

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 467**

51 Int. Cl.:

B01D 69/14 (2006.01)

C02F 1/44 (2006.01)

B01D 69/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2006 E 10001511 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **28.04.2010 EP 2179780**

54 Título: **Membrana para la filtración de agua**

30 Prioridad:

20.05.2005 DK 200500740

20.05.2005 US 683466 P

20.09.2005 DK 200501309

20.09.2005 US 718890 P

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

01.02.2013

73 Titular/es:

AQUAPORIN A/S (100.0%)

Ole Maaloes Vej 3

2200 Copenhagen N, DK

72 Inventor/es:

JENSEN, PETER, HOLME;

KELLER, DANIELLE y

NIELSEN, CLAUS HÉLIX

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 394 467 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 para la filtración de agua

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a membranas de agua que comprenden canales de acuaporina funcionales o tetrámeros adecuados para la filtración de agua pura y/o glicerol, un dispositivo de filtración/sistema de purificación que comprende esta membrana, y procedimientos de utilización de la misma para la producción de agua
10 ultra pura y para extraer el exceso de agua de una composición acuosa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Varios sistemas y procedimientos de tratamiento de agua tradicionalmente han sido desarrollados
15 para purificar las fuentes de agua natural y contaminada para obtener agua purificada, que es adecuado para el consumo humano y/o animal. Además, el agua ultra pura tiene una gran demanda en la industria de los semiconductores y farmacéutica. La producción de agua ultra pura demanda filtros más especializados y el tratamiento químico de la fuente de agua. Una pluralidad de técnicas se utilizan, tal como la filtración de membrana, intercambiadores de iones, filtros de partículas de submicrones o nano-filtros, tratamiento con luz ultravioleta y
20 ozono. El agua producida es extremadamente pura y contiene muy bajas concentraciones de sales, compuestos orgánicos, gases disueltos como oxígeno, sólidos en suspensión, y microorganismos como virus y bacterias. Sin embargo, debido a factores tales como la continua miniaturización en la industria de los semiconductores, las especificaciones del agua ultra pura cada vez son más estrictas.

[0003] Tradicionalmente, el agua se purifica o trata a través de una variedad de dispositivos disponibles de tratamiento de agua diseñados para comunidades y para aplicaciones de punto de uso, por ejemplo sobre la base de las siguientes tecnologías: carbón activado para la retirada de componentes orgánicos; desinfección con luz ultravioleta; intercambio de iones para la eliminación de la dureza (ablandar el agua), y la desalinización de membrana, tal como ósmosis inversa (OI) o nanofiltración (NF). Sin embargo, la nanofiltración es relativamente
25 nueva en el campo de la tecnología de tratamiento de agua. Una membrana de NF produce agua dulce mediante la retención de la dureza, creando iones divalentes presentes en el agua. Una membrana de NF permite que un alto porcentaje de iones monovalentes, tales como sodio y cloruro, pasen mientras se mantiene un alto porcentaje de iones divalentes. Son los iones monovalentes los que crean la presión osmótica que requiere la moderada a alta presión necesaria para bombear agua a través de una membrana de OI. Por lo tanto, las membranas de nanofiltración requieren mucha menos presión para bombear agua a través de la membrana debido a que la fuerza de conducción hidráulica no tiene que superar el efecto de la presión osmótica derivada de los iones monovalentes. En términos generales, las membranas de OI utilizadas para aplicaciones de tratamiento de agua residencial y comercial eliminan todos los sólidos disueltos en aproximadamente un 98%, mientras que las membranas de nanofiltración eliminan iones divalentes (componentes de la dureza: calcio y magnesio) en aproximadamente un
35 90% e iones monovalentes (cloruro de sodio) en aproximadamente un 50%.

[0004] Los dispositivos de desalinización que utilizan elementos de membrana (por ejemplo: OI o NF) siempre crean dos corrientes de agua al salir el agua del elemento, agua de producto desalinizado (que ha pasado a través de la membrana), y una salmuera de residuos (que ha fluido a través de la membrana de superficie). Esta corriente de salmuera de residuos es necesaria para eliminar las sales y los minerales fuera de la membrana para evitar la acumulación de suciedad en la superficie de la membrana. Si la acumulación de sales y minerales en el agua alimentada a una membrana se produce de forma continua, las sustancias disueltas pueden precipitar y formar una película sólida, ensuciando de la superficie de la membrana. Además, contaminantes y partículas coloidales también pueden adherirse a la superficie de la membrana y causar la contaminación. Con muchos contaminantes transmitidos por el agua, si una membrana se vuelve irreversiblemente escalada, o sucia, no puede limpiarse y debe ser reemplazada. Esta característica de los procesos de membranas plantea un problema importante en la reducción de los residuos de efluentes, especialmente en sistemas de tratamiento de agua de punto de uso (POU), que son típicamente compactos y son de la forma más económica posible.

[0005] Los dispositivos de intercambio iónico se utilizan también para suavizar las llamadas "aguas duras". El problema con los sistemas de ablandamiento de agua por intercambio iónico es quitar los componentes de la dureza del agua (iones de calcio y magnesio) intercambiándolos por iones de sodio para crear lo que se llama "agua dulce". Cuando se realiza la regeneración del medio de intercambio iónico, una corriente de agua concentrada de sodio, cloruro, calcio y magnesio va a través del sistema de desagüe, creando un problema de eliminación de residuos ambiental. Un ejemplo de un sistema de purificación de agua de este tipo se describe en la patente US 5.741.416 para un "sistema de depuración de agua que tiene pares plurales de filtros y una cámara de contacto de ozono"; describiendo un sistema de purificación de agua que es efectivo para oxidar contaminantes orgánicos y destruir la mayor parte de las bacterias, virus y otros microbios en estas corrientes de agua. Sistemas que implican membranas de diálisis que son selectivas para cationes monovalentes también se han descrito en WO 2004/099088.

[0006] Por consiguiente, existe una continua necesidad de sistemas de purificación de agua para el

tratamiento de agua que está o puede estar contaminada con componentes químicos, biológicos y/o contaminantes radiológicos, tanto para uso doméstico normal, como para la investigación avanzada, uso industrial y farmacéutico.

[0007] Dado que la contaminación o las amenazas de contaminación del agua son a menudo de un carácter muy local, por ejemplo, en un barco o un pueblo alejado o en un campamento, hay una necesidad de un sistema de purificación de agua fijo o móvil que pueda instalarse rápida y fácilmente en un lugar de contaminación real o potencial. De especial importancia es un sistema que sea efectivo para eliminar los contaminantes de un suministro de agua real o potencialmente contaminado, tal como agua del mar, para producir agua tratada que sea apta para el consumo humano.

[0008] Desde el descubrimiento de las proteínas de transporte de agua de acuaporina, que se distinguen por su capacidad de transportar selectivamente moléculas de H₂O a través de 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 US 20040049230 "Membranas biomiméticas", cuyo objetivo es describir cómo las proteínas de transporte de agua están incrustadas en una membrana para permitir la purificación del agua. La forma preferida descrita tiene la forma de un disco de filtro convencional. Para fabricar un disco, una monocapa de 5 nm de espesor, de copolímero de tribloque sintético y proteína se deposita en la superficie de un disco de 25 mm de ultrafiltración comercial utilizando una artesa de Langmuir-Blodgett. La monocapa en el disco se reticula a continuación, utilizando luz UV para el polímero para aumentar su durabilidad. El dispositivo puede ser analizado mediante la instalación en una cámara que fuerza agua de la fuente a presión a través de la membrana. Sin embargo, no existe una orientación de cómo se debe seleccionar un copolímero tribloque sintético ni existe ningún dato en soporte de la propia función de la acuaporina incrustada.

[0009] Se ha sugerido que una tecnología de purificación de agua podría crearse mediante la expresión de la proteína acuaporina en vesículas bicapa lipídica y fundir estas membranas sobre soportes porosos, ver James R. Swartz, página de inicio:

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

[0010] La invención tiene como principal finalidad el desarrollo de una membrana de filtración de agua industrial y el dispositivo que comprende acuaporinas incorporadas en una membrana capaz de purificar el agua con la más alta pureza, por ejemplo, 100%. Ninguna técnica o filtros conocidos hoy en día se pueden realizar esta tarea.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0011] La presente invención se refiere en un aspecto a una membrana para el filtrado de agua, que comprende proteínas de transporte de agua de acuaporina que se han reconstituido en vesículas de lípidos, y se han transformado en una capa soportada para formar una membrana de filtración de agua según la reivindicación 1.

[0012] Las ventajas de las membranas de agua de la invención incluyen la desalinización eficiente de agua de mar (97-98% del agua de la tierra es agua de mar), sin la necesidad de productos químicos de desalinización y el suministro de filtros de desalinización transportables (un dispositivo a modo de "filtro de café" capaz de separar agua y sal), purificación eficiente del agua para la industria de semiconductores, purificación del agua potable/agua doméstica robusta y purificación de agua sin uso de electricidad, por ejemplo, en países del tercer mundo.

[0013] De este modo, la invención se refiere, en un aspecto, a una membrana de agua que comprende una construcción de sándwich que tiene al menos dos capas de soporte permeables separadas por al menos una bicapa lipídica que comprende canales de agua de acuaporina funcionales. De esta manera, el soporte permeable o poroso permitirá a las moléculas de agua penetrar a través del soporte para llegar dicha por lo menos una bicapa lipídica depositada entre las capas de soporte. La(s) bicapa(s) lipídica(s) que comprende(n) canales funcionales de acuaporina dispersados filtrarán entonces agua solamente, o, en caso de que la acuaporina sea un canal GLpF, también glicerol, en la capa de soporte porosa opuesta, resultando en un filtrado que consiste en agua pura. Preferiblemente, esta agua filtrada es agua ultra pura (UPW), que es agua muy purificada, baja en iones, partículas, material orgánico y coloides. La membrana de agua de la invención representa una nueva generación de membranas de ósmosis inversa que utilizan los canales de transporte de agua conocidos más selectivos.

[0014] En el presente contexto, una "membrana de agua, indica una estructura que permite el paso de agua, mientras que no se permite a la vez el paso de la mayoría de otros materiales o sustancias. Las membranas de agua preferidas de la presente invención son esencialmente solamente permeables para el agua (y en algunos casos, glicerol), mientras que no se permite el paso de solutos y otros disolventes.

[0015] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una membrana de agua que comprende una construcción de sándwich que tiene al menos dos monocapas de lípidos, que cuando se montan en una bicapa, comprende canales de agua de acuaporina funcionales, separándose dichas al menos dos monocapas de lípidos por al menos una capa de soporte permeable. En esta realización, la capa de soporte permeable separa así dos

monocapas de lípidos que son capaces de formar bicapas lipídicas cuando la capa de soporte incluye perforaciones/pinchazos.

5 [0016] Otro aspecto de la invención se refiere a un dispositivo de filtración de agua que comprende la membrana de agua de la invención, opcionalmente encerrada en la membrana de la estabilización, que se ha montado en un alojamiento que tiene una entrada para líquidos acuosos para la purificación y la salida de agua purificada.

10 [0017] La presente invención también se refiere a un dispositivo de filtración de agua para extraer y recuperar agua de fluidos corporales, tales como orina, leche y sudor/perspiración, que comprende una membrana de agua que comprende canales funcionales de agua de acuaporina, tal como se indica en las reivindicaciones.

15 [0018] Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de agua pura resultante de la filtración de una fuente natural de agua contaminada o de agua a través de la membrana de la invención. Dicha agua pura se caracteriza por la ausencia de contaminantes, tales como sustancias disueltas o partículas. La invención se refiere además a un procedimiento para obtener agua purificada mediante el filtrado una fuente de agua utilizando una membrana de osmosis inversa que comprende canales de acuaporina funcionales.

20 [0019] Además, un aspecto diferente de la presente invención se refiere a una película de polímero hidrofóbico que se describe en detalle a continuación.

25 [0020] Finalmente, el diseño general de las membranas de agua también se cree que es aplicable a membranas para otros fines, donde otras proteínas transmembrana que las acuaporinas se han incorporado en membranas diseñadas diferentes a las membranas de agua de la presente invención. Estas membranas son en todos los aspectos, excepto en la opción de proteínas transmembrana, idénticas a las membranas aquí descritas, y todas las descripciones sobre estas membranas se aplican mutatis mutandis a las membranas que contienen otras proteínas transmembrana de acuaporinas.

30 [0021] Las proteínas transmembrana diferentes de las acuaporinas adecuadas para su inclusión en las membranas se seleccionan, por ejemplo, pero no limitado a, cualquier proteína transmembrana encontrada en la Base de datos de Clasificación de Transportadores (TCDB). La TCDB puede consultarse en <http://www.tcdb.org>.

Ejemplos de proteínas transmembrana incluidos en la presente invención de TCDB son:

35 [0022]

Toxina de formación de canal de aerolisina

Canal de aniones de membrana de célula huésped diana agrobacteriana

Toxina de formación de canal de α -hemolisina

Canal de alameticina

Porina de exportación de alginato

Amoebaporo

Mastoparan péptido anfipático

Péptido de proteína B amiloide

Canal K⁺ de rectificador interior animal

Anexina

Regulador de apoptosis

Holina ArpQ

AS-48

Canal de cationes activado por ATP

Autotransportador

Bacillus subtilis J29 Holina

Poros celulares diana tipo III bacteriano

Proteína de aumento de la permeabilidad bactericida

Polipéptido cíclico de bacteriocina AS-48

Bacteriorodopsina

Canal de beticolina
Holina BlyA
Toxina botulínica y del tétanos
Porina Brucella-Rhizobium
Porina de membrana externa principal de Campylobacter jejuni
Catilicidina
Canal de cationes
Proteína de choque térmico 70 que forma canales de cationes
Cecropina

Antígeno de protección de ántrax Bacillus que forma canales

Ceramida que forma canales
Colicina que forma canales
Colicina V que forma canales
Proteína cristalina insecticida de d-endotoxina que forma canales
E-toxina que forma canales
Citotoxina de leucocidina que forma canales
Porina clamidial
Canal de cloruro
Formador de canales de aniones de membrana de cloroplasto
Canal de soluto de membrana externa de cloroplasto
Citolisina activada con tiol que se une al colesterol
Citotoxina clostridial
Proteína de complemento C9
Canal de complejo polihidroxitirato-Ca²⁺
Porina corinobacteriana
Holina Cph1
Péptido natriurético tipo C
Porina cianobacteriana
Porina de ciclodextrina
Citohemolisina
Amilina citotóxica
Defensina
Dermaseptina
Toxina de la difteria
Divergicina A
Toxina de lisenina de lombriz de tierra
Canal E1 de virus de cubierta
Canal de cloruro epitelial
Canal de Na⁺ epitelial
Proteína de membrana externa FadL
Porina de membrana externa fusobacteriana
Conexina formadora de unión de hueco
Inexina formadora de unión de hueco
Porina bacteriana general
Porina OprB selectiva de glucosa

Canal de iones activados por glutamato de receptores de neurotransmisores

Canal H⁺ de cit b₅₅₈ asociado a NADPH oxidasa de fagocito gp91^{phox}

Canal de gramicidina A

Motor flagelar bacteriano de translocación de H⁺- o Na⁺-

Motor flagelar bacteriano de translocación H⁺- o Na⁺ MotAB/transporte de membrana externa ExbBD

