

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 281**

51 Int. Cl.:

C08F 220/56 (2006.01)

C08F 220/26 (2006.01)

C09D 133/26 (2006.01)

C09D 143/04 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 10720665 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2430057**

54 Título: **Copolímeros sensibles a la temperatura y usos de los mismos**

30 Prioridad:

15.05.2009 GB 0908372

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

22.01.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.0%)
Oxford Road
Manchester M13 9PL, GB**

72 Inventor/es:

**LU, JIAN y
YANG, LEI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 439 281 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

Copolímeros sensibles a la temperatura y usos de los mismos

5 Esta invención se refiere a copolímeros sensibles a la temperatura, a películas poliméricas formadas a partir de estos copolímeros y a aplicaciones particulares de estas películas poliméricas, particularmente en el campo del cultivo celular. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de estas películas poliméricas en el campo del cultivo celular para proporcionar un medio para controlar la adhesión celular a, y la separación de, la superficie de un sustrato de soporte de cultivo celular.

10

Antecedentes

La capacidad para cultivar células eucariotas y procariotas en un cultivo *in vitro* se utiliza en un amplio intervalo de aplicaciones comerciales y/o de investigación.

15

Ciertos tipos de células pueden cultivarse en cultivos en suspensión, donde las células se dispersan eficazmente o se hacen "flotar" dentro de un medio de crecimiento adecuado, mientras que otros tipos de células, incluyendo muchas células de mamífero, solo se desarrollarán y proliferarán en un medio de cultivo una vez que se han adherido a la superficie de sustratos de soporte adecuados (tales como, por ejemplo, una de las superficies internas de un matraz o placa de cultivo celular).

20

Para mantener la viabilidad a largo plazo de las células cultivadas en un cultivo y evitar la senescencia asociada con una alta densidad celular dentro de un medio de cultivo, es necesario hacer pasar (o "dividir") las células en una base regular. Este proceso implica cultivar un pequeño número de células desde el medio de cultivo maduro y sembrarlas en un medio de cultivo fresco en el que pueden continuar desarrollándose y permanecer viables. También es necesario poder recoger las células de un medio de cultivo de manera que puedan usarse para una aplicación particular. En el caso de cultivos de suspensión, las células pueden recogerse simplemente retirando parte o todo el medio de cultivo de suspensión maduro. Sin embargo, en el caso de células que crecen sobre la superficie de un sustrato de soporte, tal como una superficie interna de una placa o matraz de cultivo celular, las células se adherirán a la superficie de soporte y necesitarán ser separadas, ya sea por agitación mecánica (por ejemplo, raspado o lavado vigoroso y repetido de la superficie de soporte con un fluido) y/o usando enzimas (por ejemplo, tripsina) para digerir los componentes de la matriz extracelular que unen las células a la superficie de soporte. Un problema asociado con estas técnicas enzimáticas y/o mecánicas es que no solo destruyen de forma invasiva las proteínas de unión de célula a célula conduciendo a la liberación celular, sino que también dañan irreversiblemente las proteínas asociadas con la membrana celular dando como resultado la pérdida de parte de la función celular (Yamato et al., J. Biomed. Mater. Res., 1999, 44: 44-52; Shimizu et al., Biomaterials, 2003, 24: 2309-2316; Canavan et al., J Biomed Mater Res, 2005, 75A: 1-13).

25

30

35

40

Por consiguiente, hay una necesidad de enfoques alternativos y mejorados para separar las células de la superficie de un sustrato de soporte.

45

Un enfoque alternativo implica el uso de un polímero sensible a la temperatura, tal como poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) para la recogida de células (Yamada et al., Makromol. Chem. Rapid Commun., 1990, 11: 571- 576). La PNIPAAm y sus derivados presentan una menor temperatura en solución crítica (LCST) en solución acuosa (Kwon et al., Biomaterials, 2003, 24: 1223- 1232). Entre la LCST, el polímero muestra cambios notables en hidratación como respuesta a pequeñas variaciones de temperatura. Las cadenas de PNIPAAm se hidratan para formar una estructura expandida por debajo de la LCST, mientras que por encima de la LCST, las cadenas poliméricas se hidratan y se condensan estructuralmente. Este comportamiento sensible a la temperatura es reversible y está asociado con la formación y destrucción de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y las uniones de amida. Además de su uso en el campo del cultivo celular, la PNIPAAm sensible a la temperatura se ha estudiado para un número de aplicaciones diferentes, incluyendo administración de fármacos y la inmovilización y separación de proteínas.

50

55

En el cultivo celular, una película fina de PNIPAAm normalmente se injerta o recubre sobre las placas de cultivo o membranas comerciales. Las células en su mayor parte se cultivan a aproximadamente 37 °C *in vitro*. A esta temperatura, la película de polímero se deshidrata y su superficie es principalmente hidrófoba y muy adecuada para fijación y crecimiento celular. Tras alcanzar la confluencia, la temperatura se reduce a por debajo de 30 °C y la película fina se hidrata. Tras la hidratación, el volumen de la película se expande y su superficie se hace hidrófila. La combinación de expansión de la película de polímero y su naturaleza hidrófila fuerzan a las células a separarse del sustrato. El uso de un polímero sensible a la temperatura de PNIPAAm para retirar las células adheridas posee un número de ventajas respecto a las técnicas de digestión enzimática o disociación mecánica usadas más habitualmente. En particular, a medida que las células crecen sobre sustratos recubiertos con PNIPAAm se recuperan con solo una caída en la temperatura y las membranas celulares de las células permanecen intactas. En consecuencia, las células mantienen mejor las actividades de crecimiento y función biológica en comparación con aquellas cultivadas usando enzimas o raspadores de células (Canavan et al., J Biomed Mater Res, 2005, 75A: 1-13).

65

Sin embargo, a pesar de los beneficios ofrecidos por la PNIPAAm sensible a la temperatura para el cultivo celular, su uso comercialmente ha permanecido limitado. Esto se debe principalmente a que la mayoría de películas de PNIPAAm se han fijado sobre placas de cultivo o membranas que se generan mediante procedimientos de tratamiento elaborados y caros tales como irradiación por haz de electrones (Yamada et al., Makromol. Chem. Rapid Commun, 1990, 11: 571-576; Kwon et al., Biomaterials, 2003, 24: 1223-1232; Yamato et al., J Biomed Mater Res, 1999, 44: 44-52; Shimizu et al., Biomaterials, 2003, 24: 2309-2316), tratamiento con plasma (Akiyama et al., Langmuir, 2004, 20: 5506-5511; Schmaljohann et al., Biomacromolecules, 2003, 4: 1733-1739; Nitschke et al., Express Polymer Letters, 2007, 1: 660-666), irradiación por UV (Chen et al., Materials Science and Engineering, 2005, 25: 472-478; Matsuda et al., Biomacromolecules 2007, 8: 2345-2349) y enfoques químicos exigentes (Cho et al., Biomaterials, 2004, 25: 5743-5751; Ista et al., Langmuir, 2001, 17: 2552-2555). En cada una de estas reacciones, las superficies se activan y los monómeros se añaden a la solución. La polimerización ocurre y las cadenas de polímero injertadas a la superficie se forman a partir de monómeros injertados directamente sobre la superficie del sustrato. El proceso de polimerización directa de la película sensible a la temperatura sobre la superficie del sustrato es laborioso, consume tiempo y es caro, puesto que a menudo implica una instrumentación y un entorno de laboratorio caros. Por consiguiente, esto ha evitado la aplicación extensa de esta técnica.

Se han descrito también procesos para la polimerización por radicales con transferencia de átomos iniciada en superficie por secuencia viva (SI-ATRP) para crear un copolímero de bloques injertado a la superficie tal como PNIPAAm-PS para fijación y separación celular (Wu et al., Langmuir 2009, 25, 2900-2906 y Yu et al., Langmuir 2010, DOI: 10.1021/la904663m). Sin embargo, es necesario injertar la superficie de óxido de silicio del sustrato con un 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) subyacente, seguido del injerto químico del iniciador de superficie tal como bromuro de bromoisobutirilo (BIBB) o cloruro de cloroacetilo. Como con otros enfoques de polimerización, este método requiere también formación de una película superficial *in situ* sobre la superficie del sustrato. Adicionalmente, como están implicadas muchas etapas, es difícil controlar el crecimiento de la película de superficie, provocando incertidumbre al predecir el espesor y composición de la capa. Tales procesos serán difíciles a gran escala.

La presente invención pretende abordar estos inconvenientes proporcionando un recubrimiento de película polimérica para los sustratos de soporte del cultivo celular que es simple de preparar, barato y fiable.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un medio sencillo, barato y fiable para proporcionar un recubrimiento de película polimérica sensible a la temperatura sobre el sustrato de soporte del cultivo celular, que proporciona una superficie sobre la cual las células pueden crecer y proliferar a la temperatura de incubación, pero que hidrata y separa las células cuando la temperatura se reduce por debajo de la temperatura de incubación.

Breve resumen de la divulgación

La presente invención usa el comportamiento sensible a la temperatura de polímeros que comprenden unidades monoméricas sensibles a la temperatura, tales como N-isopropilacrilamida, para proporcionar recubrimientos de película para sustratos de soporte de cultivo celular. El recubrimiento de película polimérica de la presente invención proporciona un medio dependiente de la temperatura para controlar la adhesión celular a, y la separación de, la superficie del sustrato de soporte de cultivo celular. Los nuevos polímeros sensibles a la temperatura de la presente invención pueden sintetizarse fácilmente usando técnicas de polimerización bien establecidas. Además, los polímeros pueden aplicarse fácilmente a, e inmovilizarse sobre, la superficie de un sustrato de cultivo celular para formar el recubrimiento de película dependiente de la temperatura.

Los polímeros sensibles a la temperatura de la presente invención son copolímeros que comprenden una mezcla de monómeros sensibles a la temperatura y monómeros hidrófobos y/o hidrófilos adicionales. Los copolímeros de la presente invención comprenden también un medio de reticulación para posibilitar que un copolímero se una covalentemente a la superficie del sustrato para evitar la separación durante el uso y proporcionar reticulaciones dentro de la película para mejorar su resistencia e integridad.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un copolímero sensible a la temperatura, un proceso, un sustrato, una solución de recubrimiento, un kit de partes, un método de formación de un recubrimiento de película sensible a la temperatura sobre una superficie del sustrato, un método para separar las células y un método para cultivar las células como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las características opcionales de la invención son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes y la descripción que sigue.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un copolímero sensible a la temperatura para formar un recubrimiento de película sobre la superficie de un sustrato de cultivo celular, comprendiendo el copolímero unidades monoméricas hidrófilas sensibles a la temperatura, unidades monoméricas hidrófobas y/o hidrófilas no sensibles a la temperatura y un medio de reticulación para unir covalentemente el copolímero a la superficie del sustrato.

