

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 406**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34** (2006.01)

**B01D 61/00** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2005 PCT/JP2005/000638**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2005 WO05070954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2005 E 05703866 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 1707573**

54 Título: **Fraccionador**

30 Prioridad:

**21.01.2004 JP 2004013253**

**30.01.2004 JP 2004023080**

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

**14.03.2017**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku  
Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**TANAHASHI, KAZUHIRO;  
KUMO, ICHIRO;  
KUROKI, NOBUYUKI;  
SUGAYA, HIROYUKI;  
YAMADA, SATOKO;  
WADA, SHIGEHISA;  
JUNG, GIMAN;  
KURODA, TOSHIHIKO y  
SEKIGUCHI, SHUJI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 605 406 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).

## DESCRIPCIÓN

Fraccionador

5 **Sector de la técnica**

10 La invención se refiere a un dispositivo para obtener una muestra con una composición modificada a partir de una solución que contiene un componente biológico, en particular de un líquido bruto tal como sangre humana, plasma, orina o similar, mediante el fraccionamiento de moléculas biológicas tales como proteínas de la solución, particularmente del líquido bruto. Específicamente, con el objetivo de hacer posible el análisis del proteoma clínico, la invención se refiere a un método de fraccionamiento y a un dispositivo de fraccionamiento para obtener una solución con una composición modificada a partir de componentes biológicos mediante la eliminación de componentes que inhiben la detección de componentes traza, proteínas de peso molecular particularmente alto.

15 **Técnica anterior**

20 Recientemente, la investigación del análisis del proteoma (proteómica) ha empezado a llamar la atención como investigación postgenoma. Dado que es una suposición muy probable que las proteínas, productos genéticos, están más directamente vinculados con síntomas de enfermedades en comparación con los genes, ha sido muy esperado que los resultados y logros de investigaciones del análisis del proteoma de proteínas investigadoras a fondo puedan aplicarse ampliamente para el diagnóstico y la atención médica. Por otra parte, es muy posible encontrar muchas proteínas que causan enfermedades y factores relevantes a enfermedades, que no pueden encontrarse por el análisis del genoma.

25 Un análisis estructural a alta velocidad se hace posible por un MS (espectrómetro de masas) y técnicamente ha contribuido en gran medida al rápido avance de análisis del proteoma, y la aplicación práctica de MALDI-TOF-MS (espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz) ha permitido la realización de un ultramicroanálisis de polipéptidos a un alto rendimiento, y eso hace que sea posible identificar incluso rastrear proteínas que no se pueden detectar de forma convencional y, por consiguiente, se convierte en una poderosa herramienta para la búsqueda de factores relevantes para enfermedades.

30 La primera finalidad de la aplicación clínica del análisis del proteoma es encontrar proteínas biomarcadores inducidas o eliminadas por enfermedades. El biomarcador se comporta en relación con los síntomas de las enfermedades, de modo que puede ser un marcador para el diagnóstico y también muy posiblemente se convierte en una diana para la producción de productos farmacéuticos. Es decir, puesto que los resultados y logros del análisis del proteoma son muy posiblemente aplicables a encontrar un marcador de diagnóstico y una diana para la producción de productos farmacéuticos en lugar del gen especificado, se puede decir que el análisis del proteoma se convierte en una tecnología clave para el diagnóstico y la atención médica en la era postgenoma y puesto que el biomarcador identificado lleva directamente beneficios para los pacientes, es decir, evaluación de la respuesta a los fármacos y la especulación de manifestaciones de efectos secundarios, se puede decir que esta técnica desempeña un papel importante para promover la denominada atención médica personalizada (atención a medida).

45 En el caso en que el análisis del proteoma (proteómica clínica) se va a introducir en las investigaciones clínicas, es necesario analizar de forma rápida y fiable un gran número de muestras y por otra parte, debido a que cada muestra clínica es escasa en cantidad y muy valioso, se requiere realizar rápidamente una medición de alta resolución, alta sensibilidad, y altamente funcional. La espectrometría de masas ha impulsado considerablemente el análisis y las características de los espectrómetros de masas, es decir, una alta sensibilidad y alto rendimiento han contribuido en gran medida al análisis. Sin embargo, aunque las técnicas y los aparatos se han mejorado con rapidez, la situación actual aún no está lista para realizar de forma sencilla y rápida el análisis del proteoma en un campo clínico.

50 Una de las causas se atribuye al tratamiento previo de muestras clínicas. Es necesario fraccionar y refinar las proteínas de una muestra clínica como tratamiento previo del análisis de masas y el tratamiento tarda todavía varios días y la operación del pretratamiento es complicada y requiere experiencia y conocimientos y eso se convierte en un obstáculo alto en contra de la aplicación clínica. Si el diagnóstico de una enfermedad en todo el cuerpo y el control de los síntomas son posibles con una pequeña cantidad de sangre y fluido corporal, es notablemente útil, sin embargo, hay muchos temas difíciles de superar debido a la variación de las proteínas contenidas en el plasma.

60 Se supone que hay 100.000 o más tipos de proteínas humanas y aproximadamente 10.000 tipos de proteínas contenidas 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 (150-190 kDa), transferrina (80 kDa), haptoglobina (> 85 kDa), y lipoproteína (varios 100 kDa) y todas ellas existen en una gran cantidad (> mg/ml). Por otra parte, muchas de las proteínas fisiológicamente activas tales como hormonas peptídicas, interleuquina, y citoquinas consideradas como biomarcadores de síntomas y factores relevantes para enfermedades existen en una traza (<ng/ml). Los contenidos no son más de un nivel de nano a pico en comparación con aquellos de los componentes de alto contenido con altos pesos moleculares. En cuanto al tamaño de las proteínas, el 70 % o menos en todos los tipos de proteínas tienen un peso molecular de 60 kDa o

inferior y las proteínas biomarcadores antes mencionadas existentes en una traza están casi todas incluidos en este intervalo (referencia al Documento de No Patente n.º 1). Dado que estas proteínas se excretan parcialmente a la orina a través de un riñón, no solo la sangre sino también la orina se puede utilizar como una muestra.

5 Para realizar el análisis del proteoma mediante investigación serológica general, es en un principio esencial 1) eliminar los componentes de alto peso molecular con un peso molecular de 60.000 o superior, que se convierten en obstáculos para la detección de componentes traza relevantes para la enfermedad y 2) recuperar los componentes traza separados relevantes para las enfermedades y que tienen un peso molecular de menos de 60.000 tan fiablemente como sea posible.

10 Actualmente, la cromatografía líquida de alta resolución (LC) y la electroforesis en 2 dimensiones (electroforesis en gel de 2 dimensiones de poliacrilamida: 2D-PAGE) se han empleado como medio de separación y eliminación de las proteínas de alto peso molecular, sin embargo se necesita de 1 a 2 días solamente para la operación de LC y 2D-PAGE. El tiempo necesario para las mismas es muy largo en comparación con el tiempo de análisis, varios minutos, mediante MALDI-TOF-MS y ESI-MS (espectrometría de masas de ionización por electrospray) y el punto ventajoso notable que MS, un medio de análisis, tiene un alto rendimiento no se puede exhibir suficientemente en el análisis del proteoma clínico. Por lo tanto, hay que decir que en el momento actual, MS es insuficiente en aplicaciones prácticas para la finalidad de obtener resultados de análisis dentro de 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 la utilización de la EM para las investigaciones clínicas diarias. Por lo tanto, se espera que la rapidez del diagnóstico de las investigaciones clínicas mediante análisis del proteoma clínico se pueda mejorar notablemente si se resuelven los problemas antes mencionados. En la práctica, se ha deseado fabricar dispositivos y aparatos disponibles que puedan fraccionar una cantidad muy pequeña de una muestra y separar las proteínas dianas a una alta velocidad para reemplazar a LC y 2D-PAGE.

25 Además, puesto que LC y 2D-PAGE son aplicables solo para una cantidad muy pequeña de una muestra, la cantidad de un biomarcador contenido en una muestra obtenida de esta manera es muy pequeña, incluso a veces ocurre que no se detecta ningún marcador si el análisis de proteínas se realiza por el análisis de MS o el análisis de electroforesis en 2 dimensiones se realiza en el caso de los métodos de preparación de muestra descritos anteriormente.

30 Como productos ya prácticamente utilizados o técnicas divulgadas para los medios de eliminación de una sustancia objeto principal, albúmina, hay un vehículo en el que se inmoviliza un ligando de afinidad tal como un colorante azul, un aparato tubular centrífugo (referencia al Documento de No Patente 2, Documento de Patente 1) para el fraccionamiento de componentes de alto peso molecular por filtración centrífuga, un método de fraccionamiento por principio de electroforesis, un método de precipitación tradicional tal como precipitación con etanol por Cohn, y un método de fraccionamiento por cromatografía (referencia al Documento de No Patente n.º 3). Además, se comercializan productos para eliminar simultáneamente la albúmina y la inmunoglobulina G (IgG). Sin embargo, todos ellos tienen problemas tales como la insuficiencia de la capacidad de separación y de fraccionamiento, falta de idoneidad para una cantidad muy pequeña de una muestra, la contaminación de agentes químicos que son obstáculos para la espectrometría de masas y escasa capacidad de reproducción.

45 2D-PAGE y la cromatografía de líquidos son altamente funcionales. Sin embargo, son técnicas complicadas y que requieren mucho tiempo y por tanto, se han necesitado dispositivos convenientes y con alta eficacia de separación dentro de un corto período de tiempo. En estos años, un método de uso de un gel, Affi-Gel Blue (referencia al Documento de No Patente n.º 4) y un método de uso del sistema "Gradiflow" (referencia al Documento de No Patente n.º 5) se reportan como métodos de eliminación de albúmina eficaces y mejorados, sin embargo no se ha informado todavía de ninguna técnica más simplificada y altamente eficaz para la separación. Además, no se puede negar que el gel Blue elimina particularmente solo las proteínas con pesos moleculares altos tales como la albúmina y al mismo tiempo también las proteínas se someten al análisis del proteoma. Como un aparato de filtración en el que se puede hacer circular un líquido, se divulga un aparato de filtración que comprende un alojamiento cargado con una membrana plana enrollada en espiral (referencia al Documento de Patente 2), sin embargo la capacidad de separación del aparato, ya que no es suficiente. Además, para detectar una traza de proteínas con gran precisión se tiene que evitar la contaminación por sustancias extrañas. Las sustancias extrañas pueden incluir aquellas además de las proteínas y células y microorganismos además de las sustancias deseadas. Además, en el análisis de las proteínas del suero de, por ejemplo, un paciente, las proteínas del suero de otro paciente se convierten en sustancias extrañas. Hasta ahora, no se dispone de ningún aparato en el que se realice una contramedida contra la contaminación por sustancias extrañas.

60 Con respecto a un método de separación y recuperación de proteínas a partir de una solución de proteínas mediante una membrana de separación, los Documentos de Patente 3 y 4 divulgan los métodos. El Documento de Patente 3 divulga solamente un método, pero no un aparato práctico que tiene una estructura indispensable para la separación de proteínas. Además, el Documento de Patente 4 no hace referencia a un aparato de separación único provisto de todas las partes constituyentes indispensables.

65

Como se divulga en el Documento de Patente 4, es bien conocida una técnica de separar y refinar proteínas deseadas mediante el uso de una membrana de fibra hueca. Aunque el documento de Patente 4 no lo divulga directamente, es común emplear un método de separar una sustancia deseada en estas técnicas de separación mediante la conexión de columnas que tienen membranas o columnas llenas de gel con una bomba de flujo a través de un tubo de silicio; transportar una fase móvil por la bomba de flujo; conducir un líquido bruto que contiene la sustancia deseada a las columnas; y así llevar el líquido en contacto con las membranas o la columna. En el caso de tratar una pluralidad de muestras diferentes, se requiere el trabajo de lavado para evitar la contaminación entre los respectivos procesos de análisis y, en consecuencia, se necesita un tiempo y en caso de que hayan patógenos contenidos en las muestras, la fuga de patógenos puede ocurrir durante el tratamiento y puede infectar posiblemente a un trabajador con los patógenos.

Los métodos y los aparatos se han desarrollado para resolver esos problemas y, en consecuencia, el análisis del proteoma se ha empleado ampliamente en investigaciones médicas y en campos clínicos de tratamiento médico y se ha hecho posible realizar rápidamente exámenes y el diagnóstico con una alta precisión y, por lo tanto, se espera que el análisis sea una herramienta fuerte para aclarar las causas de enfermedades para las que todavía no hay a disposición ningún método eficaz de curación o que son difíciles de curar hasta el momento o para el desarrollo de métodos de diagnóstico en etapas tempranas de estas enfermedades.

[Documento de No Patente n.º 1] Anderson NL, Anderson NG "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects", *Proteómica (Proteómica Molecular & Celular)*, EE.UU., La Sociedad Americana de Bioquímica y Biología Molecular, Inc., (2002) vol. 1, pág. 845-867:

[Documento de No Patente n.º 2] Radhakrishna S. Tirumalai *et al.*, "Characterization of the low molecular weight human serum proteome", *Proteómica Molecular & Celular*, La Sociedad Americana de Bioquímica y Biología Molecular, Inc., (2003) vol. 2, pág. 1096-1103:

(Documento de No Patente n.º 3] La Sociedad Bioquímica de Japón, "New Biochemical Experiments, vol. 1", *Proteínas (1) características de separación y refinado*", TOKIO KAGAKUDOZIN CO., LTD. (1990):

[Documento de No Patente n.º 4] N. Ahmed *et al.*, "An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum", *Proteómica*, (2003) vol. 3, pág. 1980-1987:

[Documento de No Patente n.º 5] D.L. Rothemund *et al.* "Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the Gradiflow", *proteómica*, (2003), vol. 3, pág. 279-287

[Documento de Patente n.º 1] Publicación Nacional de Solicitud de Patente Japonesa (Abierta al Público) n.º 2002-542163:

[Documento de Patente n.º 2] Solicitud de patente japonesa Abierta al Público (JP-A) n.º 04-330921:

[Documento de Patente n.º 3] JP-A n.º 59-116223:

[Documento de Patente n.º 4] JP-A n.º 7-133.289:

[Documento de Patente n.º 5] JP-A n.º 2003-130882:

[Documento de Patente n.º 6] JP-A n.º 58-40323

[Documento de Patente n.º 7] Patente Japonesa n.º 3297707 WO2004/000444 proporciona dispositivos y métodos de filtración de flujo tangencial para el tratamiento de leucocitos.

#### Problemas a resolver por las invenciones

En vista del estado anterior de la técnica, los objetivos de las invenciones son para resolver lo siguiente:

1) proporcionar un dispositivo de fraccionamiento para separar un soluto deseado simple y rápidamente con poca contaminación por sustancias extrañas en una solución a obtenerse a partir de un líquido bruto, que es una solución que contiene componentes biológicos y con escasa contaminación fuera del sistema y

2) proporcionar un método de fraccionamiento y un dispositivo de fraccionamiento de componentes biológicos mediante la eliminación eficaz de las proteínas de alto peso molecular contenidas en una solución que contiene componentes biológicos

#### Medios para resolver los problemas de las invenciones

(1) En consecuencia, la presente invención proporciona un dispositivo de fraccionamiento para separar solutos en un líquido bruto mediante una membrana que comprende una parte de suministro para la carga del líquido bruto; una parte de filtración con una membrana para la filtración de algunos de los solutos en el líquido bruto enviado desde la parte de suministro; una parte de concentración para la concentración del filtrado procedente de la parte de filtración; una parte de recuperación para la recuperación de la solución concentrada obtenida en la parte de concentración;

una bomba de flujo para el envío de una fase móvil;  
en el que la bomba de flujo es una bomba de tubo provista de un rotor giratorio y un rodillo instalado de manera giratoria en la circunferencia exterior del rotor;  
en el que la parte de suministro, la parte de filtración, la parte concentración, la parte de recuperación, y un canal  
5 de flujo que conecta las partes respectivas forman un circuito cerrado y se ensamblan en un cartucho desechable  
en el que al menos porciones de los canales de flujo se exponen a la pared exterior del cartucho desde el  
exterior del cartucho, en el que el cartucho se puede separar del rodillo de la bomba de flujo y disponerse de tal  
manera que una porción de la pared exterior del cartucho funciona como un miembro de compresión mediante su  
10 acoplamiento con la bomba de rodillos para comprimir las porciones expuestas de los canales de flujo cuando el  
rodillo se hace girar con el fin de hacer circular los líquidos en las partes respectivas del cartucho.

