

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 599**

51 Int. Cl.:

**H01M 8/16** (2006.01)  
**H01M 8/106** (2006.01)  
**B01D 69/12** (2006.01)  
**B01D 69/14** (2006.01)  
**B01D 71/06** (2006.01)  
**H01M 8/1041** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2008 PCT/EP2008/058253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09003936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2008 E 08774420 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2168196**

54 Título: **Dispositivo de membrana artificial biomimética**

30 Prioridad:

**29.06.2007 US 947334 P**

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

**24.06.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1  
(100.0%)  
621 Avenue Centrale  
38400 Saint-Martin-d'Hères, FR**

72 Inventor/es:

**CINQUIN, PHILIPPE y  
MARTIN, DONALD**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 717 599 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**

Dispositivo de membrana artificial biomimética

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a dispositivos desarrollados de acuerdo con procesos biológicos.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] El suministro de energía sostenible se está convirtiendo en un tema importante que cada vez más personas tratan de resolver.

15 [0003] Se reconoce que las energías fósiles no serán suficientes para responder a la creciente necesidad de energía en todo el mundo.

[0004] Se han desarrollado algunas soluciones alternativas para reemplazar, o al menos reforzar, la forma actual de producir energía por soluciones más sostenibles.

20 [0005] De este modo, algunos desarrollos se han centrado en soluciones como la energía hidroeléctrica, la energía eólica o la energía solar. Estas soluciones son muy alentadoras, ya que permiten la producción de cantidades significativas de energía, pero también tienen el límite de ser muy dependientes de las condiciones climáticas. El funcionamiento adicional de estas soluciones es muy costoso con respecto a las soluciones fósiles actuales, que por lo tanto son predominantes.

25 [0006] Por lo tanto, se ha propuesto centrarse en las nanotecnologías como un camino hacia nuevas soluciones.

[0007] Se reconoce que la recolección de energía a partir del contenido químico de un organismo vivo es un tema esencial, con el fin de proporcionar un suministro permanente de energía a los micro o nanosistemas diseñados para realizar acciones diagnósticas o terapéuticas, particularmente en casos en los que se debe sustituir órganos defectuosos.

30 [0008] Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proponer una nueva solución para abordar estos problemas de energía. La invención, más concretamente, propone un dispositivo de nanotecnología para la producción sostenible de energía. potencialmente implantable dentro de un organismo vivo.

35 [0009] En WO 2005/022136 y US 2004/0191599 se han propuesto células de combustible que comprenden una membrana artificial que tiene una membrana semipermeable que soporta una membrana lipídica con una pluralidad de moléculas lipídicas dispuestas en una capa, estando dicha membrana provista de sustancias de transporte para crear un gradiente de protones.

40 RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] Con el fin de alcanzar el objetivo mencionado anteriormente, la invención propone un dispositivo de membrana biomimética tal como se define en las reivindicaciones.

45 [0011] En particular, la invención se refiere a un dispositivo que comprende una carcasa y una membrana biomimética artificial dispuesta dentro de la carcasa de modo que forma dos cámaras distintas, en donde cada cámara está destinada a contener un líquido de una composición dada, y en donde la membrana biomimética artificial comprende una membrana semipermeable para soportar una membrana lipídica, la membrana lipídica comprende una pluralidad de moléculas lipídicas dispuestas en una capa e incluye al menos una proteína de transporte, proteína de transporte que está adaptada para el transporte de iones y/o moléculas de los líquidos entre las dos cámaras.

50 [0012] Los aspectos preferibles pero no limitados de dicho dispositivo de membrana biomimética son los siguientes:

- la membrana lipídica comprende una pluralidad de moléculas lipídicas dispuestas en una bicapa;
- la proteína de transporte se elige entre un intercambiador  $Na^+/K^+$  , un intercambiador  $Na^+/H^+$  , un transportador de  $Na^+$ /glucosa, un intercambiador  $HCO_3^-/Cl^-$ , un transportador de urea, un canal de glucosa pasivo, acuaporina, un canal iónico pasivo (como un canal iónico de gramicidina A o un canal iónico de valinomicina, o una proteína de canal iónico más compleja aislada de una célula viva), un transportador de cadmio, bacteriorrodopsina, o una combinación de los mismos;
- la membrana lipídica comprende dos proteínas de transporte distintas, o más de dos;
- la membrana biomimética artificial comprende proteínas de transporte específicas de una membrana de polielectrolito;

- el dispositivo comprende además electrodos dispuestos en ambos lados de la membrana lipídica;
- la membrana biomimética artificial comprende dos membranas lipídicas y una membrana de polímero electroactivo dispuesta entre dichas dos membranas lipídicas;
- la membrana de soporte es permeable a cualesquiera iones y/o moléculas de las composiciones líquidas;
- 5 – la membrana de soporte es un polímero poroso, silicio o membrana de grafeno;
- cada cámara comprende una entrada para llenar la cámara con el líquido de la composición dada;
- cada cámara comprende una salida para evacuar el líquido al exterior de la cámara;
- ambas cámaras comprenden el mismo líquido con la misma composición y con una concentración idéntica de iones y/o moléculas;
- 10 – una de las cámaras comprende además una sustancia adaptada para la activación del transporte de iones y/o moléculas de las composiciones líquidas entre las dos cámaras con la proteína de transporte, siendo dicha sustancia de activación, por ejemplo, trifosfato de adenosina o cualquier otro fármaco y/o molécula conocida por cualquier experto en la técnica que pueda activar moléculas de transporte;
- una de las cámaras comprende además una sustancia adaptada para la inhibición del transporte de iones y/o moléculas de las composiciones líquidas entre las dos cámaras con la proteína de transporte;
- 15 – una de las cámaras comprende además una enzima que actúa sobre una sustancia cuyo transporte está controlado por las características de las moléculas o iones transportados, siendo dicha enzima, por ejemplo, glucosa oxidasa y dicha sustancia, glucosa;
- las paredes de las cámaras están hechas de silicio, parte del cual es silicio poroso;
- 20 – las cámaras tienen un volumen inferior a 1 cm<sup>3</sup>;
- las membranas tienen un grosor inferior a 100 nm, y preferiblemente inferior a 20 nm.

