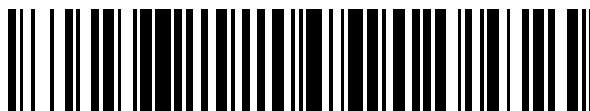


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 831**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2005 E 05250884 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1566209**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento de cromatografía de afinidad bajo vacío**

30 Prioridad:

**18.02.2004 US 545671 P**

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

**16.08.2013**

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
290 CONCORD ROAD  
BILLERICA MASSACHUSETTS 01821, US**

72 Inventor/es:

**PITT, ALDO M.;  
LABOMBARD, GARY y  
CLARK, PHILLIP**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 418 831 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

Dispositivo y procedimiento de cromatografía de afinidad bajo vacío

**Antecedentes de la invención**

5 Se han desarrollado numerosos dispositivos de laboratorio para llevar a cabo la filtración, la cromatografía y la centrifugación con el fin de concentrar, separar y / o purificar muestras de laboratorio.

Los investigadores necesitan con carácter rutinario concentrar su muestra antes de llevar a cabo cualquier otra labor de investigación. Hay dos enfoques fundamentales para la concentración de muestras: la captura específica, (resina cromatográfica y afinidad química) o filtros de exclusión por tamaños.

10 Para los investigadores que utilizan los filtros de exclusión por tamaños, existen limitaciones a las que deben adaptarse en su trabajo. El formato de estos dispositivos pueden ser o bien filtros centrífugos para un volumen de pequeñas muestras, o bien sistemas de separación de flujo tangencial a escala preparativa. Los sistemas de preparación típicamente incluyen bombas y calibradores y requieren que el usuario esté adiestrado y vigilar el proceso durante la separación. Una limitación adicional de los sistemas preparatorios es que el volumen final del concentrado puede ser mayor (50 ml o más). Teniendo en cuenta que la muestra de partida del investigador puede ser de 250 a 1000 ml, un concentrado de 50 ml es un factor de concentración bajo. Los dispositivos centrífugos son de pequeña escala y la muestra que puede procesar de forma conveniente, es pequeña (menos de 100 ml) debido a las limitaciones de tamaño del rotor centrífugo. Los dispositivos centrífugos pueden conseguir factores de concentración muy elevados. 100x no es inhabitual, pero el volumen de inicio pequeño requeriría que la investigación efectuara una vigilancia de la separación y rellenara repetidamente la unidad de filtro para concentrar toda la muestra de partida.

En algunos casos, el dispositivo centrífugo está preparado con una columna empaquetada de medios de separación, cromatografía o afinidad. Estos dispositivos se resienten de manera similar de las limitaciones de volumen iniciales y requieren llenados repetidos para concentrar las muestras mayores de 100 ml.

25 La misma limitación para el proceso UF se aplica a los sistemas de medios de cromatografía de escala preparativa, en los cuales se requieren bombas y calibradores de elevado coste y operarios adiestrados y los volúmenes del concentrado final son mayores de lo que se desea.

30 Otro sistema de bajo coste para sistemas de captación específica es utilizar columnas de gravedad. Cuando se utilizan estos sistemas, el investigador tiene que montar el sistema para conseguir una presión de descarga suficiente para procesar la muestra a través de la columna. Esto se consigue mediante la colocación de la muestra que debe ser procesada en un tanque y situándola por encima de la columna de separación. Se utilizan tubos y conectores para ensamblar la configuración de gravedad típica. Estos montajes pueden ser poco costosos de desarrollar, pero una limitación importante es el tiempo de procesamiento que puede ser lo suficientemente largo como para requerir que el proceso se lleve a cabo en una cámara fría para proteger la muestra de la degradación térmica.

35 La Patente estadounidense No. 4,755,301 divulga un procedimiento y un aparato centrífugos para la concentración de macromoléculas sin que exista filtrado hasta que se produzca la sequedad. Una membrana de ultrafiltración semipermeable separa un depósito de la muestra de una copa de filtrado, y unos conductos de filtrado situados por debajo de la membrana están separados lo suficientemente hacia dentro respecto del borde de la membrana para que, cuando el aparato se utiliza en un rotor centrífugo de ángulo fijo, la filtración se detiene una vez que el menisco de retención alcance el nivel radial centrífugo del borde más exterior del conducto de filtrado más exterior.

40 El documento US 2002/0110495 A1 divulga un dispositivo de preparación de muestra que comprende un depósito de la muestra o un soporte 22 de la muestra situado por encima de un módulo 5 de columna. El módulo de columna comprende un tubo en el que es situada una cantidad del medio 60 cromatográfico. Una vía de circulación de la muestra es suministrada desde el soporte 22 de la muestra a través del módulo 5 de columna y a través de los medios cromatográficos. El módulo de columna está situado en la parte inferior del depósito de la muestra, no dentro del taladro de un colector de vacío.

