

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 538**

51 Int. Cl.:  
**C07K 1/22** (2006.01)  
**C07K 1/34** (2006.01)  
**C07K 1/36** (2006.01)  
**C12P 1/00** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12M 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04787627 .1**  
96 Fecha de presentación: **06.09.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1661906**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Método de preparación de una solución para análisis proteómico**

30 Prioridad:  
**05.09.2003 JP 2003313567**  
**21.01.2004 JP 2004013257**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2012**

73 Titular/es:  
**TORAY INDUSTRIES, INC.**  
**1-1, NIHONBASHI-MUROMACHI 2-CHOME CHUO-**  
**KU**  
**TOKYO 103-8666, JP**

72 Inventor/es:  
**WADA, Shigehisa;**  
**UTSUMI, Jun;**  
**FUJITA, Yoshiji;**  
**SUGAYA, Hiroyuki y**  
**YAMADA, Satoko**

74 Agente/Representante:  
**Zea Checa, Bernabé**

ES 2 380 538 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Método de preparación de una solución para análisis proteómico

5

**[0001]** La invención se refiere a un método y un aparato de preparación de una solución que contiene componentes biológicos, particularmente una solución que contiene componentes biológicos con composición cambiada obtenidos aislando moléculas biológicas, tales como proteínas extraídas de suero humano, orina, o similares. Especialmente, la invención se refiere a un método y un aparato para la preparación de una solución de componentes biológicos con  
10 composición cambiada, retirando componentes que inhiben la detección de componentes vestigiales, particularmente retirando proteínas con altos pesos moleculares con el fin de realizar el análisis clínico del proteoma.

[Antecedentes de la técnica]

15 **[0002]** Recientemente, la investigación sobre el análisis del proteoma (proteómica) ha comenzado a llamar la atención como investigación postgenómica. Dado que es una suposición muy probable que las proteínas, productos génicos, estén vinculadas más directamente con síndromes de enfermedades que los genes, se han generado grandes expectativas en que los descubrimientos y logros de la investigación del análisis del proteoma de la investigación exhaustiva de las proteínas puedan aplicarse ampliamente para el diagnóstico y la atención médica.  
20 Además, es altamente posible descubrir muchas proteínas que causan enfermedades y factores relevantes para enfermedades, que no pueden descubrirse mediante el análisis del genoma.

**[0003]** El análisis estructural de alta velocidad se ha hecho posible mediante MS (espectrometría de masas) y técnicamente ha contribuido enormemente al rápido avance del análisis del proteoma y a la aplicación práctica de  
25 MALDI-TOF-MS (espectrometría de masas de tiempo de vuelo y desorción/ionización por láser asistida por matriz) ha permitido que el ultramicroanálisis de polipéptidos se realice con un alto rendimiento, y que hace posible identificar incluso proteínas vestigiales que no han sido detectadas convencionalmente y, por consiguiente, se convierte en una potente herramienta para buscar factores relevantes para enfermedades.

30 **[0004]** El primer objetivo de la aplicación clínica del análisis del proteoma es descubrir proteínas biomarcadoras inducidas o eliminadas por enfermedades. El biomarcador se comporta con respecto a síntomas de enfermedades, de modo que puede ser un marcador para el diagnóstico y también muy posiblemente se convierte en una diana para producir productos farmacéuticos. Es decir, dado que es muy posible que los descubrimientos y logros del análisis del proteoma sean aplicables para descubrir un marcador de diagnóstico y una diana para producir  
35 productos farmacéuticos en lugar de un gen especificado, puede decirse que el análisis del proteoma se convierte en una tecnología clave para el diagnóstico y la atención médica en la era postgenómica y, dado que el biomarcador identificado aporta directamente beneficios para los pacientes, es decir, la evaluación de la respuesta a los productos farmacéuticos y expectativas de desarrollo de efectos secundarios, puede decirse que esta técnica desempeña un papel importante para promover la llamada atención médica a medida.

40

**[0005]** En el caso en el que hay que introducir el análisis del proteoma en la investigación clínica, es necesario analizar de forma rápida y fiable un gran número de muestras y, además, dado que cada muestra clínica es escasa en cantidad y muy valiosa, se requiere realizar una medición de alta resolución, alta sensibilidad y altamente funcional. La espectrometría de masas ha impulsado considerablemente el análisis, y las características de los  
45 espectrómetros de masas, es decir, alta sensibilidad y alto rendimiento, han contribuido enormemente al análisis. Sin embargo, aunque las técnicas y aparatos han mejorado rápidamente, la presente situación no está lista aún para realizar de forma sencilla y rápida el análisis del proteoma en un campo clínico.

**[0006]** Una de las causas se atribuye al pretratamiento de muestras clínicas. Es necesario fraccionar y refinar  
50 proteínas de una muestra clínica antes del análisis de masas, y el tratamiento sigue tardando varios días, y la operación del pretratamiento es complicada y requiere experiencia y habilidad y esto se convierte en un gran obstáculo para la aplicación clínica. Si el diagnóstico de una enfermedad en todo el cuerpo y el control de síntomas se han hecho posibles con una pequeña cantidad de sangre y fluido corporal, esto es marcadamente útil. Sin embargo, sigue habiendo muchos desafíos que superar, debido a la variación de proteínas contenidas en el plasma  
55 sanguíneo.

**[0007]** Se supone que hay 100.000 o más tipos de proteínas humanas y aproximadamente 10.000 tipos de proteínas están contenidos en el suero y la concentración de las proteínas totales en el suero es de aproximadamente 60 a 80 mg/ml. Las proteínas contenidas en un suero humano son albúmina (peso molecular: 66 kDa), inmunoglobulina (150  
60 a 190 kDa), transferrina (80 kDa), haptoglobina (>85 kDa) y lipoproteína (varios 100 de kDa) y todas ellas existen respectivamente en una cantidad que supera 1 mg/ml. Por otro lado, muchas proteínas activas fisiológicas tales como hormonas peptídicas, interleuquina y citoquina eran biomarcadores de síntomas y factores relevantes para enfermedades existen en una cantidad mínima inferior a 1 ng/ml y el contenido no es superior a niveles de nano a picométricos en comparación con los de los componentes de alto contenido con altos pesos moleculares. En  
65 términos del tamaño de proteínas, el 70% o menos en todos los tipos de proteínas tiene un peso molecular de

60.000 (60 kDa) o menos y las proteínas biomarcadoras mencionadas anteriormente que existen en una cantidad mínima están casi todas incluidas en este intervalo (referencia al Documento no de Patente N° 1). Dado que estas proteínas son excretadas parcialmente a la orina a través de los riñones, no solamente la sangre sino también la orina puede usarse como muestra.

5

**[0008]** Para realizar el análisis del proteoma mediante investigación serológica general, en primer lugar es esencial retirar componentes de alto peso molecular con un peso molecular de 60.000 o superior, que se convierten en obstáculos para la detección de componentes vestigiales relevantes para causas patógenas, y recuperar proteínas con un peso molecular menor que 15.000 en la medida de lo posible.

10

**[0009]** Actualmente, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (LC) y electroforesis bidimensional (electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional: 2D-PAGE) se han empleado como medios de separación y retirada de las proteínas de alto peso molecular, sin embargo se requieren de 1 a 2 días solamente para la operación de LC y 2D-PAGE. El tiempo necesario para ellas es muy largo en comparación con el tiempo de análisis, varios minutos, para MALDI-TOF-MS y ESI-MS (espectrometría de masas de ionización por electropulverización) y el notable punto ventajoso de que MS, un medio de análisis, tiene un alto rendimiento no puede exhibirse suficientemente en el análisis clínico del proteoma. Por lo tanto, debe decirse que, en el momento presente, la MS es insuficiente en aplicaciones prácticas con el fin de obtener resultados de análisis en un tiempo lo más corto posible para el diagnóstico y la atención médica en campos de tratamiento médico y se convierte en una causa significativa de dificultad de utilización de MS para las investigaciones clínicas cotidianas.

20

**[0010]** Por lo tanto, se espera que la rapidez de diagnóstico de las investigaciones clínicas mediante análisis clínico del proteoma pueda mejorar notablemente si el medio de eliminación de una parte de o de todas las proteínas de alto peso molecular de una muestra se acelera. En la práctica, eso puede conseguirse si se hace disponible un método o un aparato de obtención de una solución que contiene componentes biológicos con una composición cambiada de componentes biológicos mientras se deja un grupo de proteínas pretendidas a partir de una pequeña cantidad de una muestra a una alta velocidad, en lugar de LC y 2D-PAGE.

25

**[0011]** Como productos ya utilizados en la práctica o técnicas descritas para medios de eliminación de una sustancia objeto principal, albúmina, existen un vehículo (comercializado) en el que un ligando de afinidad tal como un colorante azul se inmoviliza, un aparato tubular de centrifugado (comercializado) para fraccionar los componentes de alto peso molecular mediante filtración centrífuga, un método de fraccionamiento mediante principio de electroforesis, un método de precipitación tradicional tal como precipitación en etanol de Cohn, y un método de fraccionamiento mediante cromatografía (referencia al Documento no de Patente N° 2).

30

**[0012]** Sin embargo, todos ellos presentan problemas tales como insuficiencia de la capacidad de separación, inadecuación para una muy pequeña cantidad de una muestra, y contaminación de agentes químicos, que son obstáculos para la espectrometría de masas. Particularmente, un método de retirada de albúmina como diana en solitario mediante adsorción es capaz de retirar albúmina, sin embargo es difícil para el método retirar los componentes de alto peso molecular con un peso molecular de 60.000 o superior, tales como inmunoglobulina.

35

**[0013]** Se han desarrollado membranas de separación con diversos tamaños de acuerdo con la utilización y se han empleado para un riñón artificial, un pulmón artificial y un separador de plasma y también se han mejorado para elevar la afinidad con componentes biológicos (referencia al Documento de Patente N° 2). Sin embargo, no existe ninguna implicación de soluciones a los problemas de la proteómica clínica de que las proteínas de alto peso molecular tales como albúmina tienen que ser retiradas con alta eficacia.

45

**[0014]** Si pudiera desarrollarse un método o un aparato capaz de resolver estos problemas, el análisis del proteoma se realizaría ampliamente en investigaciones médicas y campos de trabajo clínicos y se ha hecho posible realizar investigación y diagnóstico a una mayor velocidad y con una mayor precisión y por consiguiente, se espera que el método o el aparato sea una potente herramienta para investigar causas de enfermedades apenas curables para las que aún no están disponibles métodos de atención médica eficaces, o desarrollar métodos de diagnóstico de estas enfermedades en una fase temprana.

50

**[0015]** Como se ha descrito anteriormente, es necesario retirar el exceso de proteínas de alto peso molecular que son obstáculos en el análisis clínico del proteoma. Hasta la fecha se ha requerido desarrollar un dispositivo que tenga una alta capacidad de separación más conveniente y más rápido que técnicas tales como 2D-PAGE y cromatografía de líquidos, que son complicadas y requieren mucho tiempo.

55

**[0016]** En estos años, un método de uso de un gel, Affi-Gel Blue, (referencia al Documento no de Patente N° 3) y un método de uso de un sistema llamado "Gradiflow" (referencia al Documento no de Patente N° 4) se han descrito como métodos eficaces y mejorados de retirada de albúmina, sin embargo estos aún no son capaces de preparar soluciones para el análisis para obtener mucha más información.

60

**[0017]** Las condiciones requeridas para las técnicas de retirada de albúmina del plasma sanguíneo son que los

65

componentes del plasma sanguíneo se hagan pasar a alta velocidad; que no haya función de desnaturalización de las proteínas; que se realice un procesamiento muy fino para una alta funcionalidad; y que no sean considerablemente costosos. Aún no está disponible ningún aparato ni método que pueda resolver los problemas mencionados anteriormente y cumpla las condiciones.

- 5 [Documento no de Patente N° 1] Anderson NL, Anderson NG, "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects", proteomics (Molecular & Cellular Proteomics), Estados Unidos, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (2002) vol. 1, p. 845-867.  
 [Documento no de Patente N° 2] The Japanese Biochemical Society, "New Biochemical Experiments, vol. 1; Proteins (1) separation · refining · characteristics", TOKYO KAGAKUDOZIN CO., LTD. (1990 [Documento no de Patente N° 3]  
 10 CELL TECHNOLOGY, edición especial, "Illustrated Bioexperiment 5", SHUJUNSHA Co., Ltd. (2001)  
 [Documento no de Patente N° 4] N. Ahmed et al., Proteomics, On-line issue, 23 de junio de 2003  
 [Documento no de Patente N° 5] D. L. Rothmund et al. (2003), Proteomics, vol. 3, p. 279-287  
 [Documento de Patente N° 1] Publicación nacional de Solicitud de Patente Japonesa (abierto a inspección pública) N° 2002-542163  
 15 [Documento de Patente N° 2] Patente japonesa N° 3297707

[Descripción de la invención]

[Problemas a resolver por la invención]

- 20 **[0018]** En vista del anterior estado de la técnica, es un objeto de la invención proporcionar un método y un aparato de preparación de una solución que contiene componentes biológicos con una composición de componentes biológicos cambiada adecuada para el análisis del proteoma separando y retirando el exceso de proteínas de alto peso molecular que son obstáculos en el momento del análisis clínico del proteoma de una solución que contiene  
 25 componentes biológicos.

- [0019]** Por consiguiente, en un primer aspecto la invención proporciona un método de preparación de una solución para el análisis del proteoma que tiene una composición de componentes biológicos cambiada para controlar que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales sea menor de 0,3 y la proporción de concentración  
 30 de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales en la solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos sea de al menos 10 veces la proporción de concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales en la solución que contiene componentes biológicos suministrada a la membrana, como se define en la reivindicación adjunta 1.

- 35 **[0020]** La proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina se define como:

coeficiente de tamizado de  $\beta$ 2-microglobulina,  
 coeficiente de tamizado de albúmina

- 40 **[0021]** Las realizaciones de este aspecto de la invención se refieren a lo siguiente:

1. El método de preparación de la solución mencionada anteriormente, en el que la membrana de separación mencionada anteriormente tiene una proporción de permeación comparativa de 70 o superior.
2. El método de preparación de una cualquiera de las soluciones mencionadas anteriormente, en el que la  
 45 proporción de concentración es menor de 0,1.
3. El método de preparación la solución mencionada anteriormente, en el que la proporción es al menos 100 veces tan elevada.
4. El método de preparación la solución mencionada anteriormente, en el que los componentes biológicos son una solución que contiene proteínas extraídas de sustancias obtenidas de sangre, plasma sanguíneo,  
 50 sueros, orina, ascitis, saliva, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, exudado pleural o células.

- [0022]** En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de análisis de proteínas contenidas en componentes biológicos mediante la preparación de una solución que tiene una composición cambiada de los componentes biológicos mediante uno de los métodos descritos anteriormente y a continuación analizando las  
 55 proteínas contenidas en la solución.

**[0023]** En el presente método de análisis de proteínas, los medios de análisis de proteínas pueden ser al menos uno seleccionado entre espectrometría de masas, análisis electroforético y cromatografía de líquidos.

- 60 **[0024]** Otro aspecto de la invención se refiere a un aparato para preparar una solución para el análisis del proteoma que tiene una composición cambiada de componentes biológicos, en la que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales es menor de 0,3 y la proporción de concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales es al menos 10 veces la proporción de concentración en la solución de partida que contiene componentes biológicos, aparato que es como se define en la reivindicación adjunta 13.

5 **[0025]** Las realizaciones de este aspecto pueden incluir un aparato que contiene un canal de flujo líquido que comprende un módulo que contiene una membrana de separación de polisulfona que contiene canales de flujo que tienen una estructura asimétrica y que tiene una proporción de permeación comparativa de 50 o superior de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina y el módulo tiene una entrada de líquido sin tratar y una salida de líquido sin tratar unida a una trayectoria de flujo del lado de líquido sin tratar de la membrana de separación; un canal de circulación de solución que comunica la entrada de líquido sin tratar y la salida de líquido sin tratar y que tiene una bomba y una entrada para una solución objeto para separación en el medio; y una entrada de solución diluyente formada en una posición aguas arriba de la entrada para una solución objeto para separación o una posición en el medio de la solución.