[0013] La invención también se refiere a una célula de combustible que comprende el dispositivo descrito anteriormente, en la que el dispositivo está adaptado para la creación de un gradiente de pH, y en la que la célula de combustible comprende medios para transformar dicho gradiente de pH en energía. Para tal célula de combustible, el dispositivo comprende una membrana biomimética artificial que incluye un transportador Na<sup>+</sup>/ H<sup>+</sup>, y en la que el líquido comprende NaCl.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, que solo se proporciona con fines ilustrativos y no tiene carácter limitativo y debe leerse con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1 ilustra el principio de un dispositivo de membrana biomimética de la invención;
- La figura 2 ilustra una membrana biomimética artificial de un dispositivo de la invención;
- La Figura 3 ilustra un sistema para probar la operación de un sensor de glucosa biomimético;
- La Figura 4 es un diagrama que ilustra el modelo general compartimental correspondiente al sistema físico de la figura 3.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

##### Dispositivo de membrana biomimética

[0015] La invención propone desarrollar la producción de energía electroquímica utilizando una comprensión de los procesos biológicos y desarrollar dispositivos nanoestructurados correspondientes.

[0016] La invención se basa más concretamente en la producción de energía mediante la creación de gradientes químicos, como resultado de la transformación de la energía química.

[0017] Los canales de agua e iones están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y son muy conocidos por los biólogos y bioquímicos. Son proteínas de transporte cuya producción por técnicas de ingeniería genética es ampliamente conocida. Sin embargo, esta producción no siempre es fácil porque las proteínas transmembranales son difíciles de producir y extraer en cantidades significativas.

[0018] Las membranas biológicas también son ampliamente conocidas; la membrana biológica típica es una bicapa de lípidos, generalmente una bicapa de fosfolípidos.

[0019] Los métodos para crear membranas biomiméticas, que son membranas artificiales con un comportamiento similar al proceso biológico correspondiente, son ampliamente conocidos. Se puede hacer referencia, por ejemplo, a la investigación de Donald Martin publicada en el libro titulado "Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes" (Springer, NY, 2006 - ISBN: 978-0-387-37738-4). Prácticamente cualquier proteína puede insertarse en tales membranas lipídicas biomiméticas.

[0020] La membrana biomimética artificial utilizada en el dispositivo de la invención generalmente comprende tres capas. Dicha membrana compuesta se ilustra en las Figuras 1 y 2. Estas capas son:

- un soporte de membrana físico poroso (llamado membrana de soporte), que generalmente es una membrana de polímero (pero que también puede ser una membrana de silicio poroso, o una membrana de grafeno), permeable a clases conocidas de sustancias;
- una membrana lipídica, generalmente hecha de fosfolípidos, que incorpora una o más proteínas de transporte. Los lípidos están dispuestos para formar una bicapa lipídica. Dicha membrana bicapa lipídica puede tener un grosor de aproximadamente 4 nm;
- una membrana de polielectrolito, también llamada "cushion" de polímero de polielectrolito. Dicha capa (típicamente de alrededor de 40 nm de grosor) se interpone entre la capa de soporte y la bicapa lipídica para maximizar la adhesión de la bicapa lipídica al tiempo que permite una menor viscosidad y una mejor capacidad de difusión lateral en la parte inferior que hace contacto con la membrana de soporte.

[0021] Dicho sistema de membrana mejora las membranas semipermeables existentes de una manera muy significativa. Las membranas semipermeables existentes dependen de la modificación de las características físicas de las membranas para permitir cierto grado de transporte selectivo de moléculas particulares. Por ejemplo, dicha modificación puede incluir una combinación de carga superficial ("humectabilidad") y tamaño de poro ("porosidad") además de la elección del material para la membrana. Sin embargo, este tipo de membrana se limita a poder controlar selectivamente la permeabilidad de los iones y las moléculas más grandes que existen simultáneamente en la mayoría de los fluidos "reales" complejos (por ejemplo, fluidos biológicos, fluidos ambientales).

[0022] La ventaja del sistema de membrana artificial biomimética propuesto es que la permeabilidad del sistema de membrana artificial se controla mediante el uso de proteínas de transporte específicas que existen en las membranas bicapa lipídicas de los sistemas de células vivas. De este modo, la membrana artificial cuenta con la capacidad de seleccionar el ion o la molécula que se va a transportar, de manera similar a como ocurre en los sistemas de células vivas. La mayor parte de la bicapa lipídica proporciona aislamiento para iones y moléculas que no pueden ser transportadas a través de la membrana por las moléculas de transporte biológico incorporadas. Dicha selectividad se puede impartir a la membrana artificial "construyendo" la membrana artificial a partir del conjunto de proteínas de transporte biológico que se extraen de las células vivas.

[0023] Entre las diferentes proteínas de transporte biológico disponibles, podemos citar de forma no limitativa: intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (también llamados  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa), intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (también llamados anti portadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), transportadores de  $\text{Na}^+$ /glucosa, intercambiador  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , transportadores de urea, canales de glucosa pasivos, acuaporina, canales iónicos pasivos (como un canal iónico de gramicidina A, un canal iónico de valinomicina, u otras proteínas de canal iónico aisladas de una célula viva), transportadores de cadmio, o bacteriorrodopsina.

[0024] La membrana biomimética artificial está encerrada en una carcasa, y está dispuesta de tal manera que se proporcionan dos cámaras distintas. Ambas cámaras están adaptadas para recibir un fluido de manera que los únicos intercambios que el sistema permite entre las dos cámaras pueden ocurrir a través de la cámara biomimética.

[0025] Como se ilustra en la figura 1, ambas cámaras pueden estar provistas preferiblemente de una entrada y una salida, para llenar y evacuar respectivamente la cámara con y de un líquido con una composición particular.

