(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2011-519036
(P2011-519036A)
(43)公表日　平成23年6月30日(2011.6.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 30/88	(2006.01)	G01N	30/88	201Y	4D017
B01D 15/08	(2006.01)	B01D	15/08		4G066
B01J 20/20	(2006.01)	B01J	20/20	B	
B01J 20/281	(2006.01)	B01J	20/22	D	
B01J 20/30	(2006.01)	B01J	20/26	L	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 15 頁）　最終頁に続く

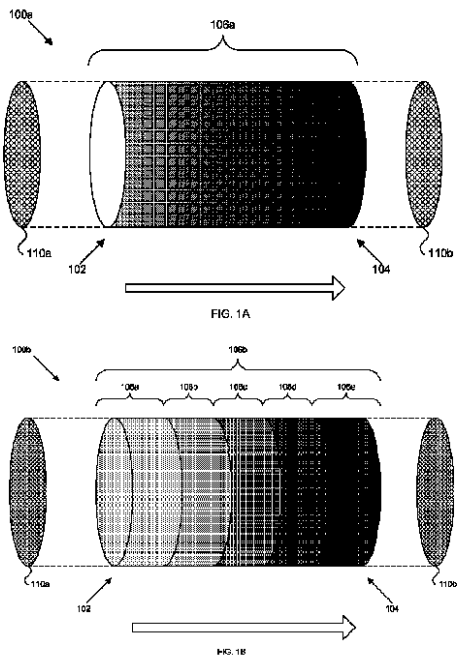
(21)出願番号　特願2011-506491 (P2011-506491)
(86)(22)出願日　平成21年4月27日 (2009.4.27)
(85)翻訳文提出日　平成22年10月21日 (2010.10.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/041771
(87)国際公開番号　WO2009/132330
(87)国際公開日　平成21年10月29日 (2009.10.29)
(31)優先権主張番号　61/125,466
(32)優先日　平成20年4月25日 (2008.4.25)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　510280693
バイオシアス　ライフ　サイエンシーズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１８８０，　ウェイクフィールド，　オーデュボン　ロード　１１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分離カートリッジ、ならびにその製造および使用方法

(57)【要約】
本発明の実施形態は、分離カートリッジ、分離カートリッジを製造するための方法、および分離カートリッジを使用するための方法を提供する。本発明の一局面は、第１の末端、第２の末端、および上記第１の末端と上記第２の末端との間に位置した１種以上の吸収剤を含む分離カートリッジを提供し、上記１種以上の吸収剤は、疎水性を増大させる順序で、上記第１の末端から上記第２の末端へ配置される。本発明の別の局面は、種々の疎水性を有する分離カートリッジを作り出すための方法を提供する。上記方法は、シリンダーに濾過物質および架橋剤を装填する工程、および上記材料をエネルギー源に選択的に曝して、上記濾過物質内の架橋反応を選択的に開始する工程、を包含する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
分離カートリッジであって、
第１の末端；
第２の末端；および
該第１の末端と該第２の末端との間に位置した１種以上の吸収剤であって、該１種以上の吸収剤は、疎水性を増大させる順序で、該第１の末端から該第２の末端へと配置される、１種以上の吸収剤
を含む、分離カートリッジ。
【請求項２】
前記第１の末端に隣り合って位置した第１のフリット；および
前記第２の末端に隣り合って位置した第２のフリット、
をさらに含み、
該第１および第２のフリットは、前記１種以上の吸収剤を保持するように適合されている、
請求項１に記載の分離カートリッジ。
【請求項３】
前記１種以上の吸収剤は、複数の領域中に配置され、各領域は、異なる疎水性を有する、請求項１に記載の分離カートリッジ。
【請求項４】
前記複数の領域を分離するための１つ以上のフリットをさらに含む、請求項３に記載の分離カートリッジ。
【請求項５】
前記１種以上の吸収剤は、シアノ樹脂、Ｃ１樹脂、Ｃ２樹脂、Ｃ３樹脂、Ｃ４樹脂、Ｃ８樹脂、Ｃ１８樹脂、フェニル樹脂、ビフェニル樹脂、グラファイトカーボン、シアノプロピル、およびトリメチルシランからなる群より選択される、請求項１に記載の分離カートリッジ。
【請求項６】
シリンダーをさらに含み、該シリンダーは、前記１種以上の吸収剤を封じ込めている、請求項１に記載の分離カートリッジ。
【請求項７】
前記シリンダーは、金属シリンダーである、請求項６に記載の分離カートリッジ。
【請求項８】
分離カートリッジであって、
該分離カートリッジの一方の末端に位置した入り口；
該入り口に隣り合う、第１の吸収剤領域；
該第１の吸収剤領域に隣り合う、第２の吸収剤領域；
該第２の吸収剤領域に隣り合う、第３の吸収剤領域；
該第３の吸収剤領域に隣り合う、第４の吸収剤領域；
該第４の吸収剤領域に隣り合う、第５の吸収剤領域；および
該第５の吸収剤領域に隣り合う該分離カートリッジの他方の末端に位置した出口、
を含む、分離カートリッジ。
【請求項９】
前記第１の吸収剤領域は、シアノ樹脂を含み；
前記第２の吸収剤領域は、Ｃ４樹脂を含み；
前記第３の吸収剤領域は、Ｃ８樹脂を含み；
前記第４の吸収剤領域は、Ｃ１８樹脂を含み；そして
前記第５の吸収剤領域は、フェニル樹脂を含む、
請求項８に記載の分離カートリッジ。
【請求項１０】

