

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 234**

51 Int. Cl.:
B01D 69/02 (2006.01)
F03G 7/00 (2006.01)
B01D 61/00 (2006.01)
B01D 69/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06791419 .2**
96 Fecha de presentación: **20.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1937395**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **Membrana de agua biomimética que comprende acuaporinas usadas en la producción de energía de sanidad**

30 Prioridad:
20.09.2005 DK 200501309
20.09.2005 US 718890 P
19.05.2006 WO PCT/DK2006/000278

73 Titular/es:
Aquaporin A/S
Ole Maaløes Vej 3
2200 Copenhagen , DK

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2012

72 Inventor/es:
JENSEN, Peter Holme

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2012

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 377 234 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

Membrana de agua biomimética que comprende acuaporinas usadas en la producción de energía de salinidad

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una planta de energía que utiliza energía de salinidad y comprende una membrana de agua biomimética que comprende canales de acuaporina funcionales o tetrámeros de canales de acuaporina, adecuados para el transporte de agua desde un lado de la membrana hacia el otro lado, impulsada por un gradiente de presión osmótica. La ósmosis de presión retardada se utilizará en la producción de energía de salinidad.

Por ello se utilizan los principios de la naturaleza para producir energía pura e inocua para el medio ambiente.

10 **Antecedentes de la invención**

Cuando el agua que contiene sal se diluye en agua dulce, se puede extraer un potencial extenso de energía. La energía de salinidad es energía estable que no depende del clima o del viento. Es renovable y no genera ningún efecto ambiental grave conocido.

15 El principio de la energía de salinidad se llama ósmosis de presión retardada (PRO), y se refiere a la utilización de la energía que puede ser liberada cuando agua salada se mezcla con agua dulce. Esto sucede mediante la realización de cada cámara en un recipiente distinto de una membrana. La membrana tolera el flujo a través del agua dulce, pero no de agua salada, ver la figura 1. El agua dulce fluirá a través del otro lado, y la energía de este flujo puede ser aprovechada mediante el uso de una turbina. La necesidad natural de dilución de la sal es tan grande que corresponde a 27 bares, es decir, cinco a seis veces la presión en un grifo de agua o de una caída de 260 metros de agua dulce. Esta energía es la llamada presión osmótica entre agua dulce y agua salada.

20 La energía de salinidad es una de las mayores fuentes de energía renovable que aún no ha sido explotada. El potencial explotable en todo el mundo se estima en 2.000 TWh al año. Un desarrollo tecnológico todavía considerable es necesario para aprovechar al máximo este recurso. Por lo tanto, el coste potencial de la energía de esta fuente es aún mayor que la energía hidroeléctrica más tradicional, pero es comparable a otras formas de energía renovable que ya se producen en plantas a gran escala.

25 Para la producción de energía de salinidad, la capacidad de ensuciarse y de flujo de las membranas son críticas, y hoy la membrana de agua que separa las dos cámaras, con agua de mar en un lado y agua dulce en el otro lado, respectivamente, es la etapa limitativa en la explotación del potencial en la producción de energía de salinidad.

30 Desde el descubrimiento las proteínas de transporte de agua de acuaporina se distinguen por su capacidad de transporte de forma selectiva de moléculas de H₂O a través de las membranas biológicas ha habido un cierto interés en la elaboración de una membrana artificial de agua que incorpore estas proteínas, ver la solicitud de patente publicada US 2004/0049230 "Membranas biomiméticas" que tiene como objetivo describir cómo las proteínas de transporte de agua forman parte de una membrana para permitir la purificación del agua. La forma preferida descrita tiene la forma de un disco de filtro convencional. Para la fabricación de este disco, una monocapa de 5 nm de espesor de copolímero de tres bloques sintéticos y proteína se deposita en la superficie de un disco de ultrafiltración comercial de 25 mm usando un canal de Langmuir-Blodgett. La monocapa sobre el disco está reticulada usando luz UV en el polímero para aumentar su durabilidad.

35 Se ha sugerido que una tecnología de purificación de agua se puede crear mediante la expresión de la proteína de acuaporina en vesículas bicapa lipídica y repartir estas membranas en soportes porosos, ver James R. Swartz, página de inicio:

[http://chemeng.stanford.edu/01About the Department/03Faculty/Swarty/swartz.html](http://chemeng.stanford.edu/01About%20the%20Department/03Faculty/Swarty/swartz.html)

45 Además, el cesionario presente ha presentado previamente una solicitud de patente internacional donde las acuaporinas están comprendidas en una construcción en sándwich que tiene por lo menos dos capas de soporte permeables separadas por al menos una bicapa lipídica que comprende canales de agua de acuaporina funcionales o que tiene una bicapa lipídica que rodea una capa de soporte hidrofóbica perforada, ver la solicitud de patente internacional N° PCT/DK2006/000278, que reivindica las prioridades de las solicitudes de patente danesas N° PA 2005 00740 y la solicitud de patente provisional US 60/683,466. El canal de agua que comprende las membranas descritas en el documento PCT/DK2006/000278 se incorpora aquí por referencia y son consideradas las membranas de agua más prometedoras para su uso en la presente invención y, por lo tanto, todas las descripciones en el documento PCT/DK2006/000278 en relación con las membranas de agua y su preparación se considera como una realización importante de la presente invención.

50 Todas las solicitudes anteriormente descritas de utilización de acuaporinas en membranas artificiales se han dirigido a la producción de agua purificada. La presente invención amplía el ámbito de utilización de los canales de transporte de agua de la naturaleza, acuaporinas, en el campo de soluciones energéticas sostenibles. La presente

invención tiene como objetivo utilizar membranas biomiméticas funcionales que comprenden canales de acuaporina para producir energía de salinidad, utilizando la ósmosis a presión retardada.

Descripción de la invención

5 La presente invención se refiere en un aspecto a una planta de energía que utiliza energía de salinidad y que comprende una membrana biomimética que comprende acuaporinas, y en otro aspecto, la presente invención se refiere al procedimiento para la producción de energía/potencia de salinidad utilizando una membrana.

La membrana de agua biomimética que comprende proteínas de transporte de agua de acuaporina que se puede producir usando múltiples procedimientos diferentes.

10 La presente invención también se refiere al uso de cualquier membrana de agua biomimética que comprende acuaporinas en la producción de energía de salinidad.

Las ventajas de la presente invención incluyen el uso de sistemas propios de la naturaleza para el transporte y la elevación de agua en la cima de los árboles. Las acuaporinas son moléculas diseñadas por la naturaleza para el transporte de agua usando presión osmótica como fuerza motriz - Esto es explotado en la presente invención para producir energía inserte para el medio ambiente.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un dibujo que describe los principios detrás de la presión de ósmosis retardada. Dos cámaras se llenan con agua de mar y agua dulce, respectivamente y separadas por una membrana permeable al agua. El gradiente de presión osmótica produce un flujo de agua dulce en la cámara de agua de mar creando una presión, que puede ser utilizada para producir energía.

20 La figura 2 es un dibujo que describe el diseño de una membrana biomimética que comprende acuaporinas. La figura muestra los diferentes componentes de la membrana según una realización de la presente invención que tiene bicapas lipídicas soportadas o copolímeros en bloque con moléculas de acuaporina incorporadas en un ejemplo de estructura en sándwich de una membrana de agua según la invención.

La figura 3 es un dibujo que describe el diseño de una membrana biomimética que comprende acuaporinas.

25 La figura muestra los diferentes componentes de la membrana según otra realización de la presente invención que tiene bicapas lipídicas de soporte o copolímeros en bloque con moléculas de acuaporina incorporadas intercaladas en torno a una película hecha de un polímero poroso, sólido, químicamente inerte de tetrafluoroetileno, por ejemplo, un película porosa de Teflon™.

La figura 4 ilustra los distintos miembros del grupo de acuaporina y acuagliceroporina de proteínas.

30 La figura 5 es un ejemplo de un sistema PRO. Muestra una planta PRO en la que agua dulce y agua de mar se introduce en filtros de agua separados, antes de que las corrientes pasen entre sí a cada lado de una membrana semipermeable, en este caso las membranas de agua biomiméticas funcionales que comprende canales de acuaporina. Una porción de la mezcla de permeado y agua salada con presión elevada se pasa a una turbina para la producción de energía eléctrica. El balance de la corriente permeada se pasa a un intercambiador de presión en el que el agua de mar de entrada se presuriza y se introduce en el módulo de la membrana.

Descripción detallada de la invención

40 El principio de la energía de salinidad fue inventado por un investigador norteamericano israelí en la década de 1970, pero nadie hasta ahora ha logrado desarrollar una tecnología de membrana que sea suficientemente buena para beneficiarse de la energía potencial almacenada en el gradiente osmótico entre el agua de mar y el agua dulce. Las membranas de agua biomiméticas que comprende canales de acuaporina funcionales podrían ser la respuesta.

En el contexto actual, una "membrana de agua" se refiere a una estructura que permite el paso de agua, mientras que la mayoría de otros materiales o sustancias no se les permite el paso al mismo tiempo. Las membranas de agua preferidas utilizadas en la presente invención son esencialmente sólo permeables al agua (y en algunos casos al glicerol), mientras que el paso de solutos y otros solventes no está permitidos.