#### 45 Principio

[0026] La Figura 1 ilustra el principio del dispositivo de membrana artificial biomimética de la invención.

[0027] Se proporciona una carcasa, que puede construirse como una cámara de difusión. Como se ha explicado, la membrana biomimética separa dos compartimentos de fluido, es decir, dos cámaras distintas que pueden llenarse con un fluido.

[0028] La carcasa se podría miniaturizar en gran medida si se construye con tecnología de oblea de silicio. De hecho, el uso de silicio para las paredes de las cámaras, parte del cual es silicio poroso, permite la construcción de un dispositivo con tecnología MEMS (Micro-ElectroMechanical System o sistema microelectromecánico). Esto puede dar como resultado cámaras de pequeño volumen (aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$  o menos), y membranas ultrafinas (decenas de nanómetros).

[0029] En el ejemplo ilustrado, la membrana biomimética tiene una bicapa lipídica que comprende un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa), un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), y un canal de  $\text{K}^+$  rectificador de entrada.

[0030] Inicialmente, ambas cámaras contienen la misma solución de electrolitos (por ejemplo,  $\text{NaCl} = 150 \text{ mM}$ ,  $\text{KCl} = 150 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ), con la excepción de que la cámara inferior contiene trifosfato de adenosina (ATP).

65

[0031] La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa principal activa utiliza  $\text{P}_i$  de la unión de ATP para transportar activamente iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Este transporte activo es electrógeno y establece gradientes asimétricos de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana.

5 [0032] El antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  activo secundario utiliza la energía potencial establecida por el gradiente de  $\text{Na}^+$  para establecer un gradiente asimétrico de iones  $\text{H}^+$  a través de la membrana.

[0033] El canal de  $\text{K}^+$  rectificador de entrada es necesario para permitir establecer un equilibrio de Nernst para los iones  $\text{K}^+$  a través de la membrana. Curiosamente, este equilibrio de Nernst producirá un potencial eléctrico (por ejemplo, 70-90 mV) que también podría ser útil para aplicaciones nanoelectrónicas posteriores de esta membrana artificial biomimética.

[0034] Dicho dispositivo de membrana artificial biomimética es capaz de generar:

- 15 (i) corriente debida al flujo electrogénico de iones,  
 (ii) un potencial eléctrico a través de la membrana (por ejemplo, 70-90 mV), y  
 (iii) presiones osmóticas significativas debido a los gradientes de iones asimétricos,  
 (iv) líquido purificado, ya que la concentración del líquido en varios solutos se modifica a través de la membrana.

20 [0035] Este principio también se podría adaptar para la fabricación de biosensores.

[0036] Por lo tanto, el dispositivo de membrana biomimética de la invención permite la creación de gradientes químicos que podrían usarse para varios propósitos, como será más evidente a partir del resto de la descripción.

25 Células de combustible biomiméticas

[0037] El dispositivo de membrana biomimética se puede usar primero como fuente de energía eléctrica.

30 [0038] Existen diferentes formas de generar directamente energía eléctrica a partir de gradientes químicos.

[0039] Por ejemplo, recientemente se ha propuesto utilizar una célula de combustible que funciona basándose en una diferencia de pH. Dicha solución se describe con mayor precisión en la solicitud de patente francesa n °06-55296 depositada el 4 de diciembre de 2006.

35 [0040] También se pueden desarrollar otras células de combustible, como la célula de combustible de glucosa donde la fuente de energía es la glucosa, y la célula de combustible de sal donde la fuente de energía es NaCl.

[0041] El dispositivo también puede usarse como fuente de energía mecánica.

40 [0042] En este caso, el dispositivo se puede utilizar, por ejemplo, en un sistema que se basa en gradientes de osmolaridad, como el descrito en la solicitud de patente francesa n °05-50314 depositada el 3 de febrero de 2005, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

45 [0043] El gradiente puede ser el de una molécula específica (glucosa, gluconato) o puede provenir del uso de acuaporinas (transportadores de  $\text{H}_2\text{O}$ ), en cuyo caso lo que se crea es un cambio global de osmolaridad.

[0044] También se puede hacer referencia a los hidrogeles y resinas de intercambio iónico, que reaccionan a los cambios (por ejemplo, en  $\text{Na}^+$  o en  $\text{H}^+$ ) por un cambio de volumen.

50 [0045] El dispositivo de membrana biomimética también se puede usar para activar EAP (polímeros electroactivos) creando una diferencia de voltaje entre las dos caras de dichos dispositivos.

55 Mecanismo de purificación

[0046] El dispositivo de membrana biomimética también se puede utilizar como un mecanismo de purificación.

[0047] En este caso, el dispositivo puede ser un componente de un riñón artificial (control del transporte de  $\text{Na}^+$ ).

60 [0048] El dispositivo se puede usar para controlar la urea (ya sea directamente o a través de un mecanismo similar al de las distintas partes de la nefrona).

[0049] Además, se puede utilizar para controlar la excreción de agua (contribuir al control del balance hídrico) o la desalinización del agua.

65 Sensor biomimético

[0050] El dispositivo de membrana biomimética podría utilizarse como un mecanismo de detección. De hecho, la creación de gradientes de moléculas crea un voltaje que depende del valor inicial de la molécula. Esto se puede utilizar para medir la concentración de la molécula.

5

[0051] Un ejemplo típico sería un sensor de glucosa. En este caso, la proteína transportada podría incluir un SGLT (cotransportador de  $\text{Na}^+$ /glucosa), o un canal iónico activado por ligando. El transportador necesitaría generar un flujo de iones en respuesta a la unión de un ligando o el co-transporte de la molécula detectada. El flujo de iones sería entonces detectado por elementos electrónicos estándar. Las proteínas de transporte adicionales, que se muestran en la Figura 1, se agregarían al principio descrito en la Figura 2 dependiendo de la aplicación y los requisitos de transporte de iones.