種々の疎水性を有する分離カートリッジを作り出すための方法であって、該方法は、
濾過物質および架橋剤を、シリンダーに装填する工程；および
該物質をエネルギー源に選択的に曝して、該濾過物質内の架橋反応を選択的に開始する工程、
を包含する、方法。
【請求項１１】
前記シリンダーは、ガラスチューブである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記シリンダーは、溶融シリカチューブである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
前記エネルギー源は、光源である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
前記エネルギー源は、放射線源である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１５】
前記濾過物質は
ポリマー；および
架橋剤
を含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１６】
濾過方法であって、該方法は、
以下：
第１の末端および第２の末端を有するシリンダー；ならびに
該シリンダー内の、該第１の末端と該第２の末端との間に位置した１種以上の吸収剤であって、該１種以上の吸収剤は、該第１の末端から該第２の末端へと、疎水性を増大させる順序で配置されている、１種以上の吸収剤、
を含む分離カートリッジを提供する工程；
該カートリッジを通じて、該第１の末端から該第２の末端へと、サンプルを流す工程であって、ここで溶液中の１種以上の分析物は、該１種以上の吸収剤に吸着される、工程；ならびに
該第２の末端から該第１の末端へ溶媒を流し、それによって、該１種以上の分析物を、該１種以上の吸収剤から溶出する工程、
を包含する、方法。
【請求項１７】
前記溶媒および前記１種以上の分析物を、検出器に与える工程、
をさらに包含する、請求項１６に記載の濾過方法。
【請求項１８】
前記検出器は、質量分析計である、請求項１７に記載の濾過方法。
【請求項１９】
前記１種以上の吸収剤は、複数の領域に配置され、各領域は、異なる疎水性を有する、請求項１６に記載の濾過方法。
【請求項２０】
前記１種以上の吸収剤は、シアノ樹脂、Ｃ１樹脂、Ｃ２樹脂、Ｃ３樹脂、Ｃ４樹脂、Ｃ８樹脂、Ｃ１８樹脂、フェニル樹脂、ビフェニル樹脂、グラファイトカーボン、シアノプロピル、およびトリメチルシランからなる群より選択される、請求項１６に記載の濾過方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願）
本出願は、２００８年４月２５日に出願された米国仮特許出願第６１／１２５，４６６

号に対する優先権を主張する。この特許出願の内容は、その全体を参考として援用する。

【０００２】

（技術分野）

本発明の実施形態は、分離カートリッジ、分離カートリッジを製造するための方法、および分離カートリッジを使用するための方法を提供する。

【背景技術】

【０００３】

（背景）

液相における化学的サンプルもしくは生物学的サンプルの分析は、広い範囲の用途において非常に重要である。多くの用途（例えば、創薬および開発、環境試験、診断剤など）において、効率的かつ再現性の高い様式において、多数のサンプルを分析することが必要である。液相サンプルを分析するために使用される技術のうちの多くは、上記サンプルが、連続してデータを得る（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｅ）ことを要し、ここで各サンプルは、逐次的様式において試験される。サンプルを定量的に分析するための望ましい方法は、質量分析法（ＭＳ）（複雑な混合物のデータを得て、その分析物の分子量に基づいて選択された分析物を定量し得る方法）である。

【０００４】

イオン化技術（例えば、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）もしくは大気圧化学イオン化（ＡＰＣＩ））を使用する現在の質量分析計は、溶液中のサンプルのデータを直接得るために使用され得る。しかし、ＭＳによる感度の高くかつ正確な定量は、上記サンプルが精製され、かつ高濃度の塩、緩衝液、およびイオン化合物から分離されていることを要する。分析されるべきサンプル中の高濃度のイオンは、イオン抑制として公知の現象をもたらし得、ここで目的の分析物は、他のイオンの存在によって印をつけられる。さらに、上記サンプル内の不揮発性成分は、上記質量分析計の供給源領域に沈殿する傾向があり、ＭＳ性能を落とす。精製されていない高濃度の塩および緩衝液は、結局は、完全にＭＳの失敗を生じる。

【０００５】

液体クロマトグラフィー（ＬＣ）は、ＭＳ分析の前に分析物を精製するために一般に使用される技術である。液体クロマトグラフィーのうちの多くのタイプが使用され、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、超高圧液体クロマトグラフィー（ＬＴＰＬＣ）、および固相抽出（ＳＰＥ）が挙げられるが、これらに限定されない。これら精製技術は、複雑なサンプル内の個々の分析物の特異な化学的特性を通じて機能する。目的の分析物を単離もしくは精製するために使用される化学的特性としては、極性、疎水性、イオン強度、電荷、サイズ、もしくは分子構造が挙げられ得る。これら技術の各々において、固体吸収剤は、カラムもしくはカートリッジに詰められ、上記複雑な混合物は、上記吸収剤に対して流され、上記目的の分析物と、上記吸収剤との間の相互作用が起こることを可能にする。

