

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036586**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.26

(51) Int. Cl. **B01D 11/00** (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890740

(22) Дата подачи заявки
2017.09.11

(54) **СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОТЫ ОБРАЗЦОВ С
НЕРАЗЛИЧИМЫМИ НЕВООРУЖЕННЫМ ГЛАЗОМ ЧАСТИЦАМИ**

(31) **62/402,003**

(56) US-A1-20120244524
US-A1-20030072484
US-A-5917927

(32) **2016.09.30**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/US2017/050962**

(87) **WO 2018/063785 2018.04.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНТЕЛЛИДЖЕНТ ВАЙЕРЭС
ИМЭДЖИНГ ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Синторн Ида-Мария, Райнер Мартин,
Килсберг Густаф, Ниллсон Жозефина
(SE)**

(74) Представитель:
Нагорных И.М. (RU)

(57) Предложен способ количественного определения чистоты образцов с неразличимыми невооруженным глазом частицами. Анализируемый образец помещают в электронный микроскоп для получения электронно-микроскопического изображения (100) образца. Образец содержит объекты (114). Объекты (114), которые имеют размеры, отличающиеся от диапазона размеров первичных частиц (120), и размеры, находящиеся в диапазоне размеров первичных частиц (120), усиливают. Объекты (114) распознают как являющиеся первичными частицами (120) или мусором (106). Распознанные первичные частицы (120) исключают из объектов (114), так что объекты (114) содержат мусор (106), но не первичные частицы (120). Измеряют первую полную площадь (T1) распознанного мусора (106). Измеряют вторую полную площадь (T2) распознанных первичных частиц (120).

B1

036586

036586

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу оценки и количественного измерения чистоты образца с использованием электронной микроскопии.

Уровень техники и раскрытие изобретения

Разработка и производство биофармацевтических препаратов, как правило, включают в себя несколько этапов очистки, на которых клеточные остатки, разрушенные частицы, другие загрязняющие вещества и кластеры и т.п. должны быть удалены так, чтобы конечный продукт содержал только требуемые первичные частицы. Чистота и распределение представляющих интерес первичных частиц (т.е. не кластерных первичных частиц) в конечном продукте важны для его качества и эффективности. Следовательно, количественное определение чистоты играет важную роль для конечного продукта, а также в ходе начальных процессов разработки и производства, для оценки эффективности и влияния каждого этапа очистки. Электронная микроскопия является способом, с помощью которого неразличимые невооруженным глазом частицы могут быть отображены с разрешением, достаточным для идентификации интересующих частиц (первичных частиц), а также мусора, загрязняющих веществ и кластеров в образце. Во многих процессах важно объективное количественное измерение чистоты образца с неразличимыми невооруженным глазом частицами, такими как вирусные частицы, вирусоподобные частицы, неорганические гранулы и другие наночастицы и микрочастицы из жидких образцов. Например, модифицированные вирусные векторы обычно используют при применении генной терапии, а модифицированные вирусные частицы используют в качестве вакцин. Однако существующие в настоящее время способы количественной оценки чистоты не слишком точны и часто включают в себя выполняемые вручную этапы, которые могут исказить конечный результат. Существует потребность в более эффективном и надежном способе оценки и измерения чистоты жидких образцов, содержащих неразличимые невооруженным глазом первичные частицы и загрязняющие вещества/мусор.

Способ согласно настоящему изобретению обеспечивает решение указанных выше проблем. Более конкретно, данный способ предназначен для количественного определения чистоты образцов неразличимых невооруженным глазом частиц. Анализируемый образец помещают в электронный микроскоп для получения электронно-микроскопического изображения образца. Образец содержит объекты первичных частиц, а также мусор. Мусор может быть сломанными или частями (субъединицами) первичных частиц и/или загрязнителей и/или кластерами, или агрегатами первичных частиц или мусора, или остаточным материалом фазы производства. Объекты на изображении усилены и имеют размеры, которые отличаются от диапазона размеров первичных частиц и размеров, которые находятся в диапазоне размеров первичных частиц. Объекты на изображении распознают в качестве первичных частиц или мусора. Распознанные первичные частицы исключают из оставшихся объектов так, что объекты, распознанные в качестве мусора, содержат только мусор и не содержат первичных частиц. Измеряют первую полную площадь (T1) распознанного мусора. Измеряют вторую полную площадь (T2) распознанных первичных частиц. Для определения количественного показателя чистоты образца вычисляют отношение первой полной площади (T1) ко второй полной площади (T2).