Las propiedades del copolímero de la invención se seleccionan de manera que forma películas que, a la temperatura

de incubación, típicamente de o aproximadamente 37 °C para las células de mamífero, se deshidratan y proporcionan una superficie hidrófoba sobre la cual las células pueden adherirse, crecer y proliferar. Sin embargo, tras el enfriamiento, el constituyente sensible a la temperatura del copolímero se hidrata e hincha. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que la hidratación y expansión del recubrimiento de película polimérica, junto con su carácter hidrófilo cuando está hidratada, provoca que las células se separen de la superficie.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento, comprendiendo el proceso la polimerización de unidades monoméricas sensibles a la temperatura y una o más unidades monoméricas hidrófobas y/o hidrófilas adicionales.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un sustrato que tiene una superficie sobre la cual las células pueden crecer y dividirse en el cultivo, donde dicha superficie está recubierta con un recubrimiento de película polimérica formado a partir de un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento y dicho recubrimiento de película polimérica está unido covalentemente a la superficie del sustrato.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un recipiente de cultivo celular que comprende un sustrato como se define en este documento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una solución de recubrimiento para recubrir la superficie de un sustrato, comprendiendo la solución de recubrimiento un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento disuelto en un disolvente adecuado.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit de partes que comprende un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento y un disolvente adecuado para disolver el copolímero para formar una solución que posteriormente pueda aplicarse a la superficie del sustrato.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para formar un recubrimiento de película polimérica sensible a la temperatura sobre una superficie de un sustrato, comprendiendo dicho método disolver un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento en un disolvente adecuado para formar una solución, aplicar la solución sobre la superficie del sustrato, retirar el disolvente e hibridar el copolímero a la superficie del sustrato.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para separar las células de la superficie de un sustrato que está recubierto con un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento, comprendiendo el método enfriar el sustrato de manera que el copolímero sensible a la temperatura se hidrate y provocando de esta manera que las células presentes sobre la superficie del sustrato se separen.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para cultivar células que comprende sembrar las células sobre un sustrato como se define en este documento en presencia de un medio de cultivo y mantener la temperatura a una temperatura de incubación para permitir que las células crezcan y se dividan y después reducir la temperatura para cultivar las células.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones particulares de la invención se describen adicionalmente en lo sucesivo en este documento con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es un diagrama que muestra un aparato ejemplar para la formación de un copolímero de PNIPAAm de acuerdo con la presente invención;

La Figura 2 es una ilustración de la estructura molecular de un copolímero de PNIPAAm de la presente invención que muestra las posibilidades para la formación de enlace covalente (por retirada de metanol) cuando la película de copolímero está hibridada (x: y: z = 20:1:1);

La Figura 3 muestra un espectro de FTIR para el copolímero de PNIPAAm;

La Figura 4 muestra representaciones gráficas de los diámetros hidrodinámicos de los copolímeros de PNIPAAm en agua UHQ (Elgastat ultrapuro), distribución en volumen medida por DLS (dispersión de luz dinámica) a diferentes temperaturas;

La Figura 5 es un gráfico que muestra el cambio en los diámetros hidrodinámicos de los copolímeros de PNIPAAm en agua UHQ medido por DLS a diferentes temperaturas;

La Figura 6 es un gráfico que muestra los cambios de espesor de la película de copolímero de PNIPAAm (10 mg/ml) mientras se enfría a 20 °C y se calienta a 37 °C, repetidamente;

La Figura 7 es un gráfico que muestra los cambios de espesor de la película de copolímero de PNIPAAm (5 mg/ml) mientras se enfría a 20 °C y se calienta a 37 °C, repetidamente;

La Figura 8 es un gráfico que muestra los ángulos de contacto con el agua de películas de copolímero de PNIPAAm secas y húmedas y cubreobjetos de vidrio desnudos a 20 °C y 37 °C, respectivamente;

La Figura 9 muestra las imágenes de topografía AFM (izquierda) y fase (derecha) de películas de copolímero de

PNIPAAm con diferentes concentraciones - (A, B): 0,2 mg/ml, exploración 1 μm ; (C, D): 1 mg/ml, exploración 1 μm ; (E, F): 5 mg/ml, exploración 2 μm ; (G, H): 10 mg/ml, (exploración 10 μm);

La Figura 10 muestra imágenes microscópicas de la adhesión a 37 °C (izquierda) y separación a 20 °C (derecha) de células HeLa sembradas con dos películas de diferente espesor recubiertas a concentraciones de 1 (a, B) y 5 (C, D) mg/ml de copolímero (barra de escala izquierda: 500 μm , derecha: 100 μm);

La Figura 11 muestra imágenes microscópicas de la adhesión por encima de la LCST y separación por debajo de la LCST de células HEK293 sembradas a diferentes espesores de películas de terpolímero de PNIPAAm (barra de escala: 500 μm);

La Figura 12 muestra imágenes microscópicas de la adhesión por encima de la LCST y separación por debajo de la LCST de MSC sembradas a diferentes espesores de películas de terpolímero de PNIPAAm (barra de escala: 100 μm (izquierda), 500 μm (derecha));

La Figura 13 muestra imágenes microscópicas de imágenes de tiempo transcurrido de separación de las MSC sembradas por debajo de la LCST en las películas de copolímero de PNIPAAm óptimas (1 mg/ml) (barra de escala: 500 μm);

La Figura 14 muestra imágenes microscópicas de imágenes de tiempo transcurrido de separación de células HEK293 sembradas por debajo de la LCST en películas de copolímero de PNIPAAm óptimas (2 mg/ml) (barra de escala: 500 μm);

La Figura 15 es un diagrama que ilustra la separación de las células de un cubreobjetos de vidrio;

La Figura 16 muestra imágenes microscópicas del crecimiento (izquierda) a 37 °C y separación (derecha) a 20 °C de células de HeLa sembradas sobre las películas de copolímero de PNIPAAm óptimas (5 mg/ml) en diferentes ciclos de cultivo celular (barra de escala: 100 μm);

La Figura 17 muestra imágenes microscópicas del crecimiento (izquierda) a 37 °C y separación (derecha) a 20 °C de células de HEK293 sembradas sobre las películas de copolímero de PNIPAAm óptimas (2 mg/ml) en diferentes ciclos de cultivo celular (barra de escala: 100 μm);

La Figura 18 muestra imágenes microscópicas del crecimiento (izquierda) a 37 °C y separación (derecha) a 20 °C de células de BMMSC sembradas sobre las películas de copolímero de PNIPAAm óptimas (1 mg/ml) en diferentes ciclos de cultivo celular (barra de escala: 100 μm);

La Figura 19 muestra curvas de cultivo celular representadas como una función de aumento en la densidad óptica (DO) medida a partir de ensayos MTT (en el eje Y) frente al tiempo (eje X) para miocitos cardiacos humanos (HCM) cultivados sobre cubreobjetos recubiertos con PNIPAAm contra diversas superficies de control: plástico+película (●) que denota una película termosensible recubierta a partir de una solución 1 mg/ml de copolímero, plástico (Δ) que denota una superficie de TPCS, vidrio (\square) y plástico+lisina (x) que denota una superficie de TPCS desnuda adsorbida con una capa de polilisina. Cada conjunto de datos se tomó a partir de la medida de 3-4 duplicados;

La Figura 20 muestra curvas de cultivo celular representadas como una función del aumento en la densidad óptica (DO) medida a partir de ensayos MTT (en el eje Y) frente al tiempo para células de fibroblastos 3T3 cultivadas en cubreobjetos recubiertos con PNIPAAm (1 mg/ml y 2 mg/ml) frente diversas superficies de control: plástico TPCS desnudo (\diamond), vidrio (\circ), superficies recubiertas a 1 mg/ml (\blacktriangle) y 2 mg/ml (\blacksquare) y plástico+PL (●) que denota una superficie de TPCS desnuda adsorbida con una capa de polilisina;

La Figura 21 muestra los componentes monoméricos del copolímero de PNIPAAm/dodecilmetakrilato con x:y:z:m = 16: 1:1:2.

Descripción detallada

La expresión "sensible a la temperatura" se usa en este documento para hacer referencia a polímeros que experimentan un cambio dependiente de la temperatura en la hidratación. La temperatura a la que ocurre un cambio sustancial en la hidratación polimérica se conoce como temperatura de solución crítica (CST). La temperatura de solución crítica inferior (LCST) es la temperatura crítica por debajo de la cual los copolímeros se hacen altamente miscibles con agua y, en algunos casos, completamente solubles. Por consiguiente, por encima de la LCST el copolímero está altamente deshidratado y por debajo de la LCST el copolímero está altamente hidratado. Los polímeros adecuados de la presente invención tienen una LCST dentro del intervalo de 10 °C a 40 °C. Los polímeros especialmente adecuados poseen una LCST dentro del intervalo de 20 °C a 35 °C. La expresión "sensible a la temperatura" se usa también en este documento para hacer referencia a monómeros que, cuando se polimerizan, forman polímeros sensibles a la temperatura que experimentan un cambio dependiendo de la temperatura de hidratación como se ha analizado anteriormente.

El término "alquilo", a menos que se especifique otra cosa, se usa en este documento para hacer referencia a cadenas de alquilo lineales o ramificadas que tienen de 1 a 20 átomos de carbono.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "que comprende" y "que contiene" y variaciones de las mismas que significan "incluyendo pero sin limitación" y no están destinadas a (y no) excluyen otros restos, aditivos, componentes, enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, debe entenderse que la memoria descriptiva contempla la pluralidad así como la singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Los elementos, enteros, características, compuestos, restos químicos o grupos descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en este documento a menos que sea incompatible con el mismo. Todos los elementos divulgados en esta memoria descriptiva (incluyendo cualquier reivindicación, resumen y dibujo adjunto), y/o todas las etapas y cualquier método o proceso así divulgado, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos algunas de estos elementos y/o etapas son mutuamente excluyentes. La invención no está restringida a los detalles de ninguna de las realizaciones anteriores.

10 **Copolímeros sensibles a la temperatura**

La presente invención proporciona un copolímero sensible a la temperatura para formar un recubrimiento de película sobre la superficie de un sustrato de cultivo celular, comprendiendo el copolímero unidades monoméricas hidrófilas sensibles a la temperatura, unidades hidrófobas y/o hidrófilas y un medio de reticulación para unir covalentemente el copolímero a la superficie del sustrato. Las propiedades del copolímero de la invención se seleccionan de manera que a la temperatura de incubación, típicamente a o de aproximadamente 37 °C para células de mamífero (es decir, entre 35° C y 39 °C), el copolímero se deshidrate y proporcione una superficie hidrófoba sobre la cual las células pueden adherirse, crecer y proliferar. Sin embargo, tras el enfriamiento, el constituyente sensible a la temperatura del copolímero se hincha e hidrata y está presente en una superficie hidrófila para las células presentes en la superficie. Se cree que la hidratación y expansión del recubrimiento de película polimérica junto con su carácter hidrófilo provoca que las células se separen de la superficie.

Adecuadamente, los copolímeros de la presente invención son copolímeros aleatorios formados simplemente mezclando todos los componentes monoméricos entre sí en las proporciones deseadas y realizando la polimerización.

Los copolímeros de la invención pueden tener cualquier estructura básica polimérica adecuada.

En una realización particular de la invención, la estructura básica polimérica se forma por la polimerización de monómeros metacrílicos, acrílicos y/o de bisacrilamida sustituidos.

En una realización particular de la invención, la estructura básica polimérica se forma por la polimerización de monómeros metacrílicos y/o acrílicos sustituidos.

En una realización alternativa, los monómeros tales como metilenbisacrilamida, etilenbisacrilamida, dioxietilenbisacrilamida pueden incorporarse en el copolímero para introducir enlaces de amida en la estructura básica del polímero.

Adecuadamente, se controla el peso molecular del copolímero sensible a la temperatura. Esto posibilita la retirada conveniente de impurezas después de la reacción de polimerización (por ejemplo, los monómeros no reaccionados y fragmentos iniciadores) para proporcionar un producto copolímero sustancialmente puro y también ayuda en el proceso de recubrimiento de película, en particular la formación de películas de copolímero uniformes y reproducibles. En una realización de la invención, el peso molecular del copolímero varía de 10 kD a 500 kD. En una realización adicional de la invención, el peso molecular del copolímero varía de 15 kD a 300 kD. En otra realización más, el peso molecular del copolímero varía de 20 kD a 100 kD.