Porina de membrana externa de helicobacter

Holina HP1

Canal de matriz-2 de virus de gripe

Defensina de insecto

Canal de cloruro intracelular
Holina j11
Holina jAdh
Holina jU53
Lactacina X
Lacticina 481
Lactocina S
Lactococina 972
Lactococcina A
Lactococcina G
Canal iónico mecanosensible de gran conductancia
Holina S
Canal iónico activados por ligando de receptores de neurotransmisores
Holina LrgA
Holina LydA
Magainina
Proteína intrínseca principal
Melitina
Transportador (canal) de iones metálicos
Microcina E492
Porina mitocondrial y de plastidio
Porina micobacteriana
Nisina
Canal-1 de cationes no selectivos
Canal-2 de cationes no selectivos
Porina de membrana externa formadora de canales específicos de nucleósidos
Porina OmpA-OmpF
Porina OmpG
Canal de cloruro organular
Secretina de membrana bacteriana externa
Proteínas auxiliar de membrana externa
Factor de membrana externa
Porina usher fimbrial de membrana externa

ES 2 394 467 T3

Porina de membrana externa
Receptor de membrana externa
Holina TM P2
Holina S P21
Pediocina
Fosfoleman
Pilosulina
Defensina de planta
Plasmodesmata de planta
Tionina de planta
Plantaricina EF
Plantaricina JK
Porina de cubierta externa de plastidio de 16 kDa
Porina de cubierta externa de plastidio de 21 kDa
Porina de cubierta externa de plastidio de 24 kDa
Canal catiónico de policistina
Canal iónico de poliglutamina
Equinatoxina formadora de poros
Hemolisina E formadora de poros
Toxina RTX formadora de poros
Holina M PRD1
Fragmento peptídico de priones
Membrana de célula huésped diana de <i>Pseudomonas syringae</i> HrpZ
Porina de pseudomonas OprP
Porina de rafinosa
Porina de <i>Rhodobacter Porca</i>
Canal de Ca ²⁺ del receptor de rianodina-inositol-1,4,5-trifosfato
Canal de saponina
Cadena B de toxina de Shiga
Porina de amida cadena corta y urea
Canal iónico mecanosensible de pequeña conductancia
Porina de azúcar
Canal de siringomicina
Canal de siringopeptina
Holina T4
Holina T4 inmunidad
Holina T7
Taquiplesina
Canal de tolaasina
TonB-ExbB-ExbD/ToIA-ToIQ-ToIR de energizantes para el receptor de membrana externa (OMR)-medi-
Canal de Ca ²⁺ de transitorio del receptor potencial

Hemolisina BL tripartita
Porina de secreción de dos socios
Canal NB de virus de gripe tipo B
Transportador de urea (canal)
Canal de urea/amida
Citotoxina vacuolizante
Quitoporina Vibrio/porina Neisseria
Superfamilia de canal de iones activados por voltaje
Porina de T. trichiura esticosoma
Toxina asesina de levadura K1
Canal de Ca ²⁺ selectiva de catión activada por tramo de levadura

[0023] Otros aspectos de la invención incluyen el uso de la membrana de agua para extraer el exceso de agua de soluciones o sustancias acuosas, por ejemplo, para obtener una mayor concentración de un soluto deseable.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024]

10 La figura 1 es un diagrama que muestra los diferentes componentes de una membrana de agua de acuerdo con una realización de la presente invención que tiene bicapas lipídicas soportadas con moléculas de acuaporina incorporadas en un ejemplo de estructura en sándwich de una membrana de agua de acuerdo con la invención.

15 La figura 2 es un diagrama que muestra los diferentes componentes de una membrana de agua de acuerdo con una realización de la presente invención que tiene bicapas lipídicas soportadas con moléculas de acuaporina incorporadas en un ejemplo de estructura en sándwich de una membrana de agua, en donde la bicapa lipídica que comprende los canales de acuaporina está dentro de los poros del material de soporte permeable o poroso.

20 La figura 3 es un dibujo que describe el diseño de una membrana biomimética que comprende acuaporinas. La figura muestra los diferentes componentes de la membrana de acuerdo con otra realización de la presente invención que tiene bicapas lipídicas soportadas con moléculas de acuaporina incorporadas insertadas alrededor de una película de teflón poroso.

25 La figura 4 es un dibujo que describe el diseño de una membrana biomimética que comprende acuaporinas. La figura muestra los diferentes componentes de la membrana de acuerdo con otra realización de la presente invención que tiene bicapas lipídicas soportadas con moléculas de acuaporina incorporadas insertadas alrededor de una película de teflón poroso, y además encapsuladas en una construcción en sándwich.

30 La figura 5 es un diagrama que muestra los diferentes componentes de una membrana de agua que comprende una bicapa lipídica estructurada en sándwich encapsulada con moléculas de acuaporina incorporadas.

La figura 6 es una ilustración de la membrana de agua encapsulada de la invención cuando se monta en una carcasa del filtro que tiene una entrada y una salida de acuerdo con otra realización de la presente invención.

35 La figura 7 es un diagrama que muestra los diferentes componentes de un sistema de purificación de agua, de acuerdo con otra realización de la presente invención. El sistema comprende los componentes de una entrada de agua cruda, compartimiento dual de filtración de medios, compartimiento ablandador de agua, bisulfito opcional y adición cáustica, filtros de ósmosis inversa 1 y 2 (RO1, RO2) conectados a una bomba con un bucle para la purificación adicional a través de los filtros RO1 y RO2, salidas para el drenaje y tanque de almacenamiento con compartimiento de desinfección UV.

40

La figura 8 muestra los distintos miembros del grupo de proteínas de acuaporina y acuagliceroporina.

45 La figura 9 es una foto de microscopio de fuerza atómica de las membranas formadas en mica. Las membranas se han preparado de acuerdo con los protocolos descritos en el Ejemplo 1.

La figura 10 muestra un dispositivo de filtración que comprende membranas de agua enrolladas en espiral de la invención.

La figura 11 es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea II-II de la figura 10.

La figura 12 es un dibujo que ilustra la preparación de bicapas soportadas por deposición de Langmuir-Blodgett de lípidos de la interfaz aire-agua. La deposición de la primera monocapa se muestra a la izquierda y de la segunda capa a la derecha.

La figura 13 es un dibujo que ilustra el procedimiento de la fusión de vesículas. Las vesículas se adsorben en el sustrato y se rompen para hacer una bicapa soportada.

La figura. 14 es un dibujo que ilustra la preparación de la bicapa lipídica soportada mediante recubrimiento giratorio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0025] Las células vivas están encerradas por una membrana bicapa lipídica, que separa las células de otras células y su medio extracelular. Las membranas de lípidos bicapa son esencialmente impermeables a agua, iones y otras moléculas polares; sin embargo, en muchos casos, estas entidades han de transportarse rápida y selectivamente a través de una membrana, a menudo en respuesta a una señal extra o intracelular. La tarea de transporte del agua se realiza 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 plantas para el hombre. Las acuaporinas facilitan un transporte de agua rápido y altamente selectivo, lo que permite así a la célula regular su volumen y su presión interna osmótica según diferencias de presión hidrostática y/o osmótica a través de la membrana celular. La importancia fisiológica de la acuaporina en los seres humanos es quizás más evidente en el riñón, donde ~150-200 litros de agua necesitan ser reabsorbidos de la orina primaria cada día, es decir, la acuaporina que facilita el transporte de agua se invoca cuando el agua debe ser recuperada rápidamente de un fluido corporal. En los riñones, esto es posible principalmente por dos acuaporinas indicadas AQP1 y AQP2 (11 acuaporinas diferentes se conocen en los humanos). En las plantas, las acuaporinas son también críticas para la absorción de agua en la raíz y para mantener el equilibrio de agua en toda la planta (Agre et al., 1998, Borgnia et al., 1999). Los estudios de transporte de agua en diversos organismos y tejidos sugirió que las acuaporinas tienen un poro estrecho impidiendo que cualquier molécula grande, iones (sales) e incluso protones (H_3O^+) e iones hidroxilo (OH^-), fluyan mientras se mantiene un índice de permeabilidad extremadamente alto; $\sim 10^9$ moléculas de H_2O por canal por segundo (Agre et al., 1998, Borgnia et al., 1999). Hasta el año 2000 y 2001 donde se informó de la primera estructura en 3D de alta resolución de AQP1 y del GlpF de acuagliceroporina de proteína de canal bacteriano de conducción de glicerol (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 del agua.

[0026] Sin embargo, basándose en las estructuras experimentales, se propusieron modelos informáticos detallados no explicando solamente el índice de alta permeabilidad y la estricta selectividad del agua, sino también la capacidad de las acuaporinas para evitar fugas de protones (de Groot y Grubmüller, 2001; Tajkhorshid et al., 2002, Jensen et al., 2003, Zhu et al. 2003, de Groot et al., 2003, y Burykin Warshel 2003, Ilan et al., 2004, Chakrabarti et al., 2004). En esencia, la arquitectura del canal de acuaporina permite que las moléculas de agua pasen sólo en un único aspecto durante la afinación electrostática de los controles interiores de canales de selectividad de acuaporina contra cualquier especie cargada, es decir, el transporte de cualquier sal (ión), suprimándose así también los protones y los iones hidroxilo (de Groot y Grubmüller, 2001; Tajkhorshid et al., 2002, Jensen et al., 2003, Zhu et al. 2003, de Groot et al., 2003, y Burykin Warshel 2003, Ilan et al., 2004, Chakrabarti et al., 2004). En pocas palabras, esto implica que las moléculas de agua sólo atraviesan el poro de agua de acuaporina, nada más.

[0027] Cada unidad en un canal de acuaporina transporta $\sim 10^9$ moléculas de H_2O /seg, es decir, $\sim 4 \times 10^9$ moléculas/canal/seg. Por lo tanto, 1 g de acuaporina es capaz de transportar ~ 720 litros de agua por segundo a una presión muy alta. El agua resultante del filtrado a través de un canal de acuaporina funcional es agua $\sim 100\%$ purificada, ausente de iones, partículas, materia orgánica y coloides, por ejemplo, que consiste en $\sim 100\%$ H_2O .

[0028] La familia de acuaporinas de proteínas de membrana tal como se usa aquí incluye también proteínas GLpF, además de moléculas de agua también canaliza glicerol. Una acuaporina preferida es de origen vegetal, tal como una acuaporina TIP, una PIP, o una PIN, ver la figura. 8.

[0029] Las membranas de la invención descritas a continuación sólo dejarán pasar el agua, lo que facilita la purificación del agua, su desalinización, y la concentración molecular a través de ósmosis inversa. Las acuaporinas son conocidas para excluir el paso de todos los contaminantes, incluyendo bacterias, virus, minerales, proteínas, ADN, sales, detergentes, gases disueltos, protones e incluso de una solución acuosa, pero las moléculas de acuaporina son capaces de transportar el agua debido a su estructura. La familia de las acuagliceroporinas relacionadas (GLpF) son además capaces de transportar glicerol. Todos los dominios transmembrana de acuaporina comprenden alfa-helicoidales que anclan la proteína en una membrana y dos bucles muy conservados de NPA (Asn-Pro-Ala) que se unen vértice a vértice en el centro de la proteína para formar una especie de forma de reloj de arena. 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 debido a la presión hidráulica u osmótica.

5 [0030] En consecuencia, el agua purificada se puede obtener a partir de fuentes no potables o, si el agua de la fuente contiene sustancias químicas de interés, el agua puede ser eliminarse selectivamente, dejando una alta concentración de las sustancias químicas deseadas en la cámara de entrada. Es importante destacar, sin embargo, que las acuaporinas también son adecuadas para esta invención por razones distintas a su selectividad en exclusiva para el agua. Muchos miembros de esta familia de proteínas son capaces de soportar las duras condiciones de las fuentes de agua contaminada sin perder la función. Las acuaporinas resisten la desnaturalización o que se
10 deshagan en la exposición a ácidos, voltajes, detergentes, y el calor. Por lo tanto, la membrana de la invención puede utilizarse para purificar el agua mineral contaminada con materiales que podrían dañar o destruir otras membranas, y puede utilizarse en áreas que experimentan altas temperaturas de manera consistente.

15 [0031] Las acuaporinas también son mutables. Como las proteínas pueden expresarse específicamente en bacterias huésped de acuerdo con una secuencia genética que influye en su forma y función final, un técnico puede cambiar fácilmente su código genético con el fin de cambiar las características de la proteína. Por lo tanto, la proteína puede diseñarse para cumplir con una aplicación deseada que puede ser diferente de la función original de la proteína. Por ejemplo, cambiando simplemente un residuo de aminoácido particular, cerca del centro del canal de agua a cisteína, las acuaporinas producidas se unirían a cualquier mercurio libre en la solución y dejarían de
20 transportar agua debido a la obstrucción. Por lo tanto, estas proteínas mutantes utilizadas en un dispositivo de membrana podrían detectar contaminación por mercurio en una muestra de agua con sólo cesando el flujo cuando la concentración de la sustancia tóxica aumenta demasiado.

25 [0032] Por último, las nuevas membranas a base de proteínas son también muy baratas de producir. Las micro-vesículas de lípidos que comprenden fracciones de la membrana celular con AQP1 derivada de glóbulos rojos bovinos son una fuente barata de acuaporinas.

30 [0033] Por otra parte, la acuaporina se puede recoger en cantidades de miligramos de ingeniería de cepa bacteriana 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 US 20040049230.

35 [0034] Así, aquí se describen procedimientos y aparatos que utilizan componentes biológicos para lograr la producción altamente eficiente de agua completamente pura a partir de agua sucia, salada, o contaminada de otra manera. La invención demuestra la integración de las proteínas biológicas transportadoras de agua con un dispositivo externo, y señala el camino hacia una vía de fabricación capaz de producir dispositivos de depuración de agua a gran escala.

1^{er} aspecto de la invención

40 [0035] En el primer aspecto de la invención descrito anteriormente, la membrana de agua comprende una construcción en sándwich que tiene al menos dos capas permeables de soporte separadas por al menos una bicapa lipídica comprendiendo canales de agua de acuaporina funcionales.

45 [0036] La membrana de agua del primer aspecto de la invención consiste así en una membrana de lípidos anfífilicos, tal como una membrana compuesta de lípidos descritos en la Tabla 1. Por lo tanto, la(s) bicapa(s) de lípidos(s) consiste(n) esencialmente en lípidos anfífilicos seleccionados del grupo formado por fosfolípidos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y cardiolipina, así como sus mezclas, por ejemplo, fosfolípidos tales como 1,2-dipalmitoilo-sn-fosfatidilcolina (DPPC), o mezclas de fosfolípidos.

50 [0037] Alternativamente, las bicapas lipídicas pueden consistir esencialmente en, o contener, lípidos polimerizables, ver la Tabla 1.

55 [0038] La membrana de agua de la invención comprende así canales de agua de acuaporina reconstituida sobre un soporte poroso. Los materiales de soporte útiles con una superficie hidrofílica para la preparación de las membranas de agua de acuerdo con la invención se seleccionan preferentemente de mica, tal como muscovita, cinta de mica, polisulfona, AlO₂ y materiales poliméricos que tienen una superficie hidrofílica, por ejemplo, celulosa. Los materiales de soporte son esencialmente planos, lo que significa que el soporte es preferiblemente plano, pero la curvatura del soporte es admisible, tal como es necesario cuando se fabrican filtros enrollados en espiral. En este caso, el material de soporte es preferentemente flexible, tal como membranas de
60 celulosa.