В другом варианте осуществления границы объектов на изображении усилены, а объекты имеют размер, который по существу аналогичен диапазону размеров первичных частиц. Для идентификации первичных частиц анализируют округлость объектов.

В другом варианте осуществления объекты на изображении, которые имеют форму, по существу аналогичную форме первичных частиц, идентифицируют как первичные частицы.

В другом варианте осуществления границы объектов на изображении усилены и объекты имеют размер, который по существу аналогичен диапазону размеров первичных частиц, и для идентификации первичных частиц анализируют радиальный профиль плотности объектов.

В еще одном варианте осуществления границы объектов на изображении усилены и объекты имеют размер, который по существу аналогичен диапазону размеров первичных частиц, а отношение сигнал/шум на границе объектов анализируют путем измерения средней интенсивности внутренней части объектов по сравнению со средней интенсивностью непосредственно за пределами объектов.

В другом варианте осуществления границы объектов на изображении усилены и объекты имеют размер, который по существу аналогичен диапазону размеров первичных частиц, а локальный контраст объектов измеряют путем анализа резкости наружной границы объектов.

В другом варианте осуществления границы объектов на изображении усилены и объекты имеют размер, который по существу аналогичен диапазону размеров первичных частиц, а структуру объектов измеряют путем анализа текстуры для идентификации первичных частиц.

В другом варианте осуществления структуру объектов на изображении измеряют путем анализа текстуры и анализируют для идентификации первичных частиц.

В другом варианте осуществления образец, содержащий вирусные частицы или вирусоподобные частицы, помещают в электронный микроскоп.

В еще одном варианте осуществления изображение фильтруется двумя сглаживающими фильтрами для создания первого отфильтрованного изображения и второго отфильтрованного изображения и вычитания первого отфильтрованного изображения из второго отфильтрованного изображения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено изображение электронного просвечивания с негативным контрастом образца биологической частицы в растворе.

На фиг. 2 представлено изображение, демонстрирующее результат после применения метода разности гауссианов, использованного для усиления тонких границ.

На фиг. 3 представлено изображение первичных объектов, распознанных на изображении, показанном на фиг. 2, путем применения специфического метода распознавания.

На фиг. 4 представлено изображение, показывающее результат после усиления объектов с типичным размером мусора с использованием метода разности гауссианов на исходном изображении.

На фиг. 5 представлено изображение, показывающее результат после пороговой обработки усиленного изображения объекта.

На фиг. 6 представлено изображение, показывающее результат после удаления объектов, соответствующих первичным частицам.

На фиг. 7 представлено изображение, показывающее конечный результат, включающее как первичные частицы, так и мусор.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении описан уникальный способ количественного измерения чистоты образца, содержащего неразличимые невооруженным глазом частицы или наночастицы (которые, например, могут иметь размер около 100 нм) в растворе, на основе автоматического и объективного анализа электронно-микроскопических изображений образца. Образец может быть, например, жидким, растворенным твердым или порошковым образцом.

Могут быть использованы изображения просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастом. В общем, показателем чистоты согласно настоящему изобретению преимущественно является отношение площади первичных частиц к площади не первичных частиц (включающих мелкий мусор, а также большие кластеры мусора).

Основные этапы способа согласно настоящему изобретению:

1) установка анализируемого образца в электронный микроскоп для получения электронно-микроскопического изображения образца;

2) усиление границ (таких как тонкие границы) первичных частиц на изображении, которые имеют размер, являющийся типичным для первичных частиц;

3) специфическое распознавание всех первичных частиц в изображении с использованием метода, который предназначен для идентификации конкретных первичных частиц;

4) усиление объектов с размерами, типичными для кластеров мусора и загрязняющих веществ, на изображении;

5) распознавание всех усиленных изображений объектов на этапе 4 с использованием, например, метода задания порога;

6) исключение (вычитание) идентифицированных первичных частиц из распознанных усиленных изображений объектов;

7) измерение полной площади распознанных и оставшихся кластеров мусора и загрязняющих веществ с этапа 6;

8) измерение полной площади распознанных первичных частиц, распознанных на этапе 3; и

9) вычисление отношения площади, полученной на этапе 7, к площади, полученной на этапе 8.