45 **Acuaporinas**

50 Las células vivas están envueltas por una membrana bicapa lipídica, que separa las células de otras células y su medio extracelular. Las membranas bicapa lipídicas son esencialmente impermeables al agua, iones y otras moléculas polares y, sin embargo, en muchos casos, estas entidades deben ser rápidamente y selectivamente transportadas a través de una membrana, a menudo en respuesta a una señal extra- o intracelular. La tarea de transportar agua se lleva a cabo mediante proteínas de canal de agua de acuaporina (Preston et al., 1992). Las acuaporinas son cruciales para la vida en cualquier forma y se encuentran en todos los organismos, desde bacterias a través de plantas al hombre. Las acuaporinas facilitan el transporte rápido altamente selectivo de agua, lo que

5 permite a la célula regular su volumen y presión osmótica interna de acuerdo a hidrostática y/o diferencias de presión osmótica a través de la membrana celular. La importancia fisiológica de las acuaporinas en el ser humano es quizás más evidente en el riñón, donde ~150-200 litros de agua deben ser reabsorbidos de la orina primaria cada día, es decir, la acuaporina que facilita el transporte el agua se invoca cuando el agua rápidamente debe ser recuperada de un fluido corporal. En los riñones, esto es posible principalmente por dos acuaporinas indicadas AQP1 y AQP2 (11 acuaporinas diferentes son conocidas en los seres humanos). En las plantas, las acuaporinas también son esenciales para la absorción de agua en la raíz y para mantener el equilibrio del agua en toda la planta (Agre et al., 1998, Borgnia et al., 1999). En las plantas, el agua es absorbida por las mismas fuerzas osmóticas que esta invención tiene la intención de utilizar en un sistema PRO en la producción de energía de salinidad.

10 Los estudios de transporte de agua en diversos organismos y tejidos sugieren que las acuaporinas tienen un estrecho poro que evita cualquier flujo de grandes moléculas, iones (sales) e incluso protones (H_3O^+) e iones hidroxilo (OH^-), mientras que se mantiene una velocidad de penetración de agua extremadamente alta; $\sim 10^9$ moléculas de H_2O por canal por segundo (Agre et al, 1998, Borgnia et al, 1999). Hasta 2000 y 2001, donde se informó de la primera estructura de alta resolución en 3D de AQP1 y de acuagliceroporina GlpF de proteínas del canal bacteriano que conduce glicerol relacionado (Fu et al., 2000; Murata et al., 2000; Ren et al., 2001; Sui et al., 2001), poco se sabía sobre el origen de la selectividad de agua.

20 Sin embargo, sobre la base de las estructuras experimentales, se presentaron modelos computacionales detallados que explican no sólo la alta tasa de permeabilidad y la estricta selectividad de agua, sino también la capacidad de las acuaporinas para evitar la fuga de protones (de Groot y Grubmuller, 2001; Tajkhorshid et al., 2002, Jensen et al., 2003, Zhu et al. 2003, de Groot et al., 2003, Burykin y Warshel 2003, Ilan et al., 2004, Chakrabarti et al., 2004). En esencia, la arquitectura de los canales de acuaporina permite a las moléculas de agua pasar sólo en un único archivo, mientras que la afinación electrostática del canal interior controla la selectividad de la acuaporina contra cualquier especie cargada, es decir, el transporte de cualquier sal (ion), así como los protones e iones hidroxilos se suprime (de Groot y Grubmuller et al., 2001; Tajkhorshid et al, 2002, Jensen et al, 2003, Zhu et al 2003, de Groot et al, 2003, Burykin y Warshel 2003, Ilan et al, 2004 , Chakrabarti et al., 2004). En pocas palabras, esto implica que sólo las moléculas de agua pasan a través del poro de agua de acuaporina, nada más.

25 Cada unidad en un canal de acuaporina transporta $\sim 10^9$ moléculas H_2O /seg, es decir, $\sim 4 \cdot 10^9$ moléculas/canal/seg. Por lo tanto, 1 g de acuaporina es capaz de transportar ~ 720 litros de agua/seg a una presión muy alta.

30 El término "familia de acuaporina de proteínas de membrana", tal como se usa aquí, incluye también las proteínas GLpF además de las moléculas de agua también canales de glicerol.

La presente invención se refiere a una planta de energía que utiliza energía de salinidad según la reivindicación 1, un procedimiento para la producción de energía/potencia de salinidad según la reivindicación 5, y el uso de una membrana biomimética que comprende canales de agua de acuaporina de ósmosis de presión retardada.

35 La membrana de agua de acuaporina biomimética que comprende las proteínas de transporte de agua se puede producir usando múltiples procedimientos diferentes. Diferentes procedimientos han sido descritos en las solicitudes de patente que se describen anteriormente.

Aspectos relacionados con el uso de membranas bicapa lipídicas

40 En los siguientes procedimientos, donde las acuaporinas se han reconstituido en vesículas de lípidos, y se transforman en una membrana bicapa lipídica de soporte para formar una membrana de filtración de agua utilizando un procedimiento como el procedimiento de Langmuir-Blodgett que se describe:

45 La permeabilidad intrínseca del material de la membrana debe ser segura. Un material de baja permeabilidad es preferible, sin embargo, al mismo tiempo debe ser robusto y capaz de incorporar las acuaporinas para constituir una matriz de filtrado estable y densa en 2D. Varios procedimientos se utilizan comúnmente para la preparación de bicapas soportadas. Una técnica simple es el procedimiento de Langmuir-Blodgett. Una solución de lípidos en un solvente orgánico adecuado se extiende en una subfase acuosa en un canal de Langmuir y el solvente orgánico se evapora. Un par de barreras móviles se utilizan para comprimir la película de lípido lateralmente a una presión de superficie deseada. Luego, el sustrato pasa verticalmente a través de la película transfiriendo así una capa de una molécula lipídica gruesa (monocapa) sobre el sustrato. Una segunda monocapa se puede transferir al pasar el sustrato a través de la película otra vez más. Un total de tres monocapas han sido transferidas mediante el procedimiento de deposición vertical (Langmuir-Blodgett), sin embargo, una cuarta capa se puede transferir mediante el uso de deposición horizontal, llamada de Langmuir-Schaeffer (LS), de la última capa. Los procedimientos pueden ser utilizados con una variedad de lípidos. Las membranas nativas biológicas a menudo son asimétricas. Tanto LB y LS ofrecen la posibilidad de preparar bicapas asimétricas. Esto se hace mediante el intercambio de la película de lípidos en la subfase entre las deposiciones.

55 Otra forma de preparar bicapas de soporte es el procedimiento de fusión de vesículas (Brian y McConnell, 1984). Una solución de pequeñas vesículas unilaminares (SUV) se aplica sobre la superficie de una pieza de silicio hidrofiliado o mica recién cortada. Cuando esta muestra se deja a baja temperatura ($4^\circ C$) las vesículas se fusionan con la superficie para hacer una doble capa continua sin estar atada a ninguna teoría que ha sido la hipótesis de que

las vesículas primero adsorben la superficie del sustrato, luego se fusionan para hacer una estructura plana a modo de panqueque y finalmente se rompen y se extienden resultando en una bicapa única sobre la superficie (Reviakine y Brisson, 2000). También se ha sugerido que después de la fusión con el sustrato sólo la parte de la vesícula que está en contacto directo con el sustrato se convierte en la bicapa de soporte (Leonenko et al. 2000). Con este mecanismo se rompe la vesícula en los bordes con la mayor curvatura y la parte superior de la bicapa puede migrar a la superficie del sustrato para aumentar el tamaño de la bicapa de forma compatible. Se ha informado que se forman bicapas en cuestión de minutos de aplicación de la solución sobre el sustrato (Tokumasu et al. 2003), pero este corto tiempo de incubación puede resultar en bicapas incompletas. Una incubación de horas o durante una noche también ha sido informada (Reimhult et al. 2003, Rinia et al. 2000).

Una tercera técnica que se puede utilizar para preparar bicapas soportadas es centrifugado (Reimhult et al. 2003, Simonsen y Bagatolli 2004). En el centrifugado el lípido se disuelve en un solvente adecuado y una gota se coloca en el sustrato que gira mientras se evapora el solvente y se produce una capa de lípidos. Dependiendo de la concentración de la solución de los lípidos, la película centrifugada consiste en una o más bicapas lipídicas. Sin embargo, la hidratación de las múltiples capas ha demostrado ser inestable, y por lo general sólo una bicapa de soporte queda en la superficie. Este procedimiento es fácil y rápido y se ha ejercido con lípidos con bajo punto de fusión (POPC), así como con lípidos con intermedia (DPPC) y muy alta temperatura de transición (ceramida). Lípidos útiles incluyen, por ejemplo, fosfolípidos y lípidos anfifílicos.

