(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 784 394**

(51) Int. CI.:

G01N 15/14 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
G01N 15/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016 PCT/US2016/058011**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17105625**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016 E 16876228 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3389813**

(54) Título: **Cuantificación de alta precisión de partículas sub-visibles**

(30) Prioridad:

18.12.2015 US 201562269465 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2020

(73) Titular/es:

INTELLIGENT VIRUS IMAGING INC. (100.0%)
26 Pinecrest Plaza, Suite 2
Southern Pines, NC 28387-4301, US

(72) Inventor/es:

NORDSTROM, RICKARD;
SINTORN, IDA-MARIA y
HAAG, LARS

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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).

DESCRIPCION

Cuantificación de alta precisión de partículas sub-visibles

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para la cuantificación de alta precisión de partículas sub-visibles, tales como micropartículas y/o nanopartículas, usando microscopía tal como la microscopía electrónica de barrido (SEM).

Antecedentes y resumen de la invención

Una enumeración precisa del número de partículas sub-visibles tales como las partículas de virus, partículas similares a virus, perlas inorgánicas y poliméricas y otras nanopartículas y micropartículas de muestras líquidas es importante en muchos procesos. Por ejemplo, los vectores de virus modificados se usan comúnmente en aplicaciones de terapia génica. El número de vectores activos por mL (el título infeccioso de la muestra de virus) se puede determinar utilizando ensayos estándar de infectividad. Sin embargo, al usar los métodos disponibles actualmente, no es posible determinar con precisión el número total de partículas, incluyendo las partículas no infecciosas, en la muestra. La proporción de partículas infecciosas sobre las no infecciosas proporciona una valiosa información sobre la calidad y eficacia del producto final de la terapia génica y los anteriores procesos de desarrollo.

Una limitación importante de las técnicas actualmente disponibles, como la citometría de flujo cuantitativa (QFCM), es que las nanopartículas de interés no se detectan directamente. En cambio, se cuantifica el número de sondas unidas a una población de nanopartículas. Dado que varía el número de sondas que se unen por nanopartícula, la precisión de las técnicas indirectas convencionales es típicamente baja y depende de la afinidad entre la muestra y la sonda. Una técnica en la que la nanopartícula de interés pudiera detectarse directamente superaría esta limitación. Además, si la técnica pudiera visualizar las partículas a una resolución suficiente, las partículas individuales podrían identificarse en función de su tamaño y su morfología y, por tanto, enumerarse directamente. Incluso las partículas de dentro de los grupos podrían enumerarse y estimarse. Esto no es posible utilizando los métodos de afinidad disponibles actualmente o las técnicas basadas en la dispersión de luz. Los ejemplos de la técnica de base incluyen los documentos: US 2003/024877 A1, US 2009/020555 A1, US 2010/151446 A1 y Komlavi Anani Afanou et al., “Indirect Immunodetection of Fungal Fragments by Field Emission Scanning Electron Microscopy”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 81, no. 17, 19 de junio 2015, pags. 5794-55803, US ISSN: 0099-2240.

El nuevo método de partículas directas de alta precisión de la presente invención puede usarse para enumerar partículas sub-visibles tanto inorgánicas como orgánicas, tales como nanopartículas, a partir de muestras líquidas. Una característica importante es que las muestras se aplican sobre una huella bien definida y medible. Otra característica importante es que los especímenes se distribuyen más uniformemente de lo que antes era posible y esto reduce la necesidad de muestreo y ahora es posible realizar el análisis a una resolución en la que las partículas individuales se pueden identificar fácilmente. Las partículas sub-visibles se detectan directamente sin necesidad de sondas señal y se pueden visualizar en imágenes bidimensionales normales. El método SEM de cuantificación de partículas (pqSEM) de la presente invención se basa preferiblemente en filtrado de bajo vacío, microscopía electrónica de barrido (SEM) u otras técnicas de microscopía electrónica, y análisis de imágenes. La presente invención puede usarse con o sin patrones internos, un ejemplo de los cuales serían perlas de poliestireno caracterizadas por el National Institute of Standards and Technology (NIST).

La presente invención proporciona una solución a los problemas descritos anteriormente. Más en particular, el método es para la cuantificación de partículas sub-visibles. Se proporciona una membrana de filtro que tiene una pluralidad de poros definidos a través de la misma. La membrana de filtro está en relación operativa con una cámara de vacío. Los poros están sellados con un sellante. Se aplica una gota de muestra sobre la membrana del filtro, que contiene un líquido con partículas sub-visibles. El líquido disuelve el sellante en los poros ubicados directamente debajo de la gota de muestra. El líquido fluye a través de los poros en los que se ha disuelto el sellante y las partículas sub-visibles permanecen en la parte superior de la membrana de filtro. La membrana de filtro, con las partículas dispuestas sobre ella, se traslada a un microscopio electrónico y se enumera en imágenes adquiridas en el microscopio.

El método comprende además la etapa de premontar un conjunto de filtro, que contiene la membrana del filtro, sobre un soporte de SEM.

El método comprende además la etapa de poner una cinta de montaje en el soporte de SEM.

El método comprende además la etapa de proporcionar el soporte de SEM, que tiene un canal alargado definido en el mismo, usar un inyector que contiene la gota de muestra y alinear el inyector en la parte superior de un canal alargado antes de la deposición de la gota de muestra en la membrana del filtro.

El método comprende además la etapa de conectar el soporte de SEM a una cámara de vacío conectada a una fuente de vacío y someter la membrana de filtro a una fuerza de succión a través del canal alargado.

El método comprende además la etapa de depositar la gota de muestra sobre la membrana de filtro sin que la gota de muestra toque ningún borde externo de la membrana de filtro.

El método comprende además la etapa del líquido que disuelve solamente el sellante en los poros dispuestos directamente debajo de la gota de muestra, mientras que los poros adyacentes en el lado de la gota permanecen sellados con el sellante porque el líquido no ha estado en contacto con el sellante dispuesto en esos poros.

El método comprende además la etapa de las partículas sub-visibles que forman una huella definida y medible en la membrana del filtro y que adquieren una serie de imágenes de las partículas desde una periferia externa de la huella hasta el centro de la huella.

El método comprende además la etapa de contar las partículas en las imágenes de microscopía electrónica adquiridas a una resolución en la que las partículas son claramente visibles, ya sea manual o automáticamente, utilizando métodos de análisis de imágenes.

El método comprende además la etapa de estimar el área total de la huella en la membrana del filtro en imágenes de microscopía que cubren la huella completa (ya sea una imagen de bajo aumento que cubre la huella completa o varias sub-imágenes de mayor aumento de la huella unidas).

El método comprende además la etapa de calcular el número total de partículas en la muestra a partir del área de la huella completa y el número de partículas por unidad de área derivadas de las imágenes con una resolución lo suficientemente alta como para ver claramente partículas individuales.

El método comprende además la etapa de compensar posiblemente la distribución desigual de partículas radiales de las partículas en la huella para la cual se deriva la información de la adquisición de una serie de imágenes desde la periferia de la huella a través del centro con un aumento suficientemente alto para ver claramente las partículas individuales.

