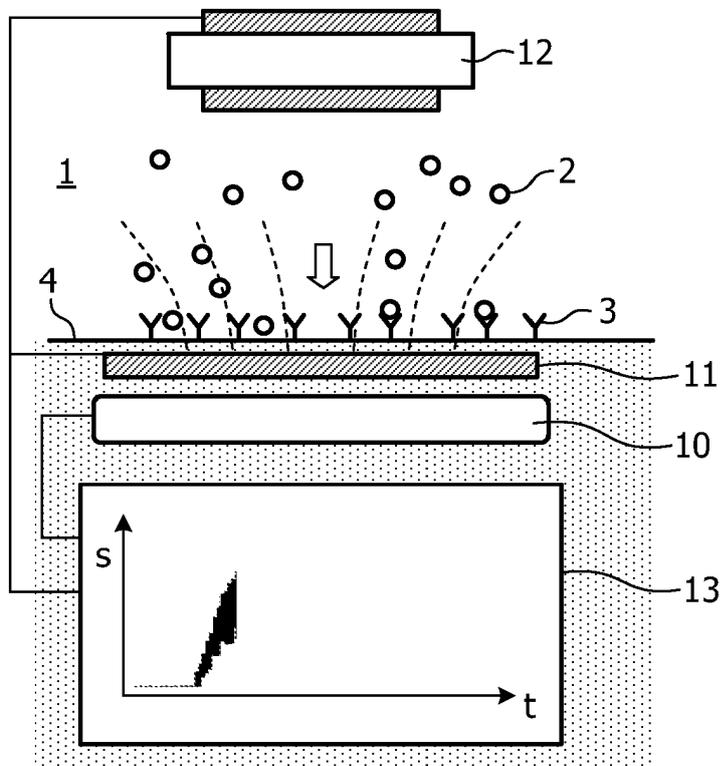


FIG. 2

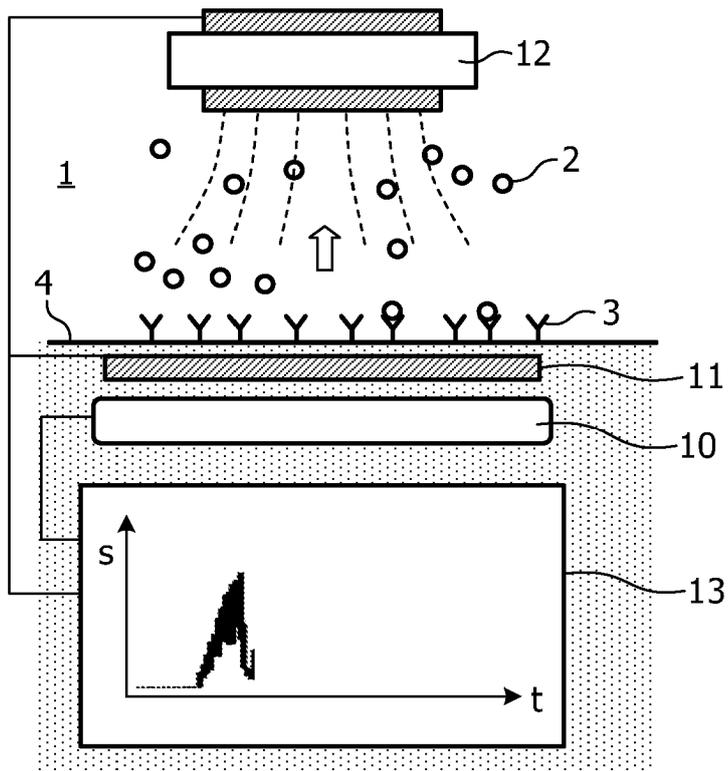


FIG. 3

