

(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2018-508793

(P2018-508793A)

(43) 公表日 平成30年3月29日 (2018.3.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 30/80 (2006.01)</b>	G O 1 N 30/80	F
	G O 1 N 30/80	E

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2017-559909 (P2017-559909)	(71) 出願人	598165611
(86) (22) 出願日	平成28年2月5日 (2016.2.5)		マックス・ブランク・ゲゼルシャフト・ツ
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月5日 (2017.10.5)		ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/052490		ャフテン・エー・ファオ
(87) 国際公開番号	W02016/128316		ドイツ連邦共和国デー 8 0 5 3 9 ミュ
(87) 国際公開日	平成28年8月18日 (2016.8.18)		ンヘン, ホフガルテンシュトラーセ 8
(31) 優先権主張番号	15154374.1	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成27年2月9日 (2015.2.9)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴

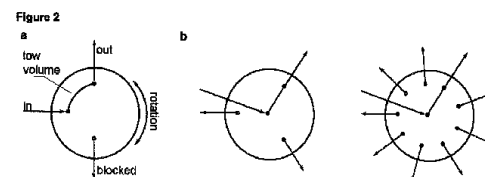
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロマトグラフィー適用におけるスウェプトボリュームおよびデッドボリュームを最小限にするための手段および方法

## (57) 【要約】

本発明は、フローセクター、例えばロータリー弁と組み合わされたクロマトグラフィーカラムを含む、バンドの広がりおよび分離された画分の再混合を防ぐためのデバイス、ならびに関連する方法に関し、ここで、前記のフローセクターは、前記のカラムの遠位端に、ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボリュームの合計が  $10 \mu\text{L}$  未満であるように接続されている。好ましくは、カラムは、ロータリー弁の入口中に直接差し込まれており、試料は、出口において分画される。

【選択図】 図 2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下：

- (a) クロマトグラフィーカラム；および
- (b) フローセクター

を含む、またはそれからなるデバイスであって、前記のフローセクターが、前記のカラムの遠位端に、ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボリュームの合計が  $10\ \mu\text{L}$  未満であるように連結されているデバイス。

## 【請求項 2】

以下：

- (a) クロマトグラフィーカラム；および
- (b) フローセクター

を含む、またはそれからなるキットであって、前記のカラムおよび前記のフローセクターが、ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボリュームの合計が  $10\ \mu\text{L}$  未満であるような前記のフローセクターの前記のカラムの遠位端への接続のために設計されているキット。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載のキットであって、さらに、請求項 1 に記載のデバイスの組み立てに関する指示を含む説明書を含むキット。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載のデバイスまたは請求項 2 もしくは 3 に記載のキットであって、前記のクロマトグラフィーカラムが、

- (a) 空であり；もしくは
- (b) クロマトグラフィー材料で充填されており；

かつ/または

$2\text{ mm}$  未満の；好ましくは  $250\ \mu\text{m}$  以下の；もしくは  $200\ \mu\text{m}$  以下の内径を有し、

かつ/または

$2\text{ mL}$  以下、好ましくは  $100\ \mu\text{L}$  以下の容積を有する、デバイスまたはキット。

## 【請求項 5】

請求項 4 (b) に記載のデバイスまたはキットであって、前記のクロマトグラフィー材料が、逆相、イオン交換、順相、親水性相互作用、親和性およびサイズ排除材料から選択される、デバイスまたはキット。

## 【請求項 6】

請求項 1、4 もしくは 5 のいずれか 1 項に記載のデバイス、または請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のキットであって、前記のセクターが、 $n$  方ローター弁であり、 $n$  が、好ましくは 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 または 24 である、デバイスまたはキット。

## 【請求項 7】

請求項 1 もしくは 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のデバイス、または請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のキットであって、前記のカラムおよび前記のセクターの間の接続が、

(a) ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボリュームの合計が、 $1\ \mu\text{L}$  未満、 $500\text{ nL}$  未満、 $200\text{ nL}$  未満、 $100\text{ nL}$  未満、 $50\text{ nL}$  未満、 $40\text{ nL}$  未満、 $30\text{ nL}$  未満、 $20\text{ nL}$  未満もしくは  $10\text{ nL}$  未満であるような接続であり；

かつ/または

- (b) 以下：

(i) 好ましくはねじ式継手もしくはフェルールを用いて前記のカラムを前記のセクターの入口の中に直接差し込むか；もしくは

(ii) 好ましくはねじ式継手もしくはフェルールを用いて前記のカラムを検出器、

10

20

30

40

50

例えば紫外 / 可視セルの中に直接差し込み ; そして前記の検出器を前記のセレクターの入口の中に直接差し込む ;

により実施される、デバイスまたはキット。

【請求項 8】

1 種類以上の分析物の分離のための、請求項 4 ( b ) または 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のデバイスまたはキットの使用。

【請求項 9】

試料を分析する方法であって、前記の方法が、以下の工程 :

( a ) 請求項 4 ( b ) または 5 ~ 7 に記載のデバイスを用いて前記の試料の第 1 クロマトグラフィー工程を実施し、ここで画分が収集される ;

を含む方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、前記の画分が、連結された画分を収集するために連結される方法。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載の方法であって、さらに、以下の工程 :

( b ) 請求項 4 ( b ) または 5 ~ 7 に記載のデバイスを、前記の第 1 クロマトグラフィー工程から得られた画分と共に、または前記の第 1 クロマトグラフィー工程から得られた連結された画分と共に用いて第 2 クロマトグラフィー工程を実施し、ここで、画分が収集され ; そして場合により

( c ) 請求項 4 ( b ) または 5 ~ 7 に記載のデバイスを、それぞれの先行するクロマトグラフィー工程から得られた画分と共に、またはそれぞれの先行するクロマトグラフィー工程から得られた連結された画分と共に用いて 1 以上のさらなるクロマトグラフィー工程を実施し、ここで、画分が前記の 1 以上のさらなるクロマトグラフィー工程において収集される ;