15 **[0026]** Las realizaciones de este aspecto de la invención se refieren a un aparato para preparar una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos; en el que el aparato comprende al menos dos canales de flujo de líquido como se ha descrito anteriormente; en el que la salida de la solución objeto para separación de un canal de flujo de líquido está conectada directa o indirectamente a una entrada para la solución objeto para separación del otro canal de flujo de líquido.

20 **[0027]** Las realizaciones de la invención pueden proporcionar un método de preparación de una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos para el análisis del proteoma, en la que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales es menor de 0,3 y la proporción de concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales es al menos 10 veces la proporción de concentración en la solución de partida que contiene componentes biológicos, introduciendo una solución que contiene componentes biológicos en el lado del líquido sin tratar de un módulo que contiene una membrana de separación de polisulfona que contiene canales de flujo que tienen una estructura asimétrica y que tiene una proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina de al menos 50, haciendo circular a la solución en el lado del líquido sin tratar a través de una solución formada en el lado exterior del módulo, y extrayendo la solución que pasó a través de la membrana de separación como la solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos; en el que una solución de dilución para la solución que contiene componentes biológicos se introduce adicionalmente en el lado del líquido sin tratar de la membrana de separación dispuesta en el módulo, inmediatamente después de la introducción de la solución que contiene componentes biológicos, y la separación se realiza en la condición que cumple  $0 < Q2/Q1 < 1$  donde Q1 indica la velocidad de flujo de la solución que contiene componentes biológicos introducida en el lado del líquido sin tratar de la membrana de separación y Q2 indica la velocidad de flujo de la solución que pasó a través de la membrana de separación

35 **[0028]** En realizaciones de este método de preparación de una solución,  $Q2/Q1$  puede cumplir  $0,005 \leq Q2/Q1 \leq 0,5$ .

40 **[0029]** En realizaciones adicionales del método de preparación de la solución como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente, la velocidad de flujo Q2 de la solución pasada y la velocidad de flujo total Q3 de la solución que contiene componentes biológicos introducida en el lado del líquido sin tratar y la solución de dilución cumple  $0,5 \leq Q2/Q3 \leq 1,5$ .

45 **[0030]** En el método de preparación de una solución como se ha descrito anteriormente;  $Q2/Q3$  puede ser aproximadamente 1.

**[0031]** En el método de preparación de una solución como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente; puede usarse una solución salina fisiológica o una solución tampón como solución de dilución.

50 **[0032]** En realizaciones del método de preparación de una solución como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente; los componentes biológicos son una solución que contiene proteínas extraídas de sustancias obtenidas de sangre, plasma sanguíneo, sueros, orina, ascitis, saliva, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, exudado pleural o células.

55 **[0033]** En realizaciones adicionales del método de preparación de una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente; se emplean dos módulos y una solución obtenida mediante uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente se usa en un primer módulo y uno cualquiera de los métodos es realizado por el segundo módulo.

60 **[0034]** Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de preparación de una solución para el análisis del proteoma que tiene una composición cambiada de componentes biológicos en la que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales es menor de 0,3 y la proporción de concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales es al menos 10 veces la proporción de concentración en la solución de partida que contiene componentes biológicos, comprendiendo el método someter a la solución que contiene componentes biológicos a tratamiento en al menos dos etapas; caracterizado por que las dos etapas se realizan en combinación y se seleccionan entre (1) una etapa de adsorber una parte de o todas las proteínas que tienen un peso

molecular igual a o superior al de la albúmina; (2) una etapa de retirar una parte de o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento con un tamiz molecular; y (3) una etapa de concentrar proteínas, en el que una membrana de separación de fibra hueca de polisulfona que contiene canales de flujo que tienen una estructura asimétrica y que se obtiene de polisulfona y poli(vinilpirrolidona) y tiene una proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina de al menos 50 se emplea en la etapa (1) o la etapa (2).

**[0035]** En realizaciones del método de preparación de una solución como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente, una membrana de separación que contiene una o más sustancias seleccionadas entre celulosa, acetato de celulosa, un policarbonato, una polisulfona, un éster de ácido (poli)metacrílico, un éster de ácido (poli)acrílico, una poliamida, fluoruro de polivinilideno, poli(acrilonitrilo), polietileno y polipropileno se usa en la etapa (3).

**[0036]** En realizaciones adicionales del método de preparación de una solución como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente, un material que fija una o más sustancias seleccionadas entre un grupo constituido por una polietilenimina, una aminometilpiridina, un polifenol, un colorante azul, un ión metálico divalente, y un compuesto que contiene un grupo alquilo en la superficie se usa en la etapa (1) o la etapa (2).

**[0037]** En realizaciones adicionales del método de preparación de una solución como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente; una o más sustancias seleccionadas entre un grupo constituido por un tensioactivo, un emulsionante, un disolvente orgánico, un alcohol, un etilenglicol, un propilenglicol, una polietilenimina, una aminometilpiridina, sulfato de protamina, sulfato de amonio, un polifenol, un colorante azul, una sal caotrópica, y un compuesto que contiene alquilo se añaden a una solución acuosa en la etapa (1) o la etapa (2).

**[0038]** En un método de preparación de una solución como se ha descrito en uno de los métodos mencionados anteriormente, la solución que contiene componentes biológicos puede contener una muestra de componentes obtenidos de un ser humano.

**[0039]** En el segundo aspecto, la invención proporciona un aparato para preparar una solución adecuada para el análisis del proteoma que tiene una composición cambiada, en la que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales es menor de 0,3 y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales es al menos 10 veces la proporción de concentración en la solución de partida, en el que el aparato comprende al menos dos tipos de medios unidos mediante una trayectoria de flujo y seleccionados entre (1) medio de adsorción de una parte de o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina; (2) medio de retirada de una parte de o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento con un tamiz molecular; y (3) medio de concentración de proteínas y en el que (1) o (2) comprende una membrana de separación de fibra hueca de polisulfona que contiene canales de flujo que tienen una estructura asimétrica que se obtiene de polisulfona y poli(vinilpirrolidona) y tiene una proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina de al menos 50.

**[0040]** Realizaciones de dicho aparato para preparar una solución como se ha descrito anteriormente pueden comprender una trayectoria de salida de flujo de líquido que se conectará a un cromatógrafo de líquidos, un aparato electroforético o un espectrómetro de masas.

45 [Efectos de la invención]

**[0041]** Los métodos y aparatos descritos en la presente memoria hacen posible preparar una solución en un tiempo corto, con la que muchos componentes vestigiales que convencionalmente han sido difíciles de detectar a partir de componentes biológicos tales como sangre, suero y plasma sanguíneo.

50 [Breve descripción de los dibujos]

**[0042]**

55 [figura 1] Una vista esquemática de un sistema de separación usado para los Ejemplos 1 y 3 de la invención (una unidad de separación por membrana).

[figura2] Una vista conceptual de un sistema de separación usado para el Ejemplo 2 de la invención (dos unidades de separación por membrana).

60 [figura 3] Una vista esquemática de un sistema de separación usado para el Ejemplo 4 de la invención (tres unidades de separación por membrana).

[figura 4] Una vista esquemática de un sistema de separación usado para los Ejemplos 5 y 6 de la invención (ejemplo que comprende tres unidades que tienen función de separación por membrana y función de adsorción y una unidad de concentración).

[figura 5] Una vista esquemática un ejemplo del aparato que ilustra la invención.

65 [figura 6] Una fotografía de electroforesis de una solución con una composición cambiada de componentes

biológicos.

[figura 7] Una fotografía de electroforesis bidimensional de una solución con una composición cambiada de componentes biológicos obtenida en el Ejemplo 2.

[figura 8] Una fotografía de electroforesis bidimensional de una solución de suero humano.

5

[Explicación de los símbolos]

**[0043]**

- 10 1 una válvula  
 2 un canal de circulación de solución  
 3 una bomba para la circulación  
 4 un orificio de recuperación de la solución de tratamiento  
 5 un módulo para la primera etapa  
 15 6 un módulo para la segunda etapa  
 7 un módulo para la tercera etapa  
 8 una bomba para inyección  
 100 una bomba para inyección  
 101 una válvula de tres vías  
 20 102 un canal de circulación de solución  
 103 una bomba para circulación  
 104 un orificio de recuperación de una solución tratada en la unidad de separación por membrana  
 105 un módulo de membrana de separación  
 106 un orificio inferior de un módulo  
 25 202 un canal de circulación de solución de segunda etapa  
 203 una bomba para circulación de segunda etapa  
 204 un orificio de recuperación de una solución tratada en la unidad de separación por membrana de segunda etapa  
 205 un segundo módulo de membrana de separación  
 30 206 un orificio inferior de un módulo de segunda etapa  
 302 un canal de circulación de solución de tercera etapa  
 303 una bomba para circulación de tercera etapa  
 304 un orificio de recuperación de una solución tratada en la unidad de separación por membrana de tercera etapa  
 35 305 un tercer módulo de membrana de separación  
 306 un orificio inferior de un módulo de tercera etapa  
 402 una solución de un canal de circulación de una unidad de concentración  
 403 una bomba de circulación de una unidad de concentración  
 404 una salida de filtrado de una unidad de concentración  
 40 405 un módulo de membrana de concentración  
 406 un orificio inferior de un módulo para concentración  
 407 un orificio de recuperación de la solución de tratamiento de una unidad de concentración

[Mejor modo de realizaciones de la invención]

45

**[0044]** En primer lugar, se describirán partes comunes en la invención.

**[0045]** “Una solución con una composición cambiada de componentes biológicos” en la invención significa una solución obtenida tratando a una solución que contiene componentes biológicos que es una solución obtenida de un organismo vivo, tal como sangre, como una solución sin tratar, mediante un tratamiento específico y cambiar de este modo la composición de proteínas. “Sangre” en la presente memoria significa sangre de animales, por ejemplo ser humano, e incluye soluciones que contienen partes de componentes, por ejemplo suero y plasma sanguíneo, en sangre. “Una solución obtenida de un organismo vivo” incluye una solución que contiene sustancias, por ejemplo proteínas, relevantes para un organismo vivo y puede ejemplificarse una solución obtenida extrayendo proteínas de sangre así como orina, saliva, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, ascitis, exudado pleural o células.

**[0046]** “Un módulo de membrana de separación” en la invención comprende una membrana de separación almacenada en una carcasa. La carcasa tiene una entrada a través de la cual una solución a separar se introduce y una salida a través de la cual una solución separada que pasa a través de la membrana de separación se descarga. El material de la carcasa no está particularmente limitado y puede ejemplificarse una carcasa hecha de plástico tal como un policarbonato, polipropileno, poliestireno, una polisulfona y una poliétersulfona.

**[0047]** La solución obtenida de acuerdo con la invención cambiando la composición de una solución que contiene componentes biológicos se usa preferiblemente para el análisis de proteínas, particularmente análisis del proteoma. El método de análisis no está particularmente limitado y LC, 2D-PAGE, resonancia magnética nuclear (RMN), MALDI-TOF-MS, y ESI-MS pueden ejemplificarse. Estos métodos son métodos de análisis cuya sensibilidad de

análisis se reduce si la solución contiene un alto contenido de proteínas tales como albúmina, que existe en una gran cantidad en algunas de las soluciones, y el uso de la solución obtenida de acuerdo con la invención hace posible un análisis altamente sensible. Además, la solución es ventajosa para el análisis del proteoma usando MS o electroforesis. La MS a la que un aparato de preparación de solución de la invención está directa o indirectamente conectado no está particularmente limitada y preferiblemente pueden ejemplificarse un tipo de ionización por electropulverización, un tipo de ionización a presión atmosférica, un tipo de cuadrupolo (QQQ), un tipo de sector magnético, un tipo de tiempo de vuelo, tipo MS/MS, MSn, FT-MS, un tipo de captura de iones, y un tipo de sus combinaciones. Además, el aparato también puede incluir un tándem MS como MS/MS y MSn (por ejemplo MS3). En el caso del tándem MS, todos los tipos de MS son útiles y particularmente, el uso en combinación de dispositivos de sector, por ejemplo tipo de captura de iones, tipo de cuadrupolo de tiempo de vuelo (Q-TOF), FT-MS, y cuadrupolo y captura de iones proporciona una alta eficacia. Por consiguiente, se ha hecho posible la detección selectiva de picos generados en medición mediante MS/MS y/o MSn.

**[0048]** La información estructural de diversos tipos de componentes de proteínas vestigiales puede recogerse si una solución obtenida mediante los métodos de refinar aparatos de la invención y los aparatos de análisis mencionados anteriormente se emplean y se realizan desarrollos adicionales. La información incluye no solamente huella de masas peptídicas (PMF) sino también información sobre la estructura primaria (secuencias de aminoácidos) de péptidos respectivos.

**[0049]** A continuación, se describirá la invención.

**[0050]** En la invención, para obtener una solución con una composición cambiada de componentes biológicos y que tiene una proporción de concentración de albúmina especificada de menos de 0,3, se emplea un método que implica etapas de suministrar una solución que contiene componentes biológicos a una membrana de separación que tiene una proporción de permeación comparativa, que es un valor calculado dividiendo un coeficiente de tamizado de  $\beta$ 2-microglobulina por el de albúmina, de 50 o superior y recoger la solución pasada a través de la membrana de separación. Para el método, se usa un aparato que tiene un módulo que contiene una membrana de separación que tiene una proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina de 50 o superior y que tiene una entrada de líquido sin tratar para la solución que contiene componentes biológicos en el lado del líquido sin tratar de la membrana de separación y una salida del filtrado pasado a través de la membrana de separación. En el módulo del aparato mencionado anteriormente, el módulo puede tener una salida de líquido sin tratar para la solución que contiene componentes biológicos en el lado del líquido sin tratar de la membrana de separación.

**[0051]** La proporción de permeación comparativa de la membrana de separación es preferiblemente de 70 o superior y más preferiblemente de 140 o superior y, aunque no hay ningún límite superior particular, sin embargo si este valor es tan alto, la cantidad de recuperación de proteínas deseadas con un peso molecular menor que 15.000 puede reducirse posiblemente y, por lo tanto, éste es preferiblemente de 10.000 o inferior. Una membrana de fibra hueca se selecciona para usarla como la membrana de separación. Con el fin de filtrar proteínas, se han empleado muchas membranas de fibra hueca como materiales de módulos de diálisis denominados convencionalmente como riñón artificial. Las membranas de separación a usar para el riñón artificial están diseñadas para impedir que proteínas tales como albúmina pasen y penetren en componentes de bajo peso molecular tales como creatinina y urea en la medida de lo posible y, por consiguiente, se emplea para purificar sangre conduciendo a la sangre al interior de las fibras huecas y descargando proteínas de bajo peso molecular innecesarias para un organismo vivo fuera del exterior de las fibras huecas. En la membrana de separación de la invención, una técnica de hacer pasar a una solución objeto desde el interior de las fibras huecas hasta el exterior a través de la membrana de fibra hueca es preferible. Particularmente, un método de obtención de una solución impidiendo que componentes de alto peso molecular tales como albúmina pasen al interior de las fibras huecas y permitiendo, por otro lado, que principalmente proteínas con un peso molecular de 15.000 pasen a través de las fibras huecas es preferible. Aunque pueden obtenerse resultados similares incluso aunque se use una membrana de separación de tipo membrana plana, la utilización de la membrana de fibra hueca hace fácil agrandar el área de superficie por cantidad de solución de tratamiento y reduce la pérdida de presión en la operación, dando como resultado la eficaz ejecución de la invención.

