

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-524581

(P2014-524581A)

(43) 公表日 平成26年9月22日(2014.9.22)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 21/65

(2006.01)

F 1

G O 1 N 21/65

テーマコード(参考)

G O 1 N 15/14

(2006.01)

G O 1 N 15/14

2 G O 4 3

D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2014-526551 (P2014-526551)
(86) (22) 出願日	平成24年8月17日 (2012.8.17)
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月21日 (2014.4.21)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2012/052019
(87) 國際公開番号	W02013/027034
(87) 國際公開日	平成25年2月28日 (2013.2.28)
(31) 優先権主張番号	61/525,669
(32) 優先日	平成23年8月19日 (2011.8.19)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/560,596
(32) 優先日	平成23年11月16日 (2011.11.16)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/669,004
(32) 優先日	平成24年7月6日 (2012.7.6)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	505307747 マルバーン インストゥルメンツ リミテッド イギリス、ウースターシャー ダブリュアール14 1エックスゼット、マルバーン、グローブウッド ロード、エニグマ ビジネス パーク (番地なし)
(74) 代理人	110000578 名古屋国際特許業務法人
(72) 発明者	ルイス イー. ニール イギリス国 ダブリュアール14 1エックスゼット ウスター・シャー マルバーン グローブウッド ロード エニグマ ビジネス パーク シーオー マルバーン インストゥルメンツ リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】微粒子のデュアルモード特徴付け

## (57) 【要約】

本発明は、懸濁粒子の特性を検出するための方法及び装置に関する。開示された実施形態には、試料の特性を検出するための光学機器(200)が含まれ、光学機器(200)は、微粒子分散液の試料を保持するための試料セル(103)と、試料セル(103)内の試料を照明するように構成されたコヒーレント光源(101)と、試料セル(103)内の試料によって弾性的に散乱したコヒーレント光源(101)からの光を受け取りその強度を測定するように配置された光強度検出器(104, 106)と、試料セル(103)内の試料によって非弾性的に散乱したコヒーレント放射線源(101)からの光を受け取りその波長の範囲測定するように配置され構成されたスペクトル光検出器(212)と、を備えている。

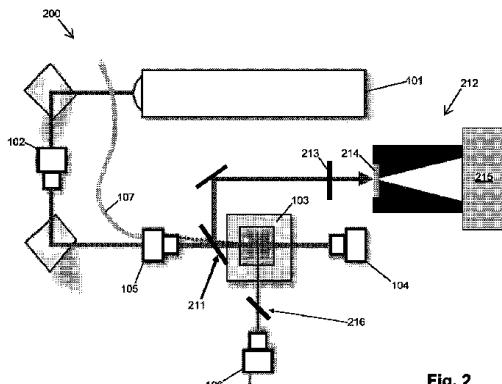


Fig. 2

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料の特性を検出するための光学機器であって、  
微粒子分散液の試料を保持するための試料セルと、  
前記試料セル内の試料を照明するように構成されたコヒーレント光源と、  
前記試料セル内の試料によって弾性的に散乱した前記コヒーレント光源からの光を受け取りその強度を測定するように配置された光強度検出器と、  
前記試料セル内の試料によって非弾性的に散乱した前記コヒーレント放射線源からの光を受け取りその波長の範囲を測定するように配置され、構成されたスペクトル光検出器と、を備えた光学機器。

10

**【請求項 2】**

前記スペクトル光検出器が、ラマン検出器であることを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

**【請求項 3】**

前記コヒーレント光源が、レーザであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の光学機器。

**【請求項 4】**

前記コヒーレント光源と前記試料セルとの間、  
前記試料セルと前記スペクトル光検出器との間、及び  
前記試料セルと前記光強度検出器との間、の 1 つ以上の間に配置された減衰器をさらに備えることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の光学機器。

20

**【請求項 5】**

前記減衰器が、第 1 の状態において前記光強度検出器が受け取った光を所定量減衰し、第 2 の状態において前記スペクトル光検出器が受け取った光をそれより少ない量減衰するように切り替え可能に構成されることを特徴とする請求項 4 に記載の光学機器。

**【請求項 6】**

前記光強度検出器が、前記減衰器が第 2 の状態にあるときに光を検出しないように構成されることを特徴とする請求項 5 に記載の光学機器。

**【請求項 7】**

前記試料セル内の試料によって非弾性的に散乱した前記コヒーレント放射線源から前記スペクトル光検出器への光の選択された範囲の波長を送信するように構成されたフィルタを備えることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の光学機器。

30

**【請求項 8】**

前記フィルタが、ノッチフィルタであることを特徴とする請求項 7 に記載の光学機器 (200)。

**【請求項 9】**

前記電子分光検出器が、前記光源からの入射光に直交する経路に沿って及び / または後方散乱光を検出するための入射光と逆方向の経路に沿って、前記試料セルから散乱光を受け取るように構成されることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の光学機器。

40

**【請求項 10】**

前記コヒーレント放射線源は、第 1 及び第 2 のコヒーレント光源を含み、前記光強度検出器は、前記第 1 のコヒーレント光源が発した光に反応し、前記スペクトル光検出器は、前記第 2 のコヒーレント放射線源が発した光に反応することを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の光学機器。

**【請求項 11】**

前記光強度検出器及び前記スペクトル光検出器は共に、前記試料セル内の試料のある性質が変化する測定期間中に光を受け取り測定するように構成されることを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の光学機器。

**【請求項 12】**

50

前記特性が、pH及び温度の一方または両方であることを特徴とする請求項10に記載の光学機器。

【請求項13】

微粒子分散液の試料の光学特性を検出する方法であって、  
分析のために試料セル内に前記試料を配置する工程と、  
コヒーレント光源からの入射光で前記試料を励起する工程と、  
光強度検出器を用いて前記励起された試料からの弾性散乱光を検出する工程と、  
スペクトル光検出器を用いて前記励起された試料からの非弾性散乱光を検出する工程と  
、を含む方法。

【請求項14】

前記試料は、前記励起された試料からの弾性及び非弾性散乱光の両方の検出時に、共通のコヒーレント放射線源からの光で励起されることを特徴とする請求項13に記載の方法。  
。

【請求項15】

前記励起の工程は、前記試料からの前記非弾性散乱放射線を検出する工程及び前記弾性散乱放射線を検出する工程中に異なるコヒーレント放射線源で前記試料を励起する工程を含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記試料を励起する工程が、前記試料の状態を変化させながら繰り返されることを特徴とする請求項13～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記状態を変化させながら、前記励起された試料からの前記弾性散乱放射線を検出する工程の結果と前記励起された試料からの非弾性散乱放射線を検出する工程の結果との間の相関を実行する工程をさらに含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記状態が、温度またはpHであることを特徴とする請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記励起された試料からの弾性散乱放射線を検出する工程及び前記励起された試料からの非弾性散乱放射線を検出する工程の結果に基づいて前記試料中の種の化学的性質の変化を前記状態の変化に関連付ける工程をさらに含むことを特徴とする請求項13～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記励起及び検出の工程が、前記試料の製造可能性、安定性、貯蔵寿命、品質管理、品質保証、または製剤のいずれかを評価するために繰り返されることを特徴とする請求項13～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記配置、励起、検出及び除去の工程が、タンパク質懸濁液、生物薬剤または1つ以上の酵素、タンパク質、DNA配列、RNA配列、ワクチン、ウイルス及びウイルス状粒子について行われることを特徴とする請求項13～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記検出された弾性散乱放射線から前記試料の物理的性質を導出する工程及び前記検出された非弾性散乱放射線から試料の化学的性質を導出する工程をさらに含むことを特徴とする請求項13～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記物理的性質を導出する工程が、粒径または多分散値を導出する工程を含み、前記化学的性質を導出する工程が、化学的同定または分子構造の尺度を導出する工程を含むことを特徴とする請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記配置、励起、検出及び除去の工程が、タンパク質について行われ、前記物理的性質を導出する工程が、タンパク質凝集サイズ分布の導出を含み、前記化学的性質を導出する