Las realizaciones pueden proporcionar también lo siguiente:

15 El dispositivo de fraccionamiento como se ha descrito anteriormente se caracteriza por que la capacidad interior  
total del circuito cerrado es de 50 ml o menos.

20 El dispositivo de fraccionamiento como se ha descrito anteriormente se caracteriza por que el aparato de filtración se  
emplea para cada una de la parte de filtración y de la parte de concentración. El dispositivo de fraccionamiento como  
se ha descrito anteriormente se caracteriza por que el aparato de filtración es un módulo que tiene membranas de  
fibra huecas.

25 El dispositivo de fraccionamiento como se ha descrito anteriormente que se caracteriza por que el canal de flujo que  
conecta la parte de suministro y la parte de filtración está provisto de una bomba. El dispositivo de fraccionamiento  
como se ha descrito anteriormente que se caracteriza por que la parte de recuperación es un recipiente para el  
muestreo de un líquido concentrado.

30 El dispositivo de fraccionamiento como se ha descrito anteriormente que se caracteriza por que una parte de tampón  
para tamponar el cambio volumétrico en el momento de cargar el líquido bruto se instala en cualquier posición en los  
circuitos.

35 En el presente dispositivo de fraccionamiento al menos una porción del circuito compuesto por la parte de  
suministro, la parte de filtración, la parte concentración, la parte de recuperación, y los canales de flujo que conectan  
las partes respectivas se ensambla en un cartucho.

40 En el dispositivo de fraccionamiento, la bomba de flujo es una bomba de tubo provista de un rotor giratorio y de un  
rodillo instalado de manera giratoria en la circunferencia exterior del rotor y una porción de la pared exterior del  
cartucho es un miembro de compresión para comprimir una parte del circuito.

45 El dispositivo de fraccionamiento puede estar provisto de un mecanismo de transporte para el transporte del  
cartucho en la dirección hacia y desde el rotor de la bomba de tubo de tipo rodillo para comprimir una tubería de  
flujo. El dispositivo de fraccionamiento presente se puede utilizar con un líquido bruto que es un fluido corporal o una  
solución que contiene un componente biológico.

50 El dispositivo de fraccionamiento presente puede comprender un cartucho y una bomba de tubo de tipo rodillo para  
la separación de solutos o algunos de los solutos en un líquido bruto mediante una membrana, en el que el cartucho  
comprende al menos una porción de un circuito que tiene al menos una parte de suministro para cargar el líquido  
bruto, medios conectados con la parte de suministro por un canal de flujo para el fraccionamiento de los solutos del  
líquido bruto mediante una membrana, y una parte de recuperación conectada con los medios para el  
fraccionamiento de los solutos para la recuperación de los solutos fraccionadas y el circuito es un circuito cerrado y  
una parte de la pared exterior del cartucho es un miembro de compresión para comprimir el tubo de la bomba de  
tubo de tipo rodillos y una parte del circuito se forma en una parte de la pared exterior del miembro de compresión.

55 Una línea de tuberías de un dispositivo de fraccionamiento para separar solutos o algunos de los solutos de un  
líquido bruto mediante una membrana, incluyendo al menos una porción que comprende una parte de suministro  
para cargar el líquido bruto, medios conectados con la parte de suministro por un canal de flujo para el  
fraccionamiento de los solutos del líquido bruto mediante una membrana, y una parte de recuperación conectada  
con los medios para el fraccionamiento de los solutos para la recuperación de los solutos fraccionados en un  
cartucho, puede proporcionar un circuito cerrado y una parte de la pared exterior del cartucho forma un miembro de  
compresión y un tubo que forma una parte del circuito se instala en una porción de la pared exterior del miembro de  
60 compresión.

Un método de separación se divulga como sigue.

65 1) Un método de separación de componentes biológicos para la separación de algunos de los componentes  
biológicos mediante el suministro de una muestra derivada del componente biológico a un sistema de separación  
de anticuerpo-adsorción-membrana que contiene, en una parte intermedia o posterior del sistema de separación

de membrana, un anticuerpo capaz de adsorber proteínas específicas y que tiene una relación de permeación de microglobulina  $\alpha$ 1 humana y albúmina humana (permeabilidad de microglobulina  $\alpha$ 1 humana/permeabilidad de albúmina humana) en un intervalo de 1,5 o más a 1.000 o menos bajo la condición de que no exista ningún anticuerpo que absorba proteínas en el sistema y caracterizado por que la concentración de proteínas obtenidas por la separación es del 10 % o menos en una concentración del 100 % alcanzada por el sistema de separación de membranas bajo la condición de que no existe ningún anticuerpo.

2) El método de separación de componentes biológicos antes mencionado estando caracterizado por que las proteínas específicas pueden ser albúmina de suero, inmunoglobulina G, inmunoglobulina A, inmunoglobulina M, transferrina, haptoglobina,  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 2-macroglobulina,  $\alpha$ 1-glucoproteína ácida, fibrinógeno, complemento C1q, complemento C3, complemento C4, complemento C8, complemento C9, factor complemento B, apolipoproteína A, apolipoproteína B, Lp(a), colágeno, miosina, actina, citoqueratina, queratina, y/o fibronectina.

3) El método de separación de componentes biológicos antes mencionados estando caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, monoclonal, o sus fragmentos que contienen los sitios de reconocimiento de antígenos.

(4) El método de separación de componentes biológicos antes mencionado como se describe en uno de los métodos, estando caracterizado por que el anticuerpo se fija en la superficie de la membrana del sistema de separación de membrana.

(5) El método de separación de componentes biológicos antes mencionado como se describe en uno de los métodos, estando caracterizado por que el sistema de separación de membrana comprende columnas que contienen membranas de separación en su interior y dispuestas en múltiples etapas en serie y el anticuerpo se fija en la superficie en el lado de líquido bruto de la membrana de separación de la columna en la primera etapa.

(6) El método de separación de componentes biológicos antes mencionado como se describe en uno de los métodos, estando caracterizado por que el sistema de separación de membrana comprende columnas que contienen membranas de separación en su interior y dispuestas en múltiples etapas en serie y el anticuerpo se fija en la superficie en el lado de permeación de la membrana de separación de la columna en la primera etapa.

(7) El método de separación de componentes biológicos antes mencionado como se describe en uno de los métodos, estando caracterizado por que el sistema de separación de membrana comprende columnas que contienen membranas de separación en su interior y dispuestas en múltiples etapas en serie y el anticuerpo existe en la fase móvil en el canal de flujo entre la membrana de la columna en una etapa anterior y la membrana de la columna en una etapa posterior.

(8) El método de separación de componentes biológicos antes mencionado como se describe en uno de los métodos, estando caracterizado por que el sistema de separación de membrana comprende columnas que contienen membranas de separación en su interior y dispuestas en múltiples etapas en serie y el anticuerpo se fija en el canal de flujo entre la membrana de la columna en una etapa anterior y la membrana de la columna en una etapa posterior.

9) Un método de separación de componentes biológicos que comprende un aparato de separación de membrana que tiene una relación de permeación de microglobulina  $\alpha$ 1 humana y albúmina humana con un peso molecular de 60.000 en un intervalo de 2 o más y 1.000 o menos y un aparato de tratamiento de anticuerpos que contiene un anticuerpo en el medio o lado posterior del canal de flujo del aparato de separación de membrana.

Un método de fraccionamiento se describe como sigue.

(1) Un método de fraccionamiento de proteínas para el fraccionamiento de las proteínas basándose en los pesos moleculares de las proteínas llevando una solución que contiene una pluralidad de tipos de proteínas y agua en contacto con una membrana de separación de fibra hueca y estando caracterizado por que la solución a someterse a fraccionamiento contiene un disolvente orgánico.

(2) El método de fraccionamiento de proteínas como se ha descrito anteriormente estando caracterizado por que el contenido del disolvente orgánico es el 1 % en volumen o más y menos del 20 % en volumen.

(3) El método de fraccionamiento de proteína como se ha descrito en uno de los métodos estando caracterizado por que el disolvente orgánico es acetonitrilo.

(4) El método de fraccionamiento de proteína como se ha descrito en uno de los métodos estando caracterizado por que el fraccionamiento se realiza a 30°C o menos.

### Efectos de la invención

Debido al empleo del aparato de circuito cerrado, el dispositivo de fraccionamiento divulgado como la presente invención puede realizar, simple y eficazmente, el fraccionamiento de proteínas de alto peso molecular, tales como la albúmina de un líquido bruto, en particular de un fluido corporal tal como suero en un corto periodo de tiempo, mientras que se evita la contaminación de la muestra de análisis (líquido recuperado del dispositivo de fraccionamiento) y el riesgo biológico. Además, en el dispositivo de la invención, una porción del dispositivo se dispone en un cartucho, el proceso de fraccionamiento de una muestra siguiente se puede iniciar fácilmente.

De acuerdo con el método de separación descrito anteriormente, las proteínas con altos pesos moleculares se eliminan eficazmente a partir de una solución que contiene una pluralidad de proteínas con diferentes pesos moleculares y una solución enriquecida con una traza de proteínas de bajo peso molecular se puede obtener para que sea posible detectar fácilmente estas proteínas de bajo peso molecular por espectrometría de masas.

De acuerdo con el método de fraccionamiento descrito anteriormente, las proteínas con altos pesos moleculares se eliminan eficazmente a partir de una solución que contiene una pluralidad de proteínas con diferentes pesos moleculares y una traza de proteínas de bajo peso molecular se puede recuperar con una alta eficacia.

**5 Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] Una vista en perspectiva de un dispositivo utilizado para el Ejemplo 1 (para la presente invención).

[Figura 2] Una vista frontal y una vista de la cara lateral izquierda del dispositivo utilizado para el Ejemplo 1 (para la presente invención).

10 [Figura 3] Una vista esquemática que muestra una realización de un método de separación de componentes biológicos.

[Figura 4] Una fotografía de electroforesis (SDS-PAGE) de las fracciones respectivas obtenidas en el Ejemplo 2.

**Explicación de los símbolos**

15

1: una jeringa

2a: una junta de tres vías

2b: un botón de caucho (parte de suministro)

2c: una articulación

20

5a, 5b, 5c: un módulo de membrana de fibra hueca de una parte de separación

5d: un módulo de fibra hueca de una parte concentración

6a, 6b, 6c, 6d: una boquilla inferior

7a, 7b, 7c, 7d: una boquilla inferior de una parte tronco

8: un miembro de compresión

25

8a: un eje de guía

8b: un eje de guía

9: un rodillo giratorio de tipo multicanal

9a: un rodillo giratorio

9b: un rodillo giratorio

30

9c: un rodillo giratorio

10: un recipiente de recuperación

11: una tapa del recipiente de recuperación

12: una parte posterior equipada con un tubo

14: un cartucho

35

M: todo el cuerpo de un dispositivo de fraccionamiento

15: una válvula de tres vías

16: un canal de flujo que hacer circular una solución

17a, 17b, 17c: una bomba de flujo

18: una salida de la solución permeada

40

19: módulo de separación de membrana

20: una salida de filtrado

21: un módulo de adsorción

22: una salida de filtrado

23: un módulo de concentración

45

**Mejores modos de las realizaciones de la invención**

En un primer momento, se describirán los elementos en común entre las respectivas invenciones.

50

El término "Fraccionamiento" en la presente invención significa la separación de un soluto contenido en una solución y en el caso en que una pluralidad de tipos de solutos esté contenida, significa la separación de la totalidad o algunos de los solutos. En el caso de la preparación de una muestra de análisis del proteoma de componentes de fluidos corporales por el método de análisis por MS, las proteínas deseadas que deben recuperarse y las proteínas a desecharse se separan.

55

Los componentes corporales en forma de compuestos pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, vitaminas y sales inorgánicas y prácticamente componentes de fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo.

60

El término "concentración" en la presente invención significa la eliminación de un disolvente de una solución. En el objetivo de la invención, generalmente el agua es un disolvente. Se permite que una pequeña cantidad de un componente de bajo peso molecular se pierda en ese momento.

65

La albúmina puede incluir albúmina derivada de ser humano, bovino, y otros animales mamíferos y aves. Un componente de alto peso molecular que tiene un peso molecular superior al de la albúmina puede incluir principalmente proteínas con un peso molecular igual o superior al peso molecular (60.000 a 70.000) de la albúmina.

Si el peso molecular es igual o superior a la de la albúmina se puede determinar por el denominado método SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato de poliacrilamida de sodio). En el caso en que se especifica el uso de albúmina en la invención, es preferible definir la invención con albúmina humana.

5 Una realización preferible del dispositivo de fraccionamiento de la presente invención se describe a continuación. El dispositivo de fraccionamiento comprende

- 1) una parte de suministro para la carga del líquido bruto;
- 10 2) una parte de filtración para la filtración de algunos de los solutos en el líquido bruto enviado desde la parte de suministro;
- 3) una parte de concentración para la concentración del filtrado procedente de la parte de filtración;
- 4) una bomba de flujo para el envío de una fase móvil introducida en el dispositivo al momento del fraccionamiento y se caracteriza por que un circuito compuesto por la parte de filtración, la parte de concentración, y un canal de flujo que conecta la parte de filtración y la parte de concentración es un circuito cerrado. Debido a la formación del circuito cerrado, la contaminación y el riesgo biológico se pueden evitar.

El dispositivo de fraccionamiento antes mencionado comprende además

- 5) una parte de recuperación para la recuperación de la solución concentrada obtenida en la parte de concentración y que se caracteriza por que un circuito compuesto por la parte de filtración, la parte de concentración, y un canal de flujo que conecta la parte de filtración y la parte de concentración y un circuito compuesto por la parte de concentración, la parte de recuperación, y un canal de flujo que conecta la parte de concentración y la parte de recuperación son, respectivamente, circuitos cerrados.

25 Debido a la estructura antes mencionada, una solución deseada se puede obtener en la parte de recuperación sin contaminación.

El dispositivo de la invención se proporciona con la parte de suministro para la carga de un líquido bruto. La estructura de la parte de suministro puede estar equipada con un botón de caucho o una válvula de tres vías. El líquido bruto se suministra a la parte de suministro tal como un botón de caucho o la válvula de tres vías de una bomba de jeringa, un inyector, o una bolsa de líquido bruto. Estos medios de suministro son preferibles en términos de altas propiedades de cierre y capacidad de control de la velocidad de suministro. Con respecto a la velocidad de suministro del líquido bruto, si la velocidad de suministro es demasiado alta, la presión del circuito cerrado se incrementa y fugas del líquido o rotura de membrana se producen debido al aumento de la presión en el circuito cerrado. Por otro lado, si la velocidad es demasiado lenta, se necesita mucho tiempo para tratar el líquido bruto.

En el caso de cargar el líquido bruto en la parte de suministro desde el exterior del circuito cerrado, una alteración del volumen igual al volumen del líquido bruto suministrado se produce en el circuito. Si no hay ninguna parte que absorba la alteración del volumen, el exceso de presión se puede aplicar al circuito o a la membrana. Por lo tanto, es preferible instalar una parte de tampón para absorber la alteración volumétrica en cualquier posición en el circuito. Es preferible utilizar un mecanismo tal como una bolsa o una jeringa equipada con un pistón herméticamente conectado a través de un conector en forma de T.

La parte de suministro y la parte de filtración se conectan entre sí a través de un canal de flujo. En general, es preferible instalar una bomba de flujo para su transporte en el canal de flujo. Algunos de los solutos se filtran por la parte de filtración.