**[0052]** El material de la membrana de separación a usar en la invención no está particularmente limitado y los materiales utilizables son aquellos que contienen uno o más tipos de polímeros seleccionados entre un grupo constituido por polímeros tales como polisulfonas y poliétersulfonas. Entre ellos, las polisulfonas usadas ampliamente en estos años para dializadores son materiales preferibles debido a una excelente propiedad de fraccionamiento de las polisulfonas. En términos de la estructura de membrana, los canales de flujo en el interior de la membrana de separación tienen una estructura asimétrica y preferiblemente tienen una estructura asimétrica multicapa compuesta por una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y que mantiene la resistencia de la membrana. La estructura asimétrica se juzga mediante observación de la estructura de sección transversal de la membrana con un microscopio electrónico en la condición de observación de 1.000 aumentos. La estructura se juzga en base a si hay tanto una capa en la que apenas se observan vacíos como una capa en la que se observan vacíos en la dirección de grosor de la membrana. Si se observa la existencia de ambas capas, la estructura asimétrica se certifica.

**[0053]** En la estructura asimétrica, es preferible que los vacíos que existen cerca de la cara con la que una solución sin tratar se va a poner en contacto sean los más densos. Esto es debido a que el bloqueo en la superficie de la membrana con solutos puede suprimirse.

5

**[0054]** Es preferible que la membrana de separación a usar para la invención absorba proteínas lo menos posible y desde dicho punto de vista, una membrana que tiene una superficie hidrófila es preferible. Particularmente, la membrana hidrófila es eficaz para suprimir la adsorción de proteínas que dan importante información mediante análisis del proteoma y recuperar las proteínas sin pérdida de valor. La membrana hidrófila no está particularmente limitada si una membrana se fabrica para ser hidrófila y son ejemplos de la membrana aquellos obtenidos copolimerizando un monómero hidrófilo y un monómero hidrófobo, mezclando un polímero hidrófilo y un polímero hidrófobo y formando películas a partir de la mezcla, uniendo o pegando un polímero hidrófilo a una membrana hecha de un polímero hidrófobo, y tratando la superficie de una membrana de un polímero hidrófobo mediante tratamiento químico, tratamiento con plasma y tratamiento con radiación. La estructura química que da el componente hidrófilo es proporcionada por polímeros hidrófilos, incluyendo concretamente, poli(vinilpirrolidona).

**[0055]** Además, si fuera necesario, puede realizarse una etapa de concentrar proteínas retirando un disolvente tal como agua de la solución obtenida por filtración mediante lo anterior.

**[0056]** En la etapa de concentración, la concentración se realiza separando y tamizando usando una película porosa, que puede ser un filtro plano y una membrana de fibra hueca, que tiene un efecto de un tamiz molecular. En el caso en el que la cantidad de una muestra sea pequeña, se usa un dispositivo de concentración comercializado existente que comprende un filtro plano unido a un tubo para la separación por centrifugado y en el caso en el que la cantidad de una muestra es una cantidad grande, es eficaz usar fibras huecas.

25

**[0057]** El material a usar para la etapa de concentración no está particularmente limitado y son ejemplos utilizables materiales que contienen uno o más polímeros seleccionados entre un grupo constituido por polímeros de tipo celulosa tales como celulosa y triacetato de celulosa; policarbonatos; polímeros de polisulfona tales como polisulfonas y poliétersulfonas; ésteres de ácido (poli)metacrílico tales como metacrilato de (poli)metilo; ésteres de ácido (poli)acrílico; poliamidas; fluoruro de (poli)vinilideno; poliacrilonitrilo; poliésteres; polietileno; y polipropileno. Entre ellos, las polisulfonas usadas ampliamente en estos años para dializadores son materiales preferibles, dado que las polisulfonas dan membranas que tienen una excelente propiedad de fraccionamiento y alta permeabilidad al agua.

**[0058]** Con respecto a la estructura de la membrana a usar en la etapa de concentración, pueden usarse ambas de una membrana que tiene una estructura de esponja, una estructura uniforme y una membrana asimétrica que tiene una estructura multicapa compuesta por una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y que conserva la resistencia de la membrana. Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular de la membrana a usar en la etapa de concentración, es preferible usar una membrana o una membrana de ultrafiltración que tiene una capacidad de fraccionamiento molecular para impedir que los péptidos pasen a la solución salina fisiológica, por ejemplo, que tiene un valor límite de 0,5 kDa o inferior, preferiblemente de 0,1 kDa.

**[0059]** Se requiere que la solución pretendida que tiene una composición cambiada de los componentes biológicos preparada mediante la invención tenga una alta proporción de proteínas con un peso molecular de 15.000 o inferior y como un índice de la proporción de existencia en la invención, se emplea  $\beta$ 2-microglobulina que tiene un peso molecular de 1.1600. También se requiere que contenga menos proteínas que tienen un alto peso molecular tales como albúmina e inmunoglobulinotransferrina, y albúmina que tiene un peso molecular de aproximadamente 60.000 se emplea como índice. La razón para seleccionar albúmina como índice es debido a que, en el caso de la sangre, la cantidad de albúmina es la más alta y generalmente si la albúmina se retira suficientemente, la inmunoglobulina o similares que tienen un peso molecular más alto pueden retirarse simultáneamente mediante un método de uso de una membrana.

**[0060]** Para realizar de forma excelente el análisis del proteoma usando la solución obtenida que tiene una composición cambiada de componentes biológicos, la proporción de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales de la solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos con respecto a  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales de la solución que contiene componentes biológicos es de al menos 10 veces, más preferiblemente de al menos 100 veces, y aún más preferiblemente de al menos 1.000 veces. Esto es debido a que la cantidad de proteínas a inyectar en un aparato tal como un espectrómetro de masas está limitada y la sensibilidad de la medición puede mejorar.

**[0061]** De esta manera, puede obtenerse la solución con una baja proporción de composición de proteínas que tienen un peso molecular de 60.000 o superior en las proteínas totales y para realizar un análisis altamente sensible, la proporción de composición de albúmina en las proteínas es deseablemente menor de 0,3, más deseablemente menor de 0,1, y aún más deseablemente menor de 0,01.

**[0062]** En lo sucesivo en la presente memoria, se describirán ejemplos de un elemento del primer aspecto de la

invención en referencia a los dibujos.

**[0063]** La figura 1 es un dibujo conceptual que muestra un ejemplo de un aparato para preparar una solución de la primera invención. La flecha muestra el flujo de una solución. Una muestra, que es tal como suero que contiene componentes biológicos o una solución que contiene componentes biológicos que contiene suero se inyecta en un primer módulo de membrana de separación 105 que tiene una membrana de separación que tiene una proporción de permeación comparativa especificada para la primera etapa a través de una válvula de tres vías 101 desde una bomba 100 para inyección; es enviada a una solución 102 hecha de un tubo mediante una bomba de circulación 103; y se hace circular allí. El filtrado que pasó a través de la membrana de separación en la primera etapa se obtiene en el orificio de recuperación de solución tratada en la unidad de membrana 104 en la primera etapa, que es un orificio de descarga del filtrado. Esta realización es una unidad básica de una etapa. Por consiguiente, puede obtenerse una solución deseada para el análisis del proteoma. En el caso en el que se desea retirar adicionalmente proteínas con un alto peso molecular, pueden unirse una pluralidad de módulos. La figura 2 muestra un ejemplo para tratar con un tratamiento de dos etapas uniendo dos módulos y la figura 3 muestra un ejemplo para tratar con un tratamiento de tres etapas uniendo tres módulos. El filtrado es inyectado a una unidad de la siguiente etapa a través de un tubo unido directamente al orificio de recuperación de solución tratada de la unidad de separación por membrana, un orificio para el filtrado. La solución pretendida se obtiene a través de un orificio de recuperación de una unidad en la parte más aguas abajo de la etapa (el orificio 104 en el aparato de la figura 1, el orificio 204 en el aparato de la figura 2, y el orificio 304 en el aparato de la figura 3).

**[0064]** La figura 4 muestra un aparato obtenido comprendiendo además un módulo adicional que tiene una función de concentración unido al aparato de la figura 3 y la solución pretendida se recupera a través de un orificio de recuperación de la solución tratada 407 de la unidad de concentración.

**[0065]** A continuación, se describirá un segundo elemento de un aspecto de la invención.

**[0066]** En el segundo elemento, un método de preparación de una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos usando un módulo que contiene una membrana de separación introduciendo una solución que contiene componentes biológicos en el lado del líquido sin tratar de la membrana de separación, haciendo circular a la solución en el lado del líquido sin tratar a través de un canal de circulación de líquido formado en el exterior del módulo, y extrayendo la solución pasada a través de la membrana de separación se caracteriza por que una solución de dilución para la solución que contiene componentes biológicos se introduce adicionalmente en el lado del líquido sin tratar de la membrana de separación dispuesto en el módulo después de la introducción de la solución que contiene componentes biológicos. Además, en este segundo elemento de la invención, el medio de preparación de la solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos comprende un módulo que contiene una membrana de separación dispuesta en su interior y que tiene una entrada de líquido sin tratar y una salida de líquido sin tratar unidas a una trayectoria de flujo del lado de líquido sin tratar de la membrana de separación y una salida del filtrado de la membrana de separación; un canal de circulación de solución que comunica la entrada de líquido sin tratar y la salida de líquido sin tratar y que tiene una bomba y una entrada para una solución objeto para separación en el medio; y una entrada de solución diluyente formada en una posición aguas arriba de la entrada para una solución objeto para separación o una posición en el medio de la solución.

**[0067]** También en este aspecto, la membrana de separación es una membrana de separación porosa y pueden usarse ambas de una membrana de separación de tipo membrana plana tal como un filtro plano y un filtro de tipo cartucho y una membrana de separación de tipo hueco tal como una membrana de fibra hueca. Particularmente, la membrana de fibra hueca tiene una elevada área de superficie de membrana por unidad de cantidad de tratamiento y una baja pérdida de presión y, por lo tanto, es preferible usar la membrana para mejorar la eficacia. Para incrementar el área de superficie de membrana por unidad de cantidad de tratamiento, es preferible que el diámetro interno de fibras huecas sea pequeño y sea preferiblemente de 1.000  $\mu\text{m}$  o menor y más preferiblemente de 500  $\mu\text{m}$  o menor. El filtro plano tiene un punto ventajoso en que el filtro de membrana puede formarse de forma fácil y económica. Como material para las membranas, polisulfonas usadas ampliamente en estos años para dializadores son materiales seleccionados debido a una excelente propiedad de fraccionamiento de las polisulfonas.

**[0068]** En la membrana de separación a usar en el segundo elemento de la invención, es necesario usar una membrana de separación que tiene una proporción de permeación comparativa de 50 o superior de proteínas que tienen un peso molecular de menos de 15.000 y proteínas que tienen un peso molecular de 60.000 o superior. Otras propiedades y formas preferibles son las mismas que las descritas para la membrana de separación para el primer grupo de la invención.

**[0069]** En el segundo elemento de este aspecto de la invención, la invención relevante a la preparación de la solución implica introducir una solución que contiene componentes biológicos en el lado del líquido sin tratar de la membrana de separación y seguidamente introducir un diluyente para la solución que contiene componentes biológicos. Esto es debido a que la adición de la solución diluyente impide la concentración excesiva de los componentes biológicos sobre la superficie de la membrana y suprime el deterioro de la proporción de permeación comparativa de la membrana de separación. Además, es preferible usar una solución salina fisiológica o "una solución tampón" como solución diluyente. Los ejemplos de "la solución tampón" pueden incluir MES, BIS-TRIS, ADA, ACES, PIPES, MOPSO, BIS-TRIS, PROPANE, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, MOBS, TAPSO, TRIZME,

HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, TRICINE, GLY-GLY, BICINE, PBS, TAPS, AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS, y CABS. Las soluciones tampón mencionadas anteriormente están abreviadas y los contenidos detallados pueden conocerse remitiéndose a catálogos y MSDS (ficha de datos de seguridad del material) de compañías de producción de reactivos tales como Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y Sigma-Aldrich Japan Co. Ltd.

**[0070]** La velocidad de flujo Q1 de la solución que contiene componentes biológicos a introducir en un módulo significa una velocidad de flujo de una solución conducida al módulo y que fluye en el canal y es preferible que sea mayor que la velocidad de flujo Q2 de la solución separada a enviar. Esto es para impedir la concentración de la solución en la superficie de la membrana de separación; impedir la deposición de sustancias sobre la superficie de la membrana; e impedir la obstrucción de poros de la membrana. Además, la proporción Q2/Q1 de la velocidad de flujo Q1 de la solución conducida al módulo de membrana de separación y la velocidad de flujo Q2 de la solución separada a enviar es preferiblemente de 0,5 o inferior. Además, en el caso en que la proporción Q2/Q1 de la velocidad de flujo Q1 de la solución conducida al módulo de membrana de separación y la velocidad de flujo Q2 de la solución separada a enviar es 0, la filtración no se realiza y las sustancias son transferidas solamente mediante difusión y la velocidad de separación es lenta, de modo que la proporción es deseablemente de 0,005 o superior.

**[0071]** Es deseable que la velocidad de flujo Q2 de la solución que pasa a través de la membrana de separación y la velocidad de flujo Q3 de la solución diluyente conducida al módulo cumplan la inequación de  $0,5 \leq Q2/Q3 \leq 1,5$  Q2/Q3 está preferiblemente en un intervalo de 0,9 a 1,1, que es de aproximadamente 1.

**[0072]** Una solución de la que se retiran proteínas con un alto peso molecular y que es adecuada para el análisis del proteoma puede prepararse haciendo a dos módulos utilizables y obteniendo una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos introduciendo adicionalmente la solución diluyente como se ha descrito anteriormente en un primer módulo y obteniendo una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos introduciendo la solución obtenida en un segundo módulo e introduciendo simultáneamente la solución diluyente. Además, tercer y cuarto módulos adicionales pueden hacerse utilizables y pueden realizarse las mismas etapas.

**[0073]** En base a la necesidad, puede realizarse una etapa de concentrar proteínas retirando un disolvente tal como agua de una solución obtenida en la etapa mencionada anteriormente usando un módulo o una etapa usando una pluralidad de módulos, para obtener una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos. Los materiales, la estructura y la capacidad de la membrana a usar para la etapa de concentración son las mismas que las descritas en la explicación de la etapa de concentración en el primer grupo de la invención.

**[0074]** A continuación, se describirá un aspecto de la invención de las reivindicaciones adjuntas.

**[0075]** De acuerdo con este aspecto, una solución que contiene una gran cantidad de proteínas pretendidas puede prepararse eficazmente implicando al menos dos etapas de entre tres etapas de tratar proteínas mediante adsorción, fraccionamiento mediante tamizado y concentración.

**[0076]** Un método de preparación de una solución de acuerdo con este aspecto de la invención se caracteriza por que implica al menos dos etapas seleccionadas entre (1) adsorber proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina; (2) retirar una parte de o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento usando un tamiz molecular; y (3) concentrar proteínas.

**[0077]** Un aparato para preparar una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos a partir de una solución que contiene componentes biológicos en este aspecto de la invención comprende al menos dos medios seleccionados entre medios de (1) adsorción de una parte de o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina; (2) retirada de una parte de o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento usando un tamiz molecular; y (3) concentración de proteínas y los medios seleccionados se unen entre sí a través de una trayectoria de flujo. Lo mencionado anteriormente tiene preferiblemente una trayectoria de salida de flujo de una solución a unir a un cromatógrafo de líquidos, un aparato electroforético o un espectrómetro de masas en términos de la conveniencia del análisis de proteínas.