10

20

30

40

50

工程が、ラマン測定からのタンパク質二次及び三次構造情報の導出を含むことを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記化学的性質を導出する工程が、タンパク質フォールディングもしくはタンパク質変性／再生に関する情報を導出する工程を含むことを特徴とする請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、懸濁粒子の特性を検出するための方法及び装置に関する。

10

[発明の背景]

タンパク質及びタンパク質の大凝集体などの複合体ナノ粒子材料を特徴付けるには多くの異なる方法が存在する。光学顕微鏡は、細胞や高凝集したタンパク質について限られた範囲のサイズや形状の情報を提供可能な比較的安価な手法である。動的光散乱 (DLS)、静的光散乱 (SLS)、またはサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を行うような機器は、多種多様なナノ材料及びナノ微粒子のサイズについてより高解像度の情報を提供できるが、構造または形状情報を提供する能力を欠いている。円偏光二色性 (CD)、ラマン分光法、またはフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法を行うようなより洗練された機器は、タンパク質などの材料についての分子構造及び形態の情報を提供できるが、これらの材料のサイズまたはサイズ分布についての直接的な情報を提供する能力を欠いている。X線結晶学及び多次元核磁気共鳴 (NMR) を形成するような最も高価な機器は、より大きなタンパク質などの複合体ナノ粒子についてかなりの量の構造情報を提供することができるが、これらの機器は、百万ドル以上の費用がかかる上、日常測定または品質保証もしくは品質管理に使用するのに特に有用ということはない。

20

【0002】

本発明は、上述した問題の 1 つ以上に対処することを目的とする。

[発明の概要]

本発明の第 1 の態様によれば、試料の特性を検出するための光学機器が提供され、該光学機器は、

微粒子分散液の試料を保持するための試料セルと、

30

試料セル内の試料を照明するように構成されたコヒーレント光源と、

試料セル内の試料によって弾性的に散乱した光であってコヒーレント光源からの光を受け取りその強度を測定するように配置された光強度検出器と、

試料セル内の試料によって非弾性的に散乱した光であってコヒーレント放射線源からの光を受け取りその波長の範囲を測定するように配置され、構成されたスペクトル光検出器と、を備えている。

【0003】

スペクトル光検出器は、ラマン検出器であってもよい。コヒーレント光源は、レーザであってもよい。光強度検出器は、光子計数検出器であってもよい。

減衰器は、

40

コヒーレント光源と試料セルとの間、

試料セルとスペクトル光検出器との間、及び

試料セルと光強度検出器との間、の 1 つ以上の間に配置されてもよい。

【0004】

減衰器は、第 1 の状態において光強度検出器が受け取った光を所定量減衰し、第 2 の状態においてスペクトル光検出器が受け取った光をそれより少ない量減衰するように切り替え可能に構成してもよい。光強度検出器は、減衰器が第 2 の状態にあるときに光を検出しないように構成してもよい。

【0005】

光学機器は、試料セル内の試料によって非弾性的に散乱したコヒーレント放射線源から

50

スペクトル光検出器への光の選択された範囲の波長を送信するように構成されたフィルタを備えてもよい。そのフィルタはノッチフィルタであってもよい。

#### 【0006】

電子分光検出器は、光源からの入射光に直交する経路に沿って及び／または後方散乱光を検出するための入射光と逆方向の経路に沿って、試料セルから散乱光を受け取るように構成してもよい。

#### 【0007】

特定の実施形態では、コヒーレント放射線源は、第1及び第2のコヒーレント光源を含んでいてもよく、光強度検出器は、第1のコヒーレント光源が発した光に反応し、スペクトル光検出器は、第2のコヒーレント放射線源が発した光に反応してもよい。

10

#### 【0008】

光強度検出器とスペクトル光検出器は共に、試料セル内の試料のある性質が変化する測定期間中に光を受け取り測定するように構成されてもよい。その性質は、例えばpH及び温度の一方または両方以上であってもよい。

#### 【0009】

本発明の第2の態様によれば、微粒子分散液の試料の光学特性を検出する方法が提供され、該方法には、

分析のために試料セル内に試料を配置する工程と、  
コヒーレント光源からの入射光で試料を励起する工程と、  
光強度検出器を用いて、励起された試料からの弾性散乱光を検出する工程と、  
スペクトル光検出器を用いて、励起された試料からの非弾性散乱光を検出する工程と、  
が含まれる。

20

#### 【0010】

試料は、励起された試料からの弾性及び非弾性散乱光の両方の検出時に、共通のコヒーレント放射線源からの光で励起してもよい。

励起の工程は、試料からの非弾性散乱放射線を検出する工程及び弾性散乱放射線を検出する工程時に異なるコヒーレント放射線源で試料を励起する工程を含むことができる。

30

#### 【0011】

試料の状態を変化させながら試料の励起の工程を繰り返すことができる。この方法は、状態を変化させながら、励起された試料からの弾性散乱放射線を検出する工程の結果と励起された試料からの非弾性散乱放射線を検出する工程の結果とを相関させる工程をさらに含むことができる。その状態とは、例えば、温度またはpHであってもよい。

#### 【0012】

この方法は、励起された試料からの弾性散乱放射線を検出する工程及び励起された試料からの非弾性散乱放射線を検出する工程の結果に基づいて試料中の種の化学的性質の変化を状態の変化に関連付ける工程をさらに含んでもよい。

#### 【0013】

励起及び検出の工程は、試料の製造可能性、安定性、貯蔵寿命、品質管理、品質保証、または製剤のいずれかを評価するために繰り返すことができる。

40

配置、励起、検出及び除去の工程は、タンパク質懸濁液、生物薬剤、または、酵素、タンパク質、DNA配列、RNA配列、ワクチン、ウイルス及びウイルス状粒子の1つ以上について行ってもよい。

#### 【0014】

この方法は、検出された弾性散乱放射線から試料の物理的性質を導出する工程及び検出された非弾性散乱放射線から試料の化学的性質を導出する工程をさらに含んでもよい。

物理的性質を導出する工程は、粒径または多分散値を導出する工程を含んでもよく、化学的性質を導出する工程は、ある程度の化学的同定または分子構造を導出する工程を含んでもよい。

#### 【0015】

配置、励起、検出及び除去の工程は、タンパク質について行われてもよいし、物理的性

50

質を導出する工程は、タンパク質凝集サイズ分布を導出する工程を含んでいてもよいし、化学的性質を導出する工程は、ラマン測定からタンパク質二次及び三次構造情報を導出する工程を含んでいてもよい。

#### 【0016】

化学的性質を導出する工程は、タンパク質フォールディングもしくはタンパク質変性／再生についての情報を導出する工程を含むことができる。

本発明によるシステムは、ナノ粒子や、より大きなタンパク質などの他のナノ材料についてかなりの量の構造及び化学情報を、一部のより高価なX線結晶構造解析及び多次元核磁気共鳴（NMR）機器より低費用で提供することができる。これは、既存のDLS/SLSシステムに比較的単純な付属品を付けることで可能になる。いくつかの実施形態では、デュアルモード機器は、単一の放射線源を使用して、弾性及び非弾性散乱の両方についての補足情報を取得することができる。