を含む方法。

【請求項 12】

請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記の第 1 クロマトグラフィー工程に関して、および / または前記の第 2 クロマトグラフィー工程に関して用いられるクロマトグラフィー材料が、逆相材料である方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、前記の第 1 クロマトグラフィー工程に関して、および前記の第 2 クロマトグラフィー工程に関して用いられるクロマトグラフィー材料が、逆相材料であり、第 1 および第 2 クロマトグラフィー工程の一方が、中性またはアルカリ性条件下で、好ましくは 7 ~ 10 の pH で達成され、他方が、酸性条件下で、好ましくは 1 ~ 4 の pH で達成される方法。

【請求項 14】

請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記の第 1 クロマトグラフィー工程が、移動相調節剤の存在下で達成され、前記の移動相調節剤が、好ましくはトリフルオロ酢酸またはトリエチルアミンである方法。

【請求項 15】

請求項 9 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法であって、さらに、以下の工程 :

( d ) 1 以上の画分の質量分析、前記の画分は、前記の第 1 クロマトグラフィー工程ならびに / または存在する限りにおいて前記の第 2 および / もしくは前記のさらなるクロマトグラフィー工程 ( 単数または複数 ) から得られる ;

を含む方法。

【請求項 16】

請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記のデバイスに含まれるフローセレクターが、検出器により制御され、前記の検出器が、好ましくは紫外 / 可視セルまたは質量分析計である方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

請求項 9 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記の試料が、ペプチド、ポリペプチド、脂質および / または糖類を含み、またはそれからなり、前記のペプチドが、好ましくはタンパク質分解性の消化、好ましくはトリプシン消化の結果である方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、(a) クロマトグラフィーカラム ; および (b) フローセクターを含む、またはそれからなるデバイスに関し、ここで、前記のフローセクターは、前記のカラムの遠位端に、ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボリュームの合計が  $10 \mu\text{L}$  未満であるように接続されている。

10

## 【0002】

本明細書において、特許出願および製造業者の説明書を含むいくつかの文献が、引用されている。これらの文献の開示は、本発明の特許性に関連するとは考えられないが、参照により本明細書にそのまま援用される。より具体的には、全ての参照される文献は、それぞれの個々の文献が具体的かつ個々に参照により援用されると示された場合と同程度まで、参照により援用される。

## 【背景技術】

## 【0003】

分画技術は、多くの科学研究および生産プロセス、例えば化学または生物学において見られる科学研究および生産プロセスにおいて用いられている。分画の目的は、対象の試料の複雑性を低減すること、または精製し、非特異的化合物を枯渇させることである。ほとんどの分画技術は、所望の化合物を試料の他の含有物から区別する化学的および / または物理的特性に基づく。特に、クロマトグラフィーシステム、例えば液体クロマトグラフィー (LC) は、直接的な分析のための、またはさらなる処理のための試料の分画および試料の収集のために用いられている。クロマトグラフィー分画の分画効率、主にクロマトグラフィーマトリックスの化学的性質に依存する (Meyer, Practical High-Performance Liquid Chromatography (2004))。しかし、特にポストカラムスウェプトボリュームおよびデッドボリュームが、乱流および分離された化合物の逆混合に寄与し、それにより分画性能を低下させる可能性がある。

20

30

## 【0004】

特に、高速 LC システムが、優秀な分画効率のために適用されており、スウェプトボリュームおよびデッドボリュームは、適用に対して有害であり得る。典型的には、増大した流速、ゼロデッドボリューム接続、および細く短い管類が、逆混合の機会および期間を減少させるために用いられる。しかし、適用によっては、長い管類が、時には避けられないこともあると考えられ、より小さい内径は、高い背圧をもたらし得る。例えば、LC 分画システムと共に用いられる現状技術のフラクションコレクターシステムは、画分が収集されるバイアルに達するための長い管類を有する必要がある。これらのフラクションコレクターは、典型的には管類を試料が収集されるチューブの上または内側に配置する X - / Y - ロボットアームまたは収集板からなる (図 1)。空間および管類の長さの制限は、従来の分画収集システムに内在する問題である。

40

## 【0005】

分画の特定の分野は、試料を分画するために様々な直交する化学を用いることにより優秀な分画を達成する多次元分画である。これらの方法は、高度に類似した化合物を含む非常に複雑な試料が分画されるべきである場合に、特に興味深い。その次元は、一般には画分を異なる物理化学的特性により分離するように選択される。例えば、第 1 次元としてのイオン交換クロマトグラフィーおよび第 2 次元としての逆相クロマトグラフィーが、化合物をまずそれらの電荷に従って、そしてその後それらの疎水性により分離するために、続いて実施される。これらの方法は、完全に自動化されることができ、多くの LC 製造業者により実施されている (例えば、Dionex Technical Note 85 を参照 ; <http://www.dionex>).

50

com/en-us/webdocs/77308-TN85-HPLC-ESI-MS-2D-Peptides-14Jul2009-LPN2256-01.pdf に  
おいても入手可能)。たとえ多くのクロマトグラフィー相が組み合わせられることができ  
るとしても、最終的な効率、より効率の悪い分画技術により強く影響を受ける。さらに  
、完全に直交性であることができる相はなく、従って、第 1 次元は、第 2 次元の分画効率  
に影響を及ぼす。限られた直交性の第 1 次元の多数の画分を混合して第 2 次元へのより少  
ない作用を達成するための連結スキームの開発は、直交性作用を低減するための比較的  
新しい概念である(Dwivedi et al., Anal. Chem., 80(18): 7036-42 (2008))。この方法は  
、類似のクロマトグラフィー相が用いられ、化合物の特性がそれらの pH または異なるク  
ロマトグラフィー条件を用いた親和性に従って変化する場合に、特に有用である。連結ス  
キームにおいて、多くの画分が、第 1 次元において生成される。次いで、その画分は、定  
められた互いに対する距離において混合される。例えば、60 の画分が、画分 1、11、  
21、31、41、51 がプールされ、画分 2、12、22、32、42、52 がプール  
されて(以下同様)最終的に 10 の画分を得るように混合される。この方法は、画分 1 ~  
10 に及ぶために十分な直交性のみを必要とするが、逆混合を避けるために第 1 画分にお  
いて非常に高い分画効率も必要とする。