**[0078]** La albúmina, cuyo peso molecular tiene que ser un patrón en este aspecto de la invención incluye albúmina obtenida de ser humano, bóvidos, otros mamíferos y aves, y puede determinarse de acuerdo con un organismo vivo objeto y en la invención, se prefiere albúmina humana como patrón. Proteínas que tienen un peso molecular igual a o superior al de la albúmina significan principalmente proteínas que tienen un peso molecular de al menos 60.000 a 70.000, superior al de la albúmina. Si el peso molecular es superior o no al de la albúmina puede determinarse mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico).

**[0079]** En lo sucesivo en la presente memoria, se describirán tres etapas y medios característicos de este aspecto de la invención.

(1) la etapa o medio de adsorción de una parte de o todas las proteínas con un peso molecular igual a o superior al de la albúmina

5 **[0080]** En la presente memoria, "adsorción" significa capturar proteínas solubilizadas en una solución acuosa en una sustancia que existe en la etapa mediante interacción con la sustancia.

**[0081]** Un material a usar para la adsorción en esta etapa se selecciona para ser polímeros de tipo polisulfona tales como polisulfonas y poliétersulfonas.

10

**[0082]** El material a usar está en forma de fibras huecas. En las formas respectivas, es preferible que su superficie sea áspera para aumentar el efecto del área de superficie de adsorción. Dado que el material es una membrana de separación de tipo permeable, concretamente una membrana de fibra hueca, la separación de proteínas con un bajo peso molecular puede separarse simultáneamente y, por lo tanto, dicho material es preferible.

15 Para las propiedades del propio sustrato, aquellos cuya superficie está hecha para ser hidrófila para no adsorber proteínas con un bajo peso molecular, que se necesitan en la solución pretendida y que no tienen que retirarse, y aquellos cuya superficie está hecha para ser hidrófoba para adsorber de forma selectiva proteínas con un alto peso molecular tales como albúmina, pueden seleccionarse y usarse apropiadamente.

20 **[0083]** El sustrato que tiene una superficie hidrófila puede ser de un copolímero obtenido copolimerizando un monómero hidrófilo y un monómero hidrófobo, una mezcla obtenida mezclando un polímero hidrófilo y un polímero hidrófobo, un material obtenido uniendo o pegando un polímero hidrófilo a la superficie de un polímero hidrófobo, y un material obtenido tratando la superficie de un material de un polímero hidrófobo mediante tratamiento químico, tratamiento con plasma y tratamiento con radiación. El componente hidrófilo a usar se selecciona entre  
25 poli(vinilpirrolidona) hidrófila. Los ejemplos del sustrato hidrófobo a usar pueden ser sustancias hidrófobas y aquellas que tienen una superficie en la que se introduce un ligando hidrófobo, más específicamente polisulfonas.

**[0084]** Además, ejemplos a usar para el componente hidrófobo pueden incluir materiales en los que se fija al menos un compuesto seleccionado entre compuestos tales como polietilenimina, aminometilpiridina, un polifenol, un  
30 colorante azul, un ión metálico divalente ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $CO^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ ), un compuesto (por ejemplo etanol, alcohol isopropílico y poliestireno amidometilado) que tiene un grupo hidrófobo (por ejemplo metilo, bencilo, fenilo, clorometilo, octilo y laurilo).

(2) La etapa de retirar una parte de o todas las proteínas con un peso molecular igual a o superior al de la albúmina  
35 mediante fraccionamiento con un tamiz molecular

**[0085]** En esta etapa, es preferible usar una membrana porosa en forma de una membrana plana o membrana de fibra hueca y que tiene un efecto de un tamiz molecular. Particularmente, el uso de una membrana de fibra hueca es eficaz, dado que el área de superficie de la membrana de separación aumenta notablemente.

40 El material para la membrana a usar preferiblemente en esta etapa es polímeros de tipo polisulfona tales como polisulfonas y poliétersulfonas. Las polisulfonas usadas ampliamente en estos años para dializadores son materiales preferibles, dado que tienen una excelente propiedad de fraccionamiento, es decir una alta proporción del coeficiente de tamizado de una sustancia con un bajo peso molecular con respecto al de una sustancia con un alto peso molecular entre sustancias con diferentes pesos moleculares. Con respecto a la estructura de la membrana, puede  
45 usarse una membrana que tiene una membrana asimétrica que tiene una estructura multicapa compuesta por una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y que mantiene la resistencia de la membrana. Un método de conformación de la estructura asimétrica y una realización preferible de la estructura asimétrica son los mismos que los descritos en las descripciones del primer grupo de la invención.

50 **[0086]** Como membrana a usar para la etapa de fraccionamiento, hay una membrana hidrófila y una membrana hidrófoba en base a la propiedad de la superficie de la membrana.

**[0087]** Los ejemplos de la membrana hidrófila son aquellas obtenidas copolimerizando un monómero hidrófilo y un monómero hidrófobo, las obtenidas mezclando un polímero hidrófilo y un polímero hidrófobo y formando películas a  
55 partir de la mezcla, las obtenidas uniendo o pegando un polímero hidrófilo a una membrana hecha de un polímero hidrófobo, y las obtenidas tratando la superficie de una membrana de un polímero hidrófobo mediante tratamiento químico, tratamiento con plasma y tratamiento con radiación. El componente hidrófilo es poli(vinilpirrolidona). Estas membranas hidrófilas pueden suprimir la adsorción de proteínas necesarias y recuperarse sin pérdida de valor.

60 **[0088]** Por otro lado, con respecto a la membrana hidrófoba, pueden usarse aquellas mezcladas con un componente hidrófobo y aquellos que tienen una superficie en la cual se introduce un ligando hidrófobo. El componente hidrófobo incluye polisulfonas

**[0089]** Además, los ejemplos a usar para el componente hidrófobo pueden incluir materiales en los que al menos un  
65 compuesto seleccionado entre compuestos tales como polietilenimina, aminometilpiridina, un polifenol, un colorante

azul, un ión metálico divalente ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ ), un compuesto (por ejemplo etanol, alcohol isopropílico y poliestireno amidometilado) que tiene un grupo hidrófobo (por ejemplo metilo, bencilo, fenilo, clorometilo, octilo, y laurilo) se fija o reacción química.

5 **[0090]** Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular, es preferible usar membranas que tienen una capacidad de fraccionamiento molecular de impedir que la albúmina pase a la solución salina fisiológica, por ejemplo, que tienen un valor límite de 50 kDa o inferior, preferiblemente 30 kDa o inferior.

10 **[0091]** En la etapa (1) o la etapa (2), pueden añadirse diversos tipos de agentes a la solución acuosa a cargar para mejorar la capacidad de adsorción o de fraccionamiento. En la práctica, puede añadirse al menos una sustancia entre un tensioactivo, un emulsionante, un disolvente orgánico, un etilenglicol, un propilenglicol, una polietilenimina, una aminometilpiridina, sulfato de protamina, sulfato de amonio, un polifenol, un colorante azul, una sal caotrópica y un compuesto (por ejemplo etanol y alcohol isopropílico) que tiene un grupo hidrófobo (por ejemplo, metilo, bencilo, fenilo, clorometilo, octilo y laurilo).

15 **[0092]** Por ejemplo, la adición de una cantidad apropiada de sulfato de amonio, un polietilenglicol, una polietilenimina, o una sal caotrópica que promueve la coagulación de albúmina, coagula proteínas con un alto peso molecular, promueve que las proteínas se conviertan en moléculas enormes y promueve, por lo tanto, la adsorción de las proteínas y suprime la fuga de la membrana de separación, dando como resultado la eficaz prevención de la permeación de los componentes con un alto peso molecular. Por el contrario, la adición de una cantidad apropiada de un tensioactivo, tal como un tensioactivo anfótero o un tensioactivo aniónico, suprime la interacción entre proteínas para realizar eficazmente el fraccionamiento mediante tamizado molecular.

(3) La etapa de concentrar proteínas

25 **[0093]** La etapa de concentración significa una etapa de concentrar proteínas en una solución. En la presente memoria, la etapa de concentración puede incluir retirar no solamente el agua de una solución acuosa sino también retirar componentes con un bajo peso molecular de 1 kDa o menor. En esta etapa, se usa una membrana porosa como filtro plano o un módulo de fibra hueca para realizar la concentración mediante separación y tamizado. Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular, la membrana a usar en esta etapa difiere de la membrana de separación a usar en la etapa de fraccionamiento mencionada anteriormente (2). Además, en el caso de uso de la membrana de separación en la etapa de fraccionamiento mencionada anteriormente (2), la solución que pasó a través de la membrana es una solución deseada y, por otro lado, en la etapa de concentración (3), esto es diferente en un punto en que la solución sigue sin pasar a través de la membrana es una solución deseada.

35 **[0094]** En el caso en el que la cantidad de una muestra es pequeña, se usa un dispositivo de concentración comercializado existente que comprende un filtro plano unido a un tubo para separación centrífuga y en el caso en el que la cantidad de una muestra es una cantidad grande, es eficaz usar fibras huecas.

40 **[0095]** Un material a usar para la membrana de separación para la etapa de concentración es uno de polímeros seleccionados entre polímeros de tipo celulosa tales como celulosa y triacetato de celulosa; pueden usarse policarbonatos; polímeros de tipo polisulfona tales como polisulfonas y poliétersulfonas; ésteres de ácido (poli)metacrílico tales como metacrilato de (poli)metilo; ésteres de ácido (poli)acrílico; poliamidas; fluoruro de (poli)vinilideno; poliacrilonitrilo; poliésteres; poliuretanos; poliestirenos; polietileno; y polipropileno. Entre ellos, polisulfonas usadas ampliamente en estos años para dializadores son materiales preferibles dado que las polisulfonas tienen una excelente propiedad de fraccionamiento (es decir, una alta proporción del coeficiente de tamizado de una sustancia con un bajo peso molecular con respecto al de una sustancia con un alto peso molecular entre sustancias con diferentes pesos moleculares). Con respecto a la estructura de la membrana, puede usarse tanto una membrana que tiene una estructura de esponja, aproximadamente una estructura uniforme, como una membrana asimétrica que tiene una estructura multicapa compuesta por una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y que mantiene la resistencia de la membrana. Un método de conformación de la estructura asimétrica y una realización preferible de la estructura asimétrica son los mismos que se han descrito en las descripciones del primer aspecto de la invención.

55 **[0096]** Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular de la membrana a usar en la etapa de concentración, es preferible usar una membrana o una membrana de ultrafiltración que tiene una capacidad de fraccionamiento molecular para impedir que los péptidos pasen a la solución salina fisiológica, por ejemplo, que tiene un valor límite de 0,5 kDa o inferior, preferiblemente de 0,015 kDa o inferior.

60 **[0097]** Este aspecto de la invención es eficaz para hacer posible el funcionamiento sencillo, automático y continuo uniendo medios en las etapas respectivas a través de trayectorias de flujo de solución y haciéndoles accionables de forma continua. A este respecto, las etapas respectivas pueden realizarse de forma independiente. Para enviar una solución, puede usarse una bomba conectada a una trayectoria de flujo líquido y, en el caso de un aparato a pequeña escala, puede usarse una jeringa para enviar una solución. En el caso de concentración usando un aparato de tipo tubo de centrifugado sin usar una membrana de separación, la operación de centrifugado puede realizarse

para la concentración.

**[0098]** En el método de este aspecto de la invención, en el caso en que incluso aunque sea de una única etapa, la etapa tiene dos o más capacidades seleccionadas entre las etapas de (1) adsorber proteínas con un peso molecular igual a o superior al de la albúmina; (2) retirar una parte de o todas las proteínas con un peso molecular igual a o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento; y (3) concentrar proteínas, un método de realizar la etapa dos o más veces también está incluido en el alcance de la invención. Además, con respecto a un aparato de este aspecto de la invención, en el caso en que incluso sea un único medio, el medio tiene dos o más capacidades seleccionadas entre los medios de (1) adsorber proteínas con un peso molecular igual a o superior al de la albúmina; (2) retirar una parte de o todas las proteínas con un peso molecular igual a o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento; y (3) concentrar proteínas, un aparato que comprende dos o más de dichos medios unidos entre sí también está incluido en el alcance de la invención.

**[0099]** Un excelente efecto para reducir adicionalmente la proporción de albúmina en la cantidad total de las proteínas y aumentar la proporción de proteínas con un bajo peso molecular, que son dianas de análisis, puede causarse repitiendo las mismas etapas que las etapas mencionadas anteriormente (1) a (3). Si deben repetirse las mismas etapas o y si deben realizarse dos etapas diferentes puede planificarse de acuerdo con el alcance de la composición de las proteínas contenidas en los componentes biológicos a suministrar en primer lugar.

**[0100]** De acuerdo con el método de preparación descrito en el aspecto de la invención, en el caso de plasma sanguíneo de un adulto sano, la operación de una vez puede causar un efecto para retirar proteínas con un alto peso molecular de 50 kDa o superior a una proporción de retirada del 90% o superior, recuperar proteínas con un bajo peso molecular menor de 50 kDa a una proporción de recuperación del 70%, y dar una proporción de concentración promedio de las proteínas con un bajo peso molecular menor de 50 kDa de al menos 10 veces.

**[0101]** Además, el tiempo de tratamiento de una vez se acorta para ser de 1 a 6 horas. En términos de prevención de contaminación con una muestra diferente o peligro biológico, es preferible usar una serie de dispositivos solamente una vez y el aparato a usar para el método de la invención puede fabricarse para ser desechable y esto es notablemente ventajoso desde un punto de vista de evitar la contaminación con muestras y asegurar la reproductibilidad del análisis.

**[0102]** Este aspecto de la invención también es adecuado para separar moléculas biológicas, particularmente componentes de proteínas de una solución que contiene componentes biológicos, particularmente de plasma humano, orina, saliva, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, ascitis y exudado pleural. El tamaño de la membrana y el módulo de fibras huecas ejemplificados anteriormente y la velocidad de flujo de la solución pueden determinarse apropiadamente de acuerdo con la calidad y la cantidad de un material biológico tal como plasma sanguíneo y orina para ser una materia prima y en el caso del uso del llamado tamaño de mesa, se usan de 1 a 400 ml, preferiblemente de 5 a 100 ml de plasma sanguíneo y la velocidad de flujo se ajusta para ser de 1 a 20 ml/minuto, preferiblemente de 2 a 10 ml/minuto.

**[0103]** En lo sucesivo en la presente memoria, se describirán un método de cambio de la composición de una solución que contiene componentes biológicos que pertenece al tercer aspecto de la invención y una realización de un aparato para el método en referencia a los dibujos.

**[0104]** La figura 5 es un dibujo conceptual que muestra un ejemplo de un aparato que pertenece al tercer aspecto de la invención y que muestra tres etapas; adsorción, fraccionamiento, y concentración, en este orden. El flujo de una solución se muestra con una flecha. Una muestra de un material tal como suero o una solución que contiene componentes biológicos que contiene el suero se inyecta en un módulo 5 de la primera etapa que tiene una de capacidades de adsorción, fraccionamiento y concentración mediante una bomba 8 para inyección mediante una válvula 1, se envía a un canal de circulación de solución 2 hecho de un tubo mediante una bomba 3 y se hace circular. La solución obtenida tratada en la primera etapa se obtiene de una solución tratada 4. Este rendimiento es una unidad, llamada una única etapa. La figura 5 muestra un ejemplo que incluye tres fases y un módulo 6 para la segunda etapa y un módulo 7 para la tercera etapa están unidos entre sí. La solución obtenida se inyecta en un módulo en la siguiente etapa a través de un tubo unido a un orificio de recuperación de la solución tratada.

**[0105]** En general, en el caso de una etapa de fraccionamiento mediante un tamiz molecular, la salida de la etapa que es un orificio de recuperación de una solución tratada es una salida de un filtrado y, en el caso de una etapa de adsorción, la salida de la etapa es una salida formada en el medio del canal de circulación de solución y, en el caso del uso de una membrana de tipo permeación para la adsorción, la salida del filtrado se convierte en una salida de la etapa. En el caso de una etapa de concentración, la salida se forma en el medio del canal de circulación de solución. En la realización mostrada en la figura 5, las bombas de circulación respectivas se forman aguas abajo en las etapas respectivas, sin embargo las bombas de circulación pueden estar instaladas aguas arriba en las etapas respectivas.

