(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 670 857**

(51) Int. CI.:

B01D 61/18 (2006.01)
B01D 63/16 (2006.01)
B01L 3/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2008 E 12000169 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2457631**

(54) Título: **Filtro centrífugo**

(30) Prioridad:

24.09.2007 US 903577

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BONHOMME, LOUIS;
DOYLE, JOHN;
GREENIZEN, KURT;
GAGNE, GEORGE;
DEVIN, SEAN;
LOMBARD, GERARD y
SMITH, VINCENT

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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

Filtro centrífugo.

Antecedentes de la invención

Pueden utilizarse filtros centrífugos para separar sustancias biológicas, tales como un anticuerpo-enzima, ácido nucleico y proteína para concentración, desalinizacion, purificación y fraccionamiento. Estos dispositivos se utilizan lo más comúnmente en instrumentos separadores centrífugos, que pueden consistir en una configuración de rotor de ángulo fijo o una configuración de rotor de ángulo variable u oscilante. Los consumidores valoran enormemente la velocidad del procedimiento de filtración y la recuperación de la muestra de concentrado. Normalmente, se obtienen valores de recuperación de muestra superiores al 85% mediante la retirada de la cápsula de membrana (portamuestras) y su rotación inversa en un tubo receptor.

Dichos dispositivos se utilizan normalmente para concentrar orina, suero, plasma y líquido cefalorraquídeo. Por ejemplo, la medición de proteínas específicas en orina puede ser importante para el diagnóstico y el tratamiento de diversos estados patológicos, aunque el contenido de estas proteínas en orina a menudo es demasiado pequeño para detectarse sin concentrar primero las proteínas. Los dispositivos convencionales generalmente incluyen un alojamiento que presenta un depósito de muestras, un filtro sellado en el alojamiento de modo que la muestra debe pasar a través del filtro cuando se somete a una fuerza de accionamiento (tal como centrifugación) y una cámara de recogida para recoger la muestra concentrada.

Los ejemplos de algunos de los dispositivos que están disponibles comercialmente incluyen los dispositivos de tipo Microcon™ disponibles de Millipore Corporation, en los que una membrana circular se troquela, se coloca y se fija en su sitio utilizando una junta de estanqueidad de silicona. También están disponibles comercialmente dispositivos de tipo Ultrafree™, en los que una membrana rectangular se troquela, se coloca y se une adhesivamente en su sitio. Un manguito de drenaje inferior se ajusta a presión en su sitio para sujetar la membrana en su sitio. Sin embargo, los manguitos pueden agrietarse y gotear, lo que puede producirse por tensiones que se producen en la línea de soldadura.

Otro dispositivo representativo se divulga en la patente US n.º 5.647.990 concedida a Vassarotti. Vassarotti divulga un dispositivo de filtro centrífugo, en el que el filtro está dispuesto en una pared lateral de la cámara de filtración, y una cavidad de concentrado está dispuesta en una pared inferior de la cámara de filtración. Tras la aplicación de fuerza centrífuga, se crea un vector de fuerza que actúa sobre las macromoléculas en la muestra y que barre la superficie del filtro, haciendo que las macromoléculas se recojan en la cavidad de concentrado lejos de la superficie del filtro.

Todavía otro dispositivo representativo se muestra en la patente US n.º 4.722.792 concedida a Miyagi *et al*., que divulga un filtro centrífugo, en el que una película de filtro está dispuesta entre una cámara de muestras y una cámara de filtro de manera inclinada o paralela a un eje del filtro de modo que independientemente de si el filtro se utiliza en una centrífuga de tipo de rotor de ángulo o de tipo de rotor oscilante, el filtro se coloca, durante el funcionamiento, para que esté inclinado o en paralelo a la fuerza centrífuga para reducir la obstrucción.

La patente US nº 6 156 199 A divulga un dispositivo de filtración para separar filtrado y concentrado de una disolución y contienen un volumen de tope fijo determinado por la ubicación de un acceso de salida. El dispositivo incluye un alojamiento con unos medios para recoger el filtrado y una unidad de filtro que puede insertarse dentro del alojamiento. La unidad de filtro contiene una membrana semipermeable en ella para separar el filtrado del concentrado.

Sin embargo, los dispositivos convencionales adolecen de diversos inconvenientes, incluyendo una recuperación, velocidad de filtración menores que las deseadas y/o alto precio. Sería deseable proporcionar un dispositivo de filtración, tal como los dispositivos de filtración centrífugos, que proporcione una recuperación mejorada y tiempos de filtración rápidos a un precio competitivo.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo de filtración tal como se define en la reivindicación 1 y a una combinación de un dispositivo de filtración de este tipo y un vial tal como se define en la reivindicación 5. Versiones ventajosas de la invención se deducen de las reivindicaciones dependientes.

Los problemas de la técnica anterior se han superado por la presente invención, que proporciona un dispositivo de filtración particularmente apto para la concentración de muestras líquidas, particularmente biomoléculas, y que permite un método de concentración, desalinización, purificación y/o fraccionamiento de muestras líquidas. Más específicamente, en determinadas formas de realización, el dispositivo incluye un alojamiento que presenta un depósito de muestras, y dos membranas orientadas de manera sustancialmente vertical y separadas dispuestas en el alojamiento. Un drenaje inferior está asociado con cada membrana de manera que el fluido que

pasa a través de cada membrana fluya a través de un drenaje inferior respectivo al interior de una cámara de recogida de filtrado. El fluido que no pasa a través de la membrana se recoge en la cámara de recogida de concentrado, y puede recuperarse tal como mediante una etapa de rotación inversa, logrando recuperaciones mayores de aproximadamente el 90%. La orientación sustancialmente vertical de las membranas aumenta el área de membrana disponible en al menos 2,7 veces el área disponible en un dispositivo de filtro MICROCON™ convencional. La configuración de dos paneles también mantiene más área de membrana disponible en utilización durante las últimas fases de filtración que una configuración de un panel. Un área de membrana activa es necesaria en su mayor parte durante las últimas fases de filtración, cuando la muestra de concentrado se concentra más y la incrustación de superficie de la membrana aumenta, la incrustación interior de la membrana aumenta, y la altura de fluido disminuye. El alojamiento de dispositivo está compuesto preferentemente por un material de bajo coste, presenta bajas calidades de unión a proteínas específicas y es desechable.

Un dispositivo de filtración de este tipo típicamente se utiliza de la siguiente manera:

1. Insertar el depósito portamuestras en un vial.

2. Pipetear la disolución en el depósito portamuestras (por ejemplo, volumen máximo de 0,5 ml), sin tocar la membrana con la punta de la pipeta.

3. Situar el conjunto en una centrífuga compatible y compensar el rotor con un dispositivo similar.

4. Hacer rotar el dispositivo utilizando las “directrices centrífugas” del proveedor para tener en cuenta los tiempos y velocidades de rotación correctos.

5. Retirar el conjunto de la centrífuga. Separar el vial del depósito portamuestras.

6. Situar el depósito portamuestras boca abajo en un nuevo vial sin permitir que caiga nada del concentrado, luego hacer rotar el conjunto durante por ejemplo 3 minutos a 1000 x G (o pulsar brevemente) para transferir el concentrado al vial.

7. Retirar el conjunto de la centrífuga. Separar el depósito portamuestras del vial. Cerrar a presión la tapa de sellado sobre el vial, y almacenar el producto de manera responsable para su utilización posterior.

Diagrama de flujo de procedimiento genérico para filtración centrífuga

1. Insertar el depósito portamuestras en un vial.

↓

2. Pipetear la disolución en el depósito portamuestras (volumen máximo de 0,5 ml), sin tocar la membrana con la punta de la pipeta.

↓

3. Situar el conjunto en una centrífuga compatible y compensar el rotor con un dispositivo similar.

↓

4. Hacer rotar el dispositivo utilizando las “directrices centrífugas” del proveedor para tener en cuenta los tiempos y velocidades de rotación correctos.

↓

5. Retirar el conjunto de la centrífuga. Separar el vial del depósito portamuestras.

↓

6. Situar el depósito portamuestras boca abajo en un nuevo vial sin permitir que caiga nada del concentrado, luego hacer rotar el conjunto durante por ejemplo 3 minutos a 1000 x G (o pulsar brevemente) para transferir el concentrado al vial.

↓

7. Retirar el conjunto de la centrífuga. Separar el depósito portamuestras del vial. Cerrar a presión la tapa de sellado sobre el vial, y almacenar el producto de manera responsable para su utilización posterior.

En determinadas formas de realización, se proporciona un portadispositivos de filtración tal como un vial, de manera que el dispositivo de filtración (portamuestras) puede colocarse en una orientación en el portadispositivos para la concentración de la muestra, y puede colocarse en otra orientación (invertida) en el portadispositivos para la recuperación de la muestra.

Breve descripción de los dibujos.

La figura 1 es una vista lateral en sección transversal, orientada vertical de un alojamiento de filtro según determinadas formas de realización;

la figura 2 es una vista frontal en sección transversal, orientada angular de un alojamiento de filtro según determinadas formas de realización;

la figura 3 es una vista en despiece ordenado, orientada isométrica de un alojamiento de filtro según determinadas formas de realización;

la figura 4 es una vista isométrica de la superficie interior de un panel lateral de un alojamiento de filtro según determinadas formas de realización;

la figura 5 es una vista isométrica de la superficie exterior del panel lateral de la figura 4;

la figura 6 es una vista en sección transversal, orientada vertical de un panel lateral del alojamiento de filtro según determinadas formas de realización;

la figura 7 es una vista en sección transversal, orientada vertical de un portadispositivos o vial según determinadas formas de realización;

la figura 8 es una vista en sección transversal, orientada angular de un portadispositivos, que muestra un dispositivo de filtración que contiene el volumen máximo de un fluido de concentrado y fluido de filtrado en un modo de rotación según determinadas formas de realización;

la figura 9 es una vista en sección transversal, orientada angular de un portadispositivos que contiene un dispositivo de filtración en un modo de rotación inversa según determinadas formas de realización;

la figura 10 es un diagrama esquemático que muestra una colocación del portadispositivos durante el proceso de moldeo;

la figura 11 es una vista isométrica de un diseño de drenaje inferior texturizado según determinadas formas de realización;

la figura 12 es una vista isométrica un diseño de drenaje inferior texturizado que presenta canales de flujo orientados en diagonal según determinadas formas de realización;

la figura 13 es una vista isométrica de un diseño de drenaje inferior texturizado que presenta salientes cilíndricos elevados, que forma canales de flujo según determinadas formas de realización;

la figura 14 es una vista isométrica de un diseño de drenaje inferior texturizado que presenta salientes poligonales elevados, que forma canales de flujo según determinadas formas de realización;

la figura 15 es un gráfico de los resultados de pruebas de rendimiento de flujo de agua de un dispositivo realizado utilizando cinco configuraciones de dispositivo de membrana diferentes (3 kDa de MWCO, 10 kDa de MWCO, 30 kDa de MWCO, 50 kDa de MWCO y 100 kDa de MWCO) según determinadas formas de realización;

la figura 16 muestra unos gráficos de los volúmenes de concentrado de agua para dispositivos de 30 kDa de MWCO y 50 kDa de MWCO y dispositivos Microcon™ comparables en función del tiempo de rotación a 14.000 G;

la figura 17 es un gráfico que muestra que los valores típicos de fuga de flujo de aire para dispositivos aceptables compuestos por las cinco configuraciones de dispositivo de membrana fueron menores de 0,35 centímetros cúbicos (cc) por minuto;

la figura 18 es un gráfico que muestra que el procedimiento de sobremoldeo unió satisfactoriamente los dos paneles para dar un solo dispositivo de una manera que demostró integridad de presión aceptable;

la figura 19 es un gráfico que muestra que los niveles del paso de proteínas promedio (proteínas que no deben pasar) fueron menores del 5%, lo que se considera que es un nivel de rendimiento aceptable;

la figura 20 es un gráfico que muestra que la proteína promedio que se recuperó fue mayor del 90% para los dispositivos que se sometieron a prueba, lo que se considera que es un nivel de rendimiento aceptable;

la figura 21 es un gráfico que muestra que el volumen total promedio de muestra que se recuperó para estos dispositivos fue mayor del 98% cuando se utilizó el procedimiento de rotación inversa;

la figura 22 es un gráfico que muestra los resultados del volumen de tope fijo promedio que se midieron cuando se hicieron rotar estos dispositivos durante 10 minutos;

la figura 23 es una vista desde abajo de la camisa sobremoldeada, que describe las proporciones relativas de la característica de brida ancha en comparación con la geometría global del portamuestras;

la figura 24 es una vista lateral de la camisa sobremoldeada, que describe las proporciones relativas de la característica de brida ancha en comparación con la geometría global del portamuestras;

la figura 25 es una vista lateral de portamuestras, que describe la ubicación de los orificios de drenaje y el espacio necesario entre las bridas anchas para garantizar el drenaje adecuado del filtrado durante las operaciones de rotación;

la figura 26 es una vista isométrica del pasador de núcleo utilizado como parte del procedimiento para sobremoldear dos paneles para dar un dispositivo; y

la figura 27 es una vista isométrica del receptáculo de termosellado, que incluye unas ranuras de alineación para el panel.