Типичный пример изображения 100 показан на фиг. 1, а этапы 2-6 проиллюстрированы на фиг. 2-6. На фиг. 7 показан конечный результат 102, т. е. первичные частицы 120 и объекты мусора 106. Измеренные площади первичных частиц и объектов мусора, соответственно, используют на этапах 7-9 для получения показателя чистоты.

Более конкретно, фиг. 1 является изображением 100 просвечивающей электронной микроскопии негативно контрастированного образца биологической частицы в растворе. Биологические частицы могут быть вирусными частицами или какими-либо другими органическими частицами. Образцы, которые содержат неорганические частицы, также могут быть проанализированы с помощью способа согласно настоящему изобретению. Для усиления, например, тонких границ (или контрастных/тонких областей) объектов 116 на изображении, имеющих размер, характерный для анализируемых первичных частиц (этап 2), может быть использован подходящий метод, такой как метод разности гауссианов или какой-либо другой подходящий метод.

На фиг. 2 показан результат 105 после применения метода разности гауссианов для усиления изображения тонких границ идентифицированных объектов 116. Идентифицированные объекты 116 являются в большинстве первичными частицами, но могут содержать нежелательные мусор и загрязняющие вещества 106 (более подробно описано ниже). Определенный тип вирусных частиц может иметь ожидаемый размер 100 нм, так что частицы, размер которых существенно отличается, скорее всего, являются не первичными частицами, а вместо этого частицами нежелательного мусора 106. Следует заметить, что анализ на этапе 2 не может быть ограничен размером всех частиц. Также имеется возможность сосредоточиться на участках структуры первичной частицы, которые являются специфическими для желаемых

первичных частиц, таких как структура частицы или толщина наружной границы. Затем можно усилить конкретный участок частицы, такой как структура или толщина наружной границы частицы.

Усиление тонких границ выбранных частиц или первичных частиц (например, с использованием метода разности гауссианов) на изображении дало неожиданные и поразительно хорошие результаты. Например, контрастирование биологических образцов (таких как вирусные частицы) приводит к различному количеству контрастного материала, окружающего объекты/частицы на изображении, из-за различной толщины контрастного материала на разных участках образца, равно как и вокруг объектов/частиц разного размера. Количество (толщина) контрастного материала и, следовательно, место, где на сетке вычисляется показатель чистоты, непосредственно влияют на показатель чистоты и могут сделать измерение менее корректным. Как указано выше, границы или объекты в выбранном диапазоне размеров на изображении усиливают с использованием, например, подхода разности гауссианов. Должно быть понятно, что также могут быть использованы другие подходы усиления границы или объекта. В методе разности гауссианов изображение фильтруется с помощью двух сглаживающих фильтров Гаусса (имеющих разные коэффициенты сглаживания сигма). Затем одно отфильтрованное изображение вычитается из другого, что приводит к изображению с усиленными границами или усиленными объектами, например, определенного размера. Результат частично зависит от комбинации используемых коэффициентов сглаживания. На этих модифицированных изображениях затем распознают первичные частицы, мусор и загрязняющие вещества. Как указано выше, этап усиления границы/объекта уменьшает влияние различных количеств и неравномерного распределения контрастного материала. Следовательно, этот важный и инновационный этап необходим при использовании/в случаях, когда неравномерный контрастный материал является проблемой, например, при анализе биологических образцов вирусных частиц и других частиц. В образцах, содержащих только неорганический материал/частицы, этап усиления границы может быть исключен. Кроме того, усиление объектов (т.е. первичных частиц на этапах 2/3) с определенными выбранными размером или характеристикой, такими как толщина границы или структура, перед распознаванием всех объектов после усиления в соответствии с этапом 4 (описанные ниже), уменьшают проблему неравномерного окрашивания фона и освещения на изображении, что, в противном случае, могло бы легко привести к ложному позиционированию границ объекта и даже привести к ложным или ошибочно пропущенным, или распознанным объектам. Другими словами, усиление на этапе 2 облегчает идентификацию первичных частиц с учетом различных цветов фона и освещения от микроскопа. Например, усиление удаляет или уменьшает влияние более светлых цветов в определенных сегментах изображения и влияние градиентов интенсивности.