Los dispositivos de preparación de muestra convencionales están limitados a volúmenes de muestra relativamente pequeños, generalmente de cerca de 0,5 a 80 mililitros.

50 A estos dispositivos se les han añadido un medio de cromatografía, típicamente mediante la retirada de la membrana y sustituyéndola por un filtro o frita más abiertamente poroso y añadiendo el medio de cromatografía aguas arriba de ese filtro. En algunos casos, una capa o frita superior puede ser utilizada para mantener el medio dentro del tubo durante su almacenaje y manipulación. Una pequeña muestra que contiene una mezcla de componentes que incluyen el componente deseado (generalmente un péptido o proteína) se añade al depósito de la muestra y el dispositivo es a continuación centrifugado. El componente deseado típicamente se une (es capturado) al medio seleccionado y a todo el material restante y el fluido pasa a través del dispositivo hasta el depósito de filtrado. El dispositivo es retirado, el filtrado o bien desechado o utilizado en otras pruebas y una solución de lavado

es añadida al dispositivo que retira cualquier material suelto que puede haber sido atrapado entre el medio o abandonado sobre la superficie cuando el nivel del fluido se redujo. Este dispositivo es retirado, el filtrado es desechado (generalmente se fija una nueva copa de filtrado) y un fluido de elusión (típicamente un tampón con una resistencia al pH o iónica diferente que provoca que el componente deseado ligado se libere del medio) es añadido y centrifugado a través del dispositivo dentro de la centrifugadora. El eluyente de la copa de filtrado es recogido dado que contiene el componente deseado liberado.

Un problema de este tipo de dispositivo es que el volumen que puede ser filtrado está limitado por el dispositivo que puede acoplarse dentro de la centrifugadora. Para filtrar / capturar una muestra grande, como por ejemplo un litro de suero o de cultivo de tejido, se necesita llevar a cabo el proceso expuesto (al menos la etapa de unión y a menudo la etapa de lavado) múltiples veces.

Una alternativa es utilizar una cromatografía en columna, como por ejemplo una escala experimental o una columna preparatoria para procesar el volumen más elevado. Dichos dispositivos son costosos, y requieren columnas, soportes, bombas y la muestra y el filtrado, tanques de lavado y de eluyente. Así mismo, muchas de estas columnas están pre-empaquetadas con medios seleccionados, limitando las posibilidades de elección de los medios disponibles. Así mismo la capacidad de los medios utilizados en dichas columnas es típicamente mucho mayor de lo que es necesario para la cantidad de material necesario para ser capturado. Esto significa que a menudo se derrocha la capacidad suplementaria inherente a la columna lo que es un expediente costoso. Como alternativa, se puede limpiar y apartar la columna y utilizarla una segunda vez. Esto implica una cantidad importante de esfuerzo para asegurar que el medio está completamente limpio de manera que no quede ningún material residual (deseado o contaminante) procedente de la última prueba que pudiera afectar de manera negativa a los resultados del uso siguiente de la columna. Así mismo, la mayoría de los medios necesitan ser mantenidos refrigerados para que no resulten contaminados durante su almacenamiento.

Sería deseable contar con un dispositivo y un procedimiento para separaciones o purificaciones rápidas de alta calidad de muestras de una manera cómoda y fiable, que pudiera manejar volúmenes de muestra considerablemente más elevadas que las manejadas mediante dispositivos de centrifugación convencionales y que utilizara de manera eficaz la cantidad correcta de medios y eliminara la necesidad del derroche y del almacenamiento de las columnas entre las pruebas.

Constituye, por tanto, un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo de preparación de muestra que pueda procesar de manera práctica y rápida volúmenes relativamente amplios de muestra, en particular en una sola pasada con excelente captura.

Constituye otro objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo de preparación de muestras que pueda procesar de manera rápida y práctica volúmenes relativamente amplios de muestras y eluir el componente de interés en un factor de elevada concentración, superior a 50x.

Constituye otro objeto adicional de la presente invención proporcionar un dispositivo de preparación de muestras que pueda procesar de manera práctica y rápida volúmenes relativamente amplios de muestras, sin un equipamiento costoso y proporcionar un sistema que pueda procesar de manera fiable la muestra sin vigilancia.

Constituye un objeto adicional más de la presente invención, proporcionar un dispositivo de preparación de muestras que pueda procesar volúmenes relativamente amplios lo suficientemente rápido como para no requerir refrigeración.