10

【0006】

国際公開第 2005/114168 号は、試料分析のためのデバイスを記載している。  
デバイスは微量流体デバイスであるため、デバイスに含まれるカラムの後に継手は必要と  
されない。この文献は、画分の収集に関しては言及していない。

20

【0007】

本発明の基礎となる技術的問題は、分析物のクロマトグラフィー分離のための向上した  
手段および方法の提供である。この問題は、特許請求の範囲の主題により解決される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献 1】国際公開第 2005/114168 号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】Meyer, Practical High-Performance Liquid Chromatography (2004)

【非特許文献 2】Dionex Technical Note 85

30

【非特許文献 3】Dwivedi et al., Anal. Chem., 80(18): 7036-42 (2008)

【発明の概要】

【0010】

従って、本発明は、(a) クロマトグラフィーカラム; および (b) フローセクター  
を含む、またはそれからなるデバイスに関し、ここで、前記のフローセクターは、前記  
のカラムの遠位端に、ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボル  
ュームの合計が 10  $\mu$ L 未満であるように接続されている。

【図面の簡単な説明】

【0011】

40

【図 1】当該技術で確立された画分収集システムの例。

【図 2】流れの分割のためのローター弁。A) 模式的な 2 チャンネルローター弁の例。位  
置が 90° 回転した場合、インライン(in-line)および現在遮断されているライ  
ンが連結される。B) 多チャンネルローター弁の 2 つの例。ここで、インラインは、中心  
の口に連結されており、低体積チャンネルが出口チャンネルの放射状の口に連結されてい  
る(左: 3 チャンネル弁の例、右: 9 チャンネル弁の例)。

【図 3】本セクター分画システムを現状技術の分画の結果に対して比較する予備的な結  
果。A) ナノフローで分画された 15  $\mu$ g の出発物質を用いた本明細書において記載され  
たシステムの分画効率。最初の結果は、17 時間未満の測定時間における 7,793 のタ  
ンパク質同定のプロテオミクス深度を実証している。B) 最近公開された方法論の論文に  
おいて普通のオートサンプラーおよびミリリットル流を用いて達成された分画効率。この

50

アプローチでは、2.5 mg より多くのペプチドが分画された。その論文は、60 時間の総測定時間で分析された 7,897 のタンパク質同定のプロテオミクス深度を報告している (Mertins et al., Nat Methods, 10(7): 634-7 (2013))。

【発明を実施するための形態】

【0012】

第1側面に従うデバイスは、2つの構成要素、すなわちクロマトグラフィーカラム（満たされていることも空であることもできる）およびフローセクターを含むか、またはそれからなる。フローセクター自体は、当該技術で確立されたデバイスであり、それは、流体の入ってくる流れのいくつかの可能な出口（本明細書において“チャンネル（channels）”とも呼ばれる）の内の1つへの方向付けを提供する。その好ましい実装は、下記でさらに詳述されるようなローター弁である。本発明に従う流体は、液体（好ましい）またはガスであることができる。

10

【0013】

用語“上端”および“下端”は、カラム内の流れの方向が重力の方向と一致するように設計されているカラムを指す。より一般的に言えば、そして特に圧力下で操作されるカラムに関して、カラムは、近位および遠位端を有し、ここで、用語“近位端”および“上端”は、本明細書で用いられる際、試料がロードされる末端を示し、用語“遠位端”および“下端”は、分析物が互いに分離された、または部分的に分離された後にカラムを去る末端を示す。

20

【0014】

重要なことだが、前記のクロマトグラフィーカラムおよび前記のフローセクターの間の接続は、第1側面の必要条件が満たされることができるよう本質的に直接的である。そのような実質的に直接的な接続の実施は、下記でさらに詳述される。本明細書において与えられる手引きを提供されれば、当業者は、第1側面の必要条件を苦もなく満たすことができる。一般的な法則として、前記のクロマトグラフィーカラムおよび前記のフローセクターの間の接続がより短いほど、ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボリュームはより小さいであろう。好ましくは、前記のカラムおよび前記のフローセクターを連結するあらゆる管類が、避けられる。

【0015】

フローセクターは、カラムに対して外部にあることが、理解されている。

30

以下の記載から明らかであろうように、10  $\mu$ L 未満のポストカラムデッドボリュームおよびスウェプトボリュームの合計は、今までに達成されているポストカラムデッドボリュームおよびスウェプトボリュームの合計よりも小さい。この閾値未満の値が、本発明者らにより達成されている（下記参照）。

【0016】

用語“ポストカラムスウェプトボリューム”は、本明細書において、カラムの遠位端から分画、すなわち前記のフローセクターにおける画分の分割が行われる位置までの流路内の液体の割合として定義されている。用語“ポストカラムデッドボリューム”は、押し流されず（not swept）、かつ直接流体の流路中になく、カラムの遠位端から分画、すなわち前記のフローセクターにおける画分の分割が行われる位置までの体積を示す。ポストカラムデッドボリュームおよびスウェプトボリュームは、クロマトグラフィーカラムを去った後および前記の流体を収集するために用いられる容器（単数または複数）に入る前に分析物により達せられ得る体積である。デッドボリュームの場合、拡散は、分析物が入ることを可能にするプロセスの1つである。デッドボリュームおよびスウェプトボリュームがクロマトグラフィーカラムの遠位端により一方の末端に限定されるならば、それらは、“ポストカラム”デッド/スウェプトボリュームとも呼ばれる。上記から明らかであるように、スウェプトボリュームおよびデッドボリュームは、独立して最適化されることができる独立したパラメーターである。本発明は、デッドボリュームおよびスウェプトボリュームの合計を最小化することを目的としており、その合計は、“ポストカラムボリューム”または“総ポストカラムボリューム”とも呼ばれる。総ポストカラムボリ