65 [0039] El soporte poroso puede comprender preferentemente un material tal como mica que tiene una estructura esencialmente plana con una superficie hidrofílica y en la que se han formado micro o nano poros, por ejemplo, por grabado. Por lo tanto, en una realización del primer aspecto, la capa de soporte permeable comprende una capa hidrofílica esencialmente plana que comprende mica o cinta de mica con un espesor de capa en una escala de mm a micras, y en donde se han formado nanoporos que tienen un diámetro menor de aproximadamente

50 nm (normalmente en el rango de 10-40 nm) (por ejemplo, por grabado, tal como mediante una técnica de grabado de pista). La mica es preferentemente muscovita.

[0040] Las capas permeables de soporte pueden incluir también una superficie de la membrana hidrofílica, tal como una membrana seleccionada del grupo formado por membranas de silicona, polisulfona, AlO_2 y polímeros tales como celulosa con una superficie hidrofílica, en donde se han formado nanoporos que tienen un diámetro de menos de aproximadamente 50 nm (típicamente en el rango de 10-40 nm).

[0041] La membrana de lípidos que comprende canales de acuaporina puede ser una bicapa semejante a la constitución natural de las membranas celulares biológicas, o la membrana de lípidos puede consistir en varias bicapas de vesículas de lípidos depositadas fusionadas. Los lípidos son preferentemente de naturaleza anfílica, tales como fosfolípidos (o fosfoglicéridos), esfingolípidos y cardiolipina. Al depositar las capas de lípidos en el sustrato poroso, los canales de acuaporina preferentemente pueden ser depositados junto a los ya existentes o en los poros en el material de soporte.

[0042] El soporte permeable o poroso utilizado en realizaciones preferidas de la invención se prepara preferentemente de acuerdo con R.M. Webber, J.L. Anderson, M.S. John, *Macromolecules* 23 (1990), 1026-1034, en el cual se describe que:

"Las membranas estaban hechas de delgadas láminas de mica muscovita, de aproximadamente 7 nm de espesor, mediante una técnica de grabado de pista. Con membranas grabadas con pista, los poros se crean al grabar las pistas creadas por fragmentos de fisión colimada de una fuente de californio 252, con una solución de ácido fluorhídrico. El número de poros (n) se controla mediante el tiempo de exposición de la membrana a la fuente de fisión, mientras que el radio de poro se determina por el tiempo de grabado, la temperatura y la concentración del baño de ácido fluorhídrico acuoso. Los poros son de tamaño uniforme y perpendicular a la superficie de la membrana. La uniformidad del tamaño de poro es una característica importante de estas membranas, porque una distribución importante de tamaño de poros daría lugar a resultados ambiguos para el espesor hidrodinámico de la capa de polímero debido al flujo sesgado a través de los poros de mayor tamaño. La fracción de área de los poros en sección transversal de la parte irradiada de las membranas era de aproximadamente el 1%; por lo tanto, el número total de poros individuales, modelados mediante una distribución binomial de tamaños de poros, fue superior al 96%. La longitud del poro (l) igualó el espesor de la membrana, ya que los poros eran perpendiculares respecto a la cara de membrana; el espesor se determinó a partir de las dimensiones conocidas y el peso de la membrana."

[0043] Se prefiere obtener un número final y una distribución de poros que sea aproximadamente igual al número y la distribución de canales de acuaporina en la capa de lípidos.

2º aspecto de la invención

[0044] También es posible reconstituir canales de agua de acuaporina en una bicapa lipídica plana montada alrededor de una membrana de soporte poroso con una superficie hidrofóbica, tal como una película de teflón, donde monocapas de lípidos se montan a cada lado de la membrana de soporte porosa. En los poros de la membrana de soporte porosa se montarán las bicapas lipídicas, donde los canales de agua de acuaporina se pueden reconstituir.

[0045] El segundo aspecto de la invención está así constituido por una membrana de agua que comprende una construcción en sándwich con al menos dos monocapas de lípidos, que cuando se monta en una bicapa, comprende canales de agua de acuaporina funcionales, estando dichas por lo menos dos monocapas de lípidos separadas mediante al menos una capa de soporte permeable. Típicamente, 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.

[0046] Se prefiere que el material hidrofóbico tenga un grado de hidrofobicidad que corresponda 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 de la presión atmosférica, pero superiores grados de hidrofobicidad se prefieren, tales como los correspondientes a ángulos de contacto de al menos 105° , 110° , 120° y 120° . Los materiales hidrofóbicos preferidos son parafilm o teflón.

[0047] El material hidrofóbico es típicamente plano (pero puede ser flexible y por lo tanto curvo) y las perforaciones están normalmente distribuidas de manera uniforme y sustancialmente todas de la misma forma geométrica en el plano intermedio entre las 2 superficies del material hidrofóbico, proporcionándose a continuación los detalles relacionados con las perforaciones en el material hidrofóbico.

[0048] El "plano intermedio" se define como el plano que consiste en de puntos desde los cuales la distancia perpendicular a cualquiera de las dos superficies del material hidrofóbico plano es la misma.

[0049] El tamaño de las perforaciones en el material hidrofóbico debe asegurar meramente que se

pueden formar bicapas estables de lípidos anfifílicos en las perforaciones, de manera que pueden tener tamaños en el rango de nm, μm o mm.

[0050] El material hidrofóbico está preferentemente perforado de tal manera que la relación entre el área de perforación y el área no perforada del material se maximiza, ya que esto proporciona una superficie máxima de bicapa lipídica con acuaporinas para realizar el transporte del agua. El patrón constituido por las perforaciones es así de importancia, ya que es la distancia entre cada perforación. Un patrón óptimo es una disposición hexagonal de las perforaciones con un "espesor de pared" mínimo entre cada perforación en el patrón. Sin embargo, el patrón cuadrático también puede resultar suficiente.

[0051] La membrana de agua del segundo aspecto de la invención, por lo tanto, también comprende una membrana de lípidos anfifílica, tal como una membrana que comprende los lípidos que se describen en la Tabla 1. Así, la(s) bicapa(s) de lípidos(s) consiste(n) esencialmente en lípidos anfifílicos seleccionados del grupo formado por fosfolípidos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y cardiolipina, así como sus mezclas, por ejemplo, fosfolípidos tales como 1,2-dipalmitoilo-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 hidrófobos hacia el soporte hidrofóbico y los extremos hidrofílicos hacia el medio acuoso.

Preparación de bicapas

[0052] La permeabilidad intrínseca del material de la membrana debe estar asegurada. Un material con baja permeabilidad es preferible, sin embargo, debe al mismo tiempo ser robusto y capaz de incorporar acuaporinas 2D para constituir una matriz de filtrado conjunto estable y denso. Varios procedimientos se utilizan para preparar el bicapas lipídicas de soporte. Una técnica simple es el procedimiento de Langmuir-Blodgett. Una solución de lípidos en un disolvente orgánico apropiado se extiende en una subfase acuosa en una artesa de Langmuir y el solvente orgánico se evapora. Un par de barreras móviles se utilizan para comprimir la película de lípidos lateralmente a una presión de superficie deseada. Luego, el sustrato se pasa verticalmente a través de la película, transfiriendo así de una capa de lípidos de una molécula de espesor (monocapa) en el sustrato (ver la fig. 12). Una segunda monocapa puede transferirse mediante el paso del sustrato a través de la película otra vez. Un total de tres monocapas han sido transferidas mediante el procedimiento de deposición vertical (Langmuir-Blodgett), sin embargo, una cuarta capa puede ser transferida mediante la deposición horizontal, llamada de Langmuir-Schaeffer (LS), de la última capa. Los procedimientos se pueden utilizar con una variedad de lípidos. Las membranas biológicas nativas a menudo son asimétricas. Ambos 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.

[0053] Otra forma de preparar bicapas soportadas es el procedimiento de fusión de vesículas (Brian y McConnell 1984). Una solución de pequeñas vesículas unilamelares (SUVs) se aplica sobre la superficie de una pieza de silicio hidrofílica o mica recién separada. Cuando la muestra se deja a temperatura baja (4°C) las vesículas se funden con la superficie para hacer una bicapa continua (fig. 13). Sin estar sujeto a ninguna teoría, se ha hipotetizado que las vesículas se adsorben primero en la superficie del sustrato, a continuación se fusionan para crear una estructura plana a modo de panqueque y, finalmente se rompen y se extienden hacia fuera, resultando en una única bicapa en 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 soportada (Leonenko et al. 2000). Con este mecanismo, las vesículas se rompen en los bordes con la mayor curvatura y la parte superior de la bicapa puede migrar entonces a la superficie del sustrato para aumentar el tamaño de la bicapa soportada formada. Se ha informado que se forman bicapas en cuestión de minutos al aplicar la solución sobre el sustrato (Tokumasu et al. 2003), pero este tiempo de incubación corto puede resultar en bicapas incompletas. También se ha informado de horas o una noche de incubación (Reimhult et al. 2003, Rinia et al. 2000).

[0054] Una tercera técnica que se puede utilizar para preparar las bicapas soportadas es el recubrimiento giratorio (Reimhult et al. 2003, Simonsen y Bagatolli 2004). En el recubrimiento giratorio el lípido se disuelve en un solvente adecuado y una gota se coloca en el sustrato, que luego se rota mientras el solvente se evapora y se produce un recubrimiento de lípidos. Dependiendo de la concentración de la solución de los lípidos, la película recubierta giratoria consiste en una o varias bicapas lipídicas. Sin embargo, tras la hidratación las múltiples capas se han demostrado inestables, y usualmente sólo una bicapa soportada permanece en la superficie (fig. 14). Este procedimiento es fácil y rápido, y se ha hecho con lípidos de baja fusión (POPC), así como con lípidos intermedios (DPPC) y con una temperatura de transición muy alta (ceramida). Los lípidos útiles incluyen, por ejemplo, fosfolípidos y lípidos anfifílicos.

[0055] Cuando uno también quiere incorporar péptidos y proteínas en las bicapas soportadas, la técnica de fusión de vesículas es la más aplicable, ya que los procedimientos mencionados implican la solubilización de las proteínas o péptidos en solventes orgánicos. Muchas proteínas de membrana puede desnaturalizarse en solventes orgánicos, especialmente si contienen grandes dominios expuestos a la solución acuosa a ambos lados de la membrana. Por tanto, se prefiere insertar los péptidos o proteínas en las vesículas. Muchos péptidos y proteínas como acuaporinas pueden co-solubilizarse con lípidos en el solvente orgánico antes de la formación de vesículas, y

el péptido que contiene las vesículas se aplica a continuación 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 amiloide p (Lin et al 2001). Las proteínas de la membrana tales como acuaporinas preferentemente se insertan en vesículas por otros medios. Esto se puede hacer usando las estrategias para la reconstitución de las proteínas de membrana en las vesículas, tal como se describe para citocromo c oxidasa como proteína modelo en la introducción de capítulo 4 de las páginas 41-45 de la tesis que aquí incorporada "Supported bilayers as models of biological membranes" por Danielle Keller, febrero de 2005, centro MEMPHYS de física de biomembranas, Departamento de Física, Universidad del Sur de Dinamarca y Centro de Polímeros Danés, Riso National Laboratory, Dinamarca.

[0056] El apilamiento de múltiples capas de matrices 2D individuales es posible y puede ser deseable. Las dimensiones finales de las matrices apiladas dependerán de la solidez general y de la permeabilidad intrínseca del material de la membrana/composición de la membrana elegido. El apilamiento puede apartarse de un sistema donde las proteínas trivialmente están incrustadas en una bicapa lipídica única, y probablemente soportada. Una serie posterior de eventos de hundimiento de vesículas sobre la bicapa soportada podrían proporcionar dispositivos de unidad de filtrado de múltiples capas, ya que las vesículas son requisito previo reconstituido con una acuaporina apropiada. La incorporación del dispositivo de unidad apilado en una membrana de estabilización o matriz polimérica de estabilización y el posterior cosido de dichas unidades individuales daría una malla de filtrado global, eventualmente a través de procesos de automontaje.

Características comunes de los aspectos de la invención

[0057] Una serie de características son comunes para los diferentes aspectos de la invención:

Las acuaporinas útiles para la preparación de las membranas de agua de acuerdo con la invención son: AQP1, TIP, PIP, NIP, ver la figura. 8, y las mezclas y sus híbridos. Las acuaporinas de origen vegetal son especialmente deseables, ya que el riesgo de incluir contaminantes, tales como virus patógenos y priones, que son perjudiciales para los seres humanos, es muy reducido. Además, las acuaporinas de plantas son productos de genes naturales de plantas y pueden sobreexpresarse y producirse en plantas.

[0058] El canal de agua de acuaporina preferentemente se selecciona del grupo consistente en acuagliceroporinas (GLpF), tal como un canal GLPA, un canal GLPB1, un canal GLPB2, un canal GLPB3, y un canal GLPY2, y mezclas y sus híbridos.

[0059] Las membranas de agua de la invención están preferiblemente dentro de 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 filtro previo para excluir el material en partículas gruesas de los líquidos acuosos que se purifican. Como alternativa o adicionalmente, la membrana de agua de la invención puede depositarse en un disco de filtro para crear un filtro de agua.

[0060] Los materiales útiles para la estabilización de la membrana, opcionalmente utilizados para encerrar las membranas de agua de la invención son membranas de silicona microporosa que tienen un tamaño de poro relativamente pequeño y que se solidifican a temperatura ambiente o a una temperatura por debajo de 50°C aproximadamente.

[0061] Los lípidos útiles para la reconstitución de las acuaporinas y formación de las bicapas lipídicas son: POPC, DPPC, ceramida, ver la Tabla 1 y las mezclas de los mismos.