En la parte de filtración del dispositivo de la invención, es preferible utilizar un aparato de filtración y es más preferible utilizar un módulo de filtración que contiene una membrana de fibra hueca o membrana plana. Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular de la membrana, una membrana que tiene una capacidad de fraccionamiento molecular adecuada (valor discriminatorio) se puede seleccionar en consideración del peso molecular del soluto a recuperar y del peso molecular de un soluto a eliminar.

También es preferible que el módulo de filtración tenga una entrada de líquido bruto y una salida de líquido bruto en el lado de líquido bruto de la membrana y una salida de los componentes de filtrado en el lado de filtración de la membrana. Es preferible que un canal de flujo se componga, respectivamente, mediante la conexión de la entrada de líquido bruto y la salida de líquido bruto de un tubo, la instalación de una bomba de flujo en el canal de flujo, y por lo tanto, la circulación del líquido objeto a ser tratado en el lado de líquido bruto de la membrana en el módulo por las bombas. Por lo tanto, el líquido objeto a tratar se somete repetidamente al proceso de filtración.

A fin de mejorar la eficacia de separación, los módulos de filtración pueden conectarse en serie en múltiples etapas en la parte de filtración. En el caso de múltiples etapas, el primero módulo de filtración cerca de la parte de suministro se conecta con la parte de suministro a través de un canal de flujo en el medio del canal de flujo que conecta la entrada de líquido bruto y la salida de líquido bruto. El canal de flujo de la salida del componente filtrado del primer módulo de filtración se conecta con el centro del canal de flujo que conecta la entrada de líquido bruto y la salida de líquido bruto del siguiente módulo de filtración. El canal de flujo del siguiente módulo de filtración

conectado a la salida del componente filtrado se conecta de manera similar al canal de flujo lateral del líquido bruto del siguiente, pero un módulo. La función de la parte de filtración del último módulo de filtración se termina, sin embargo, el canal de flujo conectado a la salida del componente filtrado se conecta a la siguiente parte de concentración. En consecuencia, el filtrado de la parte de filtración se envía a la parte de concentración.

5 En el caso de módulos conectados en una filtración de múltiples etapas, las bombas existentes en los canales de flujo que conectan las entradas de líquido bruto y las salidas de líquido bruto de los módulos de filtración respectivos se pueden operar por fuerzas motrices separadas o pueden operarse de forma concéntrica por una sola fuerza motriz. Es preferible operar el dispositivo a un caudal constante para enviar el líquido bruto sin estancamiento y  
10 obtener la máxima eficacia de separación.

Los solutos se clasifican generalmente de acuerdo con el peso molecular de los solutos en el módulo de filtración. La membrana de separación que se utiliza en el módulo de filtración puede ser un filtro o una membrana de fibra hueca que contiene uno o más tipos de materiales seleccionados de un grupo que consiste en polímeros de tipo acetato de  
15 celulosa tales como celulosa y triacetato de celulosa; policarbonatos; polímeros de tipo polisulfona tal como polisulfona y poliéter sulfona; polimetacrilatos tales como poli (metacrilato de metilo); poliácridatos, nylon poliamida; fluoruro de polivinilideno); poliácridonitrilo, poliésteres, poliuretanos, poliestirenos, polietileno, y polipropileno y el uso de estos materiales hace que sea posible separar los componentes de soluto más eficazmente. Todos los tipos de  
20 membranas de separación de tipo membrana plana (filtros), tales como filtros planos y filtros de tipo cartucho y membranas de separación de fibra hueca (membranas de hilo hueco) de fibras huecas se pueden utilizar. Una o más clases de sustancias (ligandos) seleccionadas de un grupo que consiste en anticuerpos, sus fragmentos, polietilenimina, aminometilpiridina, polifenol, colorante azul, un ion metálico divalente (por ejemplo,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , o similares), y un compuesto hidrófobo (por ejemplo, compuestos con un grupo metilo, grupo bencilo, grupo fenilo, grupo clorometilo, grupo octilo, grupo laurilo o similares) puede fijarse en estos filtros o fibras huecas, de  
25 manera que los filtros o fibras huecas puedan estar provistos de afinidad con los solutos. En el caso de que el dispositivo se utilice para el tratamiento previo de una muestra para el análisis por MS, una función para adsorber y eliminar las proteínas innecesarias para el análisis por MS se puede proporcionar.

La membrana de separación a utilizarse en el módulo de filtración de la invención es particularmente,  
30 preferentemente, una membrana de fibra hueca, debido a que tiene un área superficial amplia por la cantidad de un líquido a tratar y una baja pérdida de presión en el proceso. Módulos de membrana de fibra hueca, que son aparatos de filtración provistos de una membrana de fibra hueca, se han utilizado convencionalmente, ampliamente, como un riñón artificial (un módulo de diálisis) relevante para las proteínas y todos se han utilizado para mantener las proteínas tales como albúmina sin fugas y dejando escapar componentes de bajo peso molecular, tales como la creatinina y la urea y purificando, por tanto, la sangre que fluye en el lado hueco interior de las fibras huecas. Por  
35 otra parte, la membrana de separación que se utiliza en la parte de filtración de la primera invención se utiliza con el objetivo de recoger los componentes filtrados desde el lado de líquido bruto para su análisis. Prácticamente, es preferible tener fugas de componentes proteicos con un peso molecular tan bajo como 5 kDa o menos, mientras que los componentes de alto peso molecular tales como la albúmina se dejan en el lado de líquido bruto.

40 A continuación, el canal de flujo de la última salida del componente filtrado de la parte de separación se conecta a la parte de concentración. También en la parte de concentración, es preferible utilizar un aparato de filtración. Con respecto a la capacidad de fraccionamiento correspondiente a los pesos moleculares del aparato de filtración que se va emplear, una membrana o una membrana de ultrafiltración que tiene una capacidad de fraccionamiento por peso  
45 molecular (valor discriminatorio: 0,05 a 0,5 kDa o menos) que es suficiente para evitar la permeación de péptidos en una solución salina fisiológica se puede utilizar. En la parte de concentración, es preferible instalar un módulo de concentración provisto de una membrana de fibra hueca o una membrana plana. También en el aparato de filtración, es preferible utilizar un módulo que contiene una membrana de separación en su interior. Como la membrana que se utiliza en el módulo de concentración se utiliza preferentemente una membrana de fibra hueca debido a la misma  
50 razón que la descrita anteriormente, es decir, alta capacidad de tratamiento y una baja pérdida de presión. También, con respecto al módulo de concentración, es preferible tener una entrada de líquido bruto y una salida de líquido bruto en el lado de líquido bruto de la membrana y una salida del componente filtrado en el lado de filtración de la membrana. Es preferible que la entrada de líquido bruto y la salida de líquido bruto se formen utilizando un tubo para formar un canal de flujo y una bomba de flujo se instala en o sobre el canal de flujo y el líquido objeto a tratar se  
55 hace circular en el lado de líquido bruto de la membrana en el módulo mediante la bomba. Por consiguiente, el líquido objeto a tratar puede someterse varias veces al proceso de filtración. Un disolvente o componentes con peso molecular extremadamente bajo, que no son objeto de separación, salen a través de la salida del componente filtrado. Puesto que se desea para suprimir la alteración volumétrica en el dispositivo en la medida de lo posible, es preferible que los componentes que salen a través de la salida del componente filtrado se mantengan en el  
60 dispositivo de fraccionamiento. Por lo tanto, es preferible conectar un canal de flujo a la salida del componente filtrado y conectar un lado del canal de flujo a la parte de suministro o al circuito en la periferia de la parte de suministro. También en el canal de flujo, es preferible instalar una bomba de flujo.

65 Un canal de flujo de un módulo en la etapa previa se conecta al canal de flujo que conecta la salida de líquido bruto y la entrada de líquido bruto del módulo de separación en la parte de separación y también al canal de flujo que conecta la salida de líquido bruto y la entrada de líquido bruto de la parte de la concentración y es preferible que una

bomba de flujo se instale a fin de enviar el líquido por la bomba de flujo después de que el canal de flujo se conecta y los líquidos se unen. Como resultado, la separación y la eficacia de concentración se mejora aún más.

5 En el dispositivo de fraccionamiento de la invención, la parte de concentración se conecta a la parte de recuperación para recuperar el líquido concentrado en la parte de concentración. Un recipiente para recuperación se utiliza generalmente como la parte de recuperación. En el caso de que un módulo de concentración se utilice para la parte de concentración y la salida de líquido bruto y la entrada de líquido bruto se conecten por un canal de flujo, el líquido que circula en el canal de flujo es objeto de recuperación. Es preferible instalar una bomba de flujo también en el canal de flujo. Además, para formar un circuito cerrado, es preferible que dos canales de flujo se formen en la parte de recuperación y uno de los canales de flujo es preferentemente un canal de flujo en el que se suministra un líquido concentrado procedente de la parte de concentración tal como se ha descrito anteriormente y el otro canal se instala preferentemente para enviar aire en el recipiente de recuperación al lado de líquido bruto de la parte de concentración a través de una tubería de flujo.

15 En el dispositivo de fraccionamiento de la invención, las bombas de flujo instaladas basándose en la necesidad entre la parte de suministro y la parte de separación, en la parte de separación, la parte de concentración, y la parte de recuperación, y entre estas partes se pueden operar de forma independiente u operarse coaxialmente por una sola fuerza motriz. En el caso de operación coaxial, la velocidad de operación y la secuencia de cada parte se pueden separar correctamente.

20 Con respecto al dispositivo de fraccionamiento de la invención para lograr el objetivo, los canales de flujo formados en el circuito se pueden instalar de forma independiente, sin embargo con el fin de alcanzar la comodidad y la estabilidad de su instalación, se selecciona para componer el circuito del dispositivo de fraccionamiento mediante el ensamblado de al menos algunos de los medios para el fraccionamiento por membranas tales como la parte de suministro, la parte de filtración, y la parte de concentración, la parte de recuperación, y los canales de flujo para la conexión de las partes respectivas en un cartucho. Además, es necesario formar una parte del exterior del cartucho como un miembro de compresión para una bomba de tubo de tipo rodillo. Es preferible hacer que el cartucho se pueda separar de una parte de accionamiento del rotor de una bomba de flujo o de un miembro de soporte de la bomba. El cartucho y el contenido son aún más preferentemente desechables. Es más preferible que las porciones del canal de flujo en las que bombas de flujo de la parte de suministro, la parte de separación, la parte de concentración, y la parte de recuperación, se deben establecer queden expuestas a la pared exterior del cartucho desde el interior del cartucho y que el tubo que forma el canal de flujo expuesto se comprima por el rotor de una bomba de tubo de tipo rodillo. En este caso, las entradas de líquido bruto y las salidas de líquido bruto de los módulos respectivos instalados en la parte de filtración y en la parte de la concentración se ajustan para coincidir con la dirección en la que el tubo se conecta al miembro de compresión. El tubo que forma los canales de flujo conectados a los puertos de los respectivos módulos se activa para hacer circular un líquido en su interior a través del miembro de compresión. Para mantener la precisión de la compresión, es preferible que el tubo se coloque cerca del lado de la base del eje de accionamiento del rotor. Si la precisión es baja, el tubo puede no presionarse y el suministro cuantitativo dificulta. Para la instalación sencilla y precisa del cartucho en un cuerpo principal, es preferible instalar medios en el cartucho y una bomba, respectivamente, para el montaje de los mismos entre sí. Por ejemplo, un orificio de guía se forma en uno, y un eje de guía se forma en el otro y el eje de guía se inserta en el orificio de guía para realizar el montaje fácilmente. Sucesivamente, la posición del miembro de compresión se fija para mantener una distancia adecuada con respecto al canal de flujo compuesto por una pluralidad de tubos desde el rodillo giratorio de la bomba de tubo de tipo rodillos. Cuando se acciona la bomba de tubo de tipo rodillo, el líquido bruto se puede enviar sucesivamente en una pluralidad de los módulos. Si una caja de almacenamiento que almacena una pluralidad de módulos y el miembro de compresión se unen previamente y un tubo, que es una porción del canal de flujo, se mantiene previamente en el miembro de compresión, la unión y separación de estos componentes a y de la parte de bomba de rodillos resulta muy fácil.

50 El material para el cartucho no está particularmente limitado y aquellos fabricados de plástico son preferibles ya que son fáciles de manejar y transportar y tienen alta resistencia. La forma no está particularmente limitada, sin embargo, es preferible mantener un espacio suficiente para almacenar las columnas y un canal de líquido en el interior y que la cara de compresión del miembro de compresión que se ha de comprimir por el rotor de accionamiento de la bomba de flujo se curve como un arco en la dirección de recepción de la fuerza de compresión. El área superficial de contacto se incrementa si la cara de compresión se curva y, en consecuencia, se puede garantizar un caudal estable.

60 La función de envío de la solución se completa pellizcando el tubo con la superficie del miembro de compresión del cartucho y el rodillo instalado de manera que gira en la circunferencia exterior del rotor de accionamiento de la bomba de tubo de tipo rodillo y los líquidos existentes en las partes respectivas en el cartucho se distribuyen cuando el rotor de accionamiento se hace girar en la dirección circunferencial. El tubo se instala así para comprimirse en la cara de compresión de la vaina exterior del cartucho, sin embargo, no es necesariamente necesario que el tubo tenga contacto con la cara compresión. Para evitar que el tubo vibre verticalmente en la dirección de compresión, es particularmente preferible instalar el tubo en forma de arco en la cara de compresión curvada como un arco en la vaina exterior del cartucho.

65

El cartucho se puede empujar contra el rotor de accionamiento manual, sin embargo, desde un punto de vista de la seguridad de un trabajador, es preferible instalar un mecanismo para mover el cartucho cuando el cartucho se instala y transportar el cartucho a la posición donde el rotor comprime el tubo instalado en el cartucho.

- 5 En el caso de fraccionamiento por el dispositivo de fraccionamiento de la invención, la fase móvil es preferentemente agua o una solución acuosa. Particularmente, en el caso de que el líquido bruto sea un fluido corporal y los solutos sean proteínas, es preferible utilizar una solución tampón de pH. Además, en el caso de que una muestra obtenida por este dispositivo tenga que someterse a un analizador de MS, es preferible utilizar una solución tampón que contenga una sustancia volátil que no inhiba el análisis y, por ejemplo, carbonato de amonio, acetato de amonio, y formiato de amonio son preferibles para su utilización. La solución acuosa de la fase móvil puede contener una o más sustancias seleccionadas de un grupo que consiste en un tensioactivo, un emulsionante, un disolvente orgánico, un alcohol, glicol de etileno, glicol de polipropileno, polietilenoimina, aminometilpiridina, sulfato de protamina, sulfato de amonio, polifenol, colorante azul, sal caotrópica, y un compuesto hidrófobo, de manera que la coagulación de las proteínas, que son los componentes de alto peso molecular, se promueve para producir moléculas gigantes y la adsorción se promueve por tanto y las fugas de proteínas fuera de la membrana de fraccionamiento se suprimen para discriminar eficazmente los componentes de alto peso molecular y mejorar la eficacia de separación final. El tensioactivo (un tensioactivo anfótero y un tensioactivo aniónico) es eficaz para suprimir la reacción mutua entre las proteínas y promover el fraccionamiento molecular.
- 10
- 15
- 20 El ligando y los solutos de la solución acuosa antes mencionada se pueden seleccionar teniendo en cuenta la extensión de la separación de las proteínas deseadas.

Es preferible utilizar un tubo como el canal de flujo para la conexión de los respectivos elementos constituyentes del dispositivo de fraccionamiento de la invención y, más preferible, utilizar un cuerpo más suave y elástico. Por ejemplo, resinas de silicona, poli (cloruro de vinilo), poliuretanos, resinas de flúor, cauchos naturales y cauchos sintéticos se utilizan preferentemente y resinas de silicona y resinas de flúor son particularmente preferibles, ya que apenas adsorben los componentes biológicos deseados.