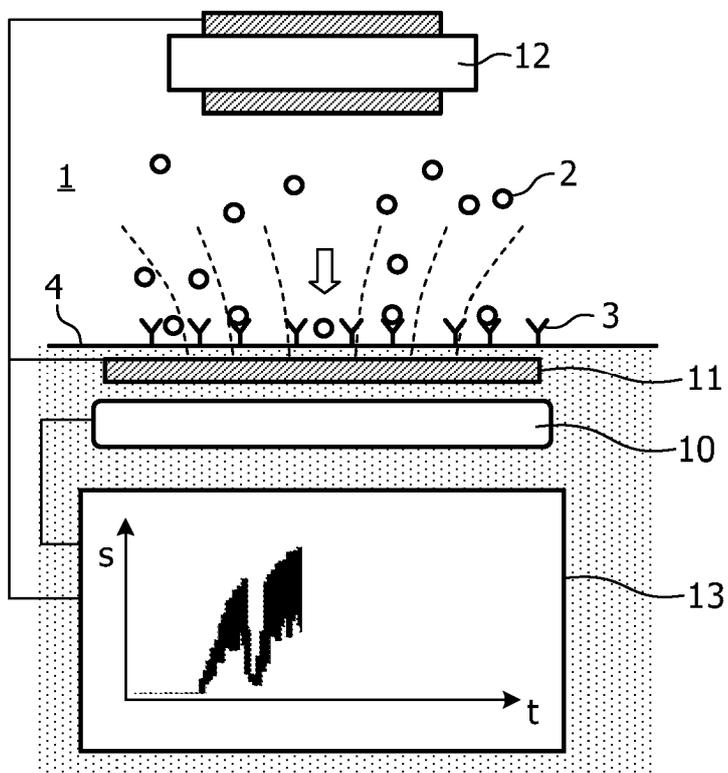


FIG. 4

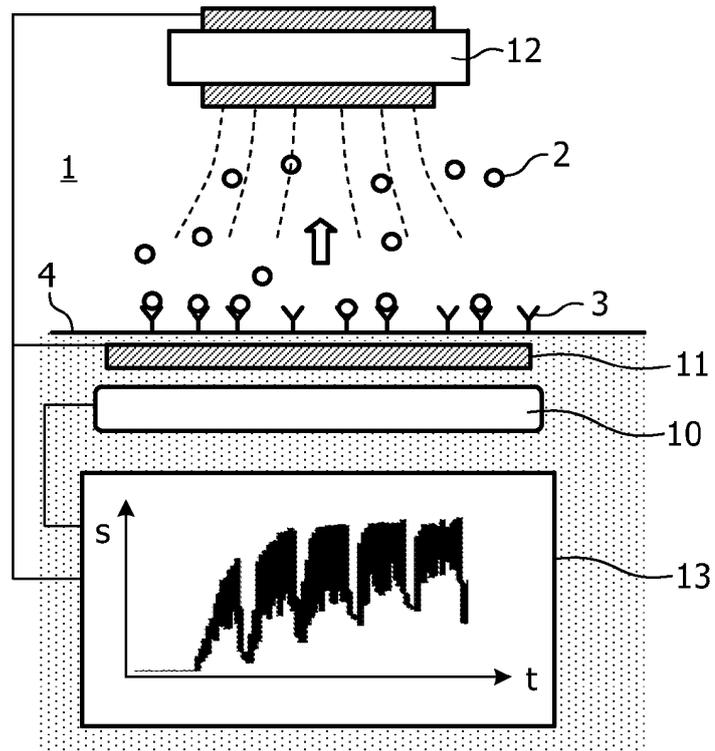


FIG. 5