[0062] 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:

Fosfatidilcolinas:

[0063]

1,2-dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)
 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)
 1,2-diestearoilfosfatidilcolina (DSPC)
 1,2-dioleoilfosfatidilcolina (DOPC)
 1,2-dimiristoleoilfosfatidilcolina
 1,2-dipalmitoleoilfosfatidilcolina
 1,2-dipetroselinilfosfatidilcolina
 1,2-dielaidoilfosfatidilcolina
 1,2-dilinoilfosfatidilcolina
 1,2-dilinolenilfosfatidilcolina
 1,2-dieicosenilfosfatidilcolina
 1,2-diarauquidonilfosfatidilcolina

- 1,2-dierucoilfosfatidilcolina
- 1,2-dnervonoilfosfatidilcolina
- 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC)
- 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilcolina
- 5 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidilcolina
- 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidilcolina
- 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilcolina (SOPC)
- 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidilcolina
- 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidilcolina
- 10 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidilcolina
- 1-oleoil-2-palmitoilfosfatidilcolina
- 1-oleoil-2-estearoilfosfatidilcolina
- 1,2-didocosahexaenoilfosfatidilcolina

15 *Fosfatidiletanolaminas;*

- [0064]
- 1,2-dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE)
- 1,2-dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE)
- 20 1,2-diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE)
- 1,2-dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)
- 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (POPE)
- 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidiletanolamina
- 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidiletanolamina
- 25 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidiletanolamina
- 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE)
- 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidiletanolamina
- 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidiletanolamina
- 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidiletanolamina
- 30 1,2-dielaidoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-dilinoleoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-dilinolenoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-diaraquidonoilfosfatidiletanolamina
- 1,2-didocosahexaenoilfosfatidiletanolamina
- 35 1,2-dipalmitoleoilfosfatidiletanolamina

Fosfatidilglicerol:

- [0065]
- 40 1,2-dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)
- 1,2-dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)
- 1,2-diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG)
- 1,2-dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG)
- 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilglicerol (POPG)
- 45 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilglicerol
- 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidilglicerol
- 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidilglicerol
- 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilglicerol (SOPG)
- 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidilglicerol
- 50 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidilglicerol
- 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidilglicerol

Fosfatidilserinas:

- [0066]
- 55 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilserina (POPS)
- 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilserina
- 1-palmitoil-2-araquidonoilfosfatidilserina
- 1-palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidilserina
- 60 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilserina (SOPS)
- 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidilserina
- 1-estearoil-2-araquidonoilfosfatidilserina
- 1-estearoil-2-docosahexaenoilfosfatidilserina
- 1,2-dimiristoilfosfatidilserina (DMPS)
- 65 1,2-dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)
- 1,2-diestearoilfosfatidilserina (DSPS)

1,2-dioleoilfosfatidilserina (DOPS)
 1,2-didocosaheptaenoilfosfatidilserina
 1,2-dierucoilfosfatidilserina

5 *Lípidos especiales:*

[0067]
 Cardiolipina
 Lípidos bipolares

10

Extractos de lípidos naturales:
 Fosfatidilcolina de yema de huevo
 Fosfatidilcolina de corazón de bovino
 Fosfatidilcolina de cerebro

15

Fosfatidilcolina de hígado de bovino
 Fosfatidilcolina de soja
 Fosfatidiletanolamina de E. Coli
 Fosfatidiletanolamina de corazón de bovinos
 Fosfatidiletanolamina de cerebro

20

Fosfatidiletanolamina de hígado de bovino
 Fosfatidiletanolamina de huevo
 Fosfatidilinositol de hígado de bovino
 Fosfatidilinositol de soja
 Fosfatidilserina de cerebro

25

Fosfatidilserina de soja

Lípidos polimerizables:

[0068]
 1,2-di-10,12-tricosadiinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DTPC)
 1,2-di-10,12-tricosadiinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DTPE)
 1-palmitoil-2,10,12-tricosadiinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PTPE)
 (DC-8,9PC [1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)-sn]-glicero-3-fosfocolina
 diPhyPC [1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfocolina]

35

Sistemas de tratamiento de agua y dispositivos de filtrado de agua

[0069] En una realización, la invención tiene la forma de un disco de filtro convencional, ya que es fácil para estudiar su funcionalidad. Para fabricar este disco, una bicapa de membrana de fosfolípidos que comprende proteína de acuaporina funcional se deposita en la superficie de un disco de 25 mm de ultrafiltración comercial utilizando una artesa de Langmuir-Blodgett. En una realización preferida de la invención, la membrana de agua se enrolla en espiral opcionalmente junto con membranas convencionales para formar un módulo RO enrollado en espiral, ver las figuras. 10 y 11.

40

[0070] El disco de filtro se monta en una cámara cerrada con una entrada y una salida, tal como una cámara de disco de filtro conectada a través de un tubo a una fuente de agua con una bomba que impulsa el agua a presión de la fuente a través de la membrana y sale a través de la salida. El dispositivo se considera funcional cuando sólo agua pura lleva a través del otro lado de la membrana y los solutos contaminantes permanecen concentrados en la cámara de origen. La solución contaminada debe ser presurizada para superar la tendencia natural del agua pura a fluir en el compartimiento de la cámara que tiene el mayor número de partículas disueltas, superando así la presión osmótica del agua, que es de aproximadamente 10 psi para el agua potable. Es el propósito de la membrana de agua de la invención invertir la ósmosis y separar el agua pura de los solutos contaminantes. Esta tendencia, o presión osmótica, del sistema se puede expresar en libras por pulgada cuadrada (psi). Por ejemplo, la presión osmótica del agua de mar está en el rango de 360 a 400 psi.

45

50

55

[0071] Hay varios procedimientos que pueden utilizarse para permitir que el dispositivo tolere este tipo de presiones. Un procedimiento consiste en agregar una alta concentración de un soluto no tóxico y fácilmente extraíble en la cámara de agua fresca para fomentar la ósmosis regular a través de la membrana, mientras la ósmosis inversa también se está produciendo debido a la presurización de la cámara. Además, la presión necesaria para la ósmosis inversa se puede reducir mediante el uso de membranas múltiples acuaporinas en una cascada de cámaras selladas conectadas que contienen concentraciones de contaminantes cada vez más pequeñas. La presión resultante para purificar el agua en cada par de cámaras es una fracción de la presión total necesaria para la ósmosis inversa. Por lo tanto, cada membrana sólo tiene que soportar una presión pequeña y tiene una mayor probabilidad de permanecer intacta. Por lo tanto, si la diferencia de concentración entre cada par de cámaras era sólo del 10% en lugar del 100%, sólo 10% de la presión alta antes mencionada sería necesaria para purificar el suministro de agua en cada unión. El agua pura se produce continuamente en la cámara de final con una presión y

60

65

un flujo constantes.

[0072] La membrana de ósmosis inversa de acuaporina puede purificar el agua que posee diferentes tipos de contaminación en una sola etapa. Los sistemas tradicionales de alta pureza requieren varios componentes que pueden incluir un ablandador de agua, filtros de carbón, intercambiadores de iones, UV o esterilización química, y un conjunto de filtro de ósmosis inversa de dos pasos que debe utilizarse en combinación antes que el agua purificada se pueda producir. Esta elaborada puesta a punto no puede eliminar los gases disueltos o sustancias menores de 150 Daltons de la fuente de agua, como puede la membrana de acuaporinas. Además, todos estos componentes requieren de mantenimiento. Las lámparas UV requieren reemplazo y energía. Los intercambiadores de iones necesitan ser regenerados químicamente cuando estén llenos. Los suavizadores necesitan sal. Los cartuchos de carbono y de ósmosis inversa deben ser reemplazados cuando se ensucian. Por último, un dispositivo de un único paso requeriría mucho menos espacio y pesaría mucho menos que un sistema de purificación típica, y la ventaja de esta opción es posible mediante dispositivos que tienen la membrana de agua acuaporina de la invención para ser portátil.

[0073] Las membranas de acuaporina son también más rápidas que los sistemas convencionales. Una unidad convencional de ósmosis inversa de alta velocidad puede producir alrededor de 28,4 litros (7,5 galones) de agua limpia por minuto. La investigación actual muestra el movimiento de las moléculas de agua a través de una membrana de lípidos de acuaporina saturada (0,0177 mm²) con un índice de 54 mmol/seg. (Pohl, P., Saporov, SM, Borgnia, MJ, y Agre, P., (2001), Actas de la Academia Nacional de Ciencias 98, p. 9624-9629). Por lo tanto, una membrana de acuaporina teórica de ósmosis inversa con una superficie de 1,0 m² puede filtrar hasta 3295 litros de agua pura por minuto. Esa tasa es superior a 116 veces más rápido que un purificador normal.

[0074] La presente invención en un aspecto adicional se refiere a un sistema de tratamiento de agua para eliminar los productos químicos, radiológicos, biológicos y/o partículas contaminantes del mismo, comprendiendo este sistema un alojamiento unitario que tiene una entrada dispuesta para su conexión a una fuente externa de agua, en donde el alojamiento unitario tiene dispuesto en el mismo una o más unidades de filtración de agua compuestas que comprenden una membrana de agua de la invención dispuesta para tratar el agua de la fuente externa de agua para producir una corriente de agua ultra pura, y en donde el alojamiento unitario comprende una salida para descargar dicho corriente de agua ultra-pura del mismo. Ejemplos de tales sistemas de tratamiento son dispositivos de filtrado de ósmosis inversa.

[0075] Sin embargo, también es posible el intercambio de una membrana de agua de la invención con otras membranas que comprenden acuaporinas funcionales, por ejemplo, las membranas que contienen acuaporinas descritas en el documento 2004/049230. Se cree que estos sistemas de tratamiento de agua y los dispositivos de filtro aquí descritos son inventivos por derecho propio, independientemente de la naturaleza exacta de las acuaporinas que contiene la membrana.

[0076] Así, la invención también incluye un dispositivo de filtrado de agua de ósmosis inversa para la producción de agua desalinizada de una fuente de agua salada, siendo dicha agua desalada útil para la agricultura de riego y/o como agua potable, en donde al menos uno de una(s) membrana(s) de filtración de ósmosis inversa final ha sido sustituida por una membrana de agua que comprende los canales de agua de acuaporina funcionales, tal como una membrana de la invención. Del mismo modo, la invención también incluye un dispositivo de filtrado de agua de ósmosis inversa para la producción de agua ultra pura de una fuente de agua cruda, siendo dicha agua ultra pura útil en la industria de los semiconductores y/o en la industria farmacéutica, en donde al menos una de una(s) membrana(s) de filtrado de ósmosis inversa final ha sido sustituida por una membrana de agua que incluye canales de agua de acuaporina funcionales. Además, la invención se refiere a un dispositivos de filtrado de agua de ósmosis inversa para la producción de agua pura de una fuente de agua cruda útil en la industria del agua municipal, industria química, industria del agua potable, industria alimenticia, industria electrónica, industria de petróleo y gas, refinerías de industria , industria de pulpa y papel, industria metalúrgica, industria minera, e industria de alimentación, en donde al menos uno de una(s) membrana(s) de filtrado de ósmosis inversa final ha sido sustituida por una membrana de agua que incluye canales de agua acuaporina funcionales. Típicamente, una presión osmótica se aplica a la parte posterior de dicha membrana de agua para conducir el flujo de agua. La presión osmótica normalmente se deriva de una solución concentrada para tener una mayor presión osmótica que la fuente de agua a purificar.

[0077] La invención también se refiere a un dispositivo de filtración de agua para extraer y recuperar agua de fluidos corporales, como orina, leche y sudor/transpiración, que incluye una membrana de agua que comprende los canales de agua de acuaporina funcionales, tal como una membrana de agua de la invención.

[0078] El sistema de purificación de agua y el dispositivo de filtración de la presente invención pueden comprender además un módulo de filtración de partículas antes de la unidad de membrana de agua, para el tratamiento previo de la corriente de agua y la eliminación de al menos una parte de las partículas contaminantes de la misma.

[0079] Este módulo de filtración de partículas funciona para reducir la carga de la unidad de filtración de

agua posterior, de modo que se requiere menos presión para el flujo suficiente de la corriente de agua, aumentando así el consumo de energía de todo el sistema y la eficiencia de operación.

5 [0080] El módulo de filtración de partículas preferentemente comprende uno o más elementos de filtración seleccionados del grupo compuesto por (a) separadores de membrana de fibra hueca, y (b) elementos de ultrafiltración. Múltiples separadores de membrana de fibra hueca y elementos de ultrafiltración se pueden emplear de forma alterna, para maximizar la capacidad de retirada de partículas de este módulo de filtración particular.

10 [0081] Los elementos de filtración preferentemente comprenden dispositivos de filtración de flujo tangencial o de flujo cruzado, ya que son bien conocidos en la materia, para evitar la oclusión de la superficie de filtración.

15 [0082] Con el fin de reducir la vulnerabilidad de este módulo de filtración de partículas de fallo de los filtros individuales, y para reducir el tiempo de inactividad del sistema durante la limpieza y el mantenimiento de los filtros individuales, este módulo de filtración de partículas preferentemente contiene múltiples elementos de filtración dispuestos en paralelo, cada uno de los cuales proporciona un ruta de filtración independiente para el flujo de agua.

20 [0083] Se utiliza preferiblemente un filtro preliminar anterior de dicho módulo de filtración de partículas, que puede por ejemplo, tener una porosidad en un intervalo de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 20 μm , para filtrar las partículas grandes (tal como partículas sólidas, esporas y bacterias) de la corriente de agua y para extender la vida de los filtros utilizados en el módulo de filtración de partículas posterior.

25 [0084] Dicha unidad de eliminación de la contaminación podrá comprender bien un módulo de nanofiltración (NF) o un módulo de ósmosis inversa (RO) para la eliminación de los iones de la corriente de agua. El módulo RO ha sido convencionalmente utilizado para este propósito y ha demostrado ser efectivo. Además, la nanofiltración requiere menos presión y menos consumo de energía y agua en comparación con los módulos de ósmosis inversa.

30 [0085] El sistema de tratamiento de agua de la presente invención puede comprender además un tanque acumulador hidráulico, en el que fluye el agua tratada, para el propósito de mantener una presión uniforme en el sistema y proporcionar un suministro constante de agua sustancialmente a la instalación de consumo de agua posterior.

35 [0086] El sistema de tratamiento de agua de la presente invención puede comprender además un módulo de supervisión de la calidad del agua, controlando una o más variables (por ejemplo, incluyendo pero no limitado a: concentración de cloro, pH, conductividad, carbono orgánico total, oxígeno disuelto, demanda de oxígeno químico, turbidez, y radiactividad) que son indicativos de la calidad del flujo de agua a tratar, comparándose dichas variables con un valor de referencia determinado por los valores observados previamente de dichas variables, identificando una desviación significativa de este valor de referencia, y produciendo una señal de salida indicativa de dicha desviación. Se pueden utilizar sensores automáticos para hacer mediciones precisas de tales variables, y una toma de muestras se puede utilizar para recoger muestras discretas de agua de forma regular, lo que permite el aislamiento de una muestra del marco de tiempo cuando se produce una desviación. Varios procedimientos analíticos pueden realizarse en la muestra, de forma que se identifiquen los contaminantes en el agua que causan la desviación. Este módulo de supervisión de la calidad del agua puede funcionar más para activar o apagar el sistema de tratamiento de agua según sea necesario, y/o para alertar a las autoridades que la calidad del agua no está cumpliendo con las normas preestablecidas de calidad del agua potable.

40

45

50 [0087] El sistema de tratamiento de agua de la presente invención pueden ser fijo o portátil. Es preferible fabricar e instalar para el transporte y la implementación vehicular, por lo que puede ser utilizado para abastecer de agua a sitios remotos.

55 [0088] El sistema de la presente invención es susceptible de ser configurado con diferentes componentes de manera redundante en paralelo y/o en serie, para aumentar la fiabilidad del sistema y el rendimiento general del sistema. Se reconoce, además, que el sistema y las realizaciones aquí descritas pueden utilizar redundancia funcional para efectuar la eliminación completa de los contaminantes del agua.

60 [0089] El sistema/dispositivo de filtración de agua es útil para purificar agua, y la invención, tal como se mencionó anteriormente, también se refiere a procedimientos de preparación de agua purificada, donde dichos procedimientos comprenden que el agua pase a través de un sistema o dispositivo de la invención. El agua así obtenida estará, por ejemplo, esencialmente libre de iones, partículas, materia orgánica y coloides, ya que tales fracciones se han retenido en el dispositivo.

Películas hidrofóbicas de la invención

65 [0090] Tal como se desprende de la descripción anterior del 2° aspecto de la invención, *es decir*, la membrana de agua que puede comprender un material hidrofóbico en una capa intermedia de soporte flanqueada

por monocapas de lípidos, es posible preparar un material en forma de una película hidrofóbica que incluye perforaciones distribuidas uniformemente con una forma y tamaño uniforme.