**[0106]** En el caso en el que la etapa de concentración es la situada más aguas abajo entre las etapas seleccionadas, el tratamiento de las respectivas etapas puede realizarse simultáneamente y los tratamientos pueden realizarse convencionalmente por separado, mientras que lo que requería mucho tiempo puede realizarse en un

tiempo corto.  
[Ejemplos]

<Método de medición de la proporción de permeación comparativa>

5

**[0107]** Suero humano (H1388, fabricado por SIGMA o un producto equivalente) se centrifuga a 3.000 rpm durante 15 minutos para retirar precipitados y a continuación se filtra con un filtro de 0,45 µm.

**[0108]** Se prepara un módulo de membrana de separación que contiene una membrana de separación y una  
10 entrada del lado de la solución sin tratar (suero humano) y una salida del lado de la solución sin tratar (suero humano) se conectan a través de un tubo para formar un canal de circulación de solución. En el medio del canal de circulación de solución, un orificio de muestreo, una válvula de conmutación para descargar una solución sin circulación, una trayectoria de flujo de entrada para introducir una solución en el canal de circulación de solución, una bomba para hacer circular a una solución sin tratar y un orificio de muestreo se instalan a lo largo de la dirección  
15 desde la salida del lado de la solución sin tratar a la entrada del lado de la solución sin tratar. Además, un tubo está conectado a la salida del lado de filtración del módulo y una bomba para filtración y una salida (un orificio de muestreo) para una solución filtrada se forman sucesivamente. A través de una trayectoria de flujo de entrada, el módulo de membrana de separación se llena con una solución de PBS acuosa (Dulbecco PBS (-), fabricado por DAINIPPON SUMITOMO PHARMA) (en lo sucesivo en la presente memoria la solución acuosa se denomina  
20 simplemente como PBS). Una solución sin tratar, suero humano, se introduce desde una entrada del lado de la solución sin tratar a un caudal de circulación de 1 ml/minuto y la filtración comienza a un caudal de filtración de 0,2 ml/minuto a 20°C. Durante la filtración, la solución sin tratar en la salida del módulo puede descargarse sin hacerla regresar conmutando la válvula para descargar la solución existente en el medio del canal de circulación de solución. Mientras se mantiene el funcionamiento como tal desde 30 minutos a 60 minutos después del comienzo de  
25 la inyección del suero humano, se recogen muestras del orificio de muestreo cerca de la entrada de solución sin tratar del módulo, el orificio de muestreo cerca de la salida de solución sin tratar del módulo y el orificio de muestreo en la periferia de la salida del lado de filtración del módulo. Las concentraciones de albúmina y β2-microglobulina en las muestras respectivas se miden y los coeficientes de tamizado de albúmina y β2-microglobulina se calculan a partir de los valores medidos. En ese momento, el valor promedio de las concentraciones de las muestras recogidas  
30 en los orificios de muestreo respectivos cerca de la entrada y la salida del módulo se emplea como la concentración en el lado de la solución sin tratar. La proporción de permeación comparativa se define como un valor calculado dividiendo el coeficiente de tamizado calculado de β2-microglobulina por el coeficiente de tamizado calculado de albúmina. A este respecto, la medición de la concentración de albúmina en los ejemplos se encarga a SRL, Inc. y se realiza de acuerdo con el código de artículo 0721 4 (Inmunoensayo de Agregación con Látex). En el ensayo,  
35 aquellos que tienen la concentración de albúmina de 0,4 mg/l o inferior, bajo el límite de detección, se someten al kit de medición *Human Albumin ELISA Quantitation Kit* (Nº de cat. E80-129) de BETHYL Inc. La medición de la concentración de β2-microglobulina se encarga a SRL, Inc. y se realiza de acuerdo con el código de artículo 02103 (Inmunoensayo de Agregación con Látex).

40 <Análisis de proteínas mediante análisis electroforético bidimensional>

**[0109]** Una solución que contiene componentes biológicos original y una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos obtenida mediante un método de la invención se analizan mediante análisis electroforético bidimensional. El método es el siguiente.

45

1. Una cantidad equivalente de una solución de sacarosa al 80% se añade a una solución separada de los componentes biológicos para obtener una muestra para electroforesis.

2. IEF-PAGE mini a pH de 3 a 10 y con un grosor de 1 mm (fabricado por TEFCO Inc.), que es un gel electroforético isoeléctrico comercializado, se coloca en un tanque de electroforesis.

50

3. Un tampón superior (hidróxido sódico 0,05 M) 200 ml y un tampón inferior (ácido fosfórico 0,01 M) 500 ml se colocan.

4. Los pocillos respectivos se lavan con el tampón superior y 20 µl de una solución de sacarosa al 10% se introduce en cada pocillo.

5. La muestra preparada en (1.) se coloca bajo la solución de sacarosa introducida en cada pocillo.

55

6. Una tapa se sitúa en el tanque de electroforesis y una fuente de energía eléctrica se conecta para realizar electroforesis a 100 V durante 30 minutos, a 200 V durante 30 minutos y a 500 V durante 60 minutos.

7. Se retiran placas de plástico de una casete de gel para sacar el gel y el gel se sumerge en una solución acuosa de ácido acético al 40% y se agita durante 30 minutos.

60

8. El gel se tiñe durante 5 minutos con una solución de tinción de colorante *Coomassie Brilliant Blue* [Azul Brillante de Coomassie] (colorante CBB) y se decolora mediante una solución de decoloración (metanol al 10%, ácido acético al 7,5%) para observar bandas y se lava durante 30 minutos o más cambiando el agua.

9. El gel se corta en una pista.

10. La pieza de gel cortada se sumerge en un tampón de electroforesis para SDS-PAGE durante de 10 a 20 minutos para producir un estado de equilibrio. La composición del tampón de electroforesis para SDS-PAGE

(en lo sucesivo en la presente memoria denominado como tampón de electroforesis) se produce añadiendo agua destilada a Tris 3,0 g, glicina 14,4 g, y SDS 1,0 g y ajustando el volumen total para que sea de 1000 ml.

11. Un pocillo de 1,5 mm de grosor-2-D (fabricado por TEFCO Inc.) que contiene del 4 al 20% de SDS-PAGE mini, un gel comercializado para SDS-PAGE, se coloca en un tanque de electroforesis.

12. El tampón de electroforesis se carga y el pocillo se lava con el tampón de electroforesis.

13. La pieza de gel obtenida en (9.) se desplaza cuidadosamente mientras se impide la formación de burbujas de aire en el SDS-PAGE mini bidimensional en el pocillo. Un  $\mu$ l de marcador Rainbow (fabricado por Amersham), un marcador de peso molecular comercializado, se coloca en un pocillo pequeño.

14. El gel se sella con un tampón de agarosa/electroforesis al 1% (se añade azul de bromofenol tan ligeramente como para colorear el gel de forma perceptible mediante observación a simple vista en el momento de la preparación).

15. Se coloca una tapa del tanque de electroforesis y se conecta una fuente de energía eléctrica para realizar electroforesis a 15 mA durante aproximadamente 120 minutos (hasta que el Azul de Bromofenol se desplaza hasta el extremo inferior).

16. El gel se saca de una casete de gel y se tñe con CBB y tinción con plata. La tinción con plata se realiza usando un kit de tinción con plata *silver dyeing II Kit Wako*, un kit comercializado, (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

(Ejemplo 1)

[0110] Polisulfona (UDEL<sup>®</sup> P-3500, fabricada por Solvay Advanced Polymers, L.L.C.) 18 partes en peso y polivinilpirrolidona (K 30, fabricada por BASF Inc.) 9 partes en peso se añadieron a un disolvente mixto de N,N'-dimetilacetamida 72 partes en peso y agua 1 parte en peso y se calentaron a 90°C durante 14 horas para disolución para obtener una solución de partida que puede formar películas. La solución de partida que puede formar películas se expulsó a chorro de un tubo externo de un orificio de entrada de tubo de tipo hilera que tiene un diámetro externo de 0,3 mm y un diámetro interno de 0,2 mm. Como solución central, una solución que contiene N,N'-dimetilacetamida 58 partes en peso y agua 42 partes en peso se expulsó a chorro del tubo interior. La solución de partida que puede formar películas expulsada se condujo a agua al 100% después de pasar a un baño de coagulación a una distancia de 350 mm desde la hilera para obtener una membrana de fibra hueca. La estructura de la membrana de fibra hueca obtenida se observó mediante un microscopio electrónico (S800, fabricado por Hitachi Ltd.) para descubrir que la membrana tenía una estructura asimétrica. Diez mil membranas de fibra hueca obtenidas como se ha descrito se insertaron en una cubierta de plástico cilíndrica que tenía una entrada de solución de diálisis y una salida de solución de diálisis iguales a un dializador común y ambas partes de los extremos se sellaron con una resina para obtener un módulo de membrana de fibra hueca que tiene un área de superficie de membrana eficaz de 1,66 m<sup>2</sup>. Después de que el módulo de membrana de fibra hueca se lavó con agua, se irradiaron rayos  $\gamma$  al módulo, en el estado en el que el módulo estaba lleno de agua. La dosis de la radiación de rayos  $\gamma$  era de 27 kGy.

[0111] Las membranas de fibra hueca del módulo se cortaron y se ataron 100 membranas y ambos extremos terminales se fijaron en una cubierta de módulo de un tubo de vidrio con un agente de encapsulado de tipo epoxi de tal manera que las partes huecas de las membranas de fibra hueca no se cerraron para producir un módulo secundario. El mini-módulo tenía un diámetro externo de aproximadamente 7 mm y una longitud total de aproximadamente 17 cm y dos orificios en el exterior de las fibras huecas análogamente a un dializador de tipo de membrana de fibra hueca común. Las membranas de fibra hueca del mini-módulo y el módulo del interior se lavaron con agua destilada.

[0112] Después de esto, el mini-módulo se llenó con una solución de PBS acuosa (Dulbecco PBS (-), fabricado por DAINIPPON SUMITOMO PHARMA) para obtener un mini-módulo de membrana de fibra hueca (en lo sucesivo en la presente memoria, denominado como mini-módulo (1) para abreviar). Se produjeron dos mini-módulos y la proporción de permeación comparativa de las membranas de separación se midió usando uno de ellos para descubrir que la proporción de permeación comparativa era de 70,5. El mini-módulo restante se usó para el siguiente experimento.

[0113] Suero humano (H 1388, Lote 28H8550, fabricado por SIGMA Inc.) se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para retirar el precipitado y se filtró sucesivamente mediante un filtro de 0,45  $\mu$ m.

[0114] Uno de los orificios en el exterior del mini-módulo (1) se tapó y el otro orificio se conectó a una bomba Peri-Strat<sup>™</sup> mediante un tubo de silicona. Por otro lado, con respecto a una solución en el interior de las membranas de fibra hueca, la entrada de solución sin tratar y la salida de solución sin tratar del módulo se conectaron entre sí a través de un tubo de silicona para formar un canal de circulación de solución y una bomba Peri-Strat<sup>™</sup> se usó para hacer circular suero en su interior. Además, una entrada para cargar adicionalmente PBS se formó en el medio del canal de circulación de solución.

[0115] Cuatro ml de suero se filtraron a un caudal de circulación de 5 ml/minuto, caudal de filtración de 0,2 ml/minuto, y 20 °C durante 4 horas (esta etapa es la etapa de fraccionar principalmente proteínas más grandes que

la albúmina). El caudal de la solución que se hizo circular se mantuvo constante añadiendo PBS al suero. El filtrado obtenido durante 4 horas, es decir, una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos era de 52,5 ml y tenía una concentración de albúmina de 61 mg/l, una concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina de 0,4 mg/l, concentración de  $\beta$ 2-microglobulina de 0,066 mg/l. La concentración total de proteínas del suero humano usado era de 53.000 mg/l, la concentración de albúmina era de 33.000 mg/l, la concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina era de 16,5 mg/l, y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina era de 1,17 mg/l y se observaba una considerable reducción de la concentración de albúmina.

**[0116]** La concentración total de proteínas en la solución se midió mediante el ensayo *Micro BCA Protein Assay* (fabricado por PIERCE Inc.) y usando BSA para una curva de calibrado. La concentración total de proteínas en el filtrado era de 275 mg/l y la proporción de la concentración de albúmina con respecto a las proteínas totales era de 0,22. La proporción de la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a la concentración total de proteínas en el filtrado era de 0,00024, mientras que la proporción en suero humano era de 0,000223 y la primera aumentó hasta ser 10,8 veces la última.

15 (Ejemplo 2)

**[0117]** Polisulfona (UDEL<sup>®</sup> P-3500, fabricada por Solvay Advanced Polymers, L.L.C.) 18 partes en peso y polivinilpirrolidona (K 30, fabricada por BASF Inc.) 9 partes en peso se añadieron a un disolvente mixto de N,N'-dimetilacetamida 72 partes en peso y agua 1 parte en peso y se calentó a 90°C durante 14 horas para disolución para obtener una solución de partida que puede formar películas. La solución de partida que puede formar películas se expulsó a chorro de un tubo externo de un orificio de entrada de tubo de tipo hilera que tenía un diámetro externo de 0,3 mm y un diámetro interno de 0,2 mm. Como solución central, una solución que contenía N,N'-dimetilacetamida 58 partes en peso y agua 42 partes en peso se expulsó a chorro del tubo interior. La solución de partida que puede formar películas expulsada se condujo a agua al 100% después de pasar a un baño de coagulación a una distancia de 350 mm desde la hilera para obtener una membrana de fibra hueca. La estructura de la membrana de fibra hueca obtenida se observó mediante un microscopio electrónico (S800, fabricado por Hitachi Ltd.) para descubrir que la membrana tenía una estructura asimétrica. Diez mil membranas de fibra hueca obtenidas como se ha descrito se insertaron en una cubierta de plástico cilíndrica que tenía una entrada de solución de diálisis y una salida de solución de diálisis igual que un dializador común y ambas partes de los extremos se sellaron con una resina para obtener un módulo de membrana de fibra hueca que tenía un área de superficie de membrana eficaz de 1,6 m<sup>2</sup>. Una solución acuosa que contenía 0,1% en peso de una polietilenimina como polímero hidrófilo catiónico (peso molecular promedio en peso 1.000.000, fabricado por BASF Inc.) se introdujo en el lado de la cara interna y el lado de la cara externa de las membranas de fibra hueca del módulo de membrana de fibra hueca. Después de esto, se irradiaron rayos  $\gamma$  al módulo. La dosis de la radiación de rayos  $\gamma$  era de 27 kGy. Las membranas de fibra hueca del módulo se cortaron y 100 membranas se ataron y ambos extremos terminales se fijaron en una cubierta de módulo de un tubo de vidrio con un agente de encapsulado de tipo epoxi de tal manera que las partes huecas de las membranas de fibra hueca no se cerraron para producir un mini-módulo. El mini-módulo tenía un diámetro externo de aproximadamente 7 mm y una longitud total de aproximadamente 17 cm y dos orificios en el exterior de las fibras huecas análogamente a un dializador de tipo de membrana de fibra hueca común. Las membranas de fibra hueca del mini-módulo y el módulo del interior se lavaron con agua destilada. Después de esto, el mini-módulo se llenó con una solución de PBS acuosa (Dulbecco PBS (-), fabricado por DAINIPPON SUMITOMO PHARMA) para obtener un mini-módulo de membrana de fibra hueca fijada con polietilenimina (en lo sucesivo en la presente memoria, denominado como mini-módulo (2) para abreviar). Se produjeron dos mini-módulos y la proporción de permeación comparativa de la membrana de separación se midió usando uno de ellos para descubrir que la proporción de permeación comparativa era de 400. El mini-módulo restante se usó para el siguiente experimento.