En una realización particular, la LCST del copolímero es entre 25 °C y 35 °C. En una realización adicional, la LCST es entre 28 °C y 35 °C. En otra realización más, la LCST es de o aproximadamente 30 °C. Tales realizaciones son particularmente adecuadas para aplicaciones de cultivo de células de mamífero, donde las células típicamente se cultivan a temperaturas de incubación de aproximadamente 37 °C.

Adecuadamente, el monómero sensible a la temperatura es el componente principal del polímero. Adecuadamente, la fracción molar del monómero sensible a la temperatura es mayor que 0,3 y más típicamente será mayor que 0,5. En una realización de la invención, la fracción molar del monómero sensible a la temperatura es mayor que 0,3 pero menor que 0,95. En una realización adicional, la fracción molar del monómero sensible a la temperatura es mayor que 0,5 pero menor que 0,95. En otra realización, la fracción molar del monómero sensible a la temperatura es mayor que 0,75 pero menor que 0,95.

Puede usarse cualquier monómero sensible a la temperatura que, tras la polimerización, produce un copolímero como se define en este documento.

Los ejemplos particulares de monómeros sensibles a la temperatura incluyen N-alquil acrilamidas sustituidas y N-alquil metacrilamidas sustituidas tales como N-isopropilacrilamida y N-isopropilmetacrilamida, N,N-alquil acrilamidas di-sustituidas y N,N-alquil metacrilamidas di-sustituidas tales como N,N-isopropilacrilamida y N,N-isopropilmetacrilamida y pueden usarse también monómeros que contienen unidades de óxido de etileno y óxido de propileno. Los ejemplos adicionales de polímeros sensibles a la temperatura adecuados se muestran en el

documento WO2007/144356 (EP 1873205) en la página 6, líneas 9 a 18.

5 En una realización de la invención, los monómeros sensibles a la temperatura se seleccionan entre N-alquil acrilamidas sustituidas y N-alquil metacrilamidas sustituidas tales como N-isopropilacrilamida y N-isopropilmetacrilamida, N,N-alquil acrilamidas di-sustituidas y N,N-dialquil metacrilamidas sustituidas tales como N,N-isopropilacrilamida y N,N-isopropilmetacrilamida o mezclas de las mismas. Los grupos alquilo pueden comprender de 1 a 20 átomos de carbono, adecuadamente de 1 a 16 átomos carbono e incluso más adecuadamente de 1 a 10 átomos de carbono. La naturaleza de la cadena de alquilo (es decir, su longitud y si está ramificado o no) y si el monómero de acrilamida o metacrilamida está mono- o di-sustituido influirá en la naturaleza de la película polimérica formada a partir del copolímero y de su LCST. Un experto en la materia podrá ser capaz de seleccionar un número apropiado de átomos de carbono para el grupo alquilo para modificar las propiedades de la película de copolímero formada a partir del copolímero.

15 En una realización adicional de la invención, el monómero sensible a la temperatura se selecciona entre N-isopropilacrilamida y N-isopropilmetacrilamida o una mezcla de las mismas.

En una realización adicional de la invención, el monómero sensible a la temperatura es N-isopropilacrilamida.

20 Los monómeros hidrófobos sensibles a la temperatura incluyen también monómeros de acrilamida y metacrilamida sustituidos con uno o más aminoácidos hidrófobos, tales como alanina, valina y leucina.

25 Los componentes monoméricos hidrófobos y/o hidrófilos adicionales del copolímero son necesarios para ajustar la hidrofiliia/hidrofobia del polímero, así como la estructura e integridad de la película de recubrimiento finalmente formada por el polímero. Esto posibilita que las propiedades de superficie y estructura de la película de copolímero se optimicen para la adhesión y separación de células. Estos componentes monoméricos hidrófobos y/o hidrófilos adicionales no son significativamente sensibles a la temperatura por debajo de 40 °C y, por lo tanto, se consideran como "no sensibles a la temperatura".

30 Cualquier monómero hidrófobo y/o hidrófilo adicional típicamente estará presente en menores cantidades relativas a los monómeros sensibles a la temperatura. En una realización particular, la fracción molar de los monómeros hidrófobos y/o hidrófilos adicionales estará dentro del intervalo de 0,01 a 0,5. En una realización adicional de la invención, la fracción molar de los monómeros hidrófobos y/o hidrófilos adicionales estará dentro del intervalo de 0,01 a 0,2. En una realización adicional, la fracción molar de los monómeros hidrófobos y/o hidrófilos adicionales estará dentro del intervalo de 0,01 a 0,10.

35 Si está presente un componente monomérico hidrófobo y/o hidrófilo adicional, entonces puede usarse cualquier monómero hidrófobo y/o hidrófilo. En una realización particular de la invención, los monómeros hidrófobos y/o hidrófilos adicionales son monómeros de acrilato N-sustituidos o de metacrilato N-sustituidos. Las uniones éster de los monómeros de acrilato o metacrilato son menos sensibles a la temperatura que, por ejemplo, los grupos amida de los monómeros de acrilamida y metacrilamida sensibles a la temperatura. Los componentes monoméricos que comprenden ésteres de alilo pueden ofrecer también ajustes estructurales e hidrófilos sin interferir con la sensibilidad a la temperatura del copolímero.

45 Los monómeros hidrófobos ejemplares incluyen monómeros de N-alquil acrilato sustituidos o N-alquil metacrilato sustituidos tales como dodecil metacrilato y N,N di-alquil acrilatos sustituidos y N,N di-alquil metacrilatos sustituidos. La longitud de las cadenas de alquilo puede variar de 1 a 20 átomos de carbono (y es adecuadamente de 1 a 16 átomos de carbono). Otros monómeros hidrófobos ejemplares incluyen monómeros de acrilato y metacrilato sustituidos con uno o más aminoácidos hidrófobos, tales como alanina, valina, leucina o isoleucina.

50 Los monómeros hidrófilos ejemplares incluyen N-hidroxiálquil metacrilatos sustituidos o N-hidroxiálquil acrilatos sustituidos, tales como acrilato de hidroxietilo, metacrilato de hidroxietilo o sus homólogos tales como, metacrilato de N-isopropanol o acrilato de N-isopropanol. Los grupos hidroxialquilo pueden comprender de 1 a 20 átomos de carbono, adecuadamente de 1 a 16 átomos carbono, e incluso más adecuadamente de 1 a 6 átomos carbonos. Los monómeros hidrófilos ejemplares adicionales incluyen monómeros de acrilato y metacrilato sustituidos con uno o más aminoácidos hidrófilos, tales como serina y lisina.

60 Para los monómeros tanto hidrófilos como hidrófobos, el número de átomos de carbono seleccionados en la cadena secundaria de alquilo, así como la extensión de cualquier ramificación presente en la cadena, ya esté mono o di-sustituida, y la presencia o ausencia de cualquier grupo sustituyente hidrófilo (por ejemplo uno o más grupos hidroxilo), afectará el carácter hidrófobo/hidrófilo global del copolímero resultante y finalmente a su rendimiento como un recubrimiento de sustrato para aplicaciones de crecimiento y separación celular. Por consiguiente, la selección de los monómeros hidrófobos y/o hidrófilos apropiados posibilita que las propiedades superficiales del copolímero y la película polimérica resultante se optimicen para un tipo de célula particular. Un experto en la materia podrá seleccionar el tipo y el número apropiado de aminoácidos para el grupo secundario hidrófilo e hidrófobo para proporcionar las propiedades deseadas de la película de copolímero formada a partir del copolímero. El medio de reticulación presente en los copolímeros de la invención puede ser cualquier medio adecuado para formar un enlace

covalente entre el copolímero y la superficie del sustrato. Para unir covalentemente el copolímero a la superficie del sustrato es necesario proporcionar grupos reactivos como parte de la estructura del copolímero que sean capaces de reaccionar con los grupos funcionales presentes sobre la superficie del sustrato para formar uniones covalentes. Un experto en la materia podrá seleccionar los grupos funcionales adecuados para este fin.

5 Los materiales de sustrato usados habitualmente incluyen vidrio, acero inoxidable y superficies de plástico tratadas. Estas superficies poseen grupos hidroxilo en superficie que pueden utilizarse para reaccionar con los grupos funcionales presentes en la estructura del copolímero para formar un enlace covalente. Otras superficies pueden poseer grupos amina funcionales que pueden usarse para formar enlaces covalentes con el medio de reticulación del copolímero.

10 Por consiguiente, en una realización particular, el medio de reticulación está adaptado para reaccionar con grupos amina y/o hidroxilo funcionales presentes en la superficie del sustrato.

15 Adecuadamente, el medio de reticulación forma adicionalmente un enlace covalente entre los polímeros adyacentes o entre monómeros adyacentes de la misma cadena polimérica.

20 En una realización de la invención, el medio de reticulación es un grupo reactivo funcional presente como parte de las unidades monoméricas sensibles a la temperatura o hidrófilas/hidrófobas.

25 En realizaciones adicionales de la invención, el medio de reticulación es un constituyente monomérico adicional del copolímero que tiene un grupo funcional que reacciona con grupos funcionales presentes sobre la superficie del sustrato. Por consiguiente, en tales realizaciones, la invención proporciona un copolímero sensible a la temperatura para formar un recubrimiento de película sobre la superficie de un sustrato de cultivo celular, donde el copolímero comprende unidades monoméricas hidrófilas sensibles a la temperatura, unidades monoméricas hidrófilas y/o hidrófobas y un componente de monómero de reticulación para unir covalentemente el copolímero a la superficie del sustrato.

30 En una realización particular de la invención, el medio de reticulación es un grupo de reticulación de silano que se incorpora a la estructura del copolímero. Los ejemplos particulares de los grupos de reticulación de silano adecuados incluyen grupos metoxisilano, tales como trimetoxisilano, grupos etoxisilano, tales como trietoxisilano y/o halosilanos, especialmente clorosilanos tales como triclorosilano.

35 En una realización, el medio de reticulación es un grupo de reticulación de silano seleccionado entre un grupo metoxisilano, tal como trimetoxisilano y/o grupos etoxisilano, tal como trietoxisilano.

En una realización adicional, el medio de reticulación es un clorosilano tal como triclorosilano.

40 En una realización adicional de la invención, el reticulante de silano está presente como grupo funcional sobre un componente monomérico adicional de la estructura básica del copolímero. Un ejemplo particular de tal componente monomérico es metacrilato de 3-trimetoxisilanopropilo, metacrilato de 3-trietoxisilanopropilo. Cualquier otro grupo de reticulación o aquellos con diferentes longitudes de la cadena de carbono espaciadora respecto al doble enlace acrílico o metacrílico también serán suficientes.

45 Como una alternativa, el concepto de reticulación usando compuestos de proteína natural tal como proteínas de mejillón podría utilizarse también para promover la formación de enlaces covalentes entre el sustrato y la película de copolímero sensible a la temperatura [Lee et al., Adv. Mater. 2008, 20, 1619-1623]. La potenciación de esa reticulación puede asegurarse por aplicación de un recubrimiento de imprimación de un copolímero sintético que contiene grupos funcionales tanto amina como catecol. La investigación extensiva ha demostrado que estas moléculas de catecolamina son capaces de mediar la adhesión a la mayoría de superficies de metal noble, orgánicas e inorgánicas, mimetizando el comportamiento de adhesión fuerte de las proteínas de mejillón.

