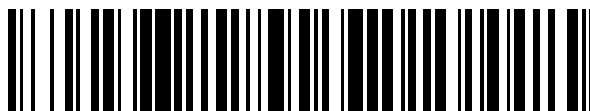


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 549**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12175469 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2546346**

54 Título: **Dispositivo y método de preparación de muestras todo en uno**

30 Prioridad:

13.07.2011 US 201161507240 P
18.05.2012 US 201261648631 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.09.2020

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US

72 Inventor/es:

SCOTT, CHRISTOPHER A.;
GREENIZEN, KURT;
GUTIERREZ, SARA D.;
BRIGGS, DAVID;
SCADUTO, RALPH T.;
NADLER, TIMOTHY K.;
BONHOMME, LUIS;
MABUCHI, MASA HARU y
CLARK, PHILLIP

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 784 549 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 método de preparación de muestras todo en uno

Antecedentes

Los filtros centrífugos pueden utilizarse para separar sustancias biológicas tales como una enzima, ácido nucleico y proteína de un anticuerpo, con el propósito de concentración, desalinización, purificación y fraccionamiento. Estos dispositivos se utilizan más comúnmente en instrumentos separadores centrífugos, que pueden consistir en una configuración de rotor de ángulo fijo o una configuración de rotor oscilante o de ángulo variable. La velocidad del proceso de filtración y la recuperación de la muestra de retenido son sumamente valorados por los usuarios. Se obtienen habitualmente valores de recuperación de la muestra mayores de 85% retirando la cápsula de membrana (portamuestras) y sometiéndola a centrifugación inversa en un tubo receptor.

Tales dispositivos se utilizan habitualmente para concentrar orina, suero, plasma y líquido cefalorraquídeo. Por ejemplo, la medición de proteínas específicas en la orina puede ser importante para el diagnóstico y la gestión de diversos estados de enfermedad, aunque el contenido de estas proteínas en la orina es a menudo demasiado pequeño para ser detectado sin concentrar las proteínas en primer lugar. Los dispositivos convencionales incluyen generalmente un alojamiento que tiene un depósito de muestras, un filtro sellado en el alojamiento de manera que la muestra deba pasar a través del filtro cuando se somete a una fuerza impulsora (tal como la centrifugación), y una cámara de recogida para recoger la muestra concentrada.

Existe una clase de protocolos de purificación de proteínas que utilizan la afinidad antígeno-proteína para separar proteínas de interés de una muestra mezclada tal como un lisado celular o un suero. Tales protocolos utilizan a menudo pequeñas microesferas que se conjugan con anticuerpos de tal manera que se unan a proteínas específicas de la muestra. Una vez que las proteínas se unen de forma efectiva a las microesferas, se necesita extraer y recoger las proteínas (elución) de las microesferas para el análisis aguas abajo, desarrollo de ensayos, etc. Entre los ejemplos de técnicas aguas abajo se incluyen la electroforesis en gel 2D y la espectrometría de masas.

Existe un número de etapas de procesamiento que se necesitan en el flujo de trabajo. Estas pueden incluir equilibrar las microesferas con un tampón neutro previamente a la unión, lavar las microesferas después de la unión para retirar contaminantes, elución de las proteínas de interés, intercambiar el tampón de las proteínas eluidas, concentrar la muestra final diluida, y finalmente recuperar la muestra de proteínas purificada. Para los protocolos de purificación por afinidad e inmunoprecipitación, las proteínas unidas a las microesferas son las proteínas de interés. Para los protocolos de depleción, la fracción no unida (proteínas no unidas a las microesferas) es la muestra de interés.

Las microesferas utilizadas en estos métodos de purificación son magnéticas o no magnéticas. Uno de los tipos de microesferas no magnéticas más comunes es la agarosa. Las microesferas magnéticas tales como PureProteome de proteína A & G, PureProteome de albúmina y PureProteome de albúmina e IgG para la depleción de albumen e IgG del suero, microesferas Magna ChIP proteína A para inmunoprecipitación cromática, y microesferas magnéticas PureProteome Nickel para la purificación recombinante marcada con His, se encuentran disponibles en el comercio en EMD Millipore.

Cuando se trabaja con microesferas magnéticas, los actuales métodos manuales se basan en el uso de las pipetas para desplazar los líquidos hacia y desde el tubo de muestras (tampones, etc.) y para desplazar la muestra de un dispositivo a otro. Se utilizan imanes para sujetar las microesferas hacia el lado del tubo de muestras de manera que el usuario pueda pipetear (tomar con la pipeta) los tampones sin afectar a las microesferas. Hay alrededor de 8 etapas con pipeta por muestra en un flujo de trabajo habitual de unión/lavado/elución.

Para una unión de proteínas óptima con las microesferas, se requiere incubación con estos métodos. El dispositivo que contiene las microesferas y la muestra se giran habitualmente en una mezcladora de tambor vertical, o se colocan en un agitador (por ejemplo, de tipo vórtex) durante 10-30 minutos. Cuando se añaden nuevos tampones, tales como tampones de lavado y elución, el usuario mezclará en agitador tipo vórtex el dispositivo durante un minuto más o menos para mezclarlo y lavarlo.

Las etapas de lavado y elución necesitan repetirse múltiples veces para que sean efectivas. Por ejemplo, el protocolo estándar es añadir un tampón de lavado al vial de la muestra, mezclar con vórtex (mezclar) durante un minuto más o menos, retirar el tampón y repetir dos o más veces. Con las microesferas magnéticas el procedimiento de unión/lavado/elución dura aproximadamente 45 minutos.

Una alternativa a las microesferas magnéticas son las microesferas de agarosa. Un dispositivo disponible en el comercio que utiliza microesferas de agarosa incluye un tubo con un fondo abierto y una frita porosa situada sobre el fondo abierto. En lugar de utilizar pipetas para retirar fluidos del tubo de muestras, se utiliza una centrifuga de

sobremesa para impulsar los fluidos a través de la frita y hacia el interior de un tubo de recogida – habitualmente un tubo de 4 ml o 15 ml. El tamaño de poro de la frita se elige de manera que retenga las microesferas a la vez que permite que los tampones y las proteínas pasen a través de la misma.

- 5 Dependiendo del tamaño de la columna de centrifugación utilizada, el flujo de trabajo puede resultar complicado y requerir mucho tiempo en comparación con métodos que utilizan microesferas magnéticas. Una centrífuga de sobremesa es habitualmente una pieza de equipo compartida situada en una ubicación común; a diferencia de las micro-centrífugas que cada usuario pueden tener instaladas en su área de trabajo.

Este proceso requiere 16 etapas de pipeteado por muestra y lleva aproximadamente 1 hora para completarla.

- 10 Tanto para los flujos de trabajo con agarosa como con microesferas magnéticas, las etapas abajo pueden incluir intercambiar el tampón de soporte y concentrar una muestra diluida. En casos en los que se desea el intercambio de tampones de la muestra, quizás para retirar el eluyente como el imidazol, la muestra se transfiere habitualmente a un tubo de membrana de diálisis con pinzas o similar, que se coloca a continuación en el interior de un depósito de tampón de intercambio durante un periodo de hasta 24 horas, a medida que el tampón se intercambia gradualmente mediante difusión.

- 15 Cuando se desea el intercambio de tampones y concentración, puede utilizarse un dispositivo de diafiltración/concentración de proteínas, tal como un dispositivo centrífugo con una membrana de UF porosa dimensionada para retener las proteínas, pero que permite que el tampón pase a través de la misma. Controlando el tiempo de centrifugado y seleccionando un diseño apropiado del dispositivo, puede controlarse la concentración final. Para que el intercambio de tampones sea efectivo, la etapa de intercambio de tampones necesita repetirse dos o tres veces (tal como se realizó con las etapas de lavado y elución). Estos dispositivos tardan 30-45 minutos y requieren múltiples centrifugados en una centrífuga. En el dispositivo Amicon Ultra disponible en el comercio a través de EMD Millipore, existen 5 etapas de pipeteado para el intercambio de tampones y concentración.

- 25 A medida que los volúmenes de las muestras de proteína se vuelven más pequeños, las pérdidas potenciales no deseables de muestra debido al volumen de retención dentro de un dispositivo, se ha vuelto más importante que nunca. Los datos actuales sugieren que una pérdida de 10 µl en una muestra concentrada de 50 µl representa el 80% de recuperación de proteínas. Si la pérdida de proteínas se redujera en un orden de magnitud de 10 µl a 1 µm, las recuperaciones de la muestra de proteínas podrían incrementarse del 80% al 98%. Una mejora del 18% en la recuperación de la muestra de proteínas podría ser muy valiosa.

- 30 Sería deseable proporcionar un dispositivo y un método que realice de forma eficiente y efectiva una unión y lavado, un intercambio de tampones y concentración, y/o una unión, lavado y elución, intercambio de tampones y concentración completos en un único dispositivo sin la necesidad de transferir mediante pipeteo la apreciada muestra entre dispositivos, en particular para tamaños de muestra de hasta aproximadamente 11 ml.

Resumen

- 35 La presente invención hace referencia a un dispositivo para la preparación de muestras y a un método de preparación de muestras y se define en las reivindicaciones 1 y 13, respectivamente. Se derivan versiones ventajosas de la invención de las reivindicaciones dependientes.

El dispositivo de preparación de muestras de acuerdo con la invención comprende un elemento de depósito y un dispositivo de filtración. Un dispositivo de filtración adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención se muestra en el documento US 2009/0078638 A1.

- 40 Los problemas de la técnica anterior han sido superados por las realizaciones divulgadas en el presente documento, que en ciertas realizaciones incluye un dispositivo de preparación de muestras que permite una unión y lavado, un intercambio de tampones y concentración, y/o realizar un proceso completo de unión, lavado, elución, intercambio de tampones y concentración sin la transferencia de muestras entre múltiples dispositivos. De acuerdo con determinadas realizaciones, se encuentra previsto un dispositivo centrífugo que incluye un depósito que tiene una entrada, una columna para contener medios tales como un lecho de microesferas empaquetadas, una región de soporte para recibir en una relación hermética un dispositivo de filtración, y una salida. De acuerdo con ciertas realizaciones, el dispositivo de filtración incluye un alojamiento con un depósito de muestras, una o más, preferiblemente dos, membranas orientadas de forma sustancialmente vertical (distanciadas cuando más de una se encuentra presente) dispuestas en el alojamiento, un drenaje inferior asociado con cada membrana, de tal manera que el fluido que pasa a través de cada membrana fluya a través de un drenaje inferior respectivo hacia una cámara de recogida del filtrado. El dispositivo de filtración se conecta con la región de soporte del dispositivo centrífugo, y el conjunto puede colocarse en un soporte opcional. El conjunto, con o sin el soporte opcional, puede colocarse en un tubo de centrifuga convencional para su centrifugación. La totalidad de las etapas de unión, lavado, elución, intercambio de tampones y concentración puede realizarse con el aparato sin ninguna transferencia en pipetas (y las

pérdidas de muestra asociadas), lo que da como resultado una superior recuperación de la muestra de interés. El dispositivo de preparación de muestras también puede ser utilizado para las etapas de unión y lavado, en cuyo caso el dispositivo de filtración no es necesario, y para las etapas de intercambio de tampones y concentración, en cuyo caso los medios no son necesarios. Pueden realizarse múltiples intercambios de tampones en el mismo dispositivo.

- 5 De acuerdo con determinadas realizaciones, el dispositivo puede incluir un tubo de alimentación retráctil, de tal manera ayude a reducir la pérdida de soluciones de muestra que se acumulan en el diámetro interior humedecido y en la superficie exterior del tubo de alimentación.

De acuerdo con ciertas realizaciones, se incubaba una muestra con los medios en su lugar en el dispositivo de manera que la diana seleccionada se una a los medios. La muestra restante sin unir puede entonces retirarse mediante lavado. La muestra se purifica mediante elución de la muestra diana de interés de los medios añadiendo un tampón que causa que los medios liberen la diana capturada de nuevo en la solución. Una vez que se purifica una muestra, puede concentrarse a una concentración útil para su análisis o almacenamiento (la mayoría de proteínas son más estables cuando se almacenan a una concentración cercana a 1 mg/ml).

- 10 De acuerdo con determinadas realizaciones, el dispositivo de preparación de muestras puede incluir un elemento de desviación o diafragma que puede accionarse para evacuar pequeñas cantidades (por ejemplo, volúmenes de retención) de muestra del dispositivo.

El dispositivo de preparación de muestras da como resultado ahorros de tiempo totales para la unión y lavado, intercambio de tampones, y/o protocolos de unión, lavado, elución y concentración. No se requiere el pipeteo de muestras, lo que tiene como resultado una mayor recuperación de la muestra. Puede realizarse el intercambio de tampones en un tiempo sustancialmente menor de lo que era posible anteriormente, con una única etapa de centrifugación en centrífuga para cada etapa de intercambio de tampones y lavado, en lugar de las múltiples etapas de centrifugación requeridas anteriormente. No es necesario ningún periodo de incubación para unión.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el interfaz del conjunto entre el dispositivo de filtración y la cámara de intercambio puede permitir un desplazamiento relativo o una separación, como por ejemplo por medios mecánicos tal como un tope físico, o mediante una geometría auto-accionable sujeta al gradiente de presión centrífuga para eliminar el acoplamiento de la punta con la diana capturada para optimizar la recuperación de la muestra.

Las ventajas logradas con los dispositivos y métodos divulgados incluyen, pero no se limitan a, tiempos de incubación reducidos para los procesos de separación por afinidad; una concentración mejorada de la muestra en una plataforma del dispositivo; recuperación de muestra mejorada utilizando dispositivos centrífugos de centrifugación inversa; y diluciones de intercambio de tampones en centrifugación única.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva, en corte transversal, de un elemento de depósito de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 1B es una vista en perspectiva, en corte transversal, de un elemento de depósito que contiene una columna de microesferas pre-empaquetada de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 2 es una vista en despiece de un elemento de depósito y un dispositivo de filtración de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 3 es una vista lateral transversal, con orientación vertical, de un dispositivo de filtración de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 4 es una vista en perspectiva, en corte transversal, de un elemento de depósito y un dispositivo de filtración situado en el mismo de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 5 es una vista en despiece de un elemento de depósito, dispositivo de filtración, soporte de conjunto opcional, tubo de centrifuga y tapa de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 6 es una vista transversal de un conjunto que incluye un elemento de depósito, dispositivo de filtración, soporte del conjunto, tubo de centrifuga y tapa de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 7 es una vista transversal de un conjunto que incluye un elemento de depósito, dispositivo de filtración, soporte del conjunto, tubo de centrifuga y tapa, que muestra la punta del elemento de depósito situada en la región de tope de volumen ("dead-stop") del dispositivo de filtración, de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 8 es una vista transversal de un conjunto que incluye un elemento de depósito, dispositivo de filtración, soporte del conjunto, tubo de centrifuga y tapa, que muestra la punta del elemento de depósito levantada de la región de tope de volumen final del dispositivo de filtración, de acuerdo con ciertas realizaciones;

5 La FIG. 9 es una vista en perspectiva en despiece de un dispositivo de unión, lavado, elución y concentración de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 10 es una vista transversal que muestra el volumen ocupado por el elemento de intercambio en el dispositivo de filtración de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 11 es una vista transversal de un elemento de depósito que tiene una parte con sinuosidades para permitir el desplazamiento axial durante la centrifugación, de acuerdo con ciertas realizaciones;

10 La FIG. 12 es una vista transversal de un elemento de depósito que tiene una parte de pared rebajada para permitir el movimiento axial durante la centrifugación, de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 13 es una vista transversal de un elemento de depósito que tiene una parte de pared rebajada sobre moldeada para permitir el movimiento axial durante la centrifugación, de acuerdo con ciertas realizaciones;

15 La FIG. 14 es una vista esquemática de un elemento de depósito que muestra la ubicación de asperezas moldeadas en la superficie exterior de la columna, y el detalle en despiece muestra una sección transversal de la superficie húmeda y la capa de barrera de gas;

La FIG. 15 es una vista inferior en perspectiva de una tapa de diafragma de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 16 es una vista superior en perspectiva de la tapa de diafragma de la FIG. 15 de acuerdo con ciertas realizaciones;

20 La FIG. 17 es una vista transversal de un elemento de depósito que incluye la tapa de diafragma de la FIG. 15 de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 18 es una vista superior en perspectiva de un elemento de depósito que tiene un reborde modificado para alojar la tapa de diafragma de la FIG. 15 de acuerdo con ciertas realizaciones;

25 La FIG. 19 es una vista transversal de un conjunto que incluye una tapa de diafragma de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 20 es una vista superior en perspectiva de un dispositivo de depósito que muestra una tapa de diafragma fija en una posición abierta;

La FIG. 21 es una vista lateral de un dispositivo de depósito que muestra una tapa de diafragma sujeta en una posición abierta;

30 La FIG. 22 es una vista en despiece de un dispositivo de depósito que incluye un diafragma y un filtro de 15 ml de acuerdo con ciertas realizaciones;

La FIG. 23 es una vista en perspectiva de un dispositivo de depósito de acuerdo con una primera realización alternativa;

35 La FIG. 24 es una vista en perspectiva de un dispositivo de depósito de acuerdo con una segunda realización alternativa;

La FIG. 25 es una vista en perspectiva de un dispositivo de depósito de acuerdo con una tercera realización alternativa;

La FIG. 26 es una gráfica que muestra los volúmenes de retención de dispositivos con y sin diafragmas de acuerdo con ciertas realizaciones; y

40 La FIG. 27 es una gráfica que compara un procedimiento de 3 centrifugaciones para un procedimiento de unión-lavado-elución de acuerdo con ciertas realizaciones.

Descripción detallada de la invención

Volviendo en primer lugar a la Figura 1, se muestra un elemento 12 de depósito de acuerdo con ciertas realizaciones. El elemento 12 se realiza preferiblemente de un material transparente de baja unión de enlace capaz de soportar las fuerzas con las que nos encontramos habitualmente durante la centrifugación. Entre los materiales adecuados se incluyen polipropileno o policarbonato clarificado. En determinadas realizaciones el elemento 12 incluye un depósito 14 de muestras, en general cilíndrico, que tiene una parte superior abierta (entrada), aunque otras formas son adecuadas y se encuentran dentro del alcance de las realizaciones divulgadas en el presente documento. Puede estar previsto un reborde 16 anular superior con un diámetro externo mayor que el diámetro externo del depósito 14 que puede asentarse en la tapa de un tubo de centrifuga (no se muestra en la FIG. 1). El volumen o la capacidad del depósito 14 no están particularmente limitados, y puede elegirse en base al tamaño de la muestra y/o el tamaño del dispositivo de filtración al que el depósito va a ser conectado. Ejemplos de volúmenes incluyen 3 ml y 11 ml. En ciertas realizaciones, la parte inferior del depósito 14 tiene una forma tronco-cónica, que se estrecha hacia abajo (en la dirección del flujo de fluido desde la parte superior abierta) y radialmente hacia el interior, convergiendo en una abertura central que conduce a una columna 18 de menor diámetro que la del depósito 14. La parte superior de la columna 18 tiene un diámetro y una longitud elegida para contener una cantidad de medios 30 suficiente para realizar una etapa de unión, y se posiciona, por tanto, aguas abajo, en la dirección de flujo de la muestra durante una operación de unión, del depósito 14 de muestras. En realizaciones en las que no se desea ninguna unión (por ejemplo, un protocolo de intercambio de tampones y concentración), los medios pueden eliminarse de la columna 18. Preferiblemente, el diámetro y la longitud de la columna son suficientes para contener al menos 200 microlitros de microesferas, creando un lecho empaquetado. Un ejemplo de diámetro es de aproximadamente $\frac{1}{4}$ pulgada, con una longitud de $\frac{1}{2}$ pulgada o más. Cuando se utilizan medios, puede colocarse una estructura de retención de medios tal como una frita 31 porosa, debajo de los medios 20 para contener dichos medios en su lugar, en el caso de una columna pre-empaquetada sería necesario una estructura 31a de retención adicional situada por encima de los medios para contener dichos medios dentro del diámetro de la columna (FIG. 1B). La columna 18 puede incluir un reborde 19 anular, que proporciona un soporte o tope contra el cual se posiciona el dispositivo 50 de filtración durante su uso (por ejemplo, con una junta 40 de estanqueidad interpuesta (FIG. 2), proporcionando una interfaz de hermética a líquidos entre el dispositivo 50 de filtración y el elemento 12). Bajo el reborde 19 anular, la columna tiene una región 20 de soporte de diámetro intermedio, que se recibe en la parte superior del depósito de muestra del dispositivo de filtración cuando se posiciona en la columna durante su uso. La región 20 tiene un diámetro externo menor que el diámetro externo del reborde 19 anular. Una parte 21 de diámetro disminuida adicionalmente aguas abajo, con un diámetro externo menor que el diámetro externo de la región 20, se asienta en una región inferior de la parte de depósito de muestras del dispositivo de filtración, por encima de las membranas, cuando están posicionadas en la columna durante el uso.