El método comprende además la etapa de calcular la concentración de partículas en la solución usando la estimación total de partículas a partir de la huella, el volumen aplicado y la dilución de la muestra líquida.

El método comprende además la etapa de usar un diluyente del líquido para disolver el sellante en los poros situados directamente debajo de la gota de muestra. La muestra debe estar en forma líquida y el diluyente debe ser compatible con el diluyente y tener la propiedad de disolver efectivamente el sellante que se está utilizando.

El método comprende además la etapa de usar glicina como sellante. Otros sellantes que podrían usarse incluyen, entre otros, sellantes basados en trehalosa/sacarosa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista lateral en alzado esquemática de un dispositivo de vacío de la presente invención.

La Figura 2 es una vista lateral esquemática en sección transversal del conjunto de filtro.

La Figura 3A es una imagen SEM de gran aumento sin procesar de perlas de poliestireno adheridas a un filtro de poli-éter sulfona.

La Figura 3B es una imagen SEM de gran aumento detectada y enumerada de perlas de poliestireno adheridas a un filtro de poli-éter sulfona.

La Figura 3C es una vista de primer plano de la imagen SEM de la Figura 3B anterior.

La Figura 4A es una vista esquemática de un borde de la imagen de la huella de la gota usando SEM (electrones primarios) a gran aumento.

La Figura 4B es una vista esquemática de un borde de la imagen de la huella de la gota usando SEM (electrones primarios) a bajo aumento.

La Figura 5A es una vista lateral esquemática en sección transversal de la membrana de la presente invención con los poros abiertos.

La Figura 5B es una vista lateral esquemática en sección transversal de la membrana mostrada en la Figura 5A pero con los poros sellados.

La Figura 5C es una vista lateral esquemática en sección transversal de la membrana de la presente invención mostrada en la Figura 5B que tiene una gota de muestra depositada sobre la misma.

La Figura 5D es una vista lateral esquemática en sección transversal de la membrana mostrada en la Figura 5C que tiene la gota siendo absorbida en la membrana de la presente invención.

Y la Figura 6 es una vista ampliada de la Figura 5D.

Descripción detallada

El método de la presente invención se describe con referencia a las Figuras 1-6. La Figura 1 es una vista frontal esquemática de una instalación de vacío 100 que tiene un dispositivo de vacío 102 conectado a una cámara de vacío 104 a través de un tubo 106 que se extiende entre ellos. Preferiblemente, el tubo 106 tiene una válvula adecuada tal como una válvula Luer 108. Un vacuómetro 110 está en acoplamiento operativo con la cámara de vacío 104 para medir la presión de vacío en la misma. Un conjunto de filtro 112 está montado mediante un montaje de conjunto de filtro 114 en la parte superior de la cámara de vacío 104. Una membrana de filtro 116 está dispuesta en el conjunto de filtro 112. Un inyector 118 está situado encima de la membrana de filtro 116.

La Figura 2 es una vista esquemática en sección transversal del conjunto de filtro 112. Todo el proceso de análisis de la presente invención puede simplificarse montando previamente la membrana de filtro 116 sobre el soporte de SEM (matriz de alúmina) 120 en vez de hacerlo manualmente cuando la membrana de filtro 116 contiene la muestra/espécimen a analizar y enumerar. El montaje puede hacerse simplemente taladrando un orificio en la matriz 120 del SEM. El uso de tal dispositivo minimiza el riesgo de perder la muestra o dañar la membrana del filtro 116 durante el ajuste previo en el que la membrana del filtro 116 que contiene la muestra se maneja manualmente durante el montaje en la matriz 120 del SEM. Los detalles de la preparación de la membrana de filtro 116 se analizan a continuación. Tal dispositivo analítico consumible pqSEM es de fabricación relativamente barata.

Más en particular, el conjunto de filtro 112 tiene preferiblemente una matriz 120 de alúmina SEM modificada sobre la que se coloca una cinta de montaje 122 de carbono de doble cara. La membrana de filtro porosa sellada 116 se pone encima de la cinta de montaje de carbono 122. El proceso de sellado de la membrana filtrante 116 se describe con detalle a continuación, particularmente con referencia a las Figuras 5-6. El inyector 118, que contiene el espécimen o muestra 124 a analizar, está dispuesto o situado encima de la membrana del filtro 116 y se usa para depositar una gota de muestra 126 en la membrana del filtro 116. Debido a que la matriz 120 está conectada herméticamente al montaje del conjunto de filtro 114 que, a su vez, está montado en la cámara de vacío 104, hay vacío dentro de la matriz 120 de modo que el vacío ejerce una fuerza de succión sobre la membrana del filtro 116 desde debajo del conjunto del filtro 112. Esto se posibilita gracias a que una cavidad o canal alargado 128, definido dentro de la matriz 120, está en comunicación fluida con la membrana del filtro 116 y la cámara de vacío 104. Como se describe más adelante, es importante que el inyector 118 esté dispuesto correctamente sobre la membrana del filtro 116 de forma que cuando la gota de muestra 126 se deposita sobre la membrana de filtro 116, la gota de muestra 126 no está en contacto con los bordes de la membrana de filtro 116 y se coloca directamente sobre una porción de cavidad ampliada 129 que está definida entre el canal 128 y la parte inferior de la cinta de montaje 122. Preferiblemente, la gota 126 se coloca en o cerca del centro de la porción de cavidad 129 que está alineada con un eje longitudinal (L) que se extiende a través del canal 128.

Las Figuras 3A-3C son imágenes de SEM de gran aumento de perlas de poliestireno adheridas a un filtro de poli-éter sulfona. La Figura 3A es una imagen sin procesar 130 y la Figura 3B es una imagen detectada y enumerada 132. La Figura 3C es una vista en primer plano 133 de la vista de la Figura 3B y la sección 131 de la Figura 3A. En estas imágenes de ejemplo, se detectaron 77 partículas en un campo de visión de 131,47 μm^2. Esto corresponde a aproximadamente 0,59 partículas por μm^2. La vista 133 muestra las partículas numeradas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 28, 29, 30.

Las Figuras 4A-4B muestran el borde de la huella de gota fotografiada usando SEM (electrones primarios). La Figura 4A muestra una imagen 134 a gran aumento y la Figura 4B muestra una imagen de huella 136 a bajo aumento. La situación de la imagen de gran aumento 134, que se muestra en la Figura 4A, está marcada con una flecha blanca en la Figura 4B, de forma que la imagen 134 muestra una parte de la imagen de la huella entera 136. El borde de la gota está bien definido con un número insignificante de partículas fuera de la huella. A bajo aumento, se visualiza la huella entera 136 de la gota y se puede medir con precisión el área de la huella. En este ejemplo, el área de la huella (A_{total}) se midió a 8,436 mm^2.