Descripción detallada de la invención

Considerando primero la figura 1, se muestra el dispositivo 10 de filtro. El dispositivo 10 incluye un depósito 11 de muestras para recibir una muestra no filtrada, y la primera y segunda membranas 12A y 12B dispuestas cada una en una pared lateral del dispositivo 10 tal como se muestra. Una cámara de concentrado 14 que define un volumen de tope fijo está prevista por debajo de las membranas 12A y 12B. Una punta de recogida 30 (figura 2) que generalmente presenta forma de arco y que sobresale hacia fuera desde el perímetro inferior del dispositivo puede proporcionarse para ubicar el volumen de tope fijo en la línea central del dispositivo, y posteriormente reducir la variabilidad del volumen de tope fijo cuando cambia el ángulo de orientación en una centrífuga. Preferentemente, el dispositivo 10 está compuesto por un material sólido que es impermeable a los líquidos, presenta bajas características de unión a proteínas, y es suficientemente fuerte como para resistir las fuerzas gravitacionales (G) aplicadas durante la centrifugación. Los materiales adecuados incluyen los materiales acrílicos, resina CYROLITE G20 HiFlo, resina ESTAR HN631 y polímeros KRATON. Los paneles laterales 15A, 15B (figura 3) 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.

Preferentemente, el dispositivo 10 se forma uniendo dos membranas de lámina plana a los paneles laterales 15A, 15B (figura 3), que entonces se sobremoldean para dar un alojamiento de un dispositivo. El panel lateral 15A (figura 4) incluye un soporte 16 de drenaje inferior que soporta la membrana y proporciona comunicación de fluido con la cámara de concentrado 14. Por ejemplo, el soporte 16 de drenaje inferior puede incluir una serie de acanaladuras, canales o texturas de superficie longitudinales separadas que están ubicadas por debajo de la membrana para capturar el filtrado cuando pasa a través de la membrana y dirigirlo hacia los orificios de drenaje y al interior de un vial receptor. El panel lateral 15B está configurado de manera similar. Cada membrana está sellada a un panel lateral 15A, 15B respectivo de modo que sólo el fluido que pasa a través de la membrana puede salir de los orificios de drenaje del dispositivo ubicado en los paneles laterales.

En determinadas formas de realización, cada membrana 12A, 12B es coextensiva con un soporte 16 de drenaje inferior respectivo y está sellada al mismo. Se pretende que la geometría del drenaje inferior soporte la membrana y la mantenga lo más plana posible, a la vez que permite un espacio abierto suficiente por debajo de la membrana para permitir que el fluido fluya y pase a través de los orificios de drenaje 18 del dispositivo. Se prefiere que la resistencia a los fluidos hidráulicos se mantenga lo más baja posible.

Las figuras 11, 12, 13 y 14 muestran ejemplos de patrones de superficie texturizada adecuados del drenaje inferior, tales como unos salientes cilíndricos elevados 16 (figura 13) o columnas de múltiples facetas que sobresalen hacia arriba desde el lado trasero del panel. La superficie superior de los salientes entra en contacto con y soporta la membrana a intervalos, lo que minimiza la extensión en el plano de la membrana durante las altas presiones que se generan durante las operaciones de rotación centrífuga. Estos también soportan la membrana y permiten que fluyan fluidos por debajo de la membrana y hacia fuera a través de los orificios de drenaje 18. Cuando la geometría del drenaje inferior soporta de manera inadecuada la membrana, los poros de la membrana pueden estirarse y llegar a alargarse. Estos tamaños de poros alargados ponen en peligro entonces las características de retención de la membrana. La realización de la figura 11 es una serie de formas irregulares elevada 16. La forma de realización de la figura 12 es un patrón cruzado que forma paralelogramos elevados 16. La forma de realización de la figura 14 es un patrón hexagonal de salientes elevados 16 que también puede utilizarse para formar una estructura de drenaje inferior. Los expertos en la materia apreciarán que estos patrones son únicamente ejemplos y que otros patrones adecuados están dentro del alcance de la presente invención.

Las membranas adecuadas incluyen unas membranas microporosas y ultraporosas, siendo estas últimas útiles para 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. La utilización de una membrana hidrófoba que presenta una microestructura "apretada" 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.

Preferentemente, cada membrana 12A, 12B (figura 1) está orientada formando un ligero ángulo con respecto a la línea central longitudinal del dispositivo 10, de 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 encontrado que es adecuado un ángulo mayor que aproximadamente 0º y menor que aproximadamente 5º, preferentemente de aproximadamente 3º.

El diseño de dos membranas una junto a la otra, de sección decreciente también presenta una característica de autolimpieza inherente, reduciendo la cantidad de incrustación de membrana durante la centrifugación.

El diseño de una junto a la otra, de sección decreciente también permite que las puntas de pipeta encajen fácilmente en el portamuestras desde la parte superior y que alcancen la parte inferior del dispositivo. Normalmente un usuario de este dispositivo utilizaría: a) punta de pipeta para extraer el volumen de concentrado deseado que se ha acumulado en la parte inferior del dispositivo, o b) hacer rotar de manera inversa el dispositivo en un vial o portador similar. El espacio en la parte inferior del dispositivo que contiene la muestra de concentrado se denomina habitualmente el volumen de tope fijo.

Tal como se observa en las figuras 3 y 5, cada uno de los paneles laterales 15A, 15B incluye uno o más orificios de drenaje 18 que están en comunicación fluídica con la cámara de concentrado 14 y permiten que el filtrado pase a través del alojamiento 10 del dispositivo para la recogida en otro alojamiento tal como un vial 75 (figura 7). En la forma de realización mostrada, se ilustran cuatro de dichos orificios de drenaje en cada uno de los dos paneles, aunque la invención no se limita de ese modo. Cada orificio de drenaje 18 está situado preferentemente en la parte inferior de una acanaladura o canal inferior de drenaje respectivo y es preferentemente de sección transversal sustancialmente circular. Los orificios de drenaje deberían estar situados a una distancia suficiente de los bordes laterales de los paneles 15A, 15B de modo que los orificios no se estrechen ni se alteren de manera perjudicial de otro modo durante una operación de termosellado que puede utilizarse durante la fabricación del dispositivo. Preferentemente, los orificios de drenaje 18 están separados equitativamente entre sí y son colineales.

Los paneles laterales 15A, 15B son preferentemente idénticos y están configurados para encajarse por encliquetado o a presión entre sí. Preferentemente, se utiliza un sello de laberinto para sellar los paneles laterales entre sí. Para este fin, un sello de laberinto a modo de ejemplo es una configuración de nervadura en acanaladura, en el que cada panel lateral incluye una acanaladura 19 formada a lo largo de un borde interno de la misma, y una nervadura 20 formada a lo largo del otro borde interno de la misma (figura 4). La acanaladura 19 y la nervadura 20 están configuradas de manera que cuando el panel lateral 15A se lleva en alineación con el panel lateral 15B, la nervadura 19 del panel lateral 15A y la acanaladura 20 del panel lateral 15B se enganchan, al igual que lo hacen la nervadura 19 del panel lateral 15B y la acanaladura 20 del panel lateral 15A, para bloquear los paneles laterales entre sí. Esta configuración de laberinto ayuda a garantizar que los paneles estén alineados simétricamente antes del sobremoldeo y durante todo el procedimiento de sobremoldeo; ayuda en la retención sobre un núcleo de molde y por tanto facilita el montaje automatizado y hace que el procedimiento de montaje sea más resistente a fallos de la máquina. La alineación de laberinto también funciona como una trampa de flujo de plástico, impidiendo que el material sobremoldeado entre en el volumen de muestra. La acanaladura 19 puede incluir una o más partes con un rebaje más profundo, cada una de las cuales recibe una parte correspondiente en la acanaladura con un saliente superior, para facilitar el ajuste a presión entre los dos paneles. Los expertos en la materia apreciarán que podrían utilizarse otros diseños para crear un encaje por encliquetado o a presión y un sello, tal como una serie de salientes separados que se acoplan con una serie de pocillos separados.

Las clavijas de alineación 86 y 87 (figura 3) están moldeadas de manera solidaria en la superficie exterior de cada panel para permitir que los paneles se alineen con precisión en el interior de un orificio de alineación en los elementos de fijación de receptáculo que se utilizan para mantener el dispositivo en su sitio durante la unión de la membrana y la recogida y colocación automatizadas. Puede utilizarse un procedimiento automatizado para mover los paneles a un módulo de unión de membrana, módulo de alineación de membrana, módulo de sobremoldeo y módulos de inspección de calidad en proceso. Una de las clavijas está diseñada para fijar los paneles en su sitio en un receptáculo 108 (figura 27), mientras que una segunda clavija 87 permite que el panel crezca en una dirección debido a los efectos de expansión térmica que pueden producirse durante el procesamiento. Las clavijas también proporcionan una característica de agarre de dedo que permite que los

operarios sujeten cómodamente el dispositivo mientras llevan guantes elastoméricos que pueden haberse tratado con agua o un disolvente de limpieza, y todavía pueden estar húmedos durante la manipulación. Las clavijas que sobresalen también ayudan a impedir que el dispositivo se deslice accidentalmente de las manos de un usuario.

La figura 3 muestra que se utiliza un procedimiento de sobremoldeo para fabricar el dispositivo 10. Los paneles laterales 15A, 15B también pueden incluir una brida moldeada superior 17 y unas bridas laterales 110 lo que ayuda a capturar mecánicamente la camisa sobremoldeada sobre los paneles. La brida 17 y la brida 110 forman anclajes que se utilizan para sujetar los paneles al plástico sobremoldeado formando así un dispositivo solidario y robusto. Esto mejora la resistencia a fallos de tensión circunferencial y presiones de rotura del dispositivo. De hecho, se ha demostrado que dicho dispositivo resiste presiones mayores que aproximadamente 1724 kPa (250 psi) (figura 18), muy por encima de las 207 a 552 kPa (de 30 a 80 psi) necesarias para el funcionamiento eficaz. Preferentemente, los paneles están compuestos por un polímero que presenta una temperatura de fusión mayor que la temperatura de fusión del material sobremoldeado. Estos materiales pueden incluir: poliestireno, materiales acrílicos, copolímeros de estireno-butadieno, acrilonitrilos de estireno, resina CYROLITE G20 HiFlo, resina ESTAR HN631 y polímeros KRATON. Estos materiales permiten que el procedimiento de sobremoldeo sea más robusto de manera que la transferencia térmica para dar el material premoldeado no conduce a distorsión térmica de la geometría de las partes premoldeadas, que pone en peligro la forma, el ajuste y la función globales del dispositivo.

La camisa sobremoldeada 111 (figura 3) puede incluir una brida ancha integrada 88 para ayudar a mantener la sección transversal de las paredes del vial en forma circular durante la centrifugación. La camisa une los dos paneles entre sí mediante una combinación de fusión térmica de los materiales termoplásticos y el interbloqueo mecánico de las bridas de panel 17 y las bridas 110. La camisa comienza en la parte superior del portamuestras 89 (figura 1), donde se añaden los fluidos al dispositivo y donde se utiliza una tapa 80 de vial (figuras 7 y 8) para cerrar el dispositivo tal como durante la rotación centrífuga. El diámetro interno de la camisa 89 (figura 1) está formado de manera continua alrededor de un pasador de núcleo 102 (figura 26) que ayuda a garantizar el control dimensional aceptable del sello de tapa 81 (figuras 7 y 8). Se utilizó una línea de separación en la superficie externa 91 (figura 1) a lo largo del eje longitudinal del dispositivo, pero se no utilizó a lo largo del diámetro interno con el fin de impedir “desalineaciones de la línea de separación”. Se producen habitualmente desalineaciones de la línea de separación cuando los moldes están diseñados para abrirse en dos mitades. La eliminación de la línea de separación en el diámetro interno del sobremolde ayuda a garantizar que no se producen huecos indeseables entre la tapa y el dispositivo. La ausencia de estos huecos ayuda a garantizar la forma, el ajuste y la función aceptables del sello a los fluidos en el portamuestras y la tapa de vial.

La camisa incluye un material sobremoldeado que mantiene el mismo diámetro desde la parte superior 112 del portamuestras (figura 2) hasta el borde inferior 113. El borde inferior de la camisa incluye una brida ancha integrada 88 (figura 3) que entra en contracto mecánicamente con el diámetro interno del vial receptor 85 (figura 7), y sujeta el portamuestras en el vial. Esta característica facilita las operaciones de rotación a alta velocidad en una centrífuga distribuyendo las cargas o tensiones generadas por el dispositivo en el reborde de un vial receptor.

Las figuras 23 y 24 muestran las proporciones relativas de la característica de brida ancha integrada 88 en comparación con la geometría global del portamuestras. La vista lateral muestra que la anchura de la característica de brida ancha 88 (figura 24) (por ejemplo, 6,35 mm (0,250 pulgadas)) es mayor que la anchura del sello sobremoldeado 115 (por ejemplo, 3,66 mm (0,144 pulgadas)), que fusiona los dos paneles entre sí para dar un dispositivo. Es necesario que la anchura de la brida ancha 88 sea por lo menos el 65% del diámetro externo del portamuestras 116 (figura 24) para garantizar que las tensiones se distribuyen y se transfieren adecuadamente al canto de soporte del vial 85 (figura 7). La anchura de la brida ancha 88 no debe ser de más de por lo menos el 80% del diámetro externo del portamuestras porque debe haber suficiente espacio 117 (figura 25) para que el filtrado drene fuera de los orificios de drenaje 18.