Однако некоторые из нежелательных частиц мусора и загрязняющих частиц могут иметь размер, который аналогичен размерам анализируемых первичных частиц. Иначе говоря, усиление на этапе 2 может усиливать частицы, которые иногда имеют схожий размер или имеют другие характеристики, сходные с первичными частицами, но не являются первичными частицами. В этом случае необходимо дополнительно проанализировать усиленные объекты на этапе 2, например анализируя форму или округлость объектов 116, чтобы идентифицировать и отличить первичные частицы 120 от мусора, который может иметь размеры, находящиеся в пределах диапазона размеров первичных частиц. Это выполняют на этапе 3 (и результат 107 показан на фиг. 3), на котором идентифицируют (показано белым цветом) выявленные первичные частицы 120 с использованием метода распознавания, такого как анализ радиальной симметрии частиц/объектов, идентифицированных на этапе 2, и как показано на фиг. 2.

Чтобы осуществить способ согласно настоящему изобретению и сделать количественный показатель чистоты объективным (т.е. независимое от пользователя) и надёжным, этапы настоящего способа предпочтительно должны выполняться автоматически с использованием пользовательского ввода только для выбора приблизительных размеров первичных частиц, равно как и нижних и верхних пределов не первичных частиц/объектов (мусора и кластеров). Важным аспектом настоящего изобретения является возможность автоматически отличать первичные частицы от не первичных частиц/объектов. Как указано в отношении этапа 3, круглые первичные частицы (такие как вирусные векторы), например, могут быть распознаны на основе характеристик круговой симметрии или других способов, которые специфически определяют первичные частицы 120. Например, радиально-симметричная структура вирусной частицы может быть преобразована в профиль оттенков серого. Он может быть использован для описания структуры путем вычисления среднего оттенка серого на каждом расстоянии от центра, идя от центра наружу по направлению к периферии или оболочке структуры вирусной частицы. Также можно разработать математические алгоритмы для описания структур или формы вирусной частицы, вместо того, чтобы полагаться на профили оттенков серого.

Важной особенностью способа согласно настоящему изобретению является возможность создания шаблонов на основе профилей оттенков серого для объективного описания вирусных частиц. Шаблоны могут быть созданы также с использованием математических методов. Таким образом, все выявленные объекты в некотором диапазоне размеров можно сравнить с профилем или шаблоном, представляющим типичную первичную частицу, и использовать профиль/шаблон, чтобы определить, достаточно ли подобен выявленный объект профилю/шаблону, чтобы быть классифицированным как истинная первичная частица 120. На этапе 3 также можно использовать другие способы для идентификации первичных час-

тиц 120, такие как способы распознавания эллиптических, стержневидных или кристаллоподобных форм.

Должно быть понятно, что вышеупомянутая ссылка на вирусные частицы является просто примером, и настоящее изобретение не ограничено вирусными частицами. Кроме того, ссылка на округлость/кругообразность частицы является просто примером, и могут также использоваться другие характеристики, такие как специфические структуры, специфические формы и поверхности объекта.

Что касается этапа 3, который связан со специфическим распознаванием первичных частиц 120 (и для исключения не первичных частиц, размер которых аналогичен первичным частицам), может быть включен дополнительный этап, который использует отношение сигнал/шум или локальные контрасты на границе объектов 116. Это выполняют для дальнейшего улучшения обнаружения первичных частиц 120 и автоматического решения о том, что является или не является первичной частицей. Отношение сигнал/шум, предпочтительно, измеряют как среднюю интенсивность внутри частицы по сравнению со средней интенсивностью непосредственно за пределами частицы. Для анализа резкости наружных и/или внутренних границ частицы можно использовать метод локального контраста, чтобы иметь лучшую возможность определить первичная ли это частица или нет. Также в отношении этапа 3 для несферических частиц могут быть использованы другие способы, предназначенные для распознавания конкретных форм или других характеристик первичных частиц 120, таких как текстура (структура на поверхности частиц).

Следующим этапом является распознавание нежелательного мусора и загрязняющих веществ в образце. На фиг. 4 показан результат 108 после того, как объекты были усилены на исходном изображении. Одна из проблем состоит в том, что анализ и усиление на этапе 4 также идентифицируют и включают в себя некоторые или все первичные частицы 120, идентифицированные на этапе 3. На этапе 4 все объекты 114 на изображении усиливают с использованием, например, метода разности гауссианов. Мусор и кластеры, например, также могут быть распознаны с помощью (автоматического) метода задания порога интенсивности, такого как метод задания порога Оцу (Otsu). Ручной выбор порога интенсивности также будет работать, но он может легко внести нежелательный субъективизм пользователя.