Las Figuras 5A-5D son vistas laterales en sección transversal de la membrana de filtro 116 y describen el proceso de sellado de la membrana de filtro 116 y luego de disolución del sellante. En la Figura 5A, la membrana del filtro 116 tiene poros abiertos 138, definidos entre los miembros alargados 139 de la rejilla de la membrana del filtro 116, que se extiende a través de la membrana del filtro 116. En la Figura 5B, los poros 138 se rellenan con un sellante 140. En la Figura 5C, la gota de muestra 126 de la muestra 124, que es un líquido 144 que contiene partículas 142 a analizar, se deposita sobre la membrana de filtro 116. Preferiblemente, la gota 126 se deposita sobre la membrana de filtro 116 usando el inyector 118 descrito anteriormente. En el contacto de la gota 126 con el sellante 140, el líquido 144 disuelve el sellante 140 que está dispuesto inmediatamente debajo de la gota 126 de forma que el líquido 144 es absorbido y pasa a través de los poros 138 solo dispuestos debajo de la gota 126. Debido a que las partículas 142 que se han de enumerar tienen un tamaño que es mayor que los poros 138 de la membrana, las partículas 142 se depositan en la

parte superior de la membrana del filtro 116 mientras que el líquido y cualquier contaminante menor 144 se absorben o fluyen hacia los poros 138 debajo de la gota 126 a medida que el sellante 140 en esos poros se disuelve y el líquido 144 es sometido a la succión de la cámara alargada 128 de la cámara de vacío 104 debajo de la membrana de filtro 116.

La Figura 6 es una vista ampliada de la membrana de filtro 116 de la Figura 5D. Las partículas sub-visibles 142 descansan sobre la membrana del filtro 116 y las partículas 142 son más grandes que los poros 138a-138j, por lo que no pasan a través de los poros incluso aunque los poros estén abiertos y sometidos a succión desde la cámara de vacío 104 (mostrada en Figura 1). Los poros 138a-d y 138i-j están todavía llenos con el sellante 140 ya que no han sido disueltos por el líquido 144 porque no han estado en contacto con el líquido 144 de la gota de muestra 126 (véase la Figura 5C). Más concretamente, el diluyente, tal como un tampón adecuado, en el líquido 144 disuelve el sellante 140. Como se indicó anteriormente, el diluyente debe ser compatible con la muestra, es decir, debe tener una mínima influencia de la morfología y el estado de agregación del espécimen. El diluyente también debe tener la propiedad de disolver el sellante. Esto es para asegurarse de que el vacío solo se mantiene en la huella y para que la configuración no pierda vacío al "abrir" los poros fuera del área de interés. A medida que el líquido 144 disuelve el sellante 140 dispuesto en los poros 138e-138h, el líquido 144 llena los poros 138e-138h para reemplazar el sellante 140. Esto facilita la enumeración de las partículas 142 porque las partículas 142 se depositan en la parte superior del segmento de filtro 116 y están bien distribuidas a través de la membrana del filtro 116.

Ejemplo

A continuación se muestra un ejemplo ilustrativo del método de preparación de la membrana de filtro 116 de acuerdo con la presente invención.

1. Una muestra, que contiene partículas sub-visibles 142, tales como micropartículas y/o nanopartículas, se prepara para enumeración diluyendo la muestra en serie en un diluyente apropiado (típicamente agua, tampón fosfato, tampón HEPES, tampón TRIS o solución salina tamponada con histidina) dependiendo de las condiciones del tampón de cada muestra en particular.

2. Se puede introducir un agente de fijación (por regla general glutaraldehído o formaldehído) y/o un agente estabilizante (por regla general sacarosa o glicerol) en la solución de muestra diluida 124, que también incluye las partículas sub-visibles 142, para estabilizar y preservar la estructura de las partículas y en algunas muestras evitar la agregación indeseable de las partículas 142. Los agentes de fijación/estabilización y el diluyente corresponden al líquido 144 y junto con las partículas 142 forman la muestra/especimen 124 y la gota de muestra 126. Los agentes de fijación/estabilización se usan para evitar que las partículas 142 se destruyan o se dañen durante el manejo y se adhieran entre sí de forma no deseable, lo que hace más difícil enumerar las partículas 142 más adelante.

3. El conjunto de filtro 112 consiste en la membrana de filtro porosa 116 (normalmente hecha de poli-éter sulfona o policarbonato) con poros 138 que tienen un tamaño de poro definido (normalmente 0 a 15 nm) y una casete de filtro que puede abrirse hecha de plástico o equivalente se usan para separar las partículas 142 del líquido. Un conjunto de filtro adecuado 112 se muestra mejor en la Figura 2. En general, los filtros se adquieren a granel como filtros de un solo uso y, por tanto, necesitan ser montados en algo. Algunos vendedores también venden portafiltros y estos dispositivos están hechos originalmente para conectarse a una jeringa y empujar el líquido a través y, por lo tanto, no aspirar el líquido a través del vacío. Así pues, es necesario montar el filtro en un sistema de filtro para garantizar la integridad del vacío. Después de alguna experimentación, sorprendentemente se llegó a la conclusión de que el filtro podía montarse directamente en el soporte de SEM, lo que ahorra tiempo y evita las etapas críticas de manipular manualmente los filtros que contienen muestras. Es concebible que dicho conjunto se pueda fabricar de manera económica y se pueda vender como un consumible de SEM.

4. El conjunto de filtro 112 está montado en la parte superior de la cámara de vacío de material plástico 104 que a su vez está conectada al dispositivo de vacío 102 a través del tubo 106.

5. El vacío de la cámara de vacío 104 se controla mediante la válvula Luer de 3 vías 108 y se controla utilizando el vacuómetro 110. También se puede implementar un sistema automático que utiliza válvulas magnéticas controladas por un sistema de monitorización electrónico.

6. Los poros 138 de la membrana de filtro 116 se sellan preferiblemente con un sellante 140 tal como glicina (o equivalente) antes de la aplicación de la muestra de la gota de muestra 126, como se muestra mejor en las Figuras 5B y 5C. De manera sorprendente e inesperada se observó que al usar sellante 140 en la membrana de filtro 116, las partículas 142 dentro de la gota 126 se distribuyeron de manera más uniforme (antes de eliminar el líquido 144 de la gota 126), y que no era necesario usar una fuerza de alto vacío para reducir el riesgo de que la gota se extendiera de manera desigual en la membrana del filtro. Se ha de indicar que la distribución de las partículas no tiene que ser la misma en la periferia exterior y en el centro. El patrón de la distribución de partículas se puede determinar escaneando la huella 134/136 (véanse las Figuras 4A-4B) de la muestra de partículas, dispuesta en la membrana del filtro, desde la periferia exterior o el borde exterior 137 de la huella 136 hacia el centro 139 de la huella de la muestra de partículas. Si la porción escaneada de la muestra de partículas muestra un cierto patrón de distribución de partículas, se puede