10

[0052] La estequiometría del acoplamiento entre el transporte de glucosa y  $\text{Na}^+$  está bien definida, lo que permite un medio bioeléctrico sensible para detectar directamente las moléculas de glucosa. Esta estequiometría depende de la proteína concreta. Por ejemplo, SGLT1 transporta 2 iones  $\text{Na}^+$  con cada molécula de glucosa, y SGLT2 transporta 1 ion  $\text{Na}^+$  con cada molécula de glucosa, y SGLT3 transporta 2 iones  $\text{Na}^+$  con la unión de cada molécula de glucosa. El SGLT3 es un miembro inusual de la familia de los SGLT, porque en realidad no transporta la glucosa pero sí transporta iones  $\text{Na}^+$  a través de la membrana. Se cree que el SGLT3 es el sensor biológico de glucosa para las células neuroendocrinas.

15

20

[0053] Una característica importante es que el transporte del SGLT se basa en un gradiente de  $\text{Na}^+$  existente para transportar glucosa contra su gradiente de concentración. Si no hay un gradiente de concentración de glucosa, el SGLT funcionará como unipuerto para  $\text{Na}^+$  y generará un transporte electrogénico secundario de  $\text{Na}^+$ .

25

[0054] Existen varios inhibidores en la literatura, que incluyen la floridzina, la floretina, la florizina, la p-nitrofenil-glucosa, la  $\beta$ -naftil-glucosa, el cadmio, la isoquercitrina, la espiraeosida, el  $\alpha$ -metil-D-glucósido y el ANP.

[0055] Dependiendo de la proteína SGLT particular, existen varios sustratos en la literatura que incluyen fructosa, D-glucosa, D-manosa, galactosa,  $\alpha$ -metil-D-glucopiranosido,  $\alpha$ -metil-D-glucosa, metilazoximetanol  $\beta$ -D-glucósido, 3-O-metil glucosa, 2-desoxi-D-glucosa, mio-inositol.

30

[0056] La Figura 3 ilustra el sistema físico para realizar experimentos sobre el funcionamiento de un biosensor de glucosa biomimético, con la corriente medida por electrodos en las cámaras superior e inferior. Las referencias utilizadas tienen el siguiente significado:

35

- $U_1(t)$  = entrada de  $\text{Na}^+$  a la cámara superior
- $U_2(t)$  = entrada de glucosa a la cámara superior
- $U_3(t)$  = entrada de solución a la cámara inferior
- $k_{01}$  = salida de la solución de la cámara superior
- $k_{03}$  = salida de la solución de la cámara inferior
- $k_{04}$  = salida de productos de la reacción de glucosa oxidasa
- $k_{31}$  = velocidad de transporte de SGLT1 (directo) para  $\text{Na}^+$
- $k_{32}$  = velocidad de transporte de SGLT1 (directo) para la glucosa
- $k_{13}$  = velocidad de transporte de SGLT1 (inverso) para  $\text{Na}^+$
- $k_{23}$  = velocidad de transporte de SGLT1 (inverso) para la glucosa
- $k_{34}$  = consumo de glucosa por la glucosa oxidasa
- $k_{43}$  = productos de la reacción de la glucosa oxidasa

40

45

[0057] La Figura 4 es un diagrama que ilustra el modelo general compartimental correspondiente al sistema físico. En este diagrama:

50

- El compartimiento 1 representa la concentración de  $\text{Na}^+$  en la cámara superior
- El compartimiento 2 representa la concentración de glucosa en la cámara superior
- El compartimiento 3 representa la concentración de la solución en la cámara inferior
- El compartimiento 4 representa la concentración de glucosa oxidasa en la cámara inferior

55

[0058] El modelo general compartimental se puede describir mediante el siguiente conjunto lineal de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dX_1}{dt} = k_{13}X_3 - (k_{31} + k_{01})X_1 + U_1(t) \quad (1)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{23}X_3 - (k_{32} + k_{02})X_2 + U_2(t) \quad (2)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{31}X_1 + k_{32}X_2 + k_{34}X_4 - (k_{13} + k_{23} + k_{03} - k_{43})X_3 + U_3(t) \quad (3)$$

$$\frac{dX_4}{dt} = k_{43}X_3 - (k_{34} + k_{04})X_4 \quad (4)$$

5 [0059] Se puede desarrollar otro tipo de biosensor. El dispositivo se puede utilizar como un sensor de luz biomimético donde la molécula transportadora será la bacteriorrodopsina. La incorporación de este transportador producirá un sistema de membrana artificial biomimética que responde a la luz de manera análoga a la retina. La bacteriorrodopsina transportará iones H<sup>+</sup> a través de la membrana en respuesta a la luz. Este flujo de iones H<sup>+</sup> se puede detectar utilizando una sonda de pH u otros mecanismos de detección de pH conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo.

10 [0060] También es posible construir microcápsulas tridimensionales fotosensibles. Un sistema de este tipo podría proporcionar una plataforma de vanguardia en la que la luz se utiliza como un interruptor para controlar selectivamente la activación del canal iónico. Por ejemplo, una aplicación obvia de tales sistemas sería en la administración de fármacos o en la selección controlada de sitios de actuación, donde las microesferas huecas se utilizan como agentes de administración y los canales iónicos funcionan para facilitar la liberación controlada de los contenidos de las micropartículas.

15 [0061] Dado que las microcápsulas pueden construirse con un diámetro de 500 nm, se puede unir un conjunto de microcápsulas sensibles a la luz a un sustrato flexible para crear, por ejemplo, una "retina artificial". Este es un enfoque innovador para construir un material fotosensible que se basa firmemente en los principios de la nanobiotecnología. Es decir, los principios biológicos se utilizan para guiar e influir en los materiales y procesos que se desarrollan a partir de la ingeniería y las ciencias físicas para crear una microcápsula novedosa. Debido a que la transducción de la respuesta a la luz por la bacteriorrodopsina produce un gradiente electroquímico debido a los cambios en los flujos iónicos, el conjunto de microcápsulas nanoestructuradas para crear la "retina artificial" podría incorporarse en un soporte flexible como un polímero electroconductor. Tal tecnología de polímeros ya existe. La "lectura" del flujo de iones electroquímico es adecuada para adaptarse a la tecnología de microchips existente. El resultado de dicha tecnología es una membrana delgada, flexible y fotosensible que proporciona la base para dispositivos fotosensores (incluyendo una "retina artificial").