Cuando se quiere incorporar péptidos y proteínas en las bicapas soportadas, la técnica de fusión de vesículas es la más aplicable, ya que los otros procedimientos mencionados anteriormente implican la solubilización de las proteínas o péptidos en solventes orgánicos. Muchas proteínas de membrana pueden desnaturalizarse en solventes orgánicos, especialmente si contienen grandes dominios expuestos a la solución acuosa a ambos lados de la membrana. Por lo tanto, es preferible insertar los péptidos o proteínas en vesículas. Muchos péptidos y proteínas como las acuaporinas se pueden cosolubilizar con lípidos en el solvente orgánico antes de la formación de vesículas, y las vesículas que contienen péptidos se aplican al sustrato. Esto se ha hecho con una serie de péptidos, por ejemplo WALP (Rinia et al. 2000), gramicidina (Mou et al. 1996), clavanina A (van Kan et al. 2003) y proteína β amiloide (Un et al. 2001). Las proteínas de membrana tales como acuaporinas son preferentemente insertadas en las vesículas por otros medios. Esto se puede hacer usando de las estrategias para la reconstitución de las proteínas de membrana en vesículas tal como se describe para citocromo c oxidasa como una proteína modelo en la introducción al capítulo 4 de las páginas 41-45 de la tesis "Supported bilayers as models of biological membranes" por Danielle Keller, febrero de 2005, MEMPHYS-Centro de Física de biomembranas, Departamento de Física, Universidad del Sur de Dinamarca y Centro Danés de Polímeros, Laboratorio Nacional de Riso, Dinamarca.

El apilamiento de múltiples capas de las matrices en 2D individuales es posible y puede ser deseable. Las dimensiones finales de las matrices apiladas dependerá de la solidez general y de la permeabilidad intrínseca de la membrana de material seleccionado/membrana de composición. El apilamiento podría apartarse de un sistema donde las proteínas trivialmente se insertan en una sola bicapa lipídica, probablemente soportada. Una serie posterior de eventos de colapso de vesículas en la bicapa de soporte podrían proporcionar múltiples capas de filtrado de los dispositivos de unidad, dado que el requisito previo de vesículas se reconstituye con una acuaporina adecuada. La incorporación de la unidad de apilado de dispositivos en un estabilizador de membrana o la estabilización de la matriz del polímero y la costura posterior de las unidades individuales produciría una malla de filtración total, eventualmente a través de procesos de autoensamblaje.

La tabla 1 es una lista de los lípidos útiles para la formación de bicapas lipídicas que se utilizarán en las membranas de agua de la invención:

Lípidos útiles para la reconstitución de las acuaporinas y para la formación de bicapas lipídicas son: POPC, DPPC, ceramidas y sus mezclas, ver la Tabla 1.

45 **Tabla 1**

Fosfatidilcolinas:

1,2-dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)

1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)

1,2-distearoilfosfatidilcolina (DSPC)

50 1,2-dioleoilfosfatidilcolina (DOPC)

1,2-dimiristoleoilfosfatidilcolina

1,2-dipalmitoleoilfosfatidilcolina

1,2-dipetroselinolilfosfatidilcolina

1,2-dielaidoilfosfatidilcolina

- 1,2-dilinoleoilfosfatidilcolina
- 1,2-dilinoilfosfatidilcolina
- 1,2-dielcosenoilfosfatidilcolina
- 1,2-diaraquidonoilfosfatidilcolina
- 5 1,2-dierucoilfosfatidilcolina
- 1,2-dnervonoilfosfatidilcolina
- 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC)
- 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilcolina
- 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidilcolina
- 10 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidilcolina
- 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilcolina (SOPC)
- 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidilcolina
- 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidilcolina
- 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidilcolina
- 15 1-oleoil-2-palmitoilfosfatidilcolina
- 1-oleoil-2-estearoilfosfatidilcolina
- 1,2-didocosahexaenoilfosfatidilcolina
- Fosfatidiletanolaminas:**
- 1,2-dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE)
- 20 1,2-dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE)
- 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE)
- 1,2-dioleoilfosfatidiletanolamina (COPE)
- 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (POPE)
- 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidiletanolamina
- 25 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidiletanolamina
- 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidiletanolamina
- 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE)
- 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidiletanolamina
- 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidiletanolamina
- 30 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-dielaidoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-dilinoleoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-dilinoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-diaraquidonoilfosfatidiletanolamina
- 35 1,2-didocosahexaenoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-dipalmitoleoilfosfatidiletanolamina

Fosfatidilgliceroles:

- 1,2-dimiristoilfosfatidilglicerol (MPG)
- 1,2-dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)
- 1,2-diestearoil (DSPG)
- 1,2-dioleoilfosfatidilglicerol (OPG)
- 5 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilglicerol (POPG)
- 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilglicerol
- 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidilglicerol
- 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidilglicerol
- 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilglicerol (SOPG)
- 10 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidilglicerol
- 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidilglicerol
- 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidilglicerol

Fosfatidilserinas:

- 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilserina (COP)
- 15 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilserina
- 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidilserina
- 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidilserina
- 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilserina (SOP)
- 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidilserina
- 20 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidilserina
- 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidilserina
- 1,2-dimiristoilfosfatidilserina (DMPS)
- 1,2-dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)
- 1,2-distearoilfosfatidilserina (DSPS)
- 25 1,2-dioleoilfosfatidilserina (DOPS)
- 1,2-didocosahexaenoilfosfatidilserina
- 1,2-dierucoilfosfatidilserina

Lípidos especiales:

- Cardiolipina
- 30 Lípidos bipolares

Lípidos Polimerizables:

- 1,2-di-10,12-tricosadiinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DTPC)
- 1,2-di-10,12-tricosadiinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DTPE)
- 1-palmitoil-tricosadiinoil-2,10,12-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (BIL)
- 35 (DC8, 9PC [1,2-bis (10,12-tricosadiinoil)-sn-glicero-3-fosfocolina]
- diPhyPC [1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfocolina]

Extractos naturales de lípidos:

Fosfatidilcolina de yema de huevo

Fosfatidilcolina de corazón bovino

Fosfatidilcolina de cerebro

Fosfatidilcolina de hígado de bovino

5 Fosfatidilcolina de soja

Fosfatidiletanolamina de E. Coli

Fosfatidiletanolamina de corazón bovino

Fosfatidiletanolamina de cerebro

Fosfatidiletanolamina de hígado de bovino

10 Fosfatidiletanolamina de huevo

Fosfatidilinositol de hígado de bovino

Fosfatidilinositol de soja

Fosfatidilserina de cerebro

Fosfatidilserina de soja

15 **Aspectos que utilizan membranas de copolímero en bloque**

En los siguientes procedimientos, donde las acuaporinas se incorporan en las membranas de copolímero en bloque de la simulación de un entorno natural se describe: Un procedimiento para formar una membrana biocompatible, que se prefiere para su uso con una membrana basada en copolímero en bloque, es el siguiente:

20 Formar una solución de copolímero en bloque en el solvente (solución BC). La solución puede ser una mezcla de dos o más copolímeros en bloque. La solución contiene preferiblemente del 1 a 90% w/v de copolímero, más preferentemente del 2 al 20%, o aún más preferentemente del 5 al 10%, tal como el 7%.

Preparar una solución de acuaporinas en la solución BC preparada, preferiblemente mediante la adición de 1,0 a 50,0 mg/mL de la acuaporina preferida, más preferentemente de 1,0 a 10,0 mg/mL.

25 Dejar caer un pequeño volumen (por ejemplo, 4 microlitros) de solución de acuaporina/BC en cada abertura o cada una de un subconjunto de aberturas, y dejar que se seque, eliminando así el solvente.

Repetir esta etapa según sea necesario para cubrir todas las aberturas.

30 El solvente es seleccionado para ser miscible tanto con el componente de agua que se utiliza en el proceso como en el componente B del copolímero en bloque. Los solventes apropiados se cree que incluyen metanol, etanol, 2-propanol, 1-propanol, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, mezclas de solventes que pueden incluir solventes más apolares como el diclorometano, siempre y cuando la mezcla tenga la miscibilidad apropiada, y similares. (Componentes del solvente que tienen tendencia a formar contaminantes destructivos de proteínas, tales como peróxidos pueden ser debidamente purificados y tratados). El solvente normalmente comprende un 10% v/v o más de la solución de acuaporina/BC aplicada, preferiblemente 20% o más, y 30% útil o más.

35 El procedimiento anteriormente descrito de introducción de las acuaporinas en una solución que contiene solvente(s) no acuoso(s) en presencia de copolímeros en bloque sirve para estabilizar la función activa de las acuaporinas. Los componentes no acuosos pueden comprender todo el solvente.

Las mezclas de copolímeros en bloque pueden ser mezclas de dos o más de las siguientes clases, donde los componentes separados pueden ser de la misma clase, pero con una distribución diferente de los bloques de polímero:

40 Copolímeros de bloque triple de fuente de polímeros E/EP/E, de poli(etileno) (E) y copoliámfolitos de tres bloques de poli(etilenopropileno) (EP). Entre (N, N dimetilamino) isopreno, estos polímeros son Al14S63A23, Ai31S23A46, Ai42S23A35, estireno y ácido metacrílico Ai56S23A21, Ai57S11A32.