50 La ausencia de grupos funcionales de la superficie, tales como grupos amina e hidroxilo, sobre algunas superficie de sustrato puede conducir a la separación de la película sensible a la temperatura. En tales casos, podría usarse un recubrimiento de imprimación adecuado para facilitar la formación de enlaces covalentes entre el sustrato y la película sensible a la temperatura. El recubrimiento de imprimación se aplica a la superficie del material de sustrato y comprenderá una cantidad suficiente de grupos funcionales, tales como grupos amina y/o hidroxilo, para que el copolímero sensible a la temperatura se injerte a la misma. Puede usarse cualquier recubrimiento de imprimación adecuado.

60 De esta manera, muchos de los enfoques de reticulación existentes pueden descartarse para conseguir el presente objetivo de formación de una película de copolímero sensible a la temperatura y esta invención no pretende quedar ligada a ningún enfoque específico en lo que respecta al esfuerzo de promover la unión de la película sensible a la temperatura.

65 Adecuadamente, el medio de reticulación está adaptado para iniciar la reticulación con los grupos funcionales

presentes sobre la superficie del sustrato y dentro de la película por calentamiento o radiación UV. Adecuadamente, la reticulación ocurre durante la hibridación y/o esterilización de la película polimérica.

5 El medio de reticulación está presente adecuadamente en una cantidad suficiente para formar reticulaciones suficientes dentro de la película de copolímero y entre la película de copolímero y la superficie del sustrato para formar un recubrimiento de película duradero y robusto.

10 En una realización particular, el medio de reticulación está presente entre el 0,1 y el 50 % de las unidades monoméricas presentes en el polímero. En una realización adicional, el medio de reticulación está presente entre el 0,1 y el 10 % de las unidades monoméricas presentes en el polímero. En una realización adicional, el medio de reticulación está presente entre el 0,1 y el 5 % de las unidades monoméricas presentes en el polímero.

15 Para la fijación y crecimiento celular, los aminoácidos a menudo son los mejores constituyentes químicos para la biocompatibilidad de la superficie. De esta manera, los sustituyentes en las cadenas laterales de copolímero o estructura básica pueden incluir aminoácidos como se ha indicado anteriormente. Cualquier aminoácido adecuado o secuencias peptídicas pueden utilizarse como sustituyentes sobre el polímero. Hay unos 20 aminoácidos naturales y muchos homólogos *de novo*, y la elección de la combinación apropiada depende del cultivo celular particular y de las condiciones operativas. Adicionalmente, la fijación y crecimiento de las células a menudo requiere secuencias de aminoácidos particulares tales como RGD, RGDS o secuencias peptídicas tales como factores de crecimiento. Estas secuencias peptídicas cortas y largas y proteínas pueden unirse a los monómeros de metacrilamida o acrilamida para la copolimerización. Pueden unirse también para preformar una película con ayuda de otro reticulante, tal como bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol (EGS).

20 La adsorción física de los polipéptidos, proteínas de matriz extracelular o factores de crecimiento sobre superficies de película de copolímero termosensible puede conducir también a la mejora de la fijación y crecimiento celular como ya se ha demostrado con otras superficies (Moran et al. J. R. Soc. Interface 2007, 4, 1151-1157; Yaseen et al., Biomaterials 2010, 31, 3781-3792).

25 En una realización particular de la invención el copolímero es poli(N-isopropilacrilamida co-hidroxipropil metacrilato (HPM)-co-3-trimetoxisililpropil metacrilato (TMSPM)), que se abrevia "copolímero de PNIPAAm". La N-isopropilacrilamida es el monómero principal y proporciona el componente sensible a la temperatura del polímero. El metacrilato de hidroxipropilo es un componente hidrófilo no sensible a la temperatura. Los grupos hidroxilo adicionales proporcionados por el metacrilato de hidroxipropilo hacen que las películas resultantes formadas a partir de este copolímero sean más hidrófilas y contribuyen también a la suavidad de la película. El metacrilato de 3-trimetoxisililpropilo proporciona los medios de reticulación. Las estructuras químicas de estas unidades monoméricas se muestran en la Figura 2. En este tipo de copolímero, un conjunto representativo de proporciones molares de NIPAAm:HPM:TMSPM es 0,9:0,05:0,05 o una proporción de monómero de 20:1:1.

30 En una realización adicional de la invención, el copolímero es un copolímero de PNIPAAm como se ha definido anteriormente que comprende adicionalmente, como un monómero hidrófobo adicional, tal como, por ejemplo, dodecilmecrilato. En una realización ejemplar, el copolímero es NIPAAm:HPM:TMSPM:dodecilmecrilato, opcionalmente con una proporción de monómero de 16:1:1:2.

45 Síntesis

La presente invención proporciona un proceso para la preparación de un copolímero sensible a la temperatura como se ha definido en este documento, comprendiendo el proceso la polimerización de unidades monoméricas sensibles a la temperatura y una o más unidades monoméricas hidrófobas y/o hidrófilas adicionales.

50 Cuando el copolímero comprende un medio de reticulación que está presente en un componente monomérico adicional de la estructura de copolímero, el proceso comprenderá en consecuencia la polimerización de monómeros sensibles a la temperatura, uno o más monómeros hidrófobos y/o hidrófilos adicionales y los monómeros de reticulación.

55 Cualquier proceso de polimerización adecuado conocido en la técnica podrá utilizarse para formar los copolímeros de la presente invención y un experto en la materia apreciará que el proceso de polimerización particular seleccionado estará dictado por la naturaleza de los monómeros en cuestión. Un experto en la materia será capaz de seleccionar las condiciones de polimerización apropiadas, incluyendo la selección de las condiciones de reacción (por ejemplo, temperaturas de reacción, tiempos de reacción) y la selección de cualquier reactivo adicional que se requiera (por ejemplo, catalizadores e iniciadores de reacción).

60 En las realizaciones de la invención donde se usan monómeros metacrílicos o acrílicos, el copolímero puede formarse disolviendo los monómeros juntos en un disolvente adecuado e iniciando la polimerización de los monómeros usando luz ultravioleta o iniciador químico, tal como AIBN (azobisisobutironitrilo). El copolímero resultante puede purificarse después y recogerse por cualquier medio adecuado, tal como por ejemplo, precipitando el copolímero en presencia de un no disolvente adecuado para el copolímero (tal como n-hexano).

Puede usarse cualquier disolvente adecuado para las reacciones de polimerización definidas en este documento. Los ejemplos particulares de disolventes adecuados incluyen metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol y acetona.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un copolímero sensible a la temperatura que puede obtenerse por cualquiera de los procesos definidos en este documento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un copolímero sensible a la temperatura obtenido por cualquiera de los procesos definidos en este documento.

10

Formación de la película de copolímero sensible a la temperatura

La presente invención proporciona también un método para formar un recubrimiento de película sensible a la temperatura sobre la superficie de un sustrato, comprendiendo dicho método disolver un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento en un disolvente adecuado para formar una solución, aplicar la solución sobre la superficie de sustrato, retirar el disolvente e hibridar el copolímero a la superficie del sustrato.

15

Retirar los depósitos de disolvente del copolímero. El copolímero depositado se calienta adecuadamente para hibridarse a la película de copolímero.

20

En una realización particular, el método comprende adicionalmente una etapa adicional de esterilizar el sustrato.

Puede usarse cualquier medio adecuado para aplicar la solución sobre la superficie del sustrato. Por ejemplo, la solución puede verterse o pulverizarse sobre la superficie del sustrato. Como alternativa, pueden usarse también técnicas tales como recubrimiento por centrifugación o recubrimiento por inmersión.

25

El disolvente puede retirarse permitiendo que se evapore a temperatura ambiente o por calentamiento del sustrato para provocar que el disolvente se evapore.

30

Puede usarse cualquier disolvente adecuado capaz de disolver el copolímero sensible a la temperatura de la presente invención y que sea suficientemente volátil para retirarlo fácilmente de la superficie del sustrato por evaporación, para formar la solución. Los ejemplos particulares de disolventes adecuados incluyen metanol, etanol, propanol y acetona. También es adecuado cualquier disolvente mixto que tenga en cuenta el equilibrio hidrófilo e hidrófobo de los copolímeros, una mezcla binaria de etanol/hexano o una mezcla de etanol/hexano o una mezcla de etanol/cloroformo/hexano.

35

La película de copolímero puede hibridarse por calentamiento a una temperatura deseada. La temperatura requerida variará dependiendo de la naturaleza del medio de reticulación. Para copolímeros que contienen grupos de reticulación de TMSPM, las temperaturas de hibridación preferibles varían de 50-100 °C y el tiempo de hibridación de 0,5 a 4 horas, aunque las condiciones precisas pueden depender del tipo de sustrato usado, tal como plásticos (por ejemplo, placas y recipientes de plástico para cultivo tisular, poliestirenos), vidrio, acero inoxidable. Las temperaturas de hibridación superiores pueden potenciar el grado de reticulación entre el copolímero y el sustrato y dentro de la película de copolímero, mejorando el injerto de la película sobre la superficie del sustrato mientras que se restringe la extensión de la expansibilidad de la película.

40

45

En una realización particular de la invención, el medio de reticulación reacciona con los grupos funcionales presentes sobre la superficie del sustrato para unir covalentemente la película de copolímero a la superficie de sustrato durante las etapas de hibridación y/o esterilización del proceso.

50

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una solución de recubrimiento para recubrir la superficie de un sustrato, comprendiendo la solución de recubrimiento un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento disuelto en un disolvente adecuado como se ha definido anteriormente.

55

En una realización particular de la invención, la solución de recubrimiento comprende un copolímero sensible a la temperatura de la presente invención disuelto en el etanol.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un recubrimiento de película de copolímero que puede obtenerse por uno cualquiera de los procesos definidos en este documento.

60

En una realización particular, la película polimérica puede comprender un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento como el único material copolimérico presente en la película.

En una realización alternativa, la película polimérica puede comprender polímeros adicionales tales como, por ejemplo, aminoácidos, péptidos bioactivos o factores de crecimiento.

65

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit de partes que comprende, como un primer

componente, un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento y, como un segundo componente, un disolvente adecuado para disolver el copolímero para formar una solución que posteriormente puede aplicarse a la superficie del sustrato.

- 5 Adecuadamente, el kit de partes comprende adicionalmente instrucciones que detallan cómo usar las partes constitutivas del kit.

Las partes constitutivas del kit también son preferentemente estériles, de manera que pueden aplicarse asépticamente a la superficie del sustrato.

10

Propiedades de la película de copolímero

Las películas poliméricas formadas por los copolímeros de la presente invención proporcionan una superficie sobre la cual las células pueden crecer en cultivo, y después separarse mediante una reducción en la temperatura (por debajo de la LCST) y recogerse. Para conseguir este objetivo, es deseable que las películas de copolímero sean uniformes en espesor y propiedades superficiales, y estén unidas adecuadamente a la superficie del sustrato (tal como para evitar la separación durante el uso).

