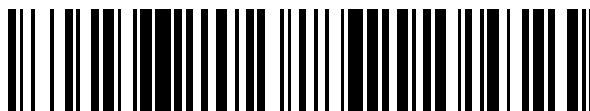


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 096**

51 Int. Cl.:

B01D 67/00 (2006.01)

B01D 69/12 (2006.01)

B01D 69/14 (2006.01)

B01D 71/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2014 PCT/IB2014/058096**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108827**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2014 E 14700945 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2943270**

54 Título: **Un módulo de fibras huecas con membrana compuesta de película delgada modificada con acuaporina**

30 Prioridad:

11.01.2013 GB 201300465

15.11.2013 DK 201300650

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

08.08.2018

73 Titular/es:

**AQUAPORIN A/S (100.0%)
Nymøllevej 78
2800 Kongens Lyngby, DK**

72 Inventor/es:

**VOGEL, JÖRG;
GROTH, JESPER S;
NIELSEN, KENT HØIER y
GESCHKE, OLIVER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 678 096 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

Un módulo de fibras huecas con membrana compuesta de película delgada modificada con acuaporina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un módulo de fibras huecas (HF) con membrana compuesta de película delgada (TFC) de fibras modificadas, tal como con una capa TFC de poliamida en la parte externa o interna de las fibras, o sobre ambos lados, y que comprende canales de agua de acuaporina en dicha capa TFC. La presente invención se refiere, además, a una membrana de fibras huecas que tiene una capa de separación modificada compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, tal como con una capa TFC de poliamida en la parte externa o interna de las fibras y a un método para preparar dicha modificación de TFC directamente sobre las fibras a medida que se montan en el módulo y donde dicha capa TFC comprende canales de agua de acuaporina inmovilizados o embebidos en dicha capa.

15 Antecedentes de la invención

Recientemente, se ha demostrado cómo pueden prepararse membranas de fibras huecas compuestas de película delgada para la ósmosis directa (Sukitpaneent y Chung 2012) mediante polimerización interfacial que crea una capa delgada de poliamida sobre la superficie interna de las membranas de soporte de fibra hueca PES donde una solución acuosa de meta-fenileno diamina (MPD) al 2 % en peso que contiene 0.5 % en peso de trietilamina y 0.1 % en peso de dodecil sulfato de sodio se introduce mediante bombeo desde una entrada inferior hacia un módulo de HF ubicado verticalmente seguido por un secado al aire y después la introducción de 0.15 % en peso de cloruro de trimesoilo (TMC) en solución de hexano para formar la película delgada de poliamida y finalmente purgar con aire y curar a 65 °C, enjuagar con agua desionizada y almacenar en agua desionizada. Además, Peinemann y otros describen un método para preparar una capa TFC similar sobre la superficie interna de una fibra hueca, cf. solicitud de patente de Estados Unidos publicada núm. 2007/0199892. Zhao, Yang y otros (2012) describen la síntesis de membranas biomiméticas basadas en acuaporina mediante polimerización interfacial y la incorporación de acuaporina en proteoliposomas. Además, Zhong y otros (2013) describen el desarrollo de membranas de fibras huecas TFC de ósmosis directa mediante el uso de polifenilensulfona sulfonada directa como sustrato de la membrana. Sin embargo, para una gran variedad de aplicaciones de separación donde se emplean módulos de fibra hueca es importante ser capaz de separar o filtrar solutos orgánicos de peso molecular relativamente bajo durante el proceso de filtración. Por ejemplo, en hemodiálisis donde los módulos de HF se usan ampliamente, una toxina urémica y un producto de degradación orgánico, tal como indoxil sulfato (sal de potasio de indoxil sulfato, número CAS 2642-37-7, peso molecular 251.30) posee un problema particularmente difícil. El indoxil sulfato se acumula en el suero de pacientes con enfermedades crónicas del riñón. Una parte del triptófano derivado de las proteínas del adieta se metaboliza a indol mediante la triptofanasa en las bacterias intestinales. El indol es absorbido hacia la sangre desde el intestino, y se metaboliza a indoxil sulfato en el hígado. El indoxil sulfato se excreta normalmente por la orina. En pacientes con hemodiálisis, sin embargo, una eliminación renal inadecuada del indoxil sulfato conduce a sus niveles elevados en suero, cf. Niwa T. (2010). Niwa y otros (1997) han planteado la hipótesis que la acumulación de indoxil sulfato acelera la esclerosis glomerular y la progresión de una enfermedad renal. La administración de un adsorbente oral disminuye los niveles de indoxil sulfato en pacientes urémicos no dializados, cf Niwa y otros (1997). Los métodos actuales de diálisis, es decir hemodiálisis y diálisis peritoneal, este último caracterizado por ultrafiltración continua y eliminación de solutos, no eliminan de manera suficiente algunos productos de degradación de bajo peso molecular del suero, tal como indoxil sulfato y *p*-cresol (4-metilfenol, CAS núm. 106-44-5, peso molecular 108.13). Además, pequeñas moléculas solubles en agua, como urea, ácido úrico y creatinina, y péptidos/proteínas, como β 2-microglobulina deben eliminarse preferentemente durante la diálisis. Se ha encontrado una asociación directa entre *p*-cresol, que refleja principalmente el *p*-cresil sulfato, y la mortalidad en general y la enfermedad cardiovascular en la enfermedad renal en etapa terminal y en la enfermedad crónica del riñón. De manera similar, se han reportado asociaciones directas entre el indoxil sulfato y la mortalidad en general y la enfermedad cardiovascular. En la terapia de hemofiltración continua debe reducirse al mínimo la pérdida de proteínas fisiológicas (vitales), y debe optimizarse la eliminación de péptidos y toxinas urémicas de peso molecular bajo (< 500 Da) y medio (de aproximadamente 500 a aproximadamente 40 kDa), cf. Wenhao Xie (2011).

Aoike (2011) menciona las características o los parámetros de calidad más importantes para el uso de membranas de alto rendimiento en las terapias de hemopurificación, es decir, alta permeabilidad al agua, capacidad para eliminar una amplia variedad de toxinas urémicas y otras características distintivas. Sin embargo, Aoike señala además que el gran tamaño de los poros de las membranas de alto rendimiento (HPM) existentes probablemente permitirá que la sangre se contamine por el líquido de diálisis, porque las HPM, tal como las membranas de poliacrilonitrilo (PAN), que tienen un gran tamaño de los poros permiten una difusión rápida adversa de fragmentos de las endotoxinas dializadas de regreso al compartimento de la sangre.

En consecuencia, en la técnica persiste el problema de proporcionar módulos de fibras huecas que sean capaces de separar los compuestos de bajo peso molecular, lo que permite su eliminación de los líquidos en procesos como la hemodiálisis y en los cuales el módulo de fibras huecas combina una alta permeabilidad al agua con tamaños de poros más pequeños.

65 Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona una membrana de fibras huecas de acuerdo con la reivindicación 1, un método para fabricar un módulo de membranas de fibras huecas de acuerdo con la reivindicación 8 y el uso de un módulo de este tipo de acuerdo con la reivindicación 12.

5 En la presente se describe un módulo de fibras huecas que es capaz de separar compuestos de bajo peso molecular, por ejemplo, que permite que el módulo de HF concentre compuestos orgánicos, que incluyen urea, indoxil sulfato, p-cresol y/o p-cresil sulfato y preferentemente compuestos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 500 Da y por lo tanto permite una eliminación mejorada de dichos compuestos, por ejemplo, de un líquido. Alternativa o
10 adicionalmente, la presente invención se dirige a proporcionar un módulo de fibras huecas que tiene alta permeabilidad al agua, pero con tamaños de poros más pequeños, tal como con un diámetro de poro de menos de aproximadamente 5 a 10 nm, cf. Clark y Gao (2002). La reivindicación 1 se refiere a una membrana de fibras huecas (HF) que tiene fibras modificadas con una capa compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, en donde la capa TFC es una capa de poliamida proporcionada sobre una superficie de las fibras, los canales de agua de acuaporina se incorporan en vesículas antes de la incorporación en la capa TFC, y en donde dichas vesículas en las que se incorporan los canales de agua de acuaporina son polimersomas. Algunas modalidades se relacionan con un módulo de fibras huecas que comprende membranas de fibras huecas como se describió anteriormente, sellado en un alojamiento. La reivindicación 8 proporciona un método para preparar un módulo de fibras huecas que comprende membranas de HF modificadas con una capa compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, dicho método comprende las etapas de:

20 a) obtener una suspensión de vesículas de acuaporina, en donde dichas vesículas son proteopolimersomas que tienen una relación de polímero con respecto a proteína (POPR) de 25 a 500 de la proteína calculada sobre una base molar,
b) preparar una solución acuosa de una di- o triamina,
c) disolver un haluro de di- o triacilo en un disolvente orgánico apolar,
25 d) preparar una mezcla de amina y vesículas de acuaporina mediante la disolución/mezcla de la preparación de vesículas de la etapa a) con la solución de la etapa b),
e) bombear la mezcla de la etapa d) a través del lumen de las fibras huecas en un módulo de fibras huecas mediante el uso de su entrada de extremo,
f) retirar el exceso de la solución acuosa mediante una purga con gas del lado del lumen de las fibras mediante el uso de
30 una entrada del módulo,
g) inyectar la solución de haluro de acilo de la etapa c) en el módulo a través del lumen de las fibras huecas para permitir que ocurra una reacción de polimerización interfacial, y
h) enjuagar el módulo con un disolvente acuoso mediante inyección a través de una entrada del módulo.

35 Algunas modalidades se relacionan con un método que comprende las etapas de

a) obtener una suspensión de vesículas de acuaporina, en donde dichas vesículas son proteopolimersomas que tienen una relación de polímero con respecto a proteína (POPR) de 25 a 500 de la proteína calculada sobre una base molar,
b) preparar una solución acuosa de 1,3-diaminobenceno de concentración de 1 % a 5 % (p/p),
40 c) disolver cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo en un disolvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en hexano, heptano, octano o una mezcla de disolventes para obtener una concentración de 0,5 % a 1 % (p/v),
d) preparar una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas de acuaporina mediante la disolución/mezcla de la preparación de vesículas de la etapa a) con la solución de la etapa b),
e) bombear la mezcla de la etapa d) a través del lumen de las fibras huecas en un módulo de fibras huecas mediante el
45 uso de su entrada de extremo,
f) retirar el exceso de la solución acuosa mediante una purga con gas del lado del lumen de las fibras mediante el uso de una entrada del módulo,
g) inyectar la solución de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo de la etapa c) en el módulo a través del lumen de las fibras huecas para permitir que ocurra una reacción de polimerización interfacial, y
50 h) enjuagar el módulo con un disolvente acuoso mediante inyección a través de una entrada del módulo.

En otro aspecto, se describe un método de recubrimiento externo de una membrana de fibras huecas con una capa compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, dicho método comprende las etapas de:

55 a) obtener una suspensión de vesículas de acuaporina (proteoliposomas o proteopolimersomas),
b) preparar una solución acuosa de una di- o triamina,
c) disolver un haluro de di- o triacilo en un disolvente orgánico apolar,
d) preparar una mezcla de amina y vesículas de acuaporina mediante la disolución/mezcla de la preparación de vesículas de la etapa a) con la solución de la etapa b),
60 e) pasar la membrana de fibras huecas a través de la mezcla de la etapa d),
f) retirar el exceso de la solución acuosa,
g) pasar la membrana de fibras huecas a través de la solución de haluro de acilo de la etapa c) para permitir que ocurra una reacción de polimerización interfacial, y
65 h) enjuagar la membrana de fibras huecas con un disolvente acuoso, por ejemplo, al hacer pasar la fibra hueca a través de un baño de agua.

En la presente se describe el uso de un módulo de fibras huecas (HF) como se describe en la presente para la extracción de agua pura mediante ósmosis directa.