### **Sumario de la invención**

Las características distintivas esenciales y opcionales de la presente invención se establecen, respectivamente, en las reivindicaciones principales y en las reivindicaciones dependientes. De esta manera, los problemas de la técnica anterior han sido resueltos mediante la presente invención, la cual proporciona un dispositivo y un procedimiento de preparación de muestras particularmente útil para una captura de gran volumen y para una elución de pequeño volumen. El dispositivo de la presente invención combina aspectos favorables tanto de la filtración por vacío como de la centrifugación para suministrar un volumen bajo (por ejemplo inferior o igual a aproximadamente 10 ml) de una muestra altamente purificada a partir de un volumen considerable (por ejemplo de aproximadamente 100 ml a un litro o más) de muestra, como por ejemplo un cultivo de tejido sobrenadante típicamente a partir de una línea celular de producción de anticuerpos monoclonales de hibridoma.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un dispositivo de preparación de muestra que comprende un colector, un soporte o depósito de la muestra, y una unidad de filtro que contiene un medio de cromatografía de tal manera que se establezca una vía de filtración entre el soporte de la muestra, la unidad de filtro y el colector. Tras someter la muestra situada en el soporte de la muestra a una fuerza directriz, como por ejemplo un vacío, la muestra fluye desde el gran depósito a través del medio de cromatografía existente en la unidad de filtro. Las moléculas de interés se unen al medio y pueden ser lavadas bajo vacío. La elusión puede entonces ser llevada a cabo mediante la retirada de la unidad de filtro y el sometimiento a una fuerza directriz, como por ejemplo un vacío o centrifugación y recoger la muestra eluida. En otra forma de realización, las moléculas de interés pueden ser eluidas hasta el interior de un extractor centrifugo de bajo volumen directamente dentro del colector y, a continuación, concentradas en mayor medida mediante centrifugación.

**Breve descripción de los dibujos**

- La Figura 1 es una vista en perspectiva del conjunto de preparación de muestras de acuerdo con la presente invención;
- 5 la Figura 2 es una vista en despiece ordenado del conjunto de la Figura 1, que presenta un dispositivo de ultrafiltración situado aguas abajo del dispositivo de separación;
- la Figura 3 es un vista en despiece ordenado parcial del conjunto de la Figura 1;
- la Figura 4 es una vista en sección transversal de una porción del conjunto de preparación de muestra de acuerdo con una forma de realización de la presente invención;
- 10 la Figura 5 es una vista en sección transversal de una porción del conjunto de preparación de muestra de acuerdo con otra forma de realización de la presente invención;
- la Figura 6 es una vista en despiece ordenado en perspectiva de la cara inferior ensamblada del soporte de muestra de acuerdo con la presente invención;
- la Figura 7 es una vista en perspectiva de la cara inferior ensamblada del soporte de muestra de acuerdo con la presente invención;
- 15 la Figura 8 es una vista en despiece ordenado de un conjunto de preparación de muestra de acuerdo con una forma de realización alternativa de la presente invención que presenta un concentrador ultrafiltración situado aguas abajo del dispositivo de filtración;
- la Figura 9 es una vista en sección transversal del conjunto de la Figura 8, mostrada en estado ensamblado;
- 20 la Figura 10 es una vista en sección transversal del conjunto de la Figura 8 con el concentrador de ultrafiltración retirado;
- la Figura 11 es una vista en despiece ordenado de un conjunto de preparación de muestra de acuerdo con una forma de realización alternativa de la presente invención que presenta un tubo de recogida situado aguas abajo del dispositivo de filtración;
- 25 la Figura 12 es una vista en perspectiva del conjunto de la Figura 11 en estado ensamblado; y
- la Figura 13 es una vista en sección transversal del conjunto de la Figura 11.

