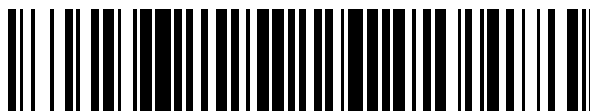


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 015**

51 Int. Cl.:

B04B 7/16 (2006.01)

B04B 1/00 (2006.01)

B01D 17/038 (2006.01)

B01D 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2012** **PCT/US2012/030819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012** **WO12135264**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012** **E 12764963 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 2691182**

54 Título: **Método y dispositivo para centrifugación y filtración**

30 Prioridad:

29.03.2011 EP 11290156

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

12.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JOUETTE, SEBASTIAN y
FELDEN, LUC

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 748 015 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

Método y dispositivo para centrifugación y filtración

La presente invención se refiere a un método y a un dispositivo para el procesamiento de muestras mediante centrifugación y filtración.

5 Antecedentes de la invención

Investigadores, en especial en el campo de la biotecnología, a menudo necesitan saber si un biorreactor de un sistema específico producirá el producto final deseado.

Debido a un contenido en partícula a veces alto de una muestra de biorreactor, actualmente se aclara la muestra en el laboratorio mediante múltiples centrifugaciones. Posteriormente, con el fin de simular un producto final estéril, se filtra el sobrenadante en un dispositivo individual. En esta etapa es posible usar una membrana de filtro de 0,22 µm (es decir una membrana de 0,22 µm MILLEX™ de MILLIPORE) combinada con una jeringuilla. Suponiendo que la membrana de filtro no está obstruida, el volumen procesado máximo es el volumen de la jeringuilla que es normalmente 50 ml.

Además, este procedimiento es un protocolo de múltiples etapas en el que el personal tiene que caminar varias veces hacia la centrifuga y una campana de flujo laminar, y es un protocolo "abierto" que aumenta el riesgo de contaminación de la muestra.

Un enfoque actual para reducir varias etapas es usar denominados "filtros sin jeringuilla" disponibles comercialmente de WHATMAN con los nombres comerciales UNIPREP™ y AUTOVIAL™.

Los filtros sin jeringuilla Autovial™ son dispositivos de filtración ensamblados previamente para retirar materiales particulados de muestras. Reemplazan dispositivos de filtración acoplados a jeringuilla con unidades desechables, individuales. Estos dispositivos están compuestos por dos partes; un barril de filtro graduado y un émbolo. Las características de diseño incluyen un filtro integral, purga de aire incorporada y una base de soporte que protege una punta deslizante Luer embutida. Los dispositivos están disponibles en una capacidad de volumen de 5 ml y 12 ml.

El filtro se selecciona según la compatibilidad de la membrana con la muestra. En la práctica, se vierte la muestra en el barril de filtro con capacidad de 5 ml o 12 ml. El émbolo se inserta en el barril hasta que la parte inferior esté firmemente en su sitio; hay un espacio de aire entre la muestra y el émbolo. Entonces, se coloca la punta del dispositivo en la boca de un vial o envase del inyector automático y se comprime el émbolo. La filtración empieza inmediatamente y, ya que el émbolo se comprime hasta que alcance la parte inferior, se purga la membrana con aire para una recuperación de la muestra máxima. Para la inyección del instrumento directa, se coloca una aguja en la salida de la parte deslizante Luer.

Los filtros sin jeringuilla UniPrep™ son dispositivos de filtración ensamblados previamente, también, para la filtración y el almacenamiento de muestras de laboratorio. Estos dispositivos incluyen un émbolo, filtro y vial en una unidad. Reemplazan dispositivos de filtración acoplados a jeringuilla con unidades desechables, individuales. Estos dispositivos consisten en dos partes; un tubo de ensayo y un émbolo de filtro en el que se monta una membrana en la punta del émbolo. Cuando el émbolo de filtro se presiona a través del líquido colocado en el tubo de ensayo, la presión positiva fuerza el filtrado para cima en un depósito del émbolo de filtro. Los dispositivos pueden usarse para filtrar sólo volúmenes de muestra pequeños en el intervalo entre 1 y 5 ml.

Un intervalo aún adicional de productos están disponibles con el nombre Mini-UniPrep™ que es un dispositivo de filtración ensamblado previamente que consiste en una cámara con capacidad de 0,4 ml y un émbolo. El émbolo contiene una membrana de filtración en un extremo y un septo/ tapa unido previamente en el otro. El émbolo se presiona a través de la muestra en una cámara externa y la presión positiva fuerza el filtrado en un depósito del émbolo. El aire escapa a través de un orificio ventilador. El dispositivo puede usarse o bien manualmente de manera individual o bien con una unidad compresora operada manualmente que comprende una palanca operada manualmente que puede presionarse hasta 6 muestras que reposan en una base. Este dispositivo está diseñado para caber en un inyector automático que aloja viales de 12 x 32 mm. Alternativamente puede perforarse el septo con una aguja y se extrae la muestra para la inyección manual en un analizador.

Membranas de filtro de tales dispositivos se hacen normalmente de los siguientes materiales dependiendo de la muestra pretendida que va a procesarse; acetato de celulosa (CA) (una membrana de baja unión a proteína no específica y alta capacidad de carga para soluciones biológicas), microfibra de vidrio (GMF) (un filtro de profundidad para muestras en medio acuoso para soluciones orgánicas), nailon (NYL) (para muestras acuosas y orgánicas dentro de un intervalo de pH entre de 3 a 10), poliétersulfona (PES) (membranas de baja unión a proteína no específica para muestras en soluciones acuosas), polipropileno (PP) (una membrana hidrófoba que es resistente a un amplio intervalo de disolventes orgánicos), politetrafluoroetileno (PTFE) (una membrana Teflon® para muestras con disolvente orgánico > 50%), poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (membranas de baja unión a proteína no específica para muestras en soluciones acuosas y/o disolventes orgánicos).