suponer de modo fiable que el mismo patrón de distribución de partículas se aplica alrededor de toda la huella de la muestra de partículas de forma circular 136, en parte porque se le dio tiempo a las partículas para sedimentarse antes de disolverse el sellante 140 por el líquido de la gota 126. Debido a que la gota 126 se deposita primero en la membrana de filtro sellada 116, el borde exterior 137 de la huella 136 de la gota 126 se vuelve relativamente distinto o afilado, lo cual es importante con el fin de determinar dónde comienza la enumeración y escaneo hacia el centro 139 de la muestra de partículas de forma circular o huella 136 depositada en la membrana filtrante disuelta 116. Inesperadamente se descubrió que las ventajas de la distribución relativamente uniforme de las partículas en la membrana filtrante superaban los inconvenientes de tener que quitar el sellante para permitir que el líquido de la gota fluya a través la membrana del filtro antes de comenzar la enumeración de las partículas. Cualquier periferia desigual o no definida de la huella de la gota en la membrana del filtro hace que sea más difícil determinar la huella de la misma y saber qué área se va a analizar para contar todas las partículas en la gota. Aplicando la gota de muestra 126 sobre la membrana de filtro 116, estando todos los poros 138 sellados por el sellante 140, las partículas 142 se distribuyen uniformemente dentro de la gota 126 a medida que la gota 126 se extiende sobre la superficie superior sellada de la membrana de filtro 116. El requisito de tener que disolver el sellante 140 primero ralentiza el flujo del líquido 144 a través de los poros 138. Al no usar el sellante 140, el líquido 144 de la gota 126 empezaría a fluir inmediatamente a través de los poros 138 y, dado que la gota 126 es la más gruesa en el centro y la más delgada en su periferia, más partículas 142 tienden a situarse en medio de la gota. Esto a menudo da como resultado una distribución desigual de las partículas en la membrana del filtro, y el borde exterior de la huella de la muestra de partículas no está claro. Cabe señalar que no siempre se encuentran más partículas situadas en el medio de la gota porque algunas muestras pueden tener una tendencia a concentrarse hacia la interfase aire-agua. En general, es difícil prever exactamente cómo se comportan y distribuyen las diferentes muestras.

Como se usa toda la huella 136 de la gota de muestra 126 para calcular la concentración de las partículas 142, la gota 126 no debe tocar el borde interior del soporte del filtro de la membrana del filtro 116. Por lo tanto, es importante que solo una parte definida de la membrana de filtro 116 esté cubierta con la gota de muestra 126. Esto es para asegurarse de que se enumeren o se cuenten todas las partículas 142 en la gota 126. Además, la posición de la gota de muestra 126 debe estar alineada con la cavidad 129 y el canal 128 definido dentro de la matriz 120. Sin pretratamiento de la membrana del filtro 116 con sellante 140, los poros del filtro circundante, es decir, los poros 138a-138d y 138i-138j en la Figura 6, permanecen abiertos y el aire fluye alrededor de la gota 126 y a través de la membrana del filtro 116 de forma que la gota de muestra 126 no se absorba y se filtre lo suficientemente rápido como para conseguir una buena distribución de la muestra de las partículas 142. En otras palabras, el uso del sellante 140 tiene la ventaja de crear una periferia externa 137 más clara de la huella 136 de la gota 126 cuando el líquido comienza a disolver el sellante 140 que se deposita debajo de la gota 126. Sin el uso del sellante 140, no hay tiempo suficiente para que las partículas 142 se distribuyan uniformemente dentro de la gota 126 ya que el líquido 144 comienza a fluir inmediatamente a través de los poros 138 sin dar tiempo a las partículas 142 para sedimentarse y distribuirse uniformemente dentro de la gota 126. Así pues, una característica muy importante del sellante 140 es crear una condición de vacío para que se forme una huella de muestra definida. Más concretamente, sin el tratamiento del sellante 140 de acuerdo con la presente invención, la gota 126 se seca de forma no deseada por difusión y evaporación. Esto tiene como resultado una distribución de partículas altamente desigual debido a los efectos del secado. Sorprendentemente se descubrió que la evaporación indeseable puede causar efectos osmóticos que podrían provocar la rotura de partículas y la formación de cristales debido al aumento de la concentración de sal en el resto de la gota. Además, esto oscurece la detección y enumeración de partículas causadas por partículas rotas y partículas que están ocultadas por los precipitados de sal. En la presente invención, cuando se aplica la gota de muestra 126 sobre la membrana de filtro sellada 116, el líquido 144 en la gota de muestra 126 disuelve lentamente el sellante 140 para abrir los poros 138e-138h dispuestos debajo de la gota 126. En consecuencia, el líquido 144 es rápidamente aspirado a través de los poros 138e-138h de la membrana de filtro 116 por el vacío, dando como resultado una buena distribución de la muestra de partículas 142 en la superficie superior de la membrana de filtro 116.

7. Antes de aplicar la gota de muestra 126 sobre la membrana de filtro 116, se activa el dispositivo de vacío 102 y se reduce la presión en la cámara de vacío 104 para crear succión en la membrana de filtro 116. El vacío de la cámara de vacío 104 asegura que el líquido 144 de la gota 126 se absorbe uniformemente sobre la membrana del filtro 116. La combinación del uso del sellante y el vacío da como resultado una distribución uniforme de partículas 142 a través de la huella 136 en la membrana del filtro 116.

8. Se aplica un volumen adecuado (típicamente 5 µl) de la gota de muestra 126 sobre la membrana de filtro porosa y sellada 116. Como se indicó anteriormente, es importante que los diámetros de las partículas 142 sean mayores que el diámetro de los poros 138 de la membrana de filtro 116 y que la gota 126 no toque los bordes del soporte del filtro. Se puede aplicar un volumen superior a 5 µl utilizando un sistema de inyección donde se aplican múltiples gotas o volúmenes más grandes en la misma posición en la membrana del filtro 116. En general, el uso de volúmenes más grandes minimiza el error de muestreo y permite el análisis de muestras menos concentradas.

9. La gota de muestra 126 se absorbe en la membrana de filtro 116 normalmente durante 60 segundos bajo presión de vacío proporcionada por la cámara de vacío 104. Los valores de presión exactos pueden tener que ajustarse en parte dependiendo del tamaño de poro, tipo de muestra, volumen, pureza y viscosidad.

10. Después de la absorción, la membrana de filtro 116 puede separarse del conjunto de filtro 112 montado sobre la matriz de alúmina 120 de SEM (normalmente usando una cinta adhesiva y conductora de carbono 122).

11. La membrana de filtro 116, con las partículas unidas 142 colocadas sobre ella, puede revestirse mediante pulverización catódica, por ejemplo con una película delgada de carbono (típicamente de 20 nm de espesor) usando un evaporador de carbono a una presión de cámara adecuada, típicamente 1 x 10^{-5} mbar. El recubrimiento por pulverización catódica mejora la conductividad de la membrana de filtro 116; aumenta la relación señal/ruido de la membrana de filtro 116 y reduce el daño del haz de electrones y los efectos de carga. Frecuentemente es necesario usar esta técnica para obtener imágenes de un material de filtro usando un SEM. Puede no ser convencional usar revestimiento de carbono, pero proporciona imágenes de SEM de mayor resolución en comparación con el mayor tamaño de grano de la pulverización de metal.