10

#### 【0017】

本発明の更なる一般的な態様によれば、試料の特性を検出するための光学機器が提供され、該光学機器は、

分析のために試料を保持するための手段と、

試料を励起するための手段と、

励起された試料からの弾性散乱放射線を検出するための手段と、

励起された試料からの非弾性散乱放射線を検出するための手段と、を備える。

20

#### 【0018】

本発明の更なる一般的な態様によれば、試料の特性を検出するための光学機器が提供され、該光学機器は、

試料を保持する容器と、

容器内の試料を照明するために配置された1つ以上のコヒーレント放射線源と、

異なる角度で容器内の試料によって散乱された光であってコヒーレント放射線源からの光を受け取るように配置された複数の散乱検出器と、

容器内の試料によって非弾性的に散乱した光であってコヒーレント放射線源からの光を受け取るように配置された少なくとも1つのスペクトル検出器と、を備える。

20

#### 【0019】

本発明のさらなる一般的な態様によれば、試料の光学特性を検出する方法が提供され、該方法には、

分析のために試料を配置する工程と、

試料に対し非弾性分光測定を行う工程と、

別のタイプの測定を使用して、非弾性スペクトル測定の過去の特性評価に基づいて非弾性スペクトル測定から試料の少なくとも1つの物理的性質に関する情報を導出する工程と、が含まれる。

#### 【0020】

試料に非弾性スペクトル測定を行う工程には、ラマン測定を行う工程が含まれてもよい。

本発明の更なる一般的な態様によれば、試料の特性を検出するための光学機器が提供され、該光学機器は、

40

試料を保持するための容器と、

容器内の試料を照明するように配置された1つ以上のコヒーレント放射線源と、

容器内の試料によって弾性的に散乱した光であってコヒーレント放射線源からの光を受け取るように配置された少なくとも1つの光子計数検出器と、

容器内の試料によって非弾性的に散乱した光であってコヒーレント放射線源からの光を受け取るように配置された少なくとも1つのスペクトル検出器と、を備える。

#### 【0021】

本発明のさらなる一般的な態様によれば、試料の光学特性を検出する方法が提供され、該方法には、

50

分析のために試料を配置する工程と、  
試料を励起する工程と、  
励起された試料からの弾性散乱放射線を検出する工程と、  
励起された試料からの非弾性散乱放射線を検出する工程と、  
試料を除去する工程と、が含まれる。

## 【0022】

## [詳細な説明]

本発明を、実施例により、添付の図面を参照しながら、以下にさらに詳細に記載する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0023】

10

【図1】本発明による例示的なシステムのための基礎として使用することができる従来技術のDLS/SLSの測定システムのブロック図である。

【図2】図1のDLS/SLS測定システムに基づく本発明に係るデュアルモード散乱システムの例示的な実施形態のブロック図である

【図3】図2のシステムを用いて得られた61°Cでの50mg/mlのBSA溶液についての例示的なラマンスペクトルである。

【図4】図2のシステムを用いて得られた61°Cでの50mg/mlのBSA溶液についての例示的なサイズ分布プロットである。

【図5】図2のシステムで得られた様々な温度範囲のラマン及びDLSサイズ測定を組み合わせた例示的なプロットである。

20

【図6】レーザ回折測定システムに基づいた代替の実施形態に係るデュアルモード散乱システムの例示的な実施形態のブロック図である。

【図7】滴定中のBSAの試料についてのpHの関数としてのz平均径及びラマンアミドIII強度(1297cm⁻¹)のプロットを示すグラフである。

【図8】BSA 10mg/ml溶液についてのラマンシフト測定値及びDLSサイズ測定値との相関関係のプロットである。

【図9】10mg/mlのBSA及びICG溶液についてのラマンシフトの関数としてのラマン強度のプロットである。

【図10】DLS多分散及びサイズの相関関係と共に、BSA(図10a)及びIGG(図10b)溶液についてのラマンシフトの関数としてのラマン強度のプロットを示す。

30

## 【発明を実施するための形態】

## 【0024】

本発明によるシステムは、ゼロから構築することができる、または既存の既製の光学機器を基に構築することができる。このようなシステムは、例えば、図1に概略的に示されているゼータサイザーナノ粒子測定システムなどの光学機器システム100を基に構築することができる。ゼータサイザー粒子計測器品目は、英国マルバーンのマルバーン社(Malvern instruments Ltd)から入手可能であると共に、その内容が参照により本明細書に組み込まれるWO 2010/04182にさらに詳細に記載されている。

## 【0025】

40

粒子測定システムシステム100は、レーザなどのコヒーレント放射線源101を含んでいる。このレーザ101の出力は、必要に応じて1つ以上の介在リフレクタ110a、110bを介して、試料セル103を通って、減衰器102に、そしてさらに送信モニタ104に提供される。古典90°光学素子106及び/または後方散乱光学素子105は、試料セル103内の浮遊粒子試料からの散乱放射線を受け取り、光源101から受け取られかつ試料セル103内の試料によって弾性的に散乱した光の強度を測定する。これらの光学素子105、106の組の一方または両方について受け取られた散乱放射線は、光ファイバ107を介してアバランシェフォトダイオード(APD)108に中継することができる。フォトダイオード108の出力は、DLSの場合には相関器109を使用して相関させることができ、SLSの場合には積分器を使用して統合することができる(図示

50

せず)。

#### 【0026】

図2及び図3を参照すると、図1のシステムシステム100を修正して本発明の一態様によるデュアルモード検出を実現する1つのアプローチは、後方散乱路に誘電体フィルタ211を追加することである。この誘電体フィルタ211は、より波長の長い光をラマン検出器などの分光検出器212に中継する。ラマン検出器212は、1つ以上のレーザノックチフィルタ213、回折格子214、電荷結合素子(CCD)などの二次元検出器215、を含むことができる。ラマン検出は、後方散乱路で行われるように、図2に示されているが、古典90°経路におけるピックオフ点216を含む1つ以上の複数の異なる角度からも、あるいは二者択一的に、行われることができる。従って、一般的な態様において、分光検出器212は、後方散乱を検出するために、入射光に直交する経路に沿って及び/または入射光と逆の経路に沿って試料セルから散乱光を受け取るように構成されてもよい。

10

#### 【0027】

動作中、図2のシステム200におけるレーザ101は、DLS及びラマンの両方の測定に使用される。DLS測定中には、APD108(図1)が飽和しないように減衰器102をオンにする。ラマン測定中には、減衰器102をオフにし、高レベルの照明をラマン測定に使用できるようにする。DLS及びラマン測定を交互に行うことにより、システム200は、弾性及び非弾性散乱の両方の情報を取得することができる。これらの2つのタイプの検出は、特定の懸濁液に関する補足情報を提供することができる。例えば、DLS測定は、微粒子の凝集についての情報を提供することができる一方、ラマン測定は、凝集の原因について、または個々の粒子の構造が変化したかどうかの情報を提供することができる。これは、凝集するとその有効性を失い、さらには有害となることもある深刻な問題を生むこともある、バイオ医薬品の凝集を調査する際に役立つ。機器200は、ある粒子懸濁液を別の粒子懸濁液と比較するために使用することができる。これは、例えば、ある会社からの生物医薬品製剤を別の会社により製造されたバイオシミラーと比較する場合に有用であり得る。

20

#### 【0028】

これらのタイプの補足情報を取得するように構成されたシステムを構築する方法は他に多数存在する。例えば、システムは、別々の光路を中心に構成された異なる測定用の別々のソースを使用して構築することができる。システムは、また、光学素子及び/または、移動ミラーまたはチョッパーなどの異なる選択またはスイッチング素子の異なる配置を採用することで、両方のタイプの測定を行うことができる。一実施形態では、例えば、減衰器102は、光ファイバ107の経路内に配置することができ、DLS及びラマン測定を同時にを行うことを可能にする。