Con el fin de permitir la filtración de muestras difíciles, el diseño incorpora un prefiltro de fibra de vidrio. Aunque estos dispositivos sean fáciles de usar están aún más limitados por el tamaño de la muestra (es decir sólo 12 ml como máximo) y está sujetos a la obstrucción de la membrana final.

5 El documento US-A-5.238.003 da a conocer una jeringuilla de extracción de sangre que puede operarse manualmente que tiene un barril con un agujero cilíndrico hueco con un extremo trasero abierto y un extremo frontal de diámetro reducido para el acoplamiento de una aguja. Una varilla de empuje está dispuesta para un movimiento deslizable dentro del barril y un émbolo o pistón en forma de disco se acopla al extremo delantero de la varilla de empuje. Un filtro que pasará aire pero es imprevisible para los fluidos está dispuesto entre las placas perforadas delantera y trasera del émbolo y una brida de sellado está dispuesta alrededor de la periferia del émbolo y
10 dimensionada para caber de manera deslizable dentro del agujero cilíndrico del barril. Un sello de trampa que es impermeable tanto a gas como fluidos se ubica en contacto contiguo con la cara trasera del émbolo y permite que el aire que ha pasado a través del filtro en el émbolo escape desde un volumen aguas arriba en un volumen aguas abajo ya que la varilla de empuje y el émbolo se mueven hacia delante en el barril.

15 El documento EP-A-0294185 da a conocer un dispositivo de filtración para fluidos que es similar a los filtros sin jeringuilla Autovial™ descritos anteriormente. Comprende un barril con un extremo abierto y un extremo de descarga de flujo con una boquilla que está en comunicación con el volumen interior del barril. Un émbolo está dispuesto de manera deslizable en el barril a través del extremo abierto hacia el extremo de descarga. Un filtro está dispuesto adyacente al barril por dentro de y adyacente a la boquilla de descarga. En la operación el fluido de muestra que va a filtrarse se vierte en el volumen del barril de modo que esté dispuesto sobre el filtro. Entonces se inserta el émbolo
20 en el extremo abierto del barril y se empuja hacia el extremo de descarga de flujo. La muestra se habrá filtrado completamente y se habrá dispensado desde la boquilla cuando el émbolo esté completamente deprimido y la cara delantera del émbolo acopla un extremo inferior del barril. Este dispositivo experimenta la obstrucción prematura de la superficie de membrana si las muestras con una carga de material particulado mayor son procesadas.

25 El documento WO 97/15399 da a conocer un dispositivo de separación de células centrífugas portátil y desechable para fluidos biológicos como sangre. El dispositivo comprende una cámara de procesamiento centrífuga hueca que puede girar aproximadamente un eje de rotación y que tiene un orificio de entrada/ salida axial común para el fluid que va a procesarse. La cámara de procesamiento contiene un émbolo que puede moverse que define un espacio de separación de tamaño variable y un espacio vacío/ presión y que puede moverse para consumir la cantidad seleccionada de un fluido de muestra en el espacio de separación a través del orificio de entrada/ salida y para
30 expresar los componentes de fluidos sedimentados procesados tras la centrifugación a partir del espacio de separación a través del orificio de entrada/ salida. El émbolo se mueve hacia el extremo del orificio de entrada/ salida de la cámara de procesamiento mediante aire presurizado introducido en el espacio vacío/presión.

El documento WO 2005/055814 muestra un barril con un pistón que puede moverse y un filtro para forzar al fluido en el volumen a través del filtro tras aplicar presión sobre el pistón y un espacio para los sólidos en los que el espacio
35 se ubica de modo que los sólidos no obstruyen completamente el medio de filtro durante la centrifugación.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es proporcionar un método y un dispositivo para procesar muestras, en especial de modo que sean difíciles de filtrar debido a una matriz compleja como muestras de biorreactores, mediante centrifugación y filtración en un ambiente estéril y de manera más efectiva.

40 Aspectos adicionales de la invención son para proporcionar un método y un dispositivo de ese tipo que son adecuados para procesar grandes volúmenes de tales muestras en comparación con la técnica anterior en un laboratorio, y que pueden usar centrífugas de sobremesa convencionales disponibles en muchos laboratorios.

Ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas.

45 Según la presente invención se proporciona un dispositivo de filtración y centrifugación según la reivindicación 1 y un método para la filtración estéril de una muestra según la reivindicación 13. La invención también proporciona un aparato para aplicar una fuerza a uno o más dispositivo(s) de filtración y centrifugación de la invención según la reivindicación 12. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

50 El dispositivo de filtración y centrifugación de la invención comprende un barril que comprende al menos dos cilindros, un volumen en el barril para recibir una muestra de fluido que va a procesarse, un medio de filtro, y al menos dos pistones que pueden moverse en el barril para forzar al fluido en el volumen a través del medio de filtro para producir un filtrado. Se proporciona un espacio para sedimentar el material particulado, en el que dicho espacio se ubica en o se comunica con el volumen de modo que el material particulado no obstruye o al menos no obstruirá completamente el medio de filtro durante la centrifugación del dispositivo.