La transición 118 de la característica de brida ancha 88 (figura 25) comienza en una ubicación en el sello de sobremolde 119 que es aproximadamente igual a la mitad del diámetro del dispositivo. Las curvas de transición del sello de sobremolde son graduales de manera intencionada para minimizar las concentraciones de tensión. El diámetro externo de la característica de brida ancha 88 es igual que el diámetro externo en el canto superior del portamuestras. Esta característica permite que el portamuestras se invierta y se haga rotar en el mismo vial receptor tal como se muestra en la figura 9.

La brida ancha 88 proporciona un soporte de material suficiente para mantener el dispositivo en su sitio durante las operaciones de rotación centrífuga que pueden ser iguales o mayores de 10.000 G. Los experimentos han demostrado que la característica acampanada permitió que los dispositivos se hicieran rotar a cargas de rotación centrífuga de hasta 16.000 G durante una hora sin daño. Cuando no se utilizó la característica acampanada, algunos dispositivos se deformaron plásticamente y se colapsaron en la parte inferior del vial receptor. El análisis de fallos de los dispositivos mostró que la geometría acampanada era necesaria para mantener las paredes del

vial lo más circulares posible, y también para distribuir la tensión de contacto entre el dispositivo y el canto de soporte 85 de los viales por debajo de la tensión de fluencia plástica del vial.

Es necesario que el grosor de pared de la pared sobremoldeada en la parte superior del dispositivo 89 (figura 1) sea suficientemente grueso con el fin de impedir fracturas de separación debido a las tensiones que se generan en la tapa 80 de vial durante los procedimientos de rotación centrífuga. Un grosor adecuado es 1,12 mm (0,044 pulgadas). Cuando se presiona una tapa 80 de vial sobre el portamuestras para establecer un sello a los líquidos, se generan tensiones circunferenciales. Cuando se hacen rotar los dispositivos en una centrífuga a velocidades que generan 16.000 G o más, la masa de la tapa combinada con la característica de ajuste a presión crea tensiones circunferenciales a la tracción en el portamuestras. Si estas tensiones son suficientemente altas, la pared lateral del portamuestras se fractura a lo largo de la línea de soldadura. La línea de soldadura se refiere a la junta donde se encuentran y se fusionan entre sí los dos o más flujos del fundido de plástico durante el procedimiento de sobremoldeo.

La camisa sobremoldeada 111 (figura 3) puede realizarse utilizando aditivos colorantes diferentes que permiten que las diferentes configuraciones del dispositivo se diferencien por medio del color.

Con el fin de garantizar que los dispositivos no se fracturen, la pared del portamuestras debe ser suficientemente gruesa para impedir: a) la deformación elástica que permitiría que las tapas se abrieran (lo que es indeseable), y b) la deformación plástica y la rotura que permitiría la fuga del fluido de muestra (lo que también es indeseable). Para el material de baja unión a proteínas de elección (copolímero de estireno-butadieno) se encontró adecuado un grosor de pared de al menos 0,89 mm (0,035 pulgadas).

Cuando se aumenta el grosor de pared 89 (figura 1), se reduce el volumen interno (figura 1) del portamuestras hasta niveles indeseables. Volúmenes de muestra de menos de 0,45 ul son indeseables comercialmente. Se considera que tener un dispositivo que presenta un volumen de muestra de hasta 0,5 ul es deseable y es de valor comercial estratégico.

En algunos casos de prueba, se utilizó el aumento de la temperatura de la base de molde desde 32,22ºC (90ºF) hasta 51,67ºC (125ºF) durante el sobremoldeo para fusionar más eficazmente las líneas de soldadura entre sí y lograr mayor resistencia mecánica. Debe tenerse cuidado para garantizar que cualquier calor adicional utilizado no haga que la parte inferior de los paneles se funda y se colapse (lo que es indeseable).

Es necesario que los dos paneles del dispositivo sean suficientemente gruesos y suficientemente rígidos para soportar la presión de sobremoldeo en la parte delantera de los paneles y en el centro de los paneles. Experimentos que utilizan la geometría actual y el material de estireno-butadieno revelaron que era necesario un grosor de pared de al menos 1,49 mm (0,0595 pulgadas) para impedir la deformación y el colapso inaceptables. Este grosor y una resistencia mecánica de pared adecuada eran necesarios aunque los paneles se soportaran por un pasador de núcleo 102 de acero (figura 26) durante el procedimiento de sobremoldear los paneles para dar el dispositivo completado. La superficie del pasador que está más cerca de la superficie de membrana 103 se alivió para garantizar que la membrana nunca entra en contacto con el pasador de núcleo 102 (figura 26). La capa de retención de las membranas puede dañarse cuando la membrana entra en contacto con pasadores de núcleo y puede arañarse cuando las partes se extraen del sobremolde.

Para impedir que las membranas se separen de los paneles y se arañen por la superficie del pasador de núcleo 102, el pasador se fabricó con orificios de ventilación 104 que permiten que el aire de la cavidad de molde se evacúe a través del centro del pasador de núcleo. Este diseño de pasador de núcleo único permite el sobremoldeo de los dispositivos de manera que no se presuricen en exceso ni se separe la membrana unida de los paneles.

Debe prestarse atención especial al diseño de accesos de enfriamiento en la cavidad sobremoldeada. Durante algunos experimentos se observó que cuando la temperatura del material de sobremolde, tal como se mide mediante la temperatura del molde de base a 32,22ºC (90ºF), se aumentó en solo 19,45 K (35 grados F) a 51,67ºC (125ºF), el calor adicional que fluyó al interior de los paneles hizo que comenzaran a fundirse y colapsarse sobre el pasador de núcleo. En los casos más extremos, los paneles premoldeados se deformaron suficientemente como para cerrar completamente los orificios de drenaje. En algunos casos, los efectos de calor fueron suficientes para permitir que los paneles se alejaran ligeramente de la cavidad sobremoldeada y permitir que el plástico se fugara y fluyera sobre la pared exterior del panel. En algunos casos, la fuga fue suficientemente pequeña como para que los dispositivos fueran todavía de buena calidad. En los peores casos, el plástico fluyó todo el recorrido hasta los orificios de drenaje y los llenó parcialmente. Esto se consideró indeseable, porque el flujo a través de los orificios de drenaje estaba restringido.

Los efectos adversos del calor sobre el panel premoldeado pueden superarse mejorando el enfriamiento térmico de la cavidad de molde y el pasador de núcleo, y utilizando una compuerta de válvula en el acceso 92 de inyección de plástico (figuras 1 y 23) en lugar de utilizar compuertas de borde estrecho. Las compuestas de borde estrecho crean altos niveles de flujo de flujo de cortadura en el plástico, lo que genera más calor. Estos

flujos de cortadura pueden reducirse utilizando una compuerta de válvula, que presenta un área de flujo en sección transversal mayor. Esta área aumentada reduce los efectos de calentamiento de cortadura y permite que la cavidad sobremoldeada se llene más fácilmente.

Las compuertas de válvula se utilizan en moldes de inyección para dirigir el flujo del polímero de plástico fundido desde el canal caliente al interior de la cavidad de molde. Para lograr los mejores resultados de moldeo, este flujo de polímero debe dirigirse hacia una superficie sólida en la cavidad de molde tal como un pasador de núcleo 95 (figura 10) y 105 (figura 26). Es necesario que este flujo se divida en remolinos turbulentos para impedir marcas y chorros del flujo de material, lo que podría dar aspereza a la superficie de las partes terminadas.

Los efectos adversos del calor de sobremoldeo también pueden superarse colocando líneas de enfriamiento más cerca de la superficie de la parte e incluyendo líneas de enfriamiento térmico en el pasador de núcleo. Esto puede llevarse a cabo habitualmente utilizando fluidos de enfriamiento habituales tales como agua o disoluciones de propilenglicol.

Los efectos adversos del calor también pueden superarse utilizando piezas de inserción de molde que presentan mayores valores de conductividad térmica. Los materiales que presentan una conductividad térmica mayor permitirán que el calor se aleje de las partes más eficazmente que cuando se utilizan materiales que presentan una conductividad térmica menor. Estas piezas de inserción se fijan habitualmente en la cavidad de molde, y ayudan a transferir calor de un premolde más eficazmente que cuando se utiliza un tipo de acero. Normalmente las piezas de inserción pueden obtenerse utilizando metales, tales como berilio, cobre y aluminio.

La figura 10 muestra cómo la fuga que puede producirse en la parte delantera del panel puede superarse añadiendo un saliente 93 sobre la superficie externa del panel, que actúa como un sello. Esta característica de sello puede moldearse de manera solidaria en la superficie externa del panel y funciona como un sello de junta tórica mecánica. Cuando la cavidad sobremoldeada se cierra sobre los paneles, la pared de la cavidad establece un estrecho contacto con la característica de sello moldeada de manera solidaria. Este sello ayuda a impedir la fuga de plástico al interior de los orificios de drenaje 18 del portamuestras.

Preferentemente, el pasador de núcleo 102 (figura 26) está compuesto por un material de acero endurecido. Aunque la utilización de un pasador de núcleo compuesto por acero P20, endurecido hasta una dureza Rockwell de 32-34 Rc, puede ser apto para obtener satisfactoriamente un pequeño número de dispositivos, el pasador de núcleo puede deformarse en última instancia, lo que pone en peligro la resistencia mecánica a la rotura del alojamiento de los dispositivos tal como se mide por la presión de rotura del alojamiento. Por consiguiente, preferentemente el material del pasador de núcleo es un acero H13 endurecido hasta una dureza Rockwell de 53-54 Rc, que es más duradero. Por tanto, es necesario controlar cuidadosamente la dureza del material y la geometría del diseño del pasador de núcleo para obtener satisfactoriamente dispositivos a escala comercial.

También es muy importante controlar los siguientes factores durante el procedimiento de sobremoldeo para garantizar que se obtiene un buen dispositivo:

A. El diseño y la forma del pasador de núcleo deben sujetar firmemente los paneles de tal manera que la superficie de los pasadores de núcleo 103 (figura 26) no entre en contacto y dañe la superficie de retención de la membrana.

B. El diseño, la forma y selección de materiales para el pasador de núcleo deben garantizar que se logra el enfriamiento adecuado durante operaciones de moldeo continuas. Un enfriamiento inadecuado dará como resultado la deformación térmica de los paneles.

C. El diseño, la forma y la selección de materiales para el pasador de núcleo también deben garantizar que no se producen deformaciones indeseables realizando las operaciones de moldeo continuas. La rigidez se logró satisfactoriamente incluyendo en el diseño del pasador de núcleo agarres 106 de soporte, que rigidizaron el diseño global y redujeron las deformaciones laterales. El extremo 105 del pasador de núcleo 102 debe ser suficientemente fuerte y suficientemente rígido como para empujar la parte delantera de los paneles al interior del sobremoldeado y asentar apropiadamente los paneles en el interior de la cavidad de molde 96 para impedir que los paneles se empujen alejándose de la compuerta 97 de válvula de inyección durante el sobremoldeo.

D. Debe minimizarse el huelgo 98 (figura 10) entre las clavijas de alineación de soporte en los paneles premoldeados y el rebaje 99 en el panel sobremoldeado. Esto es necesario para impedir que los paneles se alejen de la compuerta de válvula de inyección durante las operaciones de sobremoldeo.

E. Debe controlarse cuidadosamente el hueco 100 de huelgo (figura 10) entre los paneles premoldeados y la cavidad de sobremolde y mantenerse a un mínimo con el fin de impedir fugas indeseables del material sobremoldeado a lo largo de la pared exterior de los paneles.

F. Deben controlarse cuidadosamente las dimensiones de la superficie de contacto de sello entre los paneles y la cavidad de sobremolde para garantizar las buenas calidades de cierre, lo que impide la fuga de plástico al interior de los orificios de drenaje 18 (figura 3) y al interior del área de membrana 12A y 12B (figura 1).

G. El ajuste de los parámetros del procedimiento utilizados para sobremoldear puede proporcionar mejoras graduales hacia impedir la fuga indeseable del material de polímero a través de la superficie de contacto de sello entre los paneles y la cavidad de sobremolde. Estos parámetros de procedimiento consisten en: a) temperatura de interrupción de resina durante el moldeo, b) temperatura de la base de molde y c) utilización de contrapresión durante el moldeo. Sin embargo, la realización de ajustes a estos parámetros de procedimiento no es un sustituto para dimensionar apropiadamente la superficie de contacto de sello entre los paneles y la cavidad de sobremolde.

H. El tamaño y la forma del pasador de núcleo deben garantizar que hay suficiente huelgo entre las superficies 103 (figura 26) del pasador de núcleo 102 y las membranas 12A y 12B (figura 1) que se unen a los paneles, para garantizar que las dos no entran en contacto durante el procedimiento de sobremoldeo. Cualquier contacto puede dar como resultado un daño grave en la capa de retención de la membrana, lo que puede poner en peligro el rendimiento global del dispositivo.

I. El tamaño y la forma del pasador de núcleo también deben garantizar que hay una cavidad 107 de rebaje (figura 26) con huego suficiente en la punta 105 del pasador de núcleo 102 para soportar la característica 25 de cúpula (figuras 1 y 6) que está moldeada de manera solidaria para dar la tapa de cada panel.

Para obtener buenos paneles premoldeados, es necesario colocar una compuerta de válvula de molde de inyección en la parte delantera 92 (figura 23) de los paneles cerca de los orificios de drenaje para garantizar la mejor integridad estructural del dispositivo global. Situar la válvula en la parte delantera de los paneles permite el flujo de material de plástico al interior del molde y coloca preferentemente las líneas de soldadura del material en la estructura de drenaje inferior, y no a través del área donde se une la membrana. Permitir que se produzcan líneas de soldadura en el sitio de unión de la membrana pone en peligro el rendimiento de retención de los dispositivos. Los procedimientos de calentamiento utilizados para unir el material de membrana pueden hacer que las líneas de soldadura se abran de un modo indeseable, lo que permite que los fluidos se fuguen alrededor del sello.