30

#### 【0029】

図3～図5を参照すると、図2のシステム200は、効果的に同時に同じ試料についてのラマンスペクトル301(図3)などのスペクトル情報、及びサイズ分布401(図4)などの物理的性質情報を提供するように動作させることができる。これらの測定は、例えば、試料温度、濃度、pHまたは組成などの、異なる条件下で連続して行うことができる。図5は、タンパク質溶液についての温度(°C)の関数としてのDLS平均サイズデータ501(nm単位、左側の目盛)及びラマンシフトデータ502(cm<sup>-1</sup>単位、右側の目盛)のプロットを示す。温度が上昇するにつれて、DLSサイズデータは、タンパク質の凝集を示す粒径の増加を示し、ラマンシフト情報は、この場合にはヘリックスの喪失として解釈されるタンパク質における構造変化を示す。従って、一般的な態様においては、光強度検出器及びスペクトル光検出器の両方が、試料セル内の試料の特性が変化する測定期間に光を受け取り測定するように構成されている。試料の特性は、試料のpHまたは温度を変化させたりすることによって意図的に変更されてもよいし、または試料が測定されている間の進行中の反応の結果として変化してもよい。このような二重測定の利点が、DLS及びラマン測定を交互に行うことにより、同じ測定期間にわたって同じ試料

40

50

に対して異なる測定を行うことがある事にあるのは明らかである。測定は、手動で行うことができる、あるいは、例えばx-yステージのような、標準的なロボットローディングシステムを用いてまたは自動化ピッティングシステムを用いて自動的に行われてもよい。

#### 【0030】

サイズ分布または化学情報などの測定から情報を導出するために、本発明の実施形態に係る光学機器システムは、記憶されたプログラム命令がプロセッサ上で実行される汎用コンピュータのプラットフォーム上で実行されている特殊目的のソフトウェアプログラムに関連して実装されてもよい。システムはまた、同じ機能を達成するために専用ハードウェアを用いて、全体的にまたは部分的に実装されることもできる。システムは、例示の目的で示された一連のモジュール及び工程に分解することができる一方で、異なる方法でそれらを組み合わせる及び/または分割することで異なる内訳を得ることも可能であることが当業者には認識されるだろう。

10

#### 【0031】

図6を参照すると、粒子のデュアルモード特性化への別のアプローチは、ラマン及びレーザ回折測定を同時にを行うことである。レーザ回折の技術は、レーザビームを通過する粒子がそれらのサイズに直接関係する角度で光を散乱させるという原理に基づいている。粒径が減少するにつれて、観測された散乱角が対数的に大きくなる。観察された散乱強度も粒径に依存し、粒子の断面積に関連してほぼ減少する。したがって、大きな粒子が狭い角度で高強度の光を散乱させる一方で、小さな粒子はより広い角度ではあるが低強度で光を散乱させる。レーザ回折システム内で行われる主要な測定は、研究下の粒子から光散乱データを取り込むことである。

20

#### 【0032】

本発明のこの態様によるシステムは、ゼロから構築することができる、または既存の既製の光学機器を基に構築することができる。一実施形態では、このようなシステムは、英國マルバーンのマルバーン社から入手可能であるマスター サイザー 3000 粒径分析器を基に構築することができる。図6に概略的に示されている例示的なシステム300は、固定波長で強いコヒーレント光の発生源を提供するための、任意の減衰器602を備えた赤色レーザ601などのコヒーレント光源を備える。青色レーザ621などの任意の第2のコヒーレント光源を設けてもよい。システム300は、公知の再生可能な分散状態において、好ましくは、粒子604の均一な流れとして、入射レーザビームを介して試験下の材料を通過させるように構成された試料セル603などの試料提示システムをさらに含む。

30

#### 【0033】

焦点面検出器605aと大きな角度検出器605bのアレイとを含む最初の一連の検出器は、試料セル603中の分散粒子による入射光の散乱によって広範囲の角度にわたり生成された光パターンを測定するために設けられている。第2の一連の検出器606、612は、試料セル603からの後方散乱光を測定するため、またラマン検出のために設けられている。誘電体フィルタ611は、後方散乱光路の1つに配置することができ、フィルタ611は、ラマン検出器612のような分光検出器により波長の長い光を中継するように構成されている。ラマン検出器612は、1つ以上のレーザノッチフィルタ613、回折格子614、電荷結合素子(CCD)のような二次元検出器615、を含むことができる。ラマン検出は、後方散乱経路の1つで行われるように示されているが、上記図2の実施形態のように、古典90°経路におけるピックオフ点を含む1つ以上の複数の異なる角度からも、あるいは二者択一的に、行われることができる。

40

#### 【0034】

動作中、図6のシステム300内のレーザ601(及び/または621)は、レーザ回折とラマン測定との両方に使用される。レーザ回折測定時に、散乱検出器が飽和しないようにするために減衰器602をオンにする。ラマン測定時に、減衰器602をオフにし、高いレベルの照明をラマン測定で使用できるようにする。レーザ回折及びラマン測定を交互に行うことにより、システムは、特定の懸濁液についての補足情報を取得することができる。

50

きる。例えば、レーザ回折測定は、試料の物理的性質についての情報を提供することができ、ラマン測定は、試料の化学組成についての情報を提供することができる。

#### 【0035】

他の実施形態と同様に、これらの補足情報を取得するシステムを構築する方法は他に多く存在する。例えば、システムは、別々の光路の中心に構成された異なる測定のための別々のソースで構築されてもよい。システムはまた、光学素子及び／または、移動ミラーまたはチョッパーなどの異なる選択またはスイッチング素子の異なる配置を採用することで、両方のタイプの測定を行うことができる。一実施形態では、例えば、減衰器 602 は、レーザ回折及びラマン測定を同時に行われることができるように配置されてもよい。

#### 【0036】

測定中にアクセス可能なサイズ範囲は、散乱測定の角度範囲に直接関係する。モデムレーザ回折機器は、約 0.02 度から 135 度までの測定を行う。検出器 605 が、小さな角度でより密接に、広い角度でより広く間隔をあけてグループ化されている対数検知配列により、最適な感度が得られる。検知配列はまた、等容量の異なるサイズの粒子が、同様の測定された信号を生成するように設定することができる。このアプローチでは、測定散乱角が大きくなるにつれて、検出器のサイズが大きくなる。

#### 【0037】

同時測定が行われた後に、両測定間の関係を確立することができる。これは、試料へのさらなる洞察の提供を可能にする及び／または一回の測定により、別の他のものを測定に通常使用できるという情報の導出が可能になる。このアプローチは、次の例に関連してより詳細に記載されている。

#### 【0038】

##### [例 1]

図 7 を参照すると、異なる pH レベルのウシ血清アルブミン (BSA) の試料についてデュアルモードのラマン及び DLS 測定が行われた。pH が増加するにつれて、DLS 測定値 701 は、粒径の変化を示す傾向を示した。それと同時に、ラマン測定値 702 もまた、DLS 測定値の変化に相関するように変化した。DLS 及びラマン測定値両方の変化は、pH の変化から生じるタンパク質のアンフォールディングによって引き起こされたと考えられる。このアンフォールディングは、分子サイズの増大と、アンフォールドするにつれてタンパク質の二次構造に測定可能な変化もまた引き起こしていると考えられる。