55 Preferiblemente el espacio para alojar al material particulado se ubica lejos de dicho medio de filtro y preferiblemente comprende un rebaje para alojar al material particulado.

El método para la filtración estéril de una muestra de la invención comprende las etapas de introducir la muestra en el volumen de un dispositivo de la invención de ese tipo, someter el dispositivo a centrifugación para sedimentar el material particulado contenido en la muestra en el espacio lejos del medio de filtro, y aplicar fuerza al/ a los pistón/ pistones para forzar al fluido de la muestra en el volumen a través del medio de filtro para producir un filtrado.

- 5 A proporcionar el espacio para sedimentar el material particulado de la disolución que va a procesarse bajo la influencia de la fuerza de centrifugación aplicada sobre el dispositivo anterior o simultáneamente con la aplicación de la presión aplicada a través del/ de los pistón/ pistones para forzar al fluido a través del medio de filtro, la obstrucción del medio de filtro puede evitarse o retardarse considerablemente. Además, el proceso completo puede realizarse en el mismo dispositivo sin tener que retirar la muestra durante cualquier etapa de clarificación intermedia.
- 10 El dispositivo y método de la invención pueden usarse ventajosamente para la filtración y concentración de matrices complejas como en una preparación de muestra (antes de la HPLC preparativa), para procesar muestras difíciles de filtrar en general, para la filtración rápida de muestras de grande volumen, para la extracción/concentración de proteínas, y para la desalinización e intercambio de disolvente. Los principios de la invención pueden aplicarse a escala aún más grande o dimensiones industriales aumentando el volumen en el barril para la muestra que va a procesarse y/o el número de pistones/medios de filtro integrados en el barril y/o el numero de barriles procesados al mismo tiempo.
- 15

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

- La figura 1 es la representación esquemática de un dispositivo de filtración y centrifugación no según la invención,
- 20 la figura 2 es una representación esquemática de un dispositivo de filtración y centrifugación con dos pistones no según la invención,
- la figura 3 es una realización con cilindros inclinados para los dos pistones,
- la figura 4 es una modificación adicional de la realización de la figura 3 con pistones modificados que no ofrecen volumen muerto,
- 25 la figura 5 es una modificación aún adicional de la realización de la figura 3 con un espacio separado como el área de concentración en forma de un rebaje,
- la figura 6 es una modificación aún adicional de la realización de la figura 3 que combina los aspectos de los pistones que no ofrecen volumen muerto con la provisión del espacio separado como el área de concentración, y
- la figura 7 es un dispositivo que tiene una pluralidad de pistones anidados uno dentro del otro, no según la invención.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

- La figura 1 muestra un diseño esquemático de un dispositivo de filtración y centrifugación. El dispositivo comprende un barril 1 cilíndrico en el que se recibe de manera móvil un pistón o émbolo 3. Un medio 4 de filtro, incluyendo preferiblemente una o más membranas de filtro, se une al émbolo 3. Debajo del medio 4 de filtro está un volumen 2 para recibir una muestra de fluido que va a procesarse. El movimiento del pistón desde una posición superior hacia una posición inferior en la dirección hacia abajo vertical (presionando la dirección P) fuerza el fluido en el volumen 2 a través del medio de filtro para producir un filtrado que se guía a través de una varilla 5 de empuje del pistón y un conducto 8 a un receptáculo 7 externo, preferiblemente en forma de una unidad cerrada como una bolsa flexible (es decir una bolsa NovaSeptum®). La extracción del filtrado a través de la varilla de empuje es un ejemplo preferido pero también puede proporcionarse un canal separado o una trayectoria de flujo.
- 35
- 40 En la parte inferior y del volumen en el barril para recibir la muestra de fluido es un espacio 6 para sedimentar el material particulado cuando se somete el dispositivo entero a centrifugación. La centrifugación, es decir, el componente de la fuerza de centrifugación C en la dirección de la longitud axial del pistón forzará al material particulado M en el fluid que va a procesarse hacia el espacio 6 en la dirección de la fuerza de centrifugación C. Por consiguiente, el medio 4 de filtro se expondrá sólo al fluid F clarificado mientras que el material particulado sedimentado en el espacio se ubica lejos del medio de filtro. Esto tiene la consecuencia de que la filtración del fluido clarificado al presionar el pistón en la dirección P no obstruirá el medio de filtro.
- 45
- La centrifugación del dispositivo puede realizarse en una centrífuga de sobremesa convencional, por ejemplo, una con una cubeta redonda oscilante de 750 ml o en rotor de ángulo fijo con dimensiones apropiadas. El dispositivo de la figura 1, sin embargo, también pudo someterse a centrifugación en una orientación principalmente horizontal tal como se muestra en la figura 2 y en este caso la centrifuga pudo ser una centrifuga de sobremesa con un rotor con placa de 96 pocillos, por ejemplo.
- 50

Aunque no se muestra en la figura 1 el espacio para sedimentar el material particulado durante la etapa de centrifugación puede preferiblemente, pero no necesariamente, tener que ser un espacio o rebaje dedicado para

alojar al material particulado en la parte inferior y/o una periferia del barril. El espacio puede ubicarse en el volumen para recibir la muestra de fluido pero también puede ser un espacio o rebaje que se comunica con el volumen. El espacio o rebaje puede separarse preferiblemente de manera adicional del resto del volumen mediante una estructura de separación en forma de una estructura de tipo red gruesa o una rejilla o similares diseñada para dejar pasar el material particulado y la muestra de fluido.