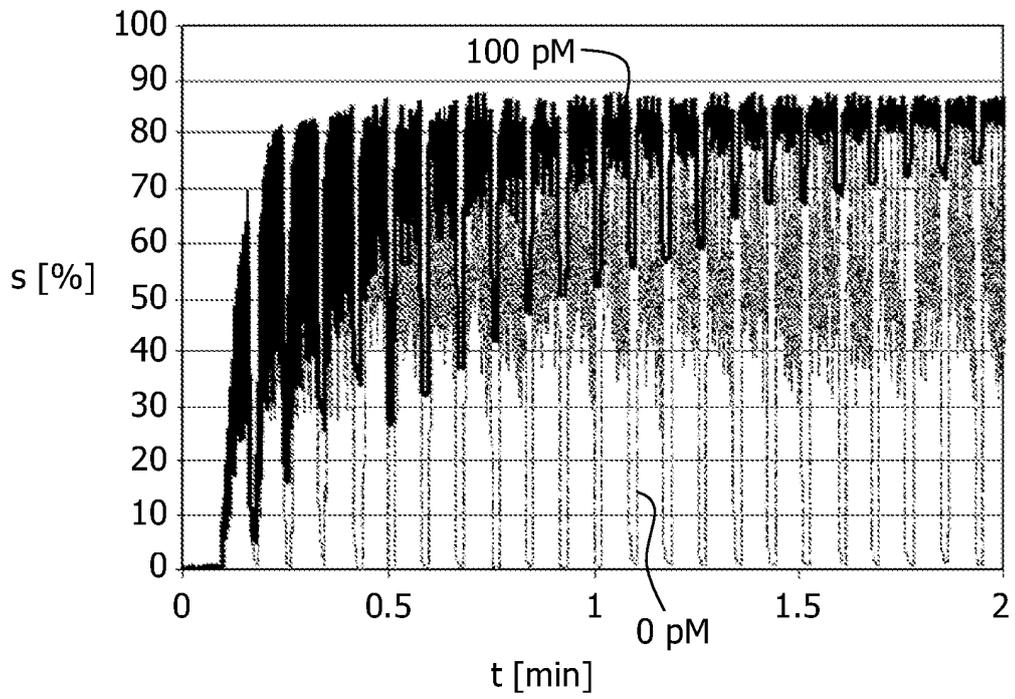


FIG. 6

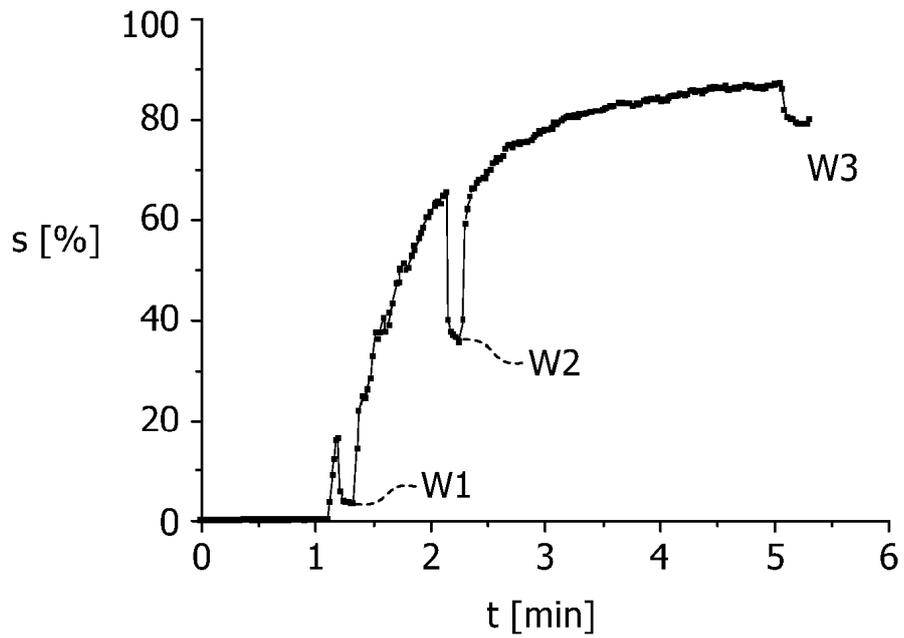


FIG. 7