5 En otro aspecto, la membrana de fibras huecas de la presente invención puede usarse en un método para extraer agua a partir de un líquido acuoso que comprende las siguientes etapas:

10 a) colocar un módulo de fibras huecas (HF) como se describe en la presente en conexión controlada con un primer líquido acuoso (solución de alimentación) que tiene una presión osmótica que es menor o igual que la de la matriz de membrana líquida, y que además está en conexión controlada con un segundo líquido acuoso (solución de extracción) que tiene una presión osmótica que es mayor que la de la matriz para crear un potencial de presión osmótica entre dicho primer y dicho segundo líquido,

b) permitir que la matriz absorba agua pura de dicho primer líquido y medie un flujo de agua pura hacia dicho segundo líquido mientras exista un gradiente de presión osmótica,

15 c) opcionalmente separar el agua pura extraída de dicho segundo líquido.

Ahora se describirán modalidades de la presente invención a modo de ejemplo y no de limitación, con referencia a las figuras adjuntas.

20 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra una fotografía y un dibujo de un módulo de HF que tiene 9 fibras huecas, dos entradas/salidas de extremos (1, 2) y dos entradas/salidas laterales (3, 4) así como cuatro tapas de extremos (5) para sellar dichas entradas/salidas. Longitud total del módulo: 100 mm; diámetro en las fibras: 10 mm; diámetro en el sello: 130 mm.

25 La figura 1B muestra como una fotografía y un dibujo de un módulo de HF que tiene 984 fibras, dos entradas/salidas de extremos (1, 2) y dos entradas/salidas laterales (3, 4). Longitud total: 25 cm, diámetro de las fibras de 700 µm.

La figura 2 muestra como una fotografía y un dibujo de una sección transversal de parte de una fibra hueca, UltraPES™, que tiene un espesor de pared de aproximadamente 220 µm ± 15 µm, un diámetro interno de aproximadamente 760 µm ± 30 µm, un valor de corte de peso molecular (MWCO, dextrano, 90 %, 0 bar) de 65 kD ± 20 kD, y un flujo de agua transmembrana de ≥ 0,65 ml/[min x cm² x bar] a 25 °C. Imagen obtenida de Membrana GmbH.

30 La figura 3 muestra un esbozo del principio de la microestructura de la capa compuesta de película delgada formada sobre una fibra hueca de la invención, cf. Ejemplo 1 más adelante.

La figura 4 muestra un esbozo del principio de un proceso para el recubrimiento externo continuo y automatizado de fibras huecas.

35 Descripción detallada

Más específicamente, algunas modalidades se relacionan con un módulo de HF que tiene fibras de polietersulfona (PES) o fibras de otro material de soporte poroso adecuado, tal como polisulfona, polifenilén sulfona, poliéter imida, polivinilpirrolidona y poliacrilonitrilo, que incluyen combinaciones y mezclas de estos, que se han modificado mediante la formación de una capa compuesta de película delgada, por ejemplo, mediante polimerización interfacial. Además, pueden usarse diversos materiales de dopaje cuando se producen los materiales de soporte de fibra hueca, cf. por ejemplo Qian Yang y otros (2009). Dichos módulos de HF se usan comúnmente en aplicaciones de alimentos y bebidas como el filtrado de cerveza y vino, pero además en algunas aplicaciones para agua y aguas residuales que incluyen la reutilización de aguas residuales y el reciclaje de aguas mezcladas. Por ejemplo, la compañía alemana Membrana proporciona un módulo de fibras huecas que contiene varios miles de fibras con un área superficial total de 75 metros cuadrados por módulo. En aplicaciones médicas de diálisis comúnmente se usan módulos más pequeños con típicamente 1-2 metros cuadrados y alrededor de 8,000 a 20,000 fibras (Fresenius Medical Care, Gambro). En principio, todos estos productos comerciales pueden recubrirse a través de una polimerización interfacial mediante el uso del método de la invención que resulta en una capa compuesta de película delgada en donde se incorporan canales de agua de acuaporina, preferentemente durante su formación, tal como mediante la adición de una suspensión o solución de proteínas adecuadas, preferentemente en forma de vesículas, a la solución de amina reactiva acuosa, por ejemplo una solución de meta-fenileno diamina, y el bombeo o inyección de la solución combinada a través de las fibras de soporte, la retirada del exceso de la solución y posteriormente el bombeo o inyección de un cloruro de acilo reactivo en disolvente orgánico, por ejemplo cloruro de trimesoilo en hexano, y finalmente el enjuague con agua desionizada, por ejemplo agua MilliQ™. El material de alojamiento de los módulos de HF de la invención puede ser cualquier material adecuado usado comúnmente para módulos de HF, como polipropileno, polietileno, PVDF y acero inoxidable. Las fibras pueden sellarse en el alojamiento del módulo de HF mediante el uso de materiales adhesivos epóxicos conocidos comúnmente y similares. Otros ejemplos de módulos de HF que pueden modificarse con TFC de acuerdo con la invención se encuentran en los sitios web de productores de membranas, tales como:

60 <http://www.membranafiltration.com/filtration-modules/documentation.cfm>

http://www.kochmembrane.com/PDFs/KMS_Puron_Hollow_Fiber_PSH300_PSH600_PSH1800_Modul.aspx

<http://www.kochmembrane.com/Membrane-Products/Hollow-Fiber/Ultrafiltration/PURON-Series.aspx>

65 <http://www.daicen.co.jp/english/membrane/kogata.html>

<http://www.spectrumlabs.com/filtration/hfmods.html>

<http://www.microdyn-nadir.com/en/Products/>

En una modalidad de la presente invención, el módulo de HF funciona con flujo contracorriente de las soluciones de extracción y alimentación. En otra modalidad de la presente invención el módulo de HF funciona con flujo en paralelo de las soluciones de extracción y alimentación. En otra modalidad de la invención el módulo de HF funciona con la solución de extracción contra la capa TFC. Aún en otra modalidad de la invención el módulo de HF funciona con la solución de alimentación contra la capa TFC. Además, las fibras huecas modificadas de la invención pueden montarse en un sistema o módulo para usar como un biorreactor de membrana (MBR), donde el módulo MBR que contiene las fibras huecas se sumerge en un líquido acuoso y donde el agua purificada se elimina de dicho líquido a través de las fibras mediante el uso de una solución de extracción o mediante la aplicación de una presión de succión moderada.

Un aspecto adicional de la descripción se refiere a un método para fabricar una membrana de fibras huecas modificada con una capa compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, donde la capa TFC que comprende canales de agua de acuaporina se prepara directamente sobre la superficie de las fibras de membrana montadas y selladas en un módulo de HF, dicho método comprende las etapas de:

- a) obtener una suspensión de vesículas de acuaporina (proteopolimersomas) con una POPR de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 (relación basada en el contenido en moles) (preferentemente POPR de 100 para un copolímero dibloque, POPR de 50 para un copolímero tribloque) de proteína,
- b) preparar una solución acuosa de una diamina, tal como 1,3-diaminobenceno, para obtener una solución de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 %, tal como una concentración de aproximadamente 2,5 a 4,2 % (p/p),
- c) disolver un cloruro de acilo, tal como cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo en un disolvente hidrocarburo, tal como hexano, heptano, octano, nonano con una cadena de hidrocarburo recta o ramificada o mezclas de estos, tal como un disolvente hidrocarburo de isoalcano para obtener una concentración de aproximadamente 0.05 % a aproximadamente 1 %, tal como aproximadamente 0,15 % (p/v),
- d) preparar una mezcla de diamina /vesículas de acuaporina, tal como una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas de acuaporina mediante la disolución/mezcla de la preparación de vesículas de la etapa a) con la solución de la etapa b),
- e) bombear la mezcla de la etapa d) a través del lumen de las fibras huecas en un módulo de fibras huecas mediante el uso de su entrada de extremo,
- f) retirar el exceso de diamina mediante una purga con gas del lado del lumen de las fibras con el uso de una entrada del módulo,
- g) inyectar la solución de cloruro de acilo de la etapa c) en el módulo a través de una entrada para permitir que ocurra una reacción de polimerización interfacial, y
- h) enjuagar el módulo con un disolvente acuoso mediante inyección a través de una entrada del módulo.

Opcionalmente, después de llenar con agua el módulo se sella con tapas herméticas para prevenir que se seque.

Un aspecto adicional descrito en la presente se refiere a un método para recubrir la parte externa de una membrana de fibras huecas con una capa compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, dicho método comprende las etapas de:

- a) obtener una suspensión de vesículas de acuaporina (proteoliposomas o proteopolimersomas),
- b) preparar una solución acuosa de una di- o triamina,
- c) disolver un haluro de di- o triacilo en un disolvente orgánico apolar,
- d) preparar una mezcla de amina y vesículas de acuaporina mediante la disolución/mezcla de la preparación de vesículas de la etapa a) con la solución de la etapa b),
- e) pasar la membrana de fibras huecas a través de la mezcla de la etapa d),
- f) retirar el exceso de la solución acuosa,
- g) pasar la membrana de fibras huecas a través de la solución de haluro de acilo de la etapa c) para permitir que ocurra una reacción de polimerización interfacial, y
- h) enjuagar la membrana de fibras huecas con un disolvente acuoso, por ejemplo, al hacer pasar la fibra hueca a través de un baño de agua.

En los métodos descritos anteriormente para recubrir la membrana de fibras huecas y preparar el módulo de fibras huecas, las etapas a)-c) pueden realizarse en cualquier orden conveniente. Además, la etapa c) puede realizarse antes o después de la etapa d).

En modalidades ilustrativas, dichos polimersomas pueden comprender copolímeros tribloque del tipo hidrófilo-hidrófobo-hidrófilo (A-B-A o A-B-C) o copolímeros dibloque del tipo hidrófilo-hidrófobo (A-B).

En otra modalidad dichos polimersomas pueden comprender una combinación de copolímeros tribloque del tipo hidrófilo-hidrófobo-hidrófilo y copolímeros dibloque del tipo hidrófilo-hidrófobo. En las combinaciones los copolímeros dibloque pueden comprender de aproximadamente 10 % en mol a aproximadamente 60 % en mol, tal como de aproximadamente 25 % en mol a aproximadamente 50 % en mol.

Dichos canales de agua de acuaporina son preferentemente canales AqpZ, pero, en principio, todas las acuaporinas selectivas al agua, por ejemplo, como acuaporina Z (AqpZ), Aqp1, GlpF o SoPIP2;1, son útiles en la invención.

5 Dicha capa TFC se forma preferentemente mediante polimerización interfacial de una solución acuosa de una amina con una solución de un cloruro de ácido en un disolvente orgánico, y en donde las vesículas con canales de agua de acuaporina se incorporan en dicha solución acuosa.

10 Dichos canales de agua de acuaporina se incorporan preferentemente en las vesículas antes de la incorporación en la capa TFC de la membrana de fibras huecas de la invención, y dichas vesículas pueden estar en la forma de polimersomas, donde dichos polimersomas comprenden copolímeros tribloque del tipo hidrófilo-hidrofobo-hidrófilo (A-B-A o A-B-C) o copolímeros dibloque del tipo hidrófilo-hidrofobo (A-B). En otra modalidad dichos polimersomas pueden comprender una combinación de copolímeros tribloque del tipo hidrófilo-hidrofobo-hidrófilo y copolímeros dibloque del tipo hidrófilo-hidrofobo.

15 La membrana de HF de la invención tiene preferentemente una capa TFC formada mediante polimerización interfacial de una solución acuosa de una amina con una solución de un cloruro de ácido en un disolvente orgánico, y en donde las vesículas con canales de agua de acuaporina se incorporan en dicha solución acuosa.

20 En una modalidad del método para preparar el módulo de HF de la invención las fibras se purgan con gas para evacuar el exceso de agua en la etapa f) y el módulo se mantiene al revés en la etapa f).