20 Densidad de proteínas de transporte en la membrana biomimética artificial.

30 [0062] Es un requisito general que la membrana biomimética artificial tenga una conductancia global de iones elevada, con el fin de aumentar el rendimiento del dispositivo que integra dicha membrana biomimética.

35 [0063] En teoría, el límite superior es probablemente alrededor de 1 molécula de transporte por 6 moléculas lipídicas. Sin embargo, ese límite superior depende de cómo las proteínas de transporte individuales se empaquetan y ensamblan entre las moléculas de lípidos en la bicapa lipídica, y es un cálculo teórico bastante complejo (depende de las energías de enlace, etc.).

40 [0064] A partir de diferentes experimentos, parece ser que un rango superior típico de densidad de proteínas de transporte a moléculas lipídicas es de aproximadamente 10<sup>5</sup> moléculas lipídicas por cada proteína de transporte. Esto representa una densidad de proteínas de transporte de aproximadamente 10<sup>9</sup> proteínas de transporte por centímetro cuadrado teniendo en cuenta que existen 10<sup>14</sup> moléculas lipídicas por centímetro cuadrado en una membrana lipídica típica.

45 [0065] El principio general para un correcto funcionamiento del dispositivo como célula de combustible es que existe una densidad de moléculas de proteínas de transporte que es al menos suficiente para lograr una corriente eléctrica medible. Las corrientes medibles pueden ser tan bajas como en el rango de los pico-amperios.

[0066] Si las proteínas de transporte individuales tienen una conductancia iónica alta (es decir, vías de resistencia individualmente baja), entonces la densidad de las moléculas de proteína de transporte podría ser bastante pequeña para lograr una corriente eléctrica medible.

5 [0067] Por ejemplo, las proteínas VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje) tienen una conductancia de canal único muy alta de 4nS. Por lo tanto, el rango inferior de densidad de las proteínas VDAC a las moléculas lipídicas es de  $5 \cdot 10^9$  moléculas lipídicas por cada proteína VDAC. Esto representa una densidad de proteínas del canal iónico de  $2 \cdot 10^4$  canales iónicos por centímetro cuadrado.

10 [0068] Si las proteínas de transporte individuales tienen una conductancia iónica baja, entonces la densidad deberá ser mayor para lograr una corriente eléctrica medible.

[0069] Este es, por ejemplo, el caso del transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, que es una enzima que produce una corriente eléctrica relativamente baja. Aun así, con  $6 \cdot 10^{23}$  moléculas por mol, todavía hay una pequeña concentración general de proteínas de transporte de baja conductancia necesaria para producir una corriente medible en el dispositivo.

#### Ejemplos específicos

20 [0070] La primera serie de ejemplos se refiere a un dispositivo A que comprende:

- Una membrana biomimética, que contiene al menos una proteína de transporte, que consiste en:
  - moléculas de fosfolípidos dispuestas preferiblemente en una bicapa para imitar la forma y la composición química de las membranas bicapa lipídicas presentes de manera natural en las células vivas,
  - una membrana polimérica de soporte para soportar la membrana bicapa lipídica,
  - la membrana polimérica de soporte es libremente permeable a iones y moléculas que son transportados por las proteínas de transporte contenidas en la membrana bicapa lipídica,
- dos compartimentos separados por la membrana
  - inicialmente los dos compartimentos están llenos de composiciones líquidas con concentraciones similares de todas las moléculas o iones,
  - uno de los compartimentos puede ser el fluido extra celular.

[0071] En el ejemplo A1, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética A que comprende un único transportador que es el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (dependiente de ATP).

40 [0072] Esto resulta en gradientes de  $\text{Na}^+$ , útiles por su efecto mecánico, o como sistema de purificación (riñón artificial).

[0073] El efecto mecánico es posible gracias al efecto osmótico, ya que 3  $\text{Na}^+$  se intercambian por 2  $\text{K}^+$ . Como ejemplo, con fluidos en las cámaras con una concentración de NaCl de 125 milimoles/L, se pudo establecer un gradiente osmótico de 40 miliOsmoles/L a través de la membrana lipídica mediante el funcionamiento del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que corresponde a una presión de 1 atmósfera. Si hay suficiente ATP, entonces la bomba continuará funcionando y el  $\text{Na}^+$  se eliminará de un lado de la membrana.

50 [0074] Teniendo en cuenta las propiedades del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  para establecer un gradiente electroquímico de 125 milimoles/L de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana, el potencial eléctrico resultante podría ser de 63 milivoltios.

[0075] El efecto mecánico también es posible a través del hinchamiento de resinas de intercambio iónico o de hidrogeles.

55 [0076] En el ejemplo A2, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética A que comprende un único transportador que es el intercambiador de  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ .

[0077] Tal dispositivo conduce a un gradiente de  $\text{H}^+$ , siempre que cualquier sistema enzimático (ureasa, por ejemplo) o sistema biológico (por ejemplo, levadura) produzca  $\text{CO}_2$ . También se podría considerar la eliminación de  $\text{CO}_2$  en el otro lado por la respiración.

60 [0078] En el ejemplo A3, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética A que comprende un único transportador que es un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Un compartimento (Comp1) contiene glucosa oxidasa, mientras

que el segundo compartimento (Comp2) contiene ureasa. Ambos compartimentos contienen inicialmente agua, NaCl, glucosa y urea.