【０００６】

多くの分析において、化学特性において広い範囲に及ぶ多数の異なる化合物は、分析される必要がある。このような分析の例としては、潜在的な薬物候補の特性を特徴付けることが非常に重要である薬物開発プロセスにおける適用が挙げられる。多くのアッセイが行われて、薬物候補の潜在的な適切さを決定し得る（例えば、溶解度アッセイ、代謝的安定性アッセイ、膜透過性アッセイ、血漿タンパク質結合アッセイ、毒性アッセイ、薬物動態特性および薬力学的特性の決定など）。これらアッセイのうちの全ては、経時的もしくは空間的な（ｏｖｅｒ　ｔｉｍｅ　ｏｒ　ｓｐａｃｅ）所定の化合物の定量を必要とする。上記アッセイは、生理学的条件を模倣するか、または細胞もしくはインタクトな生物中で実際に行われるかいずれかの高いイオン強度の緩衝液の存在を要する。正確なＭＳベースの定量は、分析する前のサンプル精製工程にかかっている。

【０００７】

迅速な、経済的なかつ効率的な様式で多数の異なる化合物のデータを得る必要性が、研

究者に難題を提示している。データを得るべき各分析物に対して特有の分析方法を開発することは、代表的には、望ましい選択肢ではない。なぜなら、方法の開発は、時間と資源を浪費するプロセスであり得るからである。結果として、１つ以上の標準的方法もしくは包括的方法が、代表的には、これらのうちの多くが受容可能なレベルにおいて機能するという目的で、試験化合物の全体のセットに適用される。例えば、ある試験化合物のセットは、上記分析物の極性親和性に基づいて、固相抽出によってＭＳ分析の前に精製され得る。疎水性（すなわち、非極性）ＳＰＥ吸収剤（例えば、Ｃ１８物質）が、選択され得る。上記分析物は、上記ＳＰＥ物質の上に載せられ得、水溶液で洗浄され得る。上記目的の分析物が吸着するか、もしくは上記疎水性ＳＰＥ吸収剤に結合する一方で、塩、緩衝液および他のイオンは、上記樹脂を通過して洗浄されることが望まれる。次いで、上記目的の分析物は、イオン対合剤（ｉｏｎ　ｐａｉｒｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）（例えば、トリフルオロ酢酸）を含み得る有機溶媒（例えば、アセトニトリル、メタノールなど）を使用して、上記ＳＰＥ吸収剤から溶出され得る。次いで、上記水溶性塩、緩衝液および他のイオンから分離されている上記溶出された分析物は、質量分析計のような検出器で定量され得る。

【０００８】

多数の試験化合物が標準的な分析法（例えば、ＨＰＬＣもしくはＳＰＥ）で精製しようとされている場合、上記分析物のうちの多くは不足することが理解される。なぜなら、目的の試験化合物は、その分析法に対して適切な化学的特性を有さないからである。例えば、低疎水性を有する吸収剤（例えば、Ｃ４もしくはシアノ相樹脂）が選択される場合、多くの極性化合物は、上記吸収剤に付着せず、上記塩および緩衝液とともに、上記吸収剤を通過して洗い流される。同様に、非常に高い疎水性能力を有するＳＰＥ樹脂（例えば、Ｃ１８もしくはフェニル樹脂）が選択される場合、多くの非極性試験化合物は、上記吸収剤に不可逆的に吸着してしまい、全く溶出されないか、または上記分析物のごく少量が、上記吸収剤から実際に溶出されてくるかのいずれかである。１つの解決策は、１つの分析法において失敗したいくつかの試験化合物が、別の分析法で成功するという見込みで、広い範囲の化学的特性を網羅するいくつかの異なる標準的分析精製法を使用することである。しかし、このようなアプローチは、これまで高価でかつ時間を浪費するものであった。

【０００９】

よって、種々の特性を有する種々のサンプルを精製し得るデバイスが必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

（発明の要旨）

本発明の実施形態は、分離カートリッジ、分離カートリッジを製造するための方法、および分離カートリッジを使用するための方法を提供する。

【００１１】

本発明の一局面は、第１の末端、第２の末端、および上記第１の末端と上記第２の末端との間に位置した１種以上の吸収剤を含む分離カートリッジを提供し、上記１種以上の吸収剤は、疎水性を増大させる順序で、上記第１の末端から上記第２の末端へと配置されている。

【００１２】

この局面は、種々の実施形態を有し得る。上記分離カートリッジは、上記第１の末端に隣り合って位置した第１のフリット、および上記第２の末端に隣り合って位置した第２のフリットを含み得る。上記フリットは、上記１種以上の吸収剤を保持するために適合されている。上記１種以上の吸収剤は、複数の領域中に配置され得る。各領域は、異なる疎水性を有する。上記分離カートリッジは、上記複数の領域を分離するために、１種以上のフリットを含み得る。上記１種以上の吸収剤は、シアノ樹脂、Ｃ１樹脂、Ｃ２樹脂、Ｃ３樹脂、Ｃ４樹脂、Ｃ８樹脂、Ｃ１８樹脂、フェニル樹脂、ビフェニル樹脂、グラファイトカーボン、シアノプロピル、およびトリメチルシランからなる群より選択され得る。上記分離カートリッジは、シリンダーを含み得る。上記シリンダーは、上記１種以上の吸収剤を

封じ込める（ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｅ）。上記シリンダーは、金属シリンダーであり得る。

【００１３】

本発明の別の局面は、分離カートリッジを提供し、上記分離カートリッジは、上記分離カートリッジの一方の末端に位置した入り口、上記入り口に隣り合う第１の吸収剤領域、上記第１の吸収剤領域に隣り合う第２の吸収剤領域、上記第２の吸収剤領域に隣り合う第３の吸収剤領域、上記第３の吸収剤領域に隣り合う第４の吸収剤領域、上記第４の吸収剤領域に隣り合う第５の吸収剤領域、および上記第５の吸収剤領域に隣り合う上記分離カートリッジの他方の末端に位置した出口を含む。