25 En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un módulo de fibras huecas con alta permeabilidad al agua y pequeños tamaños de poros, tal como con un diámetro de poro de menos de aproximadamente 5 a 10 nm, tal como igual o menor que aproximadamente 1 nm. La formación de una capa de separación en la forma de una capa de película delgada como se conoce en la técnica sobre la superficie de una fibra de la membrana de soporte da como resultado cambios en el mecanismo de transporte del agua. En lugar de que el transporte de agua tenga lugar mediante difusión normal a través de los poros de la membrana de soporte, otro tipo de transporte de agua tiene lugar a través de la capa de película delgada como se conoce para este tipo de membranas de ósmosis inversa, donde la permeabilidad de la membrana es limitada. La naturaleza no porosa de la capa de película delgada de separación da como resultado que el transporte de agua necesite una "difusión por saltos" como se describe en Kotelyanskii y otros 1998. Por lo tanto, la modificación de película delgada de las membranas para agua ha encontrado uso principalmente en ósmosis inversa, donde se necesita una presión hidrostática para forzar el agua a través de la membrana, y la ventaja obtenida yace en la separación mejorada de solutos no deseados en el agua que se va a filtrar. Estas membranas convencionales para ósmosis inversa tienen eficazmente capas no porosas de 100-200 nm de grosor soportadas por un material poroso. La permeabilidad del agua en estas membranas se produce como un proceso de difusión a través de la capa no porosa establecida por medio de la aparición y desaparición de espacios intersticiales. El módulo de HF de la presente invención puede mejorarse adicionalmente respecto de las membranas de ósmosis inversa de la materia anterior al tener canales de agua de acuaporina incorporados en la capa de película delgada lo que las convierte en una capa compuesta de película delgada (TFC). La incorporación de acuaporinas tiene el beneficio añadido de proporcionar un transporte selectivo de agua a través de sus poros que tienen un diámetro de solo 2,4 Å en su paso más estrecho (poro AqpZ, cf. Wang y otros 2005) donde tiene lugar un eficiente transporte de agua de una sola fila. El módulo de HF de la invención combina las ventajas de tener una capa de película delgada de separación junto con canales de agua de acuaporina lo que proporciona así una separación mejorada, así como flujo de agua a través de poros con tamaño en la escala de Angstrom lo que hace que el módulo de HF sea adecuado para ósmosis inversa, ósmosis directa, ósmosis directa asistida, nanofiltración, etcétera.

45 Definiciones

50 El término "membrana de fibras huecas" y "membrana de HF" como se usa en la presente se refiere a cualquier tipo de membrana capilar que puede usarse para propósitos de filtración de líquidos.

El término "polietersulfona" como se usa en la presente se refiere a un material de membrana usado en la fabricación de módulos de fibras huecas. Un ejemplo es el material de membrana UltraPES™ comercializado por Membrana GmbH. En la figura 2 se muestra una foto al microscopio de la sección transversal de una fibra UltraPes™, cf. Membrana GMBH.

55 "Acuaporina" como se usa en la presente se refiere a proteínas canales selectivas al agua, que incluyen AqpZ y SoPIP2;1 preparadas de acuerdo con los métodos descritos por Maria Karlsson y otros (FEBS Letters 537 (2003) 68-72) o como se describe en Jensen y otros US 2012/0080377 A1. "Asolectina" como se usa en la presente se refiere a una fracción de lecitina de soja [IV-S], que es un producto fosfolipídico altamente purificado que contiene lecitina, cefalina, inositol fosfátidos y aceite de soja (sinónimo: azolectina).

60 "Copolímero de bloque" como se usa en la presente se refiere a copolímeros di- y tribloque formadores de membranas o formadores de vesículas que tienen tanto bloques hidrofílicos (A o C) como hidrofóbicos (B); los copolímeros dibloque son del tipo A-B o C-B los cuales son capaces de formar bicapas y los copolímeros tribloque que son del tipo A-B-A o A-B-C forman monocapas mediante autoensamblaje, donde todos los de las membranas tienen la capa hidrofóbica en el medio.

Ejemplos de copolímeros dibloque útiles y ejemplos de copolímeros tribloque útiles son los siguientes:

Especies	Suministrador	Fórmula	n _(hidrofóbico)	n _(hidrofilico)
P7258	Polymer Source	EO ₄₈ DMS ₇₀	70	48
P5809	Polymer Source	EO ₁₅ BO ₁₆	15	16
P8365	Polymer Source	EO ₂₅ DMS ₈	8	25
P7259	Polymer Source	EO ₄₈ DMS ₁₄	14	48
P7261	Polymer Source	EO ₁₁₄ DMS ₁₄	14	114
P3691B	Polymer Source	MOXA ₆ DMS ₃₅ MOXA ₆	35	12
P8061	Polymer Source	MOXA ₁₅ DMS ₆₇ MOXA ₁₅	67	30
P9548	Polymer Source	MOXA ₁₅ DMS ₁₁₉ MOXA ₁₅	119	30

donde el bloque de EO-bloque de DMS, tal como EO₂₅DMS₈, representa poli(bloque de dimetilsiloxano-bloque de óxido de etileno),

El bloque de EO-bloque de BO, tal como EO₁₅BO₁₆, representa poli(bloque de óxido de butileno-bloque de óxido de etileno), y bloque de MOXA-bloque de DMS-bloque de MOXA, tal como MOXA₆DMS₃₅MOXA₆, representa poli(bloque de 2-metiloxazolina-bloque de dimetilsiloxano-2-metiloxazolina). Los copolímeros dibloque y tribloque pueden usarse como componentes únicos o como mezclas en la creación de membranas biomiméticas, tales como vesículas o membranas planas, para la incorporación de las acuaporinas que tienen propiedades anfífilas debido a sus propiedades de transmembrana nativas y sus funciones.

"Membrana líquida" como se usa en la presente se refiere a sistemas de membranas como se describe en los documentos WO2010/146365 (Acuaporina A/S) y WO 2012/080946(Acuaporina A/S). Dicha membrana líquida es un componente integral de las membranas de HF TFC en donde se inmoviliza o encapsula.

El término "ósmosis directa asistida" (u "ósmosis directa asistida por presión") como se usa en la presente se refiere al concepto de aplicar una presión mecánica al lado de alimentación de la membrana para aumentar el flujo de agua a través del sinergismo de las fuerzas conductoras osmótica e hidráulica.

Un "compuesto de película delgada" o (TFC) Membranas de fibras huecas como se usan en la presente, se preparan mediante el uso de un reactante de amina, preferentemente una amina aromática, tal como una diamina o triamina, por ejemplo 1,3-diaminobenceno (m-fenilendiamina > 99 %, por ejemplo como se adquiere de Sigma-Aldrich) en una solución acuosa, y un reactante de haluro de acilo, tal como un cloruro de di- o triácido, preferentemente un haluro de acilo aromático, por ejemplo cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo (CAS núm. 84270-84-8, cloruro de trimesoilo (TMC), 98 %, por ejemplo como se adquiere de Sigma-Aldrich) disuelto en un disolvente orgánico donde dichos reactantes se combinan en una reacción de polimerización interfacial, cf. US 4,277,344 que describe en detalle la formación de una membrana compuesta que comprende una poliamida laminada a un soporte de membrana poroso, en la superficie de la membrana de soporte, por ejemplo una membrana de polietersulfona. El cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo se disuelve en un disolvente, tal como un hidrocarburo C6 - C12 que incluye hexano (> 99,9 %, Fisher Chemicals), heptano, octano, nonano, decano, etcétera. (hidrocarburos de cadena recta o ramificada) u otro disolvente hidrocarburo aromático bajo, por ejemplo, el Fluido G Isopar™ que se produce a partir de materias primas basadas en petróleo tratadas con hidrógeno en presencia de un catalizador para producir un fluido de bajo olor cuyos componentes principales incluyen isoalcanos. Fluido G Isopar™: Nombre químico: Hidrocarburos, C10-C12, isoalcanos, < 2 % aromáticos; CAS núm.: 64742-48-9, nombre químico: Nafta (petróleo), pesado hidrotratado (de ExxonMobil Chemical). Las alternativas al reactante 1,3-diaminobenceno incluyen las diaminas como hexametilendiamina, etcétera, y las alternativas al reactante cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo incluyen un cloruro de diacilo, cloruro de adipoil, etcétera, como se conoce en la técnica.

"Gas" como se usa en la presente, significa cualquier fluido gaseoso, tales como los gases inertes, dinitrógeno, aire atmosférico, etcétera, que pueden usarse para retirar el disolvente.

Los proteoliposomas, como se usa en la presente, típicamente tienen una relación de lípido con respecto a proteína (LPR calculada sobre una base de moles) entre 25 y 500, tal como aproximadamente 100 a aproximadamente 200.

Los proteopolimersomas, como se usa en la presente, típicamente tienen una relación de polímero con respecto a proteína (POPR calculada sobre una base de moles) entre 25 y 500, tal como aproximadamente 50 a aproximadamente 100 cuando se usa un copolímero tribloque y una relación de polímero con respecto a proteína entre 25 y 500, tal como aproximadamente 100 a aproximadamente 200 cuando se usa un copolímero dibloque.

5 En una modalidad preferida de la invención los haces de fibras huecas comprenden un material de soporte de polietersulfona (UltraPES™) en la forma de un material de membrana capilar hidrofílica que tiene las siguientes características (se proporcionan los valores medios): Características físicas: Espesor de la pared $220 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$; diámetro interno $760 \mu\text{m} \pm 30 \mu\text{m}$; resistencia a la tracción $\geq 410 \text{ cN}$; elongación en el punto de ruptura $\geq 40 \%$; presión de explosión $\geq 12 \text{ bar}$; presión de implosión $\geq 7 \text{ bar}$; Tamaño mínimo del poro de 6 - 7 nm.

Características del rendimiento de las membranas: Flujo de transmembrana (agua, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) $\geq 0,65 \text{ ml}/[\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{bar}]$; valor de corte del peso molecular MWCO (dextrano, 90 %, 0 bar) $65 \text{ kD} \pm 20 \text{ kD}$.

10 Las características proporcionadas son representativas de un material UltraPES preferido proporcionado por Membrana GmbH, Oehder Straße 28, D - 42289 Wuppertal, Alemania.

15 En otra modalidad preferida de la invención los haces de fibras huecas comprenden la polietersulfona MicroPES®, tal como la versión TF10 proporcionada también por Membrana GmbH, material de soporte, que difiere del material UltraPES en que tiene un flujo de transmembrana (agua, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) $\geq 35 \text{ ml}/[\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{bar}]$; espesor de pared de $100 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$; un diámetro interno de $300 \mu\text{m} \pm 40 \mu\text{m}$; resistencia a la tracción de $\geq 50 \text{ cN}$; elongación en el punto de ruptura $\geq 30 \%$; tamaño máximo del poro de $0,5 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$.

20 Ejemplos experimentales

Ejemplo comparativo: Preparación de proteoliposomas de Asolectina a 1 mg/ml, y relación de lípido con respecto a proteína (LPR) 200 mediante el uso de AqpZ Mw 27233 de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 25 1) Llenar un frasco de evaporación de vidrio de 50 ml con 5 ml de una solución madre de asolectina a 2 mg/ml (mW 786,11 g/mol, Sigma) en CHCl_3 .
- 2) Evaporar el CHCl_3 mediante el uso de un evaporador de rotación durante al menos 2 horas para completar el secado.
- 3) Añadir 0.8 ml de solución tampón (octilglucósido al 1,3 % (OG) en PBS pH 7,4) para rehidratar la película obtenida en el frasco de evaporación en la etapa 2.
- 30 4) Agitar el frasco a rpm máxima en un agitador de plataforma (agitador de plataforma orbital Heidolph Unimax 2010 o equivalente) hasta que el lípido se disuelva.
- 5) Añadir 1,73 mg de AqpZ en un tampón de proteínas que contiene Tris pH 8, glucosa y OG, 10 mg/ml, y rotar el frasco durante 15 min a 200 rpm, donde AqpZ se prepara de acuerdo con la descripción en la presente.
- 6) Añadir lentamente 9,03 ml de PBS (pH 7,4 sin OG), y agitar el frasco durante 15 min a 200 rpm.
- 35 7) Congelar/descongelar la solución/suspensión combinada sobre hielo seco/baño de agua a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por tres veces para eliminar posibles estructuras multilamelares.
- 8) Añadir 250 mg de Biobeads hidratadas (SM2 de BioRad) y rotar el frasco durante 1 hora a 200 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para adsorber el detergente (OG).
- 9) Añadir otros 250 mg de Biobeads hidratadas y rotar el frasco durante 2 a 3 días a 200 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 40 10) Después las Biobeads con OG adsorbido se retiran mediante pipeteo de la suspensión.
- 11) Extrudir la suspensión obtenida aproximadamente 11 veces a través de un filtro de policarbonato de 200 nm mediante el uso de un extrusor (tal como un EmulsiFlex-C5 de Avestin, Canadá) al menos 1 vez y hasta aproximadamente 22 veces para obtener una suspensión de proteoliposomas (vesículas) uniforme.