25

El recipiente de recuperación para recoger el líquido concentrado de la invención se hace preferentemente de un material que apenas adsorbe los componentes biológicos deseados y se prefiere utilizar polipropileno, resinas de silicona y resinas fluoradas. Además, el poliestireno y el vidrio se pueden utilizar también y en ese caso, para suprimir la adsorción de los componentes biológicos deseados, aquellos cuyas superficies interiores se someten a tratamiento para suprimir la adsorción de los componentes biológicos son preferibles. El tratamiento para la supresión de la adsorción es, por ejemplo, un tratamiento hidrófilo y prácticamente un tratamiento con plasma, revestimiento con un polímero hidrófilo e injerto superficial se pueden emplear.

30

35

El dispositivo de fraccionamiento de la invención es adecuado para la separación de moléculas biológicas a partir de un líquido bruto que contiene componentes biológicos, plasma sobre todo humano, suero, orina, saliva, líquido lagrimal, líquido cefalorraquídeo, ascitis, líquido pleural, líquido amniótico, y linfa. Los tamaños de los filtros respectivos y de los módulos de membrana de fibra hueca y las velocidades de flujo de los líquidos sometidos a reflujo se determinan correctamente, dependiendo de la calidad y la cantidad del material biológico a ser el material bruto tal como plasma, orina o similares, sin embargo, en general, si un módulo es demasiado grande, no puede manipularse fácilmente y, además, puesto que el área superficial del propio módulo se hace más grande, da como resultado la pérdida de la adsorción de componentes traza. Si un módulo es demasiado pequeño, se hace imposible el tratamiento de una gran cantidad de una muestra. Particularmente en el caso del tratamiento de una muestra en una cantidad de 0,1 a 100 ml, que es un volumen práctico en el campo clínico, a través de una membrana de fibra hueca, es preferible utilizar un módulo cilíndrico con un diámetro de 0,2 a 5 cm y una longitud de 3 a 20 cm. Además, la capacidad interior total del circuito cerrado es preferentemente de 50 ml o menos. En el caso de la ejecución del tratamiento de fraccionamiento al denominado tamaño en mesa, la cantidad de una muestra es preferentemente de 1 a 400 ml y más preferentemente de 5 a 100 ml para suero. El fraccionamiento se realiza preferentemente a un caudal de 0,1 a 20 ml/min y más preferentemente de 0,2 a 10 ml/min.

40

45

50

Una muestra obtenida finalmente en la parte de recuperación mediante la carga de un líquido bruto que contiene los componentes biológicos en el dispositivo de fraccionamiento de la invención y el uso del dispositivo es útil para analizar diversos tipos de proteínas por cromatografía líquida, electroforesis, MS, o similares, y particularmente útil para el análisis del proteoma mediante electroforesis y MS.

55

La MS a ser empleada para el análisis de una muestra obtenida por el dispositivo de fraccionamiento de la invención no está particularmente limitada y como un tipo de parte de ionización, un tipo de ionización por electrospray, un tipo de ionización a presión atmosférica, un tipo de colisión de átomo a alta velocidad, un tipo cuadrupolo, un tipo de resonancia de ciclotrón, un tipo de sector magnético, o un tipo de ruptura de ionización parte láser de matriz de soporte se puede utilizar en combinación con una parte de análisis de masas tal como un tipo de trampa de iones, un tipo de tiempo de vuelo, o una parte de análisis de masa de tipo conversión de Fourier. En este caso, la MS se puede utilizar en la forma de una MS en tándem tal como MS/MS y MS<sup>n</sup> y FT-MS. En el caso de una MS en tándem, todos los tipos de MS son utilizables y en particular se mejora la eficacia cuando la MS se utiliza en combinación con el tipo de trampa de iones, un tipo de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), y FT-MS.

60

65

Los datos estructurales de diversos tipos de componentes proteicos pueden recogerse por el análisis en combinación con el dispositivo de la invención y los datos incluyen no solo el modelo prestablecido de péptido-masa (PMF), sino también datos estructurales primarios (secuencia de aminoácidos) de los respectivos péptidos.

5 Un método de separación biológica se proporciona solamente como información a continuación

- 1) un sistema de separación de membrana que tiene una relación de permeación de microglobulina  $\alpha 1$  humana a albúmina humana (permeabilidad de microglobulina  $\alpha 1$  humana/permeabilidad de albúmina humana) en un intervalo de 1,5 o más a 1.000 o menos bajo una condición de que no existe ningún anticuerpo que adsorbe proteínas en el sistema y
- 10 2) un anticuerpo que adsorbe las proteínas es esencialmente necesario, y se requiere que la concentración de las proteínas específicas obtenidas por el método de separación sea del 10 % o menos en una concentración del 100 % alcanzada por el sistema de separación de membrana bajo la condición de que no existe ningún anticuerpo. Aquí,  $\alpha 1$  microglobulina representa proteínas con un peso molecular de 30.000 o menos y la albúmina humana representa proteínas con un peso molecular de 60.000 o más.

Por ejemplo, un suero se utiliza como una muestra, puesto que la albúmina y la inmunoglobulina existen en una alta concentración en el suero, estas proteínas no se pueden separar por completo incluso si se utiliza una membrana y algo se fuga fuera de la membrana. Además, la muestra contiene también péptidos fragmentos con un peso molecular bajo y producidos por la descomposición de las proteínas y tales péptidos no pueden separarse por la membrana y, por lo tanto, se desea eliminarlos con un anticuerpo. Las proteínas que se fugan y sus péptidos fragmentos inhiben la detección de trazas de componentes mediante espectrometría de masas. La separación por este método hace que sea posible disminuir las proteínas con fugas una décima parte y aumentar la sensibilidad de la espectrometría de masas y detectar una traza de componentes. En los métodos, se utiliza un sistema de separación de membrana. Como una membrana a ser utilizada para la separación se utilizan membranas generalmente porosas y cualquier tipo de membranas planas de tipo membrana de separación (membranas planas), tales como un filtro plano y un filtro de tipo cartucho y una membrana de separación hueca (membrana de fibra hueca) de fibra hueca se puede utilizar. Por lo general, una fibra hueca tiene una superficie ancha por cantidad de un líquido a tratar y una baja pérdida de presión y, por lo tanto, se puede utilizar de manera más eficaz. Además, el filtro plano tiene un punto ventajoso en que la membrana es fácil y económica de formar. Como un material a ser utilizado para la membrana se ejemplifica uno o más tipos de materiales seleccionados de un grupo que consiste en celulosa, acetato de celulosa, policarbonato, polisulfonas, polimetacrilatos tales como poli (metacrilato de metilo), poliácridatos, poliamidas, poli (fluoruro de vinilideno), poliácridonitrilos, poliésteres, poliuretanos, poliestirenos, polietileno, y polipropileno. Entre ellos son preferibles las polisulfonas que se han utilizado ampliamente para dializadores debido a que tienen una buena capacidad de fraccionamiento.

La capacidad de separación del sistema de separación de membrana se define como una relación de permeación de microglobulina  $\alpha 1$  humana a albúmina humana (permeabilidad de microglobulina  $\alpha 1$  humana/permeabilidad de albúmina humana) en un intervalo de 1,5 o más a 1.000 o menos bajo la condición que no existe ningún anticuerpo en el sistema. La relación preferible es de 2 o más. Que la relación de permeación sea inferior a 1,5 significa que el diámetro de poro de la membrana es tan grande como para dejar pasar todo tipo de proteínas, independientemente del peso molecular o que el diámetro de poro de la membrana es tan pequeño como para evitar el paso de cualquier tipo de proteína, independientemente del peso molecular y en este intervalo, la membrana no puede trabajar prácticamente como una membrana. Es más deseable que el coeficiente de permeación se mayor, sin embargo en realidad, el coeficiente de permeación es suficiente si es 1.000.

El sistema de separación de membrana es para el fraccionamiento de las proteínas deseadas procedentes de una muestra que contiene proteínas, particularmente una muestra derivada de la sangre, tal como suero. En particular, el sistema puede ser aquél que realizase el procedimiento de fraccionamiento de proteínas de fraccionamiento tales como microglobulina  $\alpha 1$  humana con un peso molecular de 30.000 o menos mediante una membrana en un solo paso o en múltiples etapas.

Es particularmente preferible utilizar un módulo de membrana de fibra hueca para el sistema de separación de membrana anterior. Las fibras huecas se han utilizado convencionalmente ampliamente como un riñón artificial (un módulo de diálisis) correspondiente a las proteínas y todas se han utilizado para mantener las proteínas tales como albúmina sin fugas y dejando escapar componentes de bajo peso molecular, tales como la creatinina y la urea y purificar de este modo la sangre que fluye en el lado hueco interior de las fibras huecas. Por otra parte, las fibras huecas se utilizan en la invención para la recogida de fracciones de fugas fuera de la parte hueca interior de las fibras huecas para el análisis de las fracciones y se utilizan a fin de mantener los componentes de alto peso molecular, tales como la albúmina en el interior de las partes huecas de las fibras huecas y, al mismo tiempo dejar escapar los componentes proteicos con un peso molecular de menos de 30.000, tal como la microglobulina  $\alpha 1$ .

En esta descripción, las proteínas que se adsorben en el anticuerpo son proteínas existentes en una concentración tan alta como 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o más en una muestra a tratar y en el caso de que la muestra sea sangre, suero o plasma, ejemplos son la albúmina sérica, la inmunoglobulina G, inmunoglobulina A, inmunoglobulina M, transferrina, haptoglobina,  $\alpha 1$ -antitripsina,  $\alpha 2$ -macroglobulina,  $\alpha 1$  glicoproteína ácida, fibrinógeno, complemento C1q, complemento

C3, complemento C4, complemento C8, complemento C9, factor de complemento B, apolipoproteína A, apolipoproteína B, Lp(a), queratina, y colágeno y en el caso de que la muestra sea un extracto celular, ejemplos son la miosina, actina, citoqueratina, queratina, y/o fibronectina.

5 El anticuerpo a utilizar puede ser un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal. Además, puede tener cualquier morfología si incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab o F(ab)' y la porción de reconocimiento del antígeno.

10 El anticuerpo puede construirse en el medio de o detrás de un canal de flujo del sistema de separación de membrana en cualquier morfología opcional. Puede existir en un canal de flujo del sistema de separación de membrana, mientras que se disuelva o disperse en una solución o se fije a la superficie interior y/o a la superficie exterior de la membrana. Puede fijarse en perlas esféricas, una tela tejida, o una tela no tejida instalada en un canal de flujo. Una columna llena con un vehículo en el que se fija el anticuerpo se puede instalar en un canal de flujo.

15 En el caso de que el sistema de separación de membrana comprenda columnas que contienen membranas de separación y se disponga en múltiples etapas en serie, un anticuerpo se puede fijar en la superficie de la membrana de separación de la primera columna de paso en el lado de líquido bruto y/o en la superficie en el lado de permeación o en la superficie de la membrana de separación de la segunda columna de paso en el lado de líquido bruto y/o la superficie en el lado de permeación. El anticuerpo se puede fijar en el líquido de fase móvil en el canal de flujo entre la membrana en la etapa anterior y la membrana en la columna en la siguiente etapa.

20 La cantidad del anticuerpo a eliminarse puede ser opcional y puede determinarse de acuerdo con la cantidad de las proteínas que salen de las membranas del sistema de separación de membrana. La cantidad de proteínas con fugas puede aproximadamente determinarse de acuerdo con el contenido de las proteínas de alta concentración contenidas en la muestra a tratar y el coeficiente de tamizado y el tiempo de tratamiento de las proteínas con las membranas. Si la cantidad de anticuerpo es demasiado pequeña, las proteínas no se pueden eliminar por adsorción y por el contrario, si la cantidad es demasiado alta, las membranas se obstruyen y una función de separación suficiente no se pueden obtener en caso de que el anticuerpo se fije en el membranas o se encuentre en un estado libre en el lado de líquido bruto de las membranas.

30 Solo por información se proporciona un dispositivo para realizar un método de separación. El dispositivo de separación de componentes biológicos comprende un dispositivo de separación de membrana que tiene una relación de permeación de microglobulina  $\alpha 1$  humana a albúmina humana (permeabilidad de microglobulina  $\alpha 1$  humana/permeabilidad de albúmina humana) en un intervalo de 1,5 o más a 1000 y un aparato de tratamiento de anticuerpo que contiene un anticuerpo e instalado en el centro o detrás del canal de flujo del aparato de separación de membrana.

40 Las características preferibles del método de separación que utilizan este sistema de separación de membrana son las siguientes.

45 La función del sistema de separación de membrana es separar las proteínas que tienen un peso molecular de 60.000 o más, tal como albúmina a descargarse de una muestra y las proteínas que tienen un peso molecular de 30.000 o menos, tal como la microglobulina  $\alpha 1$ , proteínas deseadas a recuperarse, mediante una membrana. El sistema comprende una membrana porosa que tiene un efecto de tamizado molecular para un filtro plano o una membrana del módulo de membrana de fibra hueca y realiza el fraccionamiento molecular por la separación y el tamizado con la membrana. El uso de las fibras huecas es particularmente eficaz ya que el área superficial de la membrana de fraccionamiento se incrementa considerablemente.

50 El material de la membrana no está particularmente limitado, sin embargo, uno o más tipos de materiales que contienen polímeros seleccionados de un grupo que consiste en celulosa, acetato de celulosa, policarbonatos, polisulfonas, polimetacrilatos tales como poli(metacrilato de metilo), poliacrilatos, poliamidas, poli (fluoruro de vinilideno), poliacrilonitrilo, poliésteres, poliuretanos, poliestirenos, polietileno, y polipropileno se pueden emplear. Con respecto a la estructura de la membrana, tener tanto una estructura de esponja casi una estructura uniforme como tener una doble estructura de una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y una alta resistencia de la membrana se puede utilizar. Las propiedades superficiales de la membrana se determinan de acuerdo con las propiedades de las proteínas a separarse y puede ser hidrófila o hidrófoba.

60 En el caso de una membrana hidrófila, la membrana hidrófila puede incluir aquellas producidas por copolimerización de monómeros hidrófilos y monómeros hidrófobos o una mezcla y polímeros hidrófilos y polímeros hidrófobos formadores de película; aquellas producidas por la unión o adherencia polímeros hidrófilos a las superficies de las membranas de polímeros hidrófobos; y aquellas producidas por tratamiento químico, tratamiento con plasma o tratamiento con radiación de las superficies de las membranas de polímeros hidrófobos y si las superficies se hacen hidrófilas, el método para el tratamiento no está particularmente limitado. Los componentes hidrófilos no están particularmente limitados y ejemplos preferibles pueden incluir polímeros hidrófilos, por ejemplo, óxidos de polialquileño tales como polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol de polivinilo, poli(metacrilato de hidroxietilo), y poliacrilamida. Estas membranas hidrófilas son eficaces en suprimir la adsorción de proteínas necesarias y

recuperarlas sin una pérdida en vano.

Además se pueden utilizar también materiales en los que se fija uno o más de polietilenimina, aminometilpiridina, polifenol, tinte azul, un ion de metal divalente ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , o similares), y un compuesto hidrófobo (es decir, un compuesto del grupo metilo, un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo clorometilo, grupo octilo, grupo laurilo o similares).

Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular de la membrana, se pueden utilizar membranas que tienen una capacidad de fraccionamiento de peso molecular (valor discriminatorio: 30 a 60 kDa o inferior) que es suficiente para evitar una penetración del 50 % o más de albúmina en una solución salina fisiológica.

En este sistema de separación de membrana, además de los medios antes mencionados para el filtrado de las proteínas de bajo peso molecular, se pueden instalar medios para una etapa de concentración. En los medios, una membrana porosa que tiene un efecto de tamizado molecular se puede utilizar para un filtro plano o una membrana del módulo de membrana de fibra hueca y la concentración se realiza por la separación y el tamizado con la membrana. En el caso de que la cantidad de una muestra sea poca, es eficaz utilizar un dispositivo de concentración que comprende un filtro plano unido a un tubo de centrifuga y en el caso de una gran cantidad de una muestra, es eficaz utilizar fibras huecas.