Además, aunque no se muestra en la figura 1, puede proporcionarse un orificio para permitir la retirada del material particulado del espacio.

El tamaño del volumen en el barril para recibir la muestra de fluido que va a procesarse puede ser considerablemente mayor que en el anterior es decir al menos 5 ml, preferiblemente al menos 150 ml o además preferiblemente al menos 200 ml.

La figura 2 muestra un dispositivo que tiene dos pistones 3a,3b en un barril 1 de cilindro alargado. Esto permite duplicar el área de filtración y aumentar el tamaño del volumen en el barril para recibir la muestra de fluido sin haber que aumentar necesariamente la longitud de carrera del pistón en el caso de un dispositivo de pistón individual. Tal como se ilustra, a continuación en relación con las figuras 5 y 6 puede proporcionarse un rebaje dedicado en la parte inferior del volumen para servir como espacio para alojar al material particulado sedimentado durante la centrifugación a una posición aún más lejos de los medios 4 de filtro. En el dispositivo mostrado en la figura 2 pudo haber un determinado contacto de partículas sedimentadas en consecuencia de la centrifugación con parte de las membranas. Sin embargo, durante el proceso de filtración, cuando los pistones se acercan entre sí, hay siempre un área de la membrana que nunca está en contacto con las partículas sedimentadas y permanece esencialmente sin obstrucciones.

Con el fin de evitar contacto sustancial de los medios de filtro con las partículas sedimentadas y retardar consecuentemente o evitar la obstrucción de los medios de filtro, el barril, tal como se muestra en la figura 3, pudo comprender dos secciones 1a, 1b de cilindro que reciben respectivamente uno de los pistones 3a, 3b. Tal como se muestra en la figura 3 las dos selecciones de cilindro del barril están inclinadas en relación entre sí con el volumen 2 para recibir la muestra de fluido que va a procesarse allí entre y con el espacio 6 para alojar al material particulado sedimentado ubicado en el ápice en la parte central inferior del dispositivo.

Con el fin de reducir el volumen muerto debido a la forma V, los medios 4a de filtro, 4b pudieron permanecer verticalmente tal como se muestra en la orientación horizontal de la figura 4 (y en paralela consecuencia entre sí) incluyendo la paralela consecuencia entre sí) incluyendo la parte inferior o presurizando la cara de los pistones según el ángulo de inclinación entre los cilindros.

En esta realización, también, puede proporcionarse un área 10 de concentración o un rebaje dedicado como el espacio para sedimentar el material particulado como se pone como ejemplo en la figura 6 y puede proporcionarse esta área de concentración con o en comunicación con un orificio para retirar el material particulado (no mostrado en la figura).

En las realizaciones mostradas el medio de filtro, preferiblemente en forma de una o más membranas de filtro, se proporciona en el/ los pistón/ pistones, respectivamente. Por consiguiente, el fluido forzado a través de los medios de filtro, es decir el filtrado, se guía a través de la(s) varilla(s) de empuje del pistón/ pistones y un conducto a una o varias unidad(es) externa(s) cerrada(s) mostrado esquemáticamente en la figura 1. Aunque no se muestra en las figuras, el medio de filtro pudo ubicarse alternativamente en la parte inferior del barril (reemplazando por ejemplo el pistón derecho del dispositivo de la figura 2 mediante una estructura de soporte fija que sujeta el medio de filtro) de modo que el fluido sería forzado a través del medio de filtro en otro volumen aguas abajo de este medio de filtro o directamente a un orificio de salida. El filtrado pudo retenerse en este volumen y retirarse posteriormente o extraerse de nuevo directamente de allí a través de un conducto en una unidad externa.

Para este fin puede proporcionarse un orificio que está en comunicación con el lado aguas abajo del medio de filtro y conectado a o puede conectarse al receptáculo de fluido externo.

En la operación y según el método de la presente invención para una filtración estéril de una muestra, se introduce la muestra que va a procesarse en el volumen 2 del dispositivo tal como se describió anteriormente. Entonces, se somete el dispositivo entero a fuerza de centrifugación C (es decir 500 g o más, preferiblemente 100 g o más y normalmente hasta 4000 g), en una dirección que depende del diseño del dispositivo, sedimentando de ese modo el material particulado contenido en la muestra en el espacio 6 en el volumen lejos del medio de filtro.

Dependiendo de la dirección de aplicación de la fuerza centrífuga y en especial dependiendo de la orientación del dispositivo en relación con el eje de centrifugación podría actuar un determinado componente de la fuerza de centrifugación sobre el pistón obligándolo a moverse dentro del cilindro. Si se debe evitar un movimiento de ese tipo o bien la resistencia de fricción entre el pistón y el cilindro puede ajustarse de manera apropiada, o bien pueden proporcionarse medios para sujetar el pistón en su lugar a pesar de la fuerza de centrifugación, es decir en forma de acoplar rebajes/salientes o una conexión que puede romperse, entre el pistón y el cilindro.

Al aplicar una fuerza P al/ a los pistón/ pistones la fricción o la fuerza de sujeción del pistón puede superarse y se fuerza el fluido de la muestra en el volumen a través del medio 4 de filtro en la dirección F de filtración, produciendo de ese modo el filtrado deseado.