45 Ejemplo de acuerdo con la invención: Protocolo para proteopolimersomas a 1 mg/ml, relación de proteína con respecto a polímero (POPR) 50 copolímeros tribloque basados en polioxazolina, poli(2-metil oxazolina-b-dimetil siloxano-b-2-metil oxazolina, Moxa 12: DMS 35, Mw 3510) (P3691 adquirido de Polymer Source™, Quebec, Canadá), AqpZ Mw 27233

- 50 1) Llenar un frasco de evaporación de vidrio de 50 ml con 5 ml de una solución madre a 2 mg/ml de P3691 en CHCl_3 .
- 2) Evaporar el CHCl_3 mediante el uso de un evaporador de rotación durante al menos 2 horas para completar el secado.
- 3) Añadir 3,0 ml de solución tampón (O.G. al 1,3 %; Sacarosa 200 mM; Tris 10 mM pH 8; NaCl 50 mM) para rehidratar la película obtenida en el frasco de evaporación en la etapa 2.
- 4) Agitar el frasco a 200 rpm en un agitador de plataforma (agitador de plataforma orbital Heidolph Unimax 2010 o equivalente) durante 3 horas para obtener una disolución del copolímero.
- 55 5) Añadir 1,55 mg μl de AqpZ en un tampón de proteínas que contiene Tris, glucosa y OG, y rotar el frasco durante la noche (O.N.) a 200 rpm y $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 6) Añadir 6,88 ml de tampón (Tris 10 mM pH 8; NaCl 50 mM) lentamente mientras se mezcla hacia arriba y hacia abajo con la pipeta.
- 7) Añadir 180 mg de Biobeads hidratadas y rotar durante 1 hora a 200 rpm.
- 8) Añadir 210 mg de Biobeads hidratadas y rotar durante 1 hora a 200 rpm.
- 60 9) Añadir 240 mg de Biobeads hidratadas y rotar O.N. a 200 rpm $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 10) Añadir 240 mg de Biobeads hidratadas y rotar O.N. a 200 rpm $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 11) Después las Biobeads con OG adsorbido se retiran mediante pipeteo de la suspensión.
- 12) Extrudir la suspensión aproximadamente 21 veces a través de un filtro de policarbonato de 200 nm mediante el uso de un extrusor, tal como al menos 1 vez y hasta aproximadamente 22 veces para obtener una suspensión de proteopolimersomas uniforme (vesículas).

Ejemplo 1. Preparación de un módulo de fibras huecas en donde la superficie interna de las fibras se ha funcionalizado con vesículas con AqpZ inmovilizadas

Con el uso de un módulo de fibras huecas que tiene membranas de polietersulfona, tal como un módulo diseñado especialmente, tal como con 9 fibras correspondientes a aproximadamente 10 cm² de área externa y 5 cm² de área interna, o tal como con un área de membrana de hasta 0,5 m² que puede corresponder a numerosos cientos de fibras en dependencia de la longitud del módulo (Membrana GmbH, Wuppertal, Alemania), el módulo se prepara esencialmente como se describe por Sukitpaneent y otros 2011, se prepara una capa compuesta de película delgada sobre la superficie interna de las fibras mediante polimerización interfacial que implica las siguientes etapas:

- 1) Obtener 4 ml de vesículas con AqpZ como se preparó en el ejemplo anterior.
- 2) Disolver 250 mg de 1,3-diaminobenceno en 6 ml de agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4,2 % (p/p).
- 3) Se disuelven 75 mg de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo en 50 ml de hexano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v)
- 4) Se prepara una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas con AqpZ mediante la disolución/mezcla de 4 ml de la preparación de vesículas de la etapa 1 con 6 ml de la solución de la etapa 2.
- 5) La mezcla obtenida en la etapa 4 se bombea constantemente a través del módulo durante 2 minutos mediante el uso de la entrada de extremo 1 (o la entrada 2), cf. Figura 1.
- 6) El exceso de 1,3-diaminobenceno se elimina mediante una purga de aire constante del lado del lumen de las fibras durante 2 minutos mediante el uso, por ejemplo, de la entrada 1, cf. figura 1, preferentemente manteniendo el módulo al revés.
- 7) Después se inyecta un flujo constante de la solución de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo de la etapa 3 en el módulo a través de la entrada 1 durante aproximadamente 30 s mediante el uso de una bomba de jeringa, por ejemplo, de sistemas TSE, cf. [obtenido el 09-11-2012 de Internet: (<URL: <http://www.tse-systems.com/products/other-products/pumps-infusion/index.htm>)] para permitir que ocurra la reacción de polimerización interfacial.
- 8) Finalmente, el módulo se enjuaga preferentemente con agua MilliQ, se usan aproximadamente 10 ml, mediante inyección a través de la entrada lateral 3 y 4.

Después de llenarlo con agua el módulo se sella con las tapas de sellado blancas (5), cf. fig. 1, para prevenir que se seque (las tapas de sellado son parte del módulo y se suministran con él).

Alternativamente, las etapas 2 y 3 son como se describen más adelante donde todas las otras etapas son iguales a como se mostró anteriormente:

- 2) Disolver 1,3-diaminobenceno en agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4,2 % (p/p).
- 3) El cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo se disuelve en un disolvente tal como un disolvente hidrocarburo de hexano o isoalcano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v).

Ejemplo 2. Preparación de un módulo de fibras huecas en donde la superficie interna de las fibras se ha funcionalizado con vesículas con AqpZ inmovilizadas

Con el uso del mismo módulo de fibras huecas que en el ejemplo 1 se prepara una capa compuesta de película delgada sobre la superficie interna de las fibras mediante polimerización interfacial que implica las siguientes etapas:

- 1) Obtener 4 ml de vesículas con AqpZ como se preparó en el ejemplo anterior.
- 2) Disolver 250 mg de 1,3-diaminobenceno en 6 ml de agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4,2 % (p/p).
- 3) Se disuelven 75 mg de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo en 50 ml de hexano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v)
- 4) Se prepara una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas con AqpZ mediante la disolución/mezcla de 4 ml de la preparación de vesículas de la etapa 1 con 6 ml de la solución de la etapa 2.
- 5) La mezcla obtenida en la etapa 4 se bombea constantemente a través del módulo durante 2 minutos mediante el uso de la entrada de extremo 1 (o la entrada 2), cf. Figura 1.
- 6) El exceso de 1,3-diaminobenceno se elimina del módulo mediante una corriente constante de un fluido orgánico tal como hexano durante 1 min a través de la entrada 1 mediante el uso de una bomba de jeringa.
- 7) Después se inyecta un flujo constante de la solución de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo de la etapa 3 en el módulo a través de la entrada 1 durante aproximadamente 30 s mediante el uso de una bomba de jeringa, por ejemplo, de sistemas TSE, cf. [obtenido el 09-11-2012 de Internet: (<URL: <http://www.tse-systems.com/products/other-products/pumps-infusion/index.htm>)] para permitir que ocurra la reacción de polimerización interfacial.
- 8) Finalmente, el módulo se enjuaga preferentemente con agua MilliQ, se usan aproximadamente 10 ml, mediante inyección a través de la entrada lateral 1 y 3.

Después de llenarlo con agua el módulo se sella con las tapas de sellado blancas (5), cf. fig. 1, para prevenir que se seque (las tapas de sellado son parte del módulo y se suministran con él).

Alternativamente, las etapas 2 y 3 son como se describen más adelante donde todas las otras etapas son iguales a como se mostró anteriormente:

- 2) Disolver 1,3-diaminobenceno en agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4,2 % (p/p).
- 3) El cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo se disuelve en un disolvente tal como un disolvente hidrocarburo de hexano o isoalcano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v).

Ejemplo 3. Preparación de un módulo de fibras huecas en donde la superficie interna de las fibras se ha funcionalizado con vesículas con AqpZ inmovilizadas

Con el uso del mismo módulo de fibras huecas que en el ejemplo 1 se prepara una capa compuesta de película delgada sobre la superficie interna de las fibras mediante polimerización interfacial que implica las siguientes etapas y mediante el uso de una bomba de jeringa para empujar las soluciones a través del módulo:

- 1) Obtener 4 ml de vesículas con AqpZ como se preparó en el ejemplo anterior.
- 2) Disolver 250 mg de 1,3-diaminobenceno en 6 ml de agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4.2 % (p/p).
- 3) Se disuelven 75 mg de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo en 50 ml de hexano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v).
- 4) Se prepara una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas con AqpZ mediante la disolución/mezcla de 4 ml de la preparación de vesículas de la etapa 1 con 6 ml de la solución de la etapa 2.
- 5) Añadir la solución de la etapa 2 a través del interior de las fibras mientras el módulo se mantiene verticalmente con la entrada hacia abajo asegurando que el aire se deje salir; la solución puede bombearse preferentemente mediante el uso de una tasa de flujo de aproximadamente 5 ml/min y continuar el bombeo de la solución a través de éste durante 2 min, por ejemplo, tal como iniciar el tiempo inmediatamente después que la solución puede observarse en el extremo superior del módulo.
- 6) Desconectar el módulo de la bomba de jeringa y darle vuelta para permitir que el exceso de la solución fluya hacia el recipiente de vidrio de recolección.
- 7) Conectar el módulo al revés con el aire y lentamente iniciar el flujo de aire hasta alcanzar 10 l/min; permitir un flujo de aire durante 2 min.
- 8) Conectar el módulo a una jeringa con solución de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo, mantener el módulo en posición vertical e iniciar el flujo de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo/hexano, por ejemplo, a la vez que se mantiene una tasa de flujo de aproximadamente 15 ml/min.
- 9) Desconectar el módulo de la jeringa con hexano y girar al revés para permitir la salida del último hexano; conectar con el aire y purgar a aproximadamente 10 l/min durante 5-10 s.
- 10) Llenar el módulo con MilliQ mediante succión desde un recipiente de vidrio.

Alternativamente, las etapas 2 y 3 son como se describen más adelante donde todas las otras etapas son iguales a como se mostró anteriormente:

- 2) Disolver 1,3-diaminobenceno en agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4,2 % (p/p).
- 3) El cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo se disuelve en un disolvente tal como un disolvente hidrocarburo de hexano o isoalcano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v).