#### 【0039】

##### [例 2]

図 8 ~ 図 10 を参照すると、異なる温度レベルのウシ血清アルブミン (BSA) の試料についてデュアルモードのラマン及び DLS 測定が行われた。温度が上昇するにつれて、DLS 測定値及びラマン測定値 801 (図 8) が採られ、記録された。これら二つのセットの値は相関しており、いかに上手くサイズ変更が、異なる波長でのラマンスペクトルの変化と相関しているかを示すプロット (点線 802) を生成した。実験は、その後、免疫グロブリン G (IgG) を用いて繰り返された。

#### 【0040】

温度調整は、実験のこの最初の部分で行われたが、pH などの他の物理的性質は変化させることができる。DLS サイズパラメータがこの例で使用される一方、試料中のサイズの分布を測定する多分散性などの他の DLS パラメータも使用することができる。

#### 【0041】

図 9 に示すように、化学構造上の特徴は、化合物の異なる部分のラマンスペクトルに対応している。より高いラマンシフトでの第 1 の領域 901 内の大きなピークは、例えば、BSA 及び IgG の両方のバックボーンに対応し、幾分低いシフトでの第 2 の領域 902 内の小さなピークは、芳香族側鎖に対応している。この知識は、物理的性質が分子に影響を与える方法を知る上で手掛かりとなり得る。

#### 【0042】

図 10a 及び図 10b に示されるように、DLS とラマン測定間の相関プロットは、異

10

20

30

40

50

なる波長でより強い相関を示している。図10aは、BSAについてのラマン測定値1001aのプロット、DLS多分散性1002a及びサイズ1003aの相関を示し、図10bは、IgGについてのラマン測定値1001b、DLS多分散性1002b及びサイズ1003bの相関を示す。これらの相関を対応する分子の特徴と一致させ、どの特徴が物理的な変化による影響を受けた可能性があるかを決定することができる。この技術を使用して、例えば、タンパク質が、pHの変化よりも、温度の変化に応じて異なって変性及び/または凝集することを示すことができる。

#### 【0043】

例えば、温度、塩濃度、薬物または他の化学的濃度、イオン強度、及び/または変性のレベルなどの他のタイプの変化についての実験も行うこともできる。これらのタイプのデュアルモード実験は、異なる材料の他のタイプの化学的及び物理的性質を決定するために実行することもできる。例えば、ラマン測定は、試料の状態を変化させつつ、試料の結晶化度と試料のサイズの検出のために使用されるレーザ回折とを検出するために使用することができる。これは、試料が異なる条件下において示す結晶質、非晶質、及び/または多型の特性の程度をより深く理解するのを可能にする。この種の理解により、ラマン測定を行うことで、サイズ、形状、直径、またはアスペクト比など、特定のシステムにおける試料の物理的性質に関する情報を得ることが可能である。また、そうでなければDLSを用いて測定される、タンパク質ゼータ電位、電荷または等電点などの物理化学的性質を含む、他の特性について知ることも可能である。この相互測定の原理は、異なるスケジュールに従ってデュアルモードシステムにおける任意のタイプの測定間で使用することができる。品質管理の状況では、例えば、試験中の材料は両方の測定技術を用いて完全に特徴付けられるが、通常の試験は、それらのうちの一方のみを用いて行われてもよい。通常の試験のために選択された技法は、あまり高価でなく、より速く、よりスケーラブル、またはより信頼性が高いといった種々の理由により、選択されてもよい。

10

20

30

#### 【0044】

本発明によるシステムは、研究、品質管理、製剤開発、安定性試験、製造試験、効率試験、放出試験、及び創薬を含む、多種多様なアプリケーションに適用可能である。システムはまた、生物薬剤、小及び大分子タンパク質、賦形剤、及び顔料及び他の工業粉末などの、様々な材料に適用可能である。

#### 【0045】

本発明をいくつかの具体的な実施形態に関連して説明した。しかしながら、本発明の範囲内に入るものと考えられる多数の変更も当業者には明らかであるはずである。したがって、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることが意図されている。加えて、特許請求の範囲の提示の順序は、必ずしもクレーム中の任意の特定の用語の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【図1】