Suero humano (H 1388, Lote 28H8550, fabricado por SIGMA Inc.) se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos para retirar el precipitado y se filtró sucesivamente mediante un filtro de 0,45  $\mu$ m.

50

**[0118]** En primer lugar, se preparó un mini-módulo de membrana de fibra hueca igual que en el Ejemplo 1 (el mini-módulo 1) y uno de los orificios en el exterior de las fibras huecas se tapó y el otro orificio se conectó a un tubo de silicona. Con respecto a una solución en el interior de las membranas de fibra hueca, la entrada de solución sin tratar y la salida de solución sin tratar se conectaron entre sí a través de un tubo de silicona para formar un canal de circulación de solución y una bomba Peri-Strat<sup>™</sup> se usó para hacer circular a una solución sin tratar en su interior. Una válvula de tres vías se instaló en el medio del canal de circulación de solución y una bomba de inyección se instaló mediante un tubo en un lado. Además, también en el mini-módulo (2), uno de los orificios en el exterior de las fibras huecas se tapó y el otro orificio se conectó a un tubo de silicona. Con respecto a una solución en el interior de las membranas de fibra hueca en este mini-módulo, la entrada de solución sin tratar y la salida de solución sin tratar se conectaron entre sí para formar un canal de circulación de solución y una bomba Peri-Strat<sup>™</sup> se instaló en el medio del canal de circulación para hacer circular a una solución sin tratar en su interior. Una válvula de tres vías también se instaló en el medio del canal de circulación de solución.

**[0119]** El tubo de silicona conectado al orificio en el exterior del mini-módulo (1) y la válvula de tres vías instalada en

el medio del canal de circulación de solución del mini-módulo (2) se conectaron. A continuación, estos tubos y dos módulos se llenaron con PBS para producir un sistema que comprende dos mini-módulos conectados entre sí en serie como se muestra en la figura 2. En la presente memoria, el uso del mini-módulo (1) es para una etapa de fraccionar proteínas con un peso molecular igual o superior al de la albúmina y el uso del mini-módulo (2) es para ambas etapas de adsorber y fraccionar proteínas con un peso molecular igual o superior al de la albúmina.

**[0120]** El suero se cargó a través de tubos mediante la bomba de inyección y la filtración se realizó a un caudal de circulación de 5 ml/minuto, caudal de filtración de 0,2 ml/minuto, y 20°C durante 4 horas en el respectivo canal de circulación de soluciones de los mini-módulos (1) y (2). En ese momento, el caudal de la solución que se hizo circular se mantuvo constante añadiendo PBS en una cantidad equivalente a la de la solución filtrada.

**[0121]** Después de 4 horas, el filtrado obtenido del módulo (2), una solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos, tenía una concentración de albúmina de 0,62 mg/l, la concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina de 0,036 mg/l, concentración de  $\beta$ 2-microglobulina de 0,05 mg/l. La concentración total de proteínas del suero humano usado era de 53.000 mg/l, la concentración de albúmina era de 33.000 mg/l, la concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina era de 16,5 mg/l, y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina era de 1,17 mg/l y se observaba una considerable reducción de la concentración de albúmina. La concentración total de proteínas en el filtrado era de 8,1 mg/l y la proporción de la concentración de albúmina con respecto a la de las proteínas totales era de 0,08. La proporción de la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a la concentración total de proteínas en el filtrado era de 0,00617 mientras que la proporción en suero humano era de 0,0000223 y la primera aumentó hasta ser 277 veces la última.

**[0122]** Los resultados del análisis de la muestra obtenida mediante electroforesis bidimensional se muestran en la figura 7.

**[0123]** La figura 7 muestra una fotografía de electroforesis bidimensional de una solución concentrada obtenida usando 300  $\mu$ l de la solución que tiene una composición cambiada de componentes biológicos producida en el Ejemplo 2. Como se entiende a partir de la figura 7, se observan muchas manchas independientes en el intervalo que indica un peso molecular de menos de 60.000. La muestra obtenida mediante separación usando el dispositivo tiene un gran número de manchas en una región de un bajo peso molecular.

(Ejemplo Comparativo 1)

**[0124]** El análisis electroforético bidimensional se realizó usando suero humano antes de la separación como muestra comparativa. La figura 8 muestra los resultados. La figura 8 es una fotografía de electroforesis bidimensional de 0,5  $\mu$ l de suero humano antes del tratamiento realizado en el Ejemplo 2 como muestra. En la figura 8, las manchas se distribuyen en un amplio intervalo y las sustancias no pueden especificarse y al mismo tiempo, se observan pocas manchas en una región de bajo peso molecular.

(Ejemplo 3)

**[0125]** Ambos extremos de partes de adhesión de resina del dializador Dialyzer BS 1.8 1 (Lote 20440312, fabricado por Toray Industries, Inc.) se cortaron para obtener membranas de fibra hueca. Las membranas de fibra hueca tenían un diámetro interno de 200  $\mu$ m y un grosor de membrana de 40  $\mu$ m y se descubrió que la estructura de las membranas de fibra hueca era asimétrica mediante observación con un microscopio electrónico (S800, fabricado por Hitachi Ltd.).

**[0126]** Las membranas de fibra hueca en número de 100 se ataron y ambos extremos terminales se fijaron en una cubierta de módulo de un tubo de vidrio con un agente de encapsulado de tipo epoxi de tal manera que las partes huecas de las membranas de fibra hueca no se cerraron para producir un módulo secundario. El mini-módulo tenía un diámetro interno de aproximadamente 5 mm y una longitud total de aproximadamente 17 cm y dos orificios (orificios de sangre) en el interior de las membranas de fibra hueca y dos orificios (orificios de solución dializada) en el exterior de las fibras huecas análogamente a un dializador de tipo de membrana de fibra hueca común. Las membranas de fibra hueca del mini-módulo y el módulo del interior se lavaron con agua destilada. Después de esto, el mini-módulo se llenó con una solución de PBS acuosa (Dulbecco PBS (-), fabricado por DAINIPPON SUMITOMO PHARMA) para obtener un mini-módulo de membrana de fibra hueca (en lo sucesivo en la presente memoria, denominado como mini-módulo (3) para abreviar). Se produjeron dos mini-módulos (3) y la proporción de permeación comparativa de la membrana de separación se midió usando uno de ellos para descubrir que la proporción de permeación comparativa era de 149. El mini-módulo restante se usó para el siguiente experimento.

**[0127]** Suero humano (H 1388, Lote 122K0424, fabricado por SIGMA Inc.) se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para retirar el precipitado y se filtró sucesivamente mediante un filtro de 0,45  $\mu$ m.

**[0128]** Entre los orificios en el exterior del mini-módulo (1), el orificio inferior 106 en el módulo se tapó y el orificio

superior se estableció para ser un orificio de recuperación de la solución tratada 104 de la unidad de separación por membrana. Se dejó que la solución en el interior de las membranas de fibra hueca circulara en un canal de circulación de solución 102 formado conectando la entrada y la salida de solución sin tratar a través de un tubo de silicona e instalando una bomba Peri-Strat™ como bomba de circulación 103 en el medio. También se instaló una  
5 válvula de tres vías 101 en el medio del canal de circulación de solución 102 y se instala una bomba de inyección 103 en un lado de la válvula de tres vías 101.

**[0129]** Se añadieron cuatro ml de suero a 1,0 ml/minuto mediante la bomba de inyección y se filtraron a un caudal de circulación de 10 ml/minuto, caudal de filtración de 1,0 ml/minuto, y 20°C durante 50 minutos. En ese momento, el  
10 caudal de la solución que se hizo circular se mantuvo constante añadiendo PBS a un caudal de 1,0 ml/minuto, que es la cantidad equivalente a la cantidad de la solución filtrada que pasa por las membranas, al canal de circulación. La cantidad de la solución de filtrado obtenida durante 50 minutos era de aproximadamente 50 ml y la solución tenía una concentración de albúmina de 32,8 mg/l, una concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina de 0,06 mg/l, y una  
15 concentración de  $\beta$ 2-microglobulina de 0,068 mg/l y, por otro lado, la concentración total de proteínas del suero humano usado como solución sin tratar era de 48.000 mg/l, la concentración de albúmina era de 29.800 mg/l, la concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina era de 13,2 mg/l, y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina era de 1,27 mg/l. La cantidad total de proteínas en el suero humano usado como solución sin tratar era de 192.000  $\mu$ g; la cantidad de albúmina de 119.000  $\mu$ g; la cantidad de  $\alpha$ 1-microglobulina de 52,8  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina de 5,08  $\mu$ g  
20 y, por otro lado, la cantidad total de proteínas en el filtrado era de 56.000  $\mu$ g; la cantidad de albúmina de 1.640  $\mu$ g; la cantidad de  $\alpha$ 1-microglobulina de 3,00  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina de 3,40  $\mu$ g y por consiguiente, aunque la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina se mantuvo, se retiró una gran cantidad de albúmina. En base a los resultados, se descubrió que la proporción de la concentración de albúmina con respecto a la de las proteínas totales era de 0,15. Además, la proporción de la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a la concentración total de proteínas en el filtrado era de 0,00613 mientras que la proporción en suero humano era de 0,0000265 y la primera aumentó  
25 hasta ser 23 veces la última.

(Ejemplo 4 y Ejemplo Comparativo 2)

**[0130]** Se produjo un mini-módulo usando membranas de fibra hueca (proporción de permeación comparativa 149)  
30 obtenidas en el Ejemplo 3. La forma y el número del mini-módulo eran los mismos que los del mini-módulo en el Ejemplo 3. En lo sucesivo en la presente memoria, el mini-módulo se denomina como mini-módulo (4). Además, dos mini-módulos (en lo sucesivo en la presente memoria, denominados como mini-módulo(s) (5) para abreviar) se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 1 fijando 40 membranas de fibra hueca (proporción de permeación comparativa 149) obtenidas en el Ejemplo 3 en una cubierta de módulo de un tubo de vidrio con un  
35 diámetro interno de aproximadamente 5 mm y una longitud de aproximadamente 12 cm. Estos mini-módulos se usaron para el siguiente experimento.

**[0131]** Suero humano (H1388, Lote 122K0442, fabricado por SIGMA) se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para retirar precipitados y a continuación se filtró con un filtro de 0,45  $\mu$ m.

**[0132]** En primer lugar, se preparó un mini-módulo (4) y uno de los orificios exteriores se tapó y el otro orificio se conectó a un tubo de silicona. Con respecto a una solución en el interior de las membranas de fibra hueca, la entrada de solución sin tratar y la salida de solución sin tratar se conectaron entre sí a través de un tubo de silicona para formar un canal de circulación de solución y una bomba Peri-Strat™ se instaló en el canal para hacer circular a una solución sin tratar en su interior. Una válvula de tres vías se instaló en el medio del canal de circulación de  
45 solución y una bomba de inyección se instaló en un lado de la válvula de tres vías. Además, también en uno de los mini-módulos (5), uno de los orificios exteriores se tapó y el otro orificio se conectó a un tubo de silicona. Además, con respecto a una solución en el interior de las membranas de fibra hueca en este mini-módulo (5), la entrada de solución sin tratar y la salida de solución sin tratar se conectaron entre sí para formar un canal de circulación de solución y una bomba Peri-Strat™ se instaló en el canal para hacer circular a la solución en su interior. Una válvula  
50 de tres vías también se instaló en el medio del canal de circulación de solución. El mini-módulo resultante se usó como una unidad de separación por membrana en la segunda fase. Además, uno de los orificios exteriores del otro mini-módulo (5) se tapó y el otro orificio se conectó a un tubo de silicona. Además, con respecto a una solución en el interior de las membranas de fibra hueca en este segundo mini-módulo (5), la entrada y la salida de solución sin tratar se conectaron entre sí para formar un canal de circulación de solución y una bomba Peri-Strat™ se instaló en el canal para hacer circular a la solución en su interior. Además, una válvula de tres vías también se instaló en el medio del canal de circulación de solución. El mini-módulo resultante se usó como una unidad de separación por membrana en la tercera fase. Los tubos de silicona conectados a los orificios en el exterior de los mini-módulos respectivos se conectaron sucesivamente a las válvulas de tres vías de las siguientes unidades de separación por membrana y se cargó PBS en todo el cuerpo del sistema de separación para producir el sistema de separación que  
60 comprende las unidades de separación por membrana en tres fases como se muestra en la figura 3.

**[0133]** La figura 3 es una vista esquemática del sistema de separación usado en el Ejemplo. El flujo de la solución se muestra con una flecha. Se introdujeron suero y una solución de dilución (PBS) en el canal de circulación de solución 102 mediante la válvula de tres vías 101 desde la bomba de inyección 100, se enviaron adicionalmente mediante la bomba de circulación 103, se inyectaron en el primer módulo de membrana de separación 105 (el mini-

módulo (4)) y se hicieron circular en el canal de circulación de solución 102. La solución obtenida en la primera unidad de separación por membrana se extrajo del orificio de recuperación de la solución tratada 104 de la unidad de separación por membrana. A continuación, la solución se condujo a la unidad de separación por membrana en la segunda fase, se inyectó en el módulo de membrana de separación 205 en la segunda fase (el primer mini-módulo (5)), y se hizo circular en el canal de circulación de solución 202 en la segunda fase mediante la bomba de circulación 203 en la segunda fase. La solución que pasó a través del módulo de membrana de separación 205 en la segunda fase de la segunda unidad de separación por membrana se extrajo del orificio de recuperación de la solución tratada 204. Además, la solución se condujo a la tercera separación por membrana, se inyectó en el módulo de membrana de separación 305 en la tercera fase (el segundo mini-módulo (5)), y se hizo circular. La solución que pasó a través del tercer módulo de membrana de separación se extrajo del orificio de recuperación de la solución tratada 304.

**[0134]** Las condiciones detalladas eran las siguientes. Después de que 4 ml de suero se añadieran a 0,2 ml/minuto a la unidad de separación por membrana en la primera fase, la filtración se realizó haciendo circular a la solución a un caudal de 5,0 ml/minuto y un caudal de filtrado de 0,2 ml/minuto en común en la unidad de separación por membrana en la primera fase, la unidad de separación por membrana en la segunda fase, y la unidad de separación por membrana en la tercera fase a 20 °C durante 4 horas. En ese momento, la cantidad de la solución que se hizo circular se mantuvo constante añadiendo PBS en una cantidad equivalente a la de la solución filtrada a 0,2 ml/minuto a la primera unidad de separación por membrana mediante la bomba de inyección 100. La cantidad de la solución obtenida durante 4 horas era de aproximadamente 47 ml. La solución se concentró a 4 ml usando Vivaspin 20 (de tipo 3000 MWCO), fabricado por Sartorius K.K. y la solución concentrada tenía una concentración de albúmina de 0,38 mg/l, una concentración de  $\beta$ 2-microglobulina de 0,583 mg/l y, por otro lado, la concentración total de proteínas en el suero humano usado como solución sin tratar era de 49.000 mg/l; la concentración de albúmina de 31.200 mg/l; y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina de 1,19 mg/l. Aunque la cantidad de las proteínas totales en el suero humano usado como solución sin tratar era de 196.000  $\mu$ g; la cantidad de albúmina de 124.800  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina de 4,76  $\mu$ g, la cantidad de las proteínas totales en el filtrado era de 100  $\mu$ g; la cantidad de albúmina de 1,5  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina de 2,3  $\mu$ g y, por lo tanto, aunque la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina se mantuvo elevada, se retiró una cantidad considerable de albúmina. En base a estos resultados, se ha descubierto que la proporción de albúmina en las proteínas totales era de 0,02. Además, la proporción de la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a la concentración total de proteínas en el filtrado era de 0,0307 mientras que la proporción en suero humano era de 0,0000243 y la primera aumentó hasta ser 1.263 veces la última.