La región 22 de la columna 18 tiene una geometría de aletas, que se estrecha radialmente desde una parte 22a superior relativamente gruesa hasta una parte 22b inferior relativamente delgada, y define una cámara de unión/elución. En la parte 22b más delgada, la columna se estrecha radialmente hacia el interior en 22c, convergiendo en un vástago 23, preferiblemente situado en una zona central, que tiene un extremo 24 inferior abierto, extendiéndose el vástago axialmente desde la columna con forma de aleta. La configuración en aleta está conformada para ajustarse en el interior del dispositivo 50 de filtración coincidente, con el interior ahuecado para mantener un grosor de pared uniforme. De acuerdo con ciertas realizaciones, la configuración en aleta permite que la región 22 de la columna 18 ocupe sustancialmente la totalidad del volumen entre las membranas 12A y 12B del dispositivo 50 de filtración, manteniendo de este modo el volumen de muestra deseado cerca del extremo 24 inferior abierto. Preferiblemente, el vástago es cilíndrico y se estrecha radialmente hacia el interior hacia el extremo 24 inferior abierto. El extremo 24 inferior abierto permite la relación fluido comunicante entre el depósito 14 (a través de cualquier medio y frita presente, y a través de la región 22 (cámara de unión/elución)) y un dispositivo aguas abajo tal como un tubo o un dispositivo de filtración.

De acuerdo con ciertas realizaciones, los medios pueden ser medios de cromatografía, tales como medios utilizados para capturar analitos seleccionados en una muestra y liberarlos cuando las condiciones del tampón sean cambiadas de forma apropiada. Los medios adecuados incluyen microesferas que se unen a quelato de metal, proteína A, glutatión, albúmina, etc. Los medios pueden ser magnéticos, no magnéticos, agarosa, etc., y pueden modificarse con ciertos análisis químicos tales como IMAC, proteína A, glutatión, estreptavidina, etc. Por consiguiente, los medios pueden incluir químicas adecuadas para efectuar la unión deseada.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la parte inferior en forma de aleta y la columna pueden formar una única configuración desmontable que puede acoplarse al depósito 14 por ejemplo mediante ajuste a presión, ajuste de tipo Luer, atornillado, etc. La configuración desmontable reduce la cantidad de desechos plásticos y el coste de los elementos desechables, ya que la parte de depósito puede ser lavable y reutilizable. Un ejemplo de dispositivo en el que la columna 18 es extraíble se muestra en la FIG. 23. Aunque puede utilizarse cualquier mecanismo de conexión adecuado para conectar la columna 18 al depósito 14, la FIG. 23 muestra una realización en la que la columna 18 incluye una parte 118 roscada que se recibe de forma roscada en la parte 144 inferior del depósito 14 que contiene ranuras 145 internas que coinciden con las roscas en la parte 118 roscada. La parte 114 inferior es preferiblemente cilíndrica y circunscribe la boquilla 146 de descarga que se encuentra en relación fluido comunicante con el depósito 14. La capacidad de ser extraíble de la columna 18 permite la flexibilidad a la hora de utilizar diferentes columnas 18 con el mismo depósito 14. Las FIGS. 24 y 25 muestran realizaciones similares en las que múltiples columnas

pueden ser acopladas al depósito. Por ejemplo, el depósito 14' en la realización de la FIG. 24 tiene dos salidas, y dos columnas 18A y 18 B extraíbles pueden acoplarse, cada una de ellas, a una salida respectiva. De forma similar, el depósito 14" en la realización de la FIG. 25 tiene cuatro salidas, y cuatro columnas extraíbles 18A, 18B, 18C, y 18D pueden ser acopladas, cada una de ellas a una respectiva salida.

- 5 La FIG. 2 es una vista en despiece del elemento 12 y el dispositivo 50 de filtración, con el dispositivo 50 de filtración que se muestra orientado para ser recibido por la columna 18 del elemento 12. En vista de la configuración plana y cónica de la región 22 de la columna 18, y en vista de la simetría del dispositivo 50 de filtración, el dispositivo 50 de filtración puede ajustarse únicamente en la columna 18 en una de dos maneras; la que se muestra en la FIG. 2, y la que está girada 180° desde la misma. En la realización que se muestra, una junta 40 de estanqueidad se utiliza para proporcionar una junta estanca a líquidos entre el dispositivo 50 de filtración y el elemento 12. Puede utilizarse otro mecanismo de sellado, tal como juntas tóricas o juntas sobre-moldeadas conformadas a medida que incluyen juntas de superficie, juntas de peine flexibles, etc. Tales juntas sobre-moldeadas pueden moldearse de forma integral.

Volviendo ahora a la FIG. 2, se muestra un dispositivo 50 de filtración adecuado para su uso de acuerdo con ciertas realizaciones. El dispositivo 50 de filtración es el que se describe en la Publicación de EE.UU. No. 2009/0078638.

- 15 El dispositivo 50 incluye un depósito 11 de muestras para recibir una muestra sin filtrar, y una primera y una segunda membranas 12A y 12B dispuestas cada una en una pared lateral del dispositivo 50 como se muestra. Se encuentra prevista una cámara 13 de retenido que define un tope de volumen por debajo de las membranas 12A y 12B. Una punta 30 de recogida que tiene en general forma de arco y sobresale hacia afuera desde el perímetro inferior del dispositivo, puede estar prevista para localizar el tope de volumen en la línea central del dispositivo, y posteriormente reducir la variabilidad del tope de volumen a medida que el ángulo de orientación en una centrífuga cambia. Preferiblemente, el dispositivo 50 está realizado de un material sólido que es impermeable a los líquidos, tiene baja características de unión a proteínas, y es suficientemente fuerte para soportar las fuerzas gravitacionales (Gs) aplicadas durante la centrifugación. Entre los materiales adecuados se incluyen acrílicos, resina CYROLITE G20 HiFlo, resina ESTAR HN631 y polímeros KRATON. Los paneles laterales en particular pueden estar compuestos por material de plástico transparente que permite que un operario o usuario vea en la cavidad interior del dispositivo para determinar los niveles de fluido antes y después del procedimiento de filtración. Cada uno de los paneles laterales incluye un soporte de drenaje inferior que soporta la membrana y proporciona una relación fluido-comunicante con la cámara 13 de retenido. Por ejemplo, el soporte de drenaje inferior puede incluir una serie de ranuras longitudinales distanciadas, canales, o texturas superficiales que está situadas debajo de la membrana para capturar el filtrado a medida que pasa a través de la membrana y dirigirlo hacia los orificios de drenaje y hacia el interior de un vial receptor. Cada membrana se encuentra sellada a un panel lateral respectivo, de manera que únicamente el fluido que pasa a través de la membrana puede salir de los orificios de drenaje del dispositivo situado en los paneles laterales. En ciertas realizaciones, cada membrana 12A, 12B tiene la misma extensión que un respectivo soporte de drenaje inferior y se encuentra sellado al mismo. La geometría del drenaje inferior está destinada a soportar la membrana y mantenerla tan plana como sea posible, a la vez que permite el suficiente espacio abierto bajo la membrana para permitir que el fluido fluya y pase a través de los orificios 18 de drenaje del dispositivo. Se prefiere que la resistencia del fluido hidráulico se mantenga tan baja como sea posible.

- Entre las membranas adecuadas se incluyen membranas microporosas y ultraporosas, la última siendo de utilidad para la ultrafiltración. Las membranas de ultrafiltración de celulosa regeneradas (por ejemplo, las membranas "Ultracel Amicon YM" y "Ultracel PL" disponibles de Millipore Corporation de Bedford, Mass.) son muy adecuadas para dispositivos dirigidos a concentrar o desalinizar líquidos de muestra extremadamente diluidos o hidrófobos. El uso de una membrana hidrófoba que presenta una microestructura "prieta" promueve una buena retención con baja adsorción de proteínas, ADN y otras macromoléculas. Las membranas de ultrafiltración de polietersulfona (por ejemplo, "Amicon PM" y "Biomax PB" también disponibles de Millipore Corporation), u otra membrana similar que presente una microestructura "abierta" adecuada para la separación rápida, son más adecuadas para dispositivos dirigidos a concentrar y desalinizar líquidos de muestra más concentrados, tales como suero, plasma y cultivo tisular acondicionado.

- Preferiblemente, cada membrana 12A, 12B está orientada en un ligero ángulo con respecto a la línea central longitudinal del dispositivo 10, de tal manera que la parte superior de cada membrana está separada de la línea central longitudinal una distancia mayor que la parte inferior de la membrana. Se forma una configuración con forma de embudo. Por tanto, la colocación de cada membrana se beneficia de los efectos del flujo tangencial durante la centrifugación. Se ha observado que es adecuado un ángulo mayor que aproximadamente 0° y menor que aproximadamente 5°, preferiblemente de aproximadamente 3°.

- Cada uno de los paneles laterales incluye uno o más orificios 18 de drenaje (FIG. 2) que se encuentran en relación fluido-comunicante con la cámara 13 de retenido y que permite que el filtrado pase a través del alojamiento del dispositivo para su recogida en otro alojamiento. Cada orificio 18 de drenaje se sitúa preferiblemente en la parte inferior de una respectiva ranura o canal de drenaje inferior y es preferiblemente sustancialmente circular en su sección transversal. Los orificios de drenaje deberían ser situados a una distancia suficiente de los bordes lateral de los paneles, de manera que los orificios no están limitados o alterados de forma perjudicial de otro modo durante una

operación de termosellado que puede ser utilizada durante la fabricación del dispositivo. Preferiblemente, los orificios 18 de drenaje se encuentran separados a distancias iguales entre sí y son co-lineales.

La FIG. 4 muestra el elemento 12 con un dispositivo 50 de filtración situado en su lugar en la columna 18 del elemento 12 de acuerdo con ciertas realizaciones. Puede verse que la junta 40 de estanqueidad proporciona una interfaz de sellado entre el dispositivo 50 de filtración y el reborde 19 de la columna 18. Preferiblemente, el vástago 23 del elemento 12 está posicionado para que esté dentro del tope de volumen del dispositivo 50 de filtración, tal como se discute en mayor detalle a continuación.

Tal como se ve en la FIG. 5, de acuerdo con ciertas realizaciones, puede estar previsto un soporte 60 del conjunto opcional en el que mantener el elemento 12 acoplado al dispositivo 50 de filtración es una preocupación bajo las fuerzas centrífugas aplicadas a dicho conjunto. En determinadas realizaciones, el soporte 60 puede estar realizado del mismo material que el elemento 12, e incluye un manguito 62 de retención superior cilíndrico configurado para recibir el depósito 14 del elemento 12. Un reborde 6 anular superior que se extiende radialmente hacia el exterior proporciona un asiento para el reborde 16 anular del elemento 12. De acuerdo con ciertas realizaciones, la parte 63 inferior del manguito 62 de retención tiene una forma tronco-cónica para recibir la parte inferior con una forma similar del depósito 14. Una abertura situada en la zona central en la parte 63 inferior conduce a una columna 64 cilíndrica que se extiende axialmente que presenta un diámetro interior. El diámetro interior tiene una forma adecuada para recibir el dispositivo 50 de filtración, de tal manera que una parte inferior del dispositivo 50 de filtración sobresale axialmente por fuera del diámetro interior (FIG. 6).

Para ensamblar los componentes tal como por ejemplo para la centrifugación, el dispositivo 50 de filtración puede introducirse en la columna 18 del elemento 12, y a continuación puede introducirse en el soporte 60. La combinación se coloca a continuación en un tubo 70 de centrifuga convencional (por ejemplo, de 15 o 50 ml), que presenta un diámetro exterior de tal manera que el reborde 61 se asienta sobre la superficie superior del tubo 70 (FIG. 6). La tapa 72 puede entonces enroscarse en el tubo o conectarse de otro modo para asegurar el conjunto en el tubo. Cuando el soporte 60 opcional se omite, el reborde 16 del elemento 12 se asienta en la superficie superior del tubo 70.

Para la mayoría de los protocolos de inmunoprecipitación (IP), las etapas de unión y lavado pueden realizarse con el dispositivo de filtración desmontado de la columna 22. El dispositivo de filtración puede entonces acoplarse a la columna 22 y las proteínas eluirse directamente del dispositivo mediante centrifugación. Para la depleción en la que la fracción no unida es la muestra de interés, el dispositivo de filtración puede dejarse acoplado a la columna 22 desde el principio del proceso.

En ciertas realizaciones, la columna 30 de medios concentra los medios, preferiblemente microesferas, en una columna, muy similar a una columna de cromatografía. Esto crea un lecho empaquetado en el que el fluido es impulsado a través del lecho en una forma que aumenta la probabilidad de interacción entre las fases móviles (flujo) y estacionarias (medios). Esto conduce a una unión, lavado y elución más eficiente. De hecho, el número de cada una de las etapas de lavado y elución puede reducirse de tres a una, con un tiempo mínimo o ninguno de unión (incubación) requerido. La proteína recuperada muestra un incremento de actividad cuando únicamente se utiliza una única etapa de concentración. Cuando es deseable la unión (incubación), la frita 31 es preferiblemente una frita hidrófoba, que inhibe el flujo de la muestra a través de la frita, permitiendo de este modo tiempos de incubación prolongados hasta que se centrifuga para iniciar el flujo. Por ejemplo, las fritas que comprenden material hidrófobo permiten la incubación de agarosa en soluciones de microesferas magnéticas sin goteo, y cuando se someten a fuerzas G centrífugas entre aproximadamente 100 y aproximadamente 700 G, permiten el paso del filtrado al interior del tubo receptor. Entre los materiales adecuados se incluyen cubiertas de polipropileno sinterizado realizado por Porex Corporation, y un polipropileno extruido en forma de filamentos realizado por Filtrona Corporation que ha sido tratado con un revestimiento de superficie tal como un tratamiento por plasma fluorado. Cuando no se desea ninguna unión, tal como para el intercambio de tampones y concentración, los medios pueden omitirse del conjunto. La frita (estructura de retención de medios) también puede omitirse, pero debido a que no interfiere con el intercambio de tampones, puede dejarse en el dispositivo si se desea.

La parte inferior en forma de aleta de la columna 22 permite que una solución tampón fresca sea intercambiada de forma más eficiente que en los métodos convencionales. Aunque los presentes inventores no están sujetos por ninguna teoría, se cree que su funcionamiento está basado en un principio de diafiltración. La geometría coincidente entre la columna de intercambio y el dispositivo de filtración optimiza el flujo de tampón fresco a través del sistema. De acuerdo con ciertas realizaciones, preferiblemente la geometría en forma de aleta rellena la mayor parte del espacio de la cavidad no utilizado en el interior del dispositivo de filtración y mantiene el volumen de la muestra cerca del orificio 24 de salida. Debido a que el tampón fresco en el interior de la columna 22 y la muestra en el interior del dispositivo de filtración se encuentran en equilibrio estático durante la centrifugación, a medida que la altura de la parte superior del tampón fresco disminuye, el volumen de la muestra que sale del sistema en cualquier momento dado es pequeño, mientras que hay una gran cantidad de tampón fresco que se descarga. Esto conduce a una alta eficiencia. Como puede verse en la FIG. 10, la el espacio de desviación "A" entre la superficie de la membrana 12A enfrentada a la aleta (y entre la superficie de la membrana 12B enfrentada a la aleta) es mayor que

la desviación "B" entre la superficie de la superficie enfrentada a la aleta del dispositivo de filtración cuando no se encuentra ninguna membrana presente (por ejemplo, en 81A y 81B), de manera que la aleta no obstruya las partes de la membrana que podrían bloquear el flujo a través de la membrana. En una realización, la desviación "A" entre la superficie de la aleta enfrentada a cada membrana es de aproximadamente 0,005 pulgadas a aproximadamente 0,02 pulgadas, preferiblemente 0,020 pulgadas. La desviación "B" entre la superficie de cada aleta enfrentada a la superficie del dispositivo de filtración cuando no se encuentra presente ninguna membrana se encuentra entre aproximadamente 0,020 pulgadas y aproximadamente 0,005 pulgadas, preferiblemente aproximadamente 0,005 pulgadas. De forma óptima, la cantidad de volumen de muestra se minimiza (para optimizar la tasa de intercambio) a la vez que se optimizan las características de flujo de la membrana. La geometría de la aleta ayuda a localizar el fluido entre el área activa de las membranas y la aleta, y minimiza la cantidad de fluido entre regiones de membrana inactivas y la aleta.

Además, posicionando el vástago 23 en el tope del dispositivo de filtración, se mejora el mezclado, se evita la agregación inducida por desnaturalización, y se evita el secado de proteínas ya que siempre hay disponible tampón fresco a través de la columna de intercambio de tampones. Se logra un mezclado más eficiente de las soluciones tampón debido a que se forma un volumen de control en el espacio fluido del tope de volumen. Dentro de este volumen de control existe un sistema de flujo estacionario. La solución tampón del depósito 14 se introduce, y la solución mezclada sale a través de los orificios 18 de drenaje. Dentro del volumen de control el flujo de solución tampón que sale de la punta 23 crea y mantiene un flujo de mezclado de tipo vórtice. Es este flujo de vórtice lo que crea un mezclado más eficiente de las soluciones tampón y los fluidos de muestras. Como puede verse en la FIG. 7, se logra un intercambio de tampones óptimo y eficiente cuando la punta 23 del dispositivo de intercambio se sumerge casi hasta el fondo (sin entrar en contacto con la superficie inferior que podría bloquear el orificio de salida y obstruir el flujo de salida) del compartimento del volumen de muestra del dispositivo 50 de filtración durante la centrifugación.

De acuerdo con ciertas realizaciones, hay un beneficio adicional a la hora de poder proporcionar un desplazamiento relativo entre la punta 23 y el dispositivo 50 de filtración, tal como por ejemplo elevando la punta 23 del dispositivo de intercambio para que salga de la muestra durante la centrifugación una vez que se ha logrado el intercambio de tampones, tal como se muestra en la FIG. 8. Eso reduce la potencial pérdida de muestra debido a que la muestra se adhiere a las superficies exterior e interior de la punta debido a la tensión superficial de los materiales. El desplazamiento relativo entre la punta y el dispositivo de filtración podría lograrse por medios mecánicos tales como un tope físico o mediante una geometría auto-accionable sujeta al gradiente de presión centrífuga para retirar el acoplamiento de la punta con la diana para optimizar la recogida de la muestra.