Las probetas de membrana se troquelan utilizando un conjunto de troquel adaptado, automatizado, con el fin de lograr la precisión dimensional de una probeta a otra que se necesita. El procedimiento de troquelado, recogida y colocación y termosellado de las probetas automatizados es muy importante para la fabricación de estos dispositivos. Los procedimientos automatizados ayudan a reducir el daño de superficie que puede producirse en la capa de retención de las probetas de membrana. El procesamiento automatizado también ayuda a reducir el contenido de trabajo de la fabricación de estos dispositivos en comparación con utilizar procedimientos de fabricación manuales. Los efectos adversos de la variabilidad de un operario a otro también se reducen cuando se utilizan procedimientos de fabricación automatizados.

El borde 89 de parte superior (figura 1) del dispositivo portamuestras debe diseñarse específicamente para formar un canto continuo durante el sobremoldeo. El diámetro interno 90 del portamuestras debe formarse en un pasador de núcleo 102 (figura 26), lo que garantiza que se forma una superficie de sellado lisa y uniforme. Esto garantiza que se logran buenas cualidades de sellado entre el portamuestras y la tapa de vial. Puesto que el diseño sobremoldeado requiere que pueda utilizarse un molde de dos partes, la línea de separación para las mitades del molde debe está colocada 90 grados alejada de las línea de soldaduras de plástico. Este diseño ayuda a impedir la alineación de tensiones de moldeo residuales, líneas de soldadura y líneas de separación. Esta característica permite que el portamuestras soporte mayores tensiones durante la rotación centrífuga. Las mayores capacidades de tensión permiten que se utilicen mayores velocidades de rotación, lo que permite que se logren tiempos de filtración más cortos. Estas características combinadas proporcionan una oferta de valor única para los clientes.

Una característica de sello de laberinto 19 y 20 (figura 4) está diseñada específicamente en el borde de cada panel para: a) facilitar la alineación de los dos paneles 15A y 15B (figura 3) durante el montaje, y b) controlar e impedir la entrada indeseable de plástico durante el sobremoldeo. Tal como se mencionó anteriormente, una característica de sello de laberinto a modo de ejemplo incluye una geometría elevada en un lado de la línea 20 central del panel (figura 4) y una geometría 19 rebajada idéntica 19 (figura 4) en el otro lado de la línea central. La forma de esta característica es preferentemente simétrica alrededor del eje central de los paneles, lo que permite que una cavidad de molde obtenga los dos paneles que se montarán para dar un dispositivo. Esto ayuda a reducir el coste de tener que moldear dos paneles separados para lograr el mismo conjunto. La característica de sello también crea una trayectoria tortuosa entre el volumen interno de dos paneles montados y el espacio externo que rodea a los paneles. La trayectoria tortuosa ayuda a sellar el borde de los paneles cuando se cierra el sobremolde, lo que permite que el plástico del sobremolde fluya y selle los dos paneles entre sí. Esta trayectoria tortuosa ayuda a impedir que el plástico del sobremolde fluya al interior del volumen interno del portamuestras.

La forma y la ubicación de los orificios de drenaje 18 en los paneles se diseñaron específicamente para ayudar a lograr las bajas variaciones en los volúmenes de tope fijo, el flujo de fluido aceptable y la durabilidad aceptable del molde. Los pasadores de núcleo utilizados para formar los orificios de drenaje se diseñaron con un ángulo de desmoldeo de 5 grados en cada lado. Este ángulo de desmoldeo mejora la resistencia mecánica del pasador y permite que los pasadores se separen fácilmente de los paneles moldeados. El ángulo de desmoldeo también crea un orificio de sección decreciente, de manera que el lado más abierto del orificio estaba situado en la parte interna de los paneles. Los orificios de drenaje son todavía de sección transversal sustancialmente circular. El orificio se estrecha cuando el fluido sale hacia la superficie de descarga y fuera del dispositivo. El orificio de sección decreciente ayuda a mejorar el flujo de fluido a través de los orificios de drenaje utilizando efectos de sección contraída.

Los efectos de sección contraída describen el flujo de fluido laminar a través de un orificio, donde la ecuación de Bernoulli predice que el área de sección transversal de la corriente de fluido se estrecha o se reduce cuando un fluido newtoniano pasa a través de un orificio. El flujo de fluido se vuelve más eficaz cuando la superficie del orificio sigue la línea de corriente del flujo de fluido. Se produce menos separación de flujo, lo que reduce las apariciones de flujos de fluido recirculantes. La reducción de flujos de fluido recirculantes puede ayudar a reducir la formación de burbujas de gas arrastradas en la corriente de fluido, lo que puede conducir a espumación. La espumación del filtrado en el vial de recepción es indeseable porque puede hacer que el fluido se absorba de vuelta al portamuestras cuando se detiene la centrífuga.

La cámara de concentrado 14 (figura 4) define un volumen de tope fijo donde la muestra de concentrado se recoge y puede recuperarse. Preferentemente, la cámara de concentrado incluye una discontinuidad tridimensional que sobresale fuera de la pared interior, tal como un saliente con forma de montura 25 (por ejemplo, en figuras 4 y 6), para ayudar a situar el volumen de tope fijo en la línea central del dispositivo, y reducir la variabilidad del volumen de tope fijo cuando cambia el ángulo de orientación en la centrífuga. Más específicamente, la configuración con forma de embudo en la parte inferior del portamuestras y la discontinuidad ayudan a situar el fluido de concentrado en un espacio más pequeño en la parte inferior del volumen de tope fijo. Situar este fluido en un espacio más pequeño facilita la retirada más completa del fluido del dispositivo cuando se utiliza una pipeta. Si no se utilizara esta geometría en el dispositivo, un usuario tendría que mover una pipeta hacia delante y hacia atrás a través de la parte inferior del volumen de tope fijo utilizando uno o más pasos. Además, la configuración con forma de túnel y la discontinuidad también reducen la variación en el volumen de tope fijo que se produce cuando el portamuestras se orienta en ángulos diferentes en la centrífuga.

La altura y la forma de la discontinuidad 25, tal como un saliente con forma de montura, se determinaron tal como sigue. El portamuestras se situó en un tubo receptor y se orientó de manera diferente en dos grados de libertad. En el primero de esos grados de libertad, el eje de línea central del dispositivo se alineó con la orientación de un rotor de ángulo fijo utilizado en la centrifugación. Normalmente, los ángulos fijos son de entre 35 y 45 grados con respecto a la posición vertical. A través de ensayo y error, se determinaron una altura y una forma óptimas de la discontinuidad que logró la menor variación en el volumen de tope fijo.

En el segundo grado de libertad, el portamuestras se situó en un tubo receptor y se situó en un rotor de ángulo fijo. En estas condiciones, el portamuestras todavía podía rotar sobre su eje de línea central en un número infinito de ángulos entre 1º y 360º. Por tanto, se eligieron dos de las orientaciones más extremas; a) una orientación frontal donde los dos planos de membrana están colocados lo más verticalmente posible, y b) una orientación lateral donde los dos planos de membrana están colocados lo más cerca posible al ángulo del rotor, lo que normalmente puede ser de entre 35 y 45 grados. De nuevo a través de ensayo y error, se determinaron una altura y una forma del saliente que logra la menor variación en el volumen de tope fijo.

Una altura adecuada de la forma de lágrima 25 es de 0,51 mm (0,020 pulgadas). La tabla 2 resume los resultados de pruebas que compararon el rendimiento de un dispositivo centrífugo según determinadas formas de realización de la presente invención con un dispositivo Microcon® de Millipore convencional. Para esta prueba se consideraron dos configuraciones de membrana diferentes: membrana de 30 kDa y membrana de 50 kDa. Los resultados mostraron que los presentes dispositivos filtraban el agua mucho más rápido que los dispositivos Microcon®, tal como se esperaba debido al área de membrana disponible aumentada. Los gráficos mostraron que los dispositivos Microcon® continuaron filtrando agua hasta que se alcanzó la condición de sequedad donde no queda agua, aguas arriba del filtro. Los presentes dispositivos continuaron filtrando agua hasta que se alcanzó el volumen de tope fijo diseñado. Estos datos demuestran que el presente dispositivo puede utilizarse para filtrar y concentrar muestras hasta un volumen de tope fijo específico sin tener que preocuparse sobre la filtración hasta la sequedad, que puede poner en peligro la recuperación de la muestra.

En determinadas formas de realización, el concentrado se recupera utilizando una operación de rotación inversa, en la que el dispositivo 10 (figura 9) se sitúa en un portadispositivos 75 tal como un vial u otro alojamiento adecuado de manera invertida, y se somete a una fuerza de accionamiento tal como centrifugación, que fuerza al fluido de concentrado desde la cámara de concentrado 14 y al interior del portadispositivos 75. Tal como se observa mejor en la figura 9, el portadispositivos 75 es de sección transversal preferentemente cilíndrica con un

diámetro suficientemente ancho como para albergar el dispositivo 10 de filtro tanto en un modo de rotación directa (figura 8) como en un modo de rotación inversa (figura 9). Preferentemente, el dispositivo 10 de filtro se ajusta cómodamente dentro del portadispositivos 75. El portadispositivos 10 puede incluir un reborde 85, que es preferentemente anular, y sirve para formar una parte de diámetro interno más pequeño del portador 75 para proporcionar un tope, que limita el grado en que el dispositivo de filtro puede insertarse en el portador 10 (en cualquiera del modo de rotación o el modo de rotación inversa). Por tanto, en el modo de rotación de la figura 8, la brida superior 76 del dispositivo 10 de filtro permanece fuera del portador 75, y en el modo de rotación inversa de la figura, la parte inferior del dispositivo 10 permanece fuera del portador 75 tal como se muestra. Cuando el dispositivo 10 de filtro está así colocado en el portadispositivos 75, debe quedar suficiente volumen 77 por debajo del dispositivo 10 de filtro para recibir producto líquido suficiente obtenido durante una operación de rotación inversa.

El diseño y la forma del reborde dentro del vial son muy importantes para el ajuste de forma y la función del dispositivo. Pueden lograrse los niveles más altos de carga centrífuga cuando se utiliza un diseño de anillo 85 circunferencial continuo. Cuando se utiliza un diseño de reborde discontinuo, son posibles niveles menores de carga centrífuga. Esta menor capacidad reduce la capacidad para realizar operaciones de filtración a mayores velocidades en la centrífuga.

El portadispositivos o vial receptor incluye preferentemente una tapa 80, que puede estar montada de manera solidaria en el portador 10 tal como se muestra. La tapa debe estar dimensionada tanto para tapar el portadispositivos 75 cuando el dispositivo 10 de filtro no está colocado en el portador, como para tapar el dispositivo 10 de filtro cuando está colocado en el portador en el modo de rotación tal como se muestra en la figura 8. Para ese fin, la tapa 80 puede incluir una primera parte cilíndrica más pequeña 81 que presenta un diámetro externo ligeramente más pequeño que el diámetro interno tanto de la parte superior del portadispositivos como de la parte superior del dispositivo de filtro, y una segunda parte cilíndrica más grande 82 que presenta un diámetro externo más grande que el diámetro externo de la primera parte cilíndrica más pequeña 81. El diámetro de la parte cilíndrica más grande 82 (figura 9) preferentemente es todavía suficientemente pequeña como para ajustarse dentro del portadispositivos 75 (figura 7), pero es suficientemente grande como para no ajustarse dentro del dispositivo 10 de filtro (figura 8). Preferentemente, hay un volumen de revolución rebajado 90 (figura 1) formado en el diámetro interno del portamuestras 10. Este rebaje forma una cavidad, que facilita la inserción, la retención de y el ajuste a presión de la tapa 80 de vial.

Los tiempos de centrifugación no están limitados particularmente, y abarcan generalmente entre aproximadamente 1 minuto y 10 minutos. El dispositivo de filtración y el portadispositivos 75 pueden proporcionarse al usuario final en forma de kit envasado, junto con instrucciones para el montaje y la utilización.

En determinadas formas de realización, la recuperación de la muestra puede llevarse a cabo insertando una pipeta y una punta en el alojamiento, y más específicamente, en la cámara de concentrado 14, y retirando el filtrado del mismo.

Un procedimiento apto para fabricar dispositivos según determinadas formas de realización es el siguiente:

1) Moldear los paneles de antemano.

2) Troquelar probetas de membrana a partir de existencias en rollo de membrana.

3) Colocar las probetas sobre los paneles y en su sitio en los paneles utilizando calor, presión y tiempo.

4) Inspeccionar visualmente el submontaje resultante para garantizar la alineación adecuada de las probetas en los paneles, la calidad global de la unión de las probetas y la ausencia de suciedad y residuos extraños.

5) Situar los submontajes de paneles en las cavidades A 96 (figura 10) y B (figura 10) del sobremolde.

6) Cerrar ambos lados A y B del sobremolde para llevar los paneles en contacto y sellar el borde de laberinto de los paneles.

7) Insertar el pasador de núcleo en la cavidad de sobremolde en tal manera que: a) los paneles se empujan al interior de la parte inferior del sobremolde y se fijan en su sitio, b) las probetas de membrana unidas no resultan dañadas, y c) se mantienen los requisitos de dimensión del dispositivo de terminación.