Предпочтительно объекты 114 идентифицируют путем фокусировки на определенном диапазоне размеров, который характерен для кластера мусора и загрязняющих веществ, поскольку мусор/загрязняющие вещества могут иметь любую форму и цвет. Вначале можно сосредоточиться на объектах с размерами, характерными для мусора и загрязняющих веществ, но меньшими, чем первичные частицы, а затем сосредоточиться на объектах с размерами, которые больше, чем первичные частицы. Интенсивность объектов 114 предпочтительно анализируют для идентификации областей или зон, которые содержат мусор и загрязняющие вещества.

Таким образом, все усиленные объекты 114 на изображении распознаны на этапе 5, и результат 110 показан на фиг. 5. Иначе говоря, способ идентификации, используемый на этапе 4, недостаточно специфичен для исключения первичных частиц 120Ж, и поэтому как мусор, так и некоторые или все первичные частицы идентифицированы как объекты 114 и показаны в результате 110.

На этапе 6 идентифицированные первичные частицы 120, определенные на этапе 3, которые также включены в объекты 114, исключают или вычитают из объектов 114, показанных на фиг. 5, так что на фиг. 6 в результате 112 показаны только распознанные мусор и загрязняющие вещества 106. Это означает, что какие-либо первичные частицы, которые, как оказалось, были включены в объекты 114, в результате метода усиления, используемого на этапе 5, удалены и, следовательно, в результате 112 показаны только мусор и загрязняющие частицы 106.

На этапе 7 измеряют полную площадь T_1 оставшихся после этапа 6 объектов или мусора 106, т.е. после удаления первичных частиц. На этапе 8 измеряют полную площадь T_2 распознанных первичных частиц 120, как показано на фиг. 3. На этапе 9 вычисляют отношение R площадей, полученных после этапа 7 и этапа 8 соответственно.

Описанный подход, количественно определяющий чистоту как отношение площадей первичных частиц к другим объектам, является надежным. Несколько ложно распознанных или пропущенных первичных частиц влияют на результат лишь незначительным образом, поскольку измерение основано на большом количестве изображений, которые хорошо представляют образец, предпочтительно полученных при автоматическом захвате изображения (независимо от пользователя) или полученных в ручном режиме изображений.

Хотя настоящее изобретение описано в соответствии с предпочтительными сочетаниями и вариантами осуществления, следует понимать, что могут быть сделаны некоторые замены и изменения без отклонения от сущности и объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного определения чистоты образца с представляющими интерес неразличимыми невооруженным глазом частицами, включающий

установку анализируемого образца в электронный микроскоп для получения электронно-микроскопического изображения (100) образца, при этом образец содержит объекты (114);

усиление границ объектов (114) на изображении (100), имеющих размеры, отличающиеся от диапазона размеров первичных частиц (120), и размеры, находящиеся в диапазоне размеров первичных частиц (120);

распознавание объектов (114) на изображении в качестве первичных частиц (120) или мусора (106); исключение распознанных первичных частиц (120) из объектов (114), так что объекты (114) содержат мусор (106), но не содержат первичные частицы (120);

измерение первой полной площади (T1) распознанного мусора (106);

измерение второй полной площади (T2) распознанных первичных частиц (120);

вычисление отношения первой полной площади (T1) ко второй полной площади (T2) для определения количественного показателя чистоты образца.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает в себя усиление границ объектов (116) на изображении, имеющих размеры, которые, по существу, принадлежат диапазону размеров первичных частиц (120), и анализ округлости объектов (116) для идентификации первичных частиц (120).