15

Una característica adicional de las películas de copolímero de la presente invención es que, a una temperatura de o aproximadamente las temperaturas de incubación usadas habitualmente en los procesos de cultivo celular, típicamente de o aproximadamente 37 °C para cultivos de células de mamífero (es decir, entre 35 °C y 39 °C), las unidades monoméricas sensibles a la temperatura del copolímero se deshidratan de manera que la película polimérica presenta una superficie hidrófoba a la que las células pueden adherirse y crecer. Sin embargo, cuando la temperatura disminuye por debajo de la LCST del copolímero (que para cultivos de células de mamífero es preferentemente entre 20 °C y 35 °C), los monómeros sensibles a la temperatura se hidratan. Esta hidratación provoca que la película de copolímero se hinche y presente una superficie más hidrófila a las células adheridas a la superficie de la película. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que el hinchamiento de la película de copolímero y la naturaleza más hidrófila de la superficie da como resultado que las células se separen de la superficie del sustrato.

20

25

30

El espesor de la película polimérica estará dictado por la concentración de la solución de recubrimiento utilizada durante la formación de la película de copolímero, así como la velocidad de elevación utilizada en el recubrimiento por inmersión o la velocidad de centrifugación en los procedimientos de recubrimiento por centrifugación. La naturaleza del disolvente y la temperatura del recubrimiento pueden afectar también al espesor y uniformidad de la película. Para tipos de células particulares habrá un espesor de película óptimo y otras propiedades de superficie que proporcionan adhesión y separación óptimas, que pueden controlarse variando la concentración de la solución de recubrimiento mientras se mantienen todas las demás condiciones de recubrimiento constantes. Adecuadamente, las películas de copolímero son nanopelículas que tienen un espesor en el intervalo de nanómetros.

35

40

Las Figuras 6 y 7 muestran que la concentración de la solución de recubrimiento afecta al espesor de la película. El aumento de la concentración en solución del recubrimiento aumenta el espesor de la película. El control del espesor de la película puede ser crítico para conseguir una separación de células eficaz porque los diferentes tipos de células requieren películas de diferentes espesores para una adherencia y separación óptimas. La Tabla 1 en el Ejemplo 6 muestra que las células HeLa se separan mejor cuando las películas de copolímero particulares eran de aproximadamente 5-15 nm de espesor (espesor en seco). En contraste, el espesor de película óptima para la separación de las células BMMSC y células HEK293 era mucho más fino. Cuando se hidratan, estas películas de copolímero se expandirían bastante extensivamente, pero la extensión exacta de expansión depende de la temperatura de solución como resulta evidente también de las Figuras 6 y 7. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, el intervalo de espesor óptimo para un tipo particular de células puede variar con la composición exacta del copolímero y las condiciones usadas para el recubrimiento con película e hibridación. También se espera que estas condiciones sea probable que afecten a la estructura interna de la película y las propiedades de la superficie externa, que inevitablemente afectarán a la respuesta a la temperatura de la película y su interacción con la superficie externa de la célula. Los cambios en las propiedades de la superficie externa están marcados por las variaciones en el ángulo de contacto con la superficie. La Figura 8 muestra ejemplos de variaciones en el ángulo de contacto con la superficie con el espesor de la película (controlado por la concentración de polímero) en condiciones en seco y en húmedo. En este sentido, la necesidad de diferentes espesores de película por diferentes células de mamífero se ve claramente reflejada por la necesidad de diferentes propiedades de la superficie. Los cambios en la composición del copolímero y las condiciones de hibridación pueden dar como resultado un conjunto diferente de relaciones para conseguir propiedades de la superficie externa similares y expansibilidad de la película para adherencia y separación de un tipo de célula dado.

45

50

55

60

Sustratos para el cultivo celular

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un sustrato que tiene una superficie sobre la cual las células pueden crecer y dividirse en cultivo, donde dicha superficie está recubierta con un recubrimiento de película polimérica formado a partir de un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento y dicho

65

recubrimiento de película polimérica está unido covalentemente a la superficie del sustrato.

En una realización particular, el sustrato es la superficie interna del recipiente de cultivo celular que puede usarse para desarrollar las células en el medio de cultivo. Por consiguiente, este puede ser cualquier recipiente tal como, por ejemplo, un matraz o placa de cultivo celular. De esta manera, un aspecto particular de la presente invención proporciona un recipiente de cultivo celular que tiene una superficie de sustrato sobre la cual las células pueden desarrollarse y propagarse en el medio cultivo, donde dicha superficie está recubierta con un recubrimiento de película polimérica formado a partir de un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento y dicho recubrimiento de película polimérica está unido covalentemente a la superficie.

En una realización alternativa, el sustrato es un artículo separado que puede colocarse dentro de un recipiente de cultivo celular como se define en este documento. El artículo puede ser un cuerpo sólido que está provisto de un recubrimiento del copolímero de la presente invención o, como alternativa, puede ser poroso, por ejemplo en forma de una malla.

De esta manera, en un aspecto adicional la presente invención proporciona un artículo configurado para colocarlo dentro de un recipiente de cultivo, comprendiendo dicho artículo un material de sustrato recubierto con una película polimérica que comprende un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento y donde dicho recubrimiento de película polimérica está unido covalentemente a la superficie del sustrato.

El sustrato puede formarse a partir de cualquier material adecuado. Adecuadamente, la superficie comprende grupos funcionales adecuados que pueden utilizarse para formar enlaces covalentes con el medio de reticulación presente en los copolímeros de la invención. Los ejemplos particulares de los sustratos adecuados incluyen metales nobles, aceros inoxidable, materiales compuestos cerámicos, incluyendo TiO_2 , vidrios (SiO_2) y plásticos tratados y otros sustratos tales como poliestirenos, PMMA, Teflón, vidrios orgánicos. Para superficies que son difíciles de unir con la película de copolímero sensible a la temperatura debido a cualquier desajuste en la hidrofobia o ausencia de grupos funcionales adecuados (por ejemplo grupos amina y/o hidroxilo), puede usarse un recubrimiento de imprimación para promover la adhesión con el sustrato así como la presentación de grupos amina e hidroxilo para que se ancle el copolímero sensible a la temperatura.

Aplicaciones

Los sustratos recubiertos definidos en este documento pueden usarse en cultivo celular para proporcionar superficies a las que las células puedan adherirse y crecer.

De esta manera, la presente invención proporciona un método para cultivar células que comprende sembrar las células sobre un sustrato como se define en este documento en presencia de un medio de cultivo y mantener la temperatura a la temperatura de incubación para permitir que las células crezcan y se dividan, y después reducir la temperatura para recoger las células.

La temperatura se reduce adecuadamente por debajo de la temperatura de incubación para separar las células del sustrato. Las células se recogen adecuadamente extrayendo el medio de cultivo.

Adecuadamente, la temperatura se reduce por debajo de 35°C (preferentemente 30°C o menor, más preferentemente 25°C o menor). Esto puede conseguirse simplemente retirando el cultivo de la incubadora y dejando que se enfríe a temperatura ambiente. Como alternativa, puede enfriarse de alguna otra manera, por ejemplo por refrigeración o por aplicación de medios de cultivo enfriados. Una vez que el cultivo se ha dejado enfriar durante un tiempo suficiente, las células pueden recogerse por extracción del medio de cultivo en el que estarán presentes las células separadas. El sustrato después puede reutilizarse o descartarse.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona también un método para separar las células de una superficie del sustrato que está recubierta con un copolímero sensible a la temperatura como se define en este documento, comprendiendo el método enfriar los sustratos de manera que el copolímero sensible a la temperatura se hidrate y, de esta manera, provoque que las células presentes sobre la superficie del sustrato se separen.

Enfriar el sustrato implica adecuadamente enfriar el sustrato a una temperatura por debajo de la temperatura de incubación.

Los copolímeros sensibles a la temperatura y sustratos de la invención proporcionan un número de ventajas. En particular, el proceso de recubrimiento es fácil de implementar y puede recubrirse cualquier tamaño y forma del sustrato o recipiente de cultivo celular (por ejemplo matraces, tubos y biorreactores). El proceso puede aumentarse de escala fácilmente para posibilitar la producción en masa.

Usando los matraces recubiertos con película de copolímero, se ha demostrado que las células HeLa, células HEK293 y células MSc de ratón cultivadas a 37°C para las superficies del sustrato provistas de un recubrimiento de copolímero de acuerdo con la presente invención eran capaces de separar estas células tras disminuir la

temperatura por debajo de 20 °C, mostrando la eficacia del recubrimiento de la superficie. Adicionalmente, el sustrato del cultivo celular podría reutilizarse sin necesidad de limpieza superficial. Este beneficio es muy atractivo para el desarrollo de matraces de cultivo celular sin enzimas y reutilizables, y también es eficaz para recubrimientos de recipientes de biorreactor y estructuras de tejido tales como las superficies interna y externa de un modelo de venas y arterias. Pueden usarse los mismos enfoques también para producir películas 2D de células cutáneas, células del endotelio vascular y miocitos cardiacos. Como los dispositivos de cultivo de microfluidos se están haciendo cada vez más populares para estudiar el crecimiento celular acoplado con la flexibilidad para un control delicado y manipulación de las interacciones célula-célula, los recubrimientos de superficie que usan nuestros polímeros permitirán un control fiable de la química de la superficie cuando se reutilizan los dispositivos.

Ejemplos

La invención se describirá ahora con mayor detalle en relación a los siguientes ejemplos ilustrativos.

Materiales

El monómero de NIPAAm se adquirió en Wingch (China); tenía una pureza por encima del 98 % y estaba recién recristalizado en hexano, seguido de secado por congelación antes de su uso. Los monómeros de metacrilato de hidroxipropilo (HPM) y metacrilato de dodecilo (DM) se adquirieron en Aldrich. Los cubreobjetos de vidrio o agente de reticulación de silicio de metacrilato de 3-trimetoxisilpropilo (TMSPM) se adquirieron también en Aldrich. El iniciador 2,2-azobisisobutironitrilo (AIBN) se adquirió en BDH (RU) y se recristalizó totalmente en etanol seguido de secado por congelación antes de su uso. Los disolventes incluyendo etanol, acetona y n-hexano fueron proporcionados por Aldrich.

El agua usada se procesó usando un sistema Elgastat ultrapuro (UHQ). Las obleas de silicio se adquirieron en Compart Technology Ltd (RU) y se cortaron en cortes de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ antes de su uso. Se limpiaron con una solución de Decon al 5 %, seguido de enjuagado con agua UHQ. Los cubreobjetos de vidrio con un diámetro de 13 mm se adquirieron en VWR (Bélgica). Todos los recipientes de plástico (excepto aquellos para un solo uso en el cultivo celular) se limpiaron empapándolos con una solución de Decon al 5 %. Toda la cristalería se sumergió en solución pirafña (H_2O_2 : $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1:3$ en volumen) durante 30 min, seguido de enjuagado abundantemente con agua corriente y agua UHQ.

El cultivo celular implicaba el uso de medio de Eagle modificado por Dulbecco-bajo contenido de glucosa (DMEM-LG), penicilina-estreptomicina, ampicilina sódica de Sigma; suero bovino fetal (FBS), ácido tripsina+etilendiamina tetraacético (EDTA), azul de tripano y solución salina tamponada con fosfato (PBS) de GIBCO.

Ejemplo 1 - La síntesis de poli(N-isopropilacrilamida-co-hidroxipropil metacrilato-co-3-trimetoxisilpropil metacrilato) (abreviado copolímero de PNIPAAm)

Los copolímeros de PNIPAAm se sintetizaron por polimerización por radicales libres de acuerdo con los protocolos presentados (Cho et al., Biomaterials, 2004, 25: 5743-5751; Moran et al., J Biomed Mater Res, 2007, 81 A: 870-876; Zhang et al., Biomacromolecules, 2006, 7: 784-791; Cao et al., Journal of Controlled Release, 2007, 120: 186-194) con algunas modificaciones.