【００１４】

この局面は、種々の実施形態を有し得る。上記第１の吸収剤領域はシアノ樹脂を含み得る。上記第２の吸収剤領域は、Ｃ４樹脂を含み得る。上記第３の吸収剤領域は、Ｃ８樹脂を含み得る。上記第４の吸収剤領域は、Ｃ１８樹脂を含み得る。上記第５の吸収剤領域は、フェニル樹脂を含み得る。

【００１５】

本発明の別の局面は、種々の疎水性を有する分離カートリッジを作り出すための方法を提供する。上記方法は、濾過物質および架橋剤を、シリンダーの中に充填する工程、ならびに上記物質をエネルギー源に選択的に曝して、上記濾過物質内の架橋反応を選択的に開始する工程を包含する。

【００１６】

この局面は、種々の実施形態を有し得る。上記シリンダーは、ガラスチューブであってもよいし、溶融シリカチューブであってもよい。上記エネルギー源は、光源であってもよいし、放射線源であってもよい。上記濾過物質は、ポリマーおよび架橋剤を含み得る。

【００１７】

本発明の別の局面は、濾過方法を提供し、上記方法は、第１の末端および第２の末端、ならびに上記第１の末端と上記第２の末端との間のシリンダー内に位置した１種以上の吸収剤を有するシリンダーを含む分離カートリッジを提供する工程であって、上記１種以上の吸収剤は、疎水性を増大させる順序で、上記第１の末端から上記第２の末端へと配置されている、工程；サンプルを、上記カートリッジを通して、上記第１の末端から上記第２の末端へと流す工程であって、ここで上記溶液中の１種以上の分析物は、上記１種以上の吸収剤中に吸着される工程；ならびに上記第２の末端から上記第１の末端へと溶媒を流し、それによって、上記１種以上の吸収剤から上記１種以上の分析物を溶出する工程を包含する。

【００１８】

この局面は、種々の実施形態を有し得る。上記方法は、上記溶媒および上記１種以上の分析物を、検出器に与える工程を包含し得る。上記検出器は、質量分析計であり得る。上記１種以上の吸収剤は、複数の領域に配置され得、各領域は、異なる疎水性を有する。上記１種以上の吸収剤は、シアノ樹脂、Ｃ１樹脂、Ｃ２樹脂、Ｃ３樹脂、Ｃ４樹脂、Ｃ８樹脂、Ｃ１８樹脂、フェニル樹脂、ビフェニル樹脂、グラファイトカーボン、シアノプロピル、およびトリメチルシランからなる群より選択され得る。

【００１９】

本発明の性質および望ましい目的を十分に理解するために、添付の図面とともに、以下の詳細な説明が参照される。ここで同様の参照文字は、いくつかの図面全体を通じて対応する部品を示す。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１Ａ】図１Ａは、本発明の一実施形態による、増大する疎水性吸収剤の連続勾配を含むカートリッジの模式図である。

【図１Ｂ】図１Ｂは、本発明の一実施形態による、複数の異なる吸収剤領域を含むカートリッジの模式図である。

【図２】図２は、サンプルを精製するためのシステムの模式図である。
【図３】図３は、本発明の一実施形態による、汎用分離カートリッジの操作を示すフローチャートである。
【図４】図４は、本発明の一実施形態による、第１の末端から第２の末端へと疎水性の実質的連続増大を有するカートリッジを製造するための方法を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
（詳細な説明）
本発明の実施形態は、単一の分析法が、非常に広い範囲の試験化合物に適用可能であり得るように、変動性の疎水性を有するカートリッジを提供する。多くのアッセイの迅速かつ効率的な分析を可能にする、試験化合物の広範囲に適合する単一のカートリッジは、創薬および開発、環境分析、および診断適用に対して大きな影響力を有し得る。
【００２２】
本明細書で使用される場合、用語「カートリッジ」とは、より大きな装置部品（例えば、液体クロマトグラフィー装置、固相抽出装置、およびハイスループットオートサンプラー）に挿入されるように設計されたモジュラーユニットをいう。よって、カートリッジは、多くの実施形態において、このようなシステムにおいて使用される既存のカラムと同じ機能を発揮する。
【００２３】
カートリッジの実施形態は、サンプル装填および洗浄が、サンプル溶出の反対方向において起こる装置において使用されるように設計される。このようなシステムは、米国特許出願公開第２００５／０１２３９７０号および同第２００５／０１９４３１８号に記載されている。このような「逆溶出（ｒｅｖｅｒｓｅ　ｅｌｕｔｉｏｎ）」デバイスの１つの利点は、直線状拡散が最小化されることである。なぜなら、上記目的の分析物は、上記カートリッジの全長にわたって移動しないので、流体の乱れ（ｔｕｒｂｕｌｅｎｃｅ）に供されないからである。直線状拡散の最小化は、狭いクロマトグラフィーピークを生じる非常に鋭いバンドで上記分析物の溶出を容易にする。狭いクロマトグラフィーピークは、非常に望ましい。なぜなら、狭いピークにおいて同じ量の分析物が溶出されると、高められたピーク高を生じ、それによって、上記装置のシグナル対ノイズ比が増大するからである。さらに、ピーク幅は、上記装置の全体のスループットの最終的な決定因子である。なぜなら、個々のサンプルからのピークのベースライン分離が必要とされるからである。
【００２４】
本発明の実施形態は、上記サンプル入り口側において非常に親水性の物質を含むカートリッジの中に装填された吸収剤を含む。上記吸収剤の疎水性は、上記カートリッジ全体を通して、上記カートリッジの出口において非常に疎水性になるまで、高まる。サンプルが、上記サンプル入り口側で上記カートリッジ上に載せられる場合、上記サンプルは、上記目的の分析物が上記吸収剤に吸着される上記吸収剤の一部に達するまで上記吸収剤を通って動く。上記分析物は、非常に非極性である場合、上記カラム入り口に近い上記カートリッジの親水性領域に吸着され得る。同様に、上記分析物は、非常に極性である場合、上記カラムの出口付近の、上記カラムの非常に疎水性の領域に吸着するまで、カラムに浸透し得る。
【００２５】
上記分析物を溶出するために、その流れの方向は、切り替えられ、有機溶出溶媒（例えば、アセトニトリル、メタノールなど）が、反対の方向に上記カートリッジを通して流される。上記分析物は、上記樹脂から脱着され、上記カートリッジの入り口末端からもどって溶出してくる。
【００２６】
本発明の１つの利点は、非常に非極性の分析物が、これが不可逆的に結合されてしまう可能性のある上記カートリッジの疎水性領域と決して接触しないことである。同様に、多くの極性化合物は、同じ方法およびカラムでなお精製され得る。なぜなら、それらは、上