8) Inyectar el plástico de sobremolde en la cavidad de molde.

9) Abrir el sobremolde y retirar el dispositivo de las cavidades de molde en A y B.

10) Expulsar el dispositivo del pasador de núcleo.

11) Verificar la integridad del procedimiento de unión de membrana utilizando un instrumento de disminución de presión de gas.

12) Transportar los dispositivos a un instrumento y obtener mediante tampografía satisfactoriamente marcas de graduación sobre el lateral del dispositivo.

13) Embalar el dispositivo en una bolsa flexible y una caja diseñadas de manera adecuada.

Un procedimiento apto para concentrar muestras utilizando el dispositivo incluye lo siguiente:

1) Extraer el dispositivo portamuestras y el vial receptor de sus envases.

2) Insertar el dispositivo portamuestras en un vial receptor.

3) Pipetear la disolución de muestra en el depósito portamuestras (por ejemplo, un valor máximo de 0,5 ml), sin tocar la membrana con la punta de pipeta. Tirar de la tapa que está unida al vial receptor sobre el dispositivo portamuestras, y ajustar a presión en su sitio para garantizar un buen sello entre la tapa y el portamuestras.

4) Situar el dispositivo portamuestras y el depósito en una centrífuga compatible y tener cuidado de compensar el rotor con un dispositivo similar.

5) Hacer rotar el dispositivo en la centrífuga utilizando las “directrices centrífugas” del proveedor para tener en cuenta los tiempos y velocidades de rotación correctos para la aplicación.

6) Tras completar este procedimiento de rotación, retirar el portamuestras y el depósito de la centrífuga. Separar el vial del dispositivo portamuestras levantándolo hacia arriba y fuera del depósito sin derramar el contenido del portamuestras o depósito.

7) Situar el depósito portamuestras boca abajo en un nuevo vial receptor sin permitir que nada del volumen de concentrado 14 caiga o se pierda. Hacer rotar el conjunto de portamuestras y vial durante tres minutos a 1000xG (o pulsar brevemente) para transferir el concentrado al vial.

8) Retirar el portamuestras y el vial de la centrífuga. Separar el dispositivo portamuestras del vial. Cerrar a presión la tapa sobre el vial receptor, y almacenar el producto de manera responsable para su utilización posterior.

La figura 15 y la tabla 1 muestran los resultados de pruebas de rendimiento de flujo de agua utilizando el procedimiento de filtración mencionado anteriormente. Estos resultados demuestran que los dispositivos filtraron satisfactoriamente la muestra de agua tal como estaba previsto, y que concentraban la muestra hasta un volumen de tope fijo específico. Los dispositivos no permiten que la muestra se filtre hasta la sequedad. En lugar de filtrar hasta la sequedad, la muestra se concentra para dar el volumen de tope fijo en la parte inferior del dispositivo portamuestras y el concentrado puede retirarse utilizando una pipeta o una operación de rotación inversa. Los datos también muestran que las estructuras de membrana más abiertas, tales como los dispositivos de 100 K, presentan una velocidad de flujo más rápida que los dispositivos que presentan una estructura de membrana menos abierta tales como los dispositivos que contienen membrana que presenta 3 kDa de MWCO.

La capacidad para concentrar disoluciones de muestra hasta un volumen de concentración conocido o volumen de tope fijo sin riesgo de secar la muestra ofrece un valor importante para los usuarios. Utilizando este dispositivo, los clientes pueden concentrar sus muestras de manera rigurosa sin requerir que monitoricen continuamente el procedimiento de concentración. Esencialmente, pueden encender la centrífuga durante un periodo de tiempo especificado, marchase y saber con confianza que sus muestras se concentrarán según lo deseado. Cuando se utilizan otros dispositivos que no presentan una característica de tope fijo, los usuarios corren el riesgo de secar sus muestras lo que puede poner en peligro la utilidad de la muestra y el análisis posterior.

Tabla 1. Datos que apoya la figura 15, que demostraron el rendimiento del flujo de agua del dispositivo de 0,5 ml Amicon Ultra realizado en PTI, utilizando membranas que presentaban cinco valores diferentes (3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa y 100 kDa) de puntos de corte de peso molecular (MWCO).

MCWO	Tiempo	Ret. promedio	Desv. estándar
3.000	1	373	7,5
	2	281	19,6
	4	173	5,1
	8	96	7,7
	12	71	6,0
	20	42	2,6
	30	26	1,3

10.000	1	236	5,3
	2	136	5,0
	4	76	8,6
	8	38	2,6
	12	22	0,8
	20	14	2,6
	30	8	1,0
100.000	1	46	1,8
	2	31	2,5
	4	27	9,5
	8	21	4,3
	12	16	0,5
	20	17	2,9
	30	14	4,1
30.000	1	128	6,7
	2	66	1,2
	4	40	1,2
	8	24	1,0
	12	18	1,3
	20	16	0,8
	30	14	1,3
50.000	1	83	2,4
	2	43	4,5
	4	29	1,9
	8	19	1,0
	12	17	0,5
	20	15	0,5
	30	14	1,0

Estos resultados demuestran que la inmensa mayoría de los dispositivos que se realizaron facilitaron los niveles de rendimiento que se habían seleccionado como objetivo. En la mayoría de los casos, la recuperación de proteínas fue mayor del 90%. En los casos en que las recuperaciones de proteínas fueron menores del 90%, un análisis de los dispositivos indicó que la capa de retención de la membrana se había dañado. En algunos casos, el daño se produjo debido al contacto entre la membrana y el pasador de núcleo. En algunos casos, las probetas de membrana se alinearon de manera inadecuada sobre los paneles en el procedimiento de unión, lo que permitió que se produjera la fuga de proteínas. En otros casos, el daño puede haberse producido debido a la manipulación manual en el sitio donde se unió la membrana o en el sitio donde se realizó el sobremoldeo.

La figura 16 muestra claramente que el dispositivo filtra agua mucho más rápido que el dispositivo de tipo Microcon®. Los datos también muestran que el dispositivo filtra los fluidos de muestra hasta un volumen de tope fijo conocido lo que ayuda a impedir condiciones de secado, mientras que el dispositivo Microcon permite que se filtren volúmenes de muestra hasta la sequedad, lo que en la mayoría de los casos es indeseable.

Las figuras 17 a 22 presentan ***los resultados de pruebas que se realizaron en dispositivos que se obtuvieron utilizando moldes piloto para los paneles que consistieron en un molde de 4 cavidades, que se utilizó para simular lo más estrechamente posible una herramienta de moldeo de producción. De manera similar, la herramienta de sobremolde piloto consistió en un molde de 2 cavidades, que se utilizó para simular lo más estrechamente posible las herramientas de producción con la excepción del sistema de manipulación de panel. Para las operaciones piloto, los paneles se cargaron manualmente en la herramienta de sobremolde a mano, mientras que en las operaciones de producción los paneles se cargarían en los moldes de producción utilizando instrumentos robóticos.

Estas figuras presentan los resultados de pruebas de rendimiento en muestras de los dispositivos que se obtuvieron utilizando moldes piloto. Las pruebas se realizaron en dispositivos que representan las cinco configuraciones de membrana-dispositivo que son de interés. Las pruebas consistieron en: a) prueba de fuga de aire, b) porcentaje de paso de proteínas, c) porcentaje de proteínas recuperadas, d) volumen de tope fijo tras 10 minutos de rotación a 14.000 G, e) volumen total de muestra recuperado y f) presión de rotura del alojamiento.

Tabla 2

	Promedio					Des. estándar				
	3 K	10 K	30 K	50 K	100 K	3 K	10 K	30 K	50 K	100 K
Velocidad de fuga cc/min	0,131	0,105	0,097	0,092	0,092	0,056	0,055	0,056	0,061	0,052
% de paso de proteínas	0,163	0,223	2,080	3,472	1,508	0,186	0,358	1,345	0,798	0,607
% de recuperación de proteínas	97,8	95,4	96,2	92,8	90,0	1,250	1,441	1,368	2,016	2,498
Volumen de tope fijo	0,069	0,034	0,023	0,019	0,017	0,003	0,002	0,001	0,001	0,001
% de volumen total recuperado	98,6	98,5	98,7	98,6	98,7	0,446	0,265	0,628	0,464	0,375
Rotura del alojamiento	296,4	297,0	286,0	275,3	292,9	25,279	15,079	17,442	15,851	12,170

Las membranas de interés se unieron a los paneles piloto y más tarde se sobremoldearon para dar dispositivos. Estos dispositivos se sometieron a prueba entonces para determinar la integridad de sello utilizando un dispositivo de prueba de fuga de presión. Se aplicó una presión de aire de 30 psi a los dispositivos y se midió la velocidad de fuga del aire a través de la membrana. La figura 17 muestra que las cinco configuraciones de membrana-panel diferentes demostraron integridad de unión de membrana aceptable. Estos paneles se embalaron entonces cuidadosamente y se enviaron a la instalación de moldeo para el sobremoldeo final para dar dispositivos.

La figura 17 también muestra que los valores típicos de fuga de flujo de aire fueron menores de 0,35 centímetros cúbicos (cc) por minuto. Este límite, para aceptar y rechazar partes, se determinó evaluando los resultados de más de n=50 dispositivos que se determinó que eran aceptables, tal como se midió por un rendimiento de retención de proteínas aceptable. Este límite representa el límite de control superior (tres desviaciones estándar por encima del valor promedio) de la población de muestras.

La figura 18 muestra que el procedimiento de sobremoldeo unió satisfactoriamente los dos paneles para dar un solo dispositivo de una manera que demostró integridad de presión aceptable. Los datos muestran que la presión de rotura promedio del alojamiento para n=100 dispositivos que se obtuvieron utilizando las cinco membranas de interés o más de 250 psi. Se sometieron a prueba al menos n=20 dispositivos utilizando cada una de las configuraciones de membrana-panel (3 kDa de MWCO, 10 kDa de MWCO, 30 kDa de MWCO, 50 kDa de MWCO, y 100 kDa de MWCO).

La figura 19 muestra que los niveles del paso de proteínas promedio (proteínas que no deben pasar) fueron menores del 5%, lo que se considera que es un nivel de rendimiento aceptable. Se sometieron a prueba al menos n=24 dispositivos utilizando cada una de las cinco configuraciones de membrana-panel diferentes.

La figura 20 muestra que la proteína promedio que se recuperó fue mayor del 90% para los dispositivos que se sometieron a prueba. Se sometieron a prueba al menos n=24 dispositivos utilizando cada una de las cinco configuraciones de membrana-panel diferentes.

La figura 21 muestra que el volumen total promedio de muestra que se recuperó para estos dispositivos fue mayor del 98% cuando se utilizó el procedimiento de rotación inversa. Se sometieron a prueba por lo menos n=24 dispositivos utilizando cada una de las cinco configuraciones de membrana-panel diferentes.

La figura 22 muestra los resultados del volumen de tope fijo promedio que se midieron cuando estos dispositivos se centrifugaron durante un tiempo de 10 minutos. Los resultados muestran que tres de las configuraciones de membrana-dispositivo (30 kDa de MWCO, 50 kDa de MWCO y 100 kDa de MWCO) pudieron lograr volúmenes de tope fijo en el plazo de 10 minutos. Dos de las configuraciones de membrana-dispositivo (3 kDa de MWCO y 10 kDa de MWCO) no filtraron hasta sus volúmenes de tope fijo en el plazo de 10 minutos. Tal como se esperaba, estas dos membranas presentan una estructura de membrana mucho más apretada que las otras tres membranas, y requieren más tiempo para filtrar el mismo volumen de fluido. Los dispositivos que se obtuvieron utilizando membranas de 3 K de MWCO membranas requerirán normalmente al menos 16 minutos para lograr volúmenes de tope fijo de 20 μl cuando se filtran disoluciones de proteínas habituales. Los dispositivos que se

obtienen utilizando membranas de 10 K de MWCO requerirán normalmente al menos 12 minutos para lograr volúmenes de tope fijo de 20 μl cuando se filtran disoluciones de proteínas habituales.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de filtración, que comprende una camisa central (111) y un primer y segundo paneles laterales (15A, 15B) interconectados entre sí alrededor de dicha camisa central (111), en el que dichos paneles laterales (15A, 15B) y dicha camisa central (111) definen juntos un depósito (11) de muestras, una cámara de filtrado y una cámara de volumen de tope fijo (14), en el que cada uno de entre dichos paneles laterales (15A, 15B) comprende una membrana (12A, 12B) sellada al mismo, en el que la cámara de filtrado está dispuesta aguas abajo del depósito (11) de muestras, y en el que la camisa central (111) está situada en el exterior de los paneles laterales interconectados (15A, 15B) y sobremoldeada con respecto a los paneles laterales (15A, 15B).

2. Dispositivo de filtración según la reivindicación 1, en el que cada uno de dichos paneles laterales (15A, 15B) comprende un drenaje inferior y una pluralidad de orificios de drenaje (18).

3. Dispositivo de filtración según la reivindicación 1, en el que cada una de entre dicha pluralidad de orificios de drenaje (18) presenta un ángulo de desmoldeo comprendido entre 0º y 5º con respecto a un eje central a través del respectivo orificio de drenaje (18).

4. Dispositivo de filtración según la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo de filtración comprende una línea central longitudinal, y en el que cada una de dichas membranas (12A, 12B) está orientada en un ángulo mayor que 0º y menor que aproximadamente 5º con respecto a la línea central longitudinal.