- 5 La aplicación de la fuerza a los pistones para forzar al fluido a través del medio de filtro puede aplicarse secuencialmente tras la centrifugación o puede aplicarse simultáneamente con la centrifugación.

Después de que se ha recogido el filtrado deseado en un volumen separado dentro del barril o extraído en un receptáculo externo, el material particulado recogido en el espacio puede o bien retenerse en el dispositivo y desecharse con él o bien extraerse también, preferiblemente a través del orificio dedicado que se comunica con el espacio en el que se aloja al material particulado.

- 10 El beneficio del método y dispositivo de la presente invención es simular todas las etapas de procesamiento aguas abajo realizadas anteriormente en el laboratorio en diferentes ubicaciones o en etapas repetidas con sólo un dispositivo único en un periodo de tiempo más corto. El dispositivo y método de la invención proporciona una posibilidad para producir un producto estéril final en volúmenes grandes desde una muestra de biorreactor de gran volumen.

- 15 Con el fin de aplicar la fuerza P sobre los dos o más pistón/ pistones del dispositivo de filtración y centrifugación de la invención, puede preverse un aparato que puede alojar a uno o más del/ de los dispositivo(s) de filtración y centrifugación. Un aparato de ese tipo comprende un actuador eléctrico, neumático o mecánico para mover los dos o más pistón/ pistones en el barril del/ de los respectivos dispositivo(s) para forzar al fluido a través de los respectivos medios de filtro. El uso de un actuador eléctrico, neumático o mecánico de ese tipo proporciona la ventaja de que puede aplicarse una fuerza o presión P grande lo suficiente (es decir 10 bares o más) de manera constante, que puede repetirse y controlada, o, si se desea, en un patrón de aplicación predefinida a lo largo del tiempo, por ejemplo en que se controla el actuador mediante un programa predefinido.

Además, tales actuadores proporcionan una fuerza grande lo suficiente para procesar los volúmenes grandes para los que se diseña el dispositivo de la presente invención.

- 25 Los medios de filtro se seleccionarán de modo que sean compatibles con los tipos de muestra específica que va a procesarse y estructurarse para producir el filtrado deseado a partir de ellos. Un ejemplo es el uso de una membrana de filtro de 0,22 μm (es decir una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) hidrófila de 0,1 μm y 0,22 μm con calidad de esterilización Durapore® de MILLIPORE) que también se usa en el protocolo abierto descrito en la parte de introducción. Además, los medios de filtro tal como se describen en relación con las membranas de filtro de los dispositivos WHATMAN en la página 3 de la descripción pueden usarse alternativamente. Aún adicionalmente, pudo emplearse una membrana apilada con una o más membrana(s) de clarificación (es decir AN3H & AN50 de MILLIPORE) colocadas antes de la membrana con calidad de esterilización. La configuración de membrana apilada reduce adicionalmente la obstrucción temprana de la membrana con calidad esterilizada.

- 35 Los medios de filtro son dependientes de la aplicación, es decir ultrafiltración para concentración de proteína o desalinización/intercambio de tampón. En este caso, pueden usarse membranas de celulosa. Ultrafiltración es un método para concentrar proteínas u otras macromoléculas a través de una membrana semipermeable con poros definidos. Ultrafiltración es aplicable para desalinización de la muestra, la concentración de proteínas a partir de disolución diluida tal como muestras de orina, o desproteinización de muestras con alta concentración de proteína (es decir suero sanguíneo o plasma).

- 40 El dispositivo de la invención es una unidad única que es conveniente que se use. El dispositivo no requiere ensamblaje y es fácil de cargar. Si el material elegido para el dispositivo es económico, puede diseñarse el dispositivo como una unidad desechable.

Puesto que el dispositivo de la invención puede ser un dispositivo independiente, se elimina el riesgo de desprendimiento del filtro y por tanto es ideal también para muestras peligrosas.

- 45 Si los orificios de salida (no mostrados) del dispositivo se abren, la membrana está ventilando lo que permite cargar el barril completamente. Sin embargo, al integrar una válvula de purga de aire en el dispositivo la recuperación de la muestra puede maximizarse adicionalmente.

Si se esteriliza previamente el dispositivo, puede mantenerse la integridad de la muestra porque la muestra no tiene que ser retirada durante ninguna etapa del procesamiento.

- 50 Aunque sólo se describen realizaciones con dos pistones, pueden integrarse incluso más de dos pistones en un barril, por ejemplo en una disposición en serie o radial, en la que las secciones de cilindro que reciben los respectivos pistones pueden inclinarse en relación entre sí y, en tal caso, también pueden inclinarse las superficies de membrana de los pistones de modo que las superficies de membrana se vuelven paralelas entre sí como se pone como ejemplo en las figuras 4 y 6 anteriores.

Un dispositivo de filtración y centrifugación aún adicional se muestra en la figura 7. En este dispositivo una pluralidad de pistones 3a, 3b están anidados uno dentro del otro, teniendo cada pistón un medio 4a, 4b de filtro proporcionado en su parte inferior. Los medios de filtro pueden ser diferentes entre sí en que el medio 4s de filtro del primer pistón 3a dispuesto en el barril 1 proporcionando el volumen 2 para recibir la muestra de fluido que va a procesarse y el espacio 6 para sedimentar el material particulado se selecciona para ser una membrana de prefiltro mientras que el medio 4b de filtro del segundo pistón 3b dispuesto en un volumen del primer pistón 3a aguas abajo del medio del mismo es una membrana de filtración (es decir una membrana con calidad de esterilización). Los pistones adicionales con medios de filtro de porosidad intermedia pueden anidarse dentro del segundo pistón de la misma manera con la membrana con calidad de esterilización que se proporciona en el pistón que está más aguas abajo.