Para una síntesis típica, 2 g de NIPAAm, 0,13 g (5 % en moles de NIPAAm) de HPM, 0,22 g (5 % en moles de NIPAAm) de TMSPM y 8 ml de alcohol anhidro se vertieron en un matraz de tres bocas con un condensador y posteriormente se purgaron con nitrógeno durante aproximadamente 10 min. Se añadieron 0,0319 g (1 % en moles del total (NIPAAm + HPM + TMSPM)) de AIBN a la solución de la mezcla. La mezcla se purgó en primer lugar con un flujo de nitrógeno durante aproximadamente 10 minutos, después se calentó y se mantuvo con calentamiento y agitación a una temperatura constante de 60 °C durante 12 horas bajo protección con nitrógeno. El despliegue sintético para la producción de copolímeros de PNIPAAm se ilustra esquemáticamente en la Figura 1. Después de la polimerización, el disolvente de etanol se evaporó y después se añadió una pequeña cantidad de acetona a la mezcla restante para disolverla. El líquido se añadió gota a gota después en n-hexano para la precipitación de la muestra. El proceso de precipitación se repitió tres veces usando acetona como disolvente y n-hexano como no disolvente. Finalmente, el producto se secó a -60 °C en una secadora de congelación de vacío durante 24 horas y después se almacenó en un refrigerador para su uso.

Los copolímeros que incorporaban el monómero de DM con y sin monómero de HPM pueden sintetizarse de forma análoga. La incorporación del monómero de DM en los copolímeros tiende a aumentar su carácter hidrófobo. La hidrofobia puede mejorarse también reemplazando el monómero de HPM con grupos hidroxialquilo con mayores longitudes de la cadena de alquilo. Sin quedar restringido a teoría alguna, el aumento en DM o monómeros similares puede ayudar a promover la estructuración laminada dentro de la película hibridada. Este efecto mejora por tanto la presentación de NIPAAm y otros grupos funcionales tales como secuencias peptídicas, polipéptidos (factores de crecimiento) y proteínas (marcadores de células madre) sobre la superficie de la película externa debido a la accesibilidad a esos grupos, que puede resultar importante para la adhesión y crecimiento de ciertas células sin alterar sus propiedades (por ejemplo, fenotipos, firmas biológicas y bioquímicas). La incorporación de monómeros

tipo DM también está prevista para hacer al recubrimiento de película mucho más fácil y menos sensible al espesor recubierto exacto.

Ejemplo 2 - Caracterización del copolímero de PNIPAAm

(i) Espectroscopía de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR para los copolímeros de PNIPAAm se determinaron mezclando el copolímero con gránulos de bromuro de potasio (KBr) y después prensando la mezcla en un disco transparente. Los espectros de FTIR se registraron en un espectrofotómetro Nicolet magna 750 FTIR en el intervalo de número de onda de 4000 - 500 cm^{-1} .

El espectro de FTIR del copolímero de PNIPAAm se presenta en la Figura 3. El PNIPAAm se caracterizó por los picos de absorción típicos de amida I y amida II a 1652 y 1549 cm^{-1} respectivamente y los picos de absorción de doblete característicos de los grupos isopropilo a 1387 y 1367 cm^{-1} . Los picos anchos de absorción fuerte a 3438 cm^{-1} podrían atribuirse a grupos hidroxilo en HPM. Adicionalmente, los picos de absorción a 2875 y 1089 cm^{-1} demostraron la presencia de grupos siloxano. También, los picos de absorción a 1725, 1261 y 1171 cm^{-1} se asignaron a los grupos éster, que procedían de HPM y TMSPM.

(ii) Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La DLS se realizó usando una solución del copolímero para determinar la solubilidad y la sensibilidad a la temperatura del copolímero. Se usó una concentración del copolímero de PNIPAAm de 1 mg/ml en todos los experimentos de DLS. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento influyen en los diámetros hidrodinámicos medidos; las velocidades más altas tienden a dar un tamaño más pequeño. Por lo tanto, se aplicó la misma velocidad entre mediciones paralelas. En un experimento de DLS típico, el copolímero de PNIPAAm se disolvió en agua UHQ con agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. La solución después se filtró con un filtro de 0,2 μm para retirar cualquier partícula insoluble antes de añadirlo a la cubeta de vidrio de muestra. La temperatura de los experimentos cambió entre 15 y 45 $^{\circ}\text{C}$ y las fluctuaciones de temperatura se mantuvieron dentro $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Después de cada cambio de temperatura, la lectura se realizó al menos 10 min después de que la solución hubiera alcanzado la temperatura deseada y las cadenas de copolímero estuvieran en el estado de equilibrio. Cada curva de correlación se acumuló 30-50 veces para eliminar el ruido y se aplicaron los valores promedio para analizar la tendencia de los diámetros hidrodinámicos a diferentes temperaturas. El instrumento usado fue un Malvern Nanosizer (Nano-S-ZEN1600, Malvern Instruments Ltd, RU) con un ángulo de dispersión fijo a 173 $^{\circ}$.

De acuerdo con la aproximación de Rayleigh, la intensidad de la luz dispersada es proporcional a la 6^a potencia del diámetro de partícula (d). De esta manera, el tamaño de partícula, más que el número, es el factor decisivo de la distribución de intensidad. La distribución de intensidad puede convertirse en una distribución de volumen o de número mediante la teoría de Mie. Todos los resultados de DLS presentados en este documento se dedujeron de la distribución de volumen.

La Figura 4 muestra perfiles de dispersión representativos a partir de los experimentos de DLS. Hay cuatro tipos de distribuciones de tamaño. Por debajo de la LCST (Figura 4A), los diámetros hidrodinámicos de los copolímeros de PNIPAAm se distribuyeron entre 5,6 nm a 58,8 nm, con el pico centrado a 10,1 nm. La anchura del índice de polidispersidad (PDI) tenía valores de 6,2 nm y 5,9 nm a 15 $^{\circ}\text{C}$ y 23 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente, indicando que los copolímeros de PNIPAAm se solubilizaban bien en agua. El pequeño tamaño de partícula y la estrecha distribución demostraron que no había una gran formación de agregados en estas condiciones. El tamaño molecular y la distribución de los copolímeros de PNIPAAm no cambió mucho con la temperatura por debajo de LCST. El estado molecular libre era indicativo de la carcasa externa fuertemente hidrófila formada por enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y las uniones amida y enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua y grupos hidroxilo. La transición ocurrió por encima de 29 $^{\circ}\text{C}$. A 30 $^{\circ}\text{C}$, el pico máximo se desplazó a 122 nm (Figura 4B) que aumentó significativamente y la anchura de PDI de 48,5 nm era más ancha, obviamente. Esta observación sugirió que la liberación de moléculas de agua condujo a una deshidratación de la cadena de copolímero y el aumento en el tamaño de partícula reflejaba el aumento de las interacciones hidrófobas intermoleculares entre grupos isopropilo y enlace de hidrógeno entre las uniones de amida. A 31 $^{\circ}\text{C}$, se han observado dos picos en las proximidades de 43,8 nm (que suponía un 3,7 % en volumen) y 342 nm (que suponía un 9,8 % en volumen), que mostraban que la mayor parte de los copolímeros de PNIPAAm se agregaban intensivamente para formar grandes agregados mientras que una pequeña parte de los mismos se unía también para formar pequeños agregados, dando como resultado una distribución bimodal. Se estimó que el diámetro hidrodinámico promedio era aproximadamente 280 nm. Un aumento adicional en la temperatura condujo a una agregación similar, con la distribución de tamaño haciéndose de nuevo más estrecha. La distribución de tamaño a 37 $^{\circ}\text{C}$ era básicamente idéntica a aquella a 45 $^{\circ}\text{C}$, demostrando que los copolímeros de PNIPAAm experimentaban un ajuste gradual de conformaciones moleculares bajo la acción combinada de los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrófobas. De esta manera, los copolímeros permanecían como moléculas hidratadas por debajo de la LCST, pero por encima de esta se formaban nanoagregados con una distribución de tamaño ancha. El contenido de moléculas de agua asociado con los copolímeros de PNIPAAm jugaba un papel decisivo en la transformación de los estados macroscópicos.

La sensibilidad a temperatura de los copolímeros puede visualizarse mejor representando los diámetros de pico frente al cambio de temperatura y los resultados se muestran en la Figura 5. A la temperatura por debajo de 30 °C, el diámetro de los objetos de dispersión era de aproximadamente 10 nm, indicativo de las moléculas de copolímero totalmente hidratadas presentes en la solución. El calentamiento de la solución condujo al inicio del colapso estructural y la deshidratación por encima de 29 °C. En el intervalo de transición de 29-31 °C, los diámetros medios aumentaron aproximadamente 20 veces debido a la formación de agregados intermoleculares con las interacciones hidrófobas entre los grupos isopropilo y el enlace de hidrógeno entre las uniones amida, que implica que la incorporación de monómeros adicionales había disminuido la LCST en 2-3 °C. Por encima de 31 °C, los diámetros hidrodinámicos promedio disminuían ligeramente debido a cambios en el enlace de hidrógeno y la interacción hidrófoba. En el proceso de enfriamiento, los agregados intermoleculares de PNIPAAm podían disociarse en copolímeros libres de cadena sencilla como se indica por los perfiles casi solapantes medidos. El comportamiento de los nanoagregados de copolímero de PNIPAAm en el proceso de enfriamiento estaba bastante de acuerdo también con lo observado en el proceso de calentamiento, sin embargo, los diámetros hidrodinámicos promedio en la fase de enfriamiento eran menores que aquellos en la fase de calentamiento a la misma temperatura, de lo que se deduce que las transiciones de nanopartículas de copolímero de PNIPAAm eran reversibles pero no en su totalidad.

Ejemplo 3 - Preparación de películas de copolímero de PNIPAAm

El copolímero de PNIPAAm a concentraciones de 0,2, 0,5 y 1-10 mg/ml se disolvió en etanol anhidro con agitación a temperatura ambiente durante más de 12 horas. Las soluciones después se filtraron a través de una membrana de filtro de 0,2 µm para retirar cualquier partícula insoluble. Las películas de copolímero de PNIPAAm se prepararon por recubrimiento por centrifugación sobre cubreobjetos de vidrio (como se ha descrito previamente en Dewi et al., Materials Science- Poland, 2007, 25: 657-662; Critchley et al., J. MATER CHEM., 1992, 2: 157-159; y Preliceanu et al., Organic thermally stable materials for optoelectronics devices- a linear spectroscopy study [J]. Abstract Book of ICPAM07 Conference Iasi, Romania: 1-7) con un procesador de centrifugación de una sola oblea (WS- 400B- 6NPP/LITE/AS/ 8K, Laurell Technologies Corporation, North Wales). Las películas de copolímero con diferentes espesores se formaron a la misma velocidad de rotación de 3000 rpm y el mismo tiempo de recubrimiento por centrifugación de 20 s pero con diferentes concentraciones de la solución de recubrimiento (0,2, 0,5 y 1-10 mg/ml). Las películas recubiertas se secaron al aire durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente y después se hibridaron durante 3 h a 125 °C en un horno de vacío para facilitar la reacción de los grupos 3-trimetoxisililo presentes en el copolímero de PNIPAAm con grupos hidroxilo presentes sobre la superficie de las obleas de silicio o cubreobjetos de vidrio, y para retirar el disolvente residual. Finalmente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente al vacío. Se retiraron del horno de vacío y cualquier monómero no reaccionado y copolímeros no conectados se extrajeron empapando y lavando las obleas o cubreobjetos en etanol y agua minuciosamente. Finalmente, se lavaron repetidamente con agua UHQ y se secaron a temperatura ambiente en un horno de vacío hasta peso constante y después se almacenaron en desecadores de vacío para su uso.