記極性化合物が可逆的に吸着される上記カートリッジの疎水性領域へと単純に浸透し得るからである。

【００２７】

本発明の一実施形態において、多くの個々のカートリッジもしくはサブカートリッジ（ｓｕｂｃａｒｔｒｉｄｇｅ）（各々は、単一の吸収剤化学性質を含む）は、極性が低下した単純な配置において、互いに流体連絡した状態で配置される。

【００２８】

他の局面において、上記カートリッジは、異なる吸収剤の異なる領域を含み得る。これは、いくつかの実施形態において、それらの空間的配向を維持するためにフリットもしくはフィルターによって分離され得る。あるいは、上記カートリッジは、疎水性を増大させる異なる領域ではなく、実質的に連続した疎水性の勾配を有する架橋ポリマー樹脂を含み得る。低下する極性の異なる領域もしくは連続する極性勾配のいずれかを含む単一のカートリッジが、特に有利である。なぜなら、上記必要に大きいカートリッジが、複数のカートリッジに関して最小化され、それによって、直線状拡散を最小化し、クロマトグラフィーピークを狭くするからである。

【００２９】

いくつかの実施形態において、上記吸収剤は、上記カートリッジが、適用され得る高圧を維持し得ることを確実にするために、鋼もしくは類似の剛性物質内に覆われる。他の局面において、上記吸収剤は、ガラス、プラスチック、もしくは他の物質で覆われ得る。いくつかの実施形態において、上記チューブのいずれかの末端にあるフィルターもしくはフリットは、上記ポリマー樹脂が、上記カートリッジ内で保持されることを確実にする。

【００３０】

図１Ａを参照すると、本発明の一実施形態に従うカートリッジ１００ａが提供される、カートリッジ１００ａは、第１の末端１０２および第２の末端１０４、ならびに上記第１の末端１０２と第２の末端１０４との間に位置した吸収剤１０６ａを有する。上記吸収剤は、上記吸収剤１０６ａの疎水性が、上記カートリッジ１００の一方の末端から上記カートリッジの他方の末端へと増大するように配置される。例えば、上記吸収剤１０６は、図１Ａにおける吸収剤１０６ａの影を濃くすることによって視覚的に表されるように、第１の末端１０２から第２の末端１０４へと疎水性が増大し得る。

【００３１】

上記吸収剤の疎水性の増大は、図１Ａに示されるように、実質的に連続性であり得る。あるいは、図１Ｂに示されるように、カートリッジ１００ｂは、吸収剤１０６ｂの複数の異なる領域１０８ａ～ｅを含み得、各々の領域１０８ａ～ｅは、実質的に均質な疎水性を有する。

【００３２】

いくつかの実施形態において、カートリッジ１００ａ、１００ｂは、カートリッジ１００ａ、１００ｂ内に吸収剤を保持するために、１つ以上のフリット１１０ａ、１１０ｂを含み得る。上記フリット１１０ａ、１１０ｂは、上記末端１０２、１０４に、および／もしくは１つ以上の領域１０８ａ～ｅとの間に位置して、望ましくない吸収剤の移動を防ぎ得る。フリットは、ガラス、プラスチック（例えば、ポリエチレン）、金属（例えば、ステンレス鋼もしくはチタン）などのような物質から構成され得る。

【００３３】

１つの実施形態は、フリットによって分離される単一のカートリッジ内の２つの異なる吸収剤ゾーンを含む。上記２つの異なるゾーンは、上記カートリッジの近位末端において大きい方の極性領域および上記カートリッジの遠位末端において小さい方の極性領域を含む。

【００３４】

このようなカートリッジは、単一吸収剤を有するカートリッジと比較して、上記装置の全体的な容積も直線的拡散も大きく変化させることなく、単純に製造され得る。フリットは、空のカートリッジの中心に配置される。次いで、上記２つの異なる吸収剤は、上記カ