45 Estireno-etileno/butileno-estireno (KRATON) G 1650, un 29% de estireno, viscosidad 8000 del copolímero tribloque de solución (25% en peso de polímero), tres bloques 100% de estireno-etileno/butileno-estireno (S-EB-S) copolímero en bloque; (KRATON) G 1652, un 29% de estireno, 1350 viscosidad de solución (25% en peso de polímero), 100% de tres bloques de copolímero en bloque S-EB-S; (KRATON) G 1657, una viscosidad de solución 4200 (25% en

peso de polímero), 35% de copolímero en bloque de doble bloque de S-EB-S, todas disponibles por parte de Shell Chemical Company. Estos copolímeros en bloque incluyen tipos de estireno-etileno/propileno (S-EP) y están disponibles en el mercado bajo los nombres comerciales (KRATON) G 1726, un 28% de estireno, 200 de viscosidad de la solución (25% en peso de polímero), un 70% de copolímero en bloque de doble bloque S-EB-S; (KRATON) G-1701X un 37% de estireno, solución de viscosidad > 50.000, 100% de copolímero en bloque de doble bloque S-EP, y (KRATON) G-1702X, un 28% de estireno, solución de viscosidad > 50.000, 100% de copolímero en bloque de doble bloque S-EP.

Copolímero de siloxano de tres bloques PDMS-b-PCPMS-b-PDMS (polidimetilsiloxano = PDMS, PCPMS = poli (3-cianopropilmetilsiloxano) puede ser preparado mediante polimerización cinéticamente controlada de hexametildiclorosiloxano iniciado por macroiniciadores de litio silanolato PCPMS delimitados. Los macroiniciadores se pueden preparar para equilibrar las mezclas de 3-ciano-propilmetilciclosiloxanos (DxCN) y dilutido difenilsilanediolato (DLDPDS) DxCNs pueden ser sintetizados por hidrólisis de 3-cianopropilmetildiclorosilano, seguido de ciclación y equilibrio de los hidrolizados resultantes DLDPDS pueden ser preparados por desprotonación de difenilsilanediol con difenilmetilitio. Mezclas de DxCN y DLDPDS pueden ser equilibradas a 100°C dentro de 5-10 horas. Mediante el control de la relación DxCN a DLDPDS, se obtienen macroiniciadores de diferentes pesos moleculares. Los cíclicos importantes en el macroiniciador equilibrado son tetrámero (8,6 +- 0,7% en peso), pentámero (6,3 +- 0,8% en peso) y hexámero (2,1 +- 0,5% en peso).

Se han caracterizado copolímeros de bloque triple 2.5k-2.5k-2.5k, 4k-4k-4k y 8k-8k-8k. Estos copolímeros de tres bloques son transparentes, separados por microfases y altamente viscosos. OPE-PDMS-PEO de tres bloques formado a partir de óxido de polietileno (PEO) y poli-copolímero de dimetil siloxano (PDMS). Poli (2 metiloxazolina)-bloque funcionalizado: Estos polímeros A-B-A incluyen versiones poli (dimetilsiloxano)-bloque- en las que los componentes tienen MW de poli (2-me-tiloxazolina) de tres bloques de aproximadamente 2 kDa, y el componente B de copolímero de aproximadamente 5 kDa, y (b) los componentes A tienen MW de aproximadamente 1 kDa, y el componente B de aproximadamente 2 kDa. Copolímero de tres bloques poli (D/L-láctido) ("PLA")-PEG-PLA. Copolímero de tres bloques poli (estireno-butadieno-b-b-estireno).

Poli (etileno (estos polímeros incluyen Pluronic F127, Pluronic P105, u óxido)/poli (óxido de propileno) Pluronic L44 de BASF (Performance Chemicals). Copolímeros de bloque triple PDMS-PCPMS-PDMS. Una serie de pesos de epoxi y polisiloxano de vinilo delimitado (copolímeros de tres bloques de polidimetilsiloxano con policianopropilmetilsiloxano molecular variado de forma sistemática) se pueden sintetizar a través de copolímero de tres bloques de polimerización aniónica utilizando LiOH como iniciador. Polidieno-poliestireno-polidieno disponible como Protolyte A700 de DAIS-Analytic, Odessa, FL. Azo-funcional de copolímero de tres bloques de estireno-butadieno-HEMA. Copolímero de tres bloques anfifílico que lleva grupos finales polimerizables. Copolímero de bloque triple sindiotáctico polimetilmetacrilato (sPMMA)-polibutadieno (PBD)-sPMMA. Copolímero de tres bloques de metacrilato de amina terciaria de tres bloques biodegradable PLGA-b-PEO-b-PLGA, copolímero de bloque triple poliactida-b-poliisopreno-b-poliactida, copolímero de tres bloques poli (isopreno-bloque-estireno-bloque-dimetilsiloxano), copolímero de bloque triple de bloque de poli (óxido de etileno), poliestireno-bloque-poli (óxido de etileno), copolímero de bloque triple poli (óxido de etileno)-poli (THF)-poli (óxido de etileno). Óxido de etileno de tres bloques de poli E-caprolactona (Birmingham Polymers, Birmingham), AL poli (DL-láctico-co-glicólico) (Birmingham Polymers), poli (DL-láctico) (Birmingham Polymers), poli (L-láctico) (Birmingham Polymer), poli (glicólico) (Birmingham Polymers), poli (DL-láctico-cocaprolactona) (Birmingham Polymers), estireno-isopreno-estireno de tres bloques (Japanese Synthetic Rubber Co., Tokio, Japón) MW = 140 kg/mol, relación de copolímero en bloque de PS/PI = 15/85. PMMA-b-PIB-b-poli PMMA (metacrilato de metilo) (PMMA) y poliisobutileno (PIB). Polímeros tribloque de PLGA-PEO-PLGA de copolímero poli (DL-láctico-co-glicólico) (PLGA) y PEO. Membrana conductora de protones de copolímero de tres bloques estireno/etileno sulfonado-butileno/estireno (S-SEBS). Copolímero de tres bloques de poli (1-láctico)-bloque-poli (óxido de etileno)-bloque-poli (1-láctico) de poli-éster-éster-éster. Copolímero de tres bloques de PLA/PEO/PLA. La síntesis de los copolímeros de bloque triple se puede preparar mediante polimerización mediante apertura de anillo de DL-láctico o e-caprolactona en presencia de poli (etilenglicol), usando metal Zn no-tóxico o hidruro de calcio como coiniciador en lugar del octoato de estaño. La composición de los copolímeros se puede variar mediante el ajuste de la relación poliéster/poliéter.

Los polímeros anteriores se pueden utilizar en mezclas de dos o más de los polímeros en la misma clase o diferente. Por ejemplo, en dos mezclas de polímeros medidos en porcentaje en peso del primer polímero, estas mezclas pueden comprender 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45% ó 45-50%. O, por ejemplo cuando se utilizan tres polímeros: el primero puede contener 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45% ó 45-50% de la totalidad de componentes de polímero, y el segundo puede ser 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45% ó 45-50% del resto.

Otras características de los aspectos de la invención

Las membranas de agua utilizadas en la invención son preparadas según las enseñanzas del documento PCT/DK2006/000278. Las enseñanzas de esta patente en particular pueden ser aplicadas tanto a la preparación de las membranas de agua que comprenden las acuaporinas en la bicapa lipídica como a las acuaporinas incluidas en copolímeros en bloque tal como se detalla anteriormente.

Sin embargo, una serie de realizaciones preferidas se describen a continuación:

Como se mencionó anteriormente, la membrana de agua, en una realización, puede comprender una construcción en sándwich con al menos dos capas de soporte permeable separadas por dos capas de lípidos al menos un copolímero en bloque que comprende canales de agua acuaporina funcional.

5 La membrana de agua en esta realización, por lo tanto, puede consistir en una membrana de lípidos anfífilos, tales como una membrana que comprende los lípidos que se describen en la Tabla 1, o un copolímero en bloque. Así, la(s) bicapa(s) lipídica(s) esencialmente consiste(n) en lípidos anfífilos seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y cardiolipina, así como sus mezclas, por ejemplo, fosfolípidos, tales como 1,2-dipalmitoil-sn-fosfatidilcolina (DPPC), o mezclas de fosfolípidos.

10 Alternativamente, las bicapas lipídicas pueden consistir esencialmente en, o contener, lípidos polimerizables, ver la Tabla 1.

15 La membrana el agua utilizada en esta realización de la invención comprende por lo tanto canales de agua de acuaporina reconstituídos en bicapas lipídicas en contacto con un soporte poroso. La capa de soporte utilizada en las membranas útiles en la invención generalmente debe ser compatible con la membrana de agua preparada tal como se describe anteriormente.

20 Materiales de soporte útiles con una superficie hidrofílica para la preparación de membranas de agua según la invención se seleccionan preferiblemente de mica, tal como moscovita, cinta de mica, polisulfona, AlO_2 , y materiales poliméricos que tienen una superficie hidrofílica de celulosa, por ejemplo. Los materiales de soporte son esencialmente planos, lo que significa que el soporte es preferiblemente plano, pero la curvatura del soporte es aceptable, tal como sea necesario cuando se fabrican las membranas envueltas en espiral. En este caso, el material de soporte es preferiblemente flexible, tal como membranas de celulosa.