[0091] Se describe una película de polímero hidrofóbico que comprende múltiples perforaciones, en la que dichas perforaciones se distribuyen uniformemente en la película y sustancialmente la totalidad de sustancialmente la misma forma geométrica en el plano intermedio entre las 2 superficies de la película. Cuando tales perforaciones tienen, cada una, una superficie de apertura lo suficientemente grande para permitir el paso de vapor de agua, pero lo suficientemente pequeña para impedir el paso de agua líquida, tal como un espacio en el rango de entre 100 nm² a 1 mm², la película funcionará de una manera equivalente a materiales como Goretex®, es decir la película es transpirable pero, no obstante, impermeable. Se cree que las películas son superiores a los materiales tales como películas de Goretex®, porque el tamaño y la geometría de las perforaciones se encuentra bajo un control superior.

[0092] El término "película hidrofóbica" en el contexto actual indica un material hidrofóbico sustancialmente plana. La película es típicamente flexible, de modo que el material plano puede alcanzar la forma de un plano curvo (*es decir*, si el material se enrolla alrededor de un eje), haciendo así la película hidrofóbica adecuada como parte de un tejido de prendas de vestir y otras estructuras flexibles.

[0093] Las perforaciones típicamente tienen una longitud máxima de corte transversal en un rango de nm a mm, por ejemplo en el rango de micras, y la película suele tener un espesor en el rango de milímetros a micras.

[0094] Típicamente, la forma geométrica de las perforaciones se selecciona entre circular y elíptica. Ambas formas son fáciles de obtener cuando se utilizan equipos láser para la introducción de las perforaciones en la película - por ejemplo, orificios circulares se obtienen utilizando un rayo láser estacionario, mientras que el movimiento de la película en relación con el rayo láser (ya sea moviendo la película o el rayo láser) durante la exposición ofrecerá una perforación elíptica o incluso en forma de varilla. En realizaciones preferidas, las perforaciones tienen sustancialmente la misma dimensión. El material de la película suele seleccionarse de los materiales hidrofóbicos descritos anteriormente en relación con la descripción del 2^o aspecto de la invención.

[0095] Otros aspectos, características y realizaciones de la invención se desprenden de forma más completa de la descripción y de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

Reconstitución de AQP-1 en vesículas de lípidos DPPC (proteoliposomas)

[0096] El siguiente protocolo se ha utilizado para preparar una membrana de agua de acuerdo con la invención.

1. Preparación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV)

[0097]

a. Un lípido DPPC seco se suspende en agua milli-Q para obtener una concentración de 1,3-1,5 mM.

b. La suspensión es hidratada mediante incubación a 55°C durante 1 hora en las vesículas resultantes multilamelares (MLVs).

c. SUVs son preparados mediante la extrusión de la solución MLV 12 veces a través de dos filtros de policarbonato de 100 nm.

d. La solución SUV se almacena a 55°C.

2. Preparación de BioBeads™ (microesferas de poliestireno)

[0098]

a. Aprox. 4 g BioBeads™ se lavan 5 veces con agua milli-Q.

b. Las BioBeads™ lavadas son sonicadas durante 1 hora bajo agua de aspiración.

3. Reconstitución

[0099]

a. Un volumen apropiado de la solución SUV se pipeta en un tubo eppendorf

b. Se añaden 50 µl 20% Triton X-100

c. Se añaden 10 µl AQP-1 en forma desnaturalizada en un tampón fosfato de purificación según el procedimiento descrito por Zeidel et al. (1992) (Conc. 0,5 mg/ml)

d. Se añade agua milli-Q a un volumen final de 200 l

e. La solución se incuba a temperatura ambiente mientras se agita durante 15 min

f. Aprox. 75 mg de BioBeads lavadas se añaden a la solución, que a continuación se incuba y se

agita durante 30-45 min

- g. La solución se pipeta en un tubo eppendorf limpio
- h. Las etapas f-g se repiten 3 veces (4 veces BioBeads en total)
- i. La solución de proteoliposomas ya está lista para su uso

5

[0100] La figura 9 muestra imágenes de microscopio de fuerza atómica (AFM) de las membranas DPPC de muscovita, y muestra una imagen AFM de AQP1 reconstituido en membranas DPPC, que muestra que la reconstitución funciona y que las bicapas soportadas de las vesículas resultantes se han hecho. El área de las pequeñas estructuras circulares en las imágenes es de aproximadamente 36 nm², medido en las imágenes. Esto se corresponde bien con el área de superficie de la proteína en la bicapa lipídica. Por término medio (6 imágenes de diferentes tamaños a partir de tres áreas diferentes) la proteína cubre el 48% de la superficie, y el 52% de los lípidos. Asumiendo un área de lípidos de 0,5 nm² la proporción de lípidos y proteínas (LPR) calculada es de 77. Las bicapas soportadas se hicieron mediante la fusión de vesículas de proteoliposomas preparados con un LPR de 50.

10

15 EJEMPLO 2

Reconstitución de AQP-1 en vesículas de extracto de lípidos *E. Coli*

[0101] Se obtuvo extracto de lípido total *E. coli* en cloroformo a partir de Avanti Polar Uplids, (Alabaster, AL). Los solventes (cloroformo, etanol, metanol, decano) fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). SM-2 BioBeads fueron adquiridos a BioRad Laboratories (Hercules, CA). El agua utilizada en todos los preparativos fue agua ultrapura Milli-Q (18,2 MΩ cm⁻¹). Acuaporina-1 purificada de eritrocitos bovinos se obtuvo como una suspensión de proteínas desplegadas por el Dr. Jan Enghild de la Universidad de Aarhus.

20

[0102] El cloroformo se evaporó de la solución de lípidos y la película de lípidos seca se hidrató con 100 mM KCl durante 30 minutos a 55°C. La solución se agitó, y pequeñas vesículas unilamelares (SUV) se formaron haciendo pasar la solución 12 veces a través de dos filtros de policarbonato de 100 nm en un extrusor Lipex (Northern Lipids, Vancouver, CD). La mezcla de reconstitución se preparó mediante la adición de Triton X-100 (Sigma) a una concentración final de 1,25% (peso/vol), seguido de AQP-1 a una proporción de lípidos y proteínas (LPR) de 1000:1. Los proteoliposomas se formaron mediante la eliminación del detergente. Esto se realizó por adsorción en BioBeads hidrofóbicos (SM-2). Los proteoliposomas se utilizaron en el día de la preparación o al día siguiente. La solución se almacenó a 4°C entre los experimentos.

25

30

EJEMPLO 3:

Formación de bicapas planas y estudios de fijación de voltaje: AQP-1 incorporados en bicapas de lípidos sin aumentar la conductancia iónica

[0103] Una fijación de voltaje controla (o "fija") la bicapa (o membrana celular) de potencial V en cualquier nivel deseado. El procedimiento aquí utilizado mide el potencial a través de una bicapa formada en una partición entre dos soluciones acuosas. Un electrodo de plata AgCl recubierto se coloca en una cámara, y por vía electrónica se compara esta tensión con la tensión que se mantenga (llamada tensión de mando). El circuito de la fijación a continuación pasa una corriente de vuelta a la otra cámara a través de otro electrodo. Este circuito de retroalimentación electrónica tiene el potencial de transbicapa en el nivel deseado, incluso frente a los cambios de permeabilidad. Lo más importante, el dispositivo permite la medida simultánea de la corriente que se necesita para mantener el potencial transbicapa en una tensión dada. Por lo tanto, la técnica de fijación de voltaje indica cómo el potencial de la membrana influye en el flujo de corriente iónica a través de la membrana. Esta influencia se expresa en una relación corriente-voltaje (I/V).

35

40

45

[0104] Se formaron bicapas planas a partir de soluciones n-decano (2,5% p/vol) de *E. coli* (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) a través de un orificio (1,3 mm de diámetro) en una partición de teflón que separa dos soluciones acuosas de 0,1 M sin búfer KCl que fueron preparados el día del experimento. Los experimentos bicapa I/V se realizaron a 22°C con un amplificador AxoPatch200 (Axon Instruments, Sunnyvale, CA) usando cables de AgCl recubiertos de plata como electrodos. Se construyeron protocolos I/V fueron y los datos fueron registrados mediante el software Clampex 9.2 (Axon Instruments, Sunnyvale, CA). Los datos fueron filtrados con paso bajo a una frecuencia de esquina de 500 Hz (-3dB), utilizando un filtro Bessel de ocho polos (Frequency Devices, Haverhill, MA) y después de conversión AD de 16 bits (DigiData1332A, Axon Instruments, Sunnyvale, CA) fueron almacenados en el PC (Dell Computers, Texas) para su análisis. Los datos fueron analizados y mostrados utilizando ClampFit 9.2 (Axon Instruments, Sunnyvale, CA) y OriginPro7.5 (OriginLab, Northampton, MA).

55

60

[0105] La formación de la bicapa se monitorizó usando un estereomicroscopio (Zeiss) equipado con una fuente de luz fría (IntraLux 5000, Volpi, CH). Después de la deposición de lípidos en el orificio de partición, los colores de la difracción de Newton de las multicapas de lípidos fueron desapareciendo y después de unos 10 minutos se estableció una membrana de lípidos transparente "negra", rodeada por un toro de lípidos/decano más grueso. Este adelgazamiento se reflejó también en la evolución temporal en la raíz del promedio de los cuadrados de las actuales transbicapas en IRMS potencial cero. Inicialmente IRMS era de 1,6 pA aproximadamente y se elevó

65

a un valor de estado estacionario de aproximadamente 6 pA, indicando que se formó una bicapa estable. El diámetro de la bicapa era de 1200 micras aproximadamente. Después de la formación de la bicapa, se obtuvieron las corrientes transbicapa mediante un protocolo de etapa en el que el potencial se incrementó de -100 mV a +90 mV en incrementos de 10 mV. Cada etapa se prolongó 1000 ms con 1000 ms entre etapas.

[0106] AQP-1 se incorporó a la bicapa plana después de la adición de vesículas que contienen AQP-1 a la solución que forma la bicapa (2:1 vol/vol), y se obtuvieron resultados similares.

[0107] La incorporación de AQP-1 en las bicapas lipídicas no cambió las corrientes iónicas, pero cambió las constantes de tiempo de la bicapa que contiene AQP-1 en comparación con el control. En una primera aproximación, esta última observación se puede interpretar como cambios en las constantes dieléctricas efectivas del toro y de la bicapa. Esto es probable, ya que la constante dieléctrica más baja del material de proteína AQP-1 en comparación con el material de hidrocarburos podría dar lugar a menores constantes de tiempo, tanto en la bicapa como en el toro.

EJEMPLO 4

Estudios de gradiente osmótico: El AQP-1 incorporado en bicapas de lípidos impuso un gradiente osmótico produciendo un aumento en la concentración de iones en la capa no agitada en el lado hipotónico.

[0108] Después de la formación de bicapas lipídicas que contienen AQP-1, se observó un flujo de agua activado por gradiente osmótico a través de la membrana, mediante la medición de los cambios en la concentración de iones K⁺ en la capa no agitada cerca de la membrana.

[0109] Se construyeron electrodos K⁺ de doble barril utilizando capilares de vidrio de 1,2 mm de diámetro exterior (Coming 120F), de acuerdo con la técnica de Zeuthen.

[0110] Las tensiones de los electrodos de los dos barriles se registraron usando un amplificador DUO773 (WPI) interconectado con un PC (Dell Computer, Austin, TX), usando una interfaz AD/DA de 12 bits BioLogic 1401+ (Biologic, Claix, Francia).

[0111] Se realizaron registros con el electrodo de doble barril colocado en la cámara posterior (cis) que contenía 100 mM KCl tamponado con 20 mM Tris [hidroximetil]-aminometano hidrocloreuro (TRIS) (T3253, Sigma, St Louis, MO) a pH 7,2. El soporte del electrodo fue montado de manera que entró en la cámara cis con un ángulo de 45° respecto a la superficie de la solución acuosa y se manipuló usando un micromanipulador hidráulico (David Knopf Instruments, modelo 1207B) con una longitud de paso mínima de 0,25 micras. La formación de la bicapa y la posición aproximada del electrodo se monitorizaron usando un estereomicroscopio tal como se describe en la sección 5.3 y la grabación comenzó 10-20 min después de la deposición de lípidos. La precisión global en la distancia de bicapa-electrodo se consideró aproximadamente $\pm 7 \mu\text{m}$ y la distancia absoluta fue juzgada mediante de los cambios mayores en el potencial del electrodo bajo estrecho contacto con la bicapa. El gradiente osmótico a través de la bicapa fue inducido por tener un lado frontal (trans) de la solución KCl que contiene 4 M urea (452042V, BDH, Poole, Reino Unido) tamponado con 20 mM TRIS a pH 7,2.

[0112] Se observó que una bicapa lipídica incorporada en AQP-1 indujo un flujo de agua en presencia de un gradiente osmótico transbicapa.

[0113] El AQP-1 incorporado en las bicapas lipídicas aumentó la concentración de iones K⁺ en un 8% aproximadamente en 20 micras de la bicapa en el lado hipotónico en presencia de un gradiente osmótico en comparación con la mayor concentración de K⁺.

[0114] Las membranas fueron capaces de soportar gradientes osmóticos 4 M.

EJEMPLO 5

Sistema de agua ultrapura compuesto por la membrana de acuerdo con la invención.

[0115] Las figuras 10 y 11 muestran un sistema de purificación de agua, de acuerdo con una realización de la presente invención. La figura 10 es una vista en perspectiva esquemática seccionada del elemento, y la figura 11 es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea II-II de la figura 10.

[0116] El elemento tiene un tubo hueco 1 dispuesto en el centro del elemento y que tiene una superficie del mismo formada con una pluralidad de orificios pasantes 1a. Las membranas de ósmosis inversa 2, elementos de paso de líquido permeados 3, y elementos de paso de líquidos de alimentación 4 se enrollan alrededor de la superficie exterior del tubo hueco 1 de la forma descrita a continuación.

[0117] Cada membrana de osmosis inversa 2 tiene una forma similar a una bolsa en conjunto, y un

elemento de paso de líquido permeado 3 se dispone en el mismo. Las membranas de ósmosis inversa en forma de bolsa 2 se fijan a la superficie exterior del tubo hueco 1 con sus aberturas 2a encerrando orificios pasantes 1a formados en el tubo hueco 1, de manera que el interior de las membranas de ósmosis inversa 2 y los elementos de paso de líquido permeados 3 pueden comunicarse con los orificios pasantes 1a.

[0118] Cada elemento de paso de líquido de alimentación 4 está dispuesto entre las membranas de ósmosis inversa 2 asociadas al mismo, y los elementos de marco 5 configurados para permitir que el líquido pase a su través están fijados a ambos extremos del conjunto de la membrana y el elemento de paso, con lo cual se consigue la estructura en espiral.

[0119] El elemento mencionado anteriormente se coloca en un recipiente a presión y se adapta para suministrarse en un extremo (lado anterior) con líquido de alimentación 6 a una presión predeterminada.