ートリッジのいずれかの末端から、加圧下で連続してスラリー充填され得る。上記充填された吸収剤は、上記カートリッジのいずれかの末端においてさらなるフリットを配置することによって、上記カートリッジ内に密封され得る。

【００３５】

カートリッジ１００は、複数の吸収剤１０６を含み得る。本明細書で議論されるように、上記吸収剤は、疎水性を増大させるかもしくは低下させる順序で配置され得る。本発明のいくつかの実施形態は、わずか２つの異なる吸収剤を含み得る一方で、他は、わずかに異なる特徴を有する一連の吸収剤を含み得る。例えば、図１Ｂを繰り返して参照すると、領域１０８ａは、シアノ樹脂であり得、領域１０８ｂは、Ｃ４樹脂であり得、領域１０８ｃは、Ｃ８樹脂であり得、領域１０８ｄは、Ｃ１８樹脂であり得、そして領域１０８ｅは、フェニル樹脂であり得る。当業者に公知であるように、樹脂（例えば、「Ｃ１８樹脂」）は、シリカに結合した定常相に言及する。本発明に容易に含められ得る種々の他の逆相定常相が存在する。それらとしては、最小限の疎水性特徴を有するＣ１樹脂、Ｃ２樹脂およびＣ３樹脂、もしくは極めて疎水性であるビフェニル相が挙げられる。上記カートリッジの１つ以上の領域はまた、あまり一般には使用されていない特別な逆相（例えば、グラファイトカーボン、シアノプロピル、トリメチルシラン（ＴＭＳ）官能基）を含み得る。

【００３６】

非シリカ支持体を含む定常相はまた、単独で、もしくはシリカベースの吸収剤を使用する領域とともに、いずれかで使用され得る。このような定常相は、ポリマーおよび／もしくはゲルベースマトリクスを含み得る。ポリマー定常相は、代表的には、ポリスチレンとジビニルベンゼンとのコポリマーから構成される。ジビニルベンゼンコポリマーの量を変化させることによって、上記カートリッジの疎水性は、弱められ得る。広い範囲のポリマー定常相が、多くの業者から市販されている。従来のシリカベースのカートリッジのものに類似した疎水性は、種々の周知の方法および特許された方法に従って、疎水性特徴を有するコポリマーの量を改変することによって得られ得る。

【００３７】

本発明の他の実施形態において、上記カートリッジは、１つ以上の順相定常相を含む。例えば、上記複数の吸収剤は、弱イオン交換樹脂を有する領域および強イオン交換樹脂を有する領域を含み得る。弱イオン交換樹脂の例としては、カルボン酸および三級アミンが挙げられる。強イオン交換体の例としては、スルホン酸および四級アミノ基が挙げられる。この実施形態において、単一のカートリッジは、酸性特性もしくは塩基性特性に基づいて、広い範囲の化合物を保持するために使用され得る。

【００３８】

本発明のなお別の実施形態において、増大する強度の親水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＬＩＣ）吸収剤は、上記カートリッジにおいて使用され得る。代表的なＨＩＬＩＣ樹脂の例としては、非改変シリカ、非改変アルミナ、シラノール、ジオール、アミン、アミド、カチオン結合相、もしくは双性イオン結合相が挙げられる。

【００３９】

（汎用分離カートリッジの操作）

図２および図３は、本発明の実施形態に従う汎用分離カートリッジの操作を記載する。カートリッジ１００は、サンプル供給源２０２、廃棄物収集器２０４、溶媒供給源２０６、および検出器２０８に連結される。上記カートリッジ１００の流体の流れは、１つ以上のバルブ２１０ａ、２１０ｂによって制御され得る。

【００４０】

本発明のいくつかの実施形態において、上記カートリッジは、上記カートリッジに対してサンプルを流す前に、上記カートリッジに対して調節溶媒を流すことによって「調節」される（Ｓ３０２）。調節溶媒は、１種以上の極性液体および／もしくは非極性液体（例えば、メタノール、続いて、水もしくは水性緩衝液）を含み得る。調節は、上記カートリッジ中の充填物質をぬらし、上記吸収剤１０６の官能基を溶媒和化する。

【００４１】

工程Ｓ３０４において、サンプル供給源２０２からの試験化合物は、第１の方向（例えば、図２において左から右）において上記カートリッジ１００に対して流される。１種以上の目的の分析物（例えば、非極性化合物）は、上記カートリッジ１００中の親水性吸収剤に結合する一方で、イオン性化合物は、上記カートリッジ１０２を通って洗浄され、廃棄物収集器２０４の中に捕捉される。

【００４２】

工程Ｓ３０６において、溶媒供給源２０６からの有機溶媒（例えば、アセトニトリル、メタノールなど）は、第２の方向（例えば、図２において右から左）において上記カートリッジ１００に対して流されて、上記カートリッジ１００から上記目的の分析物を溶出する。

【００４３】

工程Ｓ３０８において、次いで、上記溶出された分析物は、分析のために検出器２０８に与えられる。検出器は、質量分析計のような種々のデバイスを含み得る。広く種々の質量分析計が、Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣａｌｉｆｏｒｎｉａのＡｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．；Ｗａｌｔｈａｍ，ＭａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓのＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．；Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣａｌｉｆｏｒｎｉａのＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．；Ｋｙｏｔｏ，ＪａｐａｎのＳｈｉｍａｄｚｕ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；Ｗａｌｔｈａｍ，ＭａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓのＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．；Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓのＷａｔｅｒｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；およびＰａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣａｌｉｆｏｒｎｉａのＶａｒｉａｎ，Ｉｎｃ．のような会社から入手可能である。