5 [0079] El funcionamiento de las enzimas produce  $H^+$  en el Comp1 y  $OH^-$  en el comp2. El intercambio entre  $Na^+$  y  $H^+$  estadísticamente ocurre mucho más en la dirección de la concentración de  $Na^+$  en comp1. De hecho, después de algún tiempo se alcanzará un estado estacionario donde el intercambiador de  $Na^+/H^+$  transportará iones  $H^+$  del Comp1 al Comp2 a cambio del transporte de iones  $Na^+$  del Comp2 al Comp1. Esto resulta en que los iones  $Na^+$  se concentran en el Comp1 y los iones  $H^+$  se concentran en el Comp2.

10 [0080] Tal dispositivo crea gradientes significativos en  $Na^+$ , útiles para la generación de energía mecánica (mediante ósmosis, resinas de intercambio iónico o hidrogeles), o para la purificación de líquidos.

15 [0081] A partir del dispositivo A3, se crea una célula de combustible de sal, en donde NaCl es la fuente de energía. Una membrana se funcionaliza con el intercambiador de  $Na^+/H^+$ . Inicialmente hay agua pura en ambos lados de la membrana. El NaCl se introduce progresivamente en un lado. Esto crea un gradiente de  $Na^+$ , que activa el intercambio con  $H^+$ . Luego se crea un gradiente de  $H^+$ . Este gradiente se utiliza en una célula de combustible que depende del pH, por ejemplo. Prácticamente cualquier  $H^+$  corresponde a un electrón.

20 [0082] Dicho dispositivo se puede poner en funcionamiento fuera del cuerpo humano, disolviendo progresivamente el NaCl. La ventaja sobre la célula de combustible de glucosa (descrita en la solicitud de patente francesa n°06-55296 depositada el 4 de diciembre de 2006) es que no se requiere ninguna enzima, que la sal es más soluble que la glucosa y que su peso molecular es menor. Por lo tanto, la relación de potencia a masa podría ser mucho mejor que la de una célula de combustible de glucosa. Cada mol de NaCl podría producir un mol de electrón. Si se supone que funciona bajo 5 unidades de gradiente de pH, con una célula de combustible dependiente de pH  
25 donde se intercambia un electrón por cada  $H^+$  producido, esto significa  $5 \times 60 = 300$  mV y, por lo tanto, una potencia teórica máxima para la masa del combustible de  $96500 \times 0,3/58J/g = 500J/g$  (comparable con las mejores baterías, que pueden proporcionar  $160Wh/kg = 576J/g$ ). Sin embargo, también hay que tener en cuenta el peso del agua.

30 [0083] Si se usa dentro del cuerpo humano, ya no es necesario producir ATP, sino gradientes de  $Na^+$ .

[0084] En el ejemplo A4, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética A que comprende un único transportador que es un canal de glucosa pasivo. Este se puede utilizar junto con el dispositivo descrito en la solicitud de patente francesa n°06-55296 depositada el 4 de diciembre de 2006, donde uno de los compartimentos es el fluido extracelular (ECF), y el segundo compartimento contiene glucosa oxidasa que se usa para disminuir el  
35 pH de la glucosa que pasa del ECF al segundo compartimento. En tal situación, la dificultad es la presencia en el ECF de tampones químicos, como el  $HCO_3^-$ . Con la membrana biomimética de A4, la glucosa oxidasa actuará "protegida del tampón", ya que el  $HCO_3^-$  no podrá pasar a través de la membrana del ECF hasta el segundo compartimento.

40 [0085] Esto puede ser interesante, ya sea para facilitar la disminución del pH, o para un efecto osmótico debido a la captura de glucosa en forma de gluconato.

[0086] Al agregar electrodos para medir el potencial en cada lado de la superficie de la bicapa lipídica, es posible  
45 adaptar todos los dispositivos A de la primera serie a los dispositivos B correspondientes a la segunda serie de pruebas, donde el dispositivo se usa para mediciones de voltaje, o como biosensores.

[0087] En la tercera serie de ejemplos, se proporciona un dispositivo C similar a A, donde se utilizan dos transportadores.

50 [0088] En el ejemplo C1, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética C que comprende un intercambiador de  $Na^+/K^+$  (dependiente de ATP) y un intercambiador de  $Na^+/H^+$ .

[0089] Este crea gradientes de  $H^+$ , que pueden ser utilizados para la célula de combustible dependiente de pH.

55 [0090] En el ejemplo C2, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética C que comprende un intercambiador de  $Na^+/K^+$  (dependiente de ATP) y un intercambiador de  $HCO_3^-/Cl^-$ .

[0091] Este se puede utilizar para purificar el agua salada.

60 [0092] En el ejemplo C3, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética C que comprende un intercambiador de  $Na^+/K^+$  (dependiente de ATP) y un SGLTx (intercambiador de  $Na^+/glucosa$ ).