**[0135]** La muestra se concentró usando Vivaspin 500 (de tipo 3000 MWCO), fabricado por Sartorius K.K. hasta que el volumen de la muestra se convirtió en 1/10 y una cantidad equivalente de un tampón de muestra (producido añadiendo una cantidad apropiada de agua destilada a Tris-clorhidrato 0,5 M (pH 6,8) 0,5 ml, glicerol 0,4 ml, SDS al 10% 0,8 ml, y Azul de Bromofenol al 0,1% 0,1 ml y ajustando el volumen total para que sea de 10 ml) se añadió y la solución resultante se calentó durante 3 minutos en agua en ebullición y 25  $\mu$ l de la solución se sometieron al análisis electroforético. Los resultados se muestran en la pista S3 en la figura 6. El marcador Rainbow, un marcador de peso molecular comercializado (RPN 756, fabricado por Amersham Biosciences) se colocó en la pista S1; y, para comparar, una solución obtenida añadiendo un tampón de muestra al suero humano (equivalente a 0,02  $\mu$ l) antes del tratamiento mediante el sistema de separación del Ejemplo 4 y calentada durante 3 minutos en agua en ebullición se colocó en la pista S2 y estas muestras de la pista S1 y S3 se sometieron simultáneamente a electroforesis y los resultados se muestran juntos en la figura 6.

**[0136]** Como queda entendido a partir de la pista S2, el suero humano contiene una gran cantidad de proteínas en la región de peso molecular 60.000 o superior y una pequeña cantidad de proteínas en la región de peso molecular 15.000 o superior. Por otro lado, como queda entendido a partir de la pista S3, la solución concentrada del filtrado del Ejemplo 4 tratada mediante el sistema de separación contiene una pequeña cantidad de proteínas en la región de peso molecular 60.000 o superior y una gran cantidad de proteínas en la región de peso molecular 15.000 o superior.

(Ejemplo 5)

**[0137]** Las membranas de fibra hueca producidas en el Ejemplo 1 se cortaron del módulo antes de la irradiación con rayos  $\gamma$  para preparar 100 membranas de fibra hueca. Las membranas de fibra hueca se secaron a 50°C y el 13% de humedad relativa durante 24 horas. Ambas partes terminales de las membranas de fibra hueca resultantes se fijaron en una cubierta de módulo de un tubo de vidrio con un agente de encapsulado de tipo epoxi de la misma manera que en el Ejemplo 4 para producir un módulo secundario. Las membranas de fibra hueca y el interior del mini-módulo se lavaron con agua y a continuación se llenaron con una solución de PBS acuosa (Dulbecco PBS (-), fabricado por DAINIPPON SUMITOMO PHARMA) para obtener un mini-módulo de membrana de fibra hueca para concentración (en lo sucesivo en la presente memoria, denominado como mini-módulo (6)).

**[0138]** Además, uno de los orificios en el exterior del mini-módulo (6) se tapó y el otro orificio se usó como salida de

filtrado. Se dejó que la solución en el interior de las membranas de fibra hueca circulara en un canal de circulación de solución conectando la entrada y salida de solución sin tratar del módulo que estaban conectadas entre sí a través de un tubo de silicona y usando una bomba Peri-Strat™. Además, una válvula de tres vías se instaló en el medio del canal de circulación de solución. El módulo obtenido se usó como unidad de membrana de concentración.

5 **[0139]** Una unidad de separación que comprende unidades de separación por membrana de tres fases usadas en el Ejemplo 4 se produjo recientemente. El orificio de recuperación de solución tratada del mini-módulo en la tercera fase y la válvula de tres vías de la unidad de membrana de concentración se conectaron entre sí a través de un tubo de silicona. Además, un orificio de recuperación de solución tratada de la unidad de concentración que comprende  
10 una válvula de tres vías se formó en el medio del canal de circulación de solución y durante la concentración, solamente se abría el canal de circulación de solución. Todo el cuerpo del sistema se llenó con PBS para producir un sistema compuesto que comprende la unidad de separación por membrana para fraccionar proteínas con un peso molecular igual a o superior al de la albúmina mediante tamizado molecular y la unidad para concentrar proteínas unida directamente a la unidad de separación.

15 **[0140]** La figura 4 muestra un dibujo esquemático (un ejemplo de una unidad de separación por membrana y una unidad de concentración) de la unidad de separación usada en el Ejemplo 5. El flujo de solución se muestra como una flecha. El suero y una solución de dilución (PBS) se inyectan en el canal de circulación de solución 102 mediante la bomba de inyección 100 mediante la válvula de tres vías 101, son enviados adicionalmente mediante la  
20 bomba de circulación 103, se inyectan en el primer módulo de membrana de separación 105 (el mini-módulo (4)), y se hacen circular en el canal de circulación de solución 102. La solución tratada en la primera unidad de separación por membrana se obtiene a través del orificio de recuperación de la solución tratada 104 de la unidad de separación por membrana. A continuación, la solución se inyecta en el segundo módulo de membrana de separación 205 (el primer mini-módulo (5)), y se hace circular en el canal de circulación de segunda fase 202. La solución tratada en la  
25 segunda unidad de separación por membrana se obtiene a través del orificio de recuperación de la solución tratada 204 de la unidad de separación por membrana en la segunda fase. Además, la solución se inyecta en el tercer módulo de membrana de separación 305 (el segundo mini-módulo (5)), y se hace circular en el canal de circulación de tercera fase 302. La solución tratada en la tercera unidad de separación por membrana se obtiene a través del orificio de recuperación de la solución tratada 304. Además, la solución se inyecta en el módulo de membrana de  
30 concentración 405 (el mini-módulo (6)) y se hace circular en el canal de circulación 402 de la unidad de concentración. En ese momento, la solución que pasó a través del módulo de concentración se extrae de la salida de filtrado 404 de la unidad de concentración y se desecha. Una vez completada la operación de la filtración y concentración, la solución que queda en el canal de circulación 402 del módulo de membrana de concentración se extrae abriendo el orificio de recuperación de la solución tratada 407 de la unidad de concentración.

35 **[0141]** Las condiciones prácticas eran las siguientes. Después de que 1 ml de suero se añadiera a 0,2 ml/minuto a la unidad de separación por membrana en la primera fase, éste se hizo circular a un caudal de 5,0 ml/minuto en común en los respectivos canales de circulación de solución de la unidad de separación por membrana de la primera fase, la unidad de separación por membrana de la segunda fase, y la unidad de separación por membrana de la tercera  
40 fase y la filtración se realiza a un caudal de filtrado de 0,2 ml/minuto en común en los módulos respectivos y 20°C durante 4 horas. En ese momento, la cantidad de la solución que se hizo circular en las respectivas unidades de separación y la unidad de concentración se mantuvo constante añadiendo PBS en una cantidad equivalente a la de la solución filtrada a 0,2 ml/minuto mediante la bomba de inyección 100. La concentración de albúmina de la solución tomada a través de la válvula 407 después de 4 horas de funcionamiento era de 0,490 mg/l y la  
45 concentración de  $\beta$ 2-microglobulina era de 0,502 mg/l y, por otro lado, la concentración total de proteínas en el suero humano usado como solución sin tratar era de 49.000 mg/l; la concentración de albúmina de 31.200 mg/l; y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina de 1,19 mg/l. La cantidad de las proteínas totales en el suero humano usado como solución sin tratar era de 196.000  $\mu$ g; la cantidad de albúmina de 124.800  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina de 4,76  $\mu$ g y, por otro lado, la cantidad del filtrado era de 3,7 ml, la cantidad de albúmina era de 1,81  
50  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina era de 1,86  $\mu$ g y, por lo tanto, aunque la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina se mantuvo elevada, se retiró una cantidad considerable de albúmina. En base a estos resultados, se ha descubierto que la proporción de albúmina en las proteínas totales era de 0,0297. Además, la proporción de la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a la concentración total de proteínas en el filtrado era de 0,0304 mientras que la proporción en suero humano era de 0,0000243 y la primera aumentó hasta ser 1.253 veces la última.

55 (Ejemplo Comparativo 3)

**[0142]** Usando un sistema de separación que comprende una membrana plana comercializada (usando una membrana de poliétersulfona), se filtraron 4,7 ml de suero diluido a 1/4 de concentración con PBS.

60 **[0143]** La concentración de albúmina era de 5755 mg/l y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina era de 0,534 mg/l y, por otro lado, la concentración de albúmina en el suero humano usado como solución sin tratar era de 128,5 mg y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina era de 0,446 mg/l. En el suero humano usado como solución sin tratar, la cantidad de albúmina era de 27.049  $\mu$ g y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina era de 2,51  $\mu$ g, y por otro lado, en el filtrado, la cantidad de albúmina era de 578  $\mu$ g y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina era de 2,01  $\mu$ g. La proporción de

permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina (en este caso, la proporción de permeación se definió como el valor calculado dividiendo la concentración en el filtrado por la concentración en la solución sin tratar y la proporción de permeación comparativa se calculó dividiendo la proporción de permeación de  $\beta$ 2-microglobulina por la proporción de permeación de albúmina) se reducía hasta 40. La proporción de concentración de albúmina era de hasta 0,32.

(Ejemplo 6)

10 **[0144]** Se produjo un sistema compuesto de la misma manera que en el Ejemplo 5, excepto que se usaron las membranas de fibra hueca usadas en el mini-módulo (2) del Ejemplo 2 en lugar de las membranas de fibra hueca dispuestas en el mini-módulo (6) del Ejemplo 5.

15 **[0145]** Análogamente al Ejemplo 5, se trató 1 ml de suero y la solución recuperada a través del orificio de recuperación de la solución tratada 407 durante 4 horas tenía una concentración de albúmina de 0,3 mg/l y una de  $\beta$ 2-microglobulina de 0,515 mg/l y la concentración de las proteínas totales en suero humano usado como solución sin tratar era de 49.000 mg/l; la concentración de albúmina era de 31.200 mg/l; y la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina era de 1,19 mg/l. La cantidad de las proteínas totales en el suero humano usado como solución sin tratar era de 196.000  $\mu$ g; la cantidad de albúmina 124.800  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina de 4,76  $\mu$ g y, por otro lado, la cantidad del filtrado era de 3,8 ml, la cantidad de albúmina era de 1,141  $\mu$ g; y la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina era de 2,0  $\mu$ g y por lo tanto, aunque la cantidad de  $\beta$ 2-microglobulina se mantuvo elevada, se retiró una cantidad considerable de albúmina. En base a estos resultados, se ha descubierto que la proporción de albúmina en las proteínas totales era de 0,02. Además, la proporción de la concentración de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a la concentración total de proteínas en el filtrado era de 0,0343 mientras que la proporción en suero humano era de 0,0000243 y la primera aumentó hasta ser 1,414 veces la última.

25 [Aplicabilidad Industrial de la invención]

**[0146]** De acuerdo con un método o un aparato de preparación de la invención, puede obtenerse una solución que contiene componentes biológicos con la que puede mejorar la precisión del análisis y la solución es preferible como muestra para el análisis del proteoma en investigaciones médicas y farmacéuticas y campos de trabajo clínicos.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una solución para análisis proteómico que tiene una composición cambiada de componentes biológicos en la que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales es menor de 0,3 y la proporción de concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales es al menos 10 veces más alta que la proporción de concentración en la solución de partida que contiene componentes biológicos, comprendiendo el procedimiento someter la solución que contiene componentes biológicos a tratamiento en al menos dos etapas; en el que las dos etapas se seleccionan entre (1) una etapa de adsorción de una parte o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual o superior al de la albúmina; (2) una etapa de retiro de una parte o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento con un tamiz molecular; y (3) una etapa de concentración de proteínas, en donde se emplea en la etapa (1) o la etapa (2) una membrana de separación de fibra hueca de polisulfona que contiene canales de flujo que tienen una estructura asimétrica que se deriva de polisulfona y poli(vinilpirrolidona) y tiene una proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina, definida como

$$\frac{\text{coeficiente de tamizado de } \beta 2\text{-microglobulina,}}{\text{coeficiente de tamizado de albúmina}}$$

de al menos 50.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usa una membrana de separación que contiene una o más sustancias seleccionadas de celulosa, acetato de celulosa, un policarbonato, una polisulfona, un éster de ácido (poli)metacrílico, un éster de ácido (poli)acrílico, una poliamida, fluoruro de polivinilideno, poliacrilonitrilo, polietileno y polipropileno, en la etapa (3).

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que se usa un material que fija una o más sustancias seleccionadas de un grupo que consiste en una polietilenimina, una aminometilpiridina, un polifenol, un colorante azul, un ión metálico divalente y un compuesto que contiene grupo alquilo en la superficie, en la etapa (1) o la etapa (2).

4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que una o más sustancias seleccionadas de un grupo que consiste en un tensioactivo, un emulsionante, un disolvente orgánico, un alcohol, un etilenglicol, un propilenglicol, una polietilenimina, una aminometilpiridina, sulfato de protamina, sulfato de amonio, un polifenol, un colorante azul, una sal caotrópica y un compuesto que contiene un grupo hidrofóbico seleccionado de metilo, bencilo, fenilo, clorometilo, octilo y laurilo, se añade a una solución acuosa en la etapa (1) o la etapa (2).

5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución que contiene componentes biológicos contiene una muestra de componentes obtenidos de un ser humano.

6. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la membrana de separación tiene una proporción de permeación comparativa de al menos 70.

7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales es menor de 0,1.

8. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la membrana tiene una proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina no superior a 10.000.

9. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la proporción de concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales en la solución que tiene una composición cambiada es al menos 100 veces más alta que la proporción de concentración en la solución que contiene componentes biológicos.

10. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que los componentes biológicos son una solución que contiene proteínas extraídas de sustancias obtenidas de sangre, plasma sanguíneo, sueros, orina, ascitis, saliva, lágrima, líquido cefalorraquídeo, exudado pleural o células.

11. Un procedimiento de análisis de proteínas contenidas en componentes biológicos, que comprende la preparación de una solución que tiene una composición cambiada de los componentes biológicos mediante un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y a continuación el análisis de las proteínas contenidas en la solución.

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el medio para analizar proteínas incluye al menos uno seleccionado entre espectrometría de masas, análisis electroforético y cromatografía de líquidos.

13. Un aparato para preparar una solución adecuada para análisis proteómico que tiene una composición cambiada en la que la proporción de concentración de albúmina en las proteínas totales es menor de 0,3 y la proporción de concentración de  $\beta$ 2-microglobulina en las proteínas totales es al menos 10 veces más alta que la proporción de concentración en la solución de partida que contiene componentes biológicos, en el que el aparato comprende al menos dos tipos de medios conectados mediante una trayectoria de flujo y seleccionados entre (1) medios de adsorción de una parte o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual o superior al de la albúmina; (2) medios de retirada de una parte o todas las proteínas que tienen un peso molecular igual o superior al de la albúmina mediante fraccionamiento con un tamiz molecular; y (3) medios de concentración de proteína, y en el que (1) ó (2) comprende una membrana de separación de fibra hueca de polisulfona que contiene canales de flujo que tienen una estructura asimétrica que se deriva de polisulfona y poli(vinilpirrolidona) y tiene una proporción de permeación comparativa de  $\beta$ 2-microglobulina con respecto a albúmina de al menos 50.

14. Aparato de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende una trayectoria de salida de flujo de líquido a ser conectada a un cromatógrafo de líquidos, un aparato electroforético o un espectrómetro de masas.