25 El soporte poroso preferentemente puede comprender un material tal como mica que tiene una estructura esencialmente plana, con una superficie hidrofílica y en donde los micro o nano poros se han formado, por ejemplo, mediante grabado. Por lo tanto, en una realización especial, la capa de soporte permeable comprende una capa hidrofílica esencialmente plana, que comprende mica o cinta de mica con un espesor de capa en la escala de micras a mm y en el que se han formado nanoporos tienen un diámetro de menos de aproximadamente 50 nm (típicamente en el rango de 10-40 nm) (por ejemplo, mediante grabado tal como una técnica de grabado de pista). La mica es preferiblemente moscovita.

30 Las capas permeables de soporte también pueden comprender una superficie de membrana hidrofílica, tal como una membrana seleccionada del grupo que consiste en membranas de silicona, polisulfona, AlO_2 , y polímeros, tal como celulosa con una superficie hidrofílica, donde se han formado nanoporos con un diámetro de menos de aproximadamente 50 nm (típicamente en el rango de 10-40 nm).

35 La membrana lipídica que comprende canales de acuaporina puede ser una bicapa que se asemeja a la constitución natural de las membranas celulares biológicas, o la membrana lipídica puede consistir en múltiples bicapas de vesículas de lípidos de fusión depositadas. Los lípidos son preferentemente de carácter anfífilo, como los fosfolípidos (o fosfoglicéridos), esfingolípidos y cardiolipina. Al depositar las capas de lípidos en el sustrato poroso, los canales de acuaporina preferentemente pueden ser depositados al lado o en los poros ya existentes en el material de soporte.

40 El soporte permeable o poroso utilizado en las realizaciones preferidas de la invención está preparado según R.M. Webber, J.L. Anderson, M.S. John, *Macromolecules* 23 (1990), 1026-1034.

Es preferible obtener un número final y la distribución de poros, que es aproximadamente igual al número y distribución de canales de acuaporina en la capa de lípidos.

45 Tal como se mencionó anteriormente, otra realización implica la reconstitución de los canales de agua de acuaporina en una bicapa lipídica plana montada en torno a una membrana de soporte poroso con una superficie hidrofóbica, tal como película de teflón, donde las monocapas de lípidos se montan a cada lado de la membrana de soporte poroso. En los poros de la membrana de soporte porosa las bicapas lipídicas se unirán, donde los canales de agua de acuaporina se pueden reconstituir.

50 Esta realización utiliza así una membrana de agua que comprende una construcción en sándwich que tiene al menos dos monocapas de lípidos, que, cuando se unieron en una bicapa, comprende canales de agua de acuaporina funcionales, estando dichas al menos dos monocapas de lípidos separadas por al menos una capa de soporte permeable. Normalmente, la capa de soporte comprende un material hidrofóbico perforado que forma la superficie de contacto con las monocapas de lípidos y en el que la bicapa lipídica se forma en las perforaciones del material perforado hidrofóbico.

55 Es preferible que el material hidrofóbico en esta realización tenga un grado de hidrofobia que corresponde a un ángulo de contacto de al menos 100° entre una gota de agua desionizada y el material hidrofóbico, donde se realiza la

medición del ángulo de contacto a 20°C y la presión atmosférica, pero mayores grados de hidrofobicidad son preferidos, tales como los correspondientes a los ángulos de contacto de al menos 105°, 110°, 120° y 1 20°. Materiales hidrofóbicos preferidos son parafina o teflón.

5 El material hidrófobo es generalmente plano (aunque puede ser flexible y así curvado) y las perforaciones suelen estar distribuidas uniformemente y substancialmente toda la misma forma geométrica en el plano intermedio entre las dos superficies de los materiales hidrofóbicos, detalles relativos a las perforaciones en el material hidrófobo se proporcionan a continuación.

El "plano intermedio" se define como el plano que consiste en puntos a partir de los cuales la distancia perpendicular a cualquiera de las dos superficies del material hidrofóbico plano es el mismo.

10 El tamaño de las perforaciones en el material hidrofóbico simplemente debe asegurarse de que bicapas estables de lípidos anfífilicos se pueden formar en las perforaciones, de manera que puedan tener un tamaño en el rango de nm, micras o mm.

15 El material hidrofóbico es preferiblemente perforado de tal manera que la relación entre el área de perforación y el área sin perforar del material es máxima, ya que proporciona un área máxima de la bicapa lipídica con acuaporinas para realizar el transporte de agua. El patrón constituido por las perforaciones es así de importancia como es la distancia entre cada perforación. Un patrón óptimo es una disposición hexagonal de las perforaciones con un mínimo "espesor de pared" entre cada perforación en el patrón. Sin embargo, en el patrón cuadrático también puede ser suficiente.

20 La membrana de agua utilizada en esta realización de la invención, por lo tanto, también comprende una membrana lipídica anfífilica, tal como una membrana que comprende los lípidos descritos en la tabla 1. Así, la(s) bicapa(s) lipídica(s) consiste(n) esencialmente en lípidos anfífilicos seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y cardiolipina, así como sus mezclas, por ejemplo, fosfolípidos tal como 1,2-dipalmitoil-sn-fosfatidilcolina (DPPC), o mezclas de fosfolípidos. La diferencia con el primer aspecto es sobre todo que la membrana sólo constituye una bicapa en las zonas donde el soporte hidrofóbico está perforado, mientras que los lípidos se organizan con sus extremos hidrofóbicos hacia el soporte hidrofóbico y los extremos hidrófilos hacia el medio acuoso.

25 Las acuaporinas útiles para la preparación de membranas de agua según la invención son: AQP1, TTP, PIP, NIP, ver la figura 4, y sus mezclas e híbridos. Las acuaporinas de origen vegetal son especialmente deseables, ya que el riesgo de incluir contaminantes, como virus patógenos y priones, que son perjudiciales para los seres humanos, se reduce considerablemente. Además, las acuaporinas vegetales son productos naturales de genes de plantas y pueden ser sobreexpresados y se producen en las plantas.

El canal de agua de acuaporina es así preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en acuagliceroporinas (GLpF), tal como un canal GLPA, un canal GLPB1, un canal GLPB2, un canal GLPB3, y un canal GLPY2, y sus mezclas e híbridos.

35 Las membranas de agua utilizadas en la invención están preferiblemente encerradas en una membrana permeable o porosa de estabilización que puede ser rígida o flexible, y que puede servir como protección de la membrana de agua, así como un prefiltro para excluir las partículas gruesas del líquido acuoso a purificar. Alternativa o adicionalmente, la membrana de agua de la invención puede ser depositada en un disco de filtro para crear un filtro de agua.

40 Los materiales útiles para la estabilización de la membrana opcionalmente usados para envolver las membranas de agua de la invención son membranas de silicona microporosas que tienen un tamaño de poro relativamente pequeño y que se solidifican aproximadamente a temperatura ambiente o a una temperatura por debajo de 50°C.

45 Las membranas biocompatibles se pueden formar contra un material sólido, tal como mediante revestimiento sobre vidrio, carbono, que es la superficie modificada para aumentar la hidrofobia, o un polímero (tal como acetato de polivinilo, PDMS, Kapton®, un polímero perfluorado, Teflon, PVDF, PEEK, poliéster, o UHMWPE, polipropileno o polisulfona). Los polímeros tales como PDMS ofrecen un excelente soporte que se puede utilizar para establecer las aberturas en las que se pueden formar las membranas biocompatibles.

50 Los materiales útiles porosos para la preparación de membranas de agua según las membranas de bicapa lipídica rociadas de Mueller (Mueller et al., 1962) o las membranas basadas en decano de Montal (Montal et al., 1972) son películas de teflón y otros materiales de membrana porosa con propiedades de superficie hidrofóbica.

La invención también se refiere a la ampliación de estos tipos de membrana, donde múltiples orificios se forman en una película de partición de teflón u otro material con propiedades de superficie hidrofóbica, y una membrana bicapa lipídica o una membrana de copolímero en bloque que comprende las acuaporinas se forma alrededor del material según el diseño que se muestra en la figura 3.

55 Los materiales útiles para la estabilización de la membrana opcionalmente usados para envolver la membrana de

agua de la invención son membranas microporosas de silicona que tienen un tamaño de poro relativamente pequeño y que se solidifican a temperatura ambiente o a una temperatura por debajo de 50°C.

5 Las membranas de la invención sólo dejarán pasar agua, facilitando así la presión de ósmosis retardada. Las acuaporinas son conocidas por excluir el paso de todos los contaminantes, incluyendo bacterias, virus, minerales, proteínas, ADN, sales, detergentes, gases disueltos, e incluso los protones de una solución acuosa. La familia de las acuagliceroporinas relacionadas (GLpF) además son capaces de transportar glicerol. Se ha demostrado que el movimiento del agua es simétrico y puede proceder en cualquier dirección; este hecho es importante porque este proceso no consume energía. El agua se mueve a través de la membrana en una dirección particular provocada por la presión osmótica.