Alternativamente, en el protocolo de pHF22 usamos una bomba de jeringa para empujar las soluciones a través del módulo, tal como un módulo de HF MicroPES-TF10, después luego de obtener 4 ml de vesículas con AqpZ como se preparó en el ejemplo anterior, seguir las etapas más adelante:

- 1) Disolver MPD en agua MilliQ y añadir las vesículas con AqpZ para obtener una concentración al 2,5 % (p/p) de MPD en solución de agua/vesículas
- 2) Disolver TMC en un disolvente orgánico, tal como un disolvente hidrocarburo de hexano o isoalcano, a una concentración final de 0,15 % p/v
- 3) empujar la solución de MPD a través del interior de las fibras mientras se mantiene verticalmente con la entrada hacia abajo (mientras se llena el módulo agitarlo repetidamente para lograr que el aire salga); tasa de flujo de 5 ml/min
- 4) continuar empujando la solución de MPD durante 1 min (el tiempo comienza después que la solución de MPD puede observarse en el extremo superior del módulo) y después dejarlo empapar con la solución de MPD por dentro durante 1 min
- 5) desconectar el módulo de la jeringa y darle vuelta para que el exceso de MPD fluya hacia el recipiente de vidrio de recolección
- 6) conectar el módulo al revés (significa el extremo con número hacia arriba) con el aire y comenzar lentamente el flujo de aire; secar con corriente de aire controlada durante 1 a 2 min y girar el módulo en el medio
- 7) conectar a la solución de TMC, mantener vertical (extremo enumerado en la parte de abajo) y comenzar el flujo de la solución de TMC (tasa de flujo: 10 ml/min)
- 8) dejar que la solución corra a través de las fibras durante 45 s (después que el módulo se llena, este puede inclinarse de regreso a la posición horizontal)

9) desconectar el módulo de la jeringa y girar al revés para lograr que salga la última solución de TMC; conectar con el aire y purgar a 10 l/min durante 5-10 s

10) llenar el módulo con MilliQ mediante succión desde un recipiente de vidrio

5 Después de los diversos métodos explicados anteriormente se obtiene un módulo de fibras huecas modificado con TFC-acuaporina donde la superficie interna de las fibras han adquirido una novedosa microestructura como se muestra en la figura 3, donde (1) se refiere a la capa TFC de ~200 nm y (2) se refiere a la membrana de soporte de 220 µm, (1) y (2) juntos representan una sección transversal de la pared de la fibra hueca; (3) representa esquemáticamente la membrana de bicapa en el caso de lípidos y copolímeros dibloque como materiales formadores de membrana anfifílica, que tiene, grupos de cabeza hidrofílica y grupos de cola hidrofóbica. La característica (3) mostraría una monocapa que tiene una porción media hidrofóbica y porciones extremas hidrofílicas o mostraría un tipo de bicapa donde los copolímeros tribloque asumen una conformación en forma de herradura o mezclas de ambos cuando se usan copolímeros tribloque para el material de membrana anfifílica. (4) Representa la proteína de acuaporina donde se muestra su forma tetramérica. Sin embargo, la proteína puede estar presente, además, como un monómero o como un dímero, donde ambos también son canales de agua.

Resultados de la filtración mediante el uso de ósmosis directa

20 Las Tablas 1 y 2 más adelante muestran los resultados de la filtración en la forma de flujo de agua medido, J_w , y flujo inverso de sales medido, J_s , para los módulos de HF preparados de acuerdo con la invención mediante el uso de una solución de alimentación de calceína 10 µM (CAS núm. 1461-15-0, Mw 622,55) y una solución de extracción de NaCl 2 M ambos en agua desionizada (agua MilliQ) y donde la capa de TFC-acuaporina se forma en el interior de las fibras huecas (lumen) y la solución de extracción se aplica al exterior o interior de las fibras. Se usó un flujo en paralelo o contracorriente. Con referencia a la figura 1: Típicamente, la solución de alimentación se bombeó a través de la entrada (1) y salió a través de (2), y la solución de extracción se bombeó a través de la entrada (3) y salió a través de (4). En cinco experimentos se usó un flujo contracorriente, cf. tablas 1 y 2 y la descripción más adelante. La proteína canal de agua AqpZ se usó en todos los experimentos, y tanto un lípido (asolectina) como diversos copolímeros de bloque (P3691, P8061) fueron los materiales de membrana de las vesículas.

30 Cada experimento se caracteriza por el flujo de agua (J_w), el flujo inverso de sales (J_s) y el rechazo de calceína. El flujo de agua describe cuánta agua se transporta en una determinada cantidad de área de membrana en un tiempo determinado (usualmente l/m²h) y se mide mediante el monitoreo de la pérdida de peso en la solución de alimentación. El flujo inverso de sales caracteriza la cantidad de soluto de extracción que difunde de regreso a la solución de alimentación. Es un indicador de cuán unida a las sales está una membrana. El J_s se determina mediante la medición de los cambios de conductividad en la solución de alimentación. El rechazo de calceína se usa para determinar las propiedades de rechazo directo de una membrana. Aquí, un marcador fluorescente, que puede detectarse fácilmente mediante un fluorómetro de mesa (por ejemplo, fluorómetro Qubit, Invitrogen), se añade a la solución de alimentación. Mediante la medición de su concentración en la extracción podemos determinar la cantidad de marcador que se rechaza.

40 El flujo de agua se calcula de la siguiente manera:

$$J_w = V_t / (A * t) ; [L/m^2h],$$

45 donde V_t es el volumen transportado, A el área de membrana activa y t el tiempo en horas. Para determinar el flujo inverso de sales debemos medir la conductividad en la solución de alimentación. Con la ayuda de una curva de calibración podemos relacionar después la conductividad con una concentración de sales y por lo tanto calcular el flujo inverso de sales de la siguiente manera:

$$J_s = (c_{f,final} * V_{f,final} - c_{f,inicial} * V_{f,inicial}) / (A * t) ; [g/m^2h]$$

50 donde V_f marca el volumen inicial y final y c_f la concentración inicial y final de sal en la alimentación.

El rechazo de calceína se aproxima mediante:

$$55 R_{ca} = 1 - ((V_{d,final} * c_{ca,d,final} - V_{d,inicial} * c_{ca,d,inicial}) / (V_t * c_{ca,f,inicial}))$$

60 Donde V_d es el volumen de extracción inicial y final y $c_{ca,d}$ las lecturas de calceína en la solución de extracción. La concentración inicial de calceína en la alimentación ($c_{ca,f}$) se toma como una constante. Esto es una aproximación porque una membrana que rechaza la calceína aumentará la concentración de calceína en la alimentación. Sin embargo, esto puede tolerarse porque al dejar la concentración inicial constante en el cálculo subestimamos el rechazo total, lo cual es aceptable.

65

Tabla 1

(ej, comparativo 12-0644, 12-0636, ejemplo de acuerdo con la invención 12-0630)						
Módulo de HF núm,	Velocidad de flujo [ml/min]	J _w Flujo de agua [L/m ² h]	J _s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J _s /J _w [g/l]	Rechazo de calceína [%]	Tiempo de ejecución
12-0644 (Capa de película delgada solamente)	alimentación=10 extracción=50; a	14,07	1,67	0,12	99,97	≤ 3 h
12-0636 Asolectina d	alimentación=10 extracción=50; a	14,66	5,30	0,36	99,98	360 min
12-0636 Asolectina d	alimentación=10 extracción=50; a	21,88	4,77	0,22	99,97	360 min
12-0630 P3691 d	alimentación=50 extracción=10; ab	17,06	5,17	0,30	99,89	380 min

Notas: a flujo contracorriente; ab extracción en el interior y flujo contracorriente; d de acuerdo con el Ej, 1, El módulo de HF núm, 12-0644 se ha modificado con una capa de película delgada solamente sin vesículas y/o proteína y por lo tanto representa la materia anterior como se describió por Sukitpaneent y Chung 2012,

La Tabla 1 muestra claramente que cuando se usa el módulo de HF de la invención es posible obtener un mayor flujo de agua, J_w, de hasta 3 l/m²h por encima del flujo que puede obtenerse para un módulo de HF modificado con película delgada que tiene 9 fibras a la vez que todavía mantiene una buena relación J_s/J_w tan baja como aproximadamente 0,22. Esto será una ventaja para los propósitos de filtración, donde un flujo de agua alto es conveniente a la vez que puede tolerarse una retención de sales menos eficiente, por ejemplo, en el tratamiento de agua residual. Los resultados de acuerdo con la invención mostrados en la tabla 1 todos se obtienen mediante el uso de un flujo contracorriente, que podría ser una ventaja para un flujo de agua alto.

Tabla 2

(ejemplo comparativo 12-0644, ej, de acuerdo con la invención 12-1470, 12-1474)						
Módulo de HF núm,	Velocidad de flujo [ml/min]	J _w Flujo de agua [L/m ² h]	J _s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J _s /J _w [g/l]	Rechazo de calceína [%]	Tiempo de ejecución
12-0644 (capa de película delgada solamente)	alimentación=10 extracción=50; a	14,07	1,67	0,12	99,97	≤ 3 h
12-1470 P8061 dd	alimentación=50 extracción=10; c	8,72	1,17	0,13	99,01	900 min
12-1474 P8061 dd	alimentación=50 extracción=10; c	7,71	1,44	0,19	99,27	900 min

Notas: a flujo contracorriente; c extracción en el interior; dd preparado de acuerdo con el Ej, 3, El módulo de HF núm, 12-0644 se ha modificado con una capa de película delgada solamente sin vesículas y/o proteína y por lo tanto representa la materia anterior como se describió por Sukitpaneent y Chung 2012,

La Tabla 2 muestra claramente que con el uso del módulo de HF de la invención es posible obtener un aumento en la retención inversa de sales, J_s, de aproximadamente 0,5 g/m²h correspondiente a un aumento de 25 % en comparación con la retención inversa de sales que puede obtenerse para un módulo de HF modificado con película delgada que tiene 9 fibras a la vez que todavía mantiene un buen flujo de agua de aproximadamente 8 a 9 l/m²h. Estos resultados se obtienen mediante el uso de flujo en paralelo con la solución de extracción en el interior de las fibras del módulo de HF. Todos los valores anteriores de rechazo de calceína son mejores que 99 %, lo que muestra que los módulos de HF usados son

extremadamente herméticos (sin fuga de membrana). El módulo de HF de la invención puede usarse tanto con flujo en paralelo como flujo contracorriente, y como se observa en los resultados anteriores puede preferirse tener un flujo contracorriente. En ese caso las diferencias en presión osmótica se distribuyen más uniformemente en toda la longitud de la fibra. Cuando ambas soluciones de alimentación y extracción entran en el mismo lado (flujo en paralelo), entonces el agua se saca inmediatamente de la corriente de alimentación hacia la corriente de extracción, y a lo largo de la fibra la diferencia en presión osmótica disminuirá rápidamente (la alimentación se concentra y la extracción se diluye). Cuando el módulo de HF funciona ahora con flujo contracorriente, entonces tenemos una alimentación más limpia que se encuentra con una extracción diluida en un extremo y una extracción altamente osmótica que se encuentra con una alimentación débilmente osmótica (contaminada con sales) en el otro extremo. Por tanto, la diferencia de presión osmótica entre ambos líquidos está más cerca de ser la misma a lo largo de la fibra.

Esto podría favorecer el flujo contracorriente. Sin embargo, lo que habla a favor del flujo en paralelo es que la presión que se genera mediante el bombeo en el interior se encuentra con una presión igual que se genera mediante el bombeo en la parte externa de la fibra.