[0120] A medida que el líquido de alimentación 6 fluye a lo largo de los elementos de paso de líquido de alimentación 4, se somete a una separación de ósmosis inversa mediante membranas de ósmosis inversa 2, que se separa en líquido permeado y un soluto. El líquido permeado, que pasa a través de las membranas de ósmosis inversa 2, y que tiene una concentración de solutos baja, fluye en los orificios pasantes 1a y se recoge en el tubo hueco 1. El líquido permeado 6a se saca luego del lado posterior del elemento.

[0121] El líquido de alimentación que no ha pasado por las membranas de ósmosis inversa 2 continúa fluyendo a lo largo de los elementos de paso de líquido de alimentación 4 en el lado posterior. En el transcurso del flujo, el líquido de alimentación se toma en el soluto separado del líquido de alimentación y se deja sobre las superficies de la membrana, para ser líquido concentrado 6b que tiene una alta concentración de soluto.

[0122] Hay un problema crítico en la operación del elemento, de forma que el rendimiento del elemento disminuye debido a la polarización de la concentración.

[0123] La polarización de la concentración es un fenómeno en el que las sustancias incrustantes, tales como impurezas y contaminantes contenidos en el líquido de alimentación, se enriquecen en la superficies de la membrana de las membranas de ósmosis inversa 2, que están en contacto con los elementos de paso de líquido de alimentación 4, de manera que la concentración de soluto y de sustancias incrustantes del líquido de alimentación se hace más alto sobre la superficie de la membrana. Como resultado, la presión osmótica se vuelve más alta.

[0124] Cuando se produce la polarización de la concentración, la cantidad de líquido permeado disminuye, y las impurezas tales como gel y escala se precipitan en la superficie de la membrana. Por esta razón, la membrana de ósmosis inversa no puede desarrollar su capacidad y el rendimiento del elemento disminuye.

[0125] La aparición de la polarización de concentración puede suprimirse haciendo que el flujo del líquido de alimentación sobre la superficie de la membrana sea turbulento. Por ejemplo, el flujo turbulento se produce con más facilidad utilizando el elemento de paso de líquido de alimentación 4 de un espesor menor para aumentar la velocidad lineal del líquido de alimentación sobre la superficie de la membrana, de modo que la capa de polarización de la concentración pueda ser más fina.

[0126] Con el elemento de paso de líquido de alimentación 4 con un espesor menor, sin embargo, el paso definido por el elemento de paso de líquido de alimentación 4 se obstruye fácilmente con sustancias de incrustación contenidas en el líquido de alimentación, tales como impurezas y microorganismos. Como resultado, el rendimiento disminuye y la pérdida de presión en el líquido de alimentación aumenta. Para mantener la calidad y la cantidad de líquido permeado, la presión operativa para el líquido de alimentación tiene que ser aumentarse, y por lo tanto, debe preverse una bomba de alta presión que requiere energía eléctrica para operar y tuberías de presión, lo que resulta en un incremento de los costes de producción de líquidos.

[0127] Al menos una de las membranas de ósmosis inversa es una membrana de agua de acuerdo con la invención, que comprende canales de acuaporina y/o acuagliceroporina.

REFERENCIAS:

- [0128]
1. Agre, P., M. Bonhivers, y M. J. Borgnia. (1998). The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 14659-14662.
 2. 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.
 3. 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.
 4. Burykin y A. Warshel (2003). What really prevents proton transport through aquaporin? Charge self-energy vs. proton wire proposals, *Biophysical Journal* 85, 3696-3706
 5. Chakrabarti, N., Tajkhorshid, E., Roux, B. y Pommès, R. (2004). Molecular basis of proton blockage in aquaporins,

Structure 12, 65-74

6. Dainty, J. y C.R. House. 1966. Unstirred layers in frog skin. *J Physiol* 182:66-78.
7. de Groot, B. L., y Grubmüller, H. (2001). Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF, *Science* 294, 2353-2357.
- 5 8. de Groot, B. L., Frigato, T., Helms, V. y Grubmüller, H. (2003). The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 channel, *Journal of Molecular Biology* 333, 279-293.
9. Fettiplace, R. y D.A. Haydon. 1980. Water permeability of lipid membranes. *Physiol Rev* 60:510-50.
10. 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.
11. Heymann, J. B. y Engel, A. (1999). Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News Physiol. Sci.* (14) p. 188.
12. 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.
13. Jensen, M. O., Tajkhorshid, E., y Schulten, K. (2003). Electrostatic tuning of permeation and selectivity in aquaporin water channels, *Biophysical Journal* 85, 2884-2899.
14. 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 usin atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1509:131-147, 2000.
15. H. Lin, R. Bhatia, y R. Lal. Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.*, 15:2433-2444, 2001.
16. Montal, M. y P. Mueller. 1972 . Formation of Biomolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:3561-3566.
17. J. Mou, D. M. Czajkowsky, y Z. Shao. Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry*, 35:3222-3226, 1996.
18. 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.
19. Pohl, P., S.M. Saparov, y Y.N. Antonenko. 1997. The effect of a transmembrane osmotic flux on the ion concentration distribution in the immediate membrane vicinity measured by microelectrodes. *Biophys J* 72:1711-8.
20. 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.
21. E. Reimhult, F. Höök, 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.
22. 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.
23. I. Reviakine y A. Brisson. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*, 16:1806-1815, 2000.
24. 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.
25. Sakmann, B. y E. Neher. 1995. Single channel recording 2ed. Plenum Press, New York Saparov, S.M., D. Kozono, U.A.P. Rothe, y P. Pohl. 2001. Water and Ion Permeation of Aquaporin-1 in Planar Bilayers. *J. Biol. Chem.* 276:31515-31520.
26. A. C. Simonsen y L. A. Bagatolli. Structure of spin-coated lipid films and domain formation in supported membranes formed by hydration. *Langmuir*, 20:9720-9728, 2004.
27. 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.
28. 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.
29. 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 clavanin A interacts strongly and specifically with lipid bilayers. *Biochemistry*, 42:11366-11372, 2003.
30. Zhu, F., Tajkhorshid, E. y Schulten, K. (2003). Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1. *Biophysical Journal*, 86, 50-57.
31. Zeidel, Mark L., Suresh V. Ambudkar, Barbara L. Smith, y Peter Agre, *Biochemistry* 1992, 31, 7436-7440.

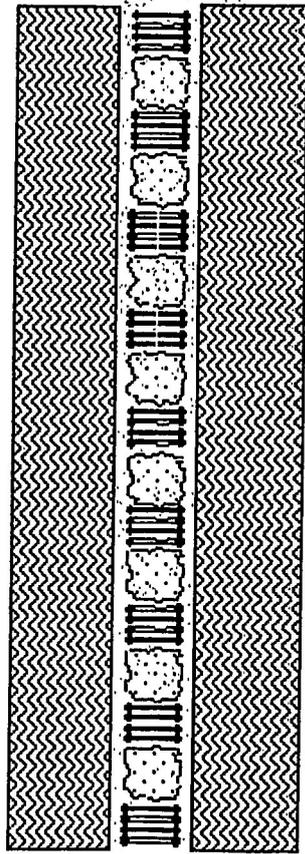
55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Membrana para la filtración de agua, que comprende proteínas de transporte de agua de acuaporina que han sido reconstituidas en vesículas lipídicas y transformadas en una capa soportada en un soporte sólido para formar una membrana para la filtración de agua.
2. Membrana de agua, según la reivindicación 1, en la que la acuaporina es de origen vegetal, tal como una acuaporina TIP, PIP, o NIP y mezclas e híbridos de las mismas.
- 10 3. Membrana de agua, según la reivindicación 1, en la que el canal de agua de acuaporina se selecciona entre el grupo que consiste en acuagliceroporinas (GLpF), tales como un canal GLPA, un canal GLPB1, un canal GLPB2, un canal GLPB3, y un canal GLPY2, y mezclas e híbridos de los mismos.
- 15 4. Membrana de agua, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la acuaporina es una proteína mutante.
- 20 5. Membrana de agua, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el soporte poroso tiene una superficie de membrana hidrofílica que comprende un material seleccionado entre mica, cinta de mica, AlO_2 o un polímero, tal como celulosa, o tiene una superficie de membrana hidrofílica, tal como polisulfona o silicona.
6. Membrana de agua, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una membrana de ósmosis inversa.
- 25 7. Utilización de la membrana de agua, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para extraer agua de una sustancia o solución acuosa.
8. Utilización, según la reivindicación 7, en la que se obtiene una concentración incrementada de un soluto disuelto en dicha sustancia o solución acuosa.
- 30 9. Procedimiento para preparar un filtrado de agua ultra pura, que comprende filtrar una solución acuosa a través de la membrana de agua, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para retener iones, partículas, materia orgánica y/o coloides, mediante el cual el filtrado es agua esencialmente libre de iones, partículas, materia orgánica y coloides.
- 35 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que se aplica una presión osmótica en el lado posterior de dicha membrana de agua.
- 40 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que dicha presión osmótica se deriva de una solución concentrada que tiene una presión osmótica mayor que la fuente de agua a purificar.
- 45 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que se añade una alta concentración de un soluto no tóxico y fácilmente extraíble en una cámara de agua fresca para fomentar la ósmosis regular a través de la membrana.
13. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que el método es para la producción de agua desalinizada a partir de una fuente de agua salada, siendo útil dicha agua desalinizada para la agricultura de riego o como agua potable.
- 50 14. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que el método es para la producción de agua ultra pura a partir de una fuente de agua cruda, siendo útil dicha agua ultra pura en la industria de los semiconductores o en la industria farmacéutica.
- 55 15. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que el método es para la producción de agua pura a partir de una fuente de agua cruda útil en la industria del agua municipal, la industria química, la industria del agua potable, la industria alimenticia, la industria electrónica, la industria del petróleo y gas, la industria de refinerías, la industria de pulpa y papel, la industria metalúrgica, la industria minera, o la industria de energía.
- 60 16. Dispositivo de filtración de agua para extraer y recuperar agua de fluidos corporales, tales como orina, leche y sudor/transpiración, que comprende una membrana de agua, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende canales de agua de acuaporina funcionales.
- 65 17. Dispositivo unitario de filtración de agua, que comprende una membrana de agua, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho dispositivo comprende un apilamiento de múltiples capas de matrices 2D individuales formadas por una serie de vesículas que se hunden sobre una bicapa soportada y en el que dichas vesículas se reconstituyen con una acuaporina apropiada.
18. Malla de filtración de agua, que comprende el dispositivo unitario según la reivindicación 17, en la que el dispositivo unitario apilado se ha incorporado en una membrana estabilizante o una matriz polimérica estabilizante.

19. Malla de filtración de agua, según la reivindicación 18, en la que dichas unidades individuales se han cosido posteriormente a través de un proceso de autoensamblaje.

Bicapa de lípidos soportada con moléculas de acuaporina incorporadas



SopORTE poroso de bicapa de lípidos, como mica, muscovita, cinta de mica, polisulfona, AlO₂, celulosa u otro soporte con superficie hidrofílica.



Membrana de bicapa de lípidos plana con acuaporinas incorporadas.



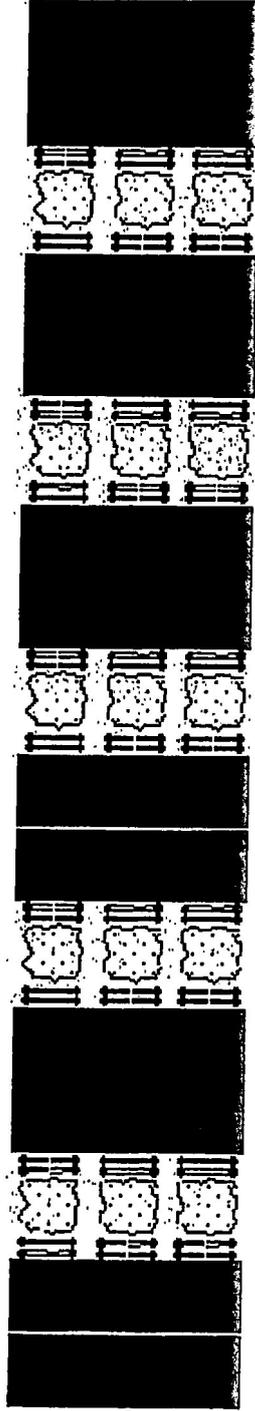
Molécula de acuaporina.



Molécula fosfolípida u otra molécula de lípidos anfifílica

Fig. 1

Moléculas de acuaporina incorporadas en material de membrana nanoporosa



Material de membrana nanoporoso



Membrana bicapa de lípidos plana con acuaporinas incorporadas



Molécula de acuaporina



Molécula de fosfolípidos u otra molécula de lípidos anfífilica

Fig. 2

Membrana bicapa de lípidos formada alrededor de película de teflón con moléculas de acuaporina

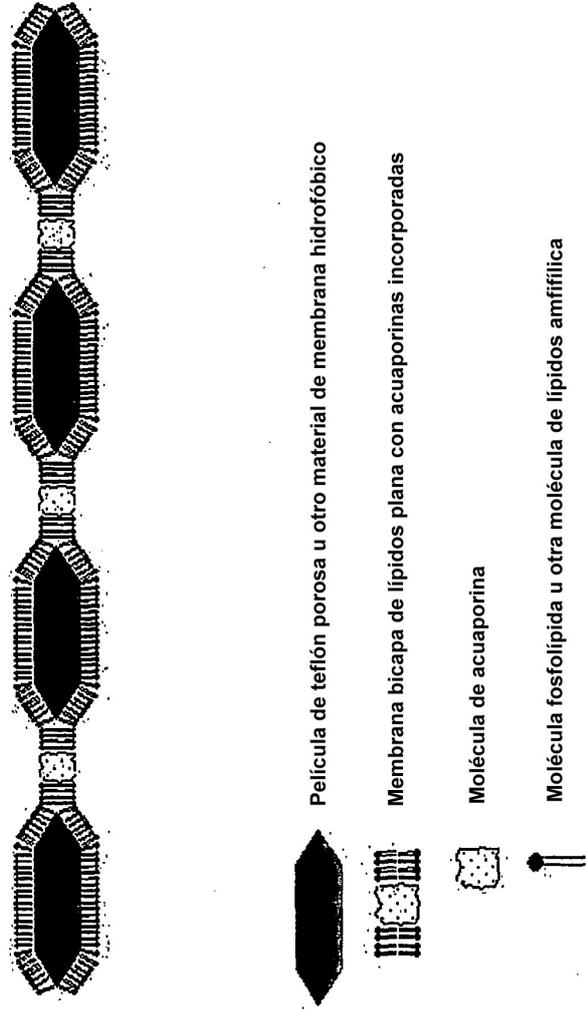
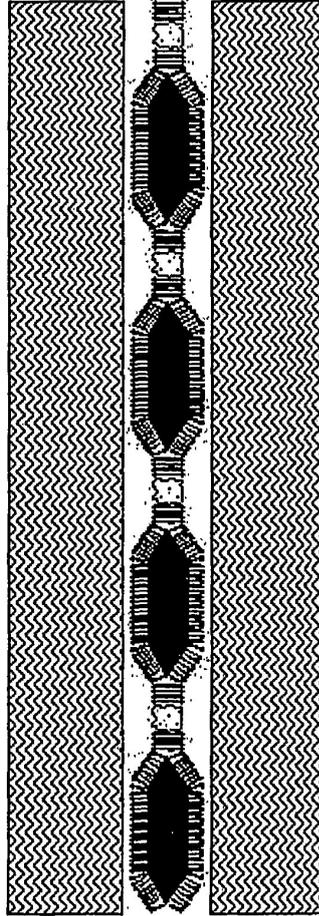