10 Las acuaporinas también son mutables. Como las proteínas pueden ser específicamente expresadas en bacterias huésped de acuerdo a una secuencia genética que influye en su forma final y su función, un técnico puede cambiar fácilmente su código genético para cambiar las características de la proteína. Por lo tanto, la proteína puede ser diseñada para cumplir con la aplicación que se desee, que puede ser diferente de la función original de la proteína. Por ejemplo, mediante un simple cambio de un determinado residuo de aminoácidos cerca del centro del canal de agua a la cisteína, la acuaporinas producidas se unirían a cualquiera libre de mercurio en la solución y dejarían de transportar agua debido a la obstrucción. Por lo tanto, estas proteínas mutantes utilizadas en un dispositivo de membrana podrían detectar la contaminación por mercurio en una muestra de agua con sólo dejar de fluir cuando la concentración de la sustancia tóxica se eleva demasiado.

20 Las membranas de acuaporina son más rápidas que los sistemas convencionales. Una unidad convencional de alta velocidad de ósmosis inversa puede hacer alrededor de 28,4 litros (7,5 galones) de agua limpia cada minuto. La investigación actual muestra el movimiento de las moléculas de agua a través de una membrana de lípidos saturados de acuaporina (0,0177 mm²), a razón de 54 µ.mol/seg. (Pohl, P., Saporov, S.M., Borgnia, M.J., y Agre, P., (2001), Actas de la Academia Nacional de Ciencias 98, p. 9.624-9629).

25 Finalmente, las nuevas membranas basadas en proteínas son baratas de producir. Las microvesículas de lípidos que comprenden fracciones de la membrana celular con AQP1 derivadas de glóbulos rojos bovinos son una fuente barata de acuaporinas.

Alternativamente, la acuaporina pueda ser recolectada en cantidades de miligramos a partir de una ingeniería de cepa de bacterias E. coli. Se estima que alrededor de 2,5 mg de proteína pura se pueden obtener de cada litro del cultivo que la produce, ver la solicitud de patente publicada US 2004/0049230.

30 Otros aspectos, características y realizaciones de la invención serán más evidentes a partir de la descripción posterior y de las reivindicaciones.

Se han descrito ejemplos de cómo las acuaporinas funcionales se pueden incorporar en una membrana de agua, sin embargo, la presente invención no está limitada por estos ejemplos. La presente invención se refiere a cualquier membrana de agua biomimética que comprende acuaporinas utilizadas en la producción de energía de salinidad.

35 Además, la presente invención se refiere a la implementación de dicha membrana en un sistema PRO. La figura 5 describe una planta PRO en la que agua dulce, así como el agua de mar, se suministra a filtros de agua separados, antes de que las corrientes pasen entre sí a cada lado de una membrana semipermeable, en este caso, las membranas de agua biomiméticas que comprenden canales funcionales de acuaporina. Una porción de la mezcla de permeado y agua salada con presión elevada se pasa a una turbina para la producción de energía eléctrica. El balance de la corriente de permeado se pasa a un intercambiador de presión en el que el agua de mar de entrada se presuriza y se introduce en el módulo de la membrana.

40 En la presente planta PRO, la energía de la presión en el agua salobre es recuperada de manera directamente hidráulica para la presurización de agua de mar entrante. Por lo tanto, se evita una parte de la pérdida que normalmente se produce en una bomba de agua corriente para este propósito. Al evitar esta pérdida, la planta PRO se puede construir sobre el nivel del suelo en lugar de por debajo del nivel del suelo y, sin embargo, lograr una eficiencia aceptable.

45 La recuperación de la energía de la presión por presurización hidráulica directa del agua de mar de entrada se lleva a cabo en un dispositivo en el que la presión de la turbina en la mitad del dispositivo empuja el agua de mar directamente en el módulo de la membrana. En la otra mitad, el agua salobre es empujada hacia atrás y hacia fuera de la planta PRO cuando el agua de mar es bombeada. Los procesos mencionados que tienen lugar en las mitades respectivas del dispositivo hidráulico de presurización de agua de mar alterno por la rotación del agua que contiene parte o por un sistema de válvula controlada en el dispositivo mencionado.

Más información sobre los sistemas PRO se puede encontrar en la solicitud de patente internacional publicada nº WO 02/13955.

55 La presente invención no está limitada por este ejemplo de un sistema PRO, sino que se refiere a cualquier membrana de agua biomimética que comprende acuaporinas implementada en un sistema PRO y que se utiliza en

la producción de energía de salinidad.

Por lo tanto, la invención se refiere en un aspecto general a una planta de energía que utiliza energía de salinidad, comprendiendo dicha planta:

5 - por lo menos un primer y por lo menos un segundo depósito de agua, que están separados por una membrana de agua que comprende canales de acuaporina funcionales (por ejemplo, una membrana de agua tal como se describe aquí), y

10 - por lo menos unos medios para la extracción de energía a partir de una diferencia de presión hidrostática entre los al menos dos depósitos. Estos medios para la extracción de energía son típicamente una turbina, un propulsor, o cualquier otro dispositivo capaz de convertir energía hidrostática/hidrodinámica en una forma conveniente de energía (electricidad, calor, etc.).

15 Tal como se mencionó anteriormente, la planta de energía de la invención utilizará las entradas de agua separadas al por lo menos primer y segundo depósitos de agua, y en la que la entrada al por lo menos un primer depósito proporciona agua con una mayor concentración de cloruro de sodio que la entrada al por lo menos un segundo depósito de agua. Es conveniente que el depósito que contiene el agua con alta concentración de sal (tal como agua del mar) sea capaz de albergar una importante cantidad de agua respecto al depósito de baja agua salada, para establecer una presión hidrostática importante entre los dos depósitos.

Referencias:

Agre, P., M. Bonhivers, y M. J. Borgnia. (1998). "The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems". *Journal of Biological Chemistry*, 273, 14659-14662.

20 Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel, y P. Agre. (1999). "Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels". *Annual Review of Biochemistry*, 68, 425-458.

A. A. Brian y H. M. McConnell. "Allogenic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6159-6163, 1984.

25 Burykin y A. Warshel (2003). "What really prevents proton transport through aquaporin? Charge self-energy vs. proton wire proposals", *Biophysical Journal* 85, 3696-3706.

Chakrabarti, N., Tajkhorshid, E., Roux, B. y Pomes, R. (2004). "Molecular basis of proton blockage in aquaporins, *Structure*" 12, 65-74.

de Groot, B. L., y Grubmuller, H. (2001). "Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF", *Science* 294, 2353-2357.

30 de Groot, B. L., Frigato, T., Helms, V. y Grubmuller, H. (2003). "The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 channel", *Journal of Molecular Biology* 333, 279-293.

Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., y Stroud, R. M. (2000). "Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity", *Science* 290, 481-6.

35 Heymann, J. B. y Engel, A. (1999). "Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels". *News Physiol. Sci.* (14) p. 188.

Ilan, B., Tajkhorshid, E., Schulten, K. y Voth, G. (2004). "The mechanism of proton exclusion in aquaporin water channels". *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55, 223-228.

Jensen, M. O., Tajkhorshid, E., y Schulten, K. (2003). "Electrostatic tuning of permeation and selectivity in aquaporin water channels", *Biophysical Journal* 85, 2884-2899.

40 Z. V. Leonenko, A. Carnini, y D. T. Cramb. "Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the Interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy". *Biochim. Biophys. Acta*, 1509:131-147, 2000.

H. Lin, R. Bhatia, y R. Lai. "Amyloid b protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology". *FASEB J.*, 15:2433-2444, 2001.

45 Montal, M., y P. Mueller. "Formation of bimolecular membranes from monolayers and study of their properties". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 69: 3561-3566, 1972.

J. Mou, D. M. Czajkowsky, y Z. Shao. "Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers". *Biochemistry*, 35:3222-3226, 1996.

Mueller, D., Rudin, O., Tien, H. T. y W. C. Wescott. "Reconstruction of cell membrane structure In vitro and its