La Tabla 3 muestra los resultados de 4 ejecuciones con el uso del método alternativo descrito anteriormente (PHF22)

Protocolo	J _w Flujo de agua [L/m ² h]	J _s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J _s /J _w [g/l]	Rechazo de calceína [%]
Fibras pHF22 MicroPES-TF10 El experimento se ejecutó durante 3,5 horas	4,04	0,75	0,19	99,98
	4,52	1,02	0,23	99,88
	4,61	0,86	0,19	99,88
	8,1	1,3	0,16	99,94
Promedio	5,32	0,98	0,19	99,92

La Tabla 4 muestra los resultados de 4 ejecuciones con el uso del método alternativo descrito anteriormente (PHF22)

Protocolo	J _w Flujo de agua [L/m ² h]	J _s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J _s /J _w [g/l]	Rechazo de calceína [%]
Fibras pHF22 μPES-TF10 El experimento se ejecutó durante 3,5 horas	12,2	2,06	0,17	99,95
	13,62	2,41	0,18	99,97
	16,48	2,5	0,15	99,98
	17,34	2,55	0,15	99,77
Promedio	14,91	2,38	0,16	99,92

La Tabla 5 muestra los resultados de 4 ejecuciones con el uso del método alternativo descrito anteriormente (PHF22)

Protocolo	J _w Flujo de agua [L/m ² h]	J _s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J _s /J _w [g/l]	Rechazo de calceína [%]
pHF22 (velocidad de bombeo más lenta para la solución de TMC (5 ml/min en lugar de 10 ml/min)) Velocidad de flujo [ml/min]: alimentación=10 extracción=50 El experimento se ejecutó durante 200 mins	16,12	3,6	0,22	99,98
	16,7	3,44	0,21	99,96
	9,56	1,69	0,18	99,69
	9,58	2,15	0,22	99,99
Promedio	12,99	2,72	0,21	99,91

El recubrimiento interno de los módulos de fibras huecas con área de membrana activa de 5 cm² HF MicroPES TF10 dio como resultado una alta reproducibilidad; Todos los experimentos en las tablas 3 y 4 tienen relaciones J_s/J_w comparables con J_w y J_s variables, lo que puede deberse a diferencias/tolerancias en los experimentos, diferencias en la exactitud de las mediciones, y posiblemente debido al hecho de que el recubrimiento fue un proceso manual. Por lo tanto, los dos experimentos diferentes dieron como resultado módulos de HF con J_s/J_w comparables, pero intervalos promedio variables

de J_w y J_s , cf. la tabla 3 que muestra los resultados experimentales de J_w moderado y J_s bajo, y la tabla 4 que muestra los resultados experimentales de J_w alto y J_s moderado.

5 Ejemplo 4. Preparación de un módulo de fibras huecas en donde la superficie externa de las fibras se ha funcionalizado con vesículas con AqpZ inmovilizadas

10 Con el uso de un módulo de fibras huecas que tiene membranas de polietersulfona, tal como un módulo diseñado especialmente, tal como con 9 fibras correspondientes a aproximadamente 10 cm², o tal como con un área de membrana de hasta 0,5 m² que puede corresponder a numerosos cientos de fibras en dependencia de la longitud del módulo (Membrana GmbH, Wuppertal, Alemania), se prepara una capa compuesta de película delgada en la superficie externa de las fibras mediante polimerización interfacial que implica las siguientes etapas del protocolo PHF21:

- 1) Obtener 4 ml de vesículas con AqpZ como se preparó en el ejemplo anterior.
- 2) Disolver 1,3-diaminobenceno en agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4,2 % (p/p).
- 15 3) El cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo se disuelve en un disolvente orgánico, tal como un disolvente hidrocarburo de hexano o isoalcano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v)
- 4) Se prepara una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas con AqpZ mediante la disolución/mezcla de 4 ml de la preparación de vesículas de la etapa 1 con 6 ml de la solución de la etapa 2.
- 20 5) Introducir la solución de la etapa 4 en el módulo en la parte externa de las fibras (entradas laterales del módulo); tasa de flujo: 5 ml/min
- 6) detener el flujo después de 1 min y dejar que las fibras se empapen durante 1 min
- 7) vaciar el módulo y purgar con aire para que salga la solución de MPD sobrante
- 8) usar flujo de aire para eliminar el agua de la superficie de las fibras (tasa de flujo de aire 25 l/min)
- 9) bombear la solución de la etapa 3 en el módulo mediante el uso de una tasa de flujo de 15 ml/min
- 25 10) después de llenar el módulo continuar bombeando durante 30 s
- 11) desconectar el módulo de la jeringa y girar al revés para que salga la última solución; conectar con el aire y purgar a 10 l/min durante 5-10 s
- 12) llenar el módulo con MilliQ mediante succión desde un recipiente de vidrio

30 La Tabla 5 muestra los resultados de 4 ejecuciones mediante el uso del método descrito anteriormente (PHF21)

Protocolo PHF21 de acuerdo con el Ej, 4	J_w Flujo de agua [L/m ² h]	J_s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J_s / J_w [g/l]	Rechazo de calceína [%]
Fibras UltraPES	6,36	2,09	0,33	99,66
Recubrimiento externo (20 l/min)				
El experimento se ejecutó durante 900 min				
Fibras UltraPES	6,63	1,1	0,17	99,96
Recubrimiento externo (25 l/min)	8,57	3,95	0,46	99,57
El experimento se ejecutó durante 900 min	8,14	3,97	0,49	99,72
Promedio	7,43	2,78	0,36	99,73

50 El recubrimiento externo de módulos de fibras huecas con área de membrana activa de 5 cm² HF UltraPES TF10 dio como resultado una alta reproducibilidad: Los experimentos en la tabla 5 muestran conjuntos de 2 (aproximadamente 2 x 8 [L/m²h] y 2 x 6 [L/m²h]) con valores comparables de J_w y J_s .

55 Ejemplo 5. Recubrimiento interno para la creación de una capa TFC sobre las fibras en el módulo de HF MicroPES TF10

Protocolo HF24 para el recubrimiento interno de módulos de 100 cm² mediante el uso de una bomba de jeringa para succionar las soluciones a través del módulo:

- 60 Usar una bomba de jeringa para bombear las soluciones a través del módulo
- 1) pre-empapar los módulos con MilliQ al menos durante la noche
 - 2) Obtener 16 ml de vesículas con AqpZ como se preparó en el ejemplo anterior.
 - 3) Disolver 1,3-diaminobenceno en agua MilliQ para obtener una solución de concentración al 4,2 % (p/p).
 - 65 4) Se disuelven 75 mg de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo en 50 ml de hexano para obtener una concentración final de 0,15 % (p/v)

5) Se prepara una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas con AqpZ mediante la disolución/mezcla de 16 ml de la preparación de vesículas de la etapa 1 con 24 ml de la solución de la etapa 3.

6) bombear la solución de la etapa 5 a través del módulo durante el tiempo necesario hasta que no se observen más burbujas (golpear suavemente de manera continua para agitar las burbujas hacia afuera) a 10 ml/min; mantener el módulo verticalmente

7) Dejar que la solución empape las fibras durante 1 min

8) desconectar el módulo de la jeringa y dejar que el exceso de solución fluya hacia un recipiente de vidrio de recolección

9) conectar el módulo al revés con el aire y comenzar lentamente el flujo de aire hasta alcanzar 20 l/min

10) secar con corriente de aire controlada durante 3 a 5 min y girar el módulo en el medio

11) empujar la solución de la etapa 4 a través de las fibras a un flujo constante (tasa de flujo: 15 ml/min) durante 45 s (que inician cuando el TMC entra en las fibras)

12) vaciar el módulo mediante la desconexión del tubo

13) soplar aire a través de las fibras durante 5 a 10 s para expulsar la solución sobrante

14) llenar las fibras y el módulo con MilliQ

La Tabla 6 muestra los resultados de 2 ejecuciones mediante el uso del método descrito anteriormente (PHF24)

Protocolo	J _w Flujo de agua [L/m ² h]	J _s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J _s / J _w [g/l]	Rechazo de calceína [%]
pHF24; fibras MicroPES-TF 10; NaCl 2 M como extracción Los experimentos se ejecutaron durante 200 min	10,83	1,21	0,11	99,73
	14,21	1,65	0,12	99,88
Promedio	12,52	1,43	0,11	99,81

La Tabla 7 muestra los resultados de 3 ejecuciones mediante el uso del método descrito anteriormente (PHF24)

Protocolo	J _w Flujo de agua [L/m ² h]	J _s Flujo inverso de sales [g/m ² h]	J _s / J _w [g/l]	Rechazo de calceína [%]
pHF24; fibras MicroPES-TF10; NaCl 1 M como extracción Los experimentos se ejecutaron durante 200 min	8,26	1,33	0,16	99,97
	7,66	1,72	0,22	99,96
	6,01	1	0,17	99,74
Promedio	7,31	1,35	0,18	99,89

El recubrimiento interno de módulos de fibras huecas con área de membrana activa de 100 cm² HF MicroPES TF10 dio como resultado una alta reproducibilidad, cf. las tablas 6 y 7 que muestran los resultados experimentales con NaCl 2 M como solución de extracción y la tabla 6 que muestra los resultados experimentales con solución de extracción de NaCl 1 M donde una reducción en el flujo de agua es notable a diferencia de una menor reducción en el flujo inverso de sales

Ejemplo 6. Pruebas de recubrimiento continuo externo de las fibras huecas

El propósito de este experimento es establecer un método de recubrimiento continuo en la parte externa de las membranas de fibras huecas por medio de un proceso de producción automatizado.

Materiales

La máquina y las fibras se proporcionan por Membrana y los compuestos químicos de recubrimiento y las vesículas con AqpZ son iguales a los usados en los ejemplos anteriores. Las membranas de fibras huecas diferentes analizadas son MicroPES® TF10 y DuraPES® 0.7 (Membrana GmbH, Wupperthal, Alemania). Por lo tanto, el recubrimiento final sostiene un componente inmovilizado de membrana líquida que contiene proteínas de acuaporina.

Métodos

La figura 4 ilustra en forma de un esbozo el recubrimiento externo continuo y automatizado de las fibras huecas (mostradas como una línea estrecha). En la figura: (1) es una bobina de fibras huecas sin recubrir, preferentemente de un material poroso de polietersulfona (o polisulfona y similares). Desde aquí se transportan hacia el baño de membrana líquida con acuaporina/MPD (2) donde las vesículas de acuaporina empapan la fibra y se unirán a su superficie. El exceso de la solución de MPD/acuaporina se elimina durante una etapa de secado (3) donde puede usarse un labio soplante para aumentar la eliminación del exceso de solución. Desde aquí la fibra pasa hacia el baño de TMC/ disolvente hidrocarburo

de isoalcano donde tiene lugar la polimerización interfacial (4). Por lo tanto, las vesículas de acuaporina (proteopolimersomas de la membrana líquida) se encapsulan debido a la capa TFC formada sobre la fibra. Una etapa de secado (5) asegura que toda la solución orgánica se evapore antes de sumergir la fibra en un baño de agua para eliminar los compuestos químicos sobrantes (6). Ahora la fibra se enrolla sobre una nueva bobina. Las fibras huecas recubiertas se cortan después a la longitud adecuada y se incorporan en los módulos adecuados para propósitos de extracción y separación de agua FO.

Ejemplo 7. Ensayo de retención y concentración de dos péptidos pequeños en módulo de fibras huecas.

En este ejemplo usamos módulos de HF con 5 cm² de área activa preparados de acuerdo con el ejemplo 3 anterior.

Péptido A: GGG SGA GKT MW 0,692 kDa

Se filtraron 100 ml del péptido GGG SGA GKT (MW 0.692 kDa) en tampón TES (solución de alimentación) a través de un módulo de HF de ósmosis directa hasta la concentración deseada (aproximadamente 20x) mediante el uso de NaCl 1 M como solución de extracción. El peso de la muestra concentrada se midió para determinar la reducción de volumen a partir de la muestra inicial. Se mezclaron 10 µl de la muestra concentrada con 90 µl de tampón TES 10x para eliminar el factor de concentración del tampón cuando se determina la concentración final de la muestra concentrada del péptido. La muestra total de 100 µl se mezcló después con 100 µl del kit de cuantificación LavaPep, se incubó durante 1 hora en temperatura ambiente y después los conteos de fluorescencia se leyeron en un fluorómetro QuBit (Invitrogen). Los conteos de fluorescencia se compararon después con una curva patrón donde se determinó la concentración real de la muestra del péptido. A partir de la misma muestra concentrada inicial del péptido, se prepararon tres muestras (n=3) y se midieron en el Qubit y la cantidad media de conteos fluorescentes se usó para determinar la concentración a partir de las curvas patrón. El volumen de la muestra se concentró aproximadamente 20 veces, y el péptido A se concentró aproximadamente 18 a 19 veces.

Péptido B: AGKT MW 0,375 kDa (condiciones experimentales estrechamente correspondientes a las descritas anteriormente para el péptido A).