5. Combinación de un dispositivo de filtración según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vial (75), comprendiendo dicho vial (75) un volumen interior configurado para recibir dicho dispositivo de filtración en una primera orientación eficaz para concentrar la muestra en dicha cámara de muestras cuando se somete a una fuerza de accionamiento, y en una segunda orientación eficaz para recuperar la muestra concentrada cuando se somete a una fuerza de accionamiento.

6. Combinación según la reivindicación 5, en la que dicho vial (75) comprende un reborde (85) anular en dicho volumen interior, y en la que el diámetro de dicho reborde (85) interior es más pequeño que el diámetro externo de dicho dispositivo de filtración, de manera que dichos dispositivos de filtración hagan tope contra ese reborde (85) cuando está en cualquiera de dicha primera o segunda orientaciones.

7. Combinación según la reivindicación 5, en la que dicho dispositivo de filtración comprende una línea central longitudinal, y en la que cada una de dichas membranas (12A, 12B) está orientada en un ángulo mayor que 0º y menor que aproximadamente 5º con respecto a la línea central longitudinal.

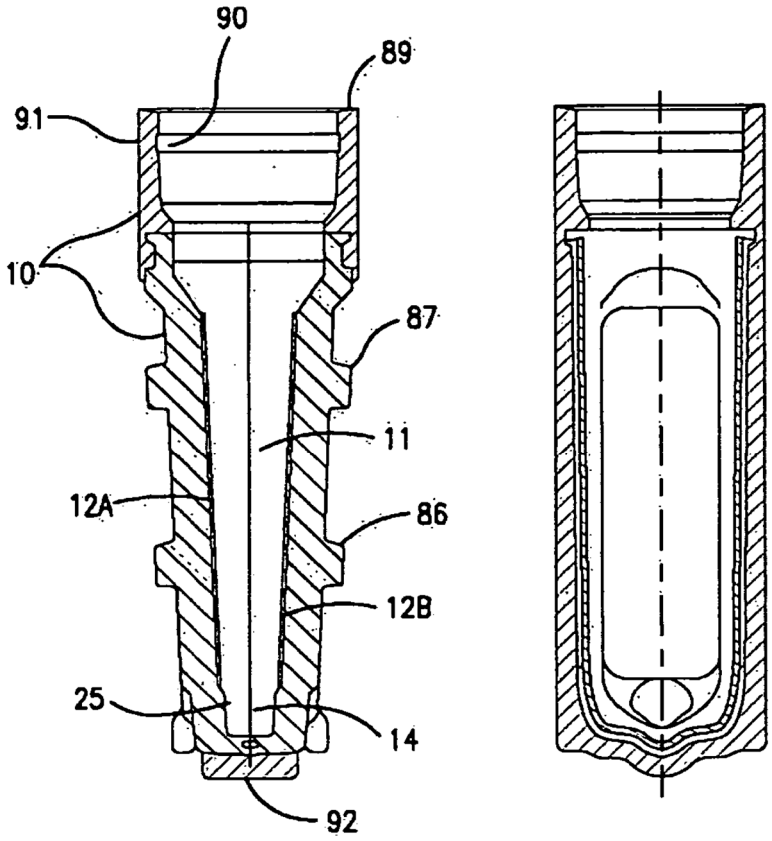

FIG. 1

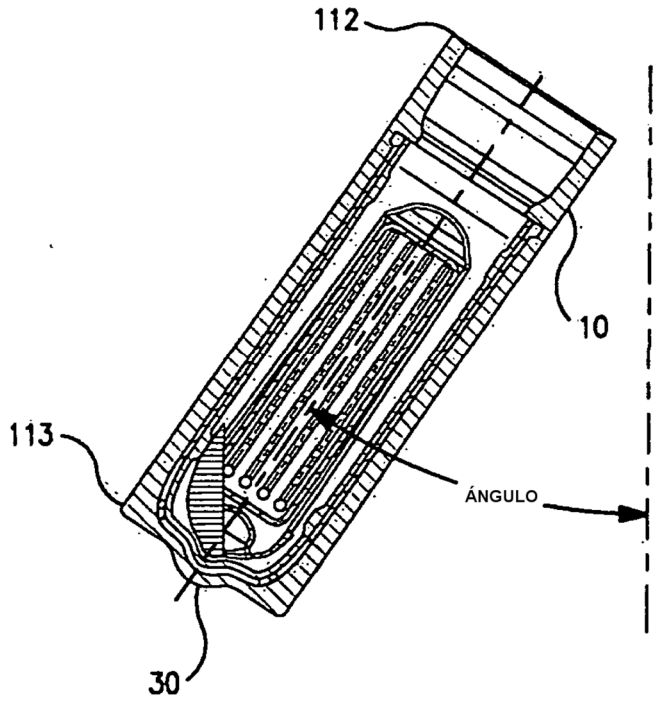

FIG. 2

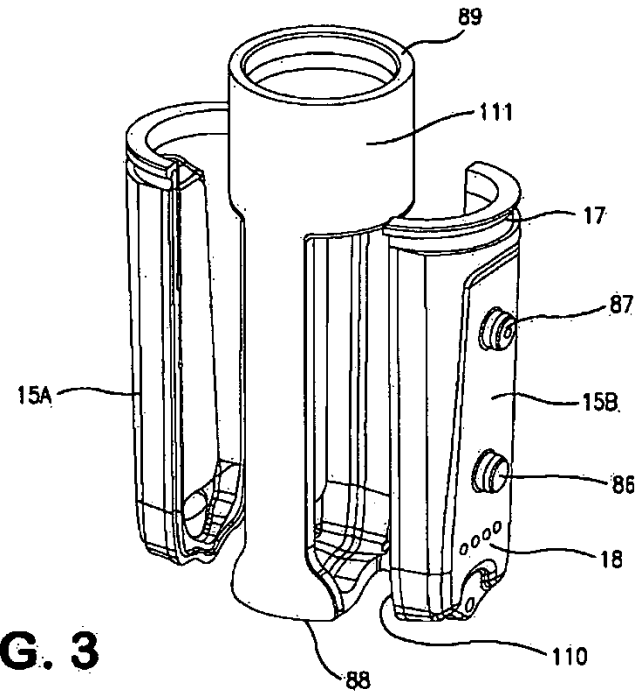

FIG. 3

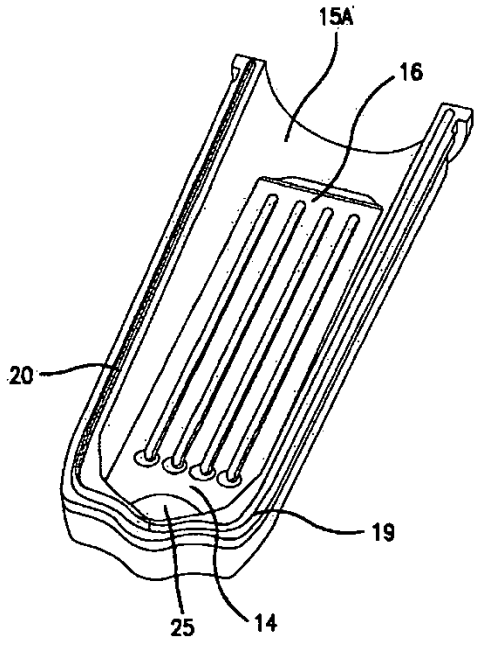

FIG. 4

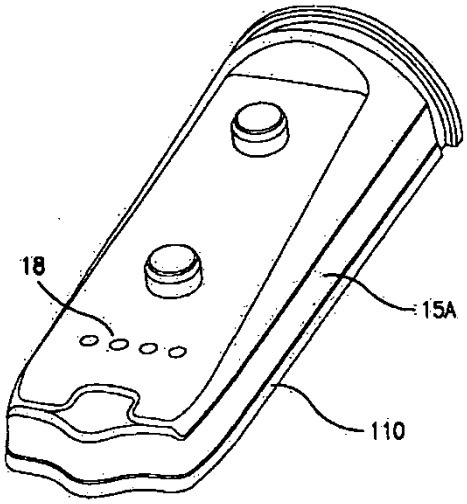

FIG. 5

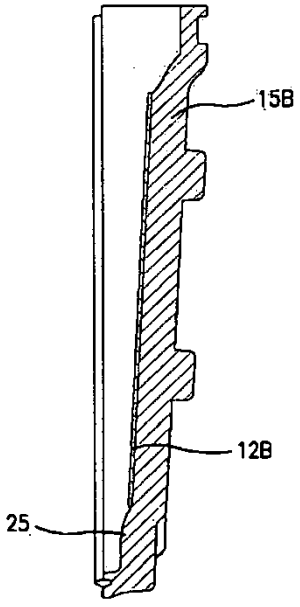

FIG. 6

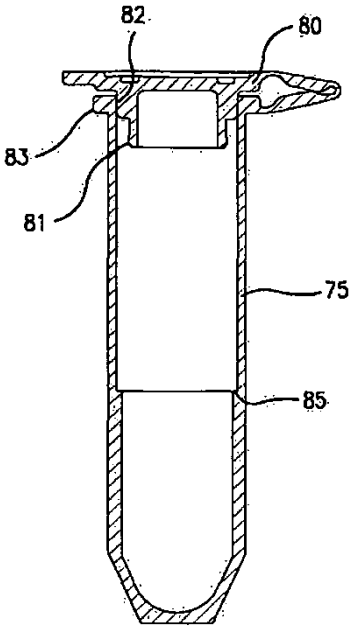

FIG. 7

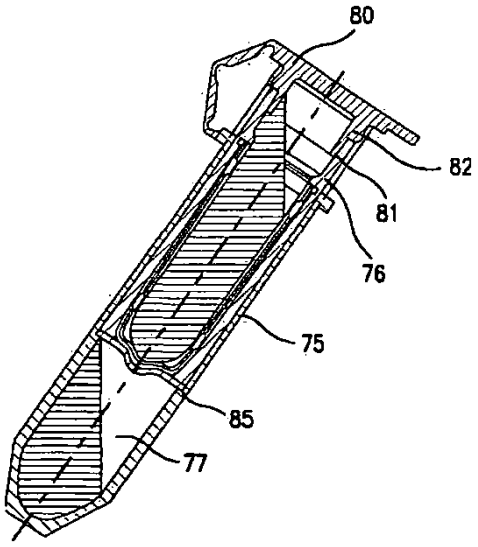