【００４４】

（変動性疎水性カラムの製造）

図４は、図１Ａに示されるように、第１の末端から第２の末端へと疎水性が実質的に連続的に増大したカートリッジ１００ａを製造するための方法４００を示す。

【００４５】

このようなカラムは、ポリマーと、非常に疎水性の基を含む架橋剤とを架橋することによって製造され得る。上記ポリマー中の架橋剤の量は、上記疎水性を有することが可能な樹脂の量を決定する。適切な逆相システムは、スチレンとジビニルベンゼンとのコポリマーから構成される。非常に疎水性のジビニルベンゼンコポリマーの相対量は、上記樹脂の全体的な特徴を決定する。

【００４６】

工程Ｓ４０２において、シリンダーには、シリンダーの中に濾過物質および架橋剤が装填される。工程Ｓ４０４において、上記濾過物質および上記架橋剤は、エネルギー源に選択的に曝されて、上記濾過物質内の架橋反応を選択的に開始する。

【００４７】

本発明の一実施形態において、上記架橋反応は、光もしくは紫外線放射によって開始される。上記ポリマーおよび架橋試薬は、上記架橋反応を開始するために使用される光もしくは放射を透過させる物質（例えば、ガラスもしくは溶融シリカチューブ）から製造されたカートリッジに装填される。親水性であるべき入り口末端における上記カートリッジの領域は、低線量もしくは短時間の間、放射に曝され、上記放射に対する曝露の量は、上記カラムの長さに沿って増大させられる。

【００４８】

（ハイスループットオートサンプラーに対する適用）

本明細書中のカートリッジ、システム、および方法は、迅速な装填、溶出、および検出器（例えば、質量分析計）へのサンプル提示を促進するハイスループットオートサンプラーに対して容易に適用され得る。このようなデバイスは、Ｗｏｂｕｒｎ，ＭａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓのＢｉｏＴｒｏｖｅ，Ｉｎｃ．からのＲＡＰＩＤＦＩＲＥ（登録商標）商標の下で入手可能であり、米国特許出願公開第２００５／０１２３９７０号および同第２００５／０１９４３１８号に記載される。

【００４９】
（等価物）
前述の明細書およびその一部を形成する図面は、本質的に例示であり、本発明の特定の好ましい実施形態を示す。しかし、上記説明は、本発明の限定として解釈されるべきではないことが認識されかつ理解されるべきである。なぜなら、多くの変更、改変およびバリエーションは、本発明の本質的な範囲、趣旨もしくは意図から逸脱することなく、当業者によって行われ得るからである。また、上記記載された実施形態の要素、工程、特徴、および／もしくは局面の種々の組み合わせは、たとえこのような組み合わせが本明細書で明示的に同定されないとしても、可能でありかつ企図される。

【００５０】
（援用）
本明細書で引用される全ての特許、公開特許出願および他の参考として援用される文献の全体的内容は、それらの全体が本明細書に明示的に参考として援用される。