12. La membrana de filtro 116 puede transferirse al SEM y la señal de electrones primarios dispersos (usando un detector “en-lente”) o electrones secundarios (tales como usando un detector SE2) se registra tanto a bajo aumento para cubrir la huella entera como a alto aumento (normalmente de 10.000 a 30.000) para la enumeración. Si se utiliza un patrón de referencia con una firma electrónica secundaria diferente (aunque no es necesario para determinar la concentración de partículas), las partículas de interés pueden distinguirse de las partículas de referencia combinando información de intensidad de diversos detectores (como detectores en lente y SE2).

13. Las imágenes de bajo aumento 136 (véase la Figura 4B) se usan para definir el tamaño de la huella de la gota y la distribución general de la muestra, mientras que las imágenes de alto aumento se usan para determinar la enumeración de las partículas.

14. Las imágenes de gran aumento, como la imagen 134, se adquieren a través de la huella de la muestra comenzando desde el borde 137, a través del centro 139 y hasta el borde opuesto de la gota con el fin de minimizar cualquier efecto de las diferencias en la distribución de partículas a través de la huella de la gota.

15. A partir de las imágenes de bajo aumento, como la imagen 136, el área de la huella de la muestra (A_{total}) se calcula trazando el borde de la huella. Se cuentan los píxeles rodeados y el número obtenido se multiplica por el tamaño del píxel.

16. A partir de las imágenes de gran aumento, se detectan y se cuentan las partículas 142. Este procedimiento se puede realizar mediante marcado manual o marcado automático usando un software adecuado, como el analizador de software patentado de Vironova o cualquier otro software de análisis de imágenes apropiado. El número promedio de partículas por unidad de área (n/A_{FOV}) se calcula a partir del conjunto de datos de imagen.

17. El número de partículas por mL en la muestra de partículas se calcula, preferiblemente, usando la siguiente fórmula:

$$C = A_{total} \times \frac{n}{A_{FOV}} \times df \times \frac{1000\ \mu l}{V\ \mu l}$$

En la que C es la concentración de partículas, *df* es el factor de dilución y *V* es el volumen de muestra aplicado. Cabe también la posibilidad de utilizar una fórmula que tenga en cuenta que la distribución de partículas puede variar desde la periferia de la muestra de partículas a medida que la muestra se escanea hacia el centro de la misma.

En resumen, la técnica de microscopía electrónica cuantitativa de barrido de partículas (pqSEM) de la presente invención es una técnica de detección y enumeración directa de partículas de alta precisión. Una característica importante de la presente invención es que la detección directa no depende de la afinidad entre una sonda y el espécimen que hacen muchas técnicas convencionales existentes. Todos los parámetros, como el factor de dilución, el volumen aplicado o la huella de la gota se pueden controlar y el número de partículas por unidad de área se puede medir directamente mientras se minimiza el error de aproximaciones y suposiciones. Además, el poder de resolución de la pqSEM permite la detección de partículas sub-visibles individuales dentro de los grupos y se pueden enumerar dos poblaciones de partículas de diferentes tamaños u otras características morfológicas a partir de la misma muestra. Las partículas y la huella de las imágenes de alto contraste generadas por la técnica pqSEM de la presente invención se pueden detectar fácilmente usando análisis de imagen automatizado. Esto proporciona los medios para recopilar rápidamente grandes conjuntos de datos y producir resultados estadísticos sólidos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la cuantificación de partículas sub-visibles, que comprende:

proporcionar una membrana de filtro (116) que tiene una diversidad de poros (138) definidos a través de la misma, estando la membrana de filtro (116) en relación operativa con una cámara de vacío (104);

sellar los poros con un sellante (140);

aplicar una gota de muestra (126) que contiene un líquido (144) y partículas sub-visibles (142) sobre la membrana del filtro (116) sin que la gota de muestra (126) toque ningún borde externo de la membrana del filtro (116);

disolviendo el líquido (144) el sellante (140) en los poros (138e-138h) dispuestos debajo de la gota de muestra (126);

fluyendo el líquido (144) a través de los poros en los que se ha disuelto el sellante (140) y permaneciendo las partículas sub-visibles (142) restantes en la parte superior de la membrana del filtro (116); y

siendo enumeradas las partículas sub-visibles (142) en un microscopio electrónico.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además la etapa de premontaje de un conjunto de filtro (112) que contiene la membrana de filtro (116), sobre un soporte de SEM (120).

3. El método según la reivindicación 2, en donde el método comprende además la etapa de poner una cinta de montaje (122) sobre el soporte de SEM (120).

4. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además la etapa de proporcionar el soporte SEM (120) que tiene un canal alargado (128) definido en el mismo, usando un inyector (118) que contiene la gota de muestra (126), y alineando el inyector (118) en la parte superior del canal alargado (128) antes de depositar la gota de muestra (126) en la membrana del filtro (116).

5. El método según la reivindicación 2, en donde el método comprende además la etapa de conectar el soporte SEM (120) a una cámara de vacío (104) conectada a una fuente de vacío (102) y someter la membrana del filtro (116) a una fuerza de succión a través del canal alargado (128).

6. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además la etapa del líquido (144) disolviendo solamente el sellante (140) en los poros (138e-138h) dispuestos inmediatamente debajo de la gota de muestra (126) mientras que los poros adyacentes (138a-138d, 138i-138j) permanecen sellados con el sellante (140).

7. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además la etapa de las partículas sub-visibles (142) formando una huella (136) en la membrana del filtro (116) y escaneando las subpartículas (142) desde la periferia exterior (137) de la huella (136) hacia el centro (139) de la huella (136).

8. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además la etapa de usar un diluyente del líquido (144) para disolver el sellante (140) en los poros situados directamente debajo de la gota de muestra (126).

9. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además la etapa de usar una glicina como sellante (140).