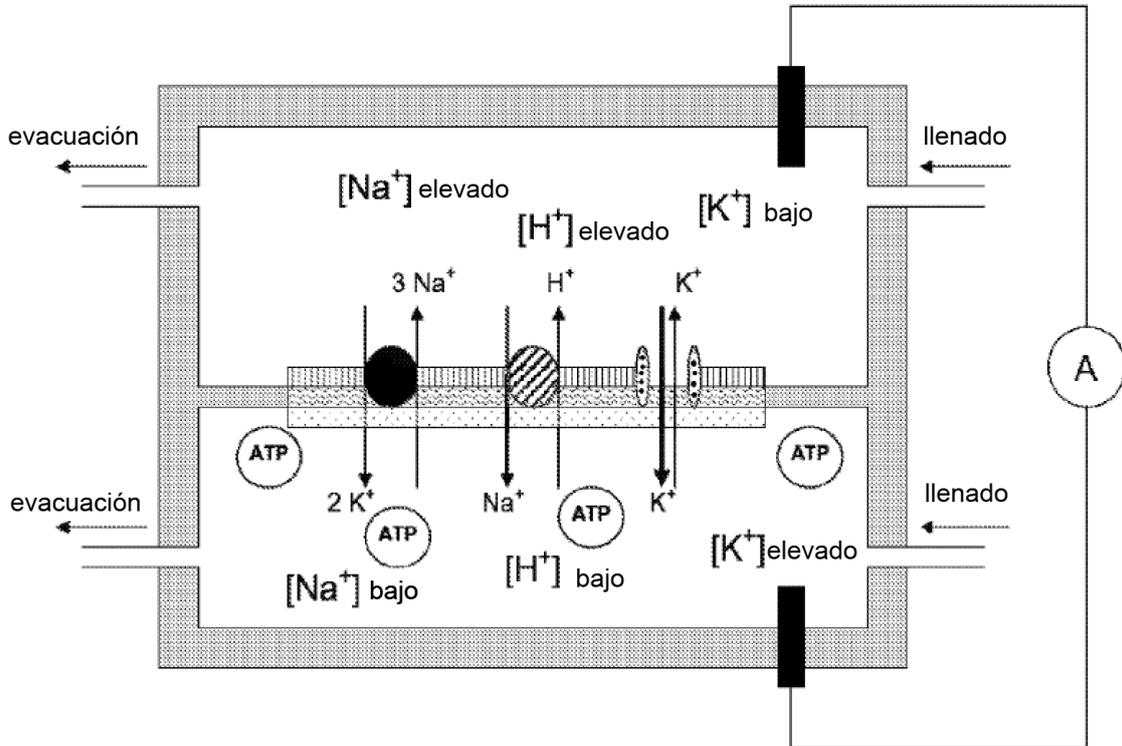
[0093] Este podría ser interesante para usar como una célula de combustible o para eliminar la glucosa. Para esto  
65 último, el compartimento donde se transporta la glucosa contiene una glucosa oxidasa. Sin embargo, esto implica la eliminación del gluconato producido a través de una válvula (el poder que impulsa esta eliminación podría ser el poder osmótico, ya que el gluconato se "atrapa")

- 5 [0094] En el ejemplo C4, se proporciona un dispositivo de membrana biomimética A que comprende un transportador de urea y un transportador de  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ . Este último crea un gradiente de  $\text{Na}^+$ , que luego es utilizado por el primero para concentrar la urea. Alternativamente, se podría usar la glucosa oxidasa para disminuir el pH en un compartimento, y luego una combinación de transportador de urea y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  para concentrar la urea.
- [0095] Este sistema se puede usar para controlar la excreción de urea. Se podría utilizar más precisamente en un riñón artificial implantable.
- 10 [0096] En la cuarta serie de ejemplos, se proporciona un dispositivo D que combina las características del dispositivo B (medición de voltaje) y el dispositivo C (dos transportadores).
- [0097] Por ejemplo, para el sensor de glucosa correspondiente, un gradiente de  $\text{Na}^+$  constante se establece a través de la membrana por la acción del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , con iones  $\text{Na}^+$  concentrados en un lado de la membrana.
- 15 [0098] La unión de una molécula de glucosa al transportador SGLTx une una molécula de glucosa y lleva a un cambio conformacional en el transportador SGLTx, por lo que tanto la molécula de glucosa como dos iones  $\text{Na}^+$  se transportan a través de la membrana.
- 20 [0099] Los electrodos a través de la membrana detectan el cambio de voltaje o corriente causado por el transporte de 2 iones de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana.
- [0100] El sensor funciona detectando un cambio en el voltaje de corriente constante de la corriente que es causado por el cotransporte de moléculas de glucosa e iones de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana por el transportador SGLTx.
- 25 [0101] Se utiliza un circuito eléctrico "de tipo puente" para detectar tales cambios pequeños en el voltaje o la corriente constante debido al transporte conjunto de moléculas de glucosa e iones de  $\text{Na}^+$ .
- 30 [0102] En la quinta serie de ejemplos, se proporciona un dispositivo E en el que un accionador hecho de un polímero electroactivo (EAP) se coloca entre las dos semicélulas de una célula de combustible dependiente de  $\text{H}^+$ .
- [0103] Esto produce un "músculo de combustible", al combinar la disminución del pH utilizando uno de los mecanismos descritos anteriormente, un par redox como el que usamos en la "célula de combustible de glucosa", por ejemplo, la quinhidrona, y un EAP.
- 35 [0104] El establecimiento de contacto eléctrico a través de la resistencia apropiada resultará en la flexión del EAP.
- [0105] Puede ser necesario asociar en serie varias "células de combustible dependientes del pH", para obtener el voltaje requerido para hacer funcionar el EAP.
- 40 [0106] En la sexta serie de ejemplos, se proporciona un dispositivo F que simula un riñón.
- [0107] Con este fin, se proporcionan varios de los dispositivos previos organizados secuencialmente, con el fin de pasar progresivamente de un fluido de entrada a un fluido de salida enriquecido en urea, gracias a la creación sucesiva de gradientes osmóticos y movimientos de urea pasivos.
- 45

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Célula de combustible que comprende una carcasa y una membrana biomimética artificial dispuesta dentro de la carcasa para formar dos cámaras distintas, en donde
- cada cámara está destinada a contener un líquido de una composición dada,
  - la membrana biomimética artificial comprende tres capas distintas:
- 10                   • una membrana lipídica que comprende una pluralidad de moléculas lipídicas dispuestas en una capa;
- una membrana semipermeable de soporte para soportar la membrana lipídica; y
  - una membrana de polielectrolito interpuesta entre la membrana semipermeable de soporte y la membrana lipídica;
- 15 en donde el combustible de la célula de combustible es NaCl, uno de dichos líquidos comprende dicho NaCl para crear un gradiente de Na<sup>+</sup> a través de la membrana biomimética artificial, la membrana lipídica incluye una pluralidad de moléculas lipídicas dispuestas en una bicapa y al menos una proteína de transporte de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> para la creación del gradiente de pH a través de la membrana debido al gradiente de Na<sup>+</sup>, y la célula de combustible comprende además medios para transformar dicho gradiente de pH en energía.
- 20 2. Célula de combustible de la reivindicación 1, en la que la membrana lipídica comprende además un intercambiador de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.
- 25 3. Célula de combustible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además electrodos dispuestos en ambos lados de la membrana lipídica.
- 30 4. Célula de combustible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la membrana semipermeable de soporte es permeable a cualquier ión y/o molécula de las composiciones líquidas.
- 35 5. Célula de combustible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la membrana semipermeable de soporte es una membrana de polímero poroso, silicio o grafeno.
6. Célula de combustible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que cada cámara comprende una entrada para llenar la cámara con el líquido de la composición dada.
- 40 7. Célula de combustible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que cada cámara comprende una salida para evacuar el líquido fuera de la cámara.
8. Célula de combustible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que las paredes de las cámaras están hechas de silicio, parte del cual es silicio poroso.
- 45 9. Célula de combustible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que las cámaras tienen un volumen inferior a 1 cm<sup>3</sup>.
10. Dispositivo de célula de combustible según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las membranas tienen un grosor inferior a 100 nm, y preferiblemente inferior a 20 nm.