【図１Ａ】

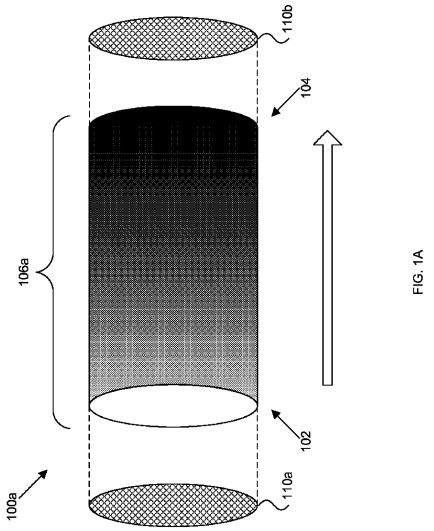


FIG. 1A

【図１Ｂ】

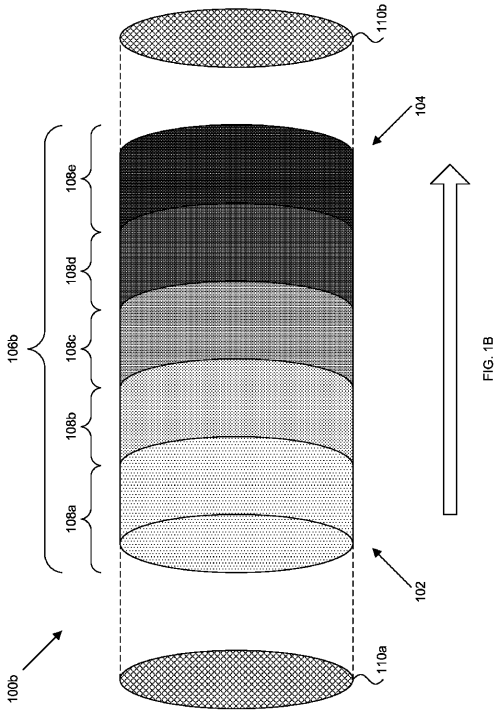


FIG. 1B

【図２】

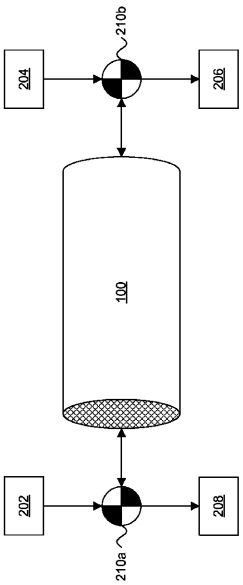


FIG. 2

【図３】

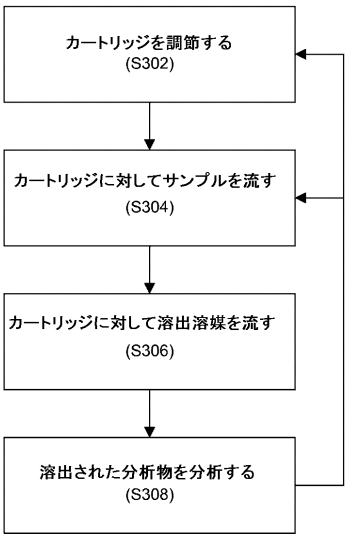


FIG. 3

【図４】

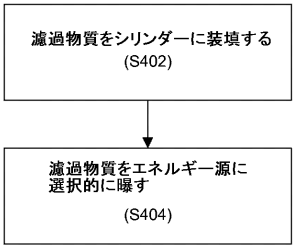


FIG. 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/41771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - B01D 15/32 (2009.01)
USPC - 210/656
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC - 210/656

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 210/294, 321.6, 322, 323.2, 634, 654, 656, 660; 436/8, 161, 174, 177; 422/292, 295. IPC(8) - B01D 15/00, 15/08, 15/30, 15/32, 27/00, 27/14, 29/50; C02F 1/28, 1/42, 1/44, 9/00; G01N 1/00, 30/02 (2009.01). Term search-- see search terms below.

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Dialogweb (344, 347, 348, 349, 371, 652, 654, 345, 351, 315, 35, 440, 155, 240); USPTO online search; Google Scholar; Google Patents. Search terms: separation, cartridge, hydrophobicity, hydrophilicity, increasing, decreasing, sorbent, phase, polarity, chromatography, column, series, continuous

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---- Y	M. GILAR et al., "Two-Dimensional Separation of Peptides Using RP-RP-HPLC System with Different pH in First and Second Separation Dimensions." Journal of Separation Science, September 2005; 28(14): 1694-1703 (09.2005), p. 1695, col. 1, first full paragraph	1, 3, 6 ---------- 2, 4, 5, 7, 16-20
X ----- Y	US 5,567,317 A (KAUVAR) 22 October 1996 (22.10.1996), abstract; col. 22, ln 51-60; col. 23, ln 51-56; col. 24, ln 66-67	8 ---------- 7, 9, 10-15
Y	US 6,183,645 B1 (DEWITT) 06 February 2001 (06.02.2001), abstract; col. 2, ln 67 to col. 3, ln 5; col. 3, ln 16-24, ln 46-50; FIGS. 1, 2	2, 4, 11
Y	US 2007/0017868 A1 (GRIMM) 25 January 2007 (25.01.2007), abstract; paras [0011], [0021]	5, 9
Y	ROGATSKY, et al., "Two-Dimensional Reverse Phase-Reverse Phase Chromatography: A Simple and Robust Platform for Sensitive Quantitative Analysis of Peptides by LC/MS. Hardware Design." Journal of Separation Science, March, 2006; 29(4): 538-546, (03.2006), p. 538, col. 2, first full para - p. 539, col. 1, first full para; p. 540, col. 2, third full para; FIGS. 1a, 1b	16-20
Y	US 2004/0019197 A1 (NORRMAN et al.) 29 January 2004 (29.01.2004), abstract; para [0017], [0039]	10-15
Y	US 5,846,530 A (SOON-SHIONG et al.) 08 December 1998 (08.12.1998), col. 3, ln 16-19, ln 26 -35, ln 52-58; col. 4, ln 46-50	10-15
Y	US 5,908,552 A (DITTMANN, et al.) 1 June 1999 (01.06.1999), abstract; col. 1, ln 35-43.	12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 June 2009 (01.06.2009)	16 JUN 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/41771

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUERRIER et al., "A Simplified Monobuffer Multidimensional Chromatography for High-Throughput Proteome Fractionation." Journal of Chromatography A, May 6, 2005; 1073(1-2): 25-33 (06.05.2005), p. 26, Experimental Sections 2.1 and 2.2; p. 27, Section 2.5, FIG. 1	1-20
A	US 6,441,160 B2 (KITAMURA et al.) 27 August 2002 (27.08.2002), abstract; col. 7, ln 17-49; col. 8, ln 17-21	1-20
A	US 6,884,346 B2 (ZARE et al.) 26 April 2005 (26.04.2005), col. 5, ln 19-65	10
A	US 2006/0201881 A1 (MARCUS et al.) 14 September 2006 (14.09.2006), abstract; para [0062]	1, 6, 8, 16, 17, 19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 30/60	*(2006.01)*	Ｂ０１Ｊ	20/30	
Ｇ０１Ｎ 30/72	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	30/60 Ｐ	
		Ｇ０１Ｎ	30/60 Ｂ	
		Ｇ０１Ｎ	30/88 １０１Ｌ	
		Ｇ０１Ｎ	30/72 Ｃ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オズバル, キャン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７５４, メイナード, カッティング ドライブ １０

Ｆターム(参考) 4D017 AA11 BA07 CA02 CA11 CA13 CA17 DA03 EA05
4G066 AA04B AB18B AB30B AC11B AC25B AE04B CA54 DA11 EA02 FA07 FA31