FIG. 8

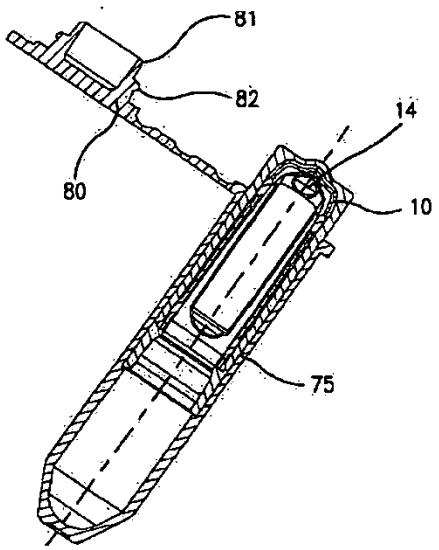

FIG. 9

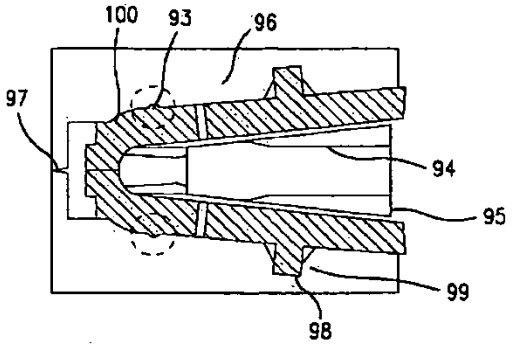

FIG. 10

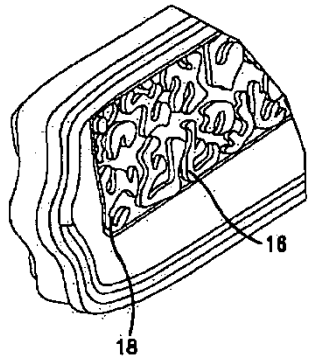

FIG. 11

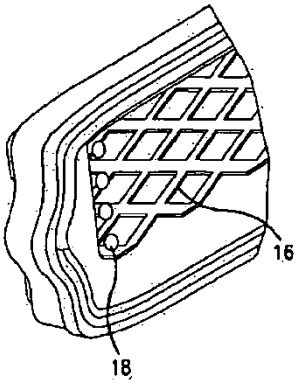

FIG. 12

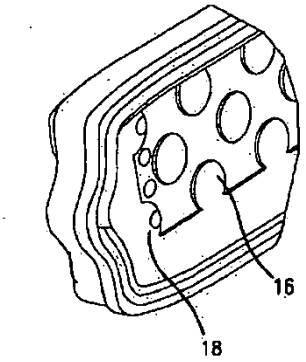

FIG. 13

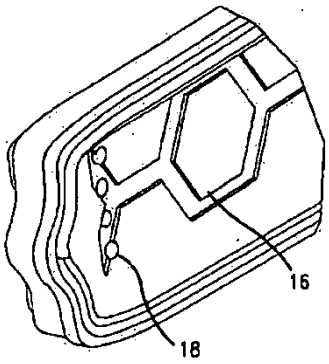

FIG. 14

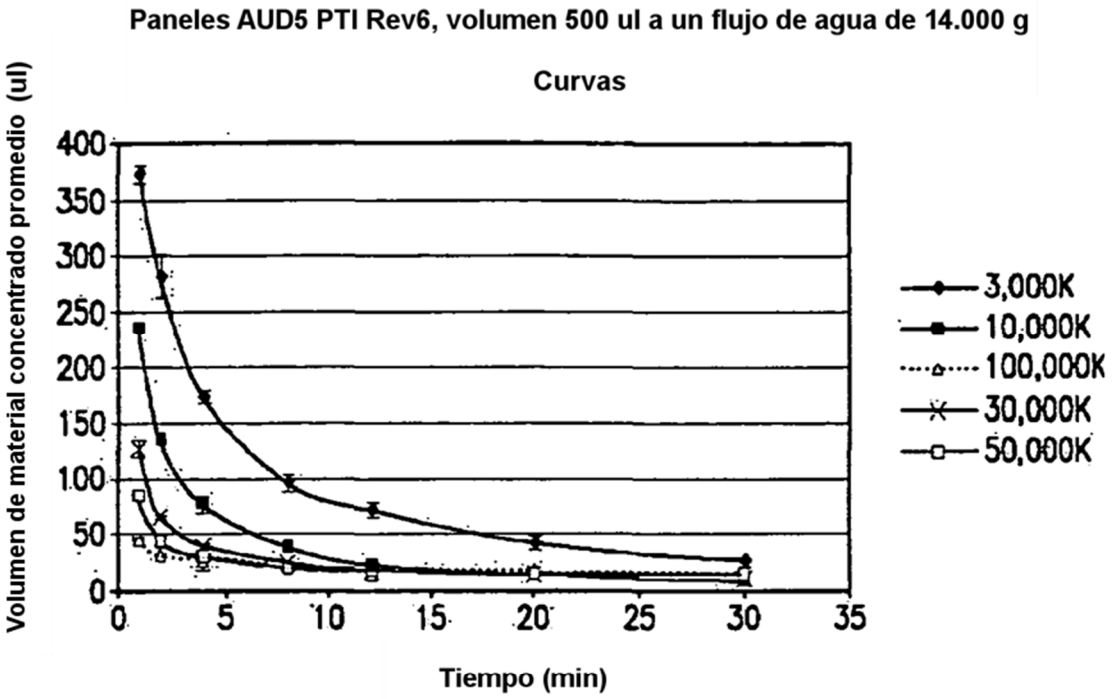
Paneles AUD5 PTI Rev6, volumen 500 ul a un flujo de agua de 14.000 g
Curvas
Volumen de material concentrado promedio (ul)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (min)
3,000K
10,000K
100,000K
30,000K
50,000K

FIG. 15

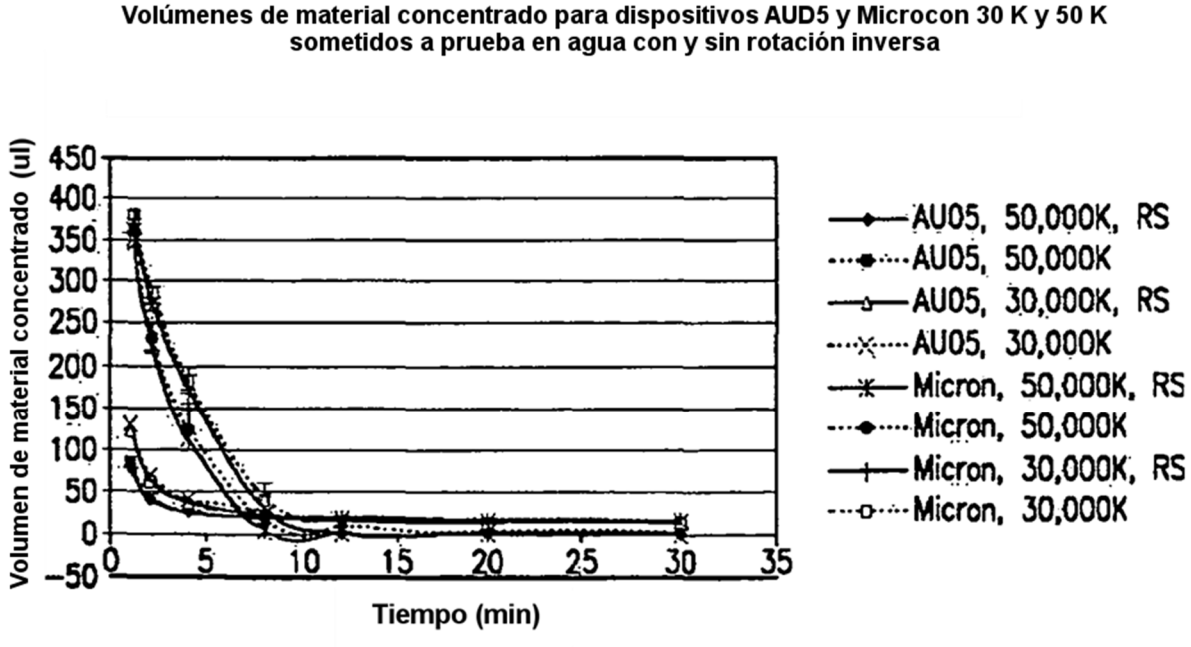
Volúmenes de material concentrado para dispositivos AUD5 y Microcon 30 K y 50 K
sometidos a prueba en agua con y sin rotación inversa
Volumen de material concentrado (ul)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (min)
AU05, 50,000K, RS
AU05, 50,000K
AU05, 30,000K, RS
AU05, 30,000K
Micron, 50,000K, RS
Micron, 50,000K
Micron, 30,000K, RS
Micron, 30,000K

FIG. 16

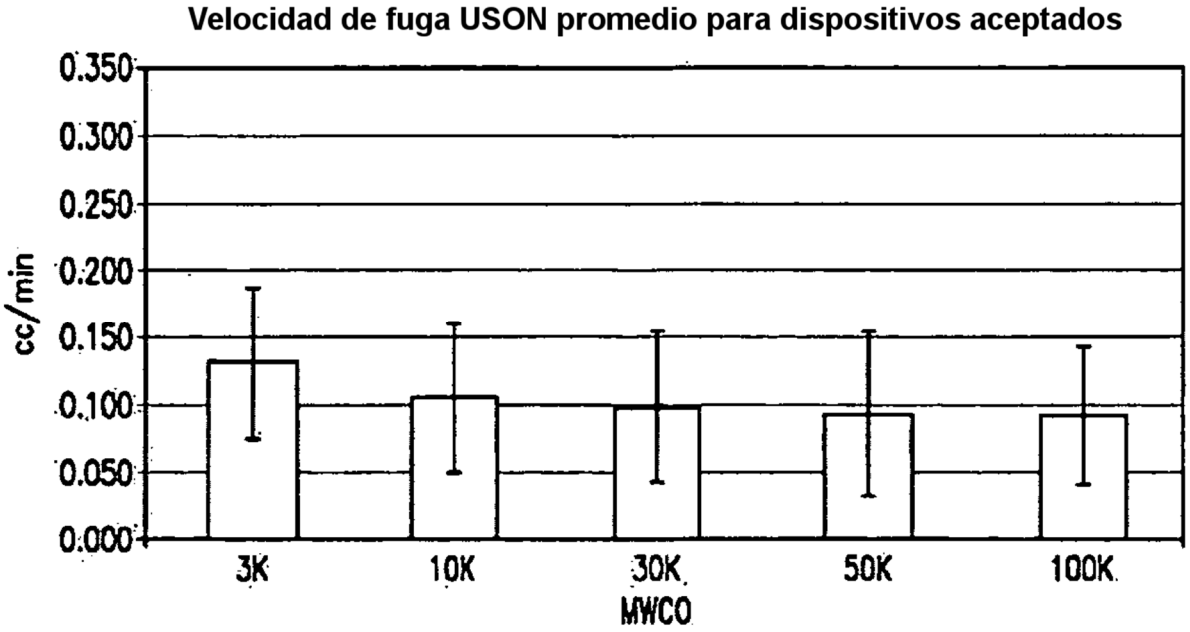
Velocidad de fuga USON promedio para dispositivos aceptados
0.350
0.300
0.250
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
cc/min
3K
10K
30K
50K
100K
MWCO

FIG. 17

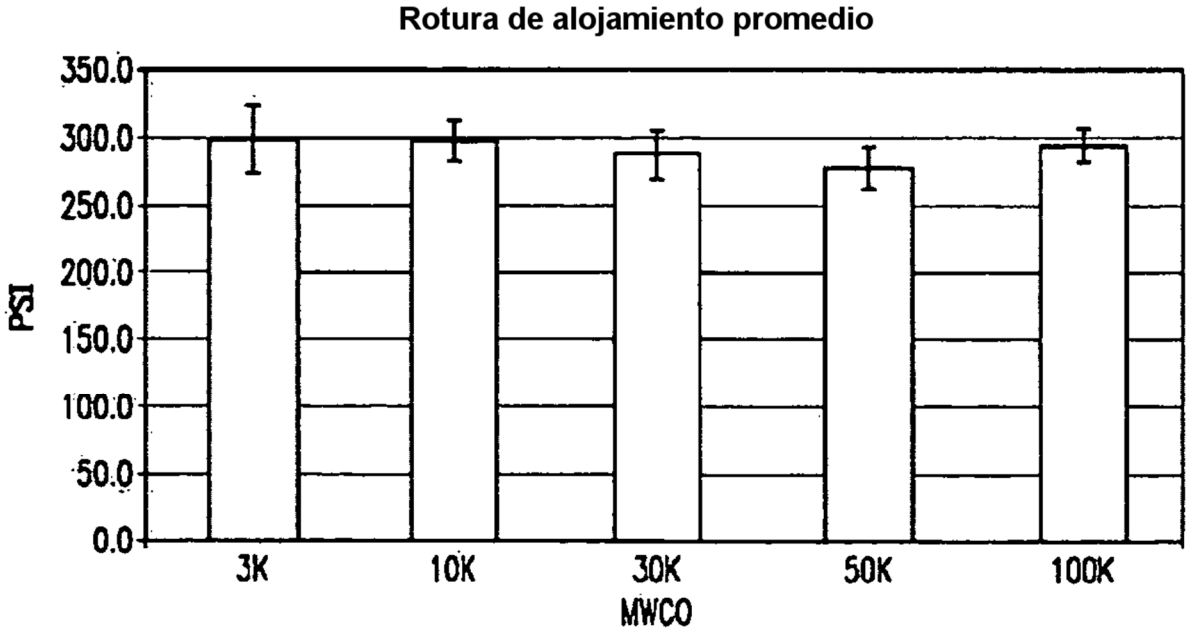
Rotura de alojamiento promedio
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
PSI
3K
10K
30K
50K
100K
MWCO

FIG. 18

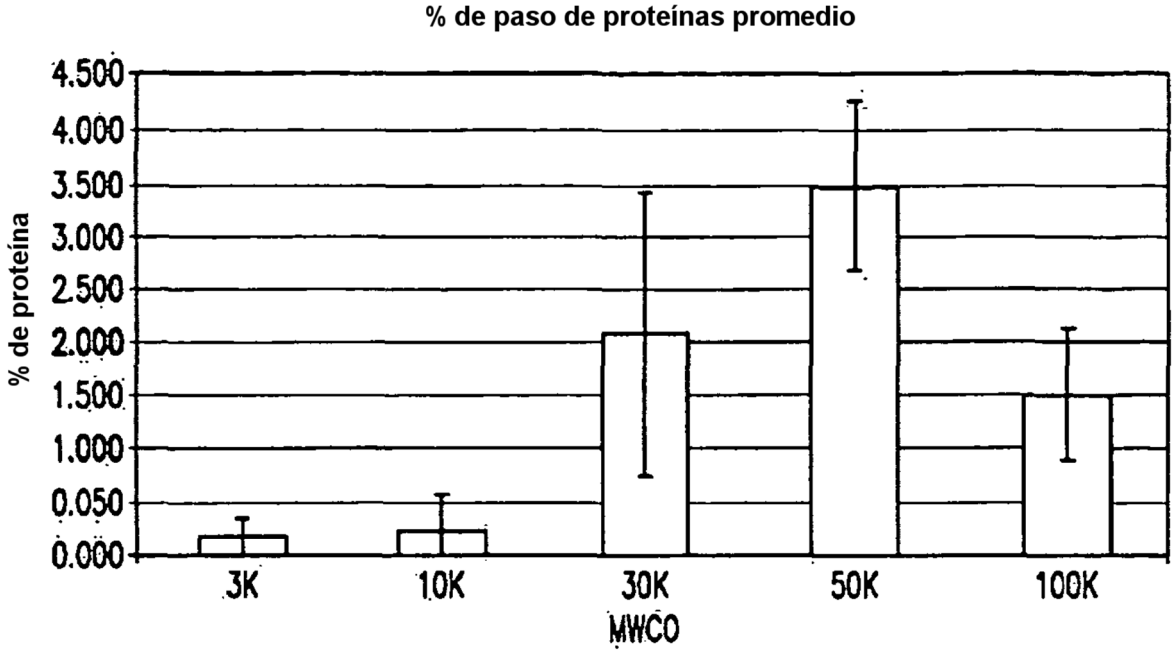
% de paso de proteínas promedio
% de proteína
4.500
4.000
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.050
0.000
3K
10K
30K
50K
100K
MWCO