En esta etapa, es preferible utilizar una membrana porosa que tiene un efecto de tamizado molecular para un filtro plano o una membrana del módulo de membrana de fibra hueca y realizar la concentración mediante la separación y el tamizado con la membrana. En el caso de que la cantidad de una muestra sea poca, es eficaz utilizar un dispositivo de concentración que comprende un filtro plano unido a un tubo de centrifuga y en el caso de una gran cantidad de una muestra, es eficaz utilizar fibras huecas.

El material de la membrana que se utilizará para la finalidad antes mencionada no está particularmente limitado, sin embargo, uno o más tipos de materiales que contienen polímeros seleccionados de un grupo que consiste en celulosa, acetato de celulosa, policarbonatos, polisulfonas, polimetacrilatos tales como poli(metacrilato de metilo), poliacrilatos, poliamidas, poli (fluoruro de vinilideno), poliacrilonitrilo, poliésteres, poliuretanos, poliestirenos, polietileno, y polipropileno se pueden emplear. Con respecto a la estructura de la membrana, tener tanto una estructura de esponja casi una estructura uniforme como tener una doble estructura de una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y una alta resistencia de la membrana se puede utilizar.

Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular de la membrana, es preferible utilizar una membrana que tiene una capacidad de fraccionamiento por peso molecular (valor discriminatorio: 10 a 1000 o menos) o se puede utilizar una membrana de ultrafiltración que sea suficiente para evitar la penetración de péptidos en solución salina fisiológica. En el caso de que un anticuerpo que adsorbe las proteínas específicas se suministre en el medio de o detrás del sistema de separación de membrana antes mencionado, no se especifica particularmente si el anticuerpo se trata durante el proceso de fraccionamiento con membrana o en una posición en la que el líquido obtenido en el proceso de fraccionamiento con membrana se pone en contacto con el mismo. Es preferible que el anticuerpo fijado en perlas o gel se envase en una porción o en todo el cuerpo del circuito y, por ejemplo, como un método común, una columna rellena con gel en la que se fija el anticuerpo se instala en una porción del circuito. También es preferible fijar el anticuerpo en el filtro plano o la membrana del módulo de membrana de fibra hueca.

Un método para suministrar el anticuerpo al soporte no está particularmente limitado y ejemplos del método para fijar eficazmente el anticuerpo puede ser un método de fijación del anticuerpo en un sustrato por reacción química utilizando el extremo  $-NH_2$  del anticuerpo; un método de fijación de sacárido oxidado; y un método de fijación del anticuerpo en ligandos de proteína A y proteína G. El anticuerpo a utilizar puede ser un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal sin ninguna limitación. Las proteínas que componen el anticuerpo son preferentemente inmunoglobulina y la inmunoglobulina G es más preferible.

En el caso de que el anticuerpo se pegue a un cuerpo de soporte y se cargue junto con el cuerpo de soporte, el material del cuerpo de soporte no está particularmente limitado y ejemplos a utilizarse preferentemente para los materiales son materiales seleccionados de un grupo que consiste en celulosa, acetato de celulosa, policarbonatos, polisulfonas, polimetacrilatos, poliacrilatos, poliamidas, poli(fluoruro de vinilideno), poliacrilonitrilos, poliésteres, poliuretanos, poliestirenos, polietileno, y polipropileno. Con respecto a la estructura de la membrana, tener tanto una estructura de esponja casi una estructura uniforme como tener una doble estructura de una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y una alta resistencia de la membrana se puede utilizar.

La morfología del material puede incluir perlas esféricas, fibras, telas tejidas, telas no tejidas, materiales de tipo plano que utilizan grapas, y fibras huecas y tienen preferentemente, respectivamente, formas porosas con alta rugosidad superficial debido a que el área de la superficie de adsorción se puede aumentar. También, en el caso de que la membrana de separación tenga la morfología como una membrana plana o una membrana de fibra hueca, la separación y la adsorción se pueden realizar simultáneamente y, por lo tanto, el caso es particularmente preferible.

En el caso de que se utilice el anticuerpo mientras está pegado a una membrana, con respecto a las propiedades del propio sustrato de membrana, aquellas que se hacen hidrófilas con el fin de suprimir la adsorción de proteínas no específicas y las que se hacen hidrófobas con el fin de adsorber selectivamente proteínas de alto peso molecular, tales como la albúmina se pueden seleccionar y utilizar adecuadamente para las respectivas etapas de fraccionamiento y adsorción.

Los ejemplos de la membrana que comprende un sustrato fabricada para ser hidrófila pueden ser aquellas producidas por copolimerización de monómeros hidrófilos y monómeros hidrófobos o una mezcla y polímeros hidrófilos y polímeros hidrófobos formadores de película; aquellas producidas por la unión o adherencia polímeros hidrófilos a las superficies de las membranas de polímeros hidrófobos; y aquellas producidas por tratamiento químico, tratamiento con plasma o tratamiento con radiación de las superficies de las membranas de polímeros hidrófobos. Los componentes hidrófilos no están particularmente limitados y ejemplos preferibles pueden incluir polímeros hidrófilos, por ejemplo, óxidos de polialquileo tales como polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol de polivinilo, poli(metacrilato de hidroxietilo), y poli(acrilamida). Como las membranas hidrófobas, aquellas producidas por la introducción de componentes hidrófobos y las obtenidas mediante la introducción de ligandos hidrófobos en superficies de la membrana se pueden utilizar. Ejemplos de los componentes hidrófobos pueden ser polímeros compuestos por compuestos polimerizables por adición que tienen doble enlace carbono-carbono, tales como ésteres de ácido metacrílico, ésteres de ácido acrílico, olefinas tales como etileno y propileno, acrilonitrilo, y metacrilonitrilo; polisulfonas, y polímeros de celulosa, sin embargo los que se puede utilizar como un material de membrana se pueden utilizar sin ninguna limitación.

Además, los materiales en los que se fija al menos uno de los compuestos seleccionados a partir de polietilenimina, aminometilpiridina, polifenol, tinte azul, un ion de metal divalente, y un compuesto aromático hidrófobo se pueden utilizar también.

En el método de separación de los componentes biológicos de la invención, como una solución para el desarrollo en el sistema, una solución tampón se utiliza preferentemente. Además, la capacidad adsorción o fraccionamiento se puede mejorar mediante la adición de diversos tipos de agentes químicos. En la práctica, la solución puede contener una o más sustancias seleccionadas de un grupo que consiste en un tensioactivo, un emulsionante, un disolvente orgánico, un alcohol, glicol de etileno, glicol de polipropileno, polietilenimina, aminometilpiridina, sulfato de protamina, sulfato de amonio, polifenol, tinte azul, una sal caotrópica, y un compuesto hidrófobo.

Por ejemplo, la adición apropiada de sulfato de amonio, polietilenglicol, polietilenimina, o una sal caotrópica promueve la coagulación de las proteínas, que son componentes de alto peso molecular y en consecuencia produce moléculas gigantes y, en consecuencia, la adsorción se promueve y las fugas de las proteínas de la membrana de fraccionamiento se suprime para reducir de manera eficaz los componentes de alto peso molecular. Mientras tanto, en la etapa de fraccionamiento, la adición adecuada de un agente tensioactivo (un tensioactivo anfótero y un tensioactivo aniónico) es eficaz para suprimir la reacción mutua entre las proteínas y promover el fraccionamiento molecular.

Las fracciones filtradas obtenidas en esta etapa se someten a la siguiente etapa de concentración. En el caso de que la solución se separe suficientemente en la etapa de adsorción y en la etapa de separación de membrana repetida, esta etapa se puede omitir.

En el caso de que el método de separación de los componentes biológicos de la invención implique una pluralidad de etapas, las unidades respectivas para realizar estas etapas se conectan entre sí a través de los canales de flujo y cuando se opera de forma continua, la operación continua se realiza fácil y automáticamente. Por supuesto, las etapas respectivas se pueden operar de forma independiente. Las bombas se instalan en tubos y las soluciones se envían por las bombas y en el caso de una pequeña escala, el transporte de la solución se puede realizar mediante una jeringa y la concentración se puede realizar mediante un dispositivo tipo de columna de revolución en la etapa de concentración. Los elementos del dispositivo que realizan la pluralidad de etapas y que se conectan entre sí a través de canales de flujo se pueden utilizar para el método. Un dispositivo en el que un módulo de membrana de fibra hueca capaz de obtener de manera eficaz proteínas con un peso molecular de 30.000 como  $\alpha_1$  microglobulina mediante filtración y un segundo módulo de membrana de fibra hueca para realizar simultáneamente la adsorción de proteínas específicas y concentrar una solución de proteínas se conectan directamente entre sí por un canal de flujo de solución acuosa, se incluye también como un dispositivo preferible.

La introducción de la etapa de concentración provoca un efecto aún más mejorado. El método también puede incluir repetir la etapa de fraccionamiento de las proteínas de bajo peso molecular permeándolas mediante membranas de separación; insertar la etapa de concentración entre la etapa de fraccionamiento por las membranas de separación y la etapa de adsorción; y realizando la permeación de las membranas de separación con las proteínas nuevamente después de la etapa de adsorción.

El método de separación anterior de los componentes biológicos es adecuado para la separación de moléculas biológicas de una muestra derivada de sangre, particularmente plasma humano y suero. Los tamaños de los filtros respectivos y los módulos de membrana de fibra hueca y las velocidades de flujo de los líquidos sometidos a reflujos

se determinan correctamente, dependiendo de la calidad y la cantidad de la muestra y en el caso de la ejecución del tratamiento de fraccionamiento al denominado tamaño en mesa, la cantidad de la muestra es preferentemente de 1 a 400 ml y más preferentemente de 5 a 100 ml para suero. El fraccionamiento se realiza a un caudal preferentemente de 0,1 a 20 ml/min y más preferentemente de 0,2 a 10 ml/min.

De acuerdo con el método anterior, el tratamiento a alta velocidad se puede realizar por el sistema de separación de membrana y el tiempo que debe adoptarse se encuentra en un intervalo de 1 a 6 horas durante un tiempo de tratamiento y en términos de prevención de la contaminación y de riesgo biológico de la muestra, es posible producir una serie de dispositivos desechables cada vez. Puesto que los aparatos se utilizan repetidamente en el análisis de un sistema de electroforesis o cromatografía líquida, hay un riesgo de contaminación con una muestra y hay un problema en la capacidad de reproducción por columnas de análisis regeneradas y también su funcionamiento es complicada y por lo tanto, el análisis por un sistema de electroforesis o cromatografía líquida no es necesariamente adecuado para el tratamiento frecuente de muchas muestras.

La muestra de análisis obtenida por el método de separación anterior del componente biológico es útil para diversos análisis de proteínas mediante cromatografía de líquidos, electroforesis, o MS y es particularmente útil para el análisis del proteoma por MS o electroforesis. La MS a unirse directa o indirectamente con el dispositivo de la invención no está particularmente limitada y un tipo de ionización por electrospray, un tipo de ionización a presión atmosférica, un tipo cuadrupolo (QQQ), un tipo de sector magnético, un tipo de tiempo de vuelo, un tipo MS/MS, MSn, FT-MS, un tipo de trampa de iones o tipos de combinación de ellos son preferibles. Además, se incluye una MS en tándem tal como MS/MS y MSn y FT-MS (por ejemplo, MS3). En el caso de una MS en tándem, todos los tipos de MS son utilizables y en particular se mejora la eficacia cuando la MS se utiliza en combinación con el tipo de trampa de iones, un tipo de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), y FT-MS y la combinación de sector- aparato de un tipo cuadrupolo y un tipo de trampa de iones. En consecuencia, se hace posible la detección selectiva de los máximos en el análisis de MS/MS y/o MSn.

Los datos estructurales de diversos tipos de componentes proteicos pueden recogerse por el análisis en combinación con el dispositivo de la invención y los datos incluyen no solo el modelo preestablecido de péptido-masa (PMF), sino también datos estructurales primarios (secuencia de aminoácidos) de los respectivos péptidos.

De aquí en adelante, un ejemplo de método de separación de los componentes biológicos se describirá con referencia a los dibujos.

La Figura 3 es un dibujo conceptual de un sistema de separación de componente anticuerpo-membrana de absorción que comprende un elemento de separación de membrana, un elemento de adsorción, y un elemento de concentración. El flujo de un líquido se muestra como una flecha. Una muestra tal como suero se inyecta en un módulo de separación de membrana 19, que es un primer elemento, a través de una válvula de tres vías 15 y se envía y hace circular en el canal de flujo de circulación de la solución 16 realizado a partir de un tubo por una bomba de flujo 17a. El filtrado producido en este proceso se obtiene a través de una salida de líquido permeado 18. El líquido permeado obtenido a través de la salida de líquido permeado 18 se carga en un módulo de adsorción que contiene un módulo de separación en cuya superficie interior se fija un anticuerpo por una bomba de flujo 17b y se hace circular. El líquido permeado que penetra la membrana de separación instalada en el módulo de adsorción se obtiene a través de una salida de filtrado 20. El líquido permeado se hace circular adicionalmente en un módulo de concentración 23 que contiene una membrana para la concentración por una bomba de flujo 17c y el agua y las proteínas con peso molecular muy bajo penetran la membrana y se descargan por una salida de líquido permeado. La solución restante en el módulo de concentración 23 y en el canal de flujo de circulación se extrae para obtener una muestra deseada.

A continuación se describirá un método de fraccionamiento de proteínas, solo como información.

Se proporciona un método de fraccionamiento de proteínas para el fraccionamiento de proteínas en los pesos moleculares de las proteínas llevando una solución que contiene una pluralidad de tipos de proteínas y agua en contacto con una membrana de separación de fibra hueca y estando caracterizado por que la solución a someterse a fraccionamiento contiene un disolvente orgánico. Las proteínas no solo se unen con otras proteínas debido a la acción mutua de hidrofobicidad, sino que también se adsorben sobre la superficie del material. La acción mutua hidrófoba se inhibe por la adición de un disolvente orgánico en la solución y en consecuencia las proteínas con un peso molecular alto se dejan en el lado de líquido bruto y las proteínas con un peso molecular bajo penetran con una alta eficacia.

En el método de separación, se añade un disolvente orgánico. La adición de un disolvente orgánico suprime notablemente fenómeno de adsorción de las proteínas en la membrana de separación, el canal de fluido, tal como el tubo, y en el recipiente para la recuperación de la solución fraccionada. La concentración del disolvente orgánico en la invención está preferentemente en un intervalo del 1 % en volumen o más y menos del 20 % en volumen, más preferentemente en un intervalo del 3 % en volumen o más y menos del 19 % en volumen, e incluso más preferentemente en un intervalo del 5 % en volumen o más y menos del 18 % en volumen. En el caso de dilución de una solución de proteínas de alta concentración con una solución tampón mezclada con un disolvente orgánico, si

se añade una cantidad en exceso del disolvente orgánico a la solución tampón, la solución de proteínas se coagula debido al efecto del disolvente y además, en el caso de que el fraccionamiento de proteínas se realice con una membrana de fibra hueca mediante el método de separación de la invención en el tratamiento previo para el análisis del proteoma de proteínas de suero, si se mezcla una cantidad en exceso del disolvente orgánico, las proteínas pueden coagularse y no se pueden filtrar y, como resultado, el número de proteínas contenidas en la solución fraccionada puede posiblemente disminuir muy significativamente.

En consecuencia, se solicita que se añada el disolvente orgánico hasta el punto en que las proteínas no se coagulen y, en consecuencia, mientras se suprime la adsorción de las proteínas en la membrana de fibra hueca, el canal de fluido, el recipiente de recuperación, y similares, la relación de recuperación de las proteínas se puede mejorar considerablemente.