40

50

ームは、クロマトグラフィーカラムの遠位端およびフローセクターの出口により限定され、そうでなければ、前記のクロマトグラフィーカラムの遠位端および前記のフローセクターの出口の間の分析物が接近できるあらゆる体積を占める。

【0017】

スウェプトボリウムは、計算されることも測定されることもできる。計算は、クロマトグラフィーシステム（例えば、図1において示されているクロマトグラフィーシステム）の管類の長さおよび寸法に基づいて行われることができる。測定は、クロマトグラフィーを漏れがなくかつ好ましくはデッドボリウムもないシステムにおいて既知の流速で実施し、所与の予想される信号の遅延を決定することにより行われることができる。用語“漏れ”は、そのシステムが緊密ではなく、液体が流路中の穴を通して漏れることができることを意味する。これは、高圧が漏れを引き起こす高速クロマトグラフィーにおいて起こり得る。漏れは、システム全体の適切な緊密性に関してチェックすることにより回避されることができる。カラムのボイドボリウムおよび流速に基づいて、第1分析物（それはカラムにおいて遅延しないであろうと仮定する）がフローセクターに到達するはずである時点が、計算されることができる。それからのあらゆる偏差は、ポストカラムスウェプトボリウムを示すものであり、その尺度である。デッドボリウムは、典型的には継手内で生じる。継手を適切に選択し、正しく使用することにより、デッドボリウムは最小化されることができる。

10

【0018】

そのシステムは、高度に多用途であり、少数の化合物ならびに多数の画分の分画を向上させる。用語“画分”（複数）は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10の画分を指す。

20

【0019】

さらに、本発明は、上記のような連結された分画に適している。その概念は、カラムの後の別々のチャンネルにおける溶離流の即時の能動的な分割に頼っており、それによりポストカラムスウェプトボリウムおよびデッドボリウムを低減またはさらには除去する。流れは、分画されるべき試料の適用および複雑性に応じて2以上のチャンネルにおいて分割されることができる。従来のデバイス（例えば図1において示されているデバイス）では、分画の位置は管類の末端にあることを特筆する。当該技術は、この分画の方法に内在する欠陥を認識することができなかった。しかし、本発明によれば、分画の位置は、フローセクターの出口である。

30

【0020】

本発明の典型的なナノフロー分画システムは、わずかおよそ80 nLのポストカラムスウェプトボリウムおよび10 nL未満のポストカラムデッドボリウムを有する。古典的な画分収集システムは、10  $\mu$ L以上のポストカラムスウェプトボリウムおよびデッドボリウムの合計を有する。

【0021】

流速、すなわち時間単位あたりの体積、例えば1分あたりの体積が、クロマトグラフィープロセスを特性付けるために当該技術において一般的に用いられている。前記のプロセスの過程において、それは、容易な方法で決定されることができる。

40

【0022】

本発明は、非常に少ないシステムあたりの経費で優秀な性能を提供する。それは、複雑な試料に関する分画条件を最適化するための単純な方法である。それは、低マイクロおよびナノフロー適用に関して超高圧ナノフローポンプと共に用いられることができる。本発明は、優秀な分画および連結された分画スキームの自動化を可能にする。

【0023】

第2側面において、本発明は、(a)クロマトグラフィーカラム；および(b)フローセクターを含む、またはそれからなるキットを提供し、ここで、前記のカラムおよび前記のフローセクターは、ポストカラムスウェプトボリウムおよびポストカラムデッド

50

ボリュームの合計が10  $\mu$ L未満であるような前記のフローセクターの前記のカラムの遠位端への接続のために設計されている。

【0024】

第2側面に従うキットは、分離した形態の第1側面に従うデバイスの2つの構成要素を提供する。重要なことだが、その2つの構成要素は、第2側面により必要とされるように、すなわち本質的に直接的な接続のために設計されている。本質的に直接的な接続のために設計されているそのようなものの典型的かつ好ましい実施は、下記でさらに詳述されており、例えばねじ式継手またはフェルールを含む。

【0025】

それと一致して、本発明のキットは、さらに第1側面に従うデバイスの組み立てに関する指示を含む説明書を含むことができる。

本発明の第1側面に従うデバイスおよび第2側面に従うキット両方の好ましい態様において、前記のクロマトグラフィーカラムは、(a)空であり；もしくは(b)クロマトグラフィー材料で充填されており；かつ/または2mm未満の；好ましくは250  $\mu$ m以下の；もしくは200  $\mu$ m以下の内径を有し、かつ/または2mL以下、1mL以下、500  $\mu$ L以下、200  $\mu$ L以下、好ましくは100  $\mu$ L以下、50  $\mu$ L以下、20  $\mu$ L以下、もしくは10  $\mu$ L以下の容積を有する。

【0026】

カラムがクロマトグラフィー材料で充填されている限りにおいて、ビーズベースのカラムならびにモノリス型カラムが用いられることができることが、理解されている。ビーズが用いられる限りにおいて、30  $\mu$ m未満、特に0.1~10  $\mu$ m、例えば1.0、1.5、1.9または2.0  $\mu$ mのビーズサイズが、優先される。

【0027】

カラムの“容積”という用語は、カラムの内容容積、すなわち $V = d^2 L$ を定義しており、dは、内径であり、Lは、円筒形のカラムの長さである。従って、その用語は、空である、すなわちクロマトグラフィー材料を有しない前記のカラムを指す。

【0028】

カラムがクロマトグラフィー材料で充填されている限りにおいて、前記のクロマトグラフィー材料は、好ましくは逆相、イオン交換、順相、混合相、親水性相互作用、親和性およびサイズ排除材料から選択される。