Fig. 1



  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (bomba de sodio)

 antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$

 Canal de  $\text{K}^+$  rectificador de entrada Kir7.1

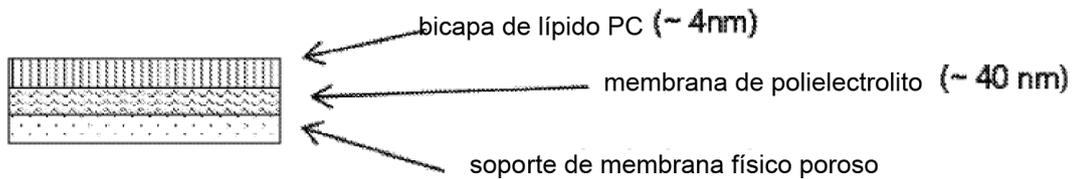


Fig. 2

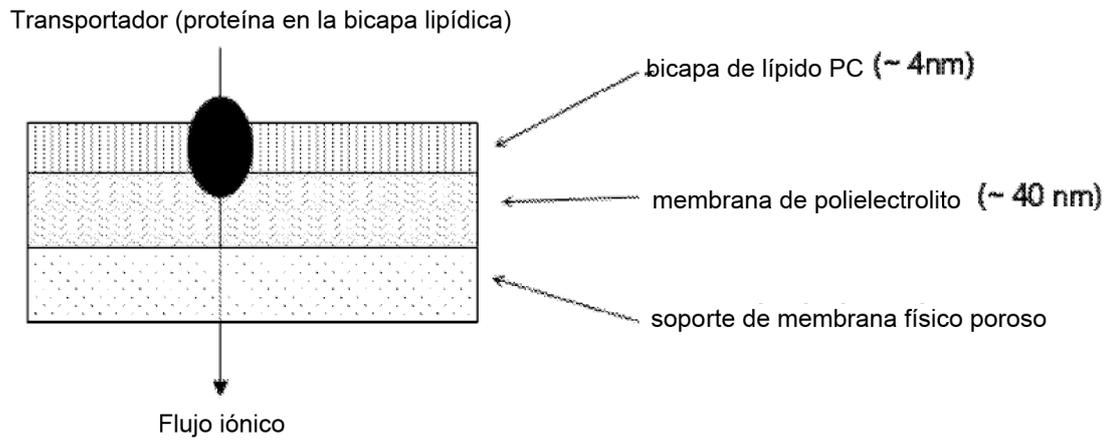


Fig. 3

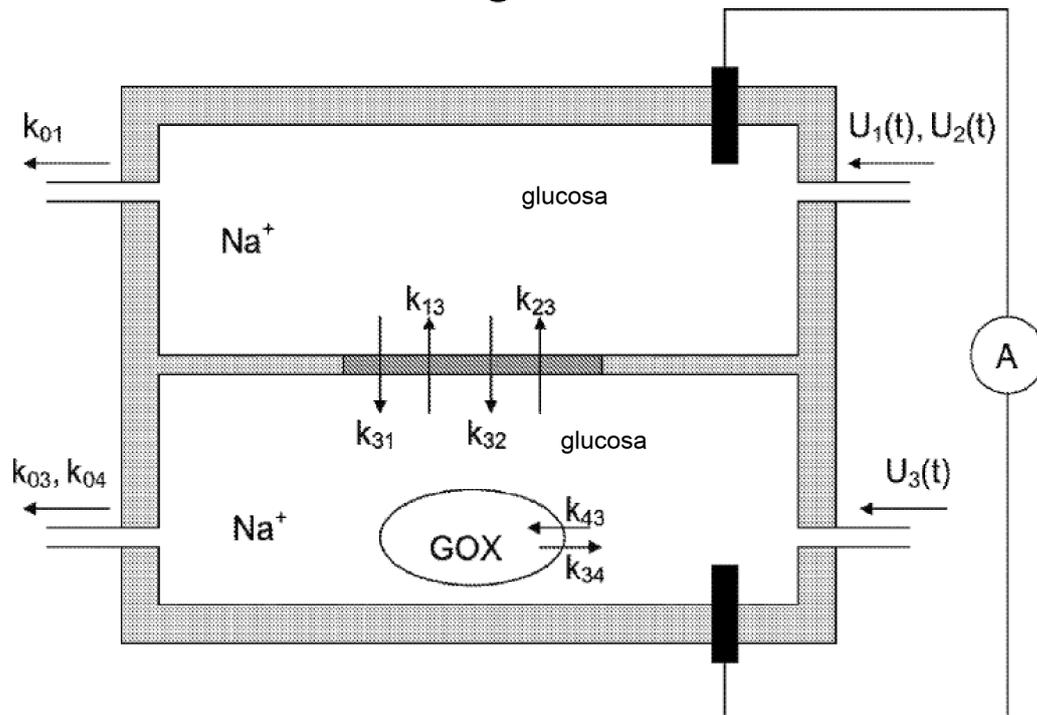


Fig. 4