**Descripción detallada de la invención**

Dirigiendo en primer término la atención a la Figura 1, de acuerdo con una forma de realización de la presente invención, en ella se muestra un colector 12 de vacío que presenta un conector 13 estándar para la conexión a una fuente de vacío a través de un tubo flexible o elemento similar. El colector 12 puede así mismo incluir un respiradero 14. El respiradero 14 puede ser utilizado por el investigador para reducir el caudal a través del dispositivo 30 de filtración para potenciar al máximo la captura de la muestra. Tal y como puede apreciarse de forma óptima en las Figuras 4 y 5, el colector 12 de esta forma de realización es, en términos generales, un cuerpo macizo que presenta un taladro 15 interno que está abierto por la parte superior 15A. El taladro 15 comunica, a través de la vía de paso 16, con una fuerza directriz, como por ejemplo una fuente de vacío. El taladro 15 comunica, así mismo, a través de la vía de paso 17, con un respiradero 14. De modo preferente, el taladro 15 está escalonado en los resaltes 15B y 15C, tal y como se muestra, con el fin de soportar un dispositivo 30 de filtración (tal y como se analiza con mayor detalle más adelante). El conector 12 está, de modo preferente, fabricado en un material lo suficientemente rígido y fuerte para soportar el vacío aplicado al dispositivo. Así mismo, el material del colector debe ser compatible con los materiales que se procesan. Materiales apropiados incluyen metal, materiales cerámicos y plásticos. De modo preferente, el colector está fabricado a partir de plástico y, de modo más preferente, el colector está fabricado a partir de poliolefinas, como por ejemplo polipropileno o polietileno.

Volviendo a las Figuras 1 a 3, el soporte 20 de la muestra es una carcasa que presenta un extremo 21 superior abierto, tal y como se muestra. El soporte 20 de la muestra es una carcasa de una pieza genéricamente cilíndrica que puede contener unos volúmenes de muestra relativamente grandes, de modo preferente, de al menos, de manera aproximada, 50 mililitros, de modo más preferente al menos de aproximadamente 100 mililitros, como máxima preferencia al menos aproximadamente 500 mililitros. De modo preferente, el soporte 20 de la muestra está fabricado en un plástico, como por ejemplo poliolefina, en particular, polipropileno, pero habitualmente está fabricado en poliestireno. El extremo 21 superior presenta, de modo preferente, una abertura de diámetro amplio con el fin de facilitar la transferencia de la muestra hasta el interior del soporte 20. El soporte 20 de la muestra incluye un filtro 31, como por ejemplo una membrana y / o unas fibras de vidrio para el prefiltrado de la muestra con el fin de reducir al mínimo o impedir que se manche el medio cromatográfico en el dispositivo de filtración aguas abajo del soporte 20. Esto es particularmente ventajoso cuando se desea reutilizar el dispositivo 30 de filtración.

La parte inferior del soporte 20 de la muestra se acopla con un collarín 25. Típicamente, el collarín 25 y el soporte 20 están unidos entre sí como una unidad integral. La unión puede llevarse a cabo mediante unión térmica, soldadura sónica, adhesivo o procedimiento similar. El collarín 25 es, de modo preferente, cilíndrico, y está configurado para que se acople con el colector 12 de vacío sobre el resalto 12A anular (Figura 4). El collarín 25 incluye un anillo 26 anular interno, de modo preferente situado en posición central en el collarín 25 el cual se fija al miembro 27 en saliente del colector 12. Puede ser utilizado cualquier medio pertinente de fijación, como por ejemplo unos hilos de rosca. De modo preferente, la fijación no es permanente, para que el colector 12 pueda ser reutilizado con otros soportes de muestra y otros collarines. El collarín, así mismo, incluye un adaptador 33 que se aprecia de forma óptima en las Figuras 2 y 3. El adaptador 33 es, de modo preferente, cilíndrico y está situado en posición central en el collarín 25, de modo preferente circunscrito por el anillo 26 anular interno. Incluye un elemento 34 de estanqueidad, como por ejemplo una junta tórica para el cierre estanco alrededor del dispositivo 30 de filtración. Como alternativa, una junta 36 (Figura 6) puede ser utilizada con fines de estanqueidad, la cual proporciona un cierre frontal con el extremo abierto de la unidad de filtro. La combinación del soporte 20 de la muestra y del collarín 25 es comercialmente disponible en Millipore Corporation y es comercializado con el nombre comercial Stericap™ o Steritop™.

El dispositivo 30 de filtración es, de modo preferente, una carcasa de una pieza fabricada a partir de un material plástico como por ejemplo poliolefina, en particular polipropileno. Es genéricamente cilíndrico, con una porción 38 superior que define una cámara de la muestra, lo suficientemente grande como para contener el volumen de elución requerido, que converge en una porción más pequeña inferior genéricamente cilíndrica que contiene el medio cromatográfico. La porción 39 inferior termina en una espita 40 que define un orificio de salida de fluido del dispositivo.

El dispositivo 30 incluye, de modo preferente, un medio 45 cromatográfico (Figuras 4 y 5), cuyos formatos no están específicamente limitados. Básicamente, cualquier medio utilizado en la recuperación del péptido y / o la proteína puede ser utilizado en este dispositivo.