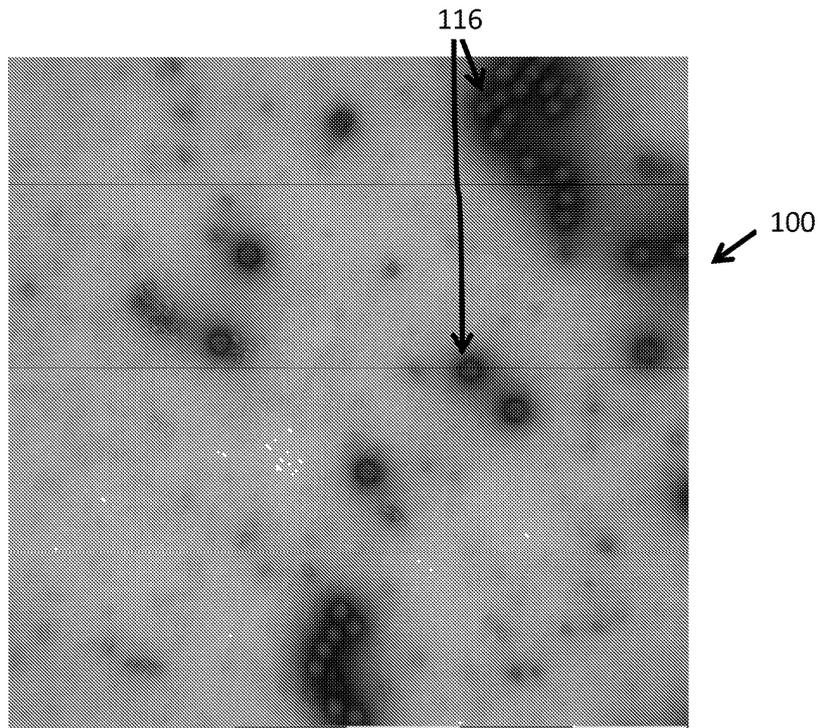
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает в себя усиление границ объектов (116) на изображении, имеющих размеры, которые, по существу, принадлежат диапазону размеров первичных частиц (120), и анализ радиального профиля плотности объектов (116) для идентификации первичных частиц (120).

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает в себя усиление границ объектов (116) на изображении, имеющих размеры, которые, по существу, принадлежат диапазону размеров первичных частиц (120), и анализ отношения сигнал/шум на границе объектов (116) путем измерения средней интенсивности внутренней части объектов по сравнению со средней интенсивностью непосредственно за пределами объектов (116).

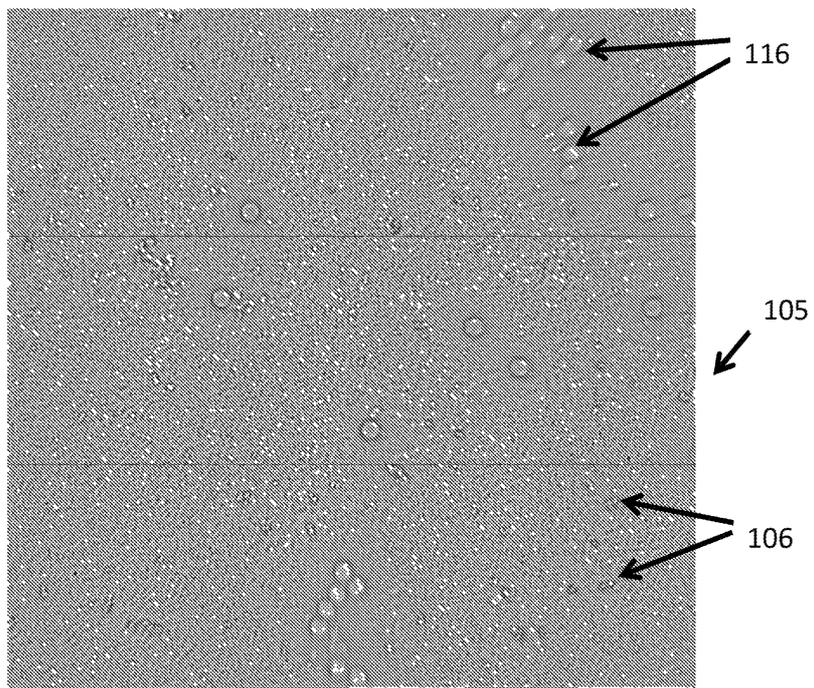
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает в себя усиление границ объектов (116) на изображении, имеющих размеры, которые, по существу, принадлежат диапазону размеров первичных частиц (120), и анализ локального контраста объектов (116) путем анализа резкости границы объектов.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает в себя установку в электронный микроскоп образца, содержащего вирусные или вирусоподобные частицы.