Fig. 1

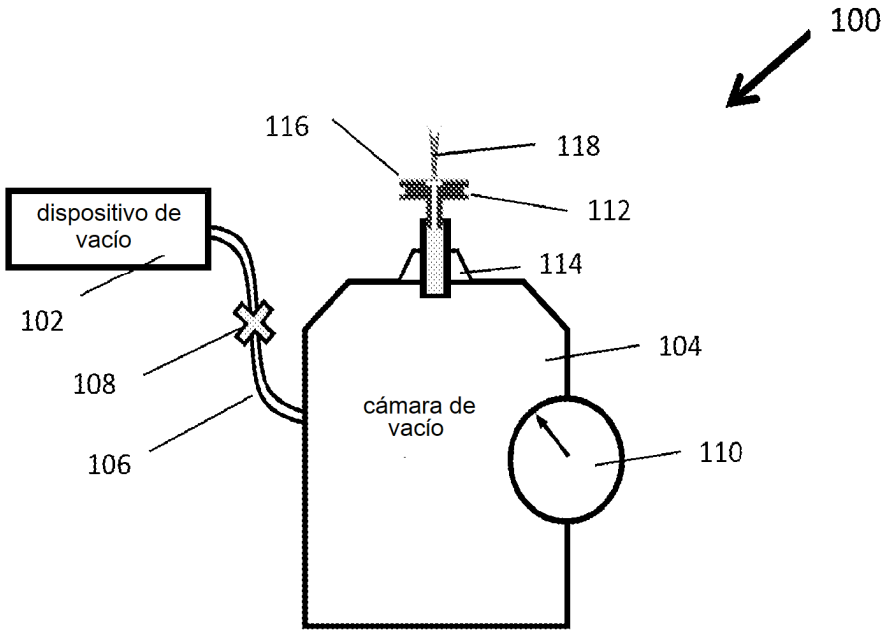

100
116
118
112
dispositivo de vacío
114
102
104
108
cámara de vacío
106
110

Fig. 2

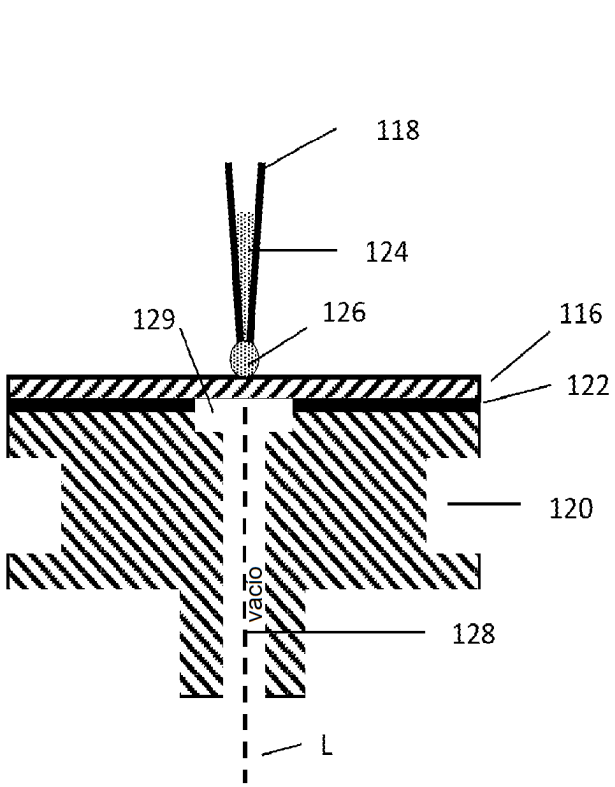

112
118
124
129
126
116
122
120
vacío
128
L

Fig. 3A

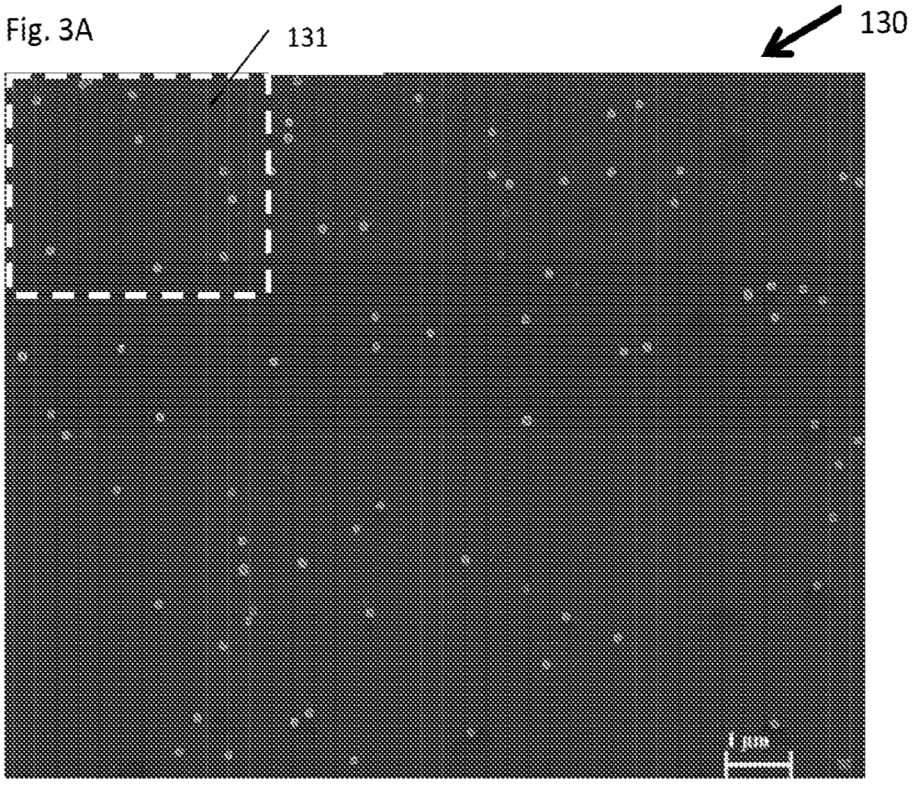