El disolvente orgánico a utilizar en la invención se requiere que sea soluble en una solución tampón basada en agua y los ejemplos utilizables del disolvente pueden incluir compuestos que contienen nitrógeno tales como acetonitrilo y piridina; compuestos de éter cíclicos tales como 1,4-dioxano y óxido de propileno; compuestos de cetona tales como acetona y metil etil cetona; amidas tales como N, N-dimetilformamida, N, N-dimetilacetamida, N, N'-dimetil-2-imidazolidinona, y N-metil-2-pirrolidona; compuestos tales como sulfolano y sulfóxido de dimetilo que contiene azufre; alcoholes monovalentes tales como metanol, etanol y 2-propanol; celosolves tales como 2-metoxietanol (metilcellosolve) y 2-etoxietanol (etilcellosolve); etanol aminas tales como 2-aminoetanol (monoetanolamina), dietanolamina, y trietanolamina; y alcoholes polivalentes tales como etilenglicol, propilenglicol, dietilenglicol y glicerina y entre todos son los disolventes orgánicos de tipo no-alcohólicos los que se prefieren utilizar. Uno o más tipos de los disolventes orgánicos se pueden añadir a la solución tampón.

El punto de ebullición del disolvente orgánico en la invención es preferentemente 100 °C o menos, más preferentemente 80 °C o menos, y aún más preferentemente 60 °C o menos. Mientras más bajo es el punto de ebullición, la eliminación del disolvente por liofilización y un evaporador se hace más fácil y si la operación se realiza a una temperatura baja al momento de la eliminación del disolvente, la deformación de las proteínas se suprime al límite mínimo y por lo tanto, es preferible.

En la invención, la adición de un disolvente orgánico soluble en agua a la solución tampón es más preferible. En la presente memoria, la solución tampón significa una solución que tiene una función de tamponamiento, es decir, una solución que no causa una alteración notable del pH cuando se mezcla con la solución de proteínas. En consecuencia, puesto que el agua simple no tiene la función de tamponamiento, no puede decirse que el agua sea una solución tampón. Como una composición de la solución tampón en la invención, una solución de carbonato, una solución tampón de dicarbonato, una solución tampón de fosfato, y una solución tampón de acetato se pueden utilizar preferentemente. En consideración de la posibilidad de ejecutar la concentración de la muestra mediante la eliminación del componente de disolvente por un dispositivo de secado por liofilización o un evaporador en el caso de la espectrometría de masa después del fraccionamiento de las proteínas, es preferible que la solución tampón en la invención sea volátil debido a que las sales no permanecen en la muestra. Aquellas que satisfacen la condición anteriormente mencionada son las soluciones tampón producidas utilizando sales de amonio y ejemplos de composiciones tampón son carbonato de hidrógeno de amonio-carbonato de amonio, ácido acético-ácido de amonio acético, y ácido fórmico-formiato de amonio. Cuando una muestra obtenida por fraccionamiento utilizando, por ejemplo, una solución tampón carbonatada de hidrógeno de amonio se liofiliza, la sal de amonio se evapora en forma de amoniaco, dióxido de carbono y agua.

La concentración de sal de la solución tampón para el dispositivo de fraccionamiento de proteínas de la invención no está particularmente limitada, sin embargo, es preferentemente de 1 mM a 1 M y más preferentemente de 10 mM a 100 mM. La concentración de iones hidrógeno (pH) de la solución tampón para el dispositivo de fraccionamiento de proteínas de la invención es preferentemente de 4,0 a 8,0. Si el pH es inferior a 4,0 o más de 8,0, la deformación de las proteínas se hace significativa y por lo tanto no es preferible.

Una membrana de separación se utiliza en este procedimiento y una membrana de fibra hueca se utiliza preferentemente. El material de la membrana de fibra hueca no está particularmente limitado, sin embargo uno o más materiales tipo que contienen polímeros seleccionados de un grupo que consiste en celulosa, acetato de celulosa, policarbonatos, polisulfonas, polimetacrilatos tales como poli(metacrilato de metilo), poliácridatos, poliamidas, poli (fluoruro de vinilideno), poliacrilonitrilo, poliésteres, poliuretanos, poliestirenos, polietileno, y polipropileno se pueden emplear. Con respecto a la estructura de la membrana, tener tanto una estructura de esponja casi una estructura uniforme como tener una doble estructura de una capa densa y una capa de soporte que tiene una alta porosidad y una alta resistencia de la membrana se puede utilizar. Las propiedades superficiales de la membrana se determinan de acuerdo con las propiedades de las proteínas a separarse y puede ser hidrófila o hidrófoba.

La membrana hidrófila puede incluir aquellas producidas por copolimerización de monómeros hidrófilos y monómeros hidrófobos o una mezcla y polímeros hidrófilos y polímeros hidrófobos formadores de película; aquellas producidas por la unión o adherencia polímeros hidrófilos a las superficies de las membranas de polímeros hidrófobos; y aquellas producidas por tratamiento químico, tratamiento con plasma o tratamiento con radiación de las

superficies de las membranas de polímeros hidrófobos y si las superficies se hacen hidrófilas, el método para el tratamiento no está particularmente limitado. Los componentes hidrófilos no están particularmente limitados y ejemplos preferibles pueden incluir polímeros hidrófilos, por ejemplo, óxidos de polialquileno tales como polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol de polivinilo, poli(metacrilato de hidroxietilo), y poli(acrilamida). Estas membranas hidrófilas son eficaces en suprimir la adsorción de proteínas necesarias y recuperarlas sin una pérdida en vano.

Además se pueden utilizar también materiales en los que se fija uno o más de polietilenimina, aminometilpiridina, polifenol, tinte azul, un ion de metal divalente ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , o similares), un compuesto hidrófobo (es decir, un compuesto del grupo metilo, un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo clorometilo, grupo octilo, grupo laurilo o similares), un anticuerpo y sus fragmentos.

Con respecto a la capacidad de fraccionamiento molecular de la membrana, se pueden utilizar membranas que tienen una capacidad de fraccionamiento de peso molecular (valor discriminatorio: 30 a 60 kDa o inferior) que es suficiente para evitar una penetración del 50 % o más de albúmina en una solución salina fisiológica.

Es preferible utilizar un módulo de llenado de la membrana de fibra mencionada hueco y es preferible que el módulo esté provisto de una entrada y una salida a través de la que una solución para separar los flujos entrantes y los flujos salientes y una salida de solución separada a través de la que una solución separada fluye hacia fuera.

En la presente memoria es preferible que la membrana envasada en el alojamiento del módulo no esté aislada al momento del envasado o que deje escapar las sustancias eluidas procedentes del material de envasado.

En el caso de tratamiento de una solución de proteínas por el método de la invención, es también preferible combinar módulos en múltiples etapas. Por consiguiente, las proteínas de alto peso molecular que no se pueden eliminar completamente mediante un módulo pueden retirarse por el módulo en la siguiente etapa y la relación S/N de los datos del análisis de la muestra después del tratamiento de fraccionamiento se puede mejorar. Estos módulos se pueden conectar en serie o en paralelo.

También es preferible concentrar la solución de proteínas obtenida en la etapa anterior después del fraccionamiento por el método de la invención. En este caso, la concentración se puede realizar utilizando la membrana. El peso molecular de fraccionamiento de la membrana se selecciona preferentemente de acuerdo con el peso molecular de las proteínas que deben recuperarse. El peso molecular de fraccionamiento en esta memoria descriptiva es un índice que se emplea para evaluar la capacidad de la membrana de filtración y se expresa como el peso molecular de un soluto en una solución para la que la relación de parada aparente se convierte en 0,9 en caso de que la filtración se realice por la membrana. Puesto que la membrana tiene la distribución de diámetros de poros y moléculas prácticamente más grandes que el peso molecular del fraccionamiento puede pasar a menudo por la membrana, el peso molecular de fraccionamiento de la membrana a utilizar es preferentemente 1/2 a 1/4 del peso molecular más pequeño en un grupo de las proteínas a recuperar. Si el peso molecular de fraccionamiento de la membrana es demasiado alto, las proteínas a ser recuperarse se filtran para reducir la relación de recuperación en algunos casos y por el contrario, si es demasiado baja, la permeabilidad se reduce para incrementar la presión y disminuir la velocidad del tratamiento en algunos casos. La morfología de la membrana de concentración no está particularmente limitada, sin embargo, es preferible utilizar una membrana de fibra hueca, ya que tiene distribución de poros precisa y una alta eficacia de concentración en comparación con una membrana plana.

En el caso de fraccionamiento de una solución de proteínas por el método anterior, es preferible realizar el tratamiento a una temperatura baja. Al disminuir la temperatura a la baja, la actividad de la proteasa en la solución de proteínas se reduce y la eficacia se mejora en gran medida. La temperatura de tratamiento al momento del fraccionamiento es, preferentemente, inferior a 30°C, más preferentemente de 0 a 20°C, y aún más preferentemente de 2 a 10°C. No solo la actividad de la proteasa contenida en el suero o plasma se suprime para evitar la descomposición de las proteínas, sino también la evaporación del disolvente orgánico se suprime tanto como sea posible mediante el tratamiento a baja temperatura. En particular, en el caso de que un tratamiento de fraccionamiento se realice utilizando la membrana de fibra hueca, es preferible realizar el tratamiento a baja temperatura con el fin de evitar el efecto adverso de que se formen burbujas mediante la evaporación del disolvente orgánico por la capacidad de separación de la membrana.

### Ejemplos

A continuación se describirá el ejemplo A de la presente invención, con referencia a las Figuras 1 y 2.

#### Ejemplo A

Las Figuras 1 y 2 son dibujos explicativos de un dispositivo de fraccionamiento de la invención. La Figura 1 muestra la parte de separación compuesta de tres módulos.

En la Figura 1, una articulación de tres vías 2a y una articulación 2c se conectan con el botón de caucho 2b

correspondiente a la parte de suministro. Un tubo flexible 3 se conecta a la articulación 2c y a una boquilla inferior 6a del módulo de membrana de fibra hueca 5a de la parte de filtración a lo largo de la cara curvada de un miembro de compresión de tipo multi-canal 8. Además una bolsa 12 equipada con tubo se conecta a la articulación de tres vías 2a. Los tubos flexibles se conectan a las boquillas superiores 4a, 4b, 4c, y 4d respectivas instaladas en el miembro de compresión, a los módulos de membrana de fibra hueca 5a, 5b, y 5c de la parte de filtración y a una parte concentración 5d. Estos tubos se colocan a lo largo de la cara curvada del miembro de compresión de tipo multi-canal 8 y se conectan, respectivamente, con las boquillas inferiores 6a, 6b, 6c, y 6d. Los tubos se conectan entre una boquilla inferior troncal 7a del módulo de membrana de fibra hueca 5a de la parte de separación y la boquilla inferior 6b de un módulo de membrana de fibra hueca 5b; entre una boquilla inferior troncal 7b del módulo de membrana de fibra hueca 5b de la parte de separación y la boquilla inferior 6c de un módulo de membrana de fibra hueca 5c; y entre una boquilla inferior troncal 7c del módulo de membrana de fibra hueca 5c de la parte de separación y la boquilla inferior 6d de un módulo de membrana de fibra hueca 5d. Una boquilla inferior troncal 7d del módulo de membrana de fibra hueca 5d y la articulación de tres vías 2a se conectan por un tubo. Además, la boquilla inferior 6d del módulo de membrana de fibra hueca 5d y una tapa 11 del recipiente de recuperación de un recipiente de recuperación 10 se conectan con un tubo. La boquilla superior 4d del módulo de membrana de fibra hueca 5d y la tapa 11 del recipiente de recuperación se conectan también entre sí. Todos los módulos de membrana de fibra hueca, las boquillas, los tubos, la articulación, la bolsa equipada con tubo, el recipiente de recuperación, y la tapa del recipiente de recuperación mencionados anteriormente forman un circuito cerrado.

Al momento del fraccionamiento, el circuito cerrado se llena con una solución tampón basada en agua como fase móvil. El circuito anteriormente mencionado se aloja en un cartucho.

La Figura 2 es un dibujo de todo el cuerpo de un dispositivo de fraccionamiento de la invención. La Figura 2A es una vista frontal y la Figura 2B es una vista lateral izquierda. El dispositivo 14 está provisto de un rodillo giratorio de tipo multi-canal 9. Ejes de guía 8a y 8b formados en el lado del cuerpo principal del dispositivo se insertan en los orificios de guía formados en la cara lateral del miembro de compresión 8 existente en el cartucho 14 y el cartucho 14 se empuja hacia abajo para fijar el cartucho en el dispositivo. El cartucho fijo 14 se mueve en paralelo hacia el rodillo giratorio de tipo multi-canal 9 para formar un sistema de flujo que comprende el rodillo giratorio de tipo multi-canal 9, un rotor, el miembro de compresión 8, siete tubos establecidos a lo largo de la cara curvada del miembro de compresión 8.

Adicionalmente, se fija una jeringa 1. Mecanismos conectados a un motor de accionamiento se fijan a los respectivos rodillos giratorios de los rodillos giratorios de tipo multi-canal 9.

Una explicación más detallada se dará con referencia a la Figura 1 de nuevo. El flujo de un líquido se muestra por la flecha. Después de que la aguja de una jeringa 1 que encierra un líquido bruto tal como suero queda atascado en el botón de caucho 2b de la parte de suministro, la muestra se carga a una velocidad prescrita por la bomba de jeringa. Después de la carga, la jeringa 1 se retira del botón de caucho 2b. Mientras se mezcla con la fase móvil, el líquido bruto cargado se transporta al módulo de membrana de fibra hueca 5a de la parte de separación mediante el giro del rodillo giratorio 9a impulsado por el motor. El filtrado producido durante la circulación en el módulo de membrana de fibra hueca 5a mediante el giro del rodillo giratorio 9b impulsado por el motor fluye fuera de la boquilla inferior troncal 7a y se transporta al módulo de membrana de fibra hueca 5b de la parte de separación en la etapa siguiente mediante el giro del rodillo giratorio 9b. El filtrado del módulo de membrana de fibra hueca 5b de la parte de separación se transporta adicionalmente al módulo de membrana de fibra hueca 5c de la parte de separación en la siguiente, pero en una sola etapa.

De esta manera, los solutos del líquido bruto se fraccionan por los módulos de membrana de fibra hueca 5a, 5b, y 5c que componen la parte de separación. El filtrado del módulo de membrana de fibra hueca 7c se transporta al módulo de membrana de fibra hueca 7d de la parte concentración. El filtrado producido durante la circulación en el módulo de membrana de fibra hueca 7d sale de la boquilla troncal 7a y vuelve de nuevo hacia la parte de suministro a través de la articulación 2a. El filtrado del módulo de membrana de fibra hueca 7c se transporta al módulo de membrana de fibra hueca 7d de la parte concentración. La circulación y el transporte de los líquidos en la parte de separación y en la parte concentración se realizan por el rodillo giratorio 9b. Después que transcurre un tiempo prescrito, los rodillos giratorios 9a y 9b se destinan y se activa el rodillo giratorio 9c impulsado por el motor. En consecuencia, el aire en el recipiente de recuperación 10 empuja hacia fuera el líquido concentrado en el circuito en la parte de concentración y el líquido concentrado se recupera en el recipiente de recuperación 10 a través de la boquilla inferior 6d.

Se proporcionan ejemplos de métodos de separación de componentes biológicos y métodos de fraccionamiento de proteínas solo como información en los Ejemplos 1 a 14.

### Ejemplo 1

Unas cien fibras huecas de polisulfona fueron agrupados y ambos extremos se fijaron en una carcasa de módulo de tipo tubo de vidrio con un agente de encapsulado de tipo epoxi de manera que las partes huecas de las fibras huecas no se cerraron para producir un mini-módulo. El mini-módulo tenía un diámetro interno de aproximadamente 7 mm y una longitud de aproximadamente 17 cm y dos puertos de diálisis de manera similar a un dializador de tipo

membrana de fibra hueca común. Las fibras huecas del mini-módulo y el interior del módulo se lavaron con agua destilada.