【0029】

上記の好ましい態様は、様々なクラスのクロマトグラフィー材料の使用を提供する。いずれのクラスにおいても、数多くの当該技術で確立された製品が存在する。少数の例を挙げると、逆相材料は、C18、C8およびフェニル結合材料を含む。イオン交換材料は、SCX、WCX、SAX、およびWAXを含み、そして順相材料は、シリカを含む。シリカベースの材料の大部分は、酸性条件下でのみ安定である。好ましい混合相材料は、スルホン化ポリジビニルベンゼン(DVB)およびスルホン化ポリスチレンジビニルベンゼン(SDB)を含む。製造業者およびそれらの商業的に入手可能な製品は、Sepax Technologies(米国デラウェア州ニューアーク)のGenerik BCXおよび3M(例えば3M Germany、ノイス)のSDB-RPSを含む。さらなる製造業者は、Dr. Maisch(ドイツ)である。典型的な親水性相互作用材料(“前方相(forward phase)”)材料としても知られている)は、HILICおよびERLICを含む。親和性材料は、免疫親和性材料、固定化金属イオン(IMAC)およびタンパク質相互作用に基づく材料を含む。サイズ排除材料は、アガロースおよびデキストランを含む。

【0030】

本発明は、ナノフロー適用またはマイクロフロー適用のためのカラムを用いて実施されることができる。典型的には、用語“ナノフロー”は、1~1000 nL/分の流れを指し、用語“マイクロフロー”は、1~1000  $\mu$ L/分の流速を指す。

【0031】

10

20

30

40

50



好ましくは、前記のカラムは、液体クロマトグラフィーのためのものである。カラムが、マイクロフローまたはナノフローのための管からなる、またはそれを含むことも、好ましい。言い換えれば、内径は、好ましくは0.05～2 mmの範囲である。好ましい内径は、0.05 mm以下、0.075 mm以下、0.1 mm以下、0.2 mm以下、0.25 mm以下、0.5 mm以下、1.0 mm以下、1.5 mm以下および1.6 mm以下である。

#### 【0032】

好ましいカラムの長さは、1 cm～100 cm、特に好ましくは10 cm～50 cmである。

本発明のデバイスおよびキット両方の好ましい態様において、前記のセレクターは、n方ローター弁であり、nは、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24である。nのより一般的な値は、3、4、6、8、10、12、18および24である。ローター弁の製造業者は、Vici AG International (Switzerland)を含む。

#### 【0033】

本発明のデバイスおよびキット両方のさらなる好ましい態様において、前記のカラムおよび前記のセレクターの間の接続は、(a) ポストカラムスウェプトボリュームおよびポストカラムデッドボリュームの合計が、1  $\mu$ L未満、500 nL未満、200 nL未満、100 nL未満、50 nL未満、40 nL未満、30 nL未満、20 nL未満もしくは10 nL未満であるような接続であり；かつ/または(b) (i) 好ましくはねじ式継手もしくはフェルールを用いて前記のカラムを前記のセレクターの入口(in-port)の中に直接差し込むか；もしくは(ii) 好ましくはねじ式継手もしくはフェルールを用いて前記のカラムを検出器、例えば紫外/可視セルの中に直接差し込み；そして好ましくはねじ式継手もしくはフェルールを用いて前記の検出器を前記のセレクターの入口の中に直接差し込むことにより実施される。

#### 【0034】

この好ましい態様の項目(a)および(b)は、本発明の第1および第2側面に従う特徴の特に好ましい制限またはそれをそれぞれ実施するための手段を提供する。

項目(b) (i) および(b) (ii) は、好ましい実施を提供し、その好ましい実施は、ポストカラムボリュームの基準ならびに上記で示されたような項目(a)の基準を満たすことを可能にする。項目(b) (i) は、カラムの遠位端およびフローセレクターの入口の間の直接的な接続を必要とする。従って、項目(b) (i) に従う接続は、本質的に直接的であるだけでなく、単純に直接的である。項目(b) (ii) は、さらなるデバイス、特に検出器、例えば紫外/可視セルが、カラムの遠位端およびフローセレクターのインポート(import)の間に配置されることができ点で、“本質的に直接的”の実施である。そのようなデバイスがカラムおよびフローセレクターの間に配置されている場合、好ましくは余分な管類は用いられないことは、理解されている。代わりに、必要とされる接続、すなわちカラムおよび検出器の間の接続ならびに検出器およびフローセレクターの間の接続のそれぞれに関して、直接的な接続のための手段、例えばねじ式継手が、用いられる。

#### 【0035】

標準的なねじ式継手は、当該技術で既知であり、例えば1/32"、1/16"、1/8"等に関するUNFねじ式継手を含む。ねじ式継手に対する代替案は、フェルール(例えばThermo Scientificから入手可能)を含む。

#### 【0036】

本発明のデバイスおよびキットのさらなる好ましい態様において、前記のフローセレクターの1つ、より多く、または全ての出口が、容器に接続されている。容器(単数または複数)は、画分(単数または複数)を収集する役目を果たす。

#### 【0037】

10

20

30

40

50

第 3 側面において、本発明は、1 種類以上の分析物の分離のための第 1 側面に従うデバイスまたは第 2 側面に従うキットの使用を提供する。

それに関して、本発明は、第 4 側面において、試料を分析する方法を提供し、前記の方法は、(a) 本発明の第 1 側面に従うデバイスを用いて前記の試料の第 1 クロマトグラフィー工程を実施することを含み、ここで、画分が収集される。

【0038】

用語“分析すること”は、その当該技術で確立された意味を有し、試料の構成要素を分離すること、少なくとも部分的に分離すること、および/またはそれらの同一性を決定することを含む。試料は、前記の試料が(未処理の形態または処理された形態のどちらかで)クロマトグラフィーカラムの近位端上にロードされることができる流体である限り、あらゆる試料であることができる。好ましい試料は、生物学的由来の試料および/または環境試料である。生物学的由来の試料は、体液、例えば哺乳類またはヒト由来の体液を含む。体液の例は、血漿、血清、血液および痰を含む。