100 ml del péptido AGKT (MW 0.375 kDa) en tampón TES se corrieron hasta la concentración deseada (aproximadamente 20x) con el módulo de fibras huecas FO. La masa de la muestra concentrada se midió para determinar la reducción de volumen a partir de la muestra inicial. La muestra concentrada se diluyó después 4 veces con tampón TES para generar una muestra del péptido concentrada 5 veces antes de un procesamiento adicional de la muestra. Esto se realiza para evitar la inactivación de la señal fluorescente para el péptido más pequeño como se ha observado en ensayos anteriores. Se mezclaron 10 µl de la muestra concentrada 5x con 90 µl de tampón TES 10x para eliminar el factor de concentración del tampón cuando se determina la concentración final de la muestra concentrada del péptido. La muestra total de 100 µl se mezcló después con 100 µl del kit de cuantificación LavaPep, se incubó durante 1 hora en temperatura ambiente y después los conteos de fluorescencia se leyeron en un fluorómetro QuBit (Invitrogen). Los conteos de fluorescencia se compararon después con una curva patrón donde se determinó la concentración real de la muestra del péptido. A partir de la misma muestra concentrada inicial del péptido, se prepararon tres muestras (n=3) y se midieron en el Qubit y la cantidad media de conteos fluorescentes se usó para determinar la concentración a partir de las curvas patrón. El volumen de la muestra se concentró aproximadamente 21 veces, y el péptido B se concentró aproximadamente 24 veces.

En ambos casos el factor de concentración de los péptidos de muestra A y B corresponde al factor de reducción del volumen, lo que conduce así a la conclusión de que los módulos de fibras huecas que tienen una capa activa de acuaporina-TFC en el interior pueden usarse para concentrar biomoléculas al menos de tamaños tan pequeños como 0,375 kDa.

Materiales y equipo:

Péptidos: GGG SGA GKT adquirido de CASLO
 TES: Ácido N-(Tris(hidroximetil)metil)-2-aminometanosulfónico), Sigma Aldrich, Cas 7365-44-8
 Kit de cuantificación de péptidos LavaPep: Adquirido de www.lavapep.com
 Parte A (LP-022010)
 Parte B (LP-022010)
 Fluorómetro Qubit, Invitrogen
 Número de catálogo: Q32857
 Número de serie: 45257-233
 Configuración de las mediciones: ADNmc Quant-iT
 Tampón TES, 100 ml
 m (TES) = 229,8 mg
 m(EDTA) = 37,2 mg
 Ajustar el pH con NaOH 1 M a 8 y rellenar con agua mQ. Filtrar a través de un filtro a vacío.
 Para el tampón TES 10x las cantidades de TES y EDTA se multiplican por 10.
 Kit de cuantificación LavaPep.
 La parte A, la parte B y el agua mQ se mezclan entre sí según la relación (1:1:8).

La solución de trabajo Lavapep se mezcla con la muestra concentrada del péptido según la relación (1:1).

8. Retención de creatinina del módulo de fibras huecas

5 En este ejemplo usaremos, entre otras cosas, los módulos de HF que tienen 5 cm² de área activa, preparados de acuerdo con el ejemplo 3 anterior. El propósito es determinar la tasa de retención de creatinina (MW 113,12 g mol⁻¹), que se produce naturalmente en la sangre y la orina. Si la filtración en el riñón es deficiente, los niveles de creatinina en sangre aumentarán. El nivel de creatinina en sangre y orina se usa comúnmente para calcular la eliminación de creatinina (CrCl), que se correlaciona con la tasa de filtración glomerular (GFR) que es clínicamente importante como una medición de la función renal.

Ensayo de creatinina

15 La creatinina en una muestra se detecta con el kit de ensayo para creatinina de abcam (ab65340). En el ensayo la creatinina es convertida a creatina mediante la creatinasa, la creatina es convertida a sarcosina que reacciona con una sonda para generar un color rojo ($\lambda_{\text{máx}} = 570 \text{ nm}$) y fluorescencia ($E_{\text{e}}/E_{\text{e}}=538/587 \text{ nm}$).

20 Las instrucciones del kit se siguen sin alteraciones. La creatininas, la creatinasa y la mezcla de enzimas de creatina se reconstituyen con 220 μl de tampón del ensayo cada una y se distribuyen en alícuotas antes del uso para evitar ciclos de congelación y descongelación. El patrón de creatinina se reconstituye con 100 μl de H₂O desionizada para generar un Patrón de Creatinina 100 mM. Para el ensayo colorimétrico el patrón de creatinina se diluye unas cien veces en tampón del ensayo para generar una solución madre de trabajo de 1 nmol/ μl . Se prepara una serie de diluciones donde 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μl de la solución de trabajo se mezclan en tampón del ensayo hasta un volumen final de 50 μl .

25 Para cada muestra se prepara una mezcla de reacción con los siguientes volúmenes.

Tampón del ensayo: 42 μl
Creatinasa 2 μl
Creatininas: 2 μl
30 Mezcla de enzimas: 2 μl
Sonda: 2 μl

35 La mezcla de reacción del fondo contiene los mismos reactivos excepto la creatininas. En cambio, la cantidad de tampón del ensayo es 44 μl . Las muestras patrón (50 μl) se mezclan con la mezcla de reacción (50 μl), incubadas a 37 °C durante una hora. La O.D. se mide en microcubetas a 570 nm y el fondo se sustrae de todas las muestras. La O.D. se grafica después contra la concentración para generar una curva patrón.

40 Para las muestras de creatinina en las fibras huecas se realizará el mismo procedimiento donde la muestra concentrada se diluirá 100 veces en tampón del ensayo y 50 μl de la muestra resultante se mezclarán con 50 μl de la mezcla de reacción. El valor de O.D. medido se medirá y la concentración de la muestra se determinará a partir de las curvas patrón.

Referencias

45 Todos los documentos mencionados en esta descripción se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Panu Sukitpaneenit y Tai-Shung Chung, *Environmental Science & Technology*, 2012, 46, 7358-7365
Niwa T. *Nagoya J Med Sci.* 2010 Feb;72(1-2):1-11.
Niwa T, Nomura T, Sugiyama S, et al.: The protein metabolite hypothesis, a model for the progression of renal failure: an oral adsorbent lowers indoxyl sulfate levels in undialyzed uraemic patients. *Kidney Int* 1997;52:S23-S28.
50 Wenhao Xie (2011) Alteration of Membrane Properties during Continuous Hemofiltration Therapy in vivo (dissertation, <http://darwin.bth.rwth-aachen.de/opus3/volltexte/2011/3556/pdf/3556.pdf>).
Ikuo Aoike, Required Water Quality for the Use of High- Performance Membranes in Saito A, Kawanishi H, Yamashita AC, Mineshima M (eds): *High-Performance Membrane Dialyzers. Contrib Nephrol.* Basel, Karger, 2011, vol 173, págs. 53-57.
Clark & Gao, Properties of Membranes Used for Hemodialysis Therapy. *Seminars in Dialysis*, Vol 15, No. 1 (January -
55 February) 2002, págs. 191-195.
Qian Yang, Kai Yu Wang, Tai-Shung Chung. Dual-Layer Hollow Fibers with Enhanced Flux as Novel Forward Osmosis Membranes for Water Production. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 2800-2805.
Peinemann y otros, solicitud de patente de Estados Unidos publicada con No. 2007/0199892.
Maria Karlsson y otros (*FEBS Letters* 537 (2003) 68-72).
60 Jensen y otros, US 2012/0080377 A1.
Baihai Su, Shudong Sun and Changsheng Zhao (2011). Polyethersulfone Hollow Fiber Membranes for Hemodialysis, *Progress in Hemodialysis - From Emergent Biotechnology to Clinical Practice*, Prof. Angelo Carpi (Ed.), ISBN: 978-953-307-377-4, InTech, Available from: Retrieved from the Internet: (<URL: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-hemodialysis-from-emergent-biotechnology-to-clinical-practice/polyethersulfone-hollow-fiber-membranes-for-hemodialysis> >)

"Polyethersulfone Hollow Fiber Membranes for Hemodialysis" Chapter 4, págs. 65-88, in Progress in Hemodialysis - From Emergent Biotechnology to Clinical Practice, Editado por Angelo Carpi, Carlo Donadio and Gianfranco Tramonti, Published by InTech 2011, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. [recuperado el 2012-11-09].

5 Kotelyanskii, M.J., Wagner, N.J., Paulaitis, M.E.: Atomistic simulation of water and salt transport in the reverse osmosis membrane ft-30. J. Membr. Sci. 139, 1-16 (1998).

Wang y otros. Structure, Volumen 13, Tema 8, agosto 2005, Páginas 1107-1118. US 4,277,344.

Membrana GMBH [recuperado el 2012-12-15] Recuperado de internet (: <URL: <http://www.membranafiltration.com/filtration-modules/product-information/ultrapestm-membrane-fiber.cfm>>).

10 Kotelyanskii, M.J., Wagner, N.J., Paulaitis, M.E.: Atomistic simulation of water and salt transport in the reverse osmosis membrane ft-30. J. Membr. Sci. 139, 1-16 (1998).

Zhang, P., Fu, X., Chung, T.-S., Weber, M. y Maletzko, C.: Development of Thin-Film Composite forward Osmosis Hollow Fiber Membranes Using Direct Sulfonated Polyphenylenesulfone (sPPSU) as Membrane Substrates. Environ. Sci. Technol., 2013, 47 (13), págs. 7430-7436.

15 Zhao, Yang y otros: Synthesis of robust and high-performance aquaporin-based biomimetic membranes by interfacial polymerization-membrane preparation and RO performance characterization. Journal of Membrane Science 423-424 (2012) 422-428.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una membrana de fibras huecas (HF) que tiene fibras modificadas con una capa compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, en donde la capa TFC es una capa de poliamida proporcionada sobre una superficie de las fibras, los canales de agua de acuaporina se incorporan en vesículas antes de la incorporación en la capa TFC, y en donde dichas vesículas en las que se incorporan canales de agua de acuaporina son polimersomas.
- 10 2. La membrana de HF de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos polimersomas comprenden copolímeros tribloque del tipo hidrófilo-hidrófobo-hidrófilo (A-B-A o A-B-C), copolímeros dibloque del tipo hidrófilo-hidrófobo (A-B), o una combinación de estos.
- 15 3. La membrana de HF de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dichos canales de agua de acuaporina se seleccionan del grupo que consiste en canales AqpZ y canales de agua SoPIP2;1.
- 20 4. La membrana de HF de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha capa TFC se forma mediante polimerización interfacial de una solución acuosa de una di- o triamina con una solución de haluro de di- o triacilo en un disolvente orgánico, y en donde las vesículas con canales de agua de acuaporina se incorporan en dicha solución acuosa.
- 25 5. La membrana de HF de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el material de soporte de la fibra hueca es polietersulfona.
- 30 6. Un módulo de fibras huecas que comprende una membrana de fibras huecas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores sellado en un alojamiento.
- 35 7. Un biorreactor de membrana que comprende un módulo de fibras huecas de acuerdo con la reivindicación 6.
- 40 8. Un método para preparar un módulo de fibras huecas que comprende membranas de HF modificadas en el interior de las fibras con una capa compuesta de película delgada (TFC) que comprende canales de agua de acuaporina, dicho método comprende las etapas de:
 - a) obtener una suspensión de vesículas de acuaporina, en donde dichas vesículas son proteopolimersomas que tienen una relación de polímero con respecto a proteína (POPR) de 25 a 500 de la proteína calculada sobre una base molar,
 - b) preparar una solución acuosa de una di- o triamina,
 - c) disolver un haluro de di- o triacilo en un disolvente orgánico apolar,
 - d) preparar una mezcla de amina y vesículas de acuaporina mediante la disolución/mezcla de la preparación de vesículas de la etapa a) con la solución de la etapa b),
 - e) bombear la mezcla de la etapa d) a través del lumen de las fibras huecas en un módulo de fibras huecas mediante el uso de su entrada de extremo,
 - f) retirar el exceso de la solución acuosa mediante una purga con gas del lado del lumen de las fibras mediante el uso de una entrada del módulo,
 - 45 g) inyectar la solución de haluro de acilo de la etapa c) en el módulo a través del lumen de las fibras huecas para permitir que ocurra una reacción de polimerización interfacial, y
 - h) enjuagar el módulo con un disolvente acuoso mediante inyección a través de una entrada del módulo.
- 50 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el método comprende las etapas de
 - a) obtener una suspensión de vesículas de acuaporina, en donde dichas vesículas son proteopolimersomas que tienen una relación de polímero con respecto a proteína (POPR) de 25 a 500 de la proteína calculada sobre una base molar,
 - b) preparar una solución acuosa de 1,3-diaminobenceno de concentración de 1 % a 5 % (p/p),
 - 55 c) disolver cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo en un disolvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en hexano, heptano, octano o una mezcla de disolventes para obtener una concentración de 0,05 % a 1 % (p/v),
 - d) preparar una mezcla de 1,3-diaminobenceno/vesículas de acuaporina mediante la disolución/mezcla de la preparación de vesículas de la etapa a) con la solución de la etapa b),
 - e) bombear la mezcla de la etapa d) a través del lumen de las fibras huecas en un módulo de fibras huecas mediante el uso de su entrada de extremo,
 - 60 f) retirar el exceso de la solución acuosa mediante una purga con gas del lado del lumen de las fibras mediante el uso de una entrada del módulo,
 - g) inyectar la solución de cloruro de benceno-1,3,5-tricarbonilo de la etapa c) en el módulo a través del lumen de las fibras huecas para permitir que ocurra una reacción de polimerización interfacial, y
 - h) enjuagar el módulo con un disolvente acuoso mediante inyección a través de una entrada del módulo.