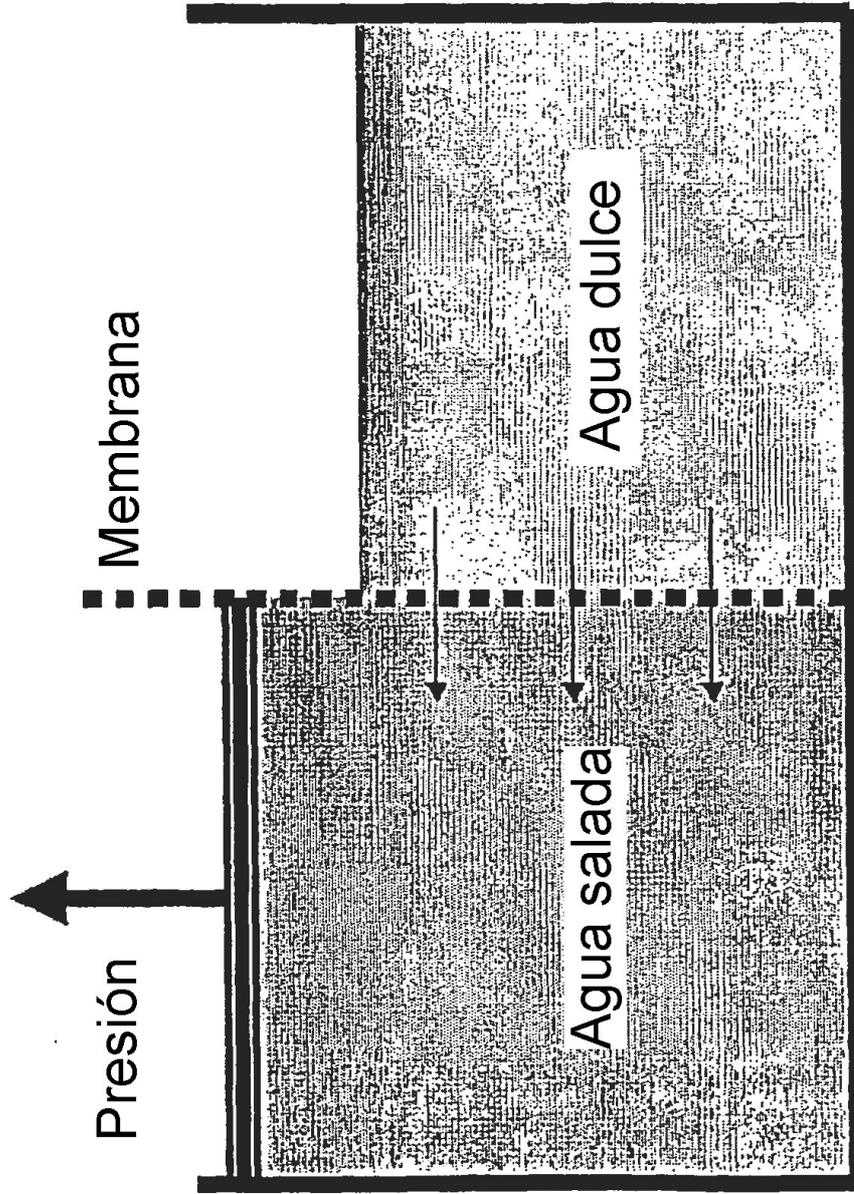
- transformation into an excitable system". *Nature (Lond.)* 194: 979-980, 1962.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., y Fujiyoshi, Y. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1", *Nature* 407, 599-605.
- 5 Preston, G. M., P. Piazza-Carroll, W. B. Guggino, y P. Agre. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 water channel". *Science*, 256, 385-387.
- E. Reimhult, F. Hook, y B. Kasemo. "Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure". *Langmuir*, 19:1681-1691, 2003.
- 10 Ren, G., Reddy, V. S., Cheng, A., Melnyk, P., y Mitra, A. K. (2001). "Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice", *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1398-1403.
- I. Reviakine y A. Brisson. "Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy". *Langmuir*, 16:1806-1815, 2000.
- H. A. Rinia, R. A. Kik, R. A. Demel, M. M. E. Snel, J. A. Killian, J. P. J. M. van der Eerden, y B. de Kruijff. "Visualization of highly ordered striated domains induced by transmembrane peptides in supported phosphatidylcholine bilayers". *Biochemistry*, 39: 5852-5858, 2000.
- 15 A. C. Simonsen y L. A. Bagatolli. "Structure of spincoated lipid films and domain formation in supported membranes formed by hydration". *Langmuir*, 20: 9720-9728, 2004.
- Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., y Jap, B. K. (2001). "Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel", *Nature* 414, 872-8.
- 20 Tajkhorshid, E., Nollert, P., Jensen, M. O., Miercke, L. J., O'Connell, J., Stroud, R. M., y Schulten, K. (2002). "Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning", *Science* 296, 525-530.
- E. J. M. van Kan, D. N. Ganchev, M. M. E. Snel, V. Chupin, A. van der Bent, y B. de Kruijff. "The peptide antibiotic clavamin A interacts strongly and specifically with lipid bilayers". *Biochemistry*, 42: 11366-11372, 2003.
- 25 Zhu, F., Tajkhorshid, E. y Schulten, K. (2003). "Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1". *Biophysical Journal*, 86, 50-57.
- Zeidel, Mark L., Suresh V. Ambudkar, Barbara L. Smith, y Peter Agre, *Biochemistry* 1992, 31, 7436-7440.

REIVINDICACIONES

1. Planta de energía que utiliza energía de salinidad, comprendiendo dicha planta:
 - por lo menos un primer y por lo menos un segundo depósito de agua, que están separados por una membrana biomimética que comprende canales de acuaporina funcionales; y
- 5 - por lo menos unos medios para la extracción de energía a partir de una diferencia de presión hidrostática entre los por lo menos dos depósitos.
2. Planta de energía según la reivindicación 1, en la que los medios para extraer energía son una turbina.
3. Planta de energía según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que incluye entradas separadas de agua al por lo menos un primer y al menos un segundo depósito de agua, y la que la entrada al por lo menos un primer depósito proporciona agua con una mayor concentración de cloruro de sodio que la entrada al por lo menos un segundo depósito de agua.
- 10 4. Planta de energía según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las acuaporinas están incorporadas en una membrana bicapa lipídica, o en una membrana de copolímero en bloque, o en una membrana lipídica que consiste en múltiples bicapas de vesículas de lípidos depositados fundidos.
- 15 5. Planta de energía según la reivindicación 4, en la que la membrana bicapa lipídica o la membrana de copolímero en bloque está intercalada alrededor de una película de membrana con propiedades de superficie hidrofóbica que comprende múltiples orificios en el rango de nm, μm o mm.
6. Planta de energía según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que el copolímero en bloque es una mezcla de dos o más copolímeros en bloque.
- 20 7. Planta de energía según la reivindicación 6, en la que el copolímero en bloque es un copolímero de tres bloques.
8. Planta de energía según la reivindicación 7, en la que el copolímero de tres bloques es un copolímero de tres bloques anfífilos con grupos terminales polimerizables.
9. Planta de energía según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que las acuaporinas son de origen vegetal, tales como una acuaporina TIP, PIP, o NIP y sus mezclas e híbridos.
- 25 10. Planta de energía según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en la que la al menos una bicapa lipídica consiste esencialmente en lípidos anfífilos seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos o fosfoglicéridos, esfingolípidos, cardiolipina, y sus mezclas.
11. Procedimiento para la producción de energía/potencia de salinidad, que comprende
 - 1) llevar una primera solución acuosa en al menos un primer recipiente y
 - 30 2) llevar una segunda solución acuosa en al menos un segundo recipiente, teniendo dicha primera solución acuosa una mayor concentración de cloruro de sodio que dicha segunda solución acuosa, y en el que dicho al menos primer y dicho al menos segundo recipientes están separados entre sí por una pared permeable al agua que comprende una membrana biomimética que comprende canales de acuaporina de agua, mediante la cual el agua se mueve desde dicho al menos un segundo recipiente a dicho al menos primer recipiente para crear una presión hidrostática positiva en el al menos un primer recipiente respecto a dicho al menos segundo recipiente, y
 - 35 3) utilizar dicha presión hidrostática como fuente de energía.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la utilización en la etapa 3 se lleva a cabo llevando agua desde el al menos un primer recipiente a través de una turbina o un dispositivo equivalente.
13. Uso de una membrana biomimética que comprende canales de acuaporina de agua en ósmosis de presión retardada para la producción de energía de salinidad.
- 40 14. Uso según la reivindicación 13, en el que las acuaporinas están incorporadas en una membrana bicapa lipídica, o en una membrana de copolímero en bloque, o en una membrana lipídica que consiste en múltiples bicapas de vesículas de lípidos depositados fundidos.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que la membrana bicapa lipídica o la membrana de copolímero en bloque comprende una película de membrana con propiedades de superficie hidrofóbica que comprende múltiples orificios en el rango de nm, μm o mm.
- 45 16. Uso según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que el copolímero en bloque es una mezcla de dos o más copolímeros en bloque.

17. Uso según la reivindicación 16, en el que el copolímero en bloque es un copolímero de tres bloques.
18. Uso según la reivindicación 17, en el que el copolímero de tres bloques es un copolímero de tres bloques anfifílico con grupos de extremo polimerizables.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que la acuaporina es de origen vegetal, tal como una acuaporina TIP, PIP, o NIP y sus mezclas e híbridos.
- 5
20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que la al menos una bicapa lipídica consiste esencialmente en lípidos anfifílicos seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos o fosfoglicéridos, esfingolípidos, cardiolipina, y sus mezclas.

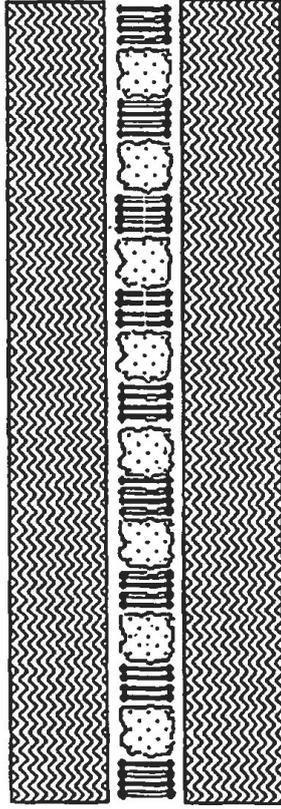
Fig. 1



Ósmosis de presión retardada (PRO)

Fig. 2

Matriz de membrana soportada con moléculas de acuaporina incorporadas



Soporte poroso de membrana bicapa lipídica/copolímero en bloque, como mica, cinta de mica, polisulfona, AlO₂, celulosa u otro soporte con superficie hidrofílica.