Incluir un diseño de punta retráctil, tal como el que se muestra en la FIG. 11 ayuda a reducir la pérdida de las soluciones de la muestra que se acumulan en el diámetro interno humedecido y en la superficie exterior de la punta. Inicialmente, una solución de proteínas concentrada ya está situada en la parte inferior del dispositivo 50 de filtración. Las soluciones de intercambio de tampones se añaden al depósito 14 y se dejan pasar a través del material de frit y hacia el interior del dispositivo de filtración. Durante las operaciones de giro centrífugo, la solución de intercambio de tampones se encuentra ahora en el dispositivo 50 de filtración donde tiene lugar la mezcla. Esta mezcla permite que la muestra de proteínas con concentración de sal se diluya mediante la solución de intercambio de tampones. Cuando la centrifugación se haya completado, el extremo de la punta 23 puede aún extenderse en el volumen de muestra concentrado. La pequeña cantidad de muestra que se infiltra en el diámetro interno del extremo distal de la punta y también recubre la superficie de la pared exterior de la punta puede ascender a 5 o 6 ml. Dicho comportamiento de mezclado de mayor éxito tiene lugar debido a que el extremo distal de la punta se sumerge en el volumen de muestra concentrado.

Una opción es realizar una operación de centrifugado secundario para mover esta pérdida de solución de 5 a 6 ml. Esto puede implicar detener la centrifuga y utilizar un mantenimiento mecánico para elevar todo el depósito para sacarlo del volumen de muestra en una distancia de 0,100 pulgadas. Sin embargo, utilizar un centrifugado secundario no es deseable.

En contraste, un diseño de punta retráctil tal como el que se muestra en las FIGS. 11-13 permite que las puntas sean introducidas en el volumen de muestra debido a las fuerzas G cuando la centrifuga aumente hasta la velocidad de centrifugación, y que se extraigan elásticamente del volumen de muestra cuando la centrifuga desacelere hasta llegar a velocidad cero. Las fuerzas G tiran de la punta 23 hacia el fondo del volumen de muestra del dispositivo 50 de filtración, y promueven el comportamiento de mezclado más efectivo que se necesita para lograr la dilución más efectiva de la solución tampón en una única operación de centrifugado. Después de que toda la solución de intercambio de tampones haya pasado a través del dispositivo, la presión hidrostática reducida y la fuerza G reducida durante la desaceleración del centrifugado causa que la punta 23 salga del volumen de muestra. La punta extraída permite que cualquier fluido residual en el diámetro interno de la punta y la superficie externa de la punta sea retirado.

La Figura 11 ejemplifica cómo un depósito 14 de una única pieza y la punta 23 pueden configurarse para tener una longitud reducida previamente al centrifugado, y un incremento de la longitud durante el centrifugado, de acuerdo

con ciertas realizaciones. La elongación podría lograrse mediante moldeo o conformando de otro modo una o más, por ejemplo, de una a cinco (se muestran tres) sinuosidades 90 en una parte de pared rebajada de un material elastomérico que define la columna 22, para logra una configuración de tipo acordeón. Un material adecuado es silicona moldeada por inyección, que puede alargarse tanto como del 50% al 200% sin ruptura. Otros materiales adecuados pueden incluir poliuretanos y otros elastómeros termoplásticos, y deberían presentar un bajo rendimiento de unión de proteínas no específicas.

Si se requiere mayor rigidez en la parte de depósito del dispositivo, pueden sobremoldearse sinuosidades 90 elastoméricas en el extremo de un depósito pre-moldeado realizado de polipropileno o un material equivalente.

La Figura 12 muestra un ejemplo de un diseño más sencillo en el que la columna 22 incluye una parte 91 de pared rebajada y recta. Las múltiples sinuosidades han sido eliminadas de esta realización. La pared más delgada permite que las fuerzas G extiendan la longitud axial de la columna 22 durante la centrifugación. Los grosores de pared delgada adecuados incluyen entre aproximadamente 0,015 a aproximadamente 0,040 pulgadas.

La Figura 13 muestra un ejemplo de un diseño sobre-moldeado. El depósito sombreado es pre-moldeado. La columna 22 es sobremoldeada en el depósito utilizando un material elastomérico transparente o virtualmente transparente, tal como silicona moldeada por inyección de líquido, elastómero termoplástico o un material equivalente. Los materiales adecuados deberían presentar un rendimiento de unión de proteínas no específicas que no comprometa la recuperación de las proteínas de interés de la muestra.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la reducción del volumen de retención de la muestra puede ser mejorado adicionalmente reduciendo el área superficial humedecida disponible de la superficie externa de la columna 22 del tubo de alimentación y/o la punta 23, tal como por ejemplo incluyendo una superficie rugosa y con más textura superficial en la superficie exterior de la columna y/o punta. Esta textura superficial puede consistir en asperezas (pequeñas protuberancias) que son al menos aproximadamente de 10 μ en diámetro y de aproximadamente 10 μ de alto. Estas asperezas superficiales pueden ser moldeadas en un dispositivo utilizando un material de baja energía superficial, tal como polipropileno, polietileno, PTFE o equivalente. Estas asperezas crean una topografía superficial que reduce significativamente la humectación superficial de la superficie del dispositivo. Únicamente los puntos más altos de las asperezas son humedecidos por el flujo de fluidos y entran en contacto con el fluido de muestra. Los valles o depresiones permanecen sin humedecerse y cubiertos por una fina capa de barrera de gas, que en este caso sería habitualmente aire. Esto reduce significativamente las pérdidas de muestra debido al comportamiento de humectación (comportamiento hidrófobo). Esto también reduce significativamente la oportunidad de pérdidas que puedan ocurrir debido a la unión de proteínas no específicas de los fluidos de muestra. La combinación de material de baja energía superficial y la geometría superficial con asperezas crea lo que se conoce como el efecto loto, que ayuda a reducir las pérdidas de muestra asociadas con la retención superficial de fluidos, y la unión no deseada de fracciones de proteínas de alto interés poco abundantes.

En casos en los que moldear las asperezas superficiales en un dispositivo pueda resultar muy difícil o no sea factible, las mismas superficies 22 y 23 podrían revestirse con una emulsión de disolvente de silicio para minimizar la energía superficial del dispositivo, o podrían ser tratadas con plasma.

Cuando se desea una maximización adicional de la recuperación de la muestra (particularmente con soluciones de muestra de alto valor), minimizar las pérdidas de muestra debido a volúmenes de retención y a la unión de proteínas no específicas resulta imperativo. A medida que los volúmenes de muestras de proteínas se vuelven más pequeños, las pérdidas no deseadas de muestras debido a la retención dentro del dispositivo tienen mayor importancia. De acuerdo con ciertas realizaciones, una tapa de diafragma que tiene un elemento de desviación o un diafragma puede incluirse en el dispositivo para rescatar la pérdida de soluciones de muestra que se acumula, tal como por ejemplo en el diámetro interior húmedo del tubo de alimentación. Por ejemplo, tras completar la centrifugación, pequeñas cantidades de muestra pueden filtrarse en el diámetro interior del extremo distal del tubo de alimentación. Esta pequeña cantidad de muestra o volumen de retención puede ascender a 5 o 10 μ l. Parte o todo este volumen de retención puede ser evacuado del diámetro interior del dispositivo accionando el elemento de desviación para crear presión en el dispositivo y forzar parte o todo el volumen de retención a ser extraído del dispositivo.

Las FIGS. 15 y 16 muestran una tapa 300 de diafragma que en ciertas realizaciones puede fijarse, preferiblemente de forma articulada, al elemento 12 de depósito. Preferiblemente, la tapa 300 de diafragma no interfiere con la tapa 72 del dispositivo. En ciertas realizaciones, la tapa 300 del diafragma incluye un perímetro 301 y una región 302 de desviación situada radialmente hacia el interior desde el perímetro 301. La región 302 de desviación está disminuida desde el perímetro 301 a través del soporte 303, e incluye una abertura 320 que permite escapar el aire. En ciertas realizaciones, la tapa 300 del diafragma es generalmente circular, con el perímetro 301 que es un anillo anular, y la región de desviación siendo también circular y presentando un diámetro correspondiente al diámetro interior de la entrada (por ejemplo, en la ubicación del reborde 16) del depósito 14 de muestra del elemento 12. De manera que dimensionar la región 302 de desviación permite que el borde del perímetro exterior de la región 302 de desviación se acople de forma hermética con la pared interna del elemento 12 como puede verse en la FIG. 17.

En ciertas realizaciones, la superficie superior del reborde 16 del elemento 12 de depósito incluye una parte 305 receptora de la tapa, tal como se muestra en la FIG. 18. La parte receptora de la tapa se encuentra ligeramente rebajada axialmente desde el resto de la superficie superior del reborde 16, e incluye un botón 306 que se extiende hacia arriba sobrepasando el resto de la superficie superior del reborde 16. El botón 306 corresponde en su forma a una abertura 307 en el perímetro 301 de la tapa 300, cuya abertura 307 se forma en una parte 308 del perímetro que está axialmente ligeramente rebajada (en la altura de los soportes 311, 312) desde el resto del perímetro 301 (FIG. 16). Una segunda abertura 313 se define radialmente hacia el interior desde la parte 308 del perímetro, tal como se muestra en las FIGS. 16 y 17. En ciertas realizaciones, la superficie 316 superior del botón 306 es más ancha que el ancho de la abertura 307 (se observa mejor en las FIGS. 19 y 21), inhibiendo de ese modo la tapa 300 de su desalojo no intencionado del elemento 12 de depósito.

El reborde 16 también incluye una región 307 rebajada radialmente que está formada y posicionada para cooperar con una lengüeta 309 en la tapa 300 del diafragma que permite que la tapa 300 se cierre a presión en el elemento 12. De este modo, cuando la tapa 300 del diafragma está en posición cerrada tal como se muestra en la FIG. 17, la lengüeta 309 que se extiende axialmente se posiciona en la región 307 rebajada del reborde 16. En ciertas realizaciones, la región 307 radialmente rebajada se posiciona opuesta a la parte 305 receptora de la tapa, y la lengüeta 309 que se extiende axialmente se posiciona de forma similar opuesta a la parte 308 del perímetro. La lengüeta 309 y la región 307 rebajada cooperan para permitir la manipulación con una sola mano de la tapa del diafragma. Por ejemplo, el usuario puede desplazar la tapa del diafragma desde su posición cerrada a su posición abierta, mientras sujeta el dispositivo simplemente colocando la parte superior de su dedo pulgar bajo el extremo libre inferior de la tapa y levantándola hacia arriba hasta que queda liberada de la región 307 rebajada.

Las FIGS. 20 y 21 ilustran la tapa 20 del diafragma en su posición abierta. En la posición abierta, la tapa 300 del diafragma permanece acoplada al reborde 16 a través del botón 306. La abertura 313 define un eje radial alrededor del cual la tapa 300 puede pivotar entre la posición abierta y la posición cerrada, definiendo de este modo una bisagra integral. La FIG. 22 muestra una vista en despiece de una realización que incluye un filtro más grande, tal como un filtro 50' de 15 ml. En la realización que se muestra, no se utiliza un soporte del conjunto, aunque uno podría estar presente.

El elemento de desviación o diafragma 302 está realizado de un material flexible deformable, y por tanto puede ser desviado axialmente fácilmente, tal como por ejemplo por el dedo índice del usuario, cuando la tapa del diafragma está en su lugar en su posición cerrada. El elemento 302 de accionamiento crea, de esta manera, una fuerza dentro del dispositivo que evacúa el fluido de retención en la cavidad interna del tubo de alimentación y el tubo distal y de este modo reduce o elimina el volumen de retención.

La tapa 300 del diafragma permite la centrifugación del conjunto del dispositivo con o sin la tapa 70 roscada en su lugar.

El diafragma o elemento de desviación puede ser elastomérico o termo-conformado.

Ejemplo 1 – Depleción de afinidad

En este protocolo, los principales contaminantes de la muestra se unen selectivamente a los medios mientras que los componentes de interés permanecen en solución. Tras completar la etapa de unión, la solución se recoge para un análisis adicional.

Las microesferas que se unen tanto a la albúmina como al IgG se añaden al dispositivo (por ejemplo, FIG. 9) de unión, lavado, elución y concentrado (BWEAC, siglas del inglés "bind, wash, elute, concentrate") completamente ensamblado. Una muestra de suero se añade a continuación y se deja que interactúe con las microesferas que se retiran a continuación selectivamente de la albúmina y del IgG de la muestra, adsorbiéndolos sobre la superficie de las microesferas mediante la interacción con anticuerpo anti-albúmina inmovilizado y proteína A inmovilizada. Después de la etapa de incubación, las microesferas se separan de los componentes no unidos en el líquido mediante centrifugación. Las microesferas son contenidas por la frita en el dispositivo BWEAC mientras que la solución que contiene los analitos y biomarcadores de interés pasa hacia la cámara que se encuentra debajo. Esa cámara puede simplemente ser el tubo de ensayo o puede ser un dispositivo de filtración tal como una unidad de filtración centrífuga Amicon Ultra-0.5, que proporciona el beneficio de que los biomarcadores de proteínas en la muestra pueden concentrarse en la misma etapa centrífuga que la de retirada de las microesferas. Esto es especialmente significativo para la depleción de afinidad, ya que las muestras de suero requieren habitualmente una dilución de 10 veces previa a la incubación de microesferas debido a que la albúmina y la IgG que van a ser retiradas se encuentran a una concentración muy alta y necesitan entrar en contacto con un gran volumen de microesferas para efectuar la retirada completa. Una vez que las proteínas abundantes se retiran de las muestras diluidas, las dianas restantes de interés necesitan habitualmente concentrarse. Por tanto el acoplamiento de las etapas de retirada/separación de microesferas y concentración de muestra reduce la manipulación requerida en el flujo de trabajo.

Ejemplo 2 – Purificación por afinidad

Se expone en el presente documento un ejemplo habitual de cómo se utilizan microesferas de afinidad para purificar un analito de interés. En este caso, las microesferas se utilizan para unirse de forma selectiva a la diana, los contaminantes se retiran mediante lavado y a continuación el analito de interés es eluido de las microesferas cambiando el sistema de tampones.

Las microesferas de cromatografía de afinidad con metal Inmovilizado (IMAC), que están cargadas con cobre, se cargan en el dispositivo BWEC junto con una muestra que contiene una proteína de fusión enlazada a la etiqueta de purificación por afinidad 6X His. Es la etiqueta 6X His que se sabe que se une a las microesferas de IMAC cargadas con cobre (también conocidas como microesferas con etiqueta his). Una vez que se completa la unión, el dispositivo es centrifugado para retirar los contaminantes que permanecen en solución mientras que las microesferas son retenidas por la frita en el dispositivo. Las microesferas pueden lavarse con un tampón de carga adicional para obtener una purificación más limpia. Sin embargo, la separación y lavado iniciales se realizan sin el dispositivo de filtración (por ejemplo, sin un dispositivo Amicon Ultra-0,5 ml) y la solución y los lavados no unidos se recogen como desechos en el fondo del tubo de centrifuga. Una vez que se completan los lavados, el dispositivo de filtración (por ejemplo, un dispositivo Amicon Ultra-0.5) se acopla a la salida del dispositivo BWEC y se añade un tampón de elución que disocia la diana de las microesferas. La diana purificada se recoge a continuación y se concentra en el dispositivo de filtración en un único centrifugado sin requerir etapas de transferencia adicionales.

Ejemplo 3 – Intercambio de tampones

Los ejemplos 1 y 2 solo se aprovechan de la funcionalidad de manipulación de microesferas del dispositivo BWEC. Se describe a continuación la capacidad de intercambio de tampones. Los dispositivos de ultrafiltración se han utilizado durante mucho tiempo para el intercambio de tampones. Esto se logra simplemente concentrando la muestra (por ejemplo, 10 veces desde μl hasta 50 μl) y a continuación diluyendo con el nuevo tampón de nuevo hasta su volumen original. En una única etapa esto daría lugar a aproximadamente un intercambio de tampones de 10 veces o 90%. Esto es habitualmente insuficiente con unos valores óptimos en el orden de un intercambio de tampones del 99%, lo que requeriría tres centrifugados individuales con un dispositivo habitual de ultrafiltración, tal como el dispositivo Amicon Ultra-0.5. Además, si se fuera simplemente a diluir la muestra con el volumen completo, 1,5 ml en este ejemplo, en un único centrifugado, no sería tan efectivo (96,7%) como tres centrifugados a 0,5 ml cada uno (99,9%). Aunque un 96,7% puede parecer que está cerca del 99,9%, hay de hecho 33 veces más de tampón restante en la muestra que fue intercambiada al 96,7%. La clave para un único centrifugado con éxito es dosificar el nuevo tampón en la muestra lentamente con mezclado en lugar de una única gran dilución.

Una muestra de proteína/ADN que contiene azida o algún otro tampón o sal no deseable, se añade en primer lugar al dispositivo completamente ensamblado (BWEC, más el dispositivo de filtración, por ejemplo, un Amicon Ultra-0.5). A continuación se centrifuga y se concentra a 50 μl . A continuación, se añade 1,5 ml del nuevo tampón al dispositivo y se centrifuga nuevamente. El dispositivo dosifica lentamente el nuevo tampón en la muestra y descarga el antiguo tampón no deseado, dejando la muestra concentrada en el nuevo tampón.

Ejemplo 4 – Combinación de Purificación por afinidad con Intercambio de tampones

Cuando una muestra purificada por afinidad o empobrecida también requiere intercambio de tampones además de la concentración, esto puede lograrse simplemente combinando las etapas de purificación con intercambio de tampones.

Las microesferas de IMAC se cargan en el dispositivo BWEC junto con una muestra que contiene una proteína de fusión enlazada a la etiqueta 6X His. Una vez que se completa la unión, el dispositivo es centrifugado para retirar los contaminantes que permanecen en solución mientras que las microesferas son retenidas por la frita en el dispositivo. Las microesferas pueden lavarse con un tampón de carga adicional para obtener una purificación más limpia. Una vez que se completan los lavados, el dispositivo de filtración (por ejemplo, un dispositivo Amicon Ultra-0.5) se acopla a la salida del dispositivo BWEC y se añade un tampón de elución que disocia la diana de las microesferas. La diana purificada se recoge a continuación y se concentra en el dispositivo de filtración en un único centrifugado sin requerir etapas de transferencia adicionales. Para retirar el imidazol, que se utiliza habitualmente en el tampón de elución, se puede añadir 1,5 ml de PBS al dispositivo y centrifugar nuevamente. La PBS no tendrá ningún impacto en las microesferas y viceversa. La PBS se dosificará lentamente en la muestra previamente eluida, descargando el imidazol, reemplazándolo con PBS.

Ejemplo 5 – Volúmenes de retención

Se evaluaron los volúmenes de retención con dispositivos de unión-lavado-elución-concentrado (BWEC) y tapas de diafragma. Los dispositivos fueron previamente lavados con 1,5 ml de BSA (1 mg/ml PBS) a 4000 xg durante 2 minutos, y a continuación se añadió 0,5 ml BSA (1 mg/ml PBS) a cada uno de los dispositivos después de

ensamblar con un dispositivo de filtrado de 0,5 μ m (AMICON ULTRA 0,5 ml 10K, disponible en EMD Millipore Corporation), seguido de centrifugación durante 15 minutos a 4000 xg. Los volúmenes de retención se calcularon por diferencia de peso de los dispositivos antes y después de accionar el diafragma. Los resultados se muestran en la FIG. 26, y demuestran que el accionamiento del diafragma tiene como resultado la recuperación de más de 1,5 μ l de muestra en comparación con la ausencia de diafragma.