FIG. 19

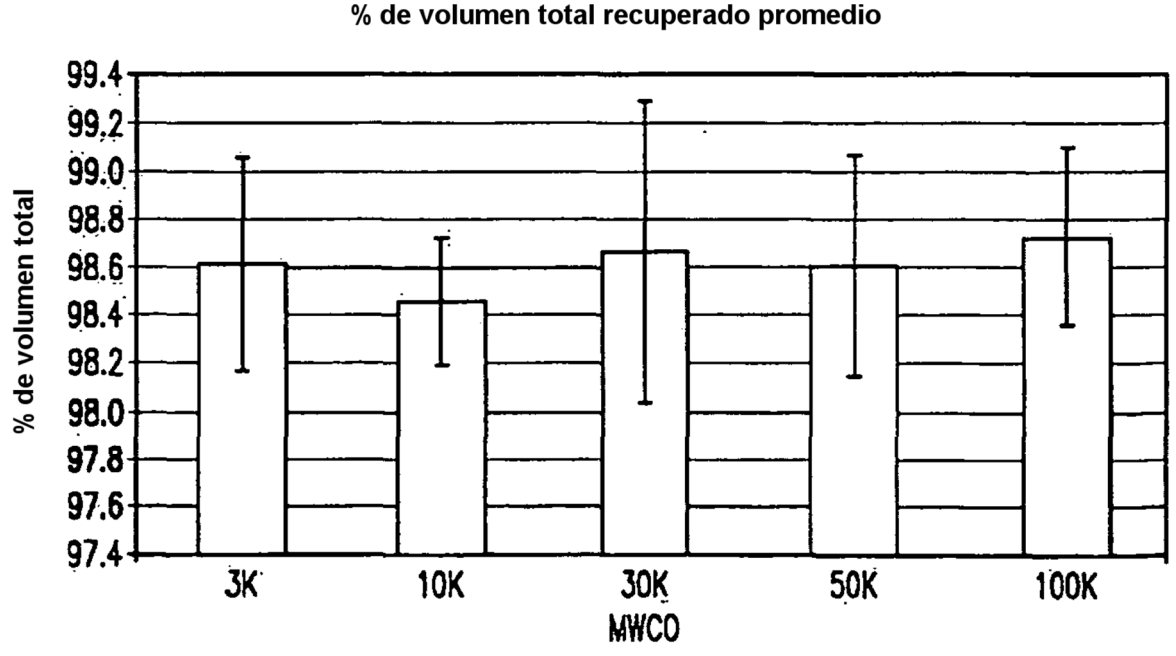
% de volumen total recuperado promedio
% de volumen total
99.4
99.2
99.0
98.8
98.6
98.4
98.2
98.0
97.8
97.6
97.4
3K
10K
30K
50K
100K
MWCO

FIG. 20

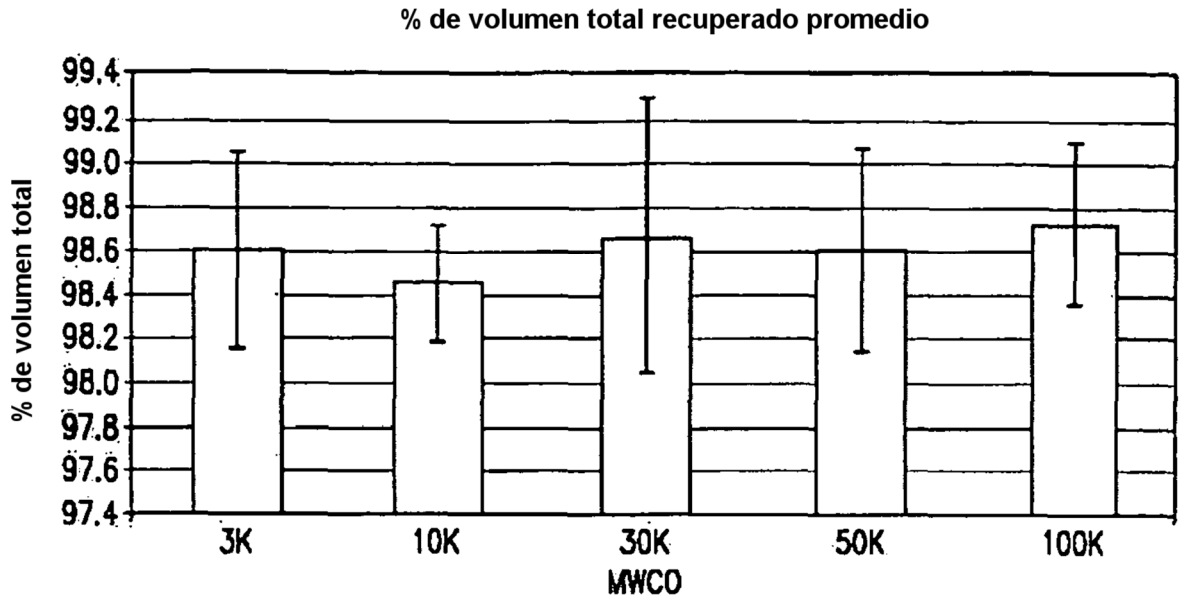
% de volumen total recuperado promedio
% de volumen total
99.4
99.2
99.0
98.8
98.6
98.4
98.2
98.0
97.8
97.6
97.4
3K
10K
30K
50K
100K
MWCO

FIG. 21

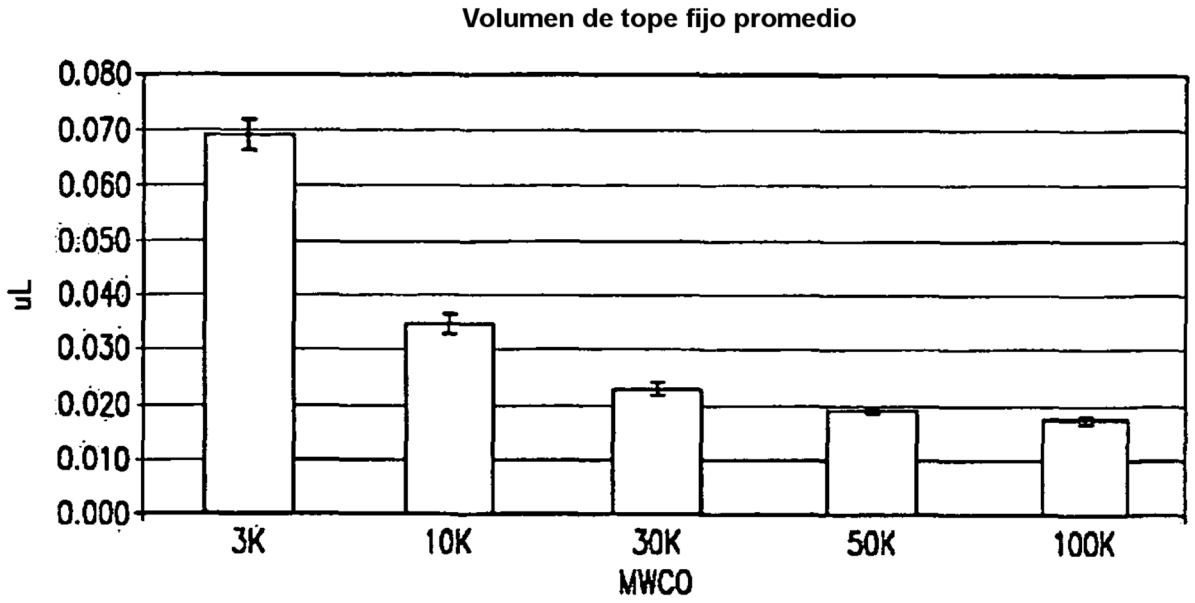
Volumen de tope fijo promedio
uL
0.080
0.070
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
3K
10K
30K
50K
100K
MWCO

FIG. 22

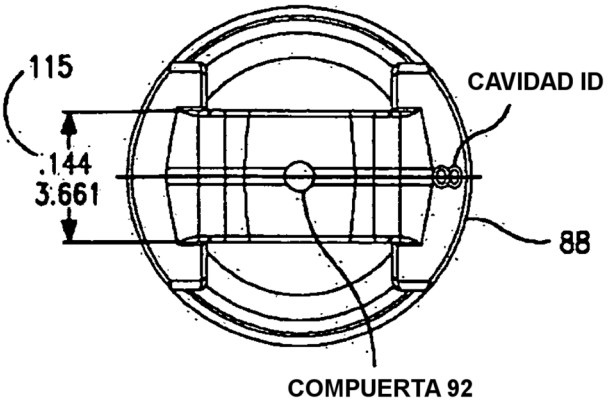
115
.144
3.661
CAVIDAD ID
88
COMPUERTA 92

FIG. 23

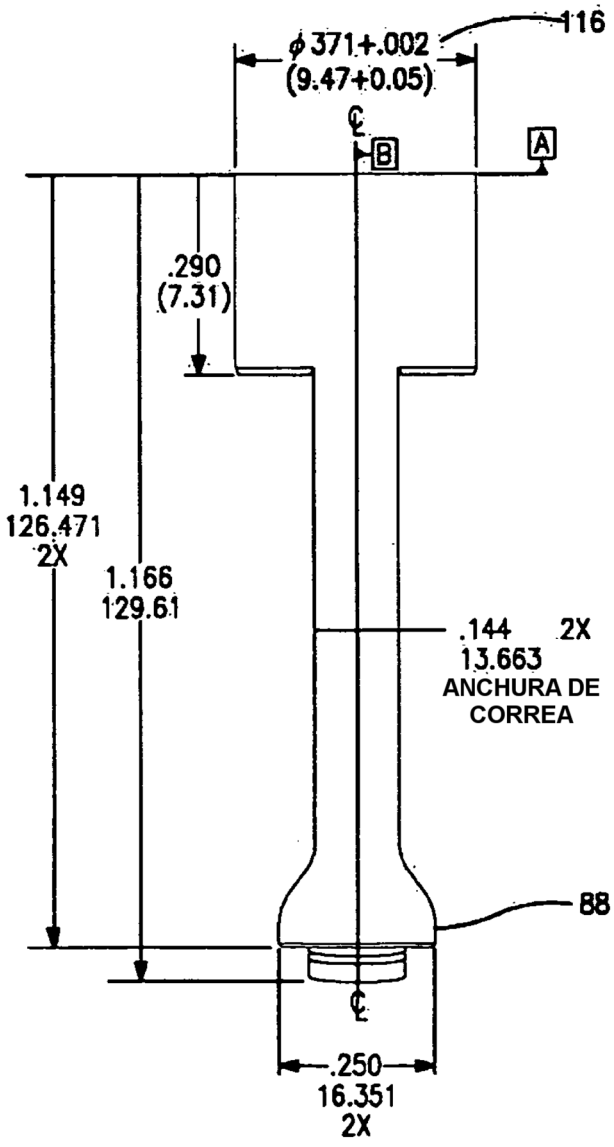
116
ϕ 371+.002
(9.47+0.05)
℄
B
A
.290
(7.31)
1.149
126.471
2X
1.166
129.61
.144 2X
13.663
ANCHURA DE
CORREA
88
℄
.250
16.351
2X

FIG. 24

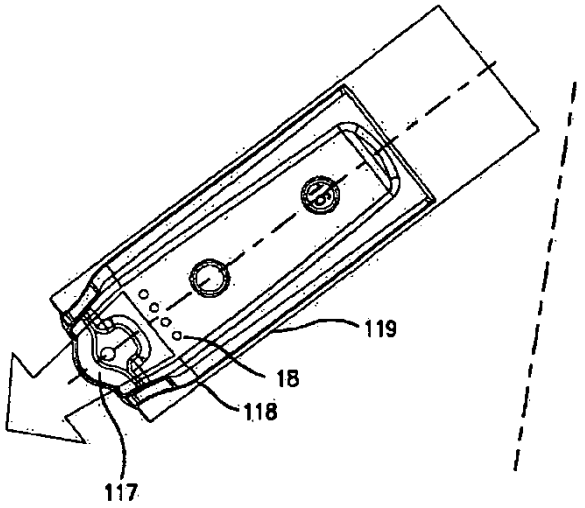

FIG. 25

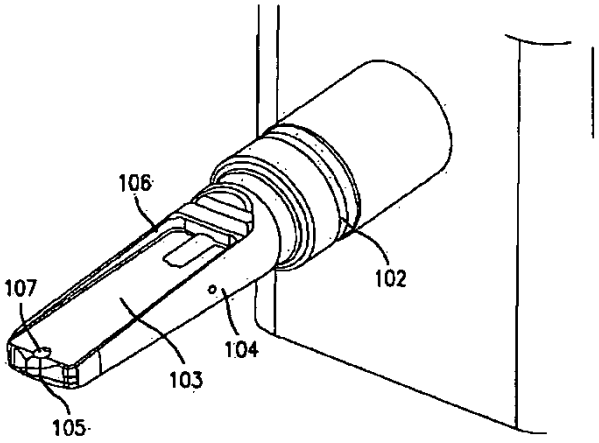

FIG. 26

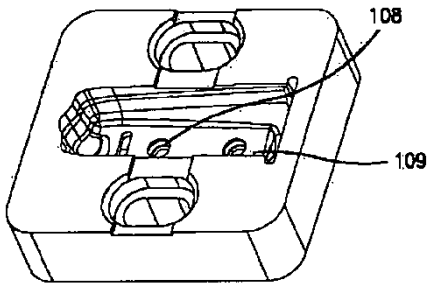

FIG. 27