Membrana bicapa lipídica/copolímero en bloque plana con acuaporinas incorporadas.



Molécula de acuaporina.



Molécula de fosfolípidos, copolímero en bloque u otra moléculas anfifílica.

Fig. 3

Matriz de membrana formada alrededor de la película hidrofóbica con moléculas de acuaporina

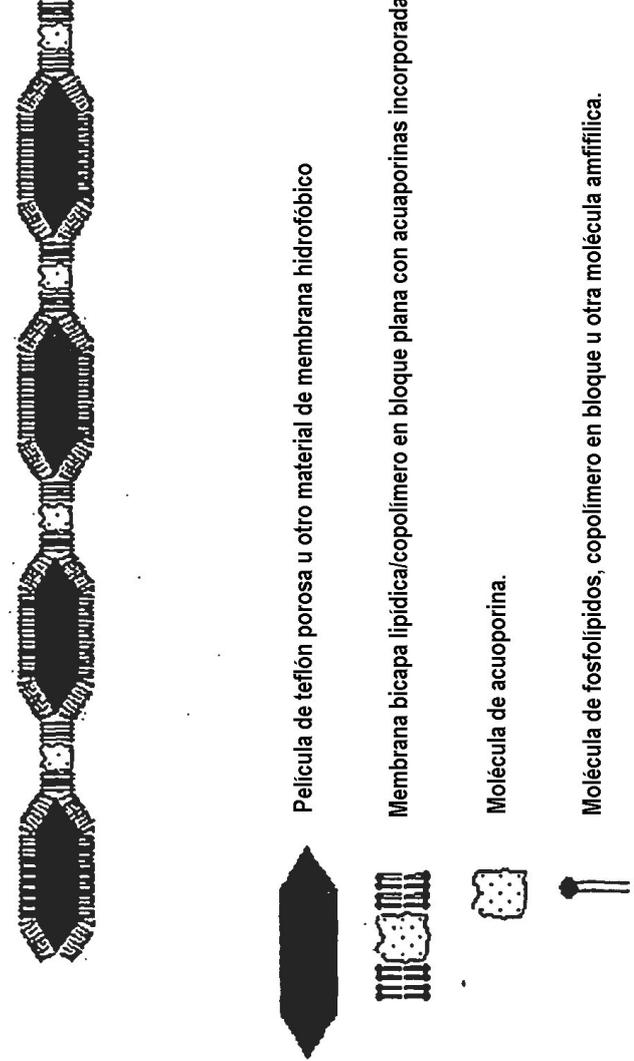
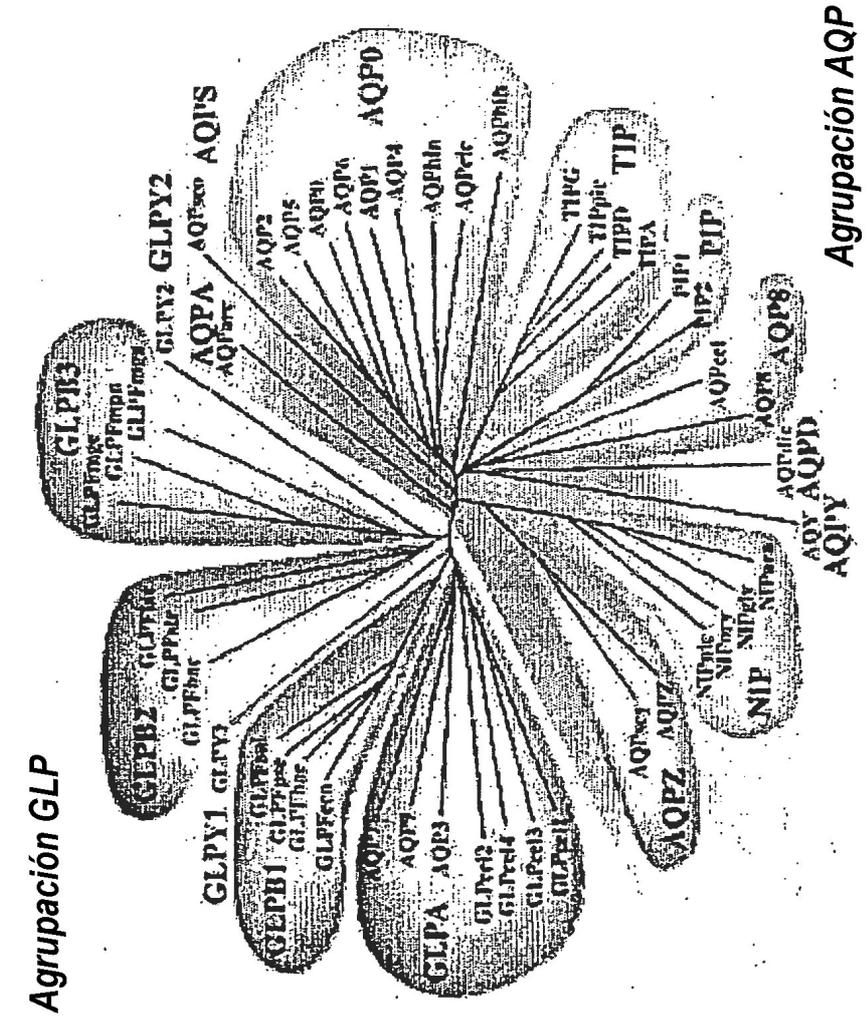


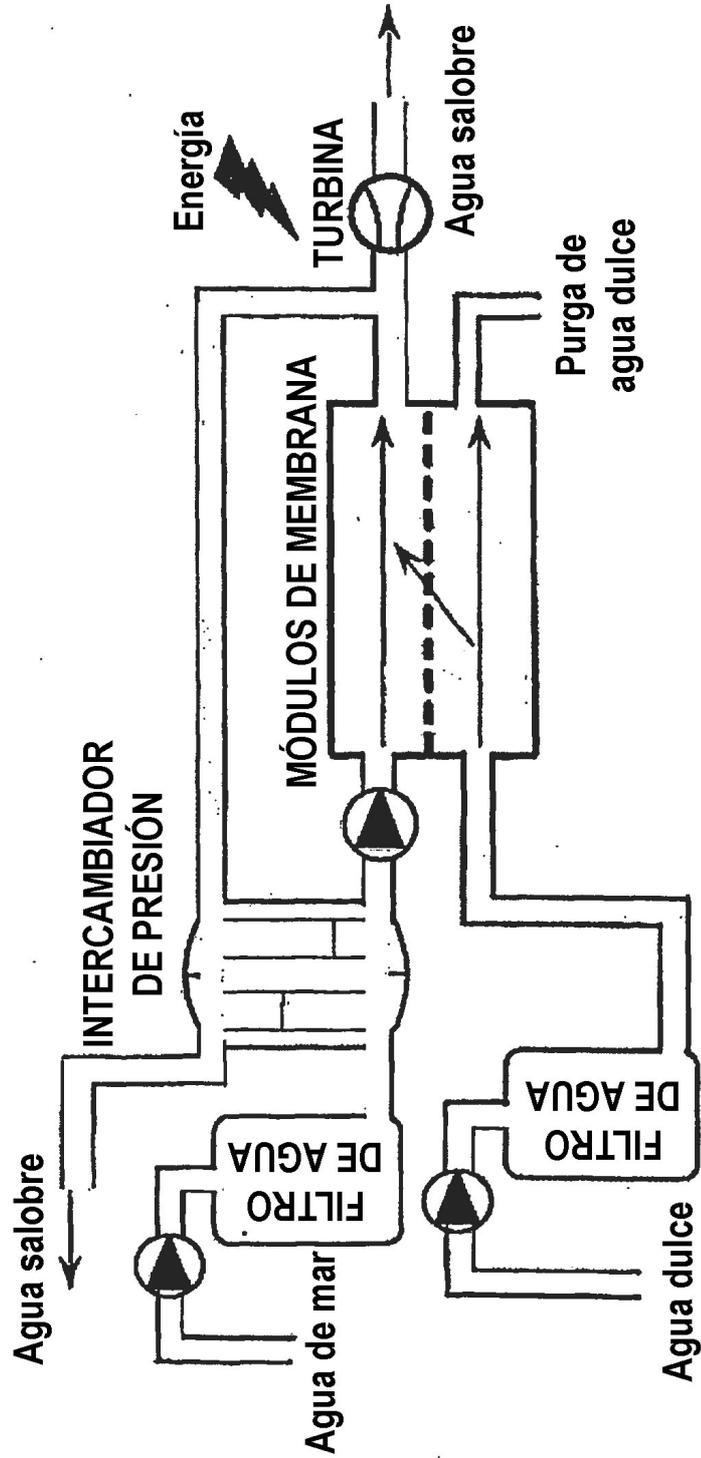
Fig. 4



{
 Acuagliceroprina GlpF
 a partir de E. coli

Heymann y Engel,
News Physiol. Sci. (1999)

Fig. 5



----- Membrana biomimética que comprende acuaporinas