【0039】

句“第 1 クロマトグラフィー工程を実施すること”は、クロマトグラフィーカラムを用いて試料のクロマトグラフィー分離を実施するための当該技術で確立された手段を包含する(前記の手段は、ポストカラムスウェプトボリュームおよびデッドボリュームに関しては当該技術で確立されていないことは、理解されている)。液体クロマトグラフィーが用いられるべきである限りにおいて、1 種類以上の緩衝液が、用いられることができる。特定の場合では、勾配が有用である可能性がある。特に、後者の場合において、欧州特許第 2 9 4 4 9 5 5 号において開示されている手段および方法が、用いられることができる。完全を期すために、我々は、Meyer(上記の引用箇所)を参照する。用語“第 1 工程”は、単に任意のさらなるクロマトグラフィー工程と区別するために用いられている。

【0040】

好ましい態様において、前記の画分は、連結された画分を収集するために連結される。画分の連結自体は、本明細書において上記で背景の節において論じられている当該技術で確立された手順である。

【0041】

第 4 側面に従う方法のさらなる好ましい態様において、前記の方法は、さらに(b) 本発明の第 1 側面に従うデバイスを前記の第 1 クロマトグラフィー工程から得られた画分と共に、または前記の第 1 クロマトグラフィー工程から得られた連結された画分と共に用いて第 2 クロマトグラフィー工程を実施すること(ここで画分が収集される); および場合により(c) 本発明の第 1 側面に従うデバイスをそれぞれの先行するクロマトグラフィー工程から得られた画分と共に、またはそれぞれの先行するクロマトグラフィー工程から得られた連結された画分と共に用いて 1 以上のさらなるクロマトグラフィー工程を実施すること(ここで前記の 1 以上のさらなるクロマトグラフィー工程において画分が収集される)を含む。

【0042】

この好ましい態様は、第 2 クロマトグラフィー工程および 1 以上の任意のさらなるクロマトグラフィー工程を提供する。好ましくは、様々なクロマトグラフィー工程において用いられる条件(例えば pH 値)および/またはクロマトグラフィー材料は、異なる。理想的には、直交性の分離条件が、用いられるべきである。用語“直交性の”は、2 つの異なるクロマトグラフィー工程における物理化学的分離条件および/または選択性が、分析物が分離される方法が根本的に異なる、および/または溶離物が同じ順序で溶離されないように異なっている状況を指す。実際には、これは常に達成することが可能なわけではない。2 つの異なるクロマトグラフィー工程を用いる方法の好ましい実施が、下記で記載される。

【0043】

好ましい態様において、前記の第 1 クロマトグラフィー工程のために、および/または前記の第 2 クロマトグラフィー工程のために用いられるクロマトグラフィー材料は、逆相

材料である。

【 0 0 4 4 】

特に好ましい態様において、前記の第 1 クロマトグラフィー工程のために、および前記の第 2 クロマトグラフィー工程のために用いられるクロマトグラフィー材料は、逆相材料であり、第 1 および第 2 クロマトグラフィー工程の一方は、中性またはアルカリ性条件下で、好ましくは 7 ~ 10 の pH において達成され、他方は、酸性条件下で、好ましくは 1 ~ 4 の pH で達成される。

【 0 0 4 5 】

さらなる好ましいアルカリ性条件は、8 および 9 の pH 値を含む。さらなる好ましい酸性条件は、2 および 3 の pH 値を含む。実際上は、我々は、酸性条件は常にそれらのそれぞれの pH 値の点で特性付けられるわけではなく、存在している酸の濃度（例えば 0.01 % ~ 1 %、好ましくは 0.1 % 酢酸；0.01 % ~ 1 %、好ましくは 0.1 % トリフルオロ酢酸；または 0.01 % ~ 1 %、好ましくは 0.1 % 酢酸）の点で特性付けられることを、特筆する。

【 0 0 4 6 】

下記の表 1 は、本発明に従う好ましい pH 調節剤を示す。

【 0 0 4 7 】

【 表 1 】

<u>pK<sub>a</sub> (25°C)</u>	<u>化合物</u>
0.3	トリフルオロ酢酸
2.15	リン酸(pK <sub>1</sub> )
3.13	クエン酸(pK <sub>1</sub> )
3.75	ギ酸
4.76	酢酸
4.76	クエン酸(pK <sub>2</sub> )
4.86	プロピオン酸
6.35	炭酸(pK <sub>1</sub> )
6.40	クエン酸(pK <sub>3</sub> )
7.20	リン酸(pK <sub>2</sub> )
8.06	トリス
9.23	ホウ酸
9.25	アンモニア
9.78	グリシン(pK <sub>2</sub> )
10.33	炭酸(pK <sub>2</sub> )
10.72	トリエチルアミン
11.27	ピロリジン
12.33	リン酸(pK <sub>3</sub> )

表 1 : 好ましい pH 調節剤。関係する pK<sub>a</sub> 値が、括弧の中に示されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 8 】

さらなる好ましい態様において、前記の第 1 クロマトグラフィー工程は、移動相調節剤の存在下で実施され、前記の移動相調節剤は、好ましくはトリフルオロ酢酸 ( T F A ) またはトリエチルアミン ( T E A ) である。

## 【 0 0 4 9 】

本発明に従う用語 “ 移動相調節剤 ” は、クロマトグラフィーの性能 ( 例えばピークの分離およびピークの形状 ) を向上させるのを助ける化合物の機能的特性付けである。移動相調節剤は、分析物に関するイオン対試薬 ( i o n   p a r i n g   r e a g e n t ) の役目を果たすことができる。 T F A または T E A が移動相調節剤としても用いられる限りにおいて、それを第 1 クロマトグラフィー工程に関して用いることが、好ましい。

10

## 【 0 0 5 0 】

本発明の方法のさらなる好ましい態様において、前記の方法は、さらに ( d ) 1 以上の画分の質量分析を含み、前記の画分は、前記の第 1 クロマトグラフィー工程ならびに / または存在する限りにおいて前記の第 2 および / もしくは前記のさらなるクロマトグラフィー工程 ( 単数または複数 ) から得られる。

## 【 0 0 5 1 】

本発明の方法のさらなる好ましい態様において、前記のデバイスに含まれるフローセクターは、検出器により制御されており、前記の検出器は、好ましくは紫外 / 可視セルまたは質量分析計である。