Fig. 3

Membrana bicapa de lípidos formada alrededor de película de teflón con moléculas de acuaporina



Soporte poroso de bicapa de lípidos, como mica, muscovita, cinta de mica, polisulfona, AlO₂, celulosa u otro soporte con superficie hidrofílica



Película de teflón porosa u otro material de membrana hidrofóbico



Membrana bicapa de lípidos plana con acuaporinas incorporadas



Molécula de acuaporina



Molécula de fosfolípidos u otra molécula de lípidos anfifílica

Fig. 4

Bicapa de lípidos soportada encapsulada con moléculas de acuaporina incorporadas

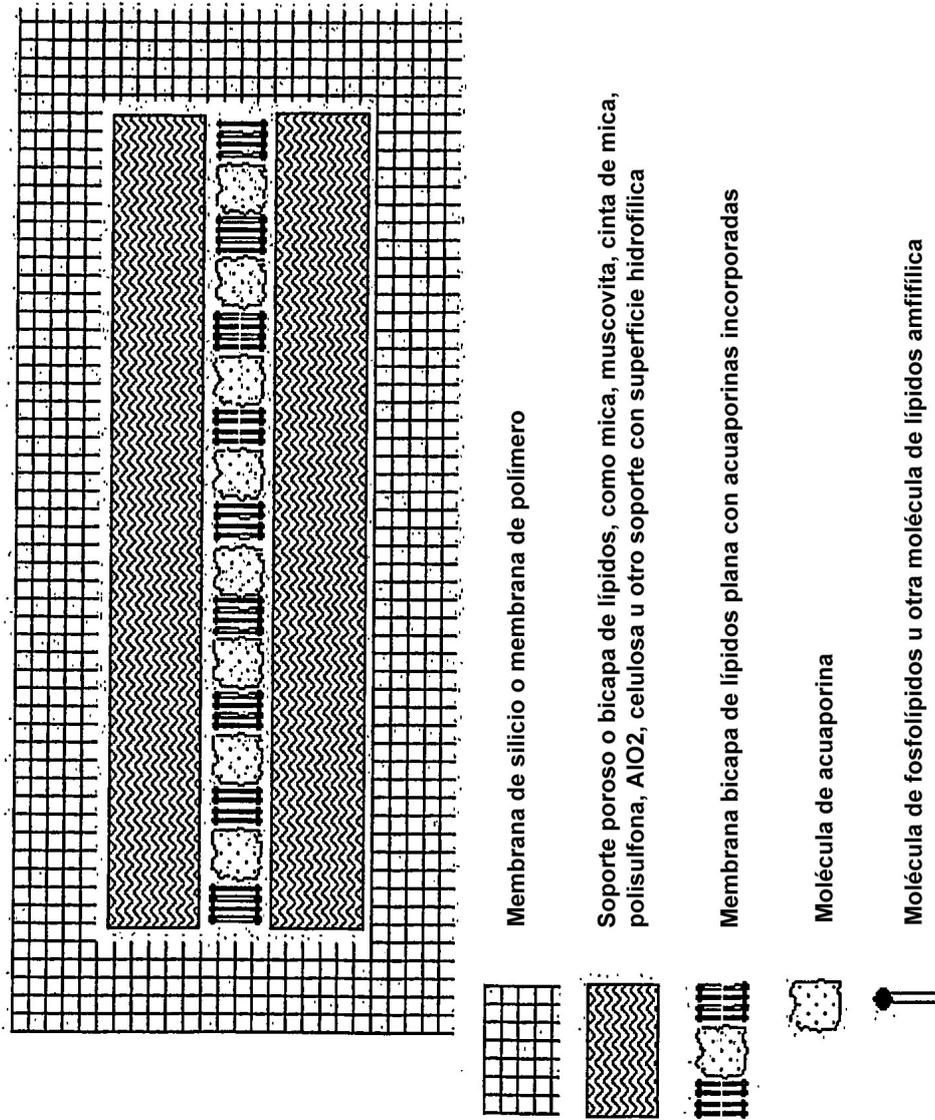


Fig. 5

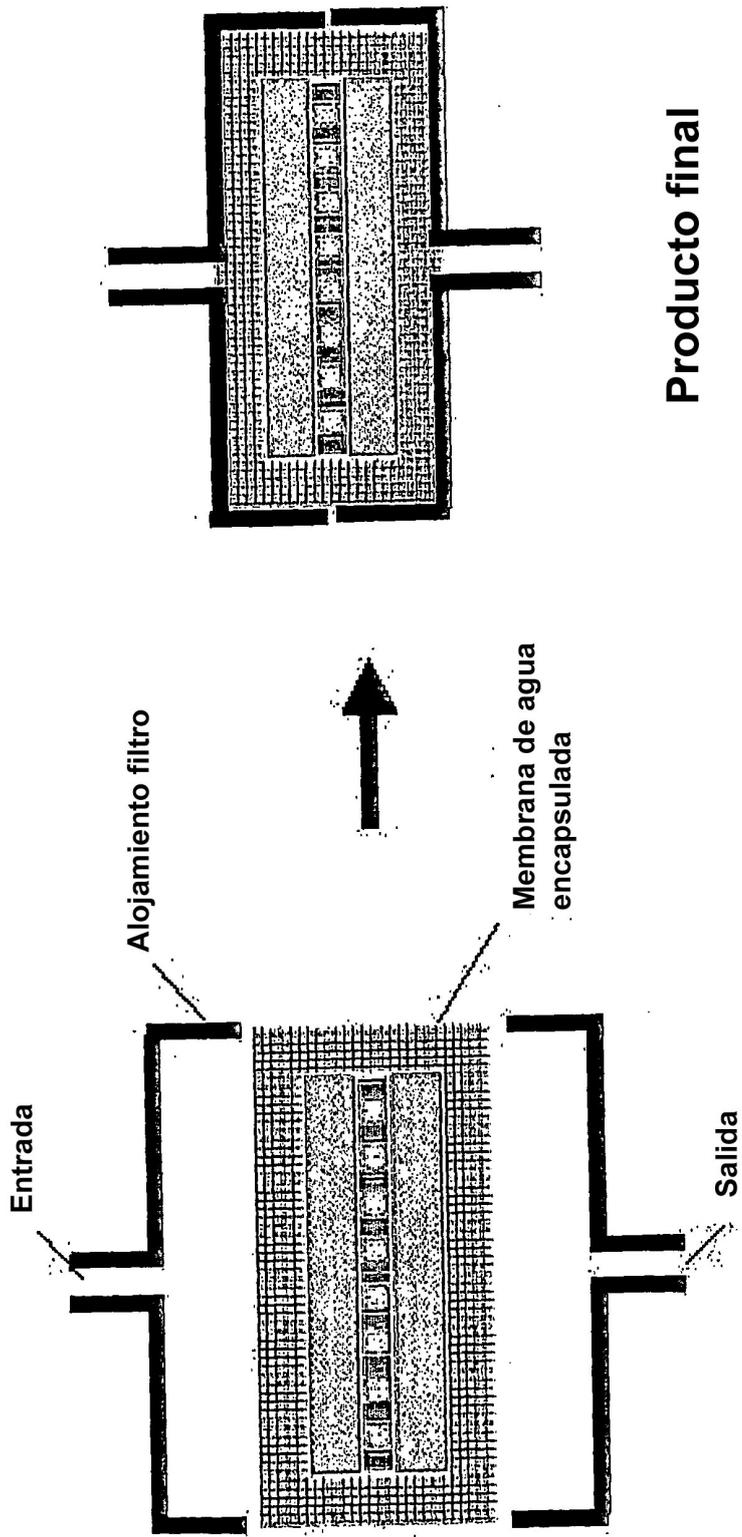


Fig. 6

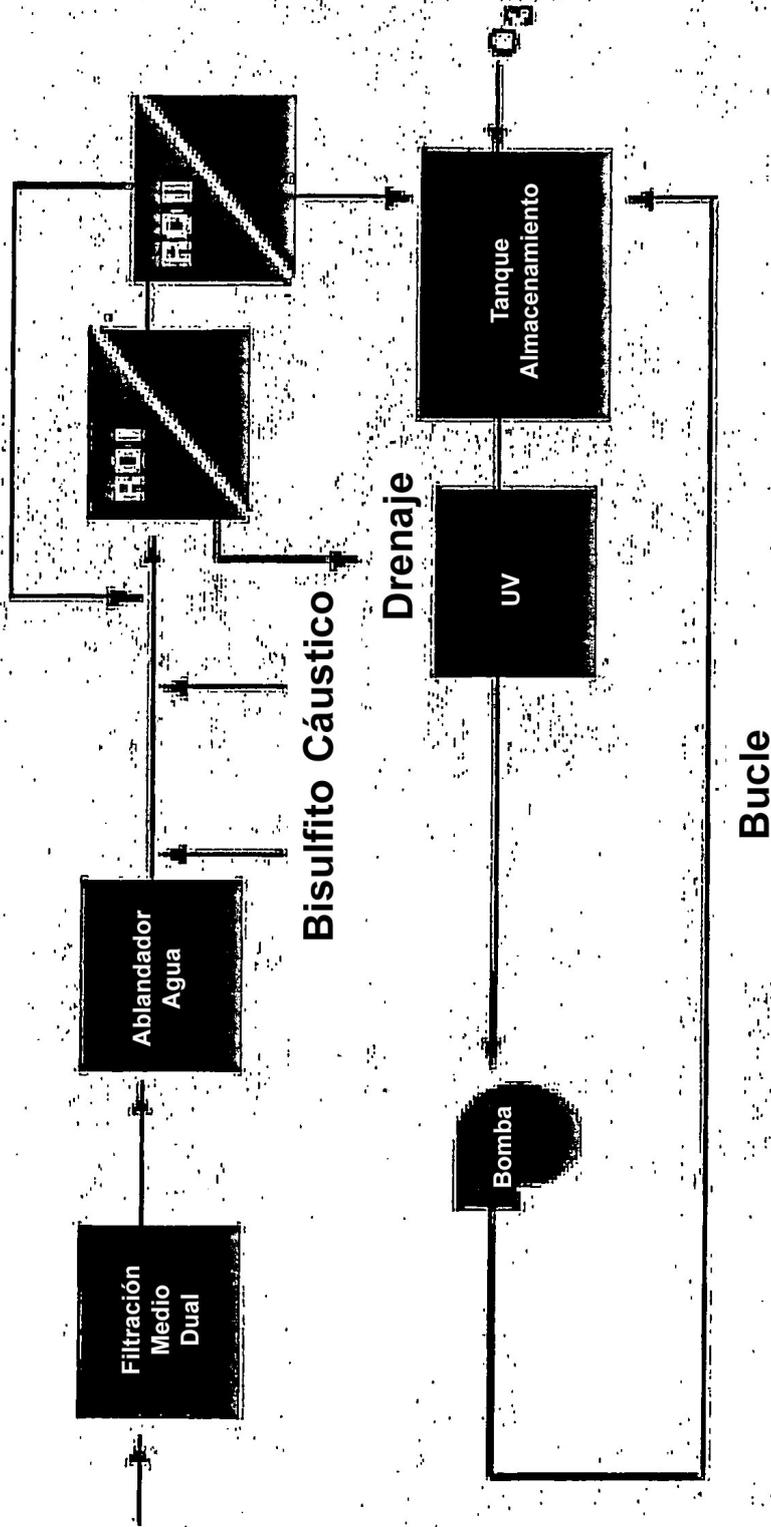


Fig. 7

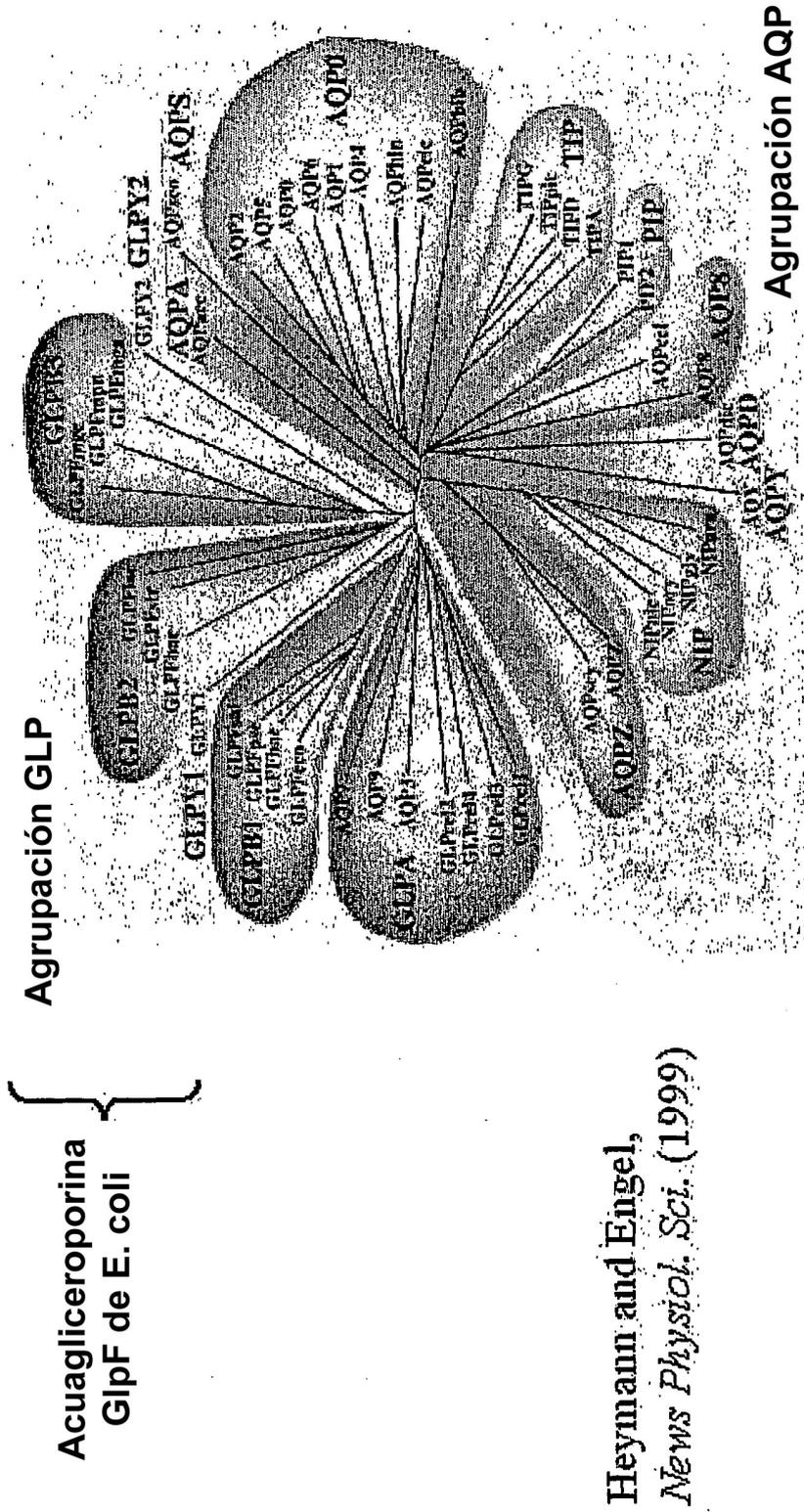
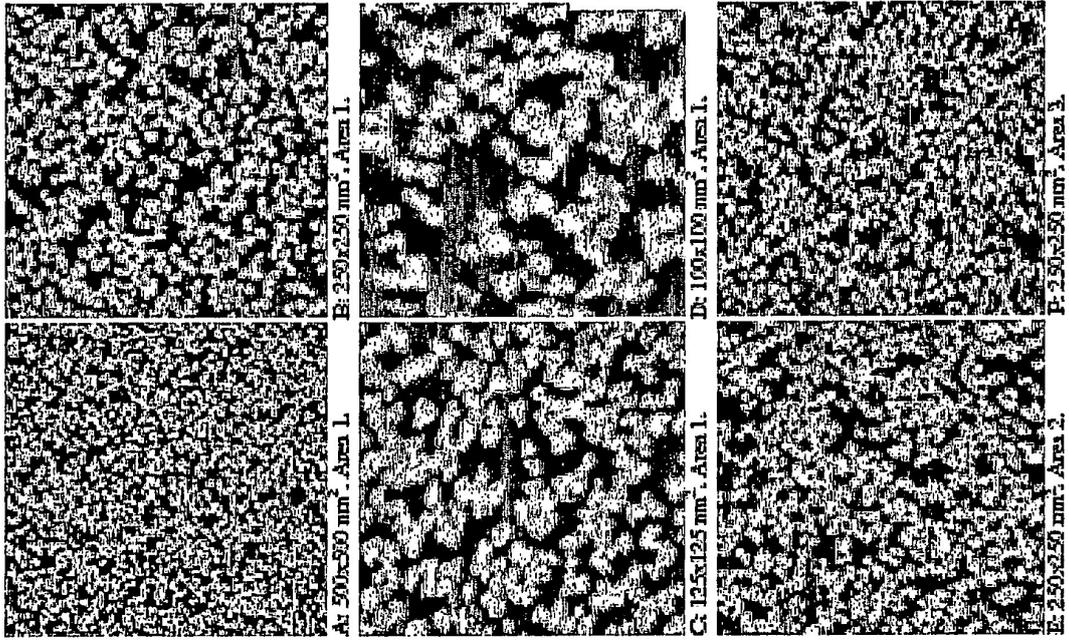