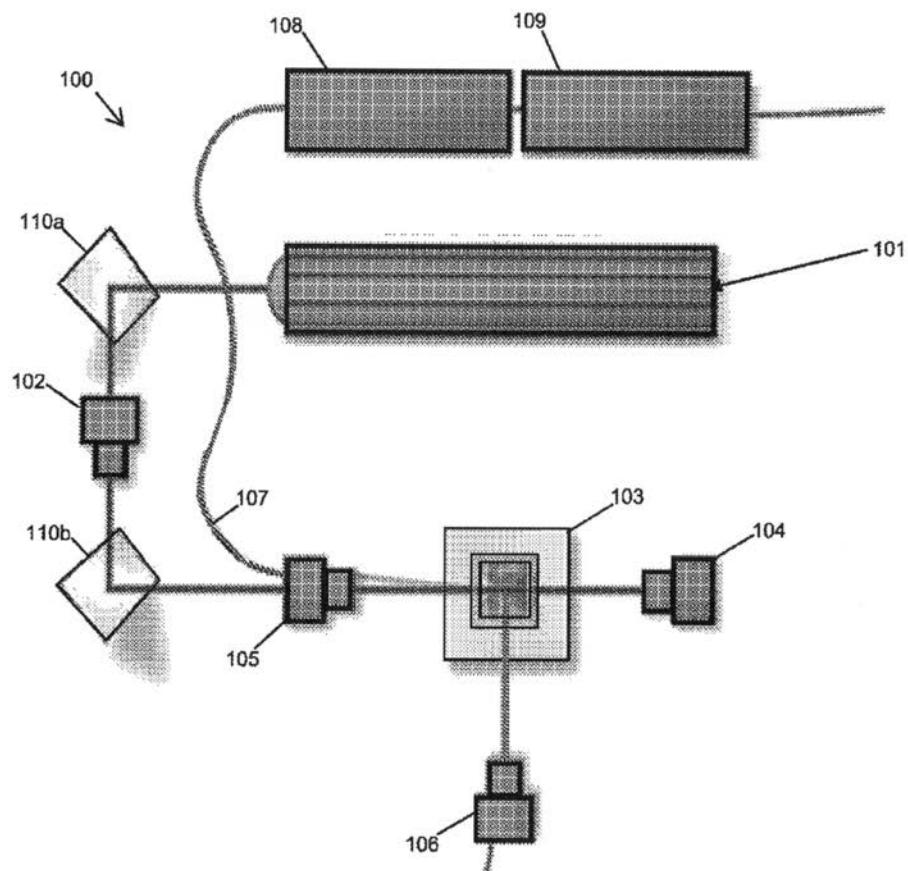


Fig. 1

従来技術

【図2】

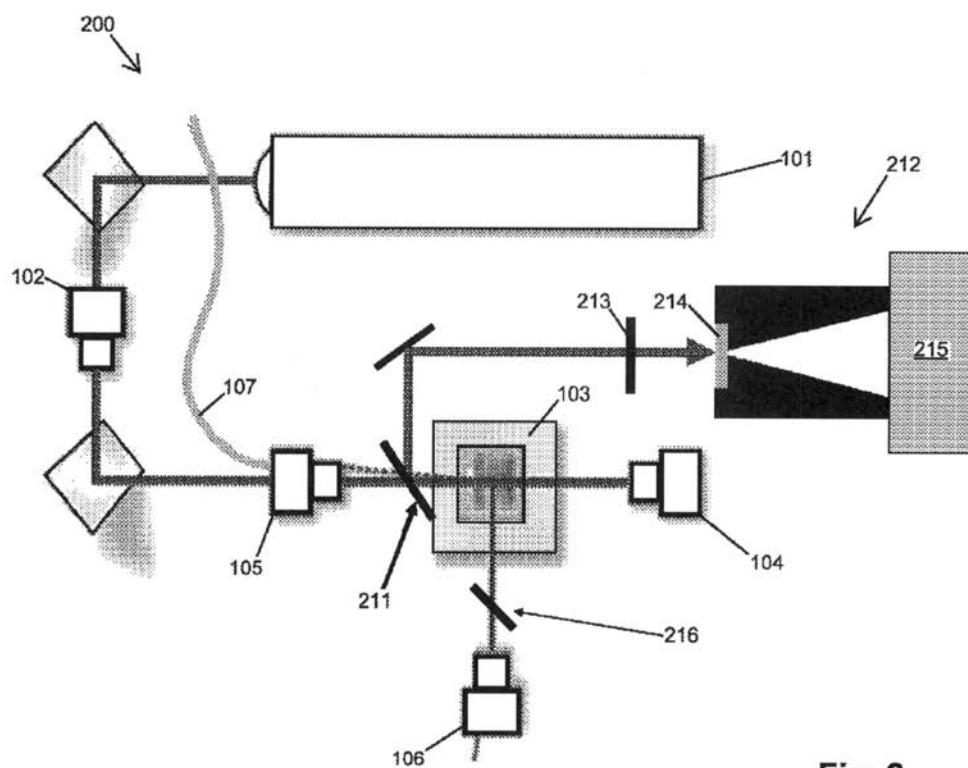


Fig. 2

【図3】

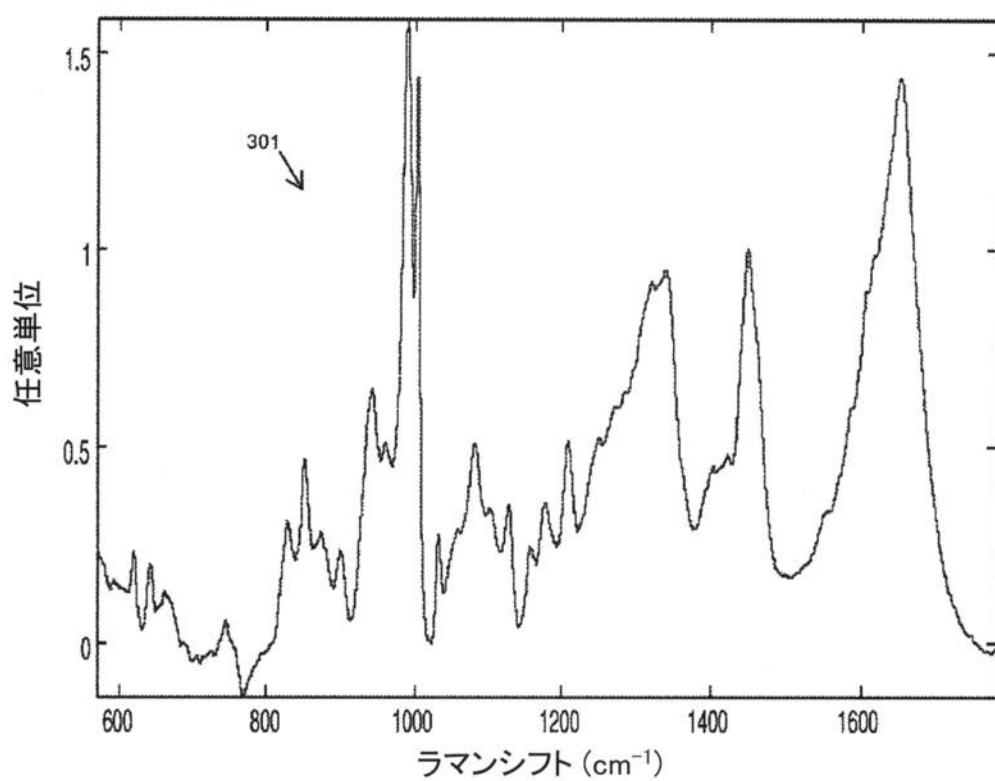


Fig. 3

【図4】

## 強度によるサイズ分布

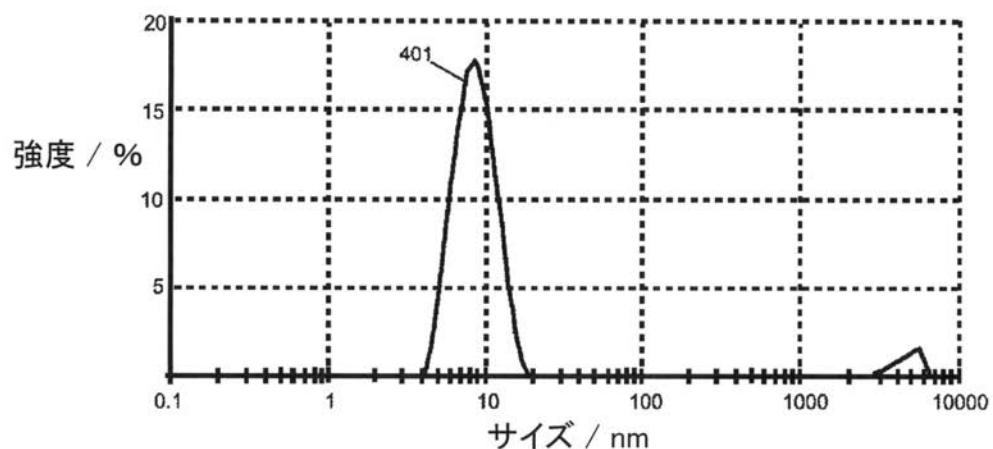


Fig. 4

【図5】

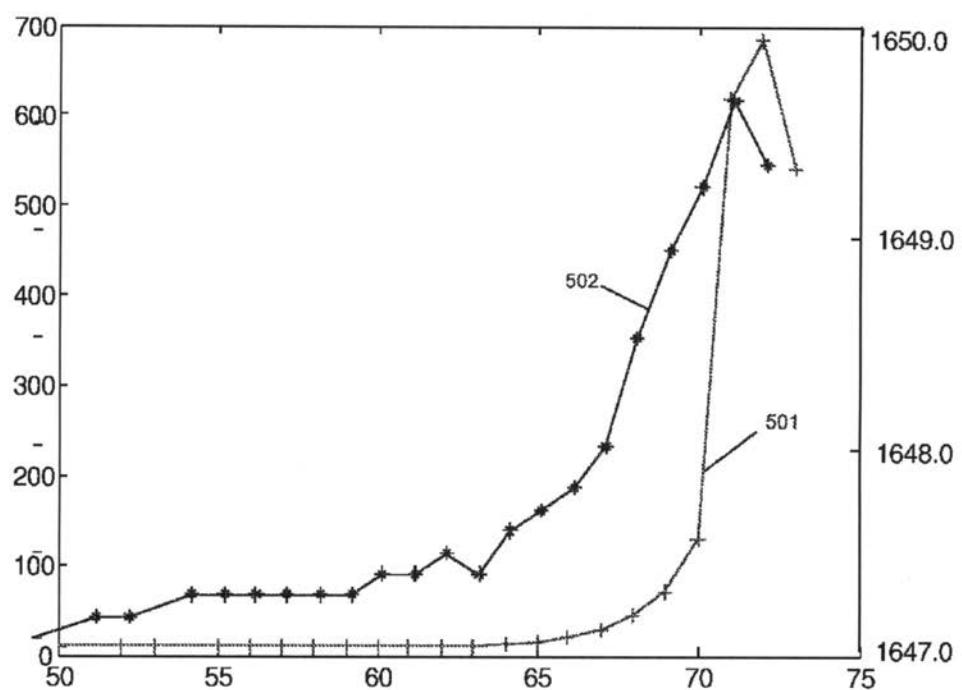


Fig. 5

【図6】

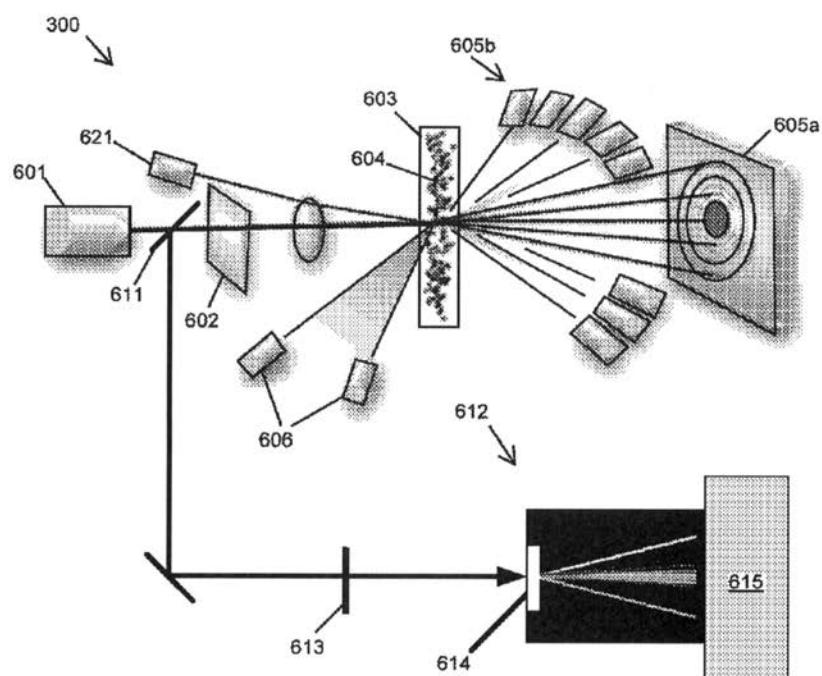


Fig. 6

【図7】

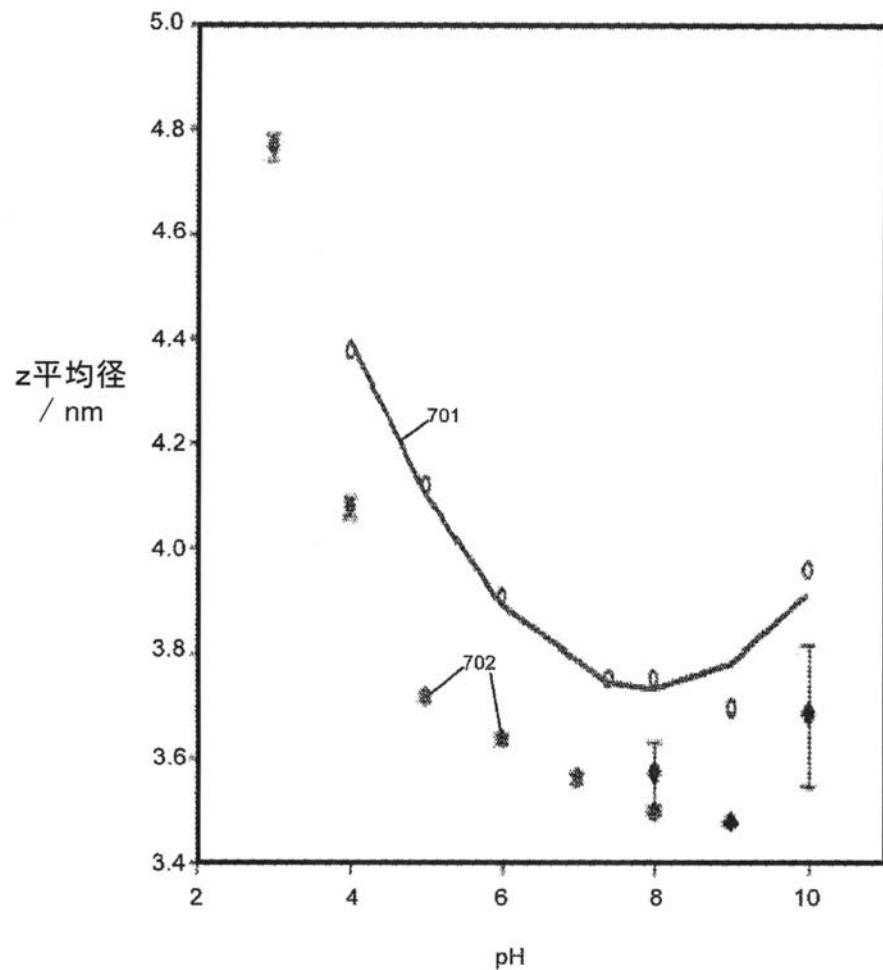


Fig. 7

【図 8】

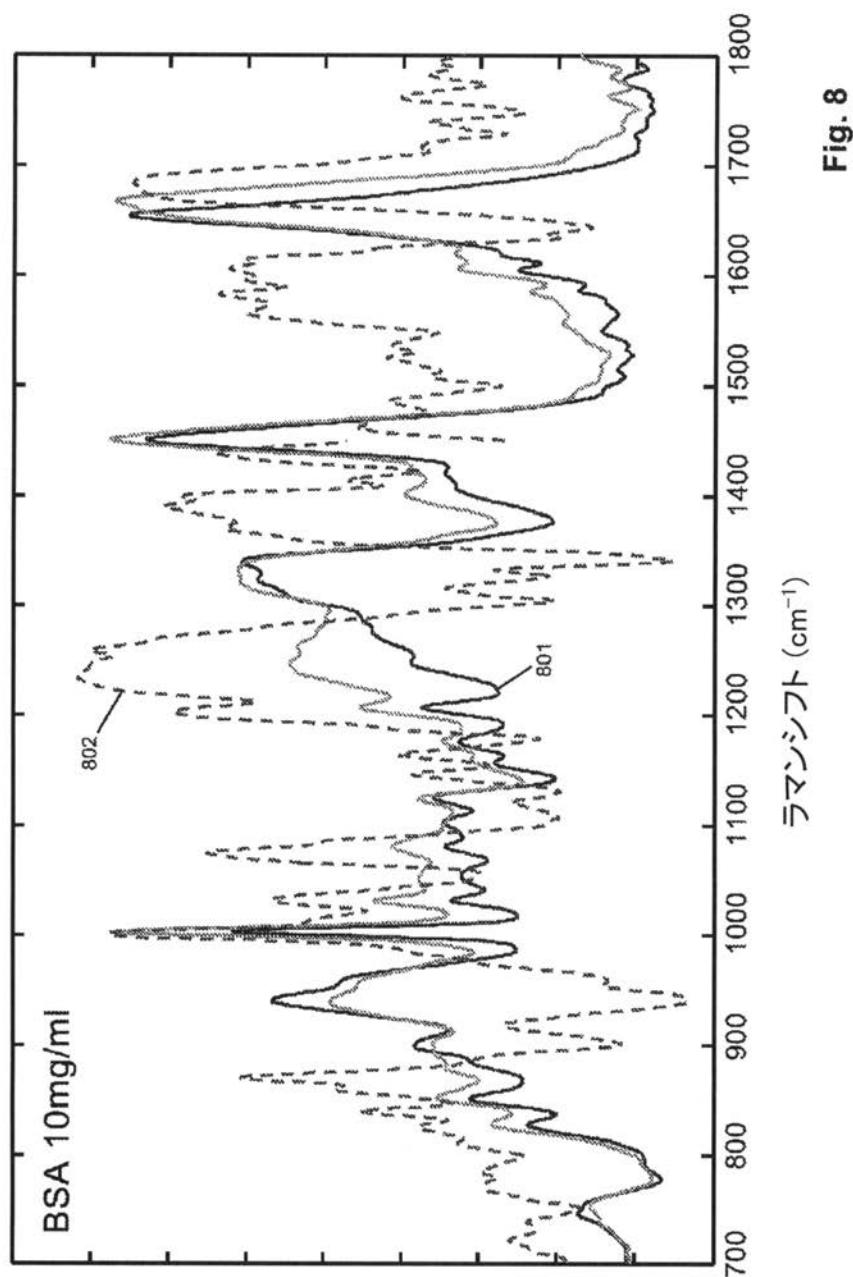
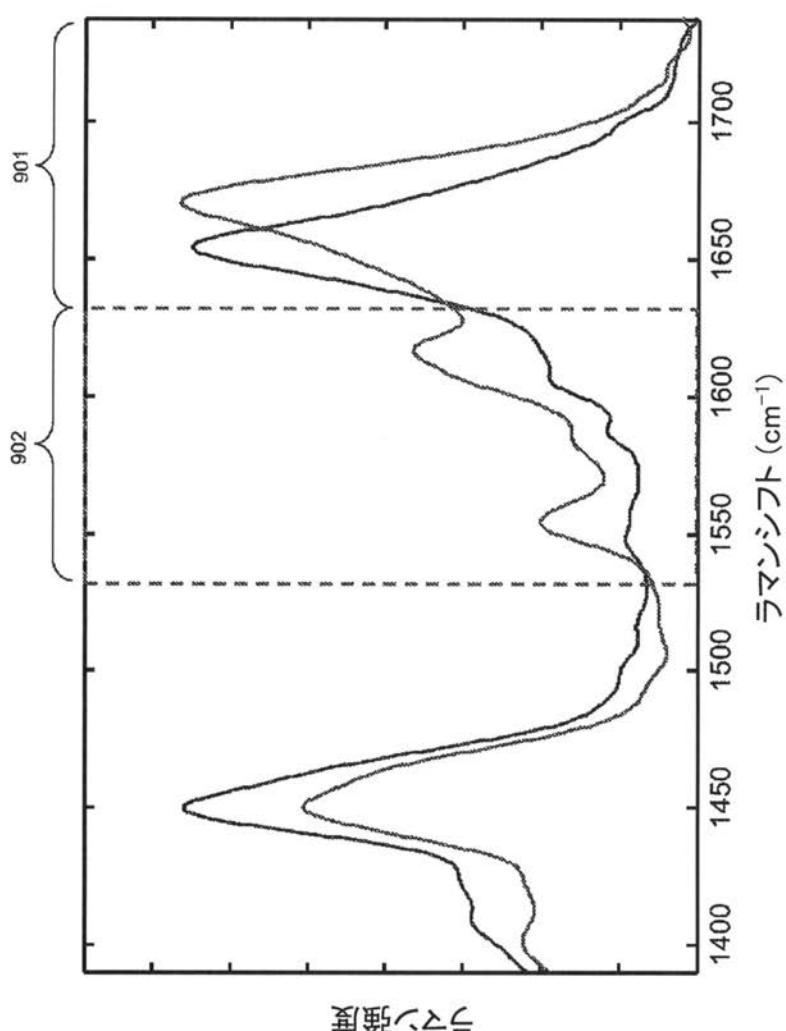


Fig. 8

【図9】

Fig. 9



【図 10】

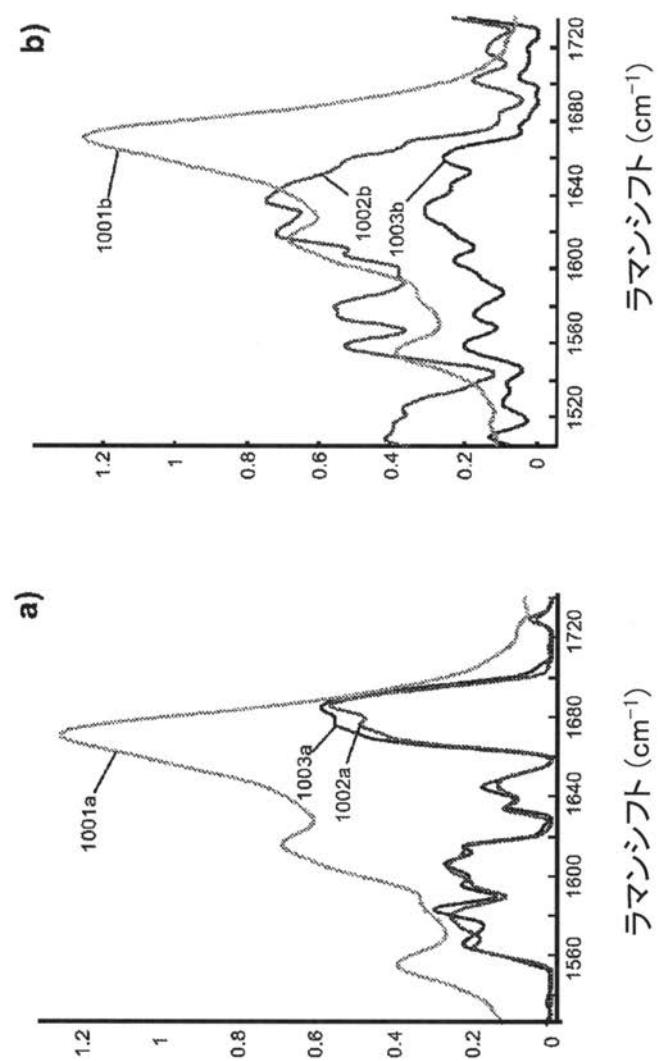


Fig. 10

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2012/052019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. G01N15/14 G01N21/51 G01N21/65 G01N15/02  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIXIN PENG ET AL: "Elastic and Inelastic Light Scattering from Single Bacterial Spores in an Optical Trap Allows the