El etanol se usó como el disolvente en este ejemplo debido a su volatilidad. A la misma velocidad rotacional que el recubrimiento de centrifugación y el mismo tiempo de recubrimiento por centrifugación, se eligieron las diferentes concentraciones de solución para cambiar las propiedades de la superficie de las películas de copolímero de PNIPAAm. Durante el proceso de hibridación, la retirada de disolvente y reticulación anhidra de silanos ocurrió simultáneamente. La Figura 2 muestra que hubo tres posibles tipos de reacciones de retirada de metanol mientras se hibridaba: grupos siloxano y grupos hidroxilo en el sustrato, grupos siloxano y grupos hidroxilo en la propia cadena molecular, así como grupos siloxano y grupos hidroxilo en otras cadenas moleculares. Bajo el efecto sinérgico de las tres reacciones, las películas de copolímero de PNIPAAm cambiaron de sueltas/desconectadas a compactas/reticuladas. Debido a la existencia de enlaces covalentes entre la película y el sustrato y la formación de la película de red macromolecular, las películas de copolímero no se desprendían del sustrato y el espesor de las películas era relativamente constante después de un largo tiempo de inmersión en agua. Muchos sustratos orgánicos/polímero tienen grupos hidroxilo residuales que serán suficientes para formar reticulaciones con los grupos metoxisilano para inmovilizar la película frente a la separación. Los materiales de titanio y silicio o sus materiales compuestos relacionados también llevan una capa fina de óxido sobre la superficie justo como las gafas. Estos sustratos pueden injertarse también fácilmente con un recubrimiento de película estable.

Ejemplo 4 - Caracterización de películas de copolímero de PNIPAAm

(i) Determinación del espesor de película de copolímero de PNIPAAm

Para la precisión y consistencia de las mediciones, el espesor de las capas de óxido sobre obleas de silicio desnudas se determinó con elipsometría espectroscópica de ángulo variable (Jobin-Yvon UVISEL, Francia) antes del recubrimiento de la película. Los procesos de medición se realizaron siguiendo los protocolos presentados previamente por Zhang et al. (Biomacromolecules, 2006, 7: 784-791). Brevemente, el haz con las longitudes de onda entre 350-370 nm se dirigió a la superficie de la muestra a un ángulo de incidencia de aproximadamente 70° y se adquirieron mediciones precisas de los dos parámetros ópticos Δ y ψ como una función de la longitud onda. Los procesos de medición se realizaron en primer lugar en aire y después en agua y se observaron espesores de la capa de óxido consistentes dentro de ± 1 Å. Análogamente, los espesor de película en seco y en húmedo después del recubrimiento de la película se realizaron también suponiendo que la capa de óxido permanecía sin cambiar. Se

usó una célula líquida construida especialmente para facilitar las mediciones en la interfaz sólido/agua. Se usaron un par de placas de cuarzo fundido (espesor 0,2 mm) como ventanas y los haces de entrada y salida se alinearon perpendicularmente a las ventanas. Los cambios en el espesor de la película como una función de la temperatura en el agua se registraron usando un dispositivo de temperatura controlada (como se describe en Murphy et al., Biomaterials, 1999, 20: 1501-1511; Tang et al., Macromolecules, 2001, 34: 8768-8776). Las soluciones dentro de las células se calentaron hasta 37 °C y se enfriaron hasta 20 °C y el proceso se recicló y repitió para examinar la extensión de la reversibilidad de la película en su expansión y contracción. Los datos experimentales se analizaron usando el software DeltaPsi II proporcionado por Jobin-Yvon.

10 Resultados y análisis

La elipsometría espectroscópica se usó para determinar el espesor de las películas de copolímero de PNIPAAm sobre una longitud de onda entre 300 nm y 700 nm. Antes del recubrimiento de la película se realizaron mediciones para determinar el espesor preciso de la capa de óxido en cada superficie de oblea. El espesor de la capa de óxido después se consideró fijo cuando se analizó la película de copolímero. Se descubrió que el índice de refracción del copolímero seco era de aproximadamente 1,5 basándose en el ajuste a una película gruesa donde era suficientemente sensible para separar el espesor del índice de refracción.

Las mediciones del espesor de la película se realizaron para capas recubiertas sobre las concentraciones de copolímero que variaban de 0,2 a 10 mg/ml de manera que cada concentración tenía un espesor de película coincidente. Todas las mediciones se realizaron en primer lugar en aire, seguido de determinación del espesor en agua a 20 y 37 °C respectivamente, y finalmente se realizaron en aire después de secar estas muestras. Para comprobar la reversibilidad, la temperatura se sometió a un ciclo 2-3 veces. La Figura 6 muestra un ejemplo de cambios de espesor medidos desde la película recubierta a 10 mg/ml. El espesor de la película seca era de 16,5 nm a 20 °C. Bajo agua a 20 °C, el espesor promedio de la capa se expandió a 85,9 nm. Este cayó después a 56,0 nm en la segunda vuelta y adicionalmente cayó a 35,7 nm para la tercera vuelta. Cuando la temperatura se calentó a 37 °C, el espesor de la película se redujo de 25,4 a 22,7 nm, mostrando una variación mucho menor. El espesor de la película seca era 15,8 nm a 20 °C en aire después de secarlo en un horno de vacío siguiendo su ciclo de temperatura en agua, mostrando la consistencia con el resultado de la película seca en la primera ocasión.

Estos resultados mostraron que, tras la primera inmersión a 20 °C, el agua se proyectó masivamente en la película de copolímero posiblemente debido a su red estructural abierta. Estas moléculas de agua deben unirse con grupos amida y grupos hidroxilo a través de enlaces de hidrógeno, provocando la mayor expansión del espesor de la película. Tras el calentamiento a 37 °C, los enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua y uniones de amida se transformaron parcialmente en enlaces de hidrógeno entre las uniones de amida, mientras que las interacciones hidrófobas entre los grupos isopropilo desempeñaban un papel dominante. Cuando la temperatura volvió a 20 °C por segunda vez, el espesor de la película de copolímero cayó a aproximadamente el 65 % del valor en la primera vuelta. Aunque la interacción entre los grupos hidrófobos no era el factor principal para el hinchado, era el responsable de la ausencia de hinchado a 20 °C debido a que el apilamiento hidrófobo ha causado una restricción en la extensión de la expansión como se espera de las moléculas de agua y uniones de amida, provocando una reducción sustancial en el grado de hinchamiento de la película de copolímero. Por lo tanto, aunque la tendencia principal de los cambios sensibles a temperatura es la misma que la observada para los diámetros hidrodinámicos obtenidos a partir de DLS (datos no mostrados), la diferencia radica en la disminución en estado estacionario en el espesor de la película a 20 °C. Pero la disminución de espesor no implica una pérdida gradual del copolímero en la película debido a una posible disolución parcial porque el espesor a 37 °C tendía a un valor casi constante, confirmando que la masa en la película permanecía intacta. Se obtuvieron resultados similares en las dos mediciones de películas secas antes y después de la inmersión en agua durante varios ciclos de temperatura variable, proporcionando totalmente la estabilidad de las películas de copolímero de PNIPAAm injertado.

La sensibilidad a la temperatura de la película recubierta bajo 5 mg/ml de la solución de copolímero se examinó análogamente. Se observó una tendencia casi idéntica, es decir, la película experimentó un gran aumento de espesor a 20 °C después de la primera vuelta del ciclo de temperatura, pero los ciclos adicionales condujeron a un espesor casi constante a 20 °C. En contraste, el espesor de la película a 37 °C cambió mucho menos. Sin embargo estaba claro que la diferencia en el espesor entre 20 °C y 37 °C aún seguía siendo sustancial, como puede verse claramente a partir de la Figura 7. Como se verá posteriormente, tales cambios en el espesor eran suficientes para separar las células.

(ii) Ángulos de contacto

Los ángulos de contacto con el agua de las películas de copolímero de PNIPAAm secas y húmedas se determinaron por el método de la gota sésil tanto a 20 °C como a 37 °C y se usó el software de análisis por imágenes MB para estimar los ángulos de contacto: Las películas secas mencionadas se refirieron a las secadas al vacío antes de la medición. Las películas húmedas se obtuvieron empapando las muestras en agua UHQ a temperatura ambiente. Los resultados experimentales se promediaron a partir de seis ensayos repetidos con desviación típica.

65 Resultados y análisis:

Los ángulos de contacto con la superficie de las películas recubiertas pueden ofrecer una indicación útil de los cambios en la capacidad de humectación de la superficie y composición química. La Figura 8 muestra la variación de los ángulos de contacto de las películas de copolímero de PNIPAAm en condiciones secas y húmedas. Puede concluirse que los ángulos de contacto de las películas de copolímero de PNIPAAm secas y húmedas a 37 °C eran mayores que aquellos a 20 °C, demostrando que estas películas poseían sensibilidad a la temperatura. A cada temperatura, las películas secas tenían mayores ángulos de contacto que las húmedas, mostrando claramente la asociación del agua en las películas húmedas. A una temperatura dada y una condición seca o húmeda, los ángulos de contacto aumentaban inicialmente con la concentración de la solución, alcanzaban un máximo y después disminuían. El aumento del ángulo de contacto inicial debe estar relacionado con el cubrimiento de la superficie aumentado de la película, pero después de alcanzar el valor de pico, la disminución estacionaria indicaba que la hidrofilia de la superficie mejoraba gradualmente con el aumento de las uniones amida e hidroxilo. Esta observación es importante, puesto que diferentes fijaciones y crecimiento de células pueden requerir diferentes composiciones químicas de la superficie, tales como la extensión de los enlaces de amida. Por lo tanto, las propiedades químicas de la superficie externa pueden ajustarse ajustando el espesor de la película.

(iii) Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Las imágenes de AFM de las películas de copolímero de PNIPAAm secas injertadas sobre las obleas de silicio se adquirieron con un sistema Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA) en el modo golpeteo en condiciones de laboratorio. Se obtuvieron imágenes tanto de topografía como de fase de diferentes tamaños de exploración de 500 nm a 10 μm simultáneamente usando una frecuencia de resonancia de menos de 270 kHz para la oscilación de sondas de nitruro de silicio (Olympus) con radios de la punta de aproximadamente 20 nm a una velocidad de exploración de 2,959 Hz. Las imágenes de AFM más representativas para cada muestra se seleccionaron de mediciones de más de tres veces a diversos tamaños de exploración en diferentes puntos de la superficie. Los parámetros de la propiedad superficial como raíz cuadrada media de la rugosidad (Rq) y altura y similares se analizaron con el software Nanoscope III y se mostraron usando los resultados promediados.