5 Este dispositivo puede ser una alternativa al diseño de membrana apilada descrita anteriormente que proporciona mayor volumen en cada fase de filtración aguas abajo.

10

Con el fin de sellar cada fase a partir de la fase aguas arriba, pueden proporcionarse juntas de estanqueidad 11 u otras estructuras de sellado en cada uno de los pistones anidados. Además, puede proporcionarse el espacio para sedimentar el material particulado lejos del respectivo medio de filtro no sólo en o en comunicación con el volumen del barril para recibir el fluido de muestra sino también en las seleccionadas de las fases aguas abajo dentro de los pistones.

15

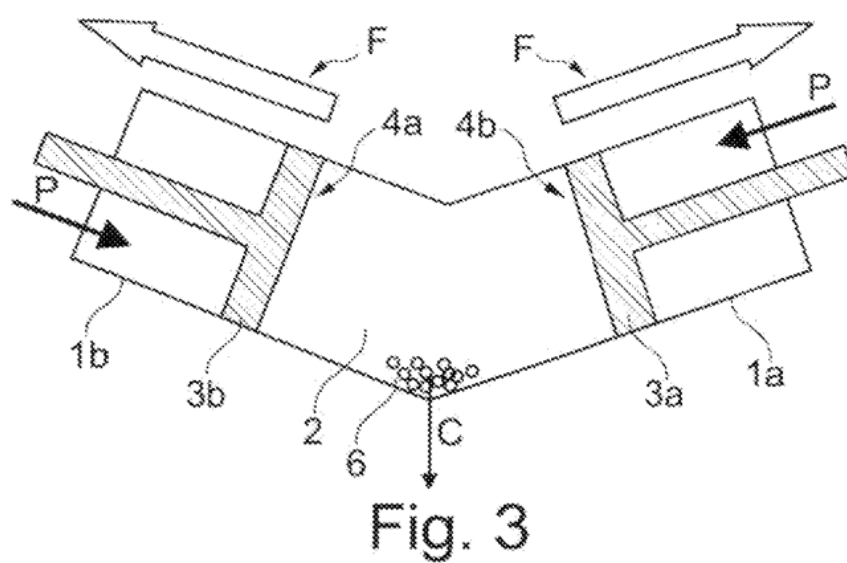
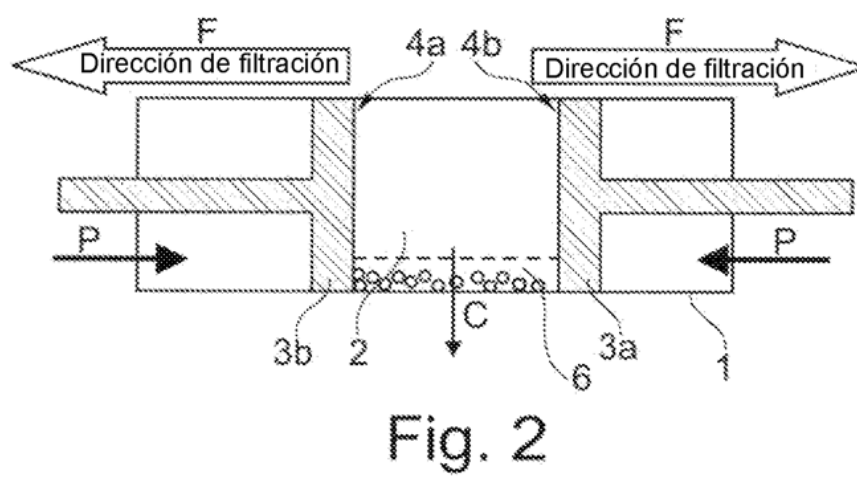
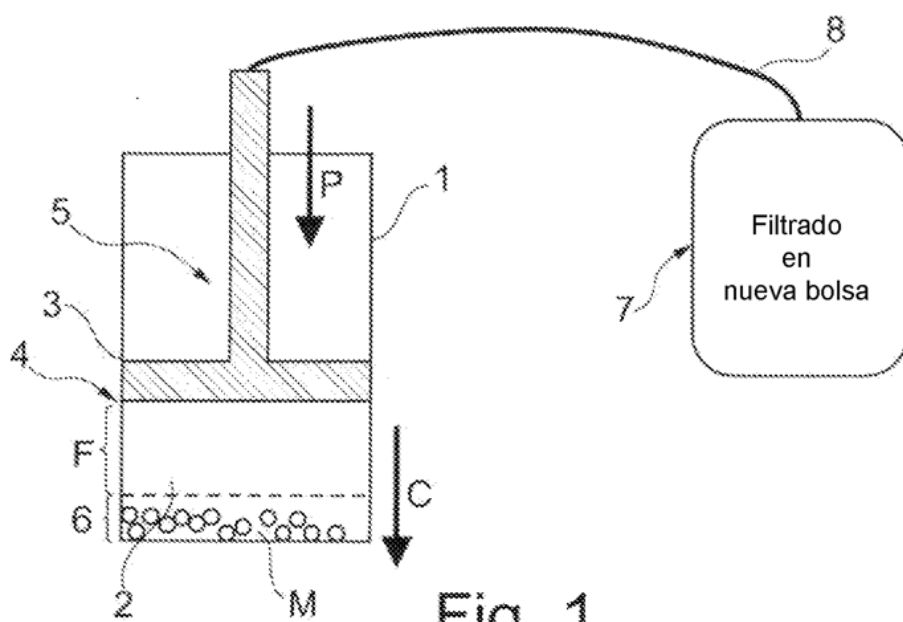
Las aplicaciones de una fuerza P sobre los respectivos pistones forzarán sucesivamente el filtrado desde el volumen 2 de muestra en el barril 1 hasta los volúmenes 2a, 2b más aguas abajo.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de filtración y centrifugación, que comprende:
un barril;
un volumen en el barril para recibir una muestra de fluido que va a procesarse;
5 un medio de filtro;
al menos un pistón que puede moverse en el barril para forzar al fluido en el volumen a través del medio de filtro para producir un filtrado; y
un espacio para sedimentar el material particulado,
en el que el dispositivo puede centrifugarse, y
10 en el que dicho espacio se ubica en o se comunica con el volumen de modo que el material particulado no obstruya o al menos no obstruya completamente el medio de filtro durante tal centrifugación del dispositivo,
caracterizado porque el dispositivo comprende al menos dos pistones con el volumen para recibir el fluido ubicado entre los mismos; y
el barril comprende al menos dos cilindros que reciben respectivamente uno de los al menos dos pistones.
- 15 2. Dispositivo de filtración y centrifugación según la reivindicación 1, en el que el medio de filtro incluye una o más membrana(s) de filtro.
3. Dispositivo de filtración y centrifugación según la reivindicación 1 ó 2, en el que el espacio para alojar al material particulado se ubica lejos de dicho medio de filtro y preferiblemente comprende un espacio o rebaje dedicado para alojar al material particulado.