Por ejemplo, medios apropiados incluyen estructuras de material compuesto funcionales que comprendan partículas de resina derivadas de grupos funcionales que incluyen medios a base de estiredivinilo - benceno (no modificado o derivado con por ejemplo ácidos sulfónicos, aminas cuaternarias, etc.); medios a base de sílice (no modificados o derivados de C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub> o funcionalidades de intercambio de iones), para adaptar una diversidad de aplicaciones para péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos.

Así mismo, medios formados con polisacáridos como por ejemplo agarosa, agarosa reticulada o dextrano o de polímeros trisacryl (grisacryl) pueden ser utilizados en solitario o bien pueden ser utilizados con diversos elementos de captura fijados a ellos, como por ejemplo ligandos, incluyendo pero no limitados a la Proteína A, la Proteína G, la Proteína G y similares. Ejemplos adicionales incluyen partículas paramagnéticas que contienen un elemento químico de captura. Así mismo, se puede utilizar vidrio poroso controlado en solitario o con un ligando como por ejemplo la Proteína A (incluyendo medios de vidrio porosos controlados ProSep®A disponibles en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets).

Los expertos en la materia advertirán que, así mismo, puede ser utilizada una amplia variedad de matrices con selectividades alternativas (por ejemplo, medios de interacción hidrofóbicos, medios de intercambio iónico, medios de fase inversa, medios de afinidad (por ejemplo la Proteína A, la Proteína G, la Proteína L, resinas de afinidad de boronato), etc.), especialmente para clases de moléculas distintas de los péptidos.

Las membranas apiladas son, así mismo, apropiadas como medios cromatográficos. Dispositivos apropiados pueden incorporar una pluralidad de estructuras porosas de material compuesto que presenten materiales con diferentes grupos funcionales para fraccionar los analitos que varían con la carga, el tamaño, la afinidad y / o la hidrofobicidad, e incluyen filtros apilados, como por ejemplo el disco de fibra de vidrio, membranas cargadas en superficie o membrana con moléculas de afinidad acopladas a la superficie de la membrana.

El término "partículas", tal y como se utiliza en la presente memoria, pretende abarcar partículas que presenten formas regulares (por ejemplo, esféricas) o irregulares, como por ejemplo fibras y polvos de fragmentos e incluyendo, de manera opcional, elementos químicos de captura de acuerdo con lo mencionado con anterioridad. Estas partículas pueden abarcar el vidrio, el metal o la frita de plástico o mats de vidrio o plástico no tejidos como es sobradamente conocido en el embalaje de cromatografía. Como alternativa, pueden estar embalados en un paquete de cromatografía que pueda a continuación ser insertado dentro de un dispositivo. El dispositivo 30 de filtración está configurado para ser recibido de manera deslizable dentro del taladro 15 del colector 12. El reborde 37 superior del dispositivo de filtración puede incluir una brida anular que se asiente sobre el resalto superior del colector 12, tal y como se aprecia en las Figuras 4 y 5. La base de la porción 38 superior del dispositivo 30 se asienta sobre un medio 46 de estanqueidad situado sobre el resalto 15B del colector 12. Los medios de estanqueidad apropiados incluyen una junta tórica, unas juntas elastoméricas planas o elementos similares, para acoplar el dispositivo 30 de filtración y el colector 12 para crear una vía de flujo para la muestra. Cuando el dispositivo 30 está situado de la manera indicada dentro del taladro 15 del colector, hay suficiente espacio por debajo del orificio de salida del dispositivo para hacer posible que el fluido fluya hasta el desagüe (como en la forma de realización de las Figuras 3 y 4) o para hacer posible el posicionamiento de un segundo dispositivo, como por ejemplo una unidad de filtro centrífuga (como en la

5 forma de realización de las Figuras 2 y 5) para concentrar en mayor medida y desalar la muestra eluída, por ejemplo. En esta última forma de realización, puede ser utilizada unidad 60 centrífuga apropiada, como por ejemplo una unidad Amicon® Ultra que contiene una membrana Ultracel®, comercialmente disponible en Millipore Corporation. El dispositivo centrífugo es situado por debajo de la unidad de filtro después de que se ha completado las etapas de unión y de lavado. Es situado para recoger el eluyente que puede ser concentrado en mayor medida antes de su análisis o utilización.

10 El caudal de la muestra a través del dispositivo puede ser controlado de diversas formas. Por ejemplo, una vía de aire puede ser introducida, como por ejemplo a través del respiradero 14 para reducir la presión de vacío aplicada al dispositivo 30 de filtro ralentizando de esta manera el caudal que circula a través de este dispositivo. Como alternativa, el embalaje del medio cromatográfico dispuesto en el dispositivo 30 de filtración, y / o el filtro del soporte 20 de la muestra pueden ser modificados para controlar el flujo.