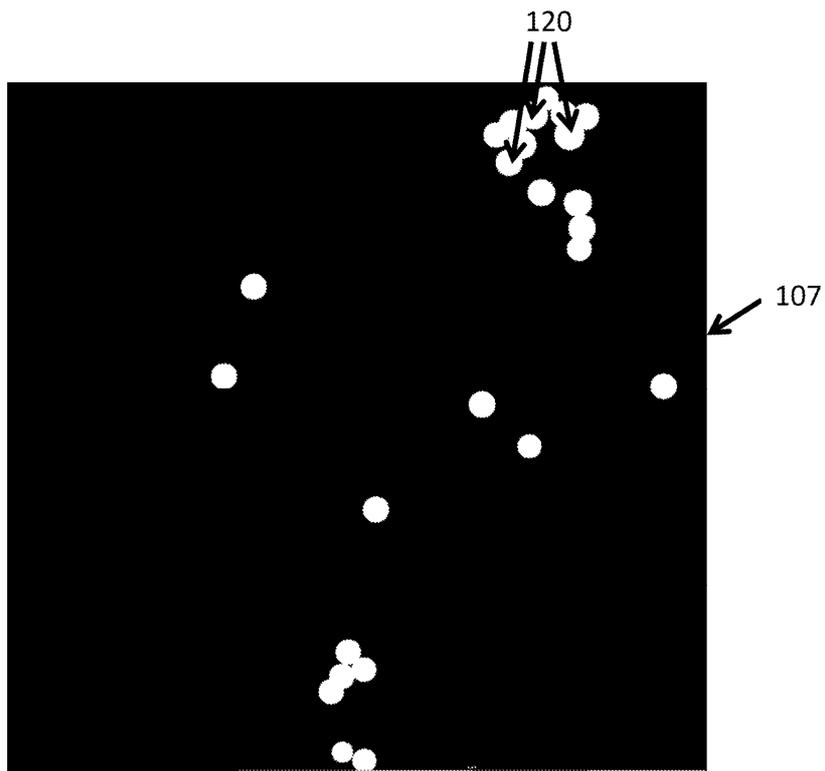
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает в себя фильтрацию изображения двумя сглаживающими фильтрами для создания первого отфильтрованного изображения и второго отфильтрованного изображения и вычитание первого отфильтрованного изображения из второго отфильтрованного изображения.