Ejemplo 6

Se evaluaron dispositivos de unión-lavado-elución (BWE, siglas del inglés de “bind-wash-elute”) en cuanto al intercambio de tampones. Se distribuyó 50 μ l de 10 mM Tris, pH 7,5, 1 M NaCl a un dispositivo de filtrado (AMICON ULTRA 0,5 ml 10K, disponible en EMD Millipore Corporation), y se ensambló en tubos de intercambio y se centrifugó a 4000 xg durante 15 minutos después de añadir 1,5 ml de 10 mM Tris, pH 7,5 al tubo de intercambio. Los retenidos se recogieron mediante centrifugación inversa durante 2 minutos a 1000 xg y el volumen final se ajustó a 100 μ l con 10 mM Tris. Se midieron las conductividades después de añadir 4,9 ml de agua Milli-Q. Para el control de 3 centrifugados, se realizó intercambio de tampones mediante tres lavados consecutivos con 0,5 ml. La FIG. 27 muestra que la unión-lavado-elución realizó un método equivalente al método de 3 centrifugados a pesar de un único centrifugado.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de preparación de muestras, que comprende un elemento (12) de depósito tiene un depósito (14) de muestras, una columna (18) que se extiende axialmente desde dicho depósito (14), y una salida (24) posicionada en dicha columna (18) y separada de y en relación fluido-comunicante con dicho depósito (14) de muestras, y un
5 dispositivo (50) de filtración acoplado a dicho elemento (12) de depósito, dicho dispositivo (50) de filtración que comprende paredes laterales, una cámara de recogida de filtrado, una o más membranas (12A, 12B) de filtración dispuestas en dichas paredes laterales y separadas entre sí y posicionada de forma hermética entre dicho depósito (14) de muestras y dicha cámara de recogida de filtrado, definiendo una cámara de retenido un tope de volumen por debajo de dichas membranas (12A, 12B) de filtración, en donde dicha salida (24) de dicho elemento (12) de depósito
10 está posicionado en dicho tope de volumen.
2. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 1, que además comprende un soporte (60) del conjunto que comprende un manguito (62) de retención configurado para recibir dicho depósito (14) de muestras y una abertura que conduce a una columna que se extiende axialmente con un diámetro interior con una forma de acuerdo a dicho dispositivo (50) de filtración.
- 15 3. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 1, en donde dicha salida (24) comprende una abertura en un vástago (23) que se extiende axialmente desde dicha columna (18).
4. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 3, en donde dicho vástago (23) es axialmente extensible y axialmente retráctil dentro de dicho tope de volumen.
- 20 5. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 4, en donde dicho vástago (23) se fija en un extremo mediante dicho depósito (14) y comprende una parte sobremoldeada con elastómero que es axialmente extensible y axialmente retráctil dentro de dicho tope de volumen.
6. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 4, en donde dicho vástago (23) comprende una o más sinuosidades que le permiten ser axialmente extensible y axialmente retráctil dentro de dicho tope de volumen.
- 25 7. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 1, en donde el dispositivo (50) de filtración comprende dos membranas (12A, 12B) separadas entre sí, y tiene un volumen entre dichas membranas (12A, 12B) separadas, y en donde dicha columna (18) comprende una cámara (22) formada para ocupar dicho volumen de tal manera que dicha cámara (22) está desviada con respecto a cada una de dichas membranas (12A, 12B).
8. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 5, en donde dicha cámara (22) de dicha columna (18) se estrecha radialmente hacia el interior hacia dicha salida (24).
- 30 9. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 1, que además comprende una tapa (300) de diafragma que comprende un elemento (302) de desviación en dicho elemento (12) de depósito.
10. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 1, en donde dicha columna (18) comprende medios (30) de cromatografía.
- 35 11. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 1, en donde dicha columna (18) comprende una frita.
12. Dispositivo de preparación de muestras según la reivindicación 11, en donde dicha frita comprende material hidrófobo.
13. Un método de preparación de muestras, que comprende proporcionar un dispositivo de preparación de muestras que comprende un elemento (12) de depósito con un depósito (14) de muestras, una columna (18) que se extiende axialmente desde dicho depósito (14), dicha columna (18) conteniendo medios (30), y una salida (24) posicionada en dicha columna (18) y separada de y en relación fluido-comunicante con dicho depósito (14) de muestras, y un
40 dispositivo (50) de filtración acoplado a dicho elemento (12) de depósito, dicho dispositivo (50) de filtración que comprende paredes laterales, una cámara de recogida de filtrado, una o más membranas (12A, 12B) de filtración dispuestas en paredes laterales y separadas entre sí y posicionadas herméticamente entre dicho depósito (14) de muestras y dicha cámara de recogida de filtrado, una cámara de retenido que define un tope de volumen bajo dichas membranas (12A, 12B) de filtración; uniendo selectivamente una diana a dichos medios (30), lavando dicha muestra unida a dichos medios (30) para retirar contaminantes, y eluyendo dicha diana de dichos medios (30) hacia dicho
45 dispositivo (50) de filtración aplicando fuerza centrífuga en una única etapa.

14. El método según la reivindicación 13, que además comprende proporcionar un elemento de desviación en dicho elemento (12) de depósito, y reducir cualquier volumen de retención de dicha muestra en dicho dispositivo desplazando dicho elemento de desviación axialmente.

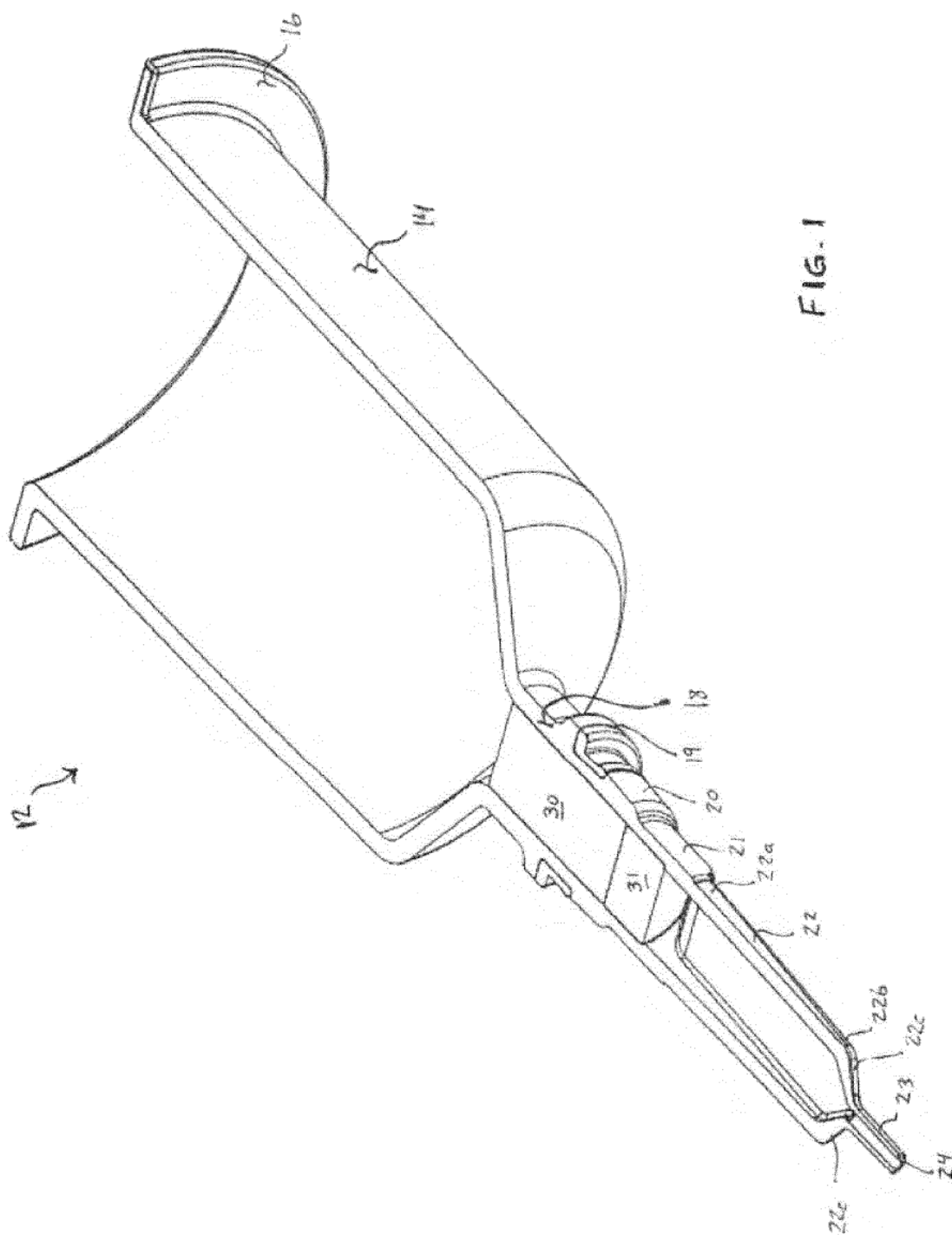
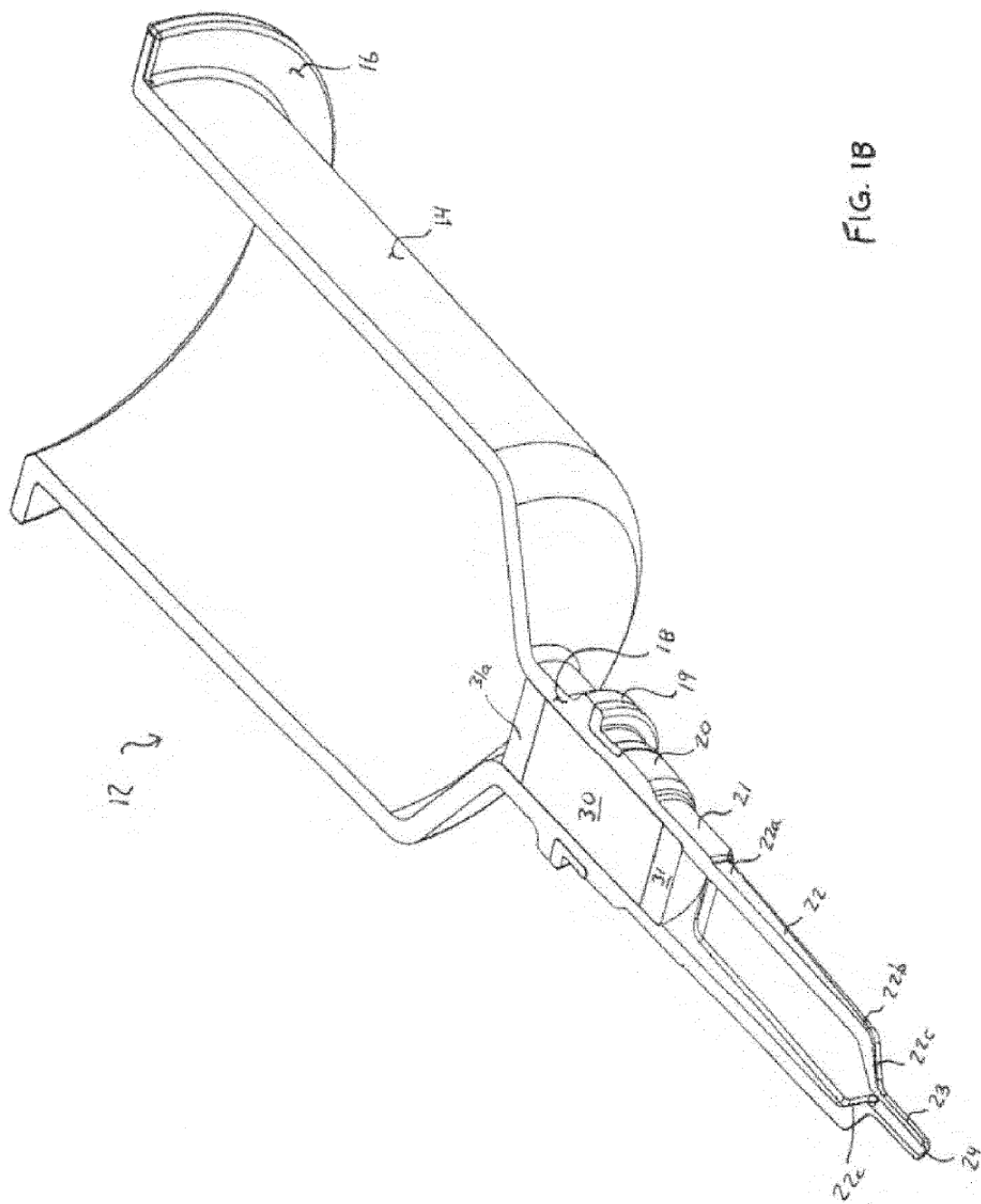
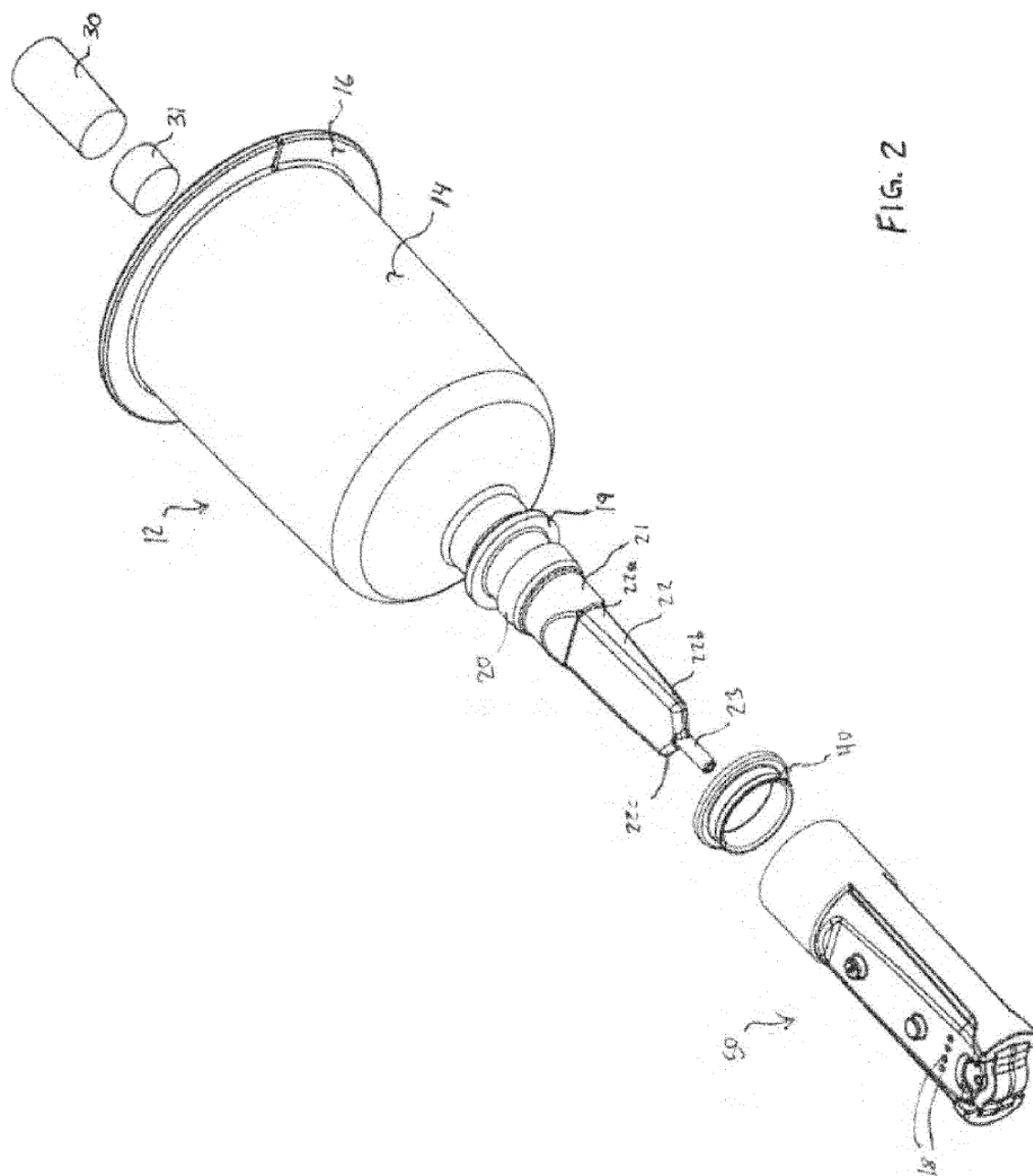


Fig. 1





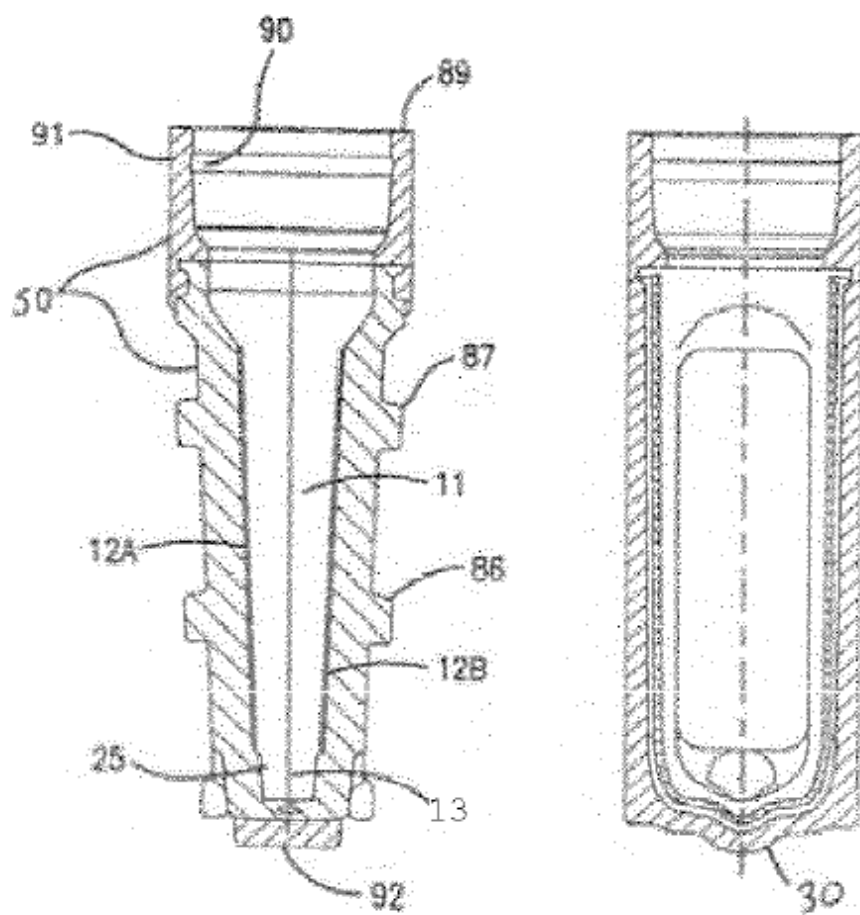
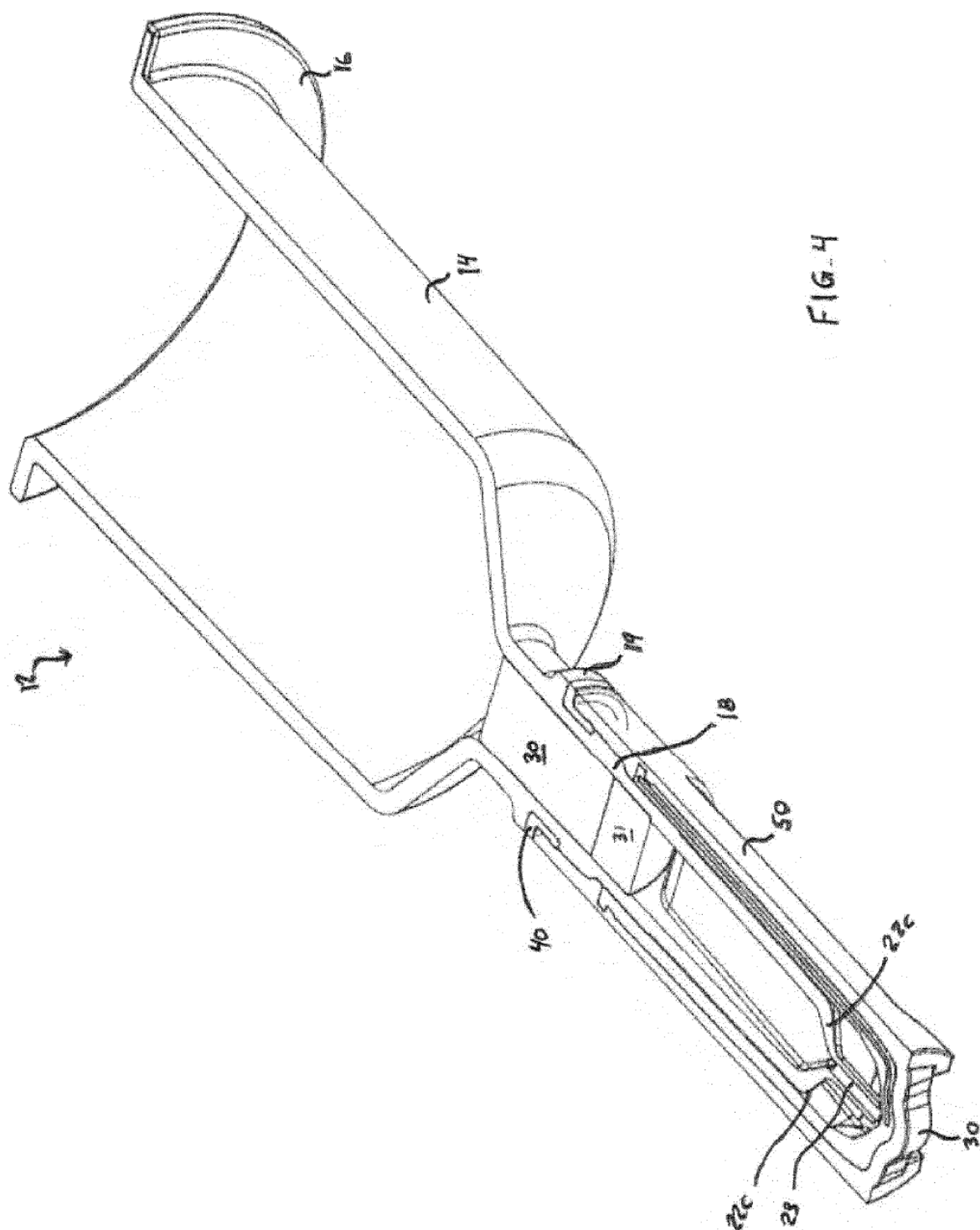