15 En funcionamiento, el dispositivo es ensamblado con un dispositivo 30 de filtración situado en el colector y el soporte 20 de la muestra y el collarín 25 situados de forma estanca sobre el colector. La muestra es añadida al soporte de la muestra, y el vacío es aplicado al dispositivo. La muestra fluye por el interior del dispositivo 30 de filtración (de modo preferente después de pasar a través del pre-filtro existente en el soporte 20 de la muestra), y las moléculas de interés se unen al medio del dispositivo de filtración. Las muestras que no son de interés pasan a través del dispositivo y son dirigidas al desagüe o a un recipiente de recogida. Las moléculas unidas pueden, de manera opcional, ser entonces lavadas mediante la introducción de lavado apropiada dentro del soporte 20 de la muestra, de nuevo con la aplicación de vacío. El dispositivo de filtración puede ser retirado del colector y sometido a un tratamiento adicional, como por ejemplo una centrifugación para eluir las moléculas de interés.

20 En otra forma de realización, un dispositivo 60 centrífugo (Figura 5), como por ejemplo un dispositivo centrífugo de ultrafiltración, es situado en el colector aguas abajo del dispositivo de filtración, como por ejemplo después de las etapas de unión y de lavado y antes de la etapa de elución. El fluido que fluye hacia fuera del dispositivo de filtración es recibido por el dispositivo centrífugo para su tratamiento y análisis posterior.

25 Las Figuras 8 a 13 ilustran otra forma de realización en la que el colector 12' es una botella o carcasa similar adaptada para ser utilizada en comunicación con una fuente de vacío. El depósito 20 de la muestra, (el cual incluye un empalme 44 que puede ser conectado a una fuente de vacío), y el dispositivo 30 de filtración, así como el dispositivo 60 centrífugo opcional, son como los descritos con anterioridad y se muestran en el estado ensamblado en la Figura 12. El colector 12' incluye un volumen suficiente para contener el dispositivo 30 de filtración y un dispositivo 60 centrífugo opcional, tal y como se aprecia de forma óptima en la Figura 9. En la forma de realización mostrada, el colector 12' incluye un labio 62 superior que presenta unos hilos de rosca 63 externos para su encaje de forma estanca con unos correspondientes hilos de rosca internos dispuestos en el anillo 26 interno del collarín 25. Los expertos en la materia apreciarán que otros medios de fijación de forma estanca del colector 12' al soporte 20 se incluyen en el alcance de la presente invención. El labio 62 superior presenta un diámetro exterior más pequeño que el diámetro exterior de las bridas 81 anular del dispositivo 30 de filtración, para que la brida 81 anular se pueda asentar sobre la superficie superior del labio 62 superior tal y como se muestra en la Figura 9. Un adaptador 33' cierra de forma estanca el dispositivo 30 de filtración al soporte 20 de la muestra de acuerdo con lo representado.

35 En la forma de realización concreta de la Figura 10, el dispositivo 60 centrífugo no es utilizado, y el filtrado procedente del dispositivo 30 de filtración simplemente se recoge en el colector 12'. Dependiendo de la aplicación este filtrado puede ser utilizado o descartado.

40 Materiales apropiados para el colector 12' incluyen acero inoxidable, vidrio, plástico, de modo preferente poliolefinas, como por ejemplo polietileno y polipropileno pero, más típicamente poliestireno.