Resultados y análisis:

La topografía e imágenes de fase de las películas de copolímero de PNIPAAm formadas por diferentes concentraciones se muestran en la Figura 9. En su conjunto, la topografía de superficie variaba con la concentración de copolímero, en concreto representado en número, altura y distribución de los picos. Pudo observarse que la superficie de la película de 0,2 mg/ml era muy suave ($R_q \approx 0,2$ nm) con algunos pequeños puntos de luz (altura = 2,5-5 nm) en la Figura 9A, indicando que solo unos pocos copolímeros podían depositarse sobre la superficie en una concentración extremadamente diluida. A medida que la concentración aumentaba a 1 mg/ml (Figura 9C), el número de picos distintos aumentaba significativamente como resultado de que más puntos estaban presentes y distribuidos uniformemente mientras que la altura promedio de los picos era similar a la de 0,2 mg/ml, mostrando que las partículas de copolímero de PNIPAAm crecían para cubrir la oblea de silicio gradualmente, mientras estaban conectadas entre sí a la misma capa y se unían con el sustrato durante el proceso de preparación. Como se muestra en la Figura 9E, la imagen topográfica de la película de copolímero con la concentración de 5 mg/ml demostraba una superficie no uniforme ($R_q \approx 1,4$ nm) caracterizada por el hecho de que algunas regiones estaban cubiertas con agregados de copolímero con alturas de pico entre 4 y 8 nm, de lo que se deduce que las partículas de copolímero de PNIPAAm dentro de la multicapas se reticulaban para formar una deposición más gruesa a la mayor concentración, mientras las otras regiones de la superficie de oblea de silicio se exponían a las sondas de AFM. La película de copolímero de 10 mg/ml (Figura 9G) era una capa más inhomogénea y rugosa ($R_q \approx 7,0$ nm, altura = 16-32 nm) con una distribución no uniforme de los agregados de copolímero, mostrando un modelo montaña-valle obvio. La extensión de agregación y reticulación de las partículas de copolímero, en otras palabras, el espesor de las películas de copolímero, aumentaba con el aumento de la concentración. Esta tendencia estaba bastante de acuerdo con los resultados obtenidos por elipsometría.

Ejemplo 5 - Cultivo de células HeLa sobre películas de copolímero de PNIPAAm

Los cubreobjetos de vidrio con películas de copolímero de PNIPAAm de diferentes propiedades superficiales se esterilizaron durante 1 h por UV y después se transfirieron a placas de cultivo tisular de 24 pocillos para uso posterior. Algunos de los cubreobjetos de vidrio estaban medio recubiertos, de manera que las superficies de vidrio desnudas funcionaron como control. Antes de iniciar el cultivo celular, los cubreobjetos se enjuagaron repetidamente con PBS y DMEM-LG. Las células HeLa se pusieron sobre los cubreobjetos sumergidos en DMEM-LG complementado con FBS al 10 %, penicilina-estreptomina y ampicilina a una densidad de $5,0 \times 10^4$ células/ml y se cultivaron durante 96 h a 37 °C en aire húmedo con CO₂ al 5 %. El estado de crecimiento de las células se observó mediante un microscopio de contraste de fase inversa (TE2000-U, Nikon). Después de aspirar el medio agotado, se introdujo medio de cultivo nuevo y frío (menos de 20 °C), acompañado de un pipeteo moderado. Se realizó la investigación de la morfología celular con el microscopio y el recuento del número de células adhesivas con el hematocitómetro. Las evaluaciones se centraron en el crecimiento celular en la condición de cultivo a 37 °C y la extensión de la separación a 20 °C. Estas mostraban un crecimiento sano y una separación rápida y limpia que eran

consistentes con las películas óptimas para células HeLa.

Resultados y análisis:

- 5 Una observación interesante era que no había diferencia entre el control de vidrio y el control recubierto con copolímero con respecto a la capacidad de las células para fijarse, adherirse, moverse y crecer sobre el cubreobjetos. Esto indica que las películas de copolímero de PNIPAAm tenían una biocompatibilidad similar que la superficie de vidrio.
- 10 A medida que aumentaba el espesor de la película, se hizo más difícil que las células se fijaran a la superficie recubierta con polímero, mostrando que a medida que aumentaba el espesor de la película, la superficie externa de la película tenía diferentes propiedades. Las superficies con recubrimiento de copolímero grueso no les gustaban a las células. En la Figura 10 se muestran las imágenes de microscopio de dos ejemplos representativos de adhesión celular y separación antes y después de reducir la temperatura. No había un límite de crecimiento celular obvio en el grupo de 1 mg/ml, sin importar cómo las células HeLa se cultivaban a 37 °C o se enfriaban a 20 °C durante 1 h, lo que sugería que las células sembradas sobre la parte de película sensible a la temperatura podían adherirse y proliferar de forma análoga a la parte de control por encima de la LCST, pero las células no se separaban del cubreobjetos cuando la temperatura se bajaba por debajo de la LCST. Las células HeLa en la película recubierta a 5 mg/ml se adherían y crecían bien a 37 °C y se separaban casi completamente y se levantaban de la superficie del copolímero a los varios minutos después de enfriar a 20 °C, dejando un límite de célula claro cuando se observaba bajo el microscopio de contraste de fase inversa. Sin embargo, a 10 mg/ml la película se hizo más gruesa y la mayor parte de las células HeLa crecieron y proliferaron sobre un cubreobjetos de vidrio de control mientras que muy pocas células se adherieron a la parte sensible a la temperatura de la superficie a 37 °C. De esta manera, un límite de células claramente visible ocurrió a 37 °C debido a que a las células no les gustaba la superficie de la película. Un fenómeno experimental que hay que destacar es que el límite de células después de la separación de las células era claramente diferente del que aparecía al principio, presentando el primero a menudo una morfología de arrugas irregulares mientras que el último mostraba una morfología suave.

30 Por tanto, puede concluirse de los resultados anteriores que las propiedades de la película como el espesor de película, la capacidad de humectación de la película y la topografía afectan a la fijación celular así como a la separación. Para las células HeLa hay un intervalo inmediato que es óptimo tanto para la adhesión como para la separación de las células. Esta observación muestra que el control de la química de la superficie es importante para el crecimiento y la liberación de las células. Un equilibrio de las propiedades de la película y otras condiciones de recubrimiento puede conducir a un control eficaz de la superficie de crecimiento y retirada de células. El fenómeno se espera porque el copolímero contiene diferentes grupos funcionales, de manera que los cambios en las propiedades de la película pueden conducir a una diferente estructura y composición dentro de la película y sobre la superficie externa.

40 Los cambios en las propiedades de la superficie externa provocados por el espesor de la película se muestran bien a partir de los datos de variación del ángulo de contacto mostrados en la Figura 8. Puede verse a partir de la Figura 8 que a medida que aumenta el espesor de la película, el ángulo de contacto disminuye, lo que indica un aumento en la hidrofilia de la superficie. Las superficies con un espesor de película intermedio tienen ángulos de contacto de 50-53° a 37 °C y de 44-47° a 20 °C cuando están hidratados. Los valores más altos o más bajos parecen no ofrecer un rendimiento óptimo. Para las películas de copolímero usadas en este ejemplo, parece que las películas necesitan ser suficientemente gruesas para proporcionar una expulsión suficiente. Sin embargo, una película demasiado gruesa no es buena para la fijación posterior de las células debido a su alta hidrofilia en la superficie.

Ejemplo 6 - Cultivo de células HEK293, BMMSC y HCASMC sobre películas de copolímero de PNIPAAm

50 Como en el Ejemplo 5 (células HeLa), las células HEK293 (línea celular humana), BMMSC (células madre de ratón) y HACSMC (células de músculo vascular humanas) se cultivaron también sobre los cubreobjetos de vidrio recubiertos con películas de copolímero de PNIPAAm que se habían esterilizado durante 1 h por UV y después se transfirieron a placas de cultivo tisular de 24 pocillos para su uso posterior. Antes de iniciar el cultivo celular, los cubreobjetos se enjuagaron repetidamente con PBS y DMEM-LG. Las células se pusieron sobre un cubreobjetos sumergido en DMEM-LG complementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina-estreptomina y 50 µg/ml de ampicilina a una densidad de $5,0 \times 10^4$ células/ml y se cultivaron durante 96 h a 37 °C en aire húmedo con 5 % de CO₂. El estado de crecimiento de las células se observó mediante un microscopio de contraste de fase inversa. Después de la aspiración del medio agotado, se introdujo medio de cultivo nuevo y frío (menos de 20 °C) acompañado de un pipeteo moderado (5-10 min). Se realizó la investigación de la morfología celular con el microscopio y el recuento del número de células adhesivas con el hematocitómetro.

Los resultados se comparan con las células HeLa (Ejemplo 5) en la Tabla 1.

Tabla 1. La adhesión y separación de las células HeLa, células HEK293, BMMSC y HCASMC sobre diferentes películas de copolímero de PNIPAAm

Concentración (mg/ml)	Células HeLa		Células HEK293		BMMSC		HCASMC	
	Ad	Sep	Ad	Sep	Ad	Sep	Ad	Sep
0,2	√	×	√	√	√	√	N/A	N/A
0,5	√	×	√	√	√	√	N/A	N/A
1	√	×	√	√	√	√	√	√
2	√	×	√	√	√	√	√	√
3	√	×	√	√	×	N/A	×	N/A
4	√	√	×	N/A	×	N/A	×	N/A
5	√	√	×	N/A	×	N/A	×	N/A
6	√	√	×	N/A	×	N/A	×	N/A
7	√	√	×	N/A	×	N/A	×	N/A
8	×	N/A	×	N/A	×	N/A	×	N/A
9	×	N/A	×	N/A	×	N/A	×	N/A
10	×	N/A	×	N/A	×	N/A	×	N/A

- 5 Puede verse a partir de la Tabla 1 que, aunque se requiere el intervalo de espesor de película apropiado (haciendo coincidir la concentración de copolímero entre 0,2 y 7 mg/ml) para que las células HeLa se adhieren y proliferen, las otras tres células requerían espesores de película mucho más finos correspondientes a concentraciones de copolímeros menores que o iguales a 3 mg/ml. Los resultados sugerían que aunque las células HeLa requerían entornos de crecimiento de superficie menos estrictos, las células HEK293, BMMSC y HCASMC son más estrictas.
- 10 Los resultados indican que las diferentes células requieren diferentes propiedades de la superficie externa para crecimiento y separación.

Después de que la temperatura se enfriara a 20 °C, se usó medio de cultivo nuevo y frío para reemplazar el que estaba templado en todos los casos. Las células HeLa podían liberarse de las superficies injertadas correspondientes a concentraciones de copolímeros de 4-7 mg/ml. Para películas más finas recubiertas a 1-3 mg/ml, parecía difícil que las células se separaran. Las otras tres células podían separarse espontáneamente de todas las películas recubiertas de las soluciones de copolímero con concentraciones de menos de o iguales a 3 mg/ml. Estos resultados muestran que debe conseguirse un equilibrio delicado para la resistencia de unión celular con la superficie de la película: las células tienen que fijarse para conseguir un crecimiento sano, pero una fijación demasiado fuerte puede no permitir a las células ser retiradas por manipulación de la sensibilidad a temperatura de la película. En las Figuras 11 y 12 se muestran ejemplos adicionales para la fijación y separación de las células HEK293 y MSC.

Las BMMSC podían fijarse y crecer bien a 37 °C y separarse totalmente de las películas de copolímero de PNIPAAm en unos pocos minutos sobre las películas recubiertas a 0,2, 0,5 y 1 mg/ml después de que la temperatura cayera por debajo de 20 °C. Para cada tipo de célula, la separación de la capa de células dejó claro un límite con el lado del vidrio de control, pero la localización y dirección inicial de la separación de las células varió. En la mayoría de los casos, la separación empezaba a partir de la región de película de copolímero de PNIPAAm y el límite después se movió hacia el lado del cubreobjetos de vidrio de control.

Las Figuras