Después de eso, una solución de PBS acuosa (Dulbecco PBS (-), fabricada por Nissui Pharmaceutical Co., LTD) se envasó para obtener un mini-módulo de membrana de fibra hueca (en lo sucesivo, referido como mini-módulo 1 para abreviar). Después los precipitados se retiraron del suero humano (H1388, Lot 28H8550, fabricado por SIGMA) por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min, el suero humano resultante se filtró con un filtro de 0,45 µm. Un lado del líquido dializado del mini-módulo 1 se tapó y el otro se conectó con un tubo de silicio conectado con una bomba Peri-Star™, que es una bomba de tubo de tipo giratoria. La entrada del mini-módulo que corresponde al líquido en la membrana de fibra hueca en el interior y la salida del mini-módulo se conectaron con un tubo de silicio para hacer que el líquido con el suero circulara por la bomba Peri-Star™. Cuatro ml de suero se filtraron a un caudal de circulación de 5 m L/min, caudal de filtrado de 0,2 ml/min a 20 °C durante 4 horas (esta etapa es equivalente a la etapa de separar las proteínas deseadas de bajo peso molecular a recuperar y dirigir las proteínas de alto peso molecular para ser desechadas).

La cantidad del líquido a circular se mantuvo constante mediante la adición de PBS en la cantidad correspondiente a la cantidad volumétrica reducida en el circuito de circulación debido a la filtración.

Por otra parte, HiTrap activada por NHS (fabricada por Amersham Biosciences), que es una columna de acoplamiento para la fijación de ligando, se dejó lista y se utilizó como una columna sin adhesión de ningún anticuerpo. A continuación, 0,2 ml del filtrado se aplicó y se hizo pasar a través de la columna.

La concentración de albúmina en el suero cargado al principio se midió por el kit de cuantificación de albúmina humana ELISA (fabricado por Bethyl) para encontrar que era 27.800 µg/ml y la concentración de albúmina después de una filtración de 4 horas era 61 µmg/ml. La concentración de α1-microglobulina en el suero antes del fraccionamiento medido por SRL, Inc. se encontró que era 8,9 µmg/ml y la concentración de α1-microglobulina en el filtrado obtenido después de 4 horas fue de 0,45 µg/ml. En consecuencia, la relación de permeación de α1-microglobulina/relación de permeación de albúmina = aproximadamente 23 y dentro de un intervalo de 1,5 o más y 1.000 o menos.

## Ejemplo 2

Un anticuerpo de la albúmina humana se fijó en HiTrap activada por NHS (fabricada por Amersham Biosciences), que es una columna de acoplamiento para la fijación de ligando, para producir una columna de anticuerpo. Los tipos y las cantidades de los anticuerpos utilizados son como se muestran en la Tabla 1. Se utilizó el n.º de cada columna producida por la fijación de cada anticuerpo de la albúmina humana, como se asignó a cada anticuerpo de la albúmina humana.

[Tabla 1]

Tabla 1 Especies y cantidad de anticuerpo

n.º	Anticuerpo de albúmina anti humana	cantidad
1	Albúmina Anti-Humana Goad, Anticuerpos Policlonales; Purificada por afinidad (Academy Bio-Medical Company, Inc.)	0,5 mg
2	Anticuerpo Monoclonal de Ratón a Albúmina de Suero Humano, Clon: ZMHSAI (Zymed Laboratories Inc.)	0,5 mg
3	Albúmina Anti-Humana de Conejo Fracción IgG (TECHNOLOGIES INIRE-CELL, INC.)	6,95 mg
4	Albúmina de Suero Anti-Humana Monoclonal, Clon: 12D12 (Seradym)	1 mg
5	Albúmina de Suero Anti-Humana Clonal, Clon: HSAI/25.1.3 (CEDARLANE Laboratories Limited)	0,5 ml (concentración desconocida)

Cada 0,2 ml del filtrado obtenido en el Ejemplo 1 se aplicó a cada uno de los cinco tipos siguientes de columnas de anticuerpo y la solución que se hizo pasar a través de cada columna se obtuvo como una muestra de fraccionamiento pasante. La concentración de albúmina en cada muestra de fraccionamiento pasante se midió por el kit de cuantificación de albúmina humana ELISA (fabricado por Bethyl). Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los números de las columnas mostradas en la Tabla 2 corresponden a los números de anticuerpos utilizados en la Tabla 1.

[Tabla 2]

Tabla 2 Cantidad de albúmina adsorbida en la columna de anticuerpo

n.º	cantidad alimentada	cantidad en fracción pasante de flujo	cantidad en fracción adsorbida
1	12,2 $\mu$ g	<0,001 $\mu$ g	12,2 $\mu$ g
2	12,2 $\mu$ g	0,016 $\mu$ g	12,2 $\mu$ g
3	12,2 $\mu$ g	0,099 $\mu$ g	12,1 $\mu$ g
4	12,2 $\mu$ g	0,251 $\mu$ g	11,9 $\mu$ g
5	12,2 $\mu$ g	<0,001 $\mu$ g	12,2 $\mu$ g

5 La albúmina adsorbida en cada una de las columnas se eluyó por una solución tampón de hidrocloreto de glicina al 0,1 M (pH 2,7) para obtener fracción adsorbida. Las fracciones pasantes y las fracciones adsorbidas se concentraron, respectivamente, a 0,2 ml mediante una membrana de separación centrífuga (Vivaspin, 3000MWCO, fabricada por Sartorius AG) para obtener muestras y 5  $\mu$ l de cada una de las muestras se analizó por SDS-PAGE. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 4.

10 La Figura 4 es una fotografía de electroforesis (SDS-PAGE) de cada fracción obtenida en el Ejemplo 2. Los respectivos carriles de la Figura 4 son los siguientes.

15 Carril 1: un marcador de arco iris, un marcador de peso molecular para electroforesis (RPN756, fabricado por Amersham)  
 Carril 2: el filtrado obtenido en el Ejemplo 1  
 Carril 3: la fracción que pasa a través de la columna n.º 1  
 Carril 4: la fracción que pasa a través de la columna n.º 2  
 Carril 5: la fracción que pasa a través de la columna n.º 3  
 20 Carril 6: la fracción que pasa a través de la columna n.º 4  
 Carril 7: la fracción que pasa a través de la columna n.º 5  
 Carril 8: la fracción adsorbida en la columna n.º 1  
 Carril 9: la fracción adsorbida en la columna n.º 2  
 Carril 10: la fracción adsorbida en la columna n.º 3  
 25 Carril 11: la fracción adsorbida en la columna n.º 4  
 Carril 12: la fracción adsorbida en la columna n.º 5  
 Carril 13: multimarcador, un marcador de peso molecular para electroforesis (LC 5725, fabricado por Invitrogen)

30 A partir de la Figura 4 se entiende que la albúmina que existe en una gran cantidad en la muestra respectiva antes del tratamiento en la columna de anticuerpos desaparece casi por completo de las fracciones pasantes a través de las columnas y, en consecuencia las proteínas se reducen al 10 % o menos o apenas existen en las fracciones pasantes debido a la existencia de los anticuerpos de albúmina.

### Ejemplo 3

35 Un medio de filtrado obtenido en el proceso del Ejemplo 1 se concentró a 1 ml mediante una membrana de tipo separación centrífuga (Vivaspin, 3000MWCO, fabricada por Sartorium AG), se mezcló con 4 ml de una solución tampón exclusivamente para la columna (Buffer A n.º5185-5987, fabricada por Agilent), se filtró mediante un filtro de centrífuga con 0,22  $\mu$ m de tamaño, y se separó mediante columnas de afinidad en las que se combinaron anticuerpos de 6 tipos, Columna De Eliminación de Afinidad Múltiple (n.º5185-5985, fabricada por Agilent).

40 Las soluciones que contenían componentes con mucha afinidad con las columnas obtenidas por 5 ml o más del tampón A se hicieron pasar después de que la aplicación de muestra se recuperó como fracciones pasantes. A continuación, las proteínas adsorbidas en las columnas se eluyeron por un tampón para la elución exclusivamente para las columnas (BufferB n.º5185-5988, fabricada por Agilent) para obtener fracciones adsorbidas. Las fracciones pasadas y las fracciones adsorbidas se concentraron, respectivamente, a 1 ml por la membrana de tipo separación centrífuga (Vivaspin, 3000MWCO, fabricada por Sartorius AG) y cada 10  $\mu$ l de las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE. Las posiciones de las bandas separadas de las fracciones pasadas y las posiciones de las bandas separadas de las fracciones adsorbidas apenas se solaparon y debido a la existencia de los anticuerpos, las proteínas fueron suprimidas a un 10 % o menos y apenas se observaron.

### (Ejemplo Comparativo 1)

55 El suero humano del mismo lote que el del Ejemplo 1 (H1388, Lot 28H8550, fabricado por SIGMA) en una cantidad de 40  $\mu$ l se destiló 5 veces por la solución tampón exclusivamente para las columnas de anticuerpos empleados en el Ejemplo 3 y se separó. Las fracciones pasantes y las fracciones adsorbidas se concentraron, respectivamente, a 1 ml por la membrana de tipo separación centrífuga (Vivaspin, 3000MWCO, fabricada por Sartorius AG) y cada 10  $\mu$ l de las fracciones obtenidas se analizó por SDS-PAGE. De acuerdo con los resultados del análisis, algunas bandas de albúmina u otras desaparecieron por los anticuerpos, sin embargo se encontró la existencia de bandas en un

amplio intervalo que cubre una sustancia de alto peso molecular a una sustancia de bajo peso molecular.

#### Ejemplo 4

5 Membranas de fibras huecas hechas de polisulfona se obtuvieron cortando partes de adhesión de resina en ambos extremos de un dializador de sangre (TS 1.6 ML, fabricado por Toray Industries, Inc.). El tamaño de la membrana de fibra hueca obtenida tenía un diámetro interno de 200  $\mu\text{m}$  y un espesor de membrana de 40  $\mu\text{m}$  y la forma de la sección transversal, donde se hizo pasar un líquido se encontró que tenía una estructura asimétrica por observación. Unas cien fibras huecas de polisulfona fueron agrupados y ambos extremos se fijaron en una carcasa de módulo de tipo tubo de vidrio con un agente de encapsulado de tipo epoxi de manera que las partes huecas de las fibras huecas no se cerraron para producir un mini-módulo. El mini-módulo tenía un diámetro interno de aproximadamente 7 mm y una longitud de aproximadamente 17 cm y con dos puertos (puertos de circulación) para hacer circular un líquido en las fibras huecas y los puertos de diálisis de manera similar a un dializador de tipo membrana de fibra hueca común. Las membranas de fibra hueca del mini-módulo y el interior del módulo se lavaron con agua destilada.

15 Carbonato de hidrógeno de amonio (fabricado por Sigma-Aldrich Japón) y carbonato de amonio se disolvieron respectivamente en agua Milli-Q y ambos se mezclaron para ajustar el pH 8,0 y obtener una solución tampón de carbonato de hidrógeno de amonio a 50 mM (pH 8,0) (en adelante, simplemente se refiere solución tampón A). Acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 10 % (v/v) se añadió y agitó bien para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 10 %).

25 El siguiente proceso se realizó en una cámara de baja temperatura establecida a 4 °C. Tubos en forma de T se ensamblaron en dos puntos de un tubo de silicio con una longitud total de 65 cm (diámetro interno 2 mm y diámetro externo 4 mm, fabricado por ASONE CO., LTD.) (tubo de silicio A) y un manómetro se conectó a una parte de abertura de un primer tubo en forma de T que no estaba conectada al tubo de silicio a través de un tubo de silicio (tubo de silicio B). Una jeringa se conectó a una parte de abertura de un segundo tubo en forma de T que no estaba conectada al tubo de silicio A través de un tubo de silicio (de longitud total 15 cm, diámetro interno de 2 mm, y diámetro externo 4 mm) (tubo silicio C) para formar una entrada de inyección de líquido. La jeringa se llenó con la solución tampón con acetonitrilo añadida al 10 % A y se instaló en una bomba de micro-jierringa (en lo sucesivo, bomba de jeringa, fabricada por KD Scientific) y una bomba de micro-tubo de tipo giratorio (en lo sucesivo referida como bomba de flujo, fabricada por Tokyo Rika Kiki Co., Ltd.) se instaló en el centro del tubo de silicio entre los dos tubos en forma de T. Después de que el tubo de silicio B conectado al manómetro y el tubo de silicio C conectado se detuvieron mediante fórceps y después de que un extremo del tubo de silicio A se sumergió en un recipiente que contenía la solución tampón con acetonitrilo añadida al 10 % A y la bomba de flujo se hizo funcionar para llenar el tubo de silicio A con la solución tampón con acetonitrilo añadida al 10 % A y el caudal se ajustó para ser 5 ml/min.

40 Un extremo del puerto de circulación del mini-módulo estaba conectado con un extremo del tubo de silicio A antes mencionado y la bomba de flujo se hizo funcionar para enviar la solución tampón con acetonitrilo añadida al 10 % A al interior de la membrana de fibra hueca y las burbujas en la parte hueca interior se eliminaron. Después de la detención de la bomba de flujo, el otro extremo del tubo de silicio A se conectó con la parte de extremo del módulo. De tal manera, se formó un circuito de circulación en el que el módulo, la jeringa y el manómetro fueron conectados. 4,5 ml de Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadida al 10 % A (en lo sucesivo referido como suero diluido A) se tomaron con la jeringa y una aguja de inyección con ala fijada (fabricado por Terumo) se fijó a la jeringa y se estableció en una bomba de micro-jierringa. Después de que el suero diluido A se inyectó hasta el extremo de la punta de la aguja y se confirmó que no habían burbujas, el extremo de la punta de la aguja de inyección se insertó en la entrada de inyección de líquido formada cerca del tubo en forma de T donde se había instalado el tubo B en el circuito para conectar la aguja con el circuito y de este modo completar el dispositivo de fraccionamiento de proteínas.

55 Después de distribuir la solución tampón con acetonitrilo añadida al 10 % A a 5 ml/min mediante la operación de la bomba de flujo, la bomba de jeringa se hizo funcionar para expulsar el suero A diluido a 0,2 ml/min para comenzar el tratamiento de fraccionamiento. En este caso, la solución filtrada desde el módulo se recuperó en un tubo de sedimentación con 50 ml de capacidad de polipropileno. Después de 20 minutos, la bomba de jeringa se detuvo en cuando se empujaron 4 ml del suero diluido hacia fuera e inmediatamente la bomba de jeringa a la que estaba fijada la jeringa cargada con la solución tampón con acetonitrilo añadida al 10 % A se hizo funcionar a 0,2 ml/min para continuar con el tratamiento. Después de 120 minutos de iniciar el fraccionamiento, la bomba de jeringa y la bomba de flujo se detuvieron ambas. En ese momento, el volumen de la solución recuperada que había pasado por la membrana y recuperado era de aproximadamente 24 ml. La solución recuperada se liofilizó y se disolvió de nuevo en la solución tampón A. Las concentraciones respectivas de la albúmina de suero humano (HSA),  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2MG), e interleucina-8 (IL-8) se midieron mediante un ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA). Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente bajo como el 0,009 % del contenido del suero diluido A, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperar, se recuperaron en un 51,2 % y 17,4 %, respectivamente.

[Tabla 3]

Tabla. 3 Recuperación (%)

	HSA	$\beta$ 2MG	IL-8
Ejemplo 4	0,009	51,2	17,4
Ejemplo 5	0,012	52,3	19,7
Ejemplo 6	0,028	54,3	24,3
Ejemplo 7	0,039	55,9	25,1
Ejemplo 8	0,008	41,9	17,1
Ejemplo 9	0,007	34,1	16,2
Ejemplo 10	0,004	20,5	11,7
Ejemplo 11	0,035	9,4	13,2
Ejemplo 12	0,022	58,7	20,5
Ejemplo 13	0,037	57,5	21,2
Ejemplo 14	0,023	46,8	18,9
Ejemplo comparativo 2	N,D,	5,90	N,D,
Ejemplo comparativo 3	N,D,	N,D,	1,83

N.D.: El resultado de la medición está por debajo de la sensibilidad de detección.