45 Las Figuras 11 y 13 ilustran una forma de realización en la que el eluyente que procede del dispositivo 30 de filtración es recogido en un tubo 70 de recogida. La muestra eluída recogida de esta manera puede ser almacenada o tratada adicionalmente.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un dispositivo de preparación de muestra, que comprende:
- un depósito (20) de la muestra, un colector (12) de vacío que presenta un taladro, y
- 5 una unidad (30) de filtro, de tal manera que se establece una vía de filtración que se extiende desde el depósito de la muestra a través de dicha unidad de filtro hasta dicho colector, estando dicha unidad de filtro situada dentro de dicho taladro de dicho colector de vacío, **caracterizada porque** dicha unidad de filtro comprende una cámara (38) de la muestra y una cámara inferior de volumen más pequeño que dicha cámara (38) de la muestra dispuesta
- 10 aguas arriba, con respecto a la dirección de flujo de fluido de dicho medio de cromatografía, teniendo dicha cámara de la muestra un volumen más pequeño que dicho depósito de la muestra, de forma que dicho depósito y colector están encajados de forma estanca.
- 2.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, en el que la unidad de filtro es una carcasa de una pieza fabricada a partir de un material plástico.
- 3.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, en el que la unidad de filtro es recibida de manera
- 15 deslizable dentro del taladro del colector.
- 4.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, en el que dicha unidad de filtro amovible de dicho colector.
- 5.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, en el que dicho depósito de la muestra tiene un volumen de al menos 500 mililitros.
- 20 6.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, en el que dicha unidad de filtro está situada dentro de dicho taladro aguas abajo de dicho depósito de la muestra, y el dispositivo comprende así mismo, una unidad (60) de filtración centrífuga situada dentro de dicho taladro aguas abajo de dicha unidad de filtro, o dicho taladro existente en dicho colector está adaptado para estar en comunicación con la fuente de vacío.
- 25 7.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, en el que dicho medio de cromatografía es seleccionado entre el grupo que consiste en estructuras funcionales de material compuesto, que comprenden partículas de resinas derivadas de grupos funcionales y medios a base de sílice, o en el que dicho medio de cromatografía es seleccionado entre el grupo que consiste en estructuras funcionales de material compuesto, que comprenden una o más capas de membranas derivadas de grupos funcionales o de estructuras de membrana de material compuesto que contienen medios a base de sílice.
- 30 8.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, en el que dicho depósito de muestra comprende un filtro (31).
- 9.- El dispositivo de preparación de muestra de la reivindicación 1, que comprende así mismo una fuente de vacío, y en el que dicho colector es un recipiente de recogida de filtrado en comunicación con dicha fuente de vacío y dicha unidad de filtro.
- 35 10.- Un procedimiento de purificación de una muestra que utiliza el dispositivo de preparación de la muestra de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:
- la introducción de dicha muestra dentro de dicho depósito de la muestra;
- la extracción de dicha muestra a través de dicho depósito de la muestra hasta el interior de dicha unidad de
- 40 filtro mediante la aplicación de vacío procedente de una fuente de vacío en comunicación con dicho colector para unir las moléculas de interés a dicho medio de cromatografía;
- la retirada de dicha unidad de filtro de dicho colector; y
- la elusión de dichas moléculas de interés de dicho medio de cromatografía.
- 11.- El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende así mismo, el tratamiento adicional de dichas moléculas de interés eluidas mediante centrifugación.
- 45

12.- El procedimiento de la reivindicación 10, así mismo **caracterizado por**

la introducción de una unidad (60) de filtro centrífuga en comunicación de fluido con dicho colector aguas abajo de dicha primera unidad de filtro; la elusión de dichas moléculas de interés de dicho medio de cromatografía dentro de dicha unidad de filtro centrífuga;

- 5 la retirada de dicha unidad de filtro centrífuga de dicho colector; y
- la centrifugación de dicha unidad de filtro centrífuga.



Fig. 1

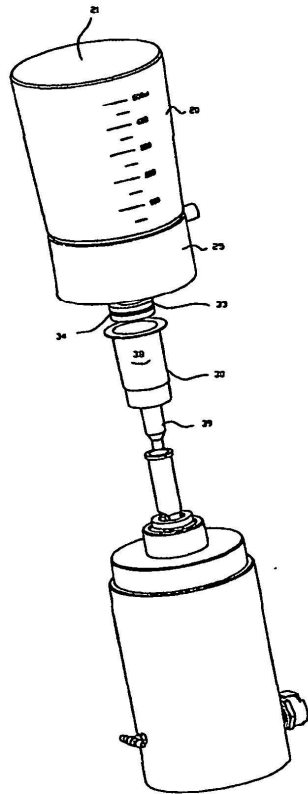
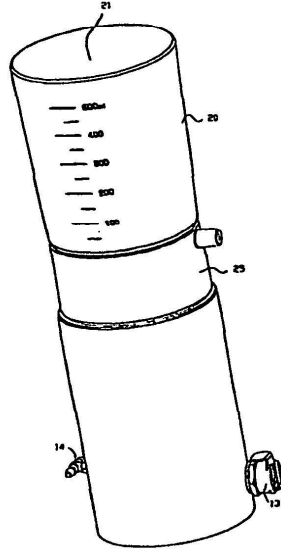