Monitoring of Spore Germination Dynamics", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 81, no. 10, 15 May 2009 (2009-05-15), pages 4035-4042, XP55046278, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac900250x page 2, last paragraph - page 3, line 15; figure 1	1-9,11, 13,14
Y	----- -/-	10-12, 15-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier application or patent but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

4 December 2012

10/12/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Consalvo, Daniela

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/052019
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Anonymous: "Raman Microspectrometer", Application Note 42, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 1-8, XP55046279, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://assets.newport.com/webDocuments-EN/images/14075.PDF">http://assets.newport.com/webDocuments-EN/images/14075.PDF</a> [retrieved on 2012-11-30] page 3; figure 1 ----- EP 2 017 600 A2 (HORIBA LTD [JP]) 21 January 2009 (2009-01-21) paragraph [0020] - paragraph [0024]; figure 2 ----- BRANCA C ET AL: "Swelling processes in aqueous polymer solutions by PCS and Raman scattering", JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 482-483, 25 May 1999 (1999-05-25), pages 503-507, XP027350654, ISSN: 0022-2860 [retrieved on 1999-05-25] abstract page 507, column 1, line 14 - line 25 -----	3-5
Y		10,15
Y		11,12, 15-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2012/052019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2017600 A2	21-01-2009	CN 101349631 A EP 2017600 A2 JP 2009025036 A US 2009073438 A1	21-01-2009 21-01-2009 05-02-2009 19-03-2009

---

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

F ターム(参考) 2G043 AA06 CA04 DA06 DA08 EA03 HA05 JA03 JA04 KA02 KA09  
LA03