Fig. 8

Fig. 9



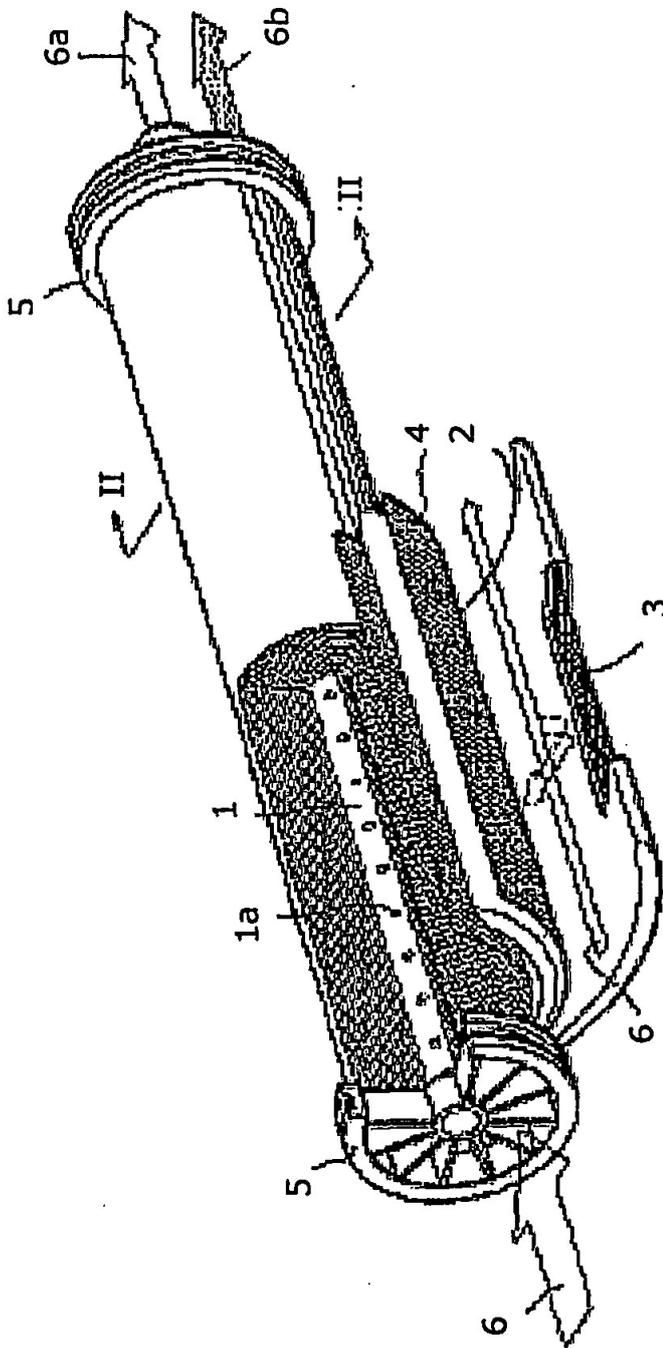


Fig. 10

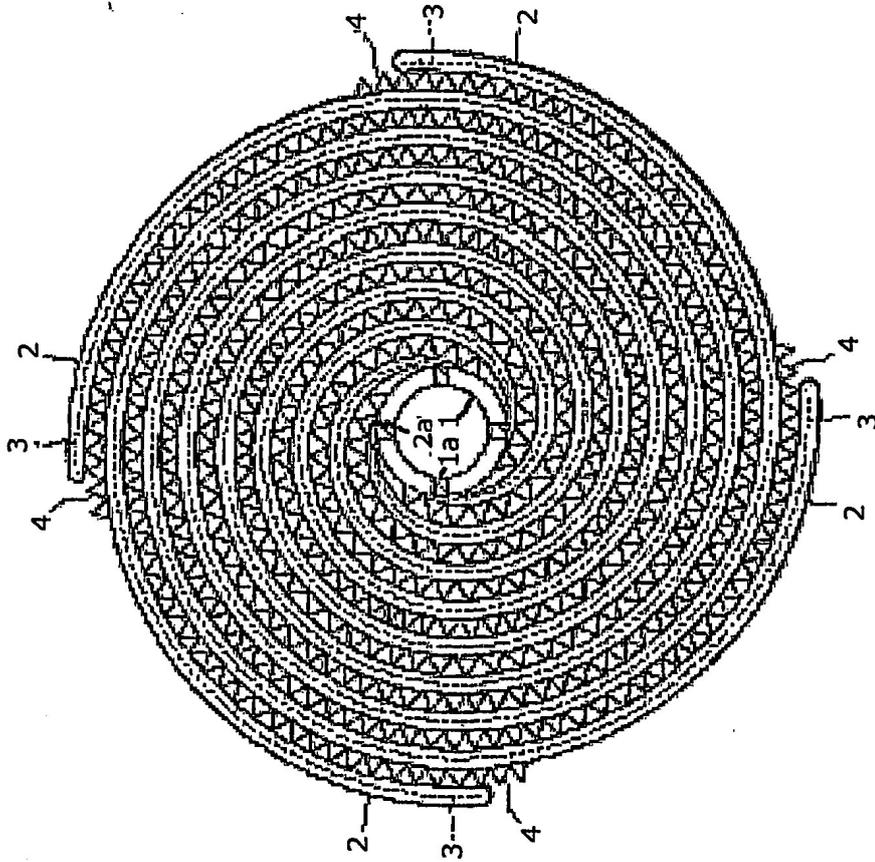


Fig. 11

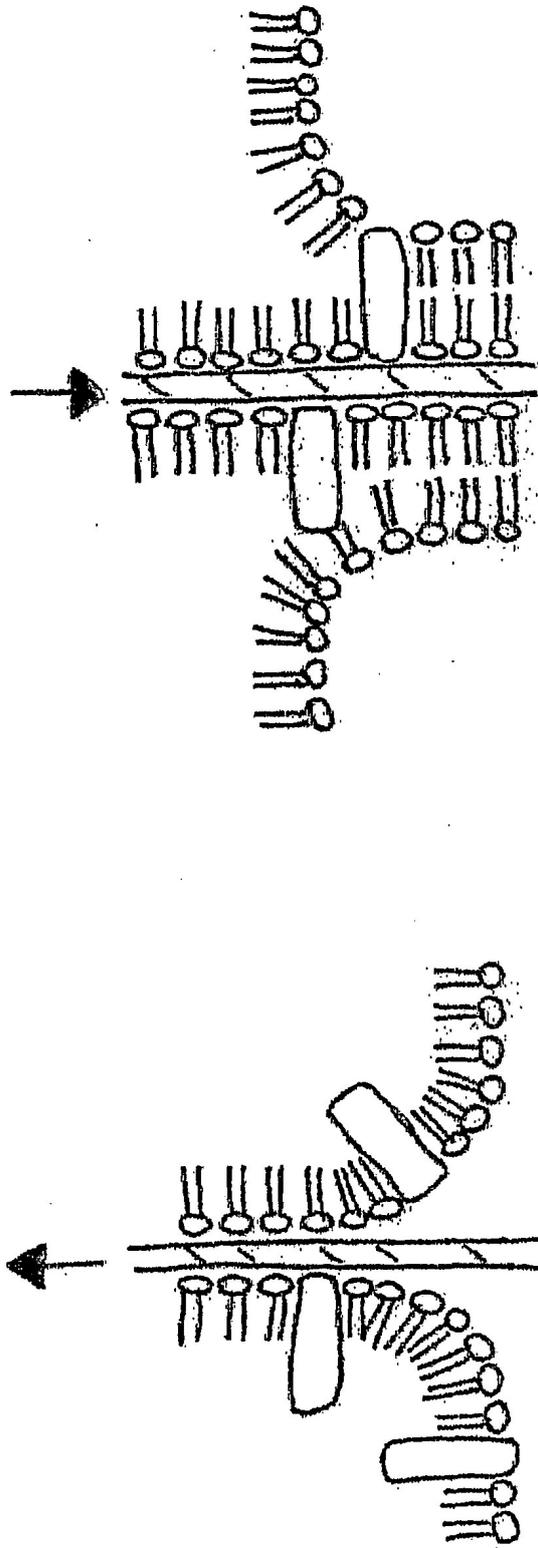


Fig. 12

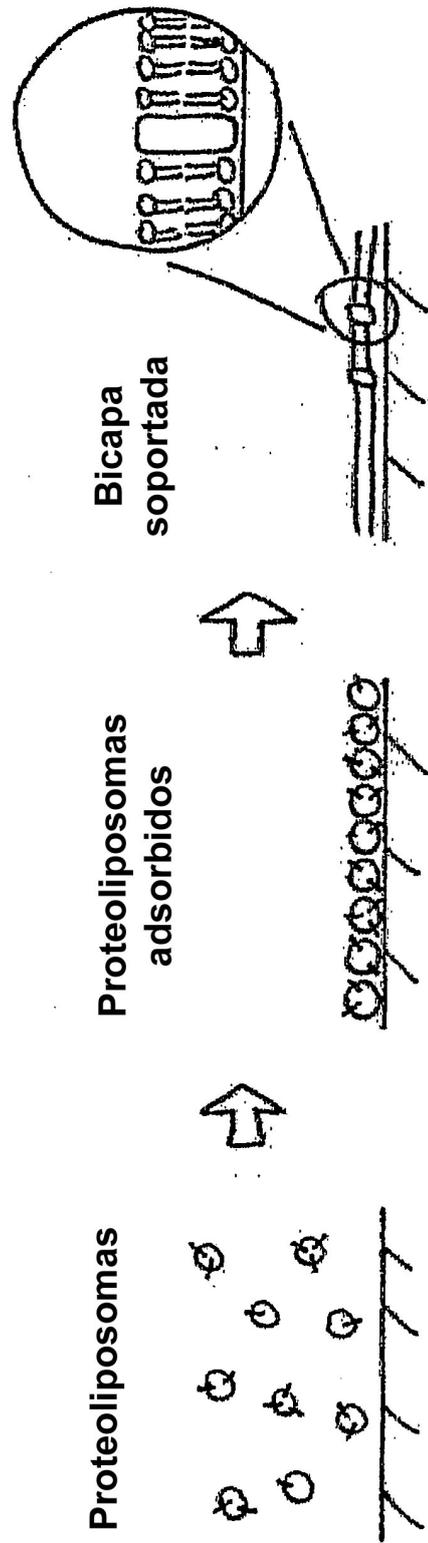


Fig. 13

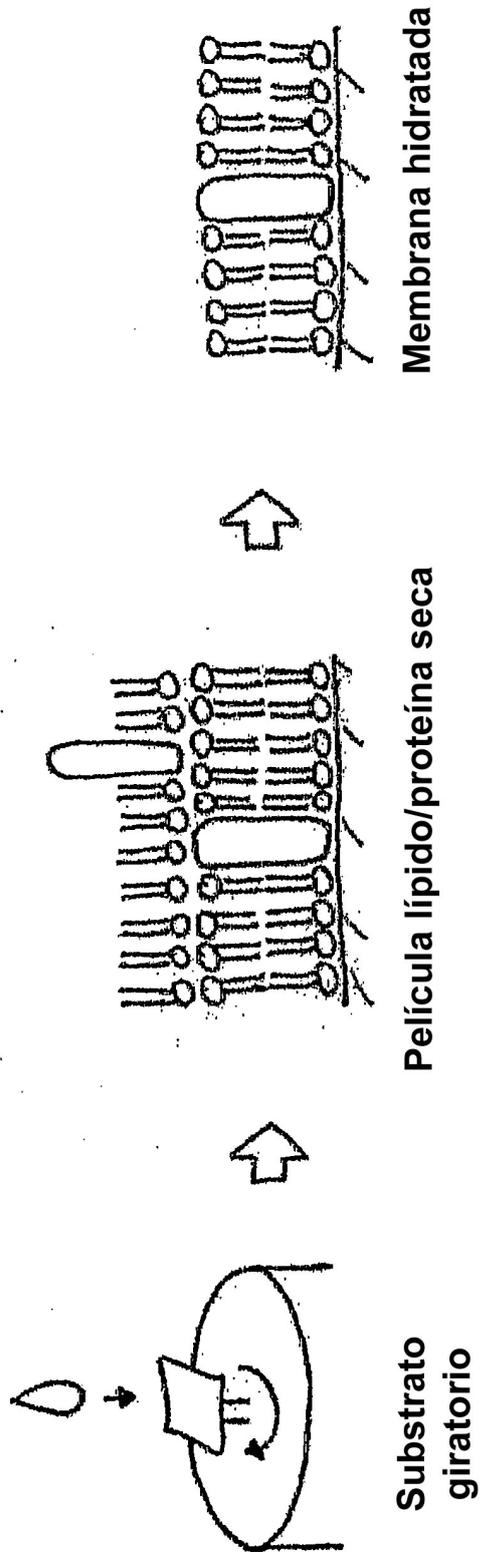


Fig. 14