Fig. 2

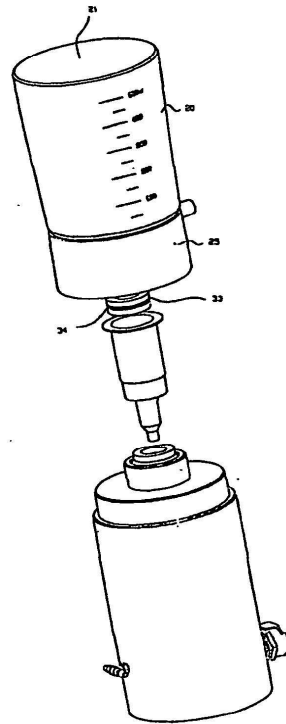


Fig. 3

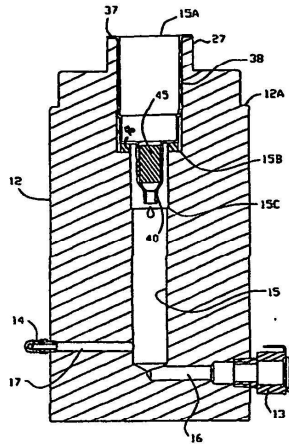


Fig. 4

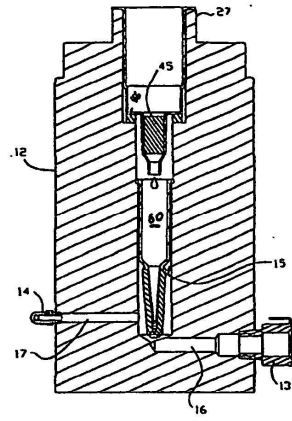


Fig. 5

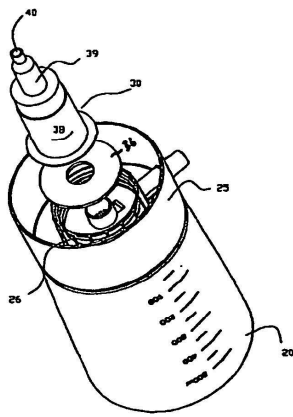


Fig. 6

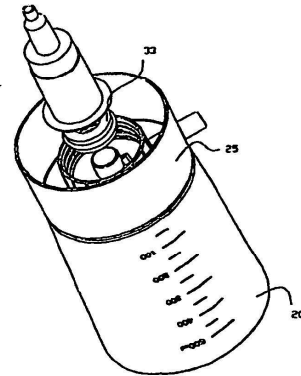


Fig. 7

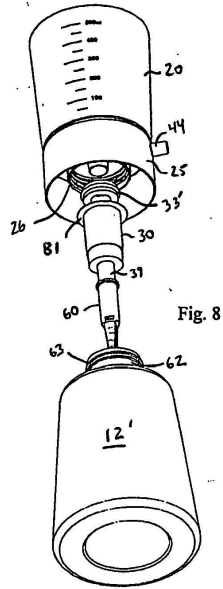


Fig. 8

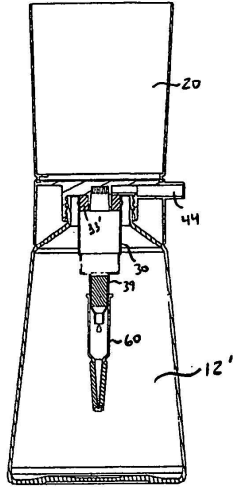


Fig. 9

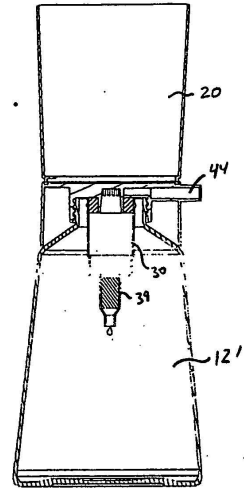


Fig. 10

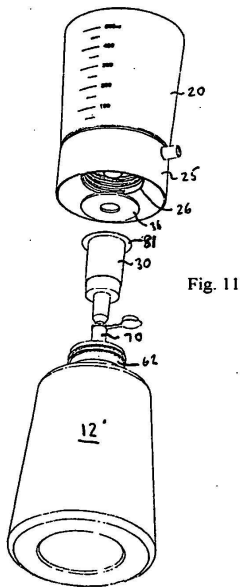


Fig. 11

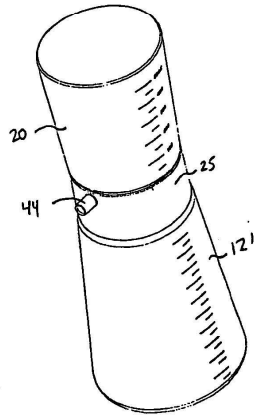


Fig. 12

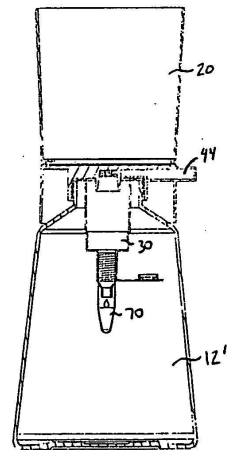


Fig. 13