- 20 4. Dispositivo de filtración y centrifugación según la reivindicación 3, en el que el rebaje comprende un orificio de comunicación para permitir la retirada del material particulado.
5. Dispositivo de filtración y centrifugación según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los al menos dos cilindros se inclinan en relación entre sí con el espacio para alojar al material particulado ubicado en el ápice.
- 25 6. Dispositivo de filtración y centrifugación según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los al menos dos pistones están opuestos entre sí.
7. Dispositivo de filtración y centrifugación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de filtro se ubica en el/los pistón/ pistones.
8. Dispositivo de filtración y centrifugación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el barril comprende un segundo volumen en el lado aguas abajo del medio de filtro dispuesto para recibir el filtrado que ha pasado el medio de filtro.
- 30 9. Dispositivo de filtración y centrifugación según la reivindicación 8, que comprende además un orificio conectado o que puede conectarse a un receptáculo de fluido externo y que se comunica con el segundo volumen en el lado aguas abajo del medio de filtro.
10. Dispositivo de filtración y centrifugación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el/cada pistón coopera con una varilla de empuje adaptada para acoplar con un dispositivo externo para aplicar fuerza para impulsar el pistón.
- 35 11. Dispositivo de filtración y centrifugación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tamaño del volumen en el barril para recibir la muestra de fluido es de al menos 5 ml, preferiblemente al menos 150 ml, más preferiblemente al menos 200 ml.
- 40 12. Dispositivo de filtración y centrifugación según cualquier reivindicación anterior y un aparato para aplicar una fuerza al dispositivo de filtración y centrifugación, que comprende un actuador eléctrico, neumático o mecánico para mover los dos o más pistón/ pistones en el barril del respectivo dispositivo.
13. Método para la filtración estéril de una muestra, que comprende las etapas:
introducir la muestra en el volumen de un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
45 someter el dispositivo a centrifugación para sedimentar el material particulado contenido en la muestra en el espacio lejos del medio de filtro; y