65

10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde dicho módulo de fibras huecas comprende fibras de polietersulfona.
- 5 11. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde en la etapa f) las fibras se purgan con gas hasta la sequedad y en donde el módulo se mantiene al revés en la etapa f).
12. Uso de un módulo de fibras huecas (HF) de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 para la extracción de agua pura a través de ósmosis directa.

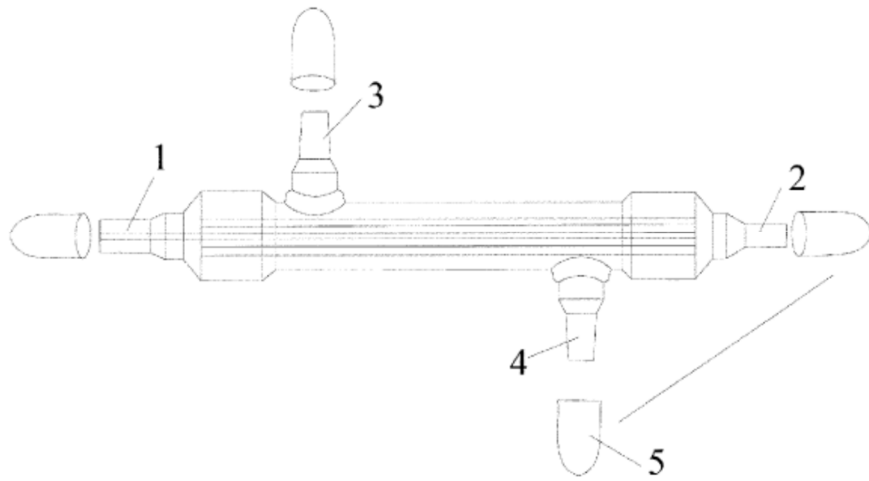
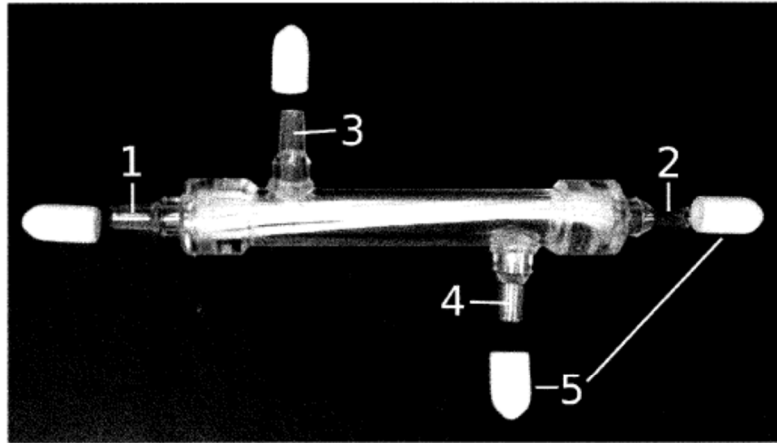


Fig. 1A

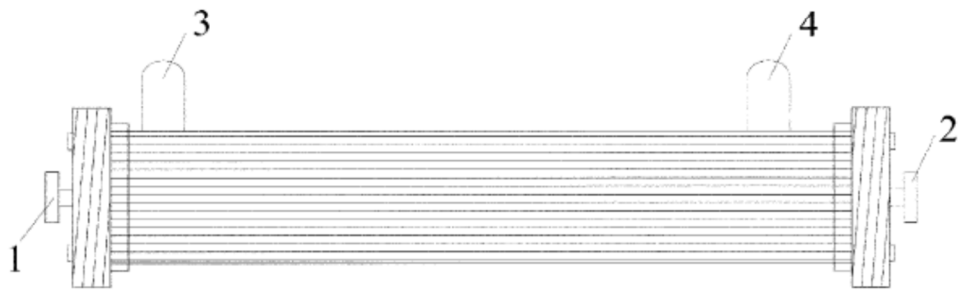
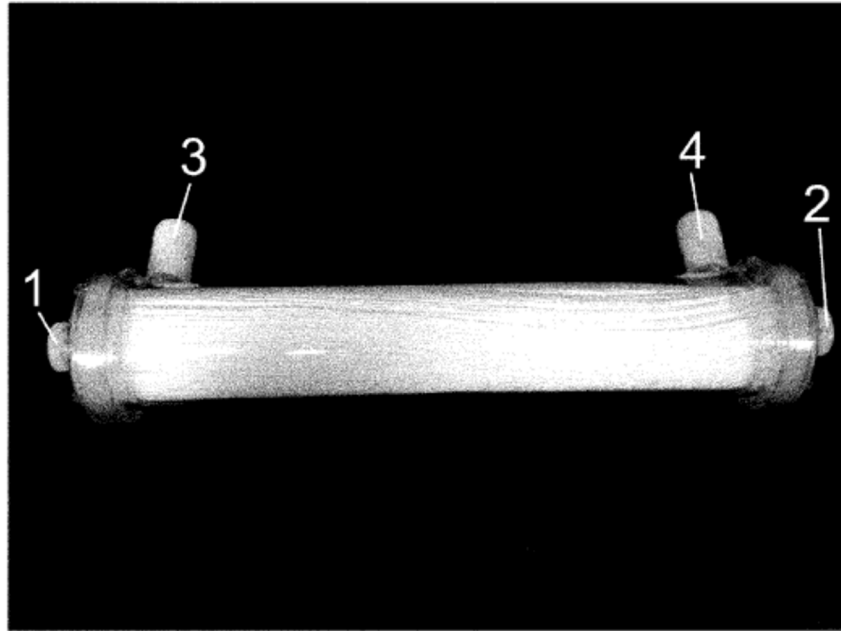


Fig. 1B

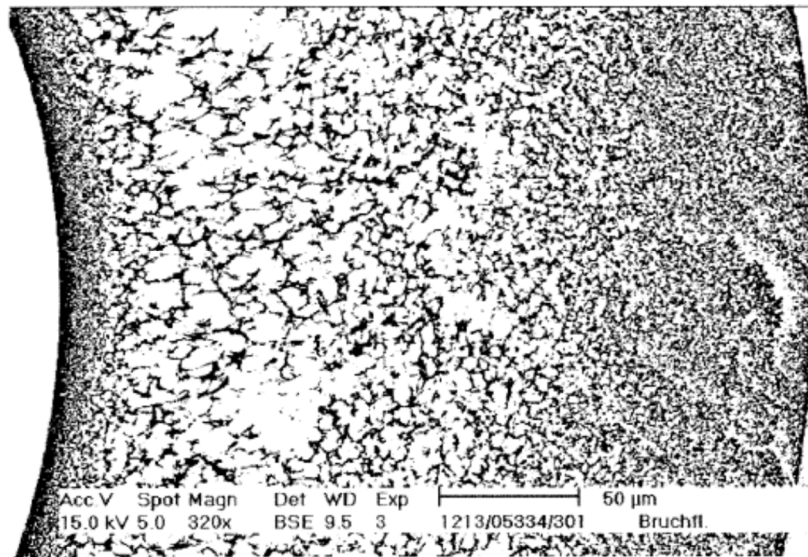
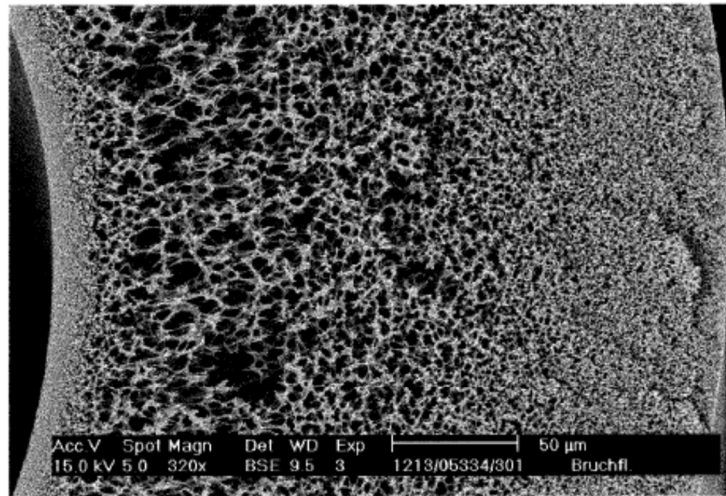


Fig. 2

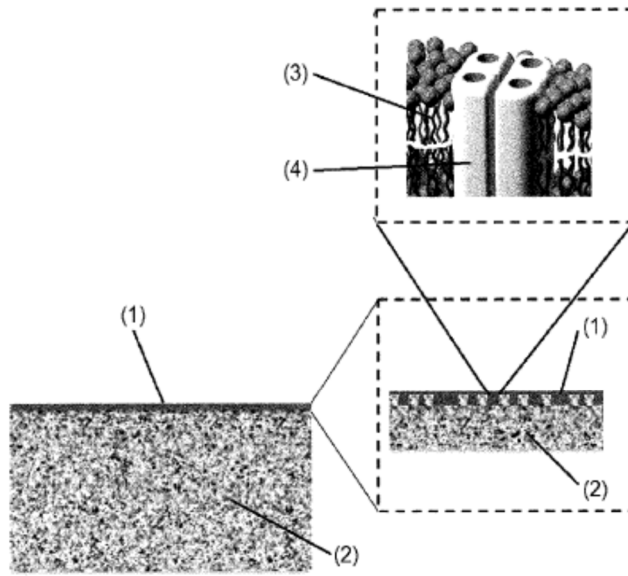


Fig. 3

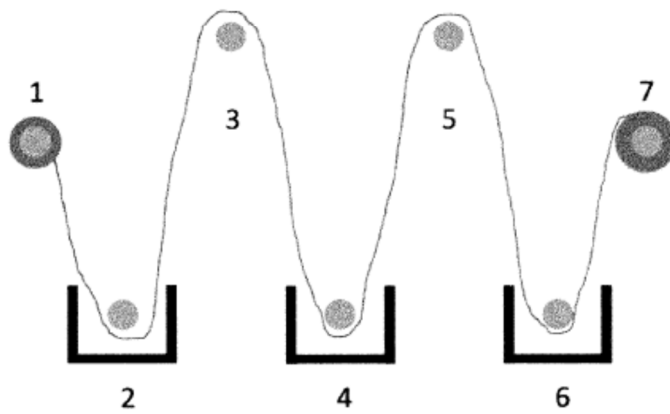


Fig. 4