FIG. 3



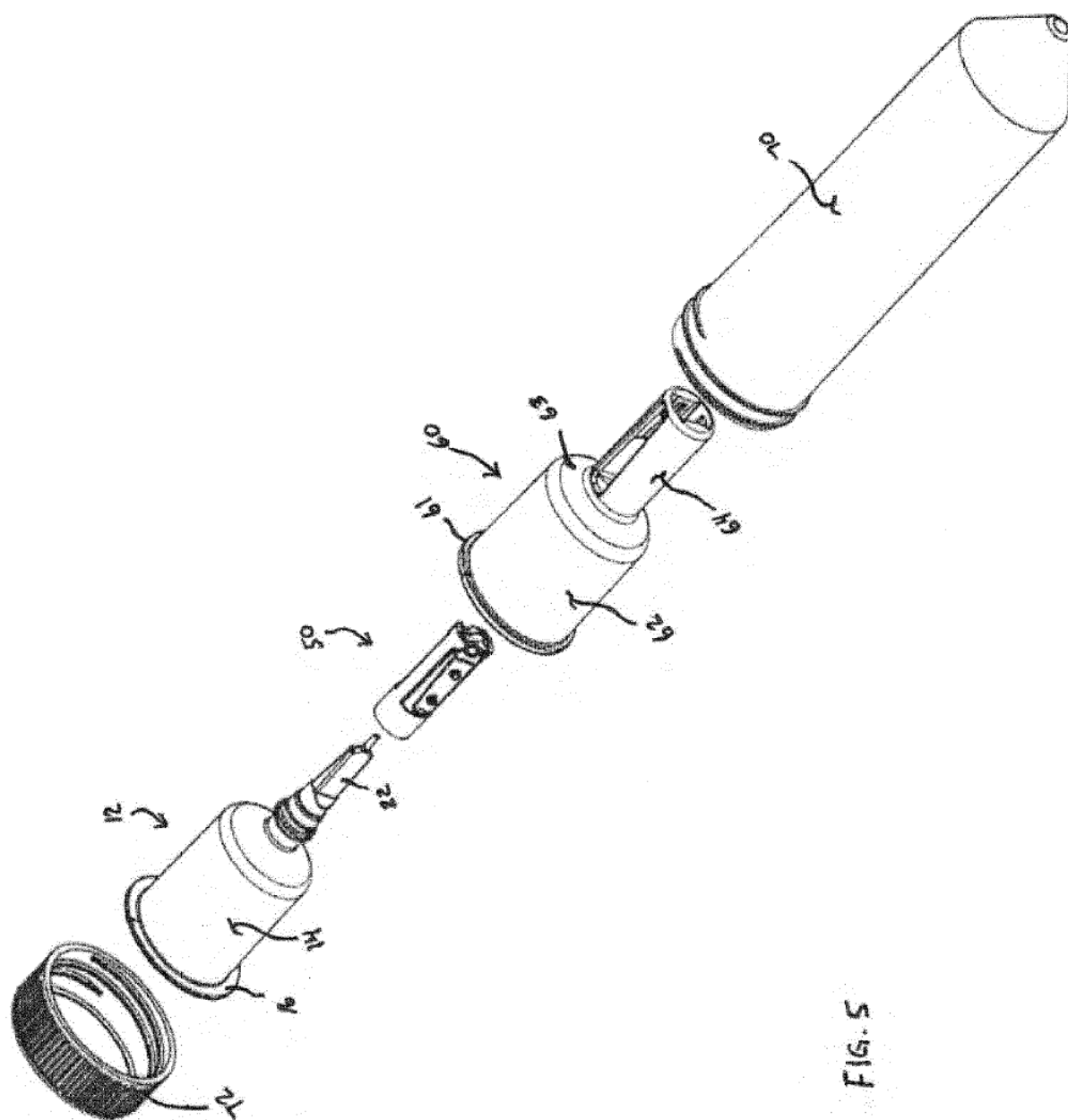
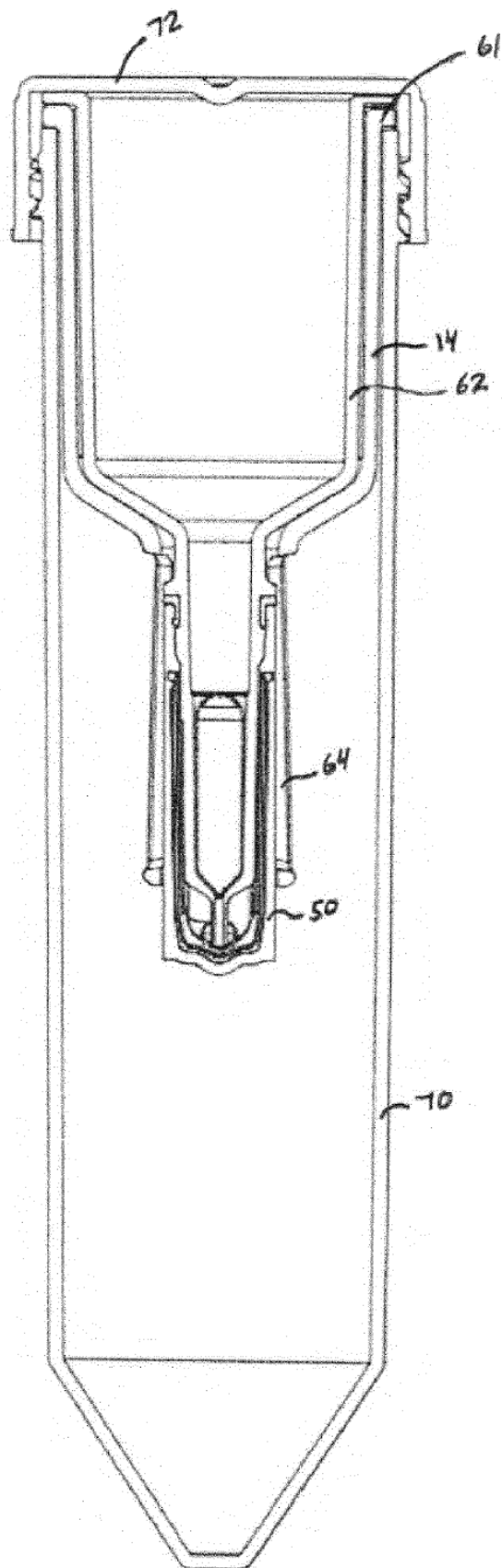