Fig. 3B

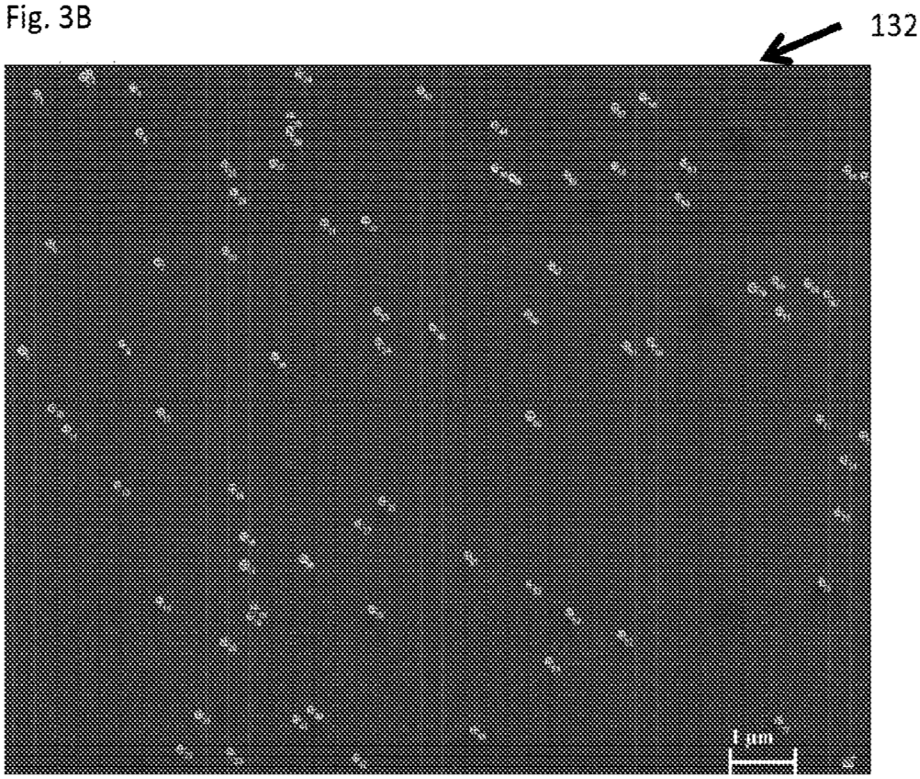


Fig. 3C

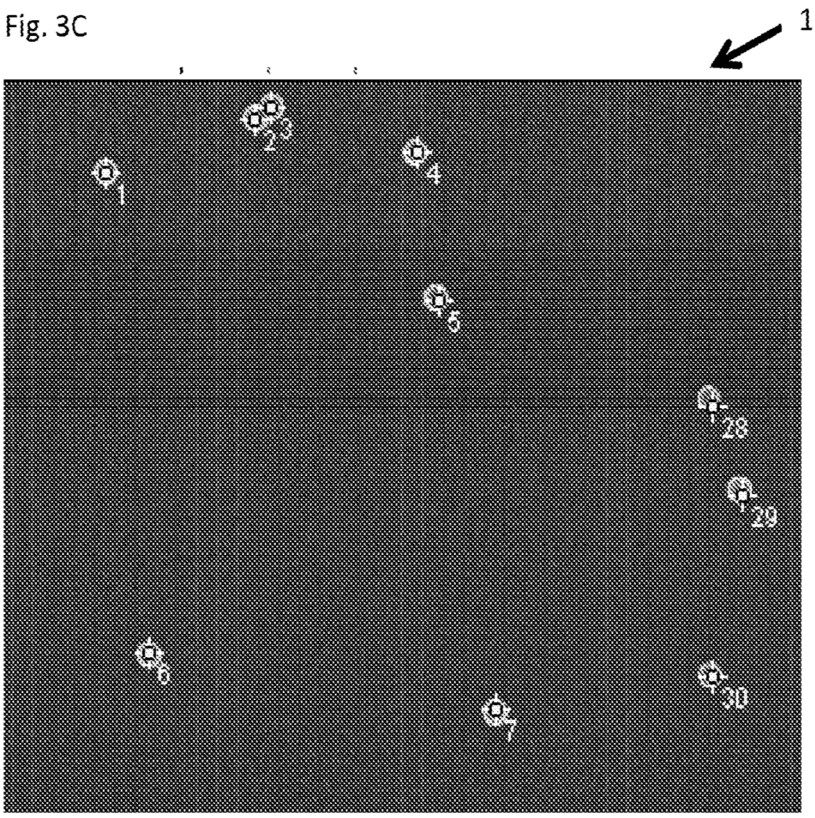


Fig. 4A

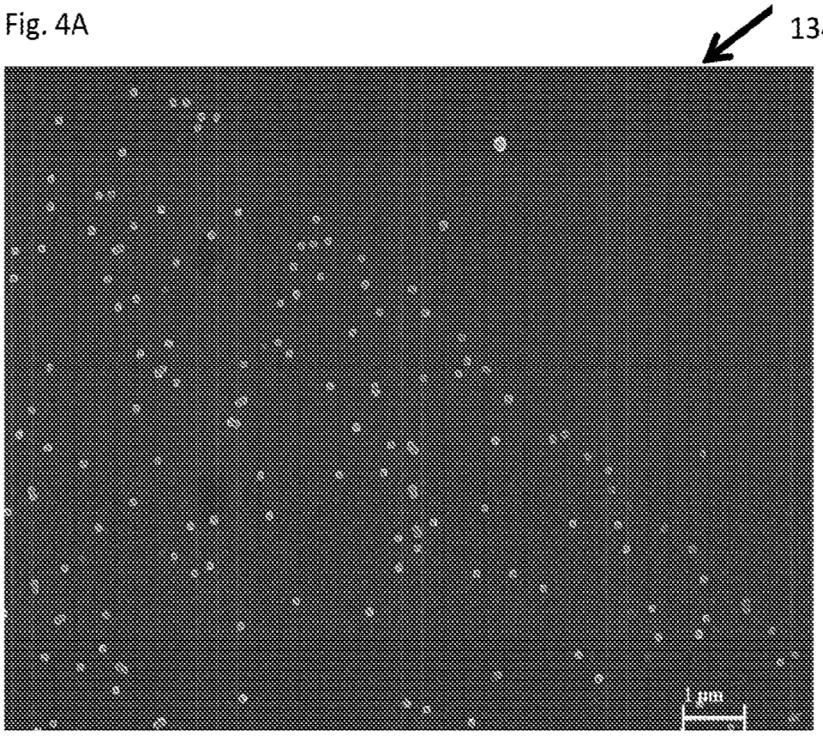


Fig. 4B

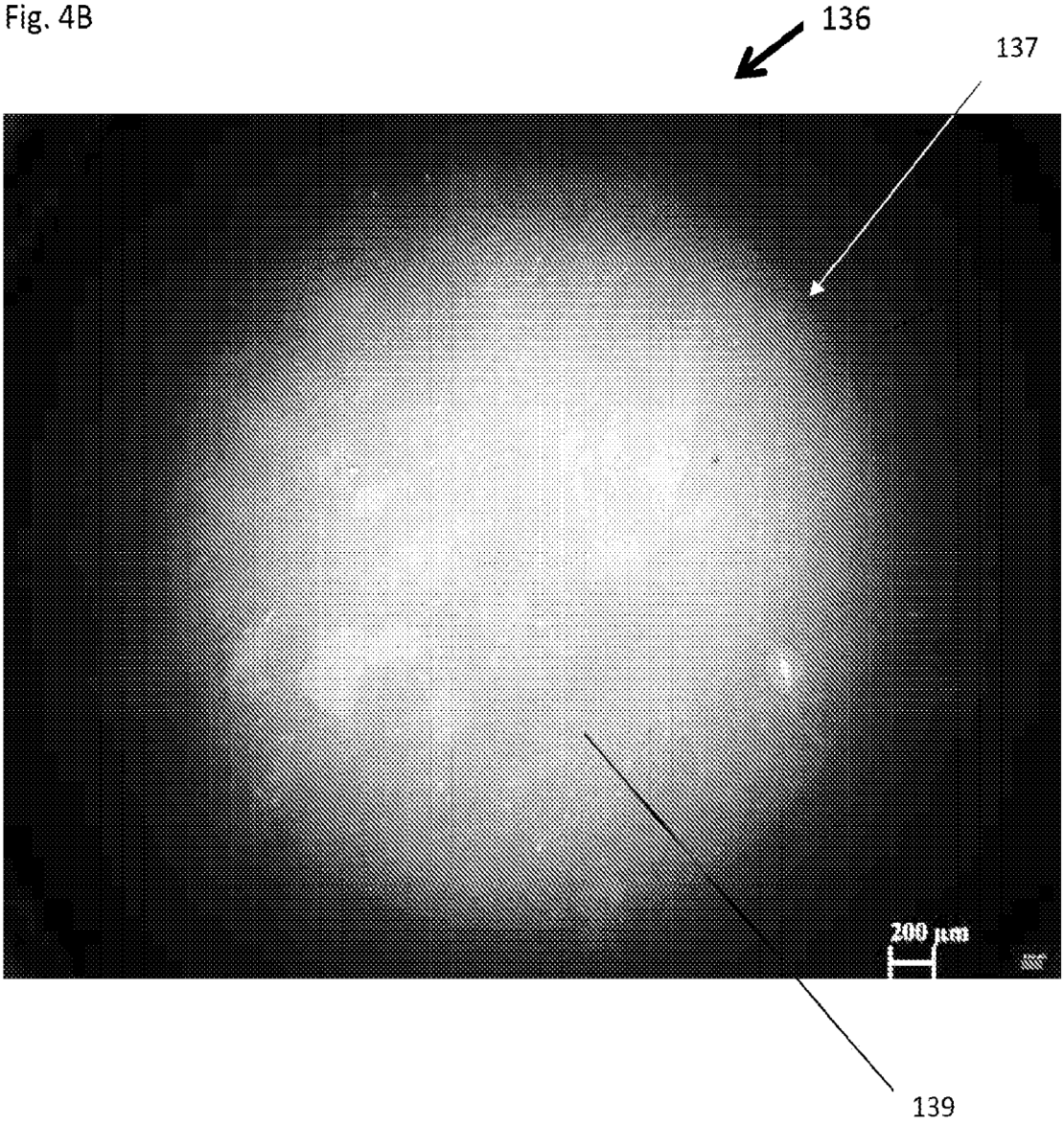


Fig. 5A

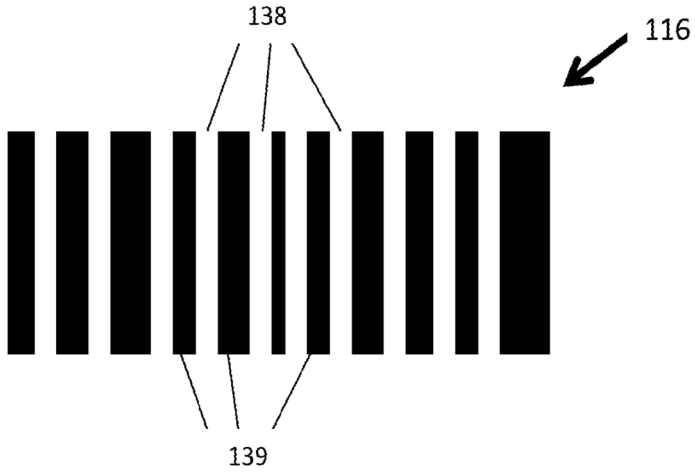


Fig. 5B