**Ejemplo 5**

5

Acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 12,5 % (v/v) se añadió y agitó bien y se desgasificó para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 12,5 % A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadido al 12,5 % A (en adelante, referido como suero diluido B) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,012 % en el contenido del suero diluido B, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 52,3 % y 19,7 %, respectivamente.

10

15

**Ejemplo 6**

Acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 15 % (v/v) se añadió y agitó bien y se desgasificó para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 15 % A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadido al 15 % A (en adelante, referido como suero diluido C) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,028 % en el contenido del suero diluido C, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 54,3 % y 24,3 %, respectivamente.

20

25

**Ejemplo 7**

Acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 17,5 % (v/v) se añadió y agitó bien y se desgasificó para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 17,5 % A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadido al 17,5 % A (en adelante, referido como suero diluido D) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,039 % en el contenido del suero diluido D, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 55,9 % y 25,1 %, respectivamente.

30

35

**Ejemplo 8**

Acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 7,5 % (v/v) se añadió y agitó bien y se desgasificó para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 7,5 % A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadido al 7,5 % A (en adelante, referido como suero diluido E) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,008 % en el contenido del suero diluido E, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 41,9 % y 17,1 %, respectivamente.

45

50

**Ejemplo 9**

Acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 5,0 % (v/v) se añadió y agitó bien y se desgasificó para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 5,0 % A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadido al 5,0 % A (en adelante, referido como suero diluido F) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,007 % en el contenido del suero diluido F, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 34,1 % y 16,2 %, respectivamente.

#### (Ejemplo 10)

Acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 2,5 % (v/v) se añadió y agitó bien y se desgasificó para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 2,5 % A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadido al 2,5 % A (en adelante, referido como suero diluido G) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,004 % en el contenido del suero diluido G, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 20,5 % y 11,7 %, respectivamente.

#### Ejemplo 11

Una solución tampón de acetato de amonio 50 mM (pH 5,0) (en lo sucesivo, solución tampón B) fue producida y acetonitrilo (cromatografía líquida de alto rendimiento, fabricada por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración de acetonitrilo al 10 % (v/v) se añadió y agitó bien y se desgasificó para obtener una solución tampón para el fraccionamiento de proteínas de la invención (en lo sucesivo, referida como solución tampón con acetonitrilo añadido al 10 % B). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetonitrilo añadido al 10 % B (en adelante, referido como suero diluido H) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la relación de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,035 % en el contenido del suero diluido H, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 9,4 % y 13,2 %, respectivamente.

#### Ejemplo 12

1,4-Dioxano (fabricado por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración para ser el 10 % (v/v) se añadió y se agitó bien con la solución tampón A (en lo sucesivo, solución tampón con dioxano añadido A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con dioxano añadido A (en adelante, referido como suero diluido I) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la tasa de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,022 % en el contenido del suero diluido I, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 58,7 % y 20,5 %, respectivamente.

#### (Ejemplo 13)

Acetona (fabricado por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración para ser el 10 % (v/v) se añadió y se agitó bien con la solución tampón A (en lo sucesivo, solución tampón con acetona añadida A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con acetona añadida A (en adelante, referido como suero diluido J) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la tasa de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,037 % en el contenido del suero diluido J, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 57,5 % y 21,2 %, respectivamente.

#### Ejemplo 14

Etanol (fabricado por Sigma-Aldrich Japón) en una cantidad adecuada para ajustar la concentración para ser el 10 % (v/v) se añadió y se agitó bien con la solución tampón A (en lo sucesivo, solución tampón con etanol añadido A). Suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón con etanol añadido A (en adelante, referido como suero diluido J) en una cantidad de 4 ml se trató por el módulo de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la tasa de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como el 0,023 % en el contenido del suero diluido I, por su parte  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 46,8 % y 18,9 %, respectivamente.

**Ejemplo Comparativo 2**

5 La solución tampón A se inyectó en el circuito y suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón A (en lo sucesivo, denominado suero diluido L) en una cantidad de 4 ml se inyectó a 0,2 ml/min en el circuito y se fraccionó de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la tasa de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como para ser el límite de detección o menos, sin embargo,  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un 5,90 %, respectivamente, también tan bajo como para ser el límite de detección.

10 **Ejemplo Comparativo 3**

15 La solución tampón B se inyectó en el circuito y suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón A (en lo sucesivo, denominado suero diluido M) en una cantidad de 4 ml se inyectó a 0,2 ml/min en el circuito y se fraccionó de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, la tasa de recuperación de HSA, un objeto a ser eliminado fue tan extremadamente baja como para ser el límite de detección o menos, sin embargo,  $\beta$ 2MG y IL-8, objetos a recuperarse, se recuperaron en un porcentaje tan bajo como 1,83 %, respectivamente.

20 **Ejemplo Comparativo 4**

25 La solución tampón A se inyectó en el circuito y suero humano (fabricado por Sigma) diluido 4 veces con la solución tampón A (en lo sucesivo, denominado suero diluido N) en una cantidad de 4 ml se inyectó a 0,2 ml/min en el circuito y se fraccionó de la misma manera que en el Ejemplo 4, excepto que la temperatura de tratamiento se fijó a 30 °C. Como resultado, se formaron burbujas durante el tratamiento y la evaluación fue imposible.

**Aplicabilidad industrial**

30 Estos inventos son muy útiles para la producción de muestras para el análisis del proteoma y notablemente ventajosos en esferas médicas y, en particular, para el diagnóstico de enfermedades humanas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de fraccionamiento para separar solutos en un líquido bruto mediante una membrana, que comprende

- 5
- 1) una parte de suministro (2b) para cargar el líquido bruto;
  - 2) una parte de filtración con una membrana (5a; 5b; 5c) para filtrar algo de los solutos en el líquido bruto enviado desde la parte de suministro;
  - 3) una parte de concentración (5d) para concentrar el filtrado procedente de la parte de filtración;
  - 10 4) una parte de recuperación (10) para recuperar la solución concentrada obtenida en la parte de concentración;
  - 5) una bomba de flujo para el envío de una fase móvil;

en el que la bomba de flujo es una bomba de tubo provista de un rotor giratorio y de un rodillo (9) instalado de manera giratoria en la circunferencia exterior del rotor;

15 **caracterizado por que** la parte de suministro, la parte de filtración, la parte de concentración, la parte de recuperación y un canal de flujo que conecta las partes respectivas, forman un circuito cerrado y están ensamblados en un cartucho desechable (14) en el que al menos las porciones de los canales de flujo están expuestas a la pared exterior del cartucho desde el exterior del cartucho,

20 **y por que** el cartucho se puede separar del rodillo de la bomba de flujo y está dispuesto de manera que una parte de la pared exterior del cartucho funciona como un miembro de compresión mediante el acoplamiento de la bomba de rodillos para comprimir las porciones expuestas de los canales de flujo cuando el rodillo se hace girar para hacer circular los líquidos en las partes respectivas del cartucho.

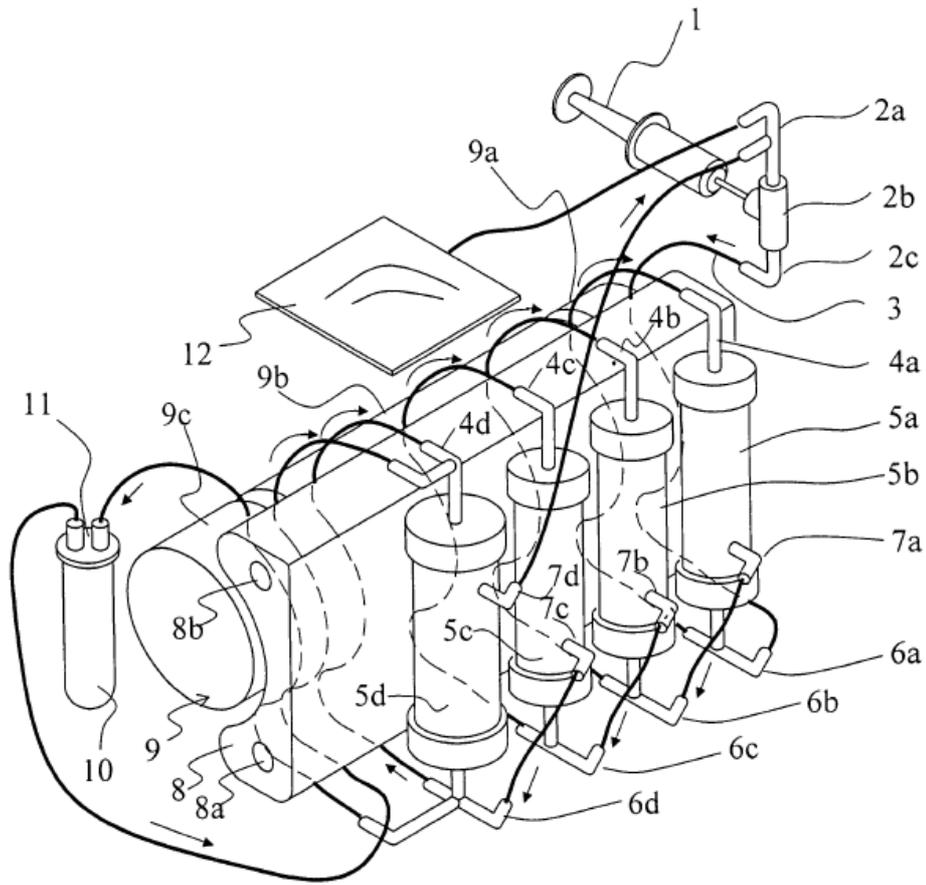


FIG. 1

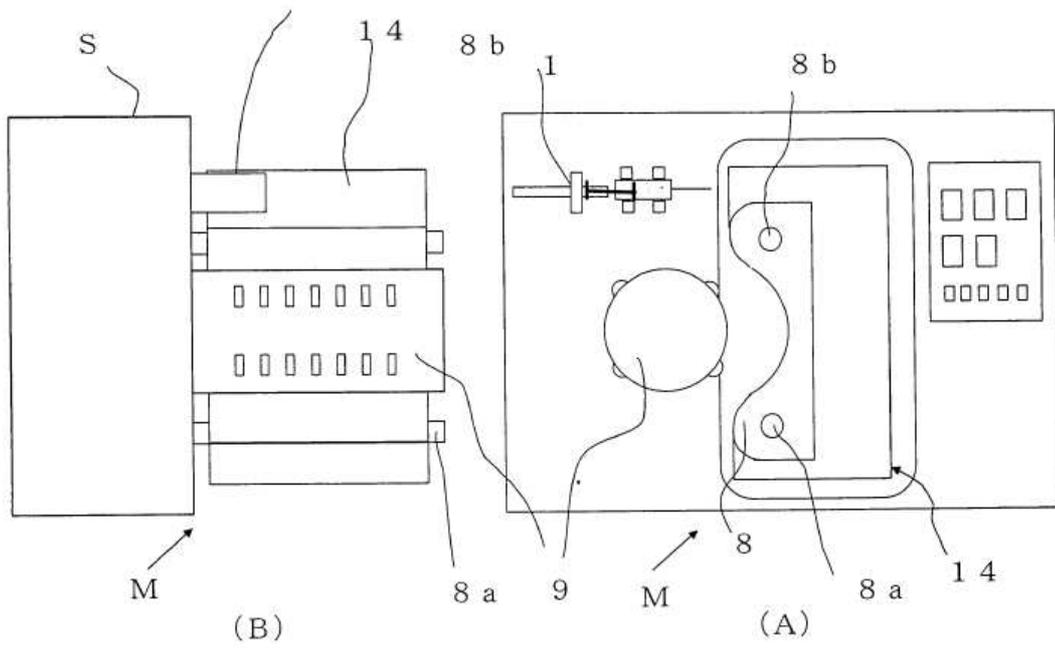


FIG. 2

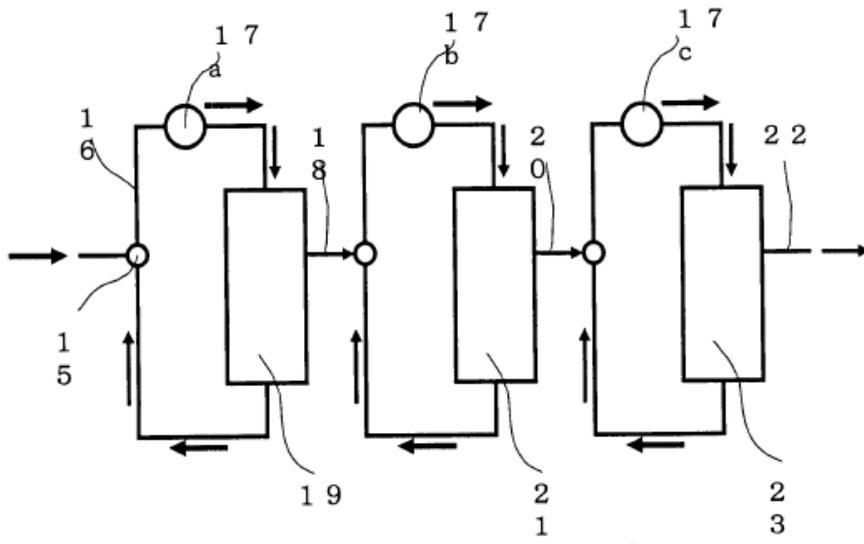


FIG. 3

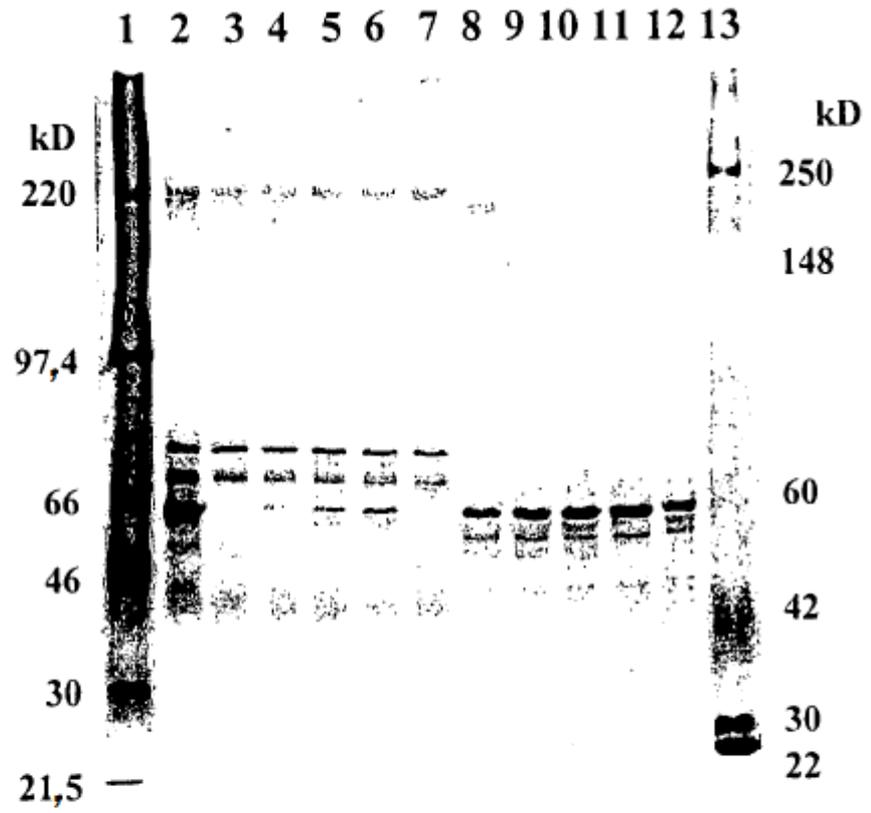


FIG.4