FIG. 5

FIG. 6



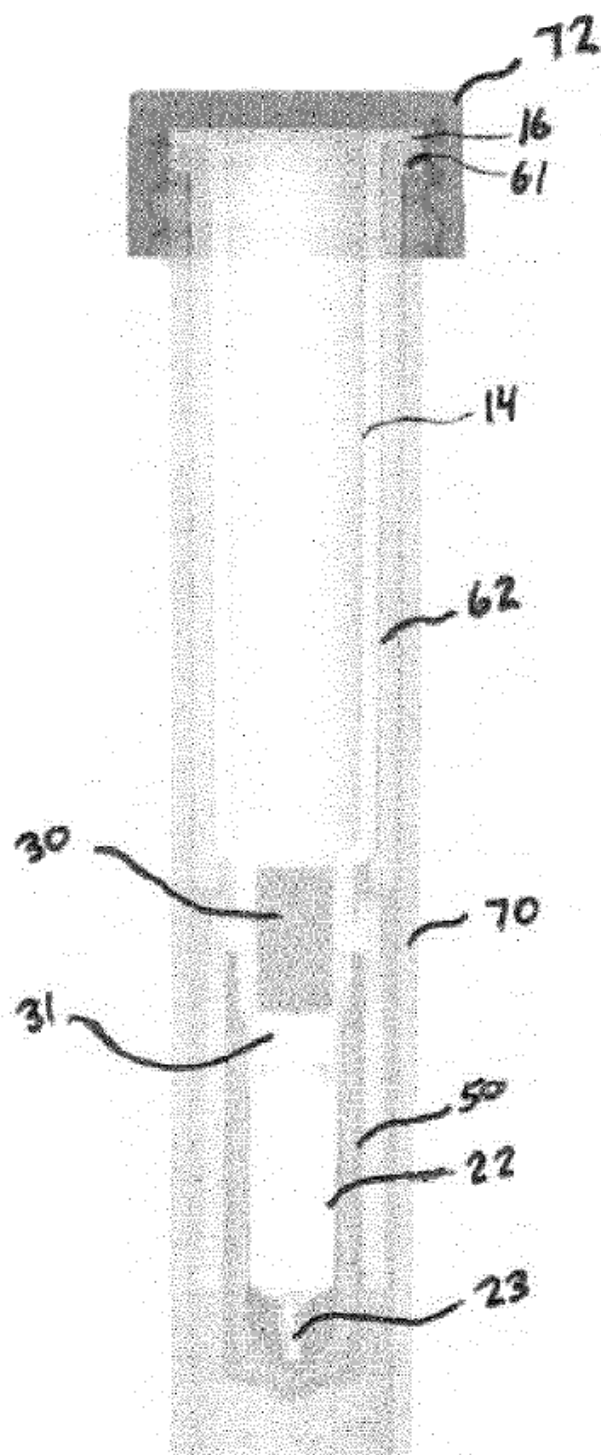


FIG. 7

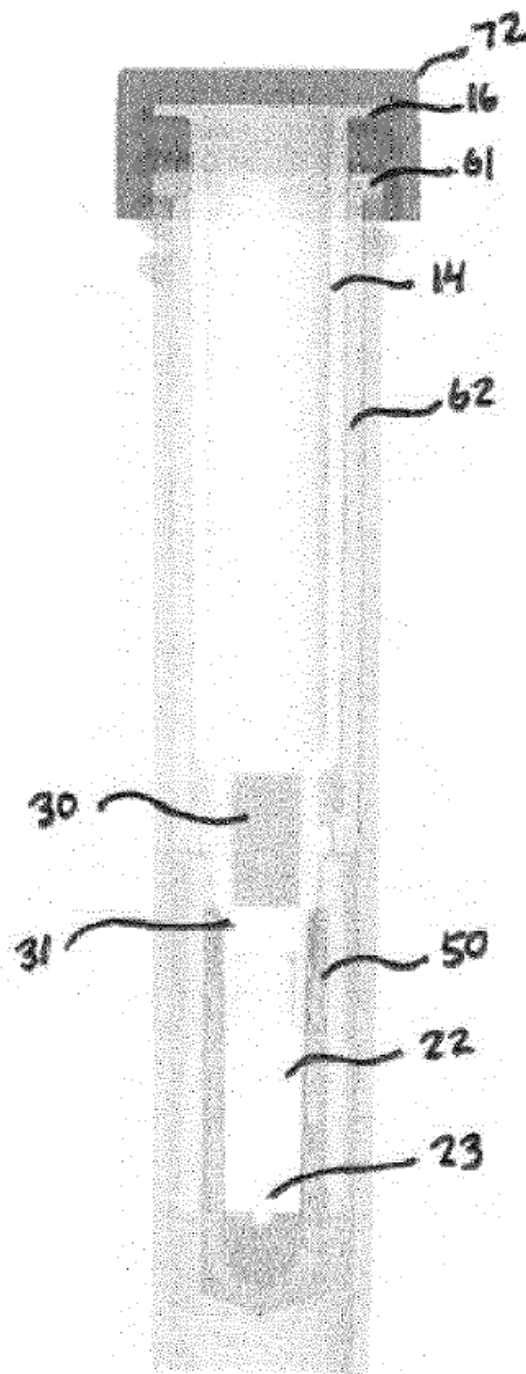


FIG. 8

FIG. 9

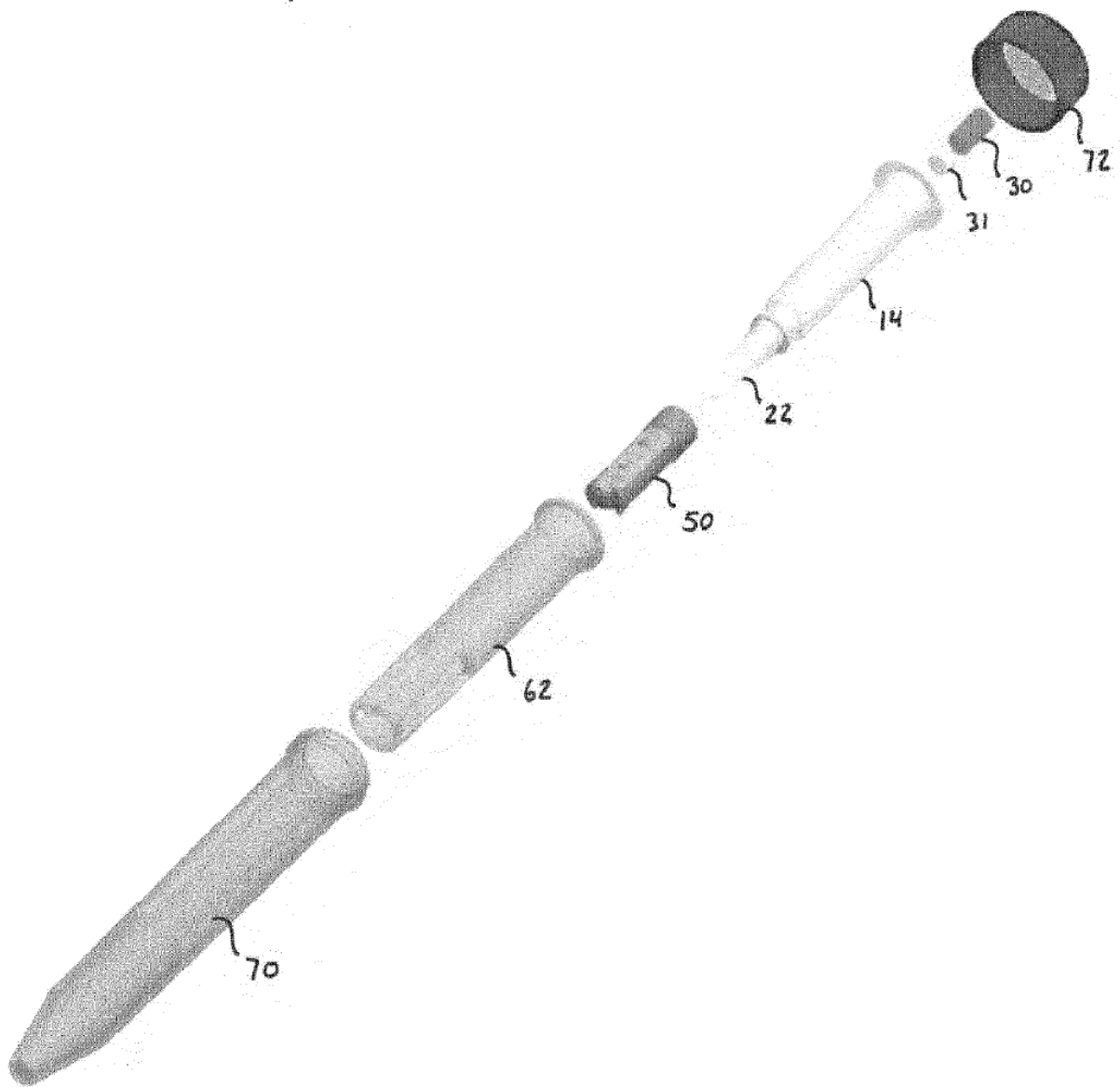


FIG. 10

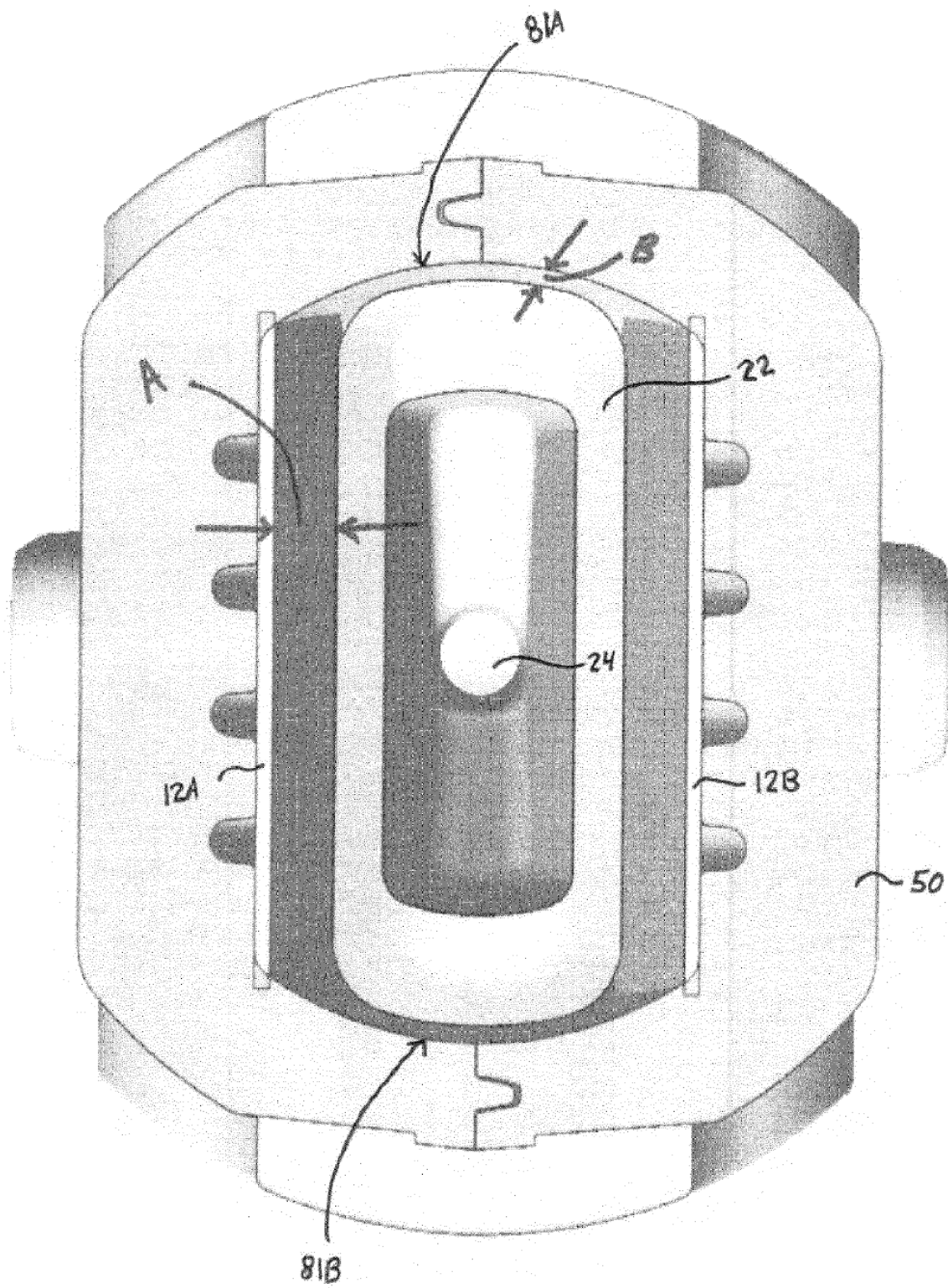


FIG. 11

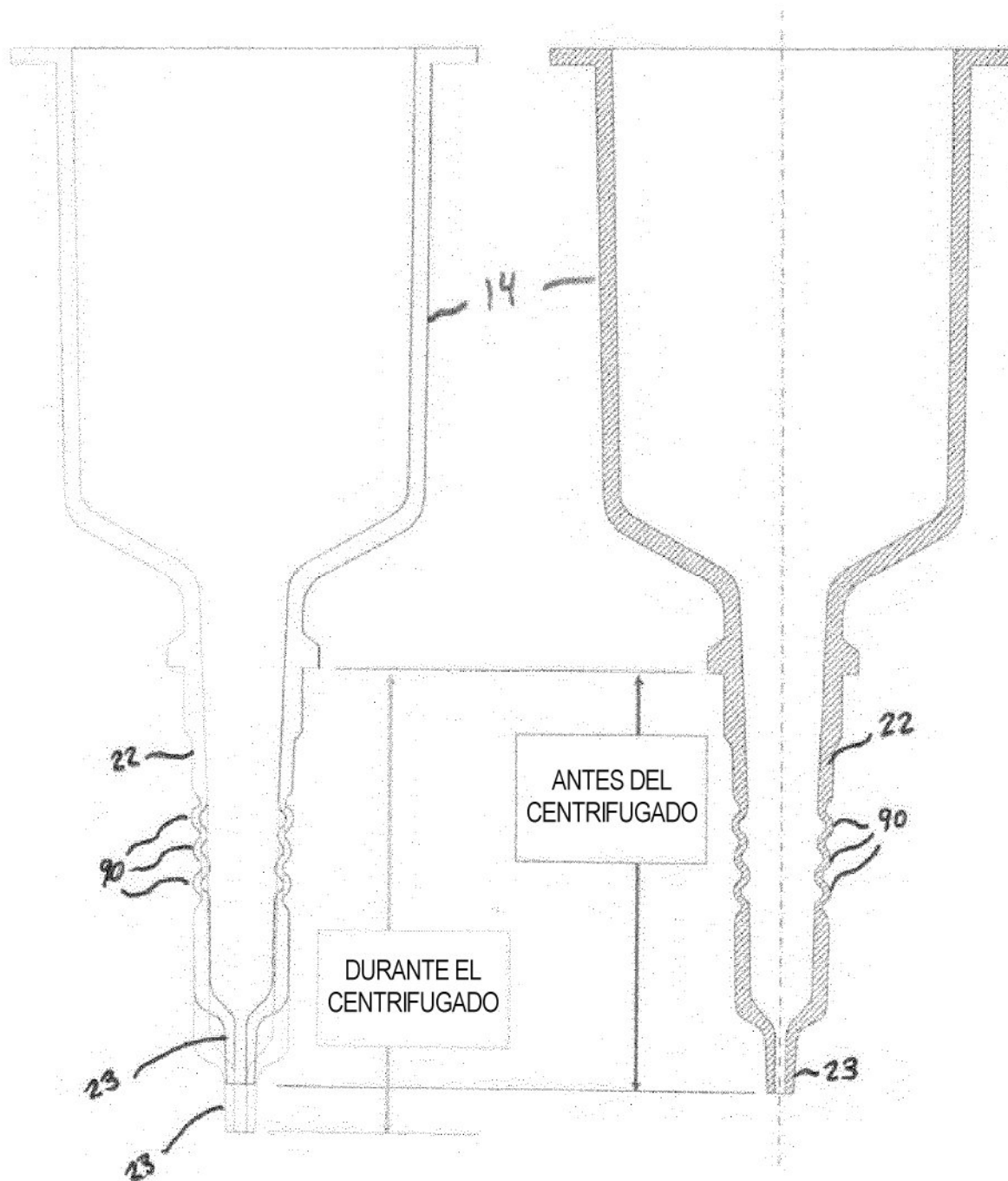


FIG. 12

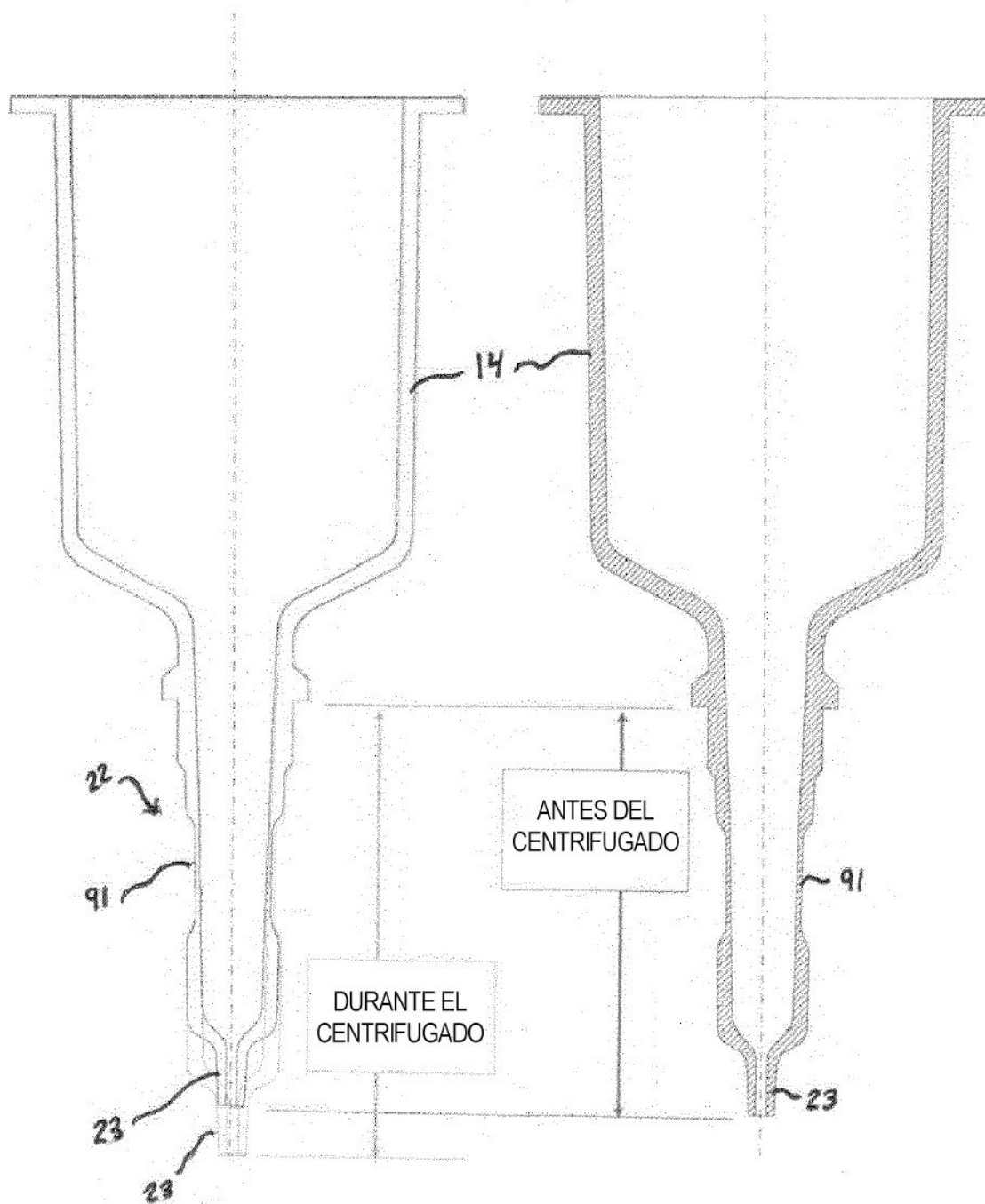


FIG. 13

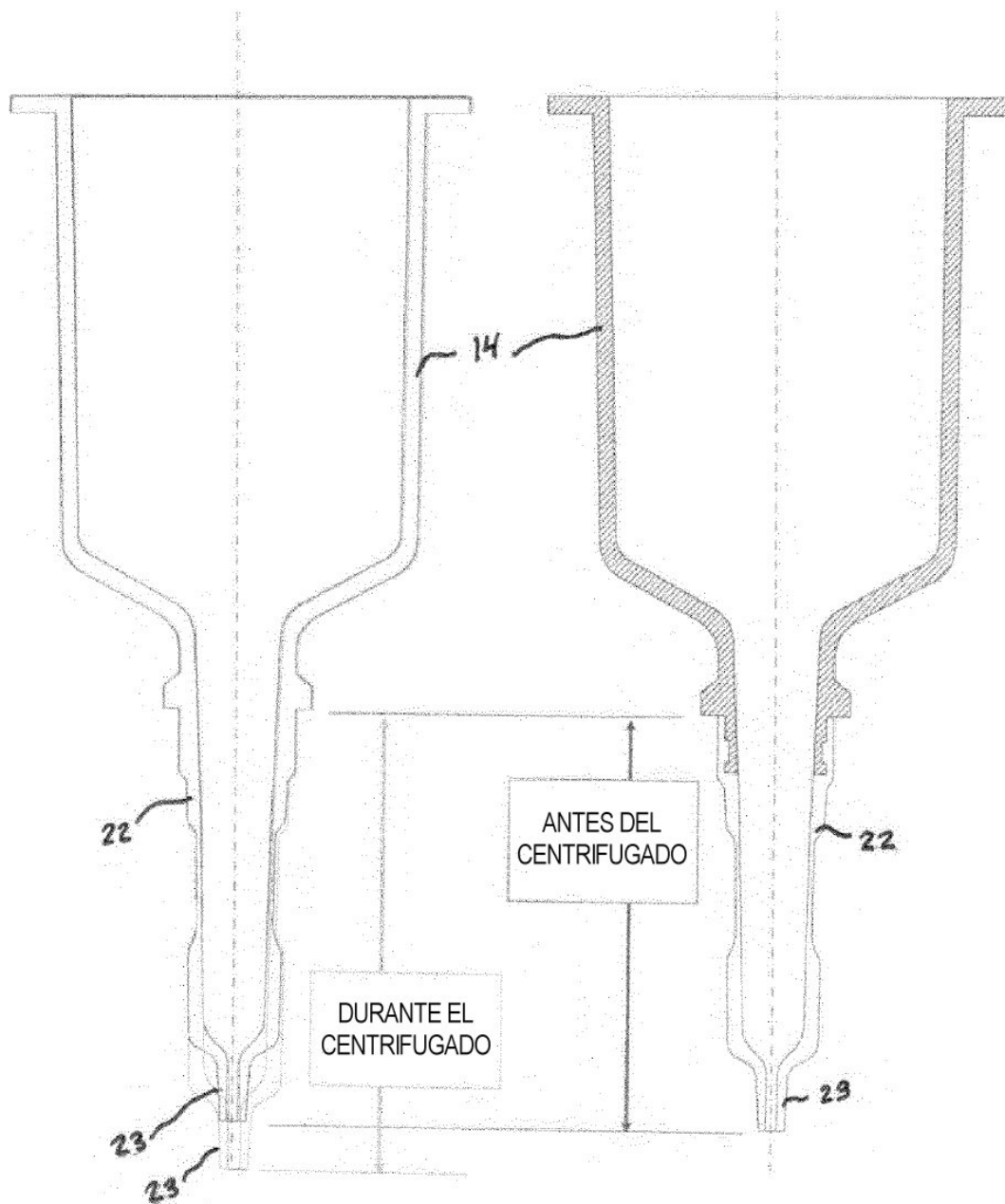
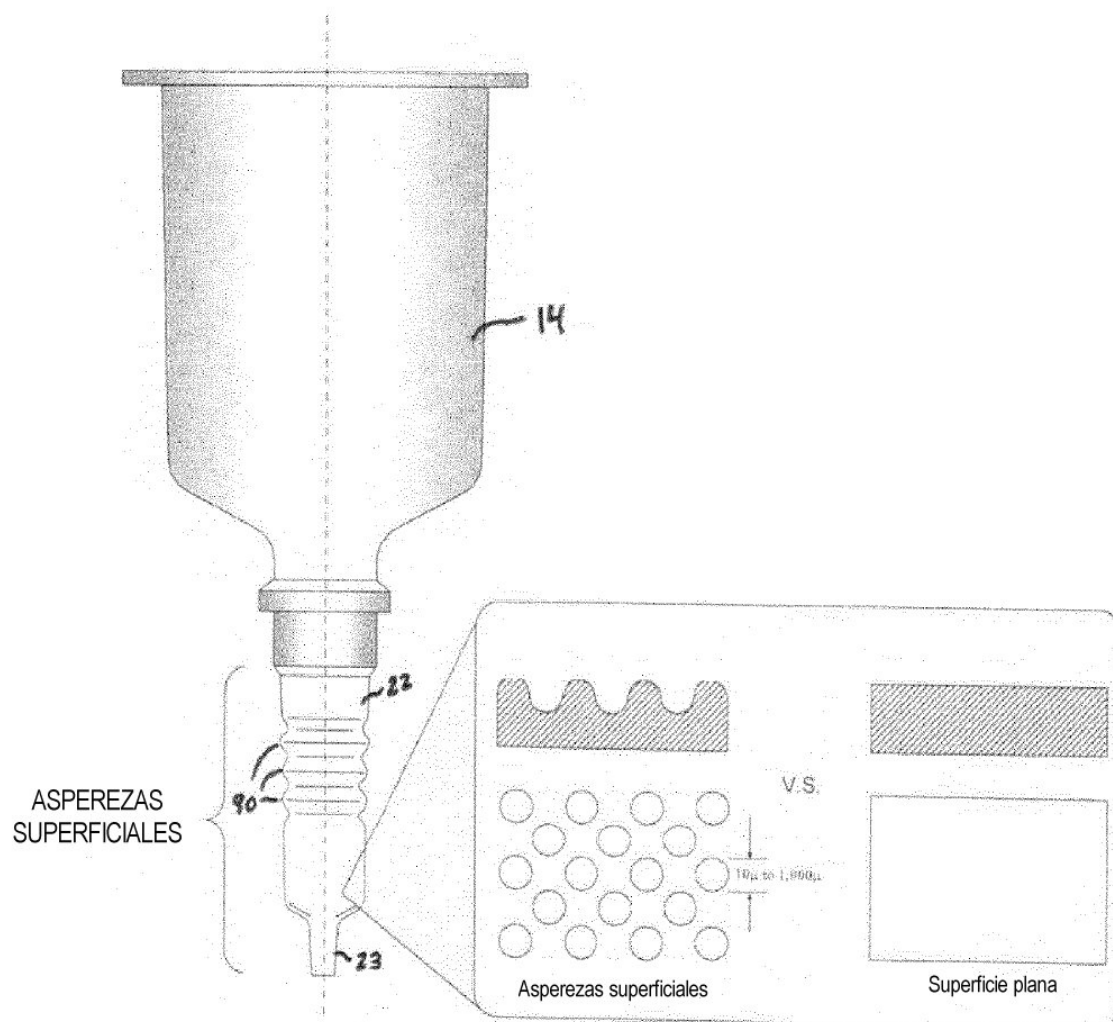
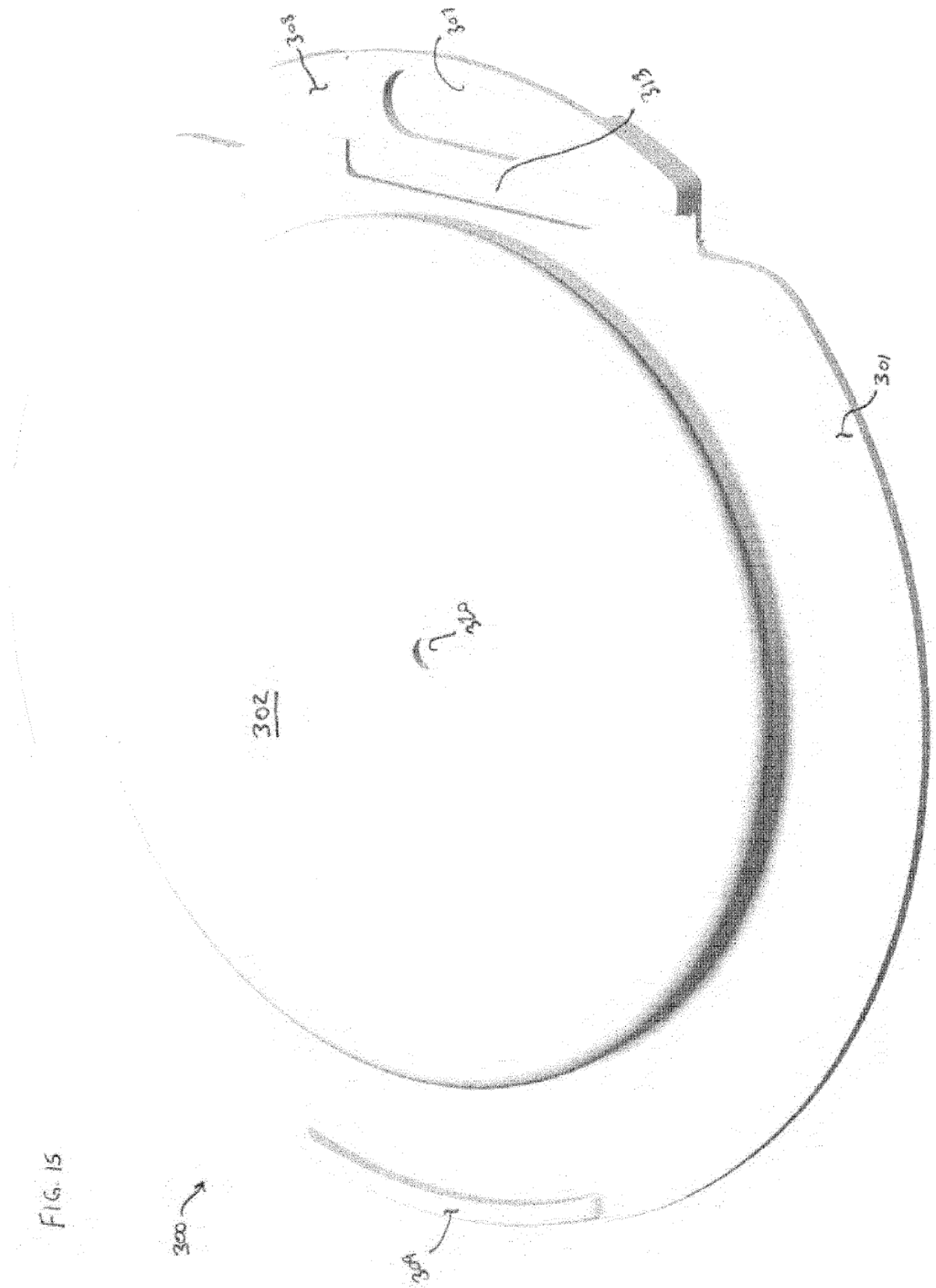