FIG. 1

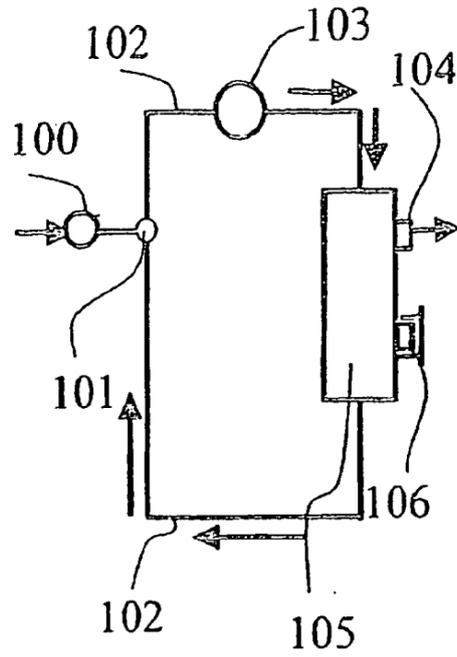


FIG. 2

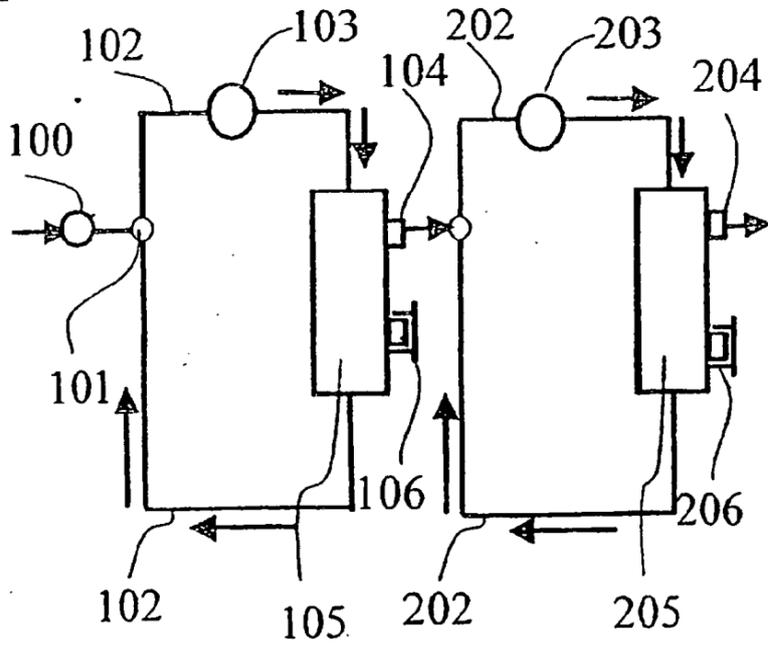


FIG. 3

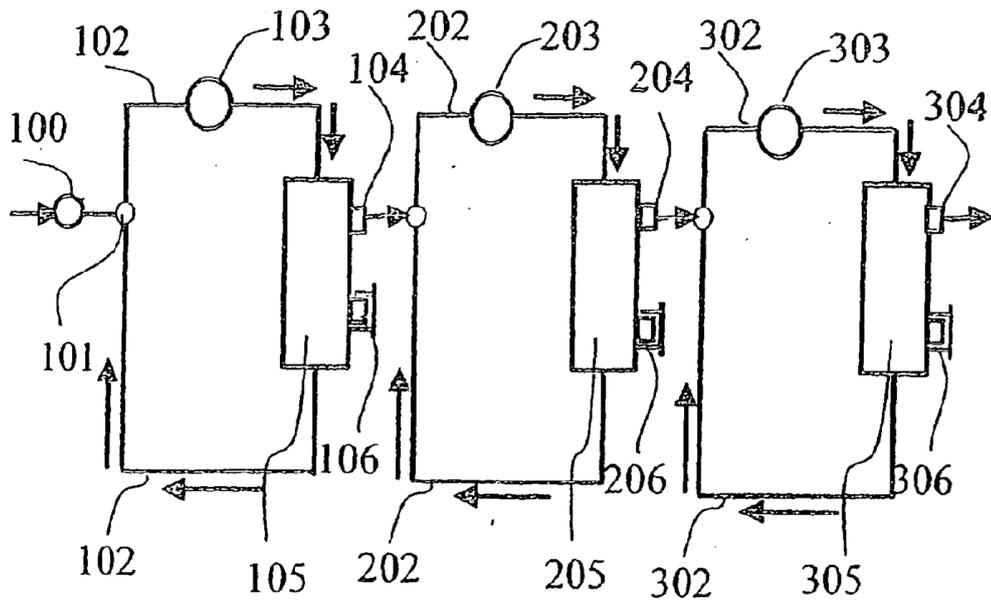


FIG. 4

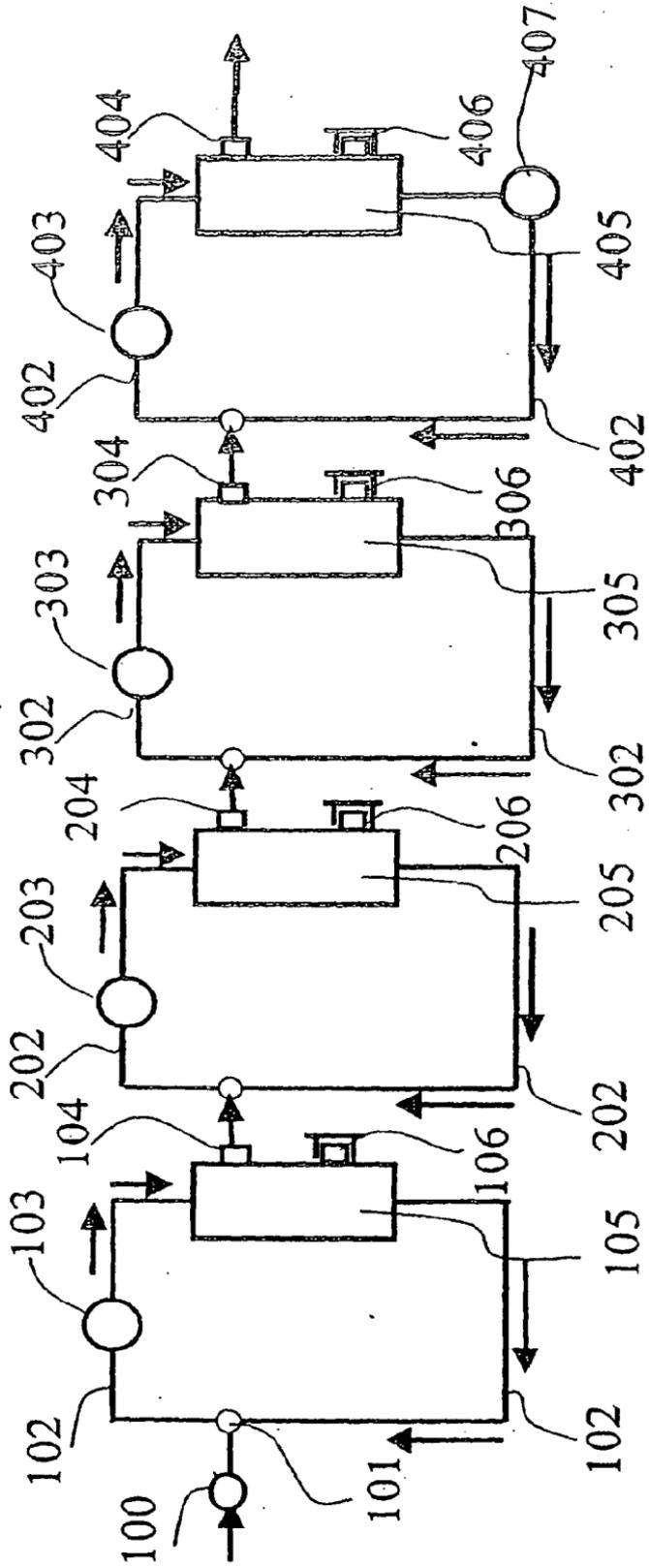


FIG. 5

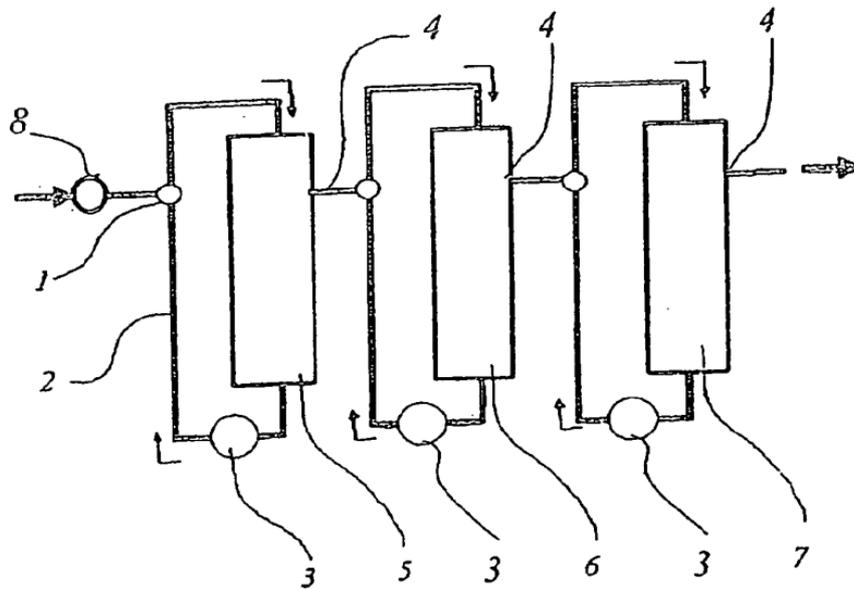


FIG. 6

Marcador S1 S2 S3

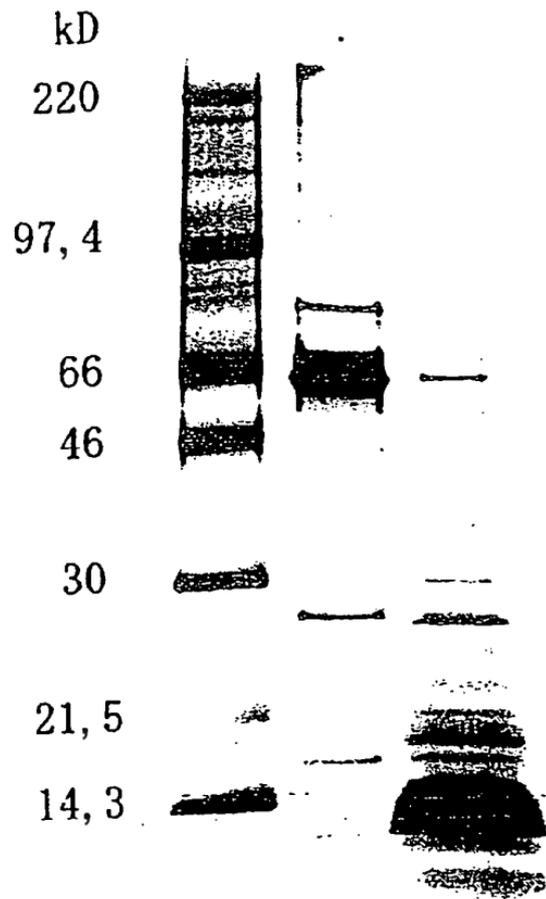


FIG. 7

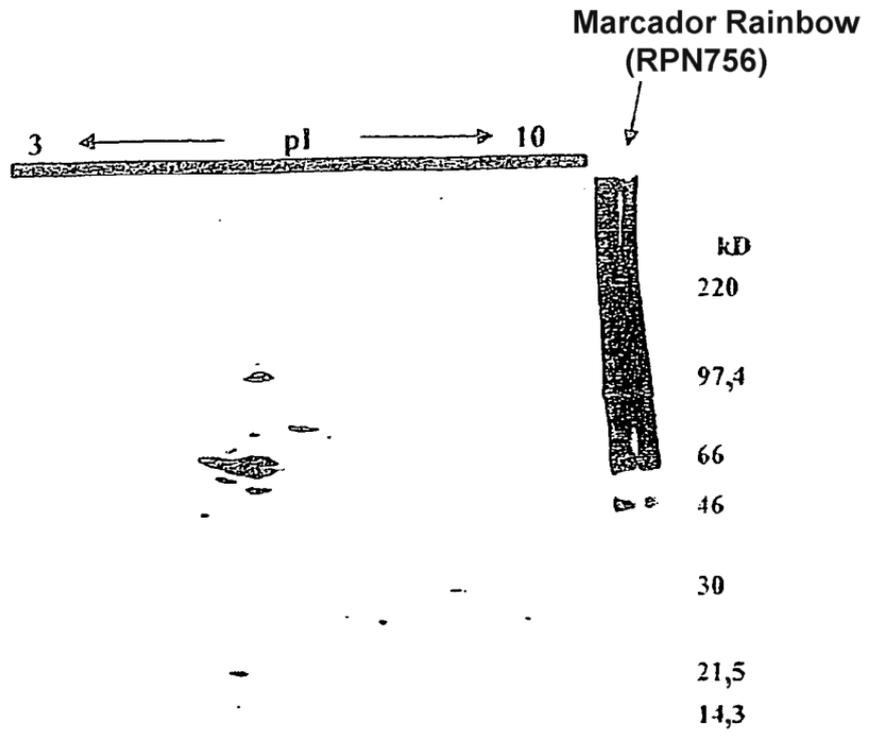
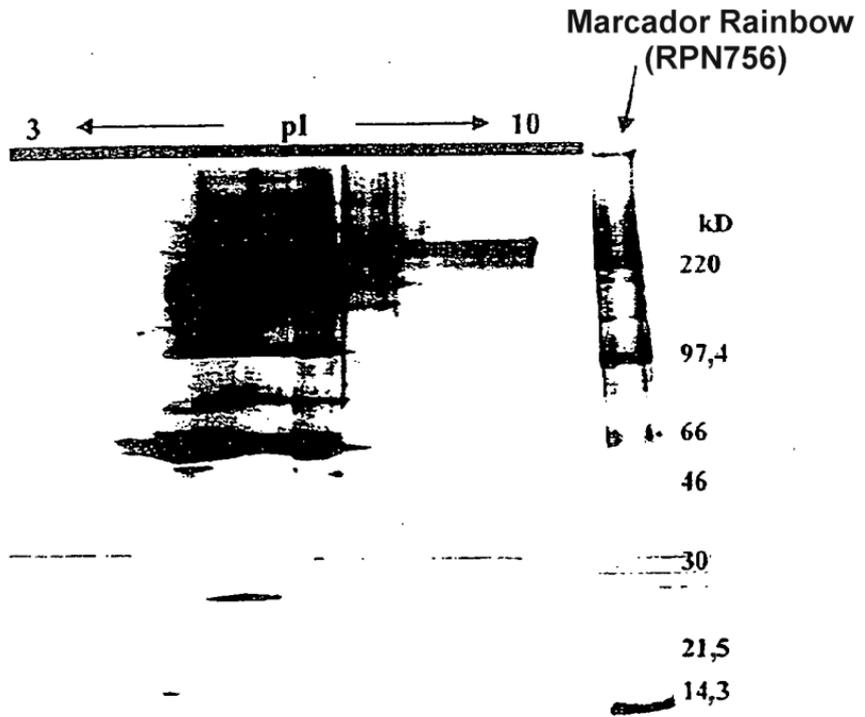


FIG. 8



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- 10 • JP 2002542163 A [0017] • JP 3297707 B [0017]

**Literatura diferente de patentes citadas en la descripción**

- 15 • The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. **Anderson NL ; Anderson NG.** proteomics(Molecular & Cellular Proteomics). The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, 2002, vol. 1, 845-867 [0017]
- New Biochemical Experiments, vol. 1; Proteins (1) separation · refining · characteristics. TOKYO KAGAKUDOZIN CO., LTD, 1990, vol. 1 [0017]
- Illustrated Bioexperiment 5. CELL TECHNOLOGY. SHUJUNSHA Co., Ltd, 2001 [0017]
- **N. Ahmed et al.** *Proteomics*, 23 June 2003 [0017]
- **D. L. Rothmund et al.** *Proteomics*, 2003, vol. 3, 279-287 [0017]