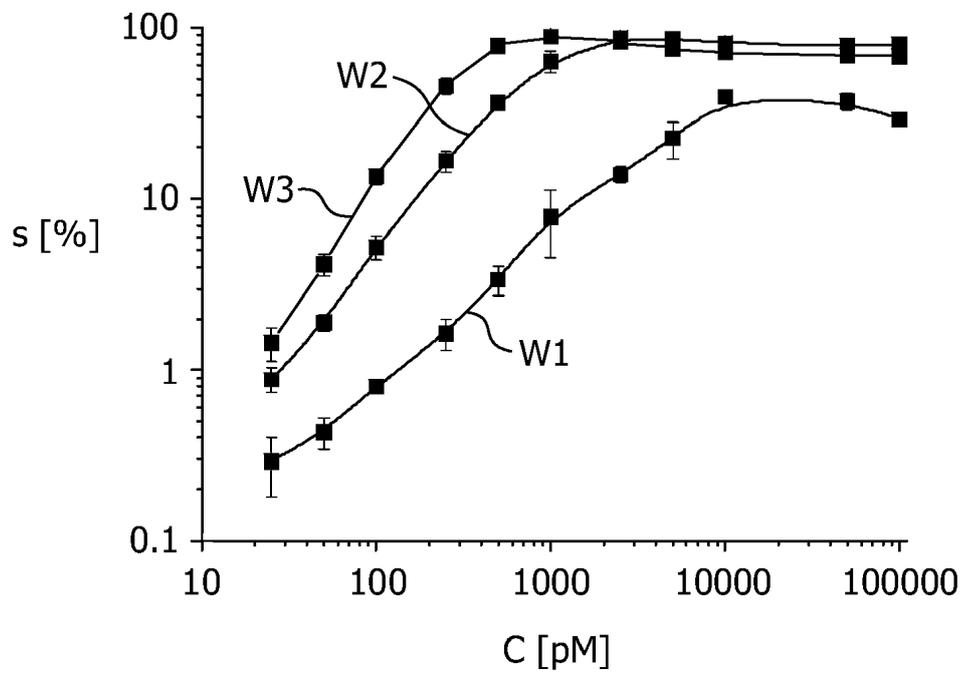


FIG. 8

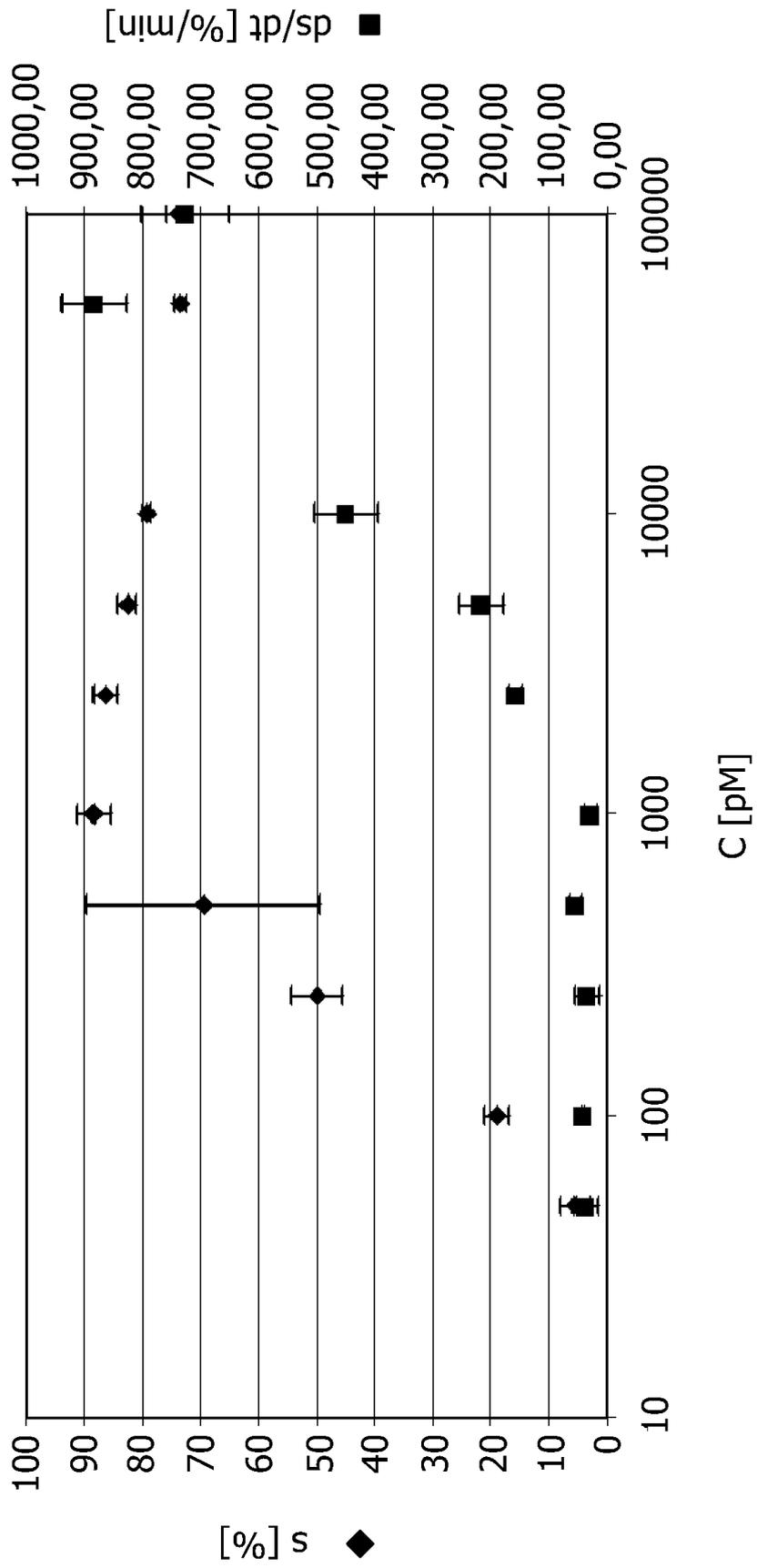


FIG. 9