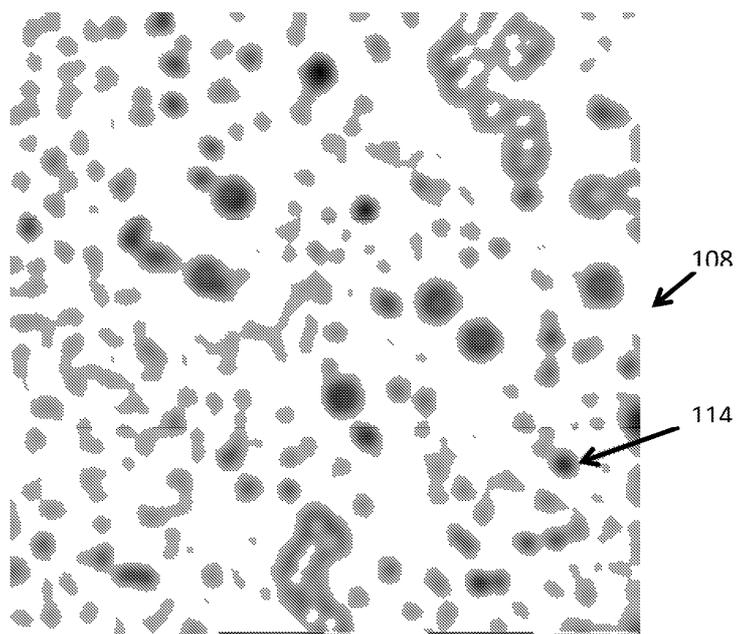
Фиг. 1



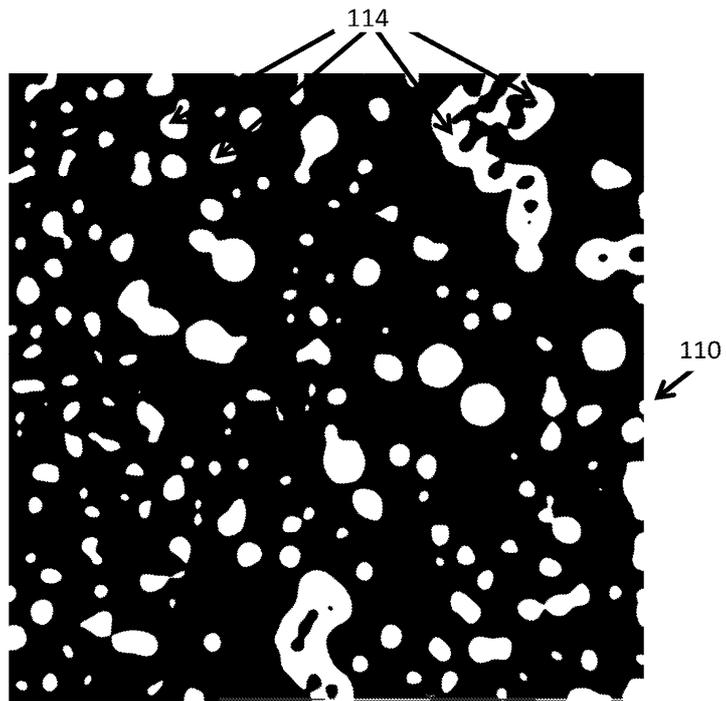
Фиг. 2



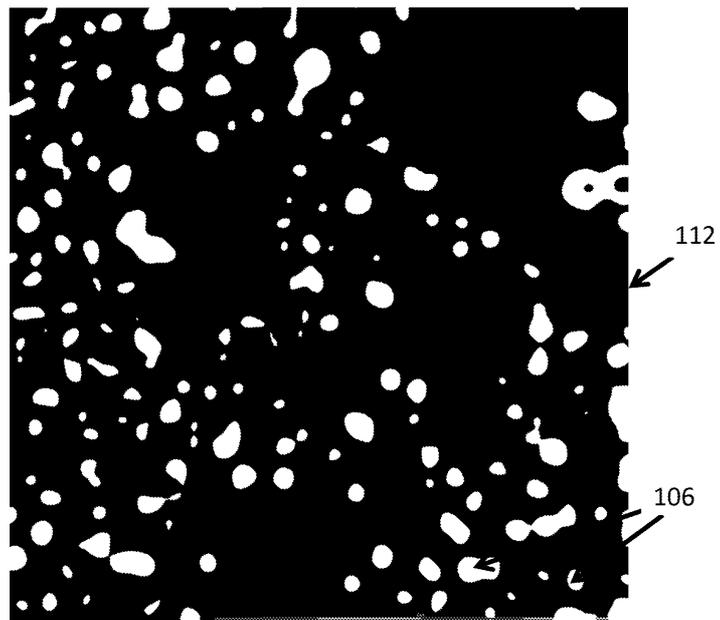
Фиг. 3



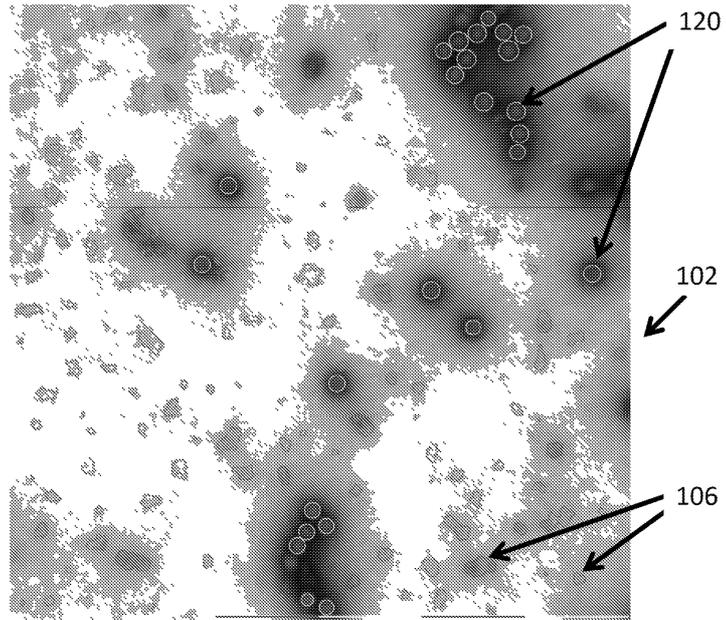
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7