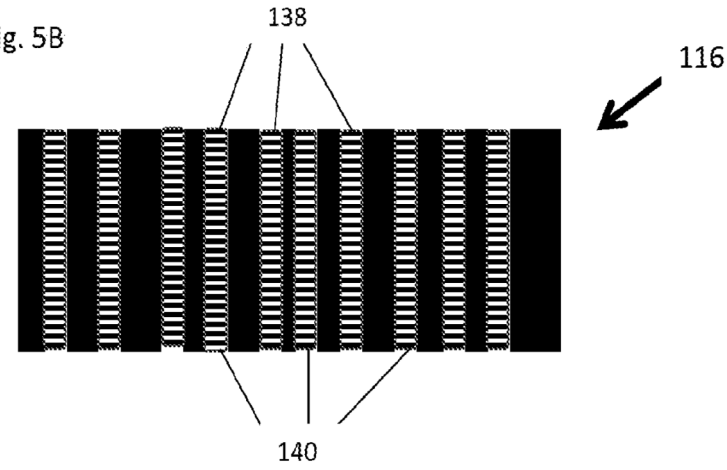


Fig. 5C

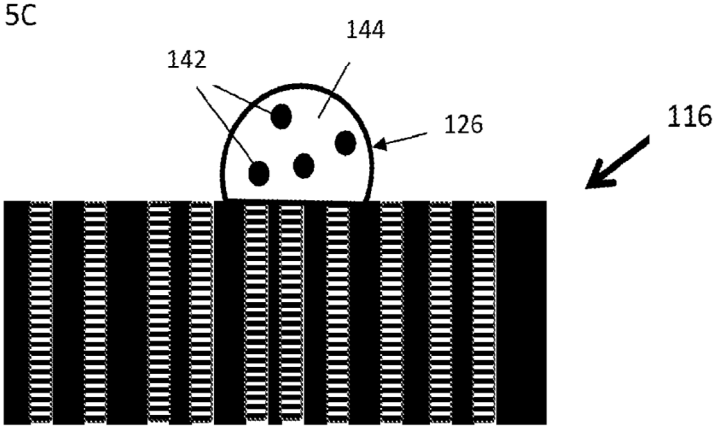


Fig. 5D

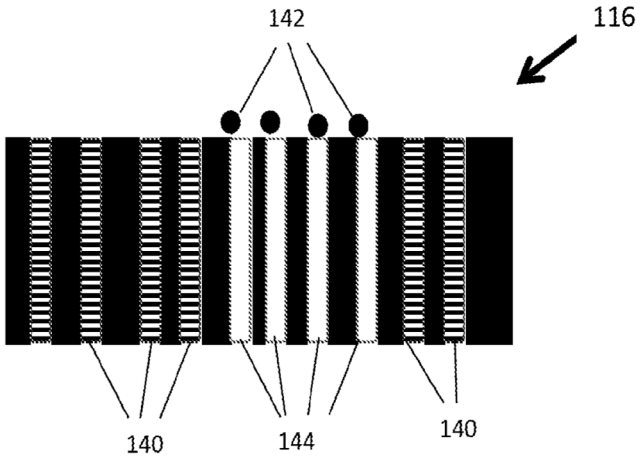
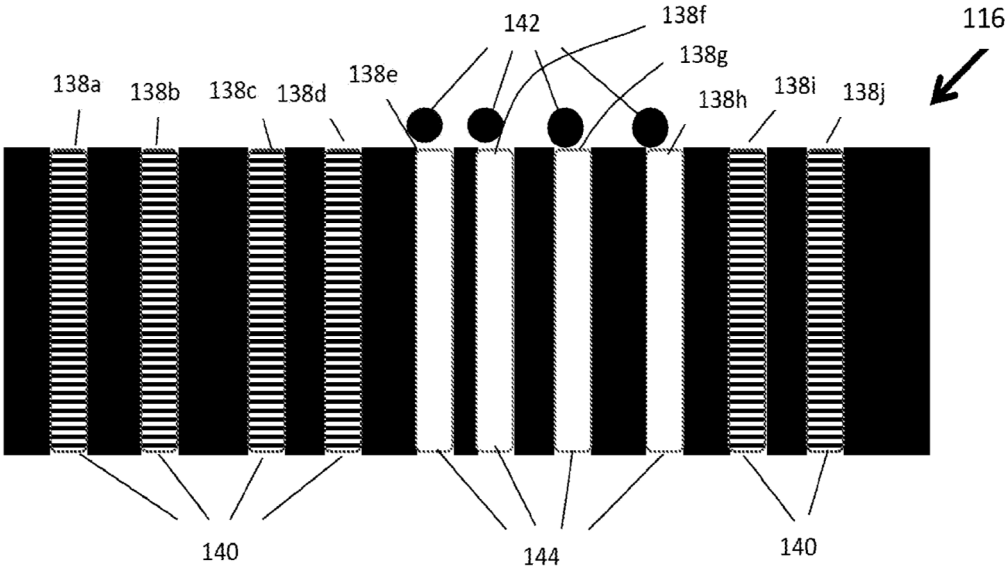

142
116
140
144
140

Fig. 6


142
138f
116
138g
138a
138b
138c
138d
138e
138h
138i
138j
140
144
140