## 【 0 0 5 2 】

後者の好ましい態様は、信号依存性の分画を提供する。詳しく説明すると、検出器、例えばカラムの遠位端およびフローセクターの間に配置された検出器、または別の方法では下流の検出器、例えば質量分析計が、ピークの位置および特性を決定するために用いられることができ、前記のピークは、対象の分析物に対応する。検出器により検出される信号の特性に応じて、フローセクターは、特定の分析物の分離および / または収集が最適であるような様式で作動することができる。

20

## 【 0 0 5 3 】

本発明の方法のさらなる好ましい態様において、クロマトグラフィーは、液体クロマトグラフィー ( L C ) である。

本発明の方法のさらなる好ましい態様において、前記の試料は、ペプチド、ポリペプチド、脂質および / または糖類を含み、またはそれからなり、ここで、前記のペプチドは、好ましくはタンパク質分解性の消化、好ましくはトリプシン消化の結果である。

30

## 【 0 0 5 4 】

当該技術で既知であるように、ペプチド、ポリペプチドおよび / またはタンパク質を含む試料、完全なプロテオームを含むそのような試料は、好ましくはその後の質量分析のためにタンパク質分解的に消化される。好ましいタンパク質分解酵素は、トリプシンを含む。これらの態様において、クロマトグラフィーカラム上にロードされる試料は、生物学的系から引き出された一次試料と、それが前処理を受けている点で異なり、前記の前処理は、言及されたタンパク質分解性の消化を含むか、またはそれからなる。

## 【 0 0 5 5 】

一般的に言って、そしてそうではないことが明確に示されていない場合、好ましい態様は、連動して機能し得る。これが後者の 2 つの態様に適用される限りにおいて、オンライン L C - M S は、特に好ましい実施である。

40

## 【 0 0 5 6 】

本明細書において、特に特許請求の範囲において特性付けられた態様に関して、従属請求項において言及されたそれぞれの態様は、前記の従属請求項が従属するそれぞれの請求項 ( 独立または従属 ) のそれぞれの態様と組み合わせられることが、意図されている。例えば、3 つの代替物 A、B および C を列挙している独立請求項 1、3 つの代替物 D、E および F を列挙している従属請求項 2、ならびに請求項 1 および 2 に従属しており 3 つの代替物 G、H および I を列挙している請求項 3 の場合、本明細書は、別途そうではないと具

50

体的に言及されない限り、組み合わせ A、D、G；A、D、H；A、D、I；A、E、G；A、E、H；A、E、I；A、F、G；A、F、H；A、F、I；B、D、G；B、D、H；B、D、I；B、E、G；B、E、H；B、E、I；B、F、G；B、F、H；B、F、I；C、D、G；C、D、H；C、D、I；C、E、G；C、E、H；C、E、I；C、F、G；C、F、H；C、F、I に対応する態様を明確に開示していることは、理解されるべきである。

#### 【0057】

同様に、独立および／または従属請求項が代替物を列挙しない場合においても、従属請求項が複数の先行する請求項に戻って参照する場合、それにより含まれる主題のあらゆる組み合わせが明示的に開示されたと考えられることは、理解されている。例えば、独立請求項 1、請求項 1 に戻って参照する従属請求項 2、ならびに請求項 2 および 1 の両方に戻って参照する従属請求項 3 の場合、請求項 3 および 1 の主題の組み合わせは、明白かつ明確に開示されており、請求項 3、2 および 1 の主題の組み合わせも同様であることになる。請求項 1～3 のいずれか 1 項を参照するさらなる従属請求項 4 が存在する場合、請求項 4 および 1 の、請求項 4、2 および 1 の、請求項 4、3 および 1 の、ならびに請求項 4、3、2 および 1 の主題の組み合わせが、明白かつ明確に開示されていることになる。

10

#### 【0058】

上記の考えは、全ての添付された特許請求の範囲に必要な変更を加えて適用される。

図は、以下のことを示す：

図 1：当該技術で確立された画分収集システムの例。

20

#### 【0059】

図 2：流れの分割のためのローター弁。A) 模式的な 2 チャンネルローター弁の例。位置が 90° 回転した場合、インライン (in-line) および現在遮断されているラインが連結される。B) 多チャンネルローター弁の 2 つの例。ここで、インラインは、中心の口に連結されており、低体積チャンネルが出口チャンネルの放射状の口に連結されている (左：3 チャンネル弁の例、右：9 チャンネル弁の例)。

#### 【0060】

図 3：本セクター分画システムを現状技術の分画の結果に対して比較する予備的な結果。A) ナノフローで分画された 15 μg の出発物質を用いた本明細書において記載されたシステムの分画効率。最初の結果は、17 時間未満の測定時間における 7,793 のタンパク質同定のプロテオミクス深度を実証している。B) 最近公開された方法論の論文において普通のオートサンプラーおよびミリリットル流を用いて達成された分画効率。このアプローチでは、2.5 mg より多くのペプチドが分画された。その論文は、60 時間の総測定時間で分析された 7,897 のタンパク質同定のプロテオミクス深度を報告している (Mertins et al., Nat Methods, 10(7): 634-7 (2013))。

30

#### 【実施例】

#### 【0061】

実施例は、本発明を説明する。

実施例 1：単一の化合物または単一の化合物群は、ほとんど量的な喪失を伴わずに、かつ高純度で精製されるべきである。この例では、システムは、2 つ以上のチャンネルを用いて実施されることができ (図 2 a、b)、ここで、溶離ピークは、別々のチャンネル中に直接向け直され、結果として有害な逆混合作用を伴わない完全にきれいな分離をもたらす。それにより、単一の化合物が、バルク流から分離されることができ、または多数の化合物が、1 つまたは多数の別々のチャンネル中へと分割されることができる。

40

#### 【0062】

実施例 2：複雑な試料は、試料の複雑性を低減するが化合物の量的な差を保持するために、画分の内容物の重複がほとんどない少数の画分へと分画されなければならない。この実施例では、多数のアウトライン (out-lines) を有するローター弁が、用いられることができる (図 2 b)。画分 1 が収集され、ローターは次のチャンネルへと切り替わり、次の画分が収集される (以下同様)。この自動化された様式では、少数の画分が、