aplicar fuerza al/ a los pistón/ pistones para forzar al fluido de la muestra en el volumen a través del medio de filtro para producir un filtrado.

14. Método según la reivindicación 13, que comprende además una etapa de recuperación del material particulado recogido en el espacio y/o filtrado desde el dispositivo hacia un receptáculo externo.



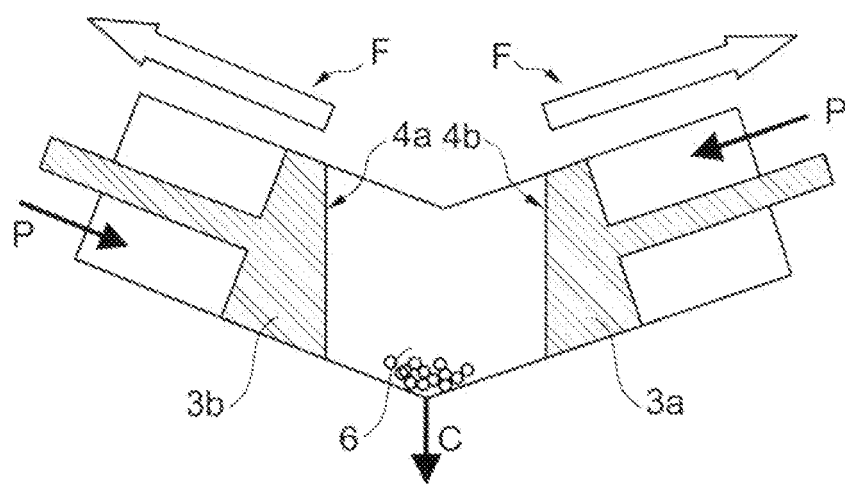


Fig. 4

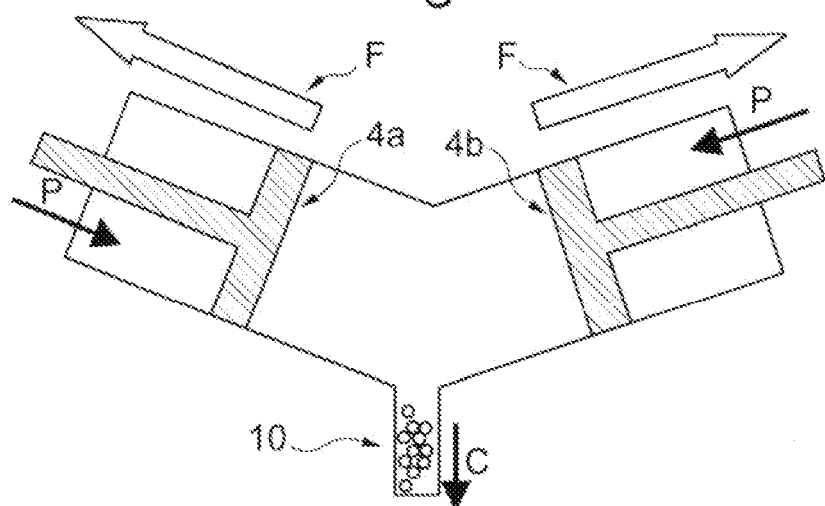


Fig. 5

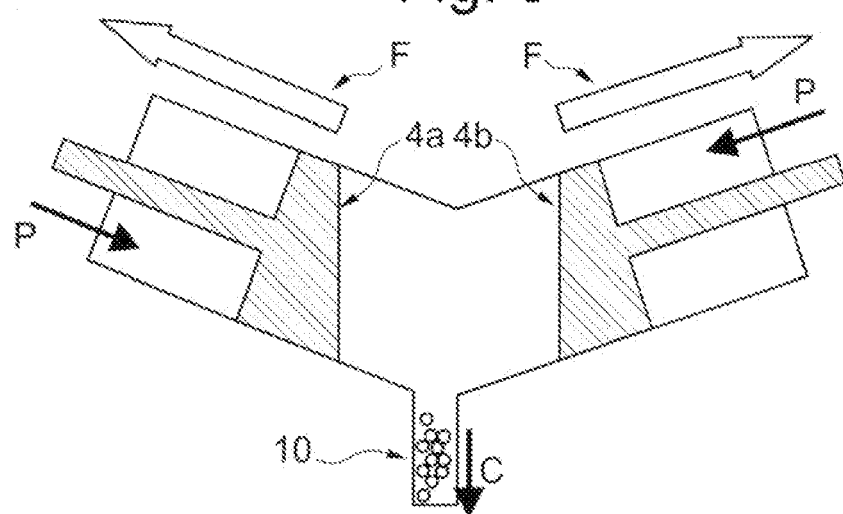


Fig. 6

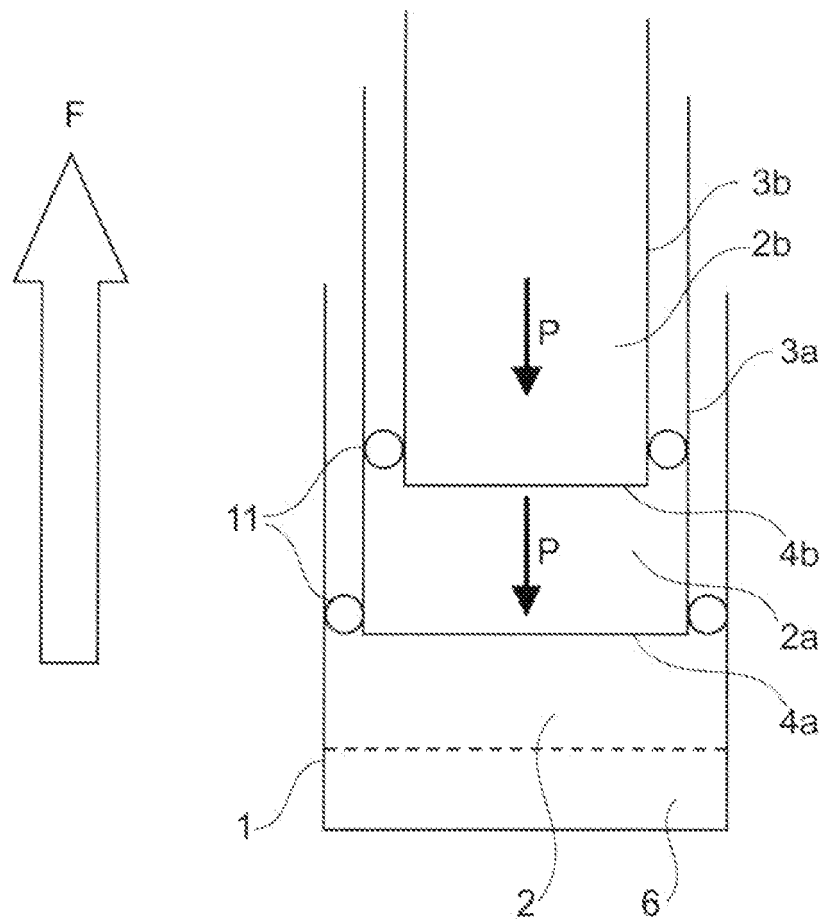


Fig. 7