FIG. 14





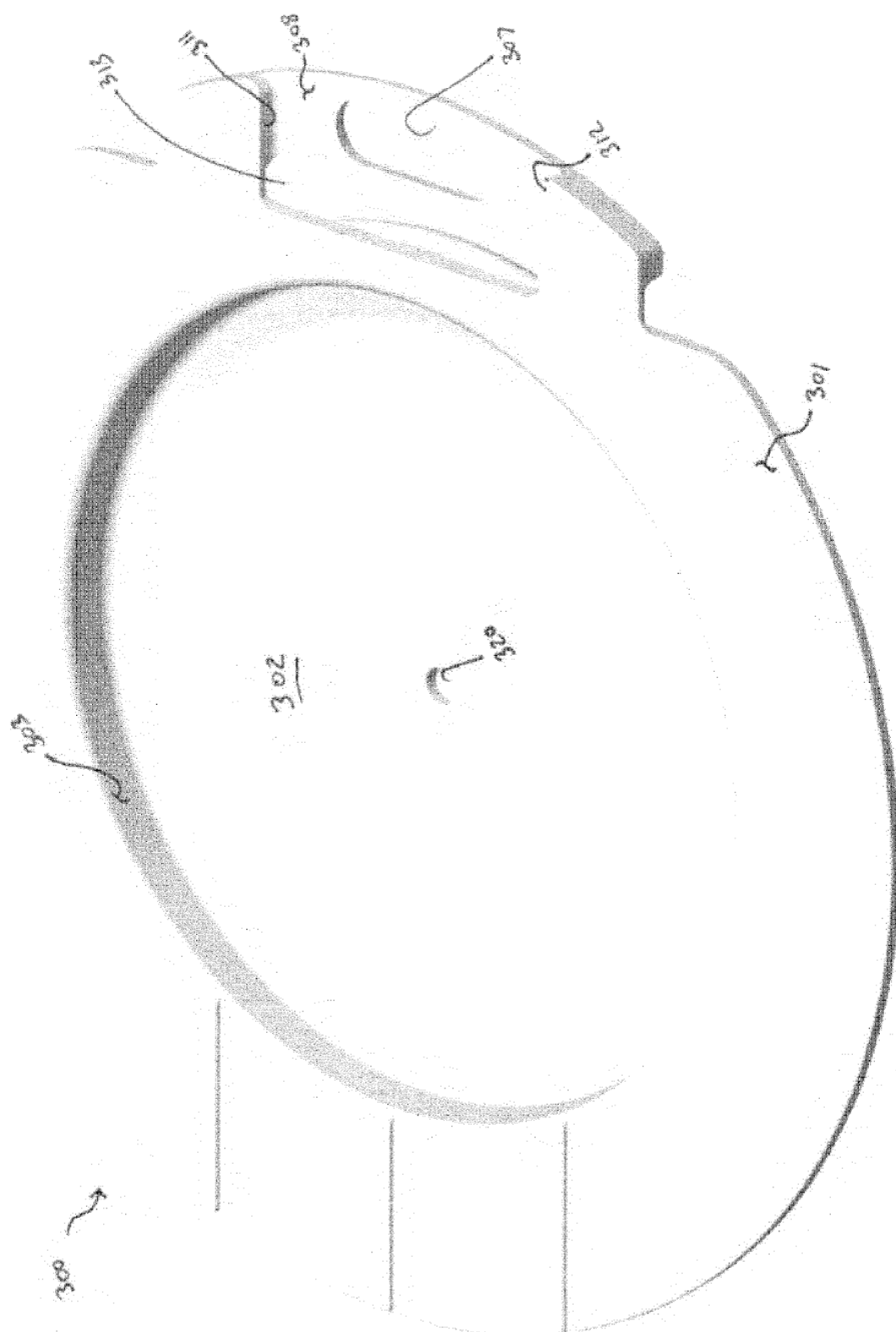


Fig. 16

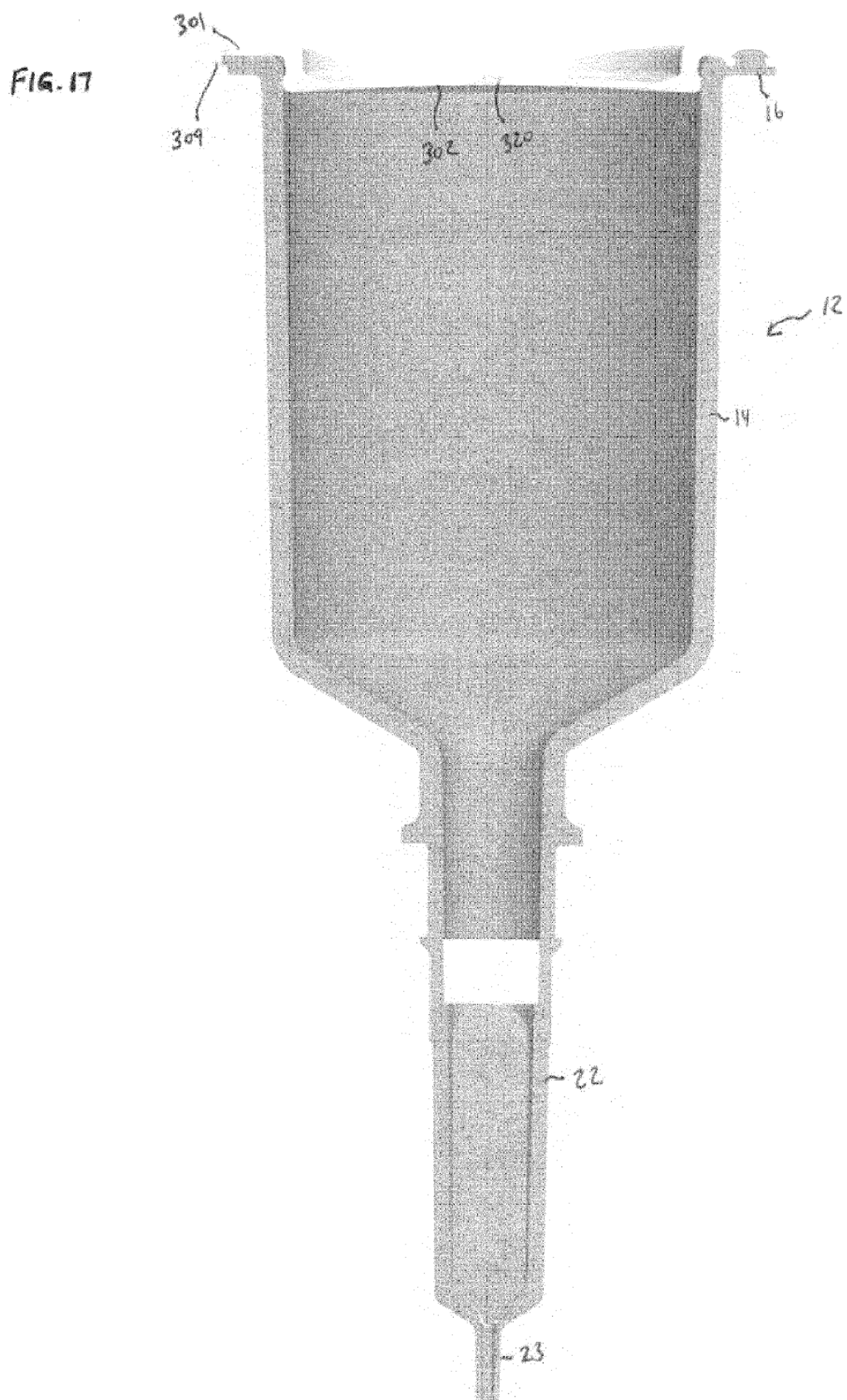
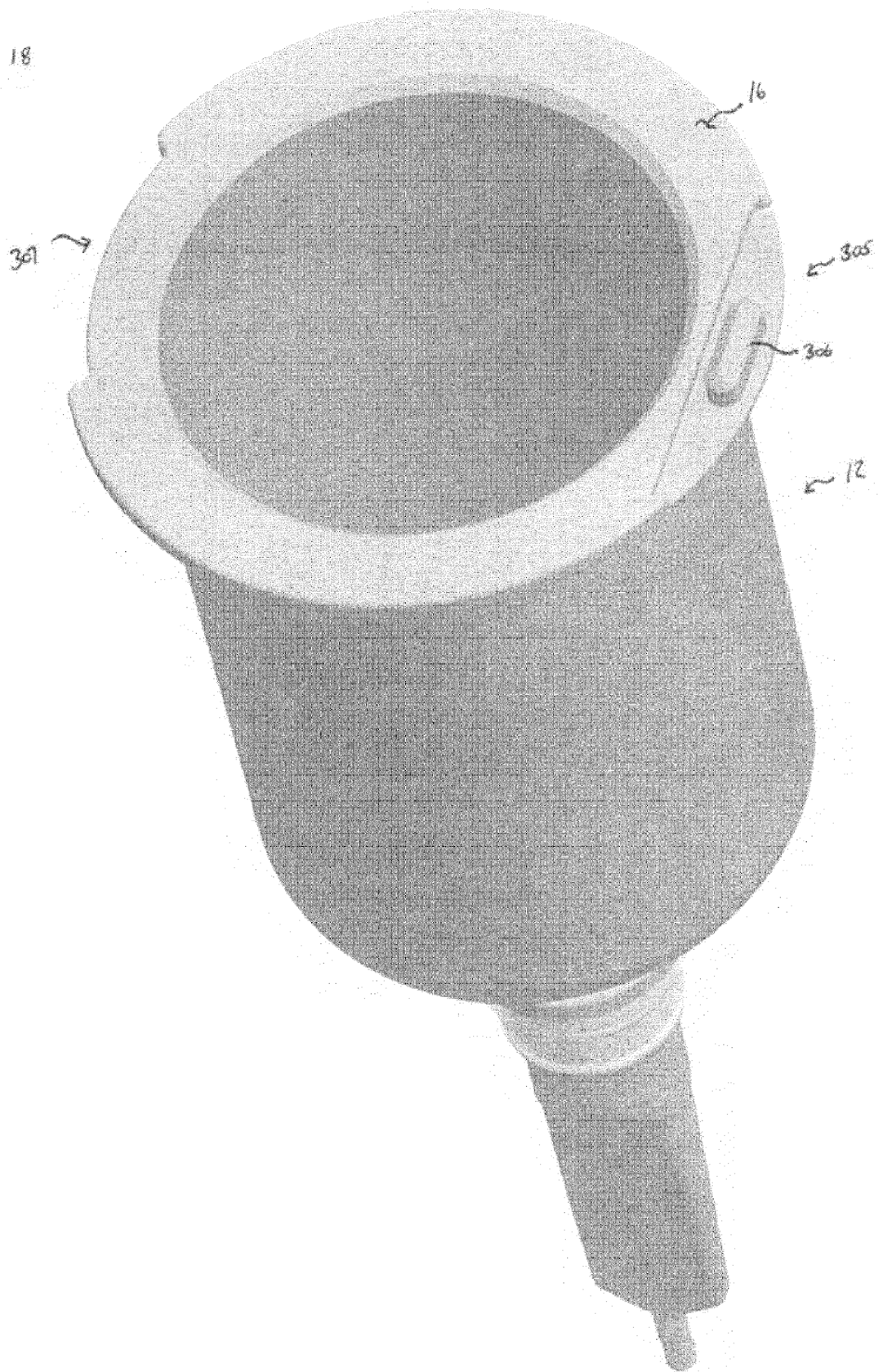
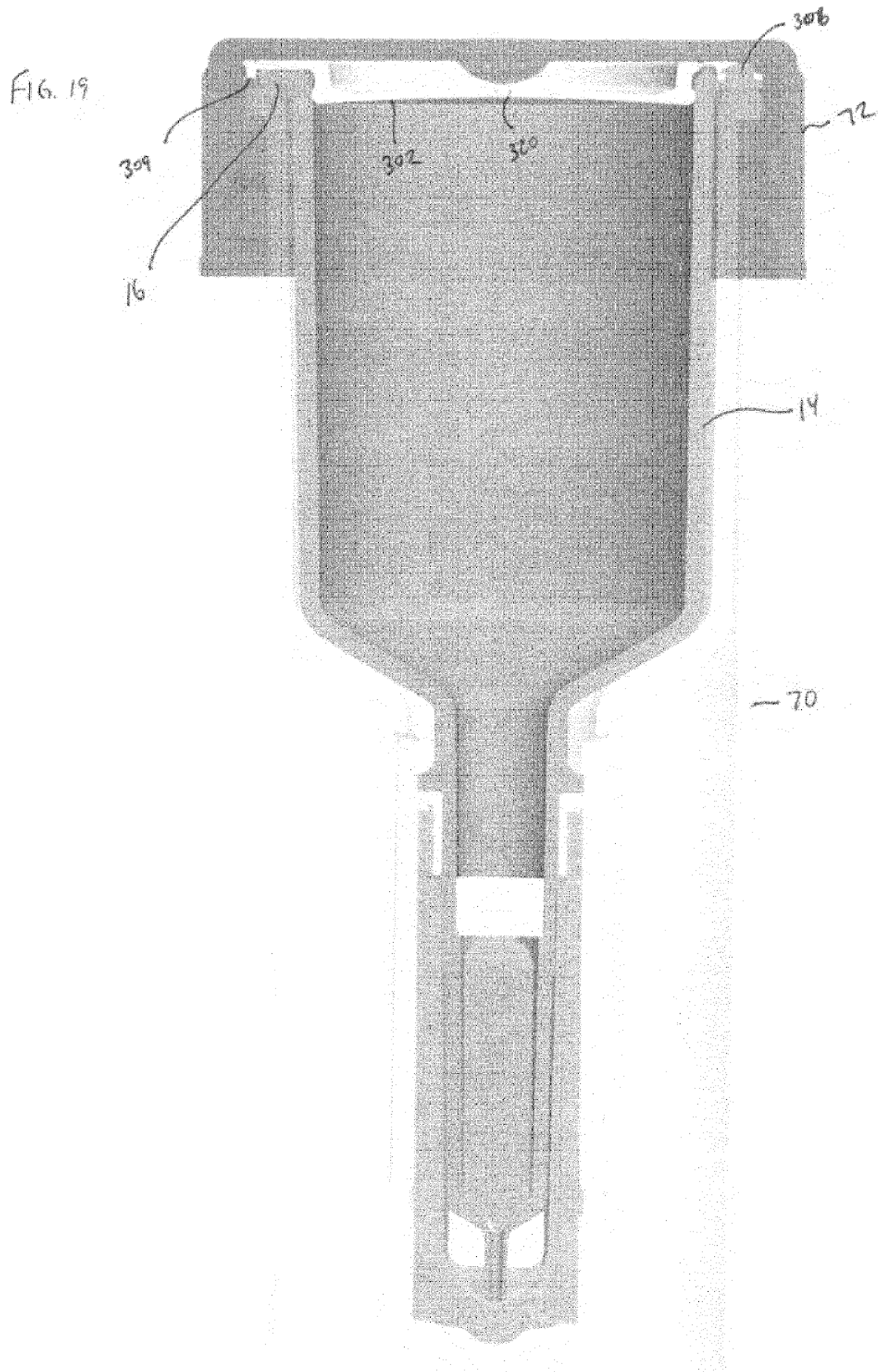


FIG. 18





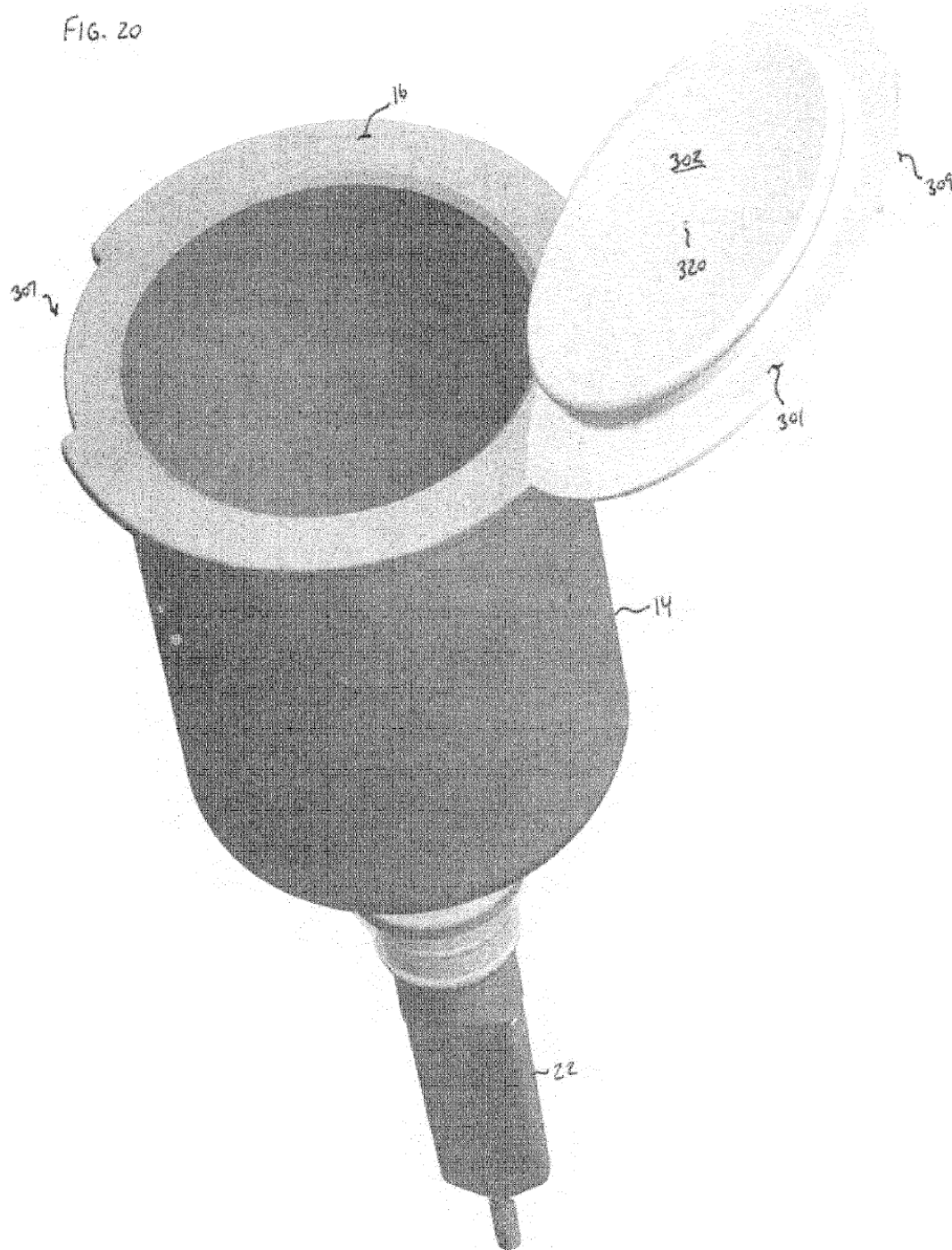


FIG. 21

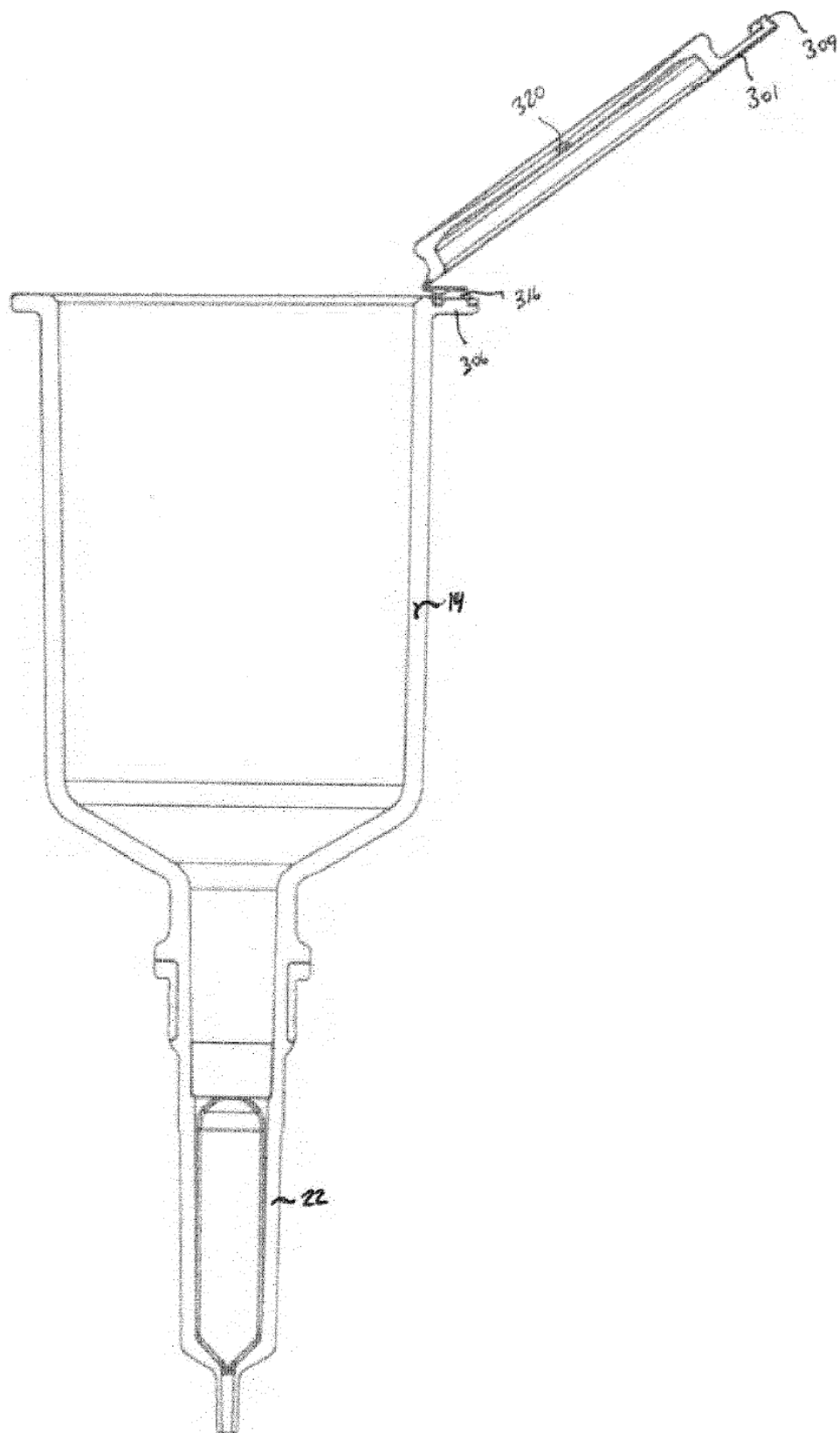


FIG. 22

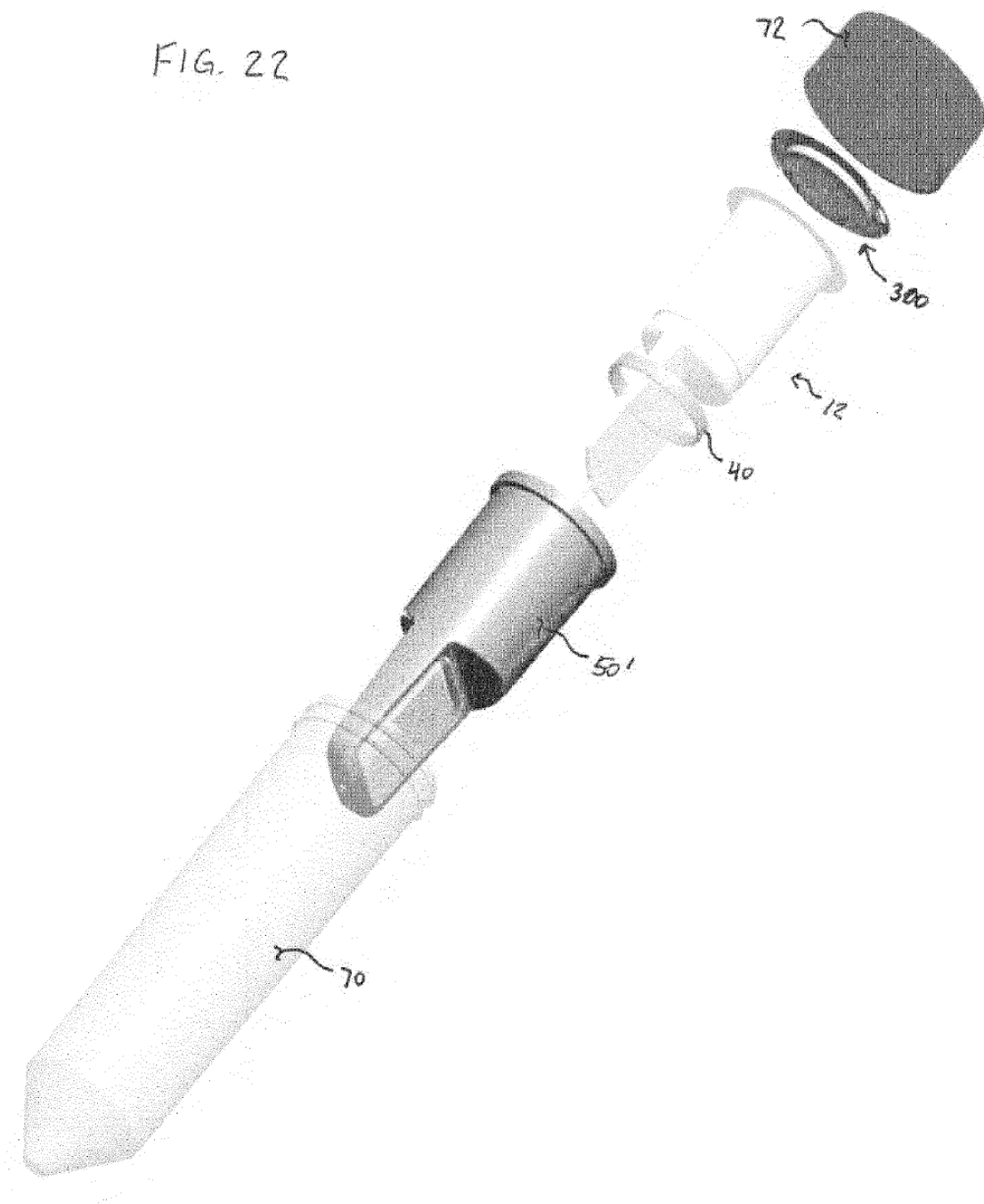


FIG. 23

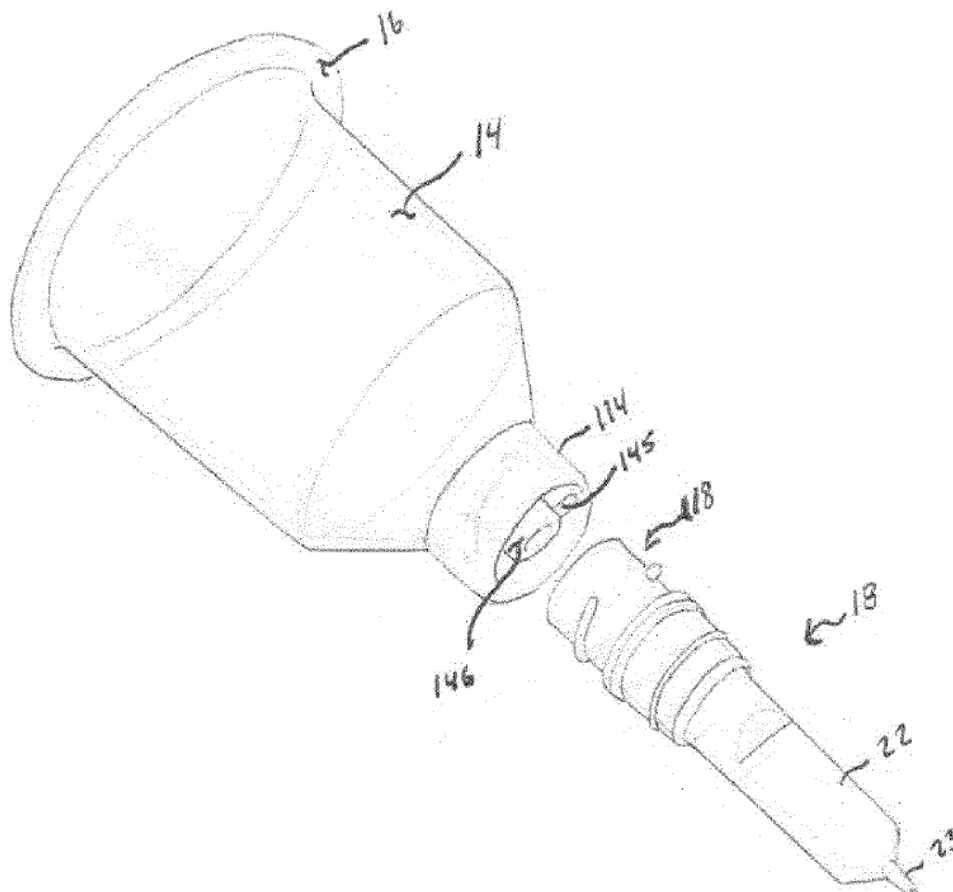


FIG. 24

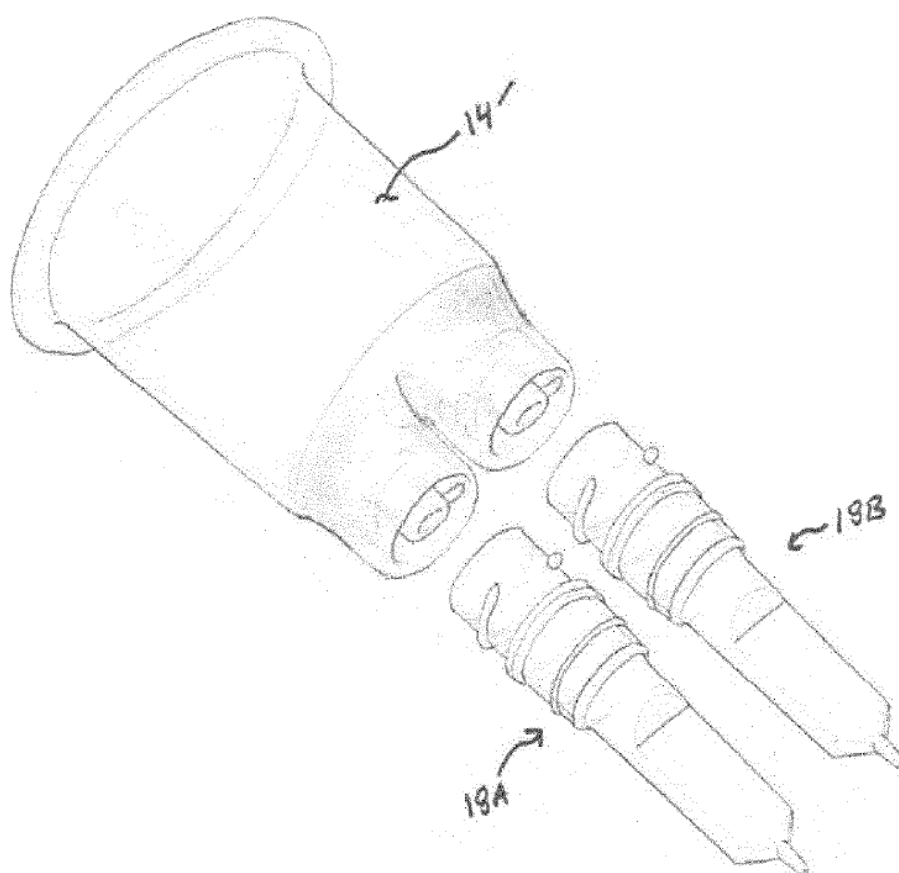
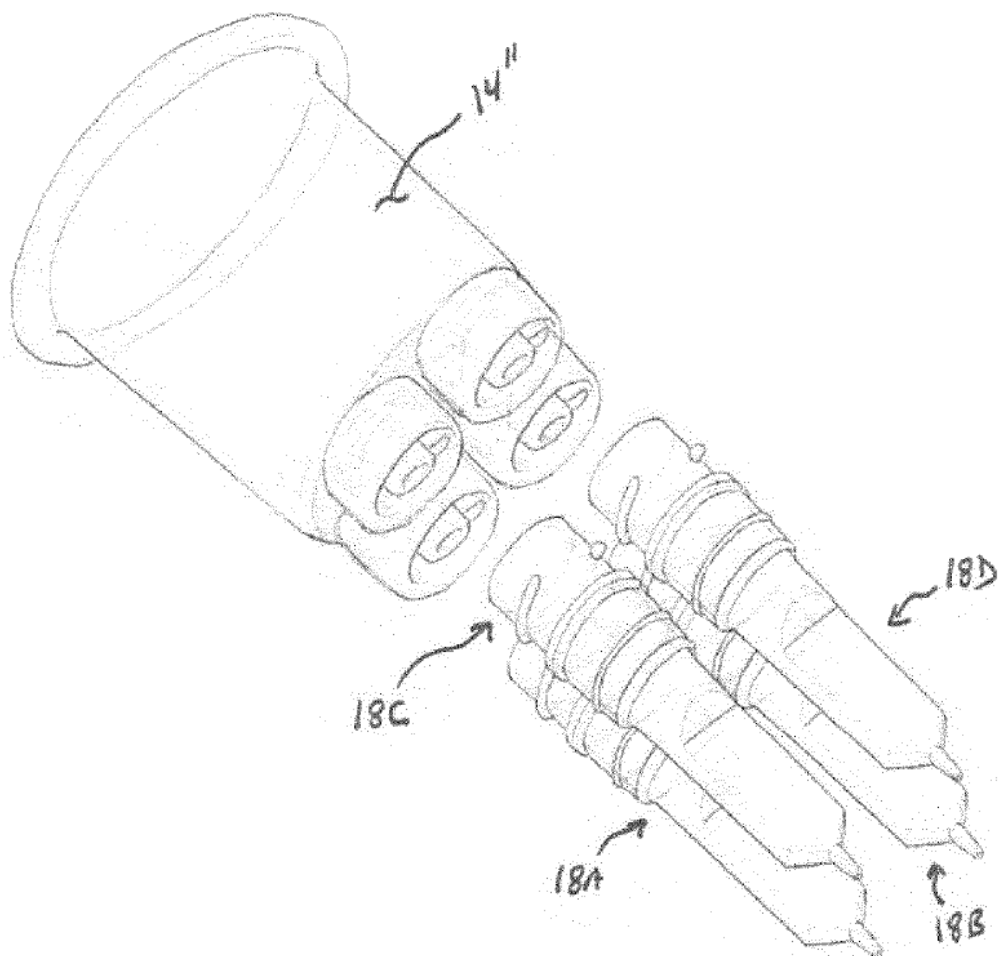


FIG. 25



Volúmenes de retención con dispositivo BWE

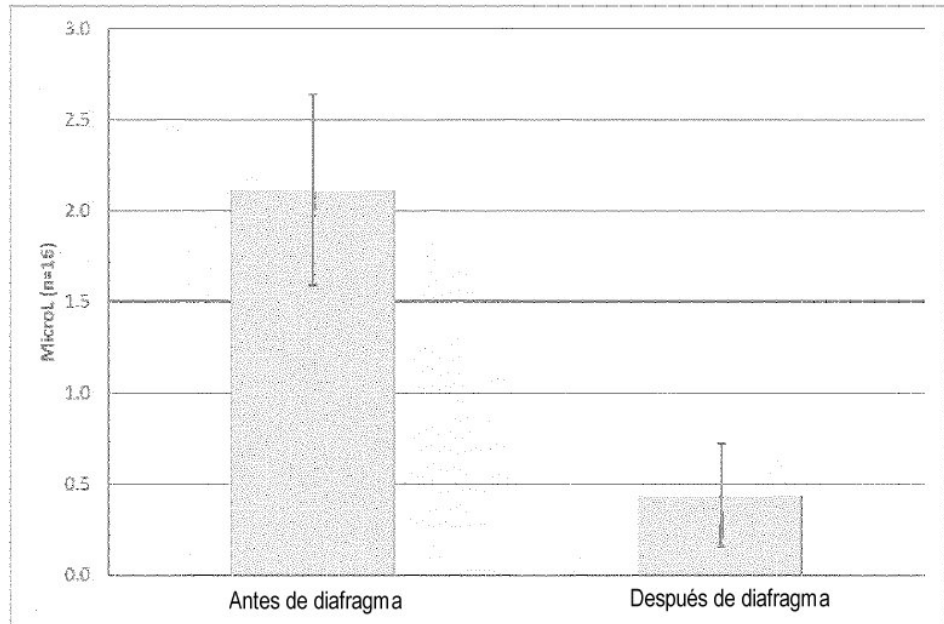


FIG. 26

Comparación de métodos para análisis de intercambio de tampones

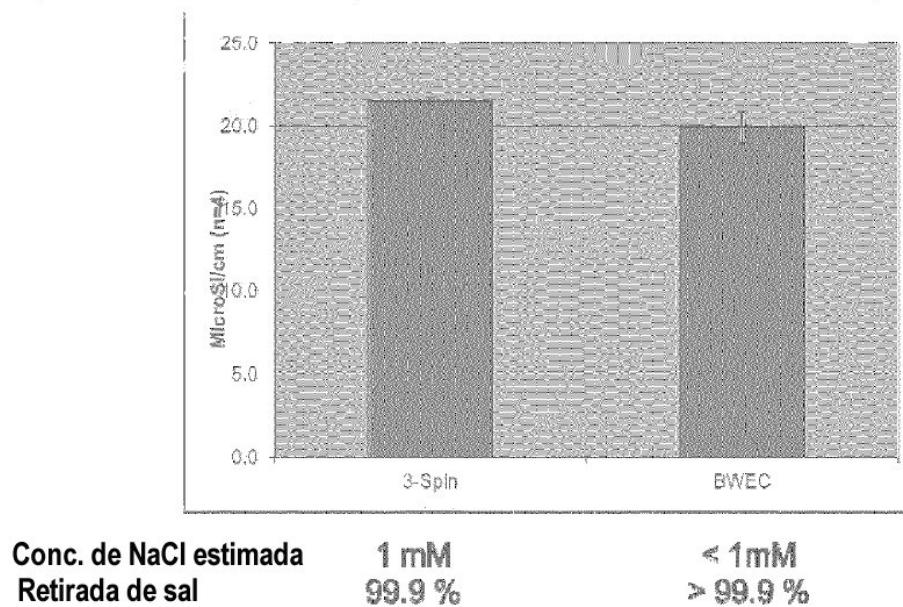


FIG. 27