50

非常にきれいな分離でほとんど重複せずに分離されることができる。

【 0 0 6 3 】

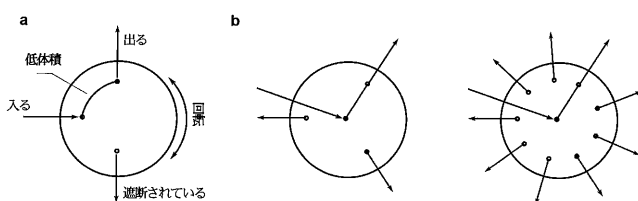
実施例 3：非常に複雑な試料は、画分の連結を伴う 2 D スキームにより分画されるべきである。ここで、多数の出力を有するロータリー弁が、多数のチャンネルへと連結される多数の細画分へと分画するために用いられることができる。例えば、10 口弁が用いられる場合、ローター弁は、環状方式で連続的な様式で切り替わる。それにより、連結は、画分 1 がチャンネル 1 に入り、画分 2 がチャンネル 2 に入り（以下同様）、続いて画分 1 1、2 1、3 1、4 1 等もチャンネル 1 に入り、画分 1 2、2 2、3 2、4 2 等もチャンネル 2 に入るように自動的に実施される。その結果は、古典的なアプローチよりもはるかに効率のよい比較可能なプロテオミクスカバー度を実証している（図 3）。

10

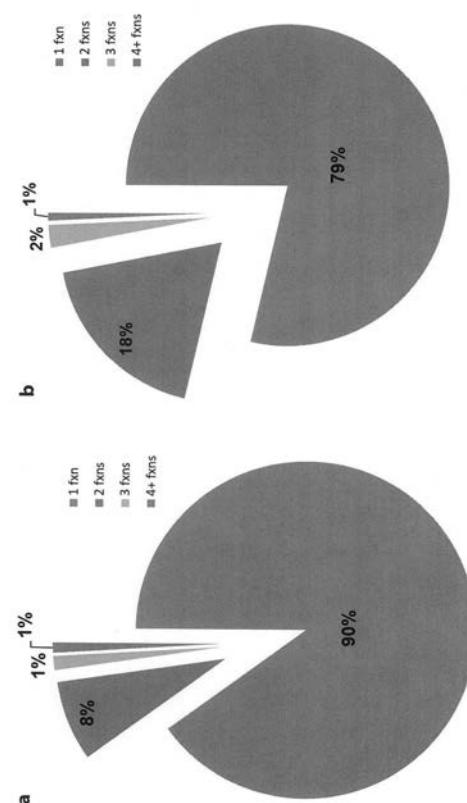
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052490

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N30/60 G01N30/80  
ADD. B01D15/24

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 B01D

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 504 622 A (THERMO ELECTRON MFG LTD [GB]; UNIV WESTERN SYDNEY [AU]) 5 February 2014 (2014-02-05) figures 10,11a,11b page 62, last paragraph - page 64, paragraph 2 page 49, line 4 -----	1-5,7-9, 11,12, 15,17
X	WO 2005/114168 A1 (AGILENT TECHNOLOGIES INC [US]; KRAICZEK KARSTEN [DE]; GLATZ BERND [DE]) 1 December 2005 (2005-12-01) figure 1 page 7, line 1 - line 17 page 8, line 6 - line 10 page 3, line 4 - line 20 ----- -/--	1-17

☒ 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2016

Date of mailing of the international search report

21/04/2016

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

Dedman, Emma

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052490

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2010/072546 A1 (UNIV BRUXELLES [BE]; DESMET GERT [BE]; LESTREMAU FRANCOIS [GB]; CABOOT) 1 July 2010 (2010-07-01) page 7, line 26 - page 8, line 11 -----	1,2,8,9
A	W0 2012/040327 A1 (PERKINELMER HEALTH SCI INC [US]; TIPLER ANDREW [US]) 29 March 2012 (2012-03-29) paragraphs [0100], [0217] -----	1,2,8,9
A	W0 2012/170756 A1 (WATERS TECHNOLOGIES CORP; BUNNER BERNARD [US]) 13 December 2012 (2012-12-13) page 4, line 8 - line 10 page 4, line 23 - line 27 -----	1,2,8,9



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/052490

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2504622	A	05-02-2014	AU 2012260981 B2 10-09-2015
			CN 103687654 A 26-03-2014
			DE 112012002247 T5 10-04-2014
			GB 2491168 A 28-11-2012
			GB 2504622 A 05-02-2014
			JP 2014517924 A 24-07-2014
			WO 2012160032 A1 29-11-2012
-----			
WO 2005114168	A1	01-12-2005	NONE
-----			
WO 2010072546	A1	01-07-2010	EP 2370193 A1 05-10-2011
			US 2011232373 A1 29-09-2011
			WO 2010072546 A1 01-07-2010
-----			
WO 2012040327	A1	29-03-2012	AU 2011305480 A1 23-05-2013
			CA 2812269 A1 29-03-2012
			CN 203935755 U 12-11-2014
			EP 2618913 A1 31-07-2013
			US 2012125444 A1 24-05-2012
			WO 2012040327 A1 29-03-2012
-----			
WO 2012170756	A1	13-12-2012	CN 103582812 A 12-02-2014
			EP 2718709 A1 16-04-2014
			JP 2014519611 A 14-08-2014
			US 2014138312 A1 22-05-2014
			WO 2012170756 A1 13-12-2012
-----			

## 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, ST, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(74)代理人 100203769

弁理士 大沢 勇久

(72)発明者 クラーク, ニルス

ドイツ国 8 2 1 3 1 ガウティング, オーベレ・ツークシュピッツシュトラッセ 1 0

(72)発明者 マン, マティアス

ドイツ国 8 2 1 3 1 シュトックドルフ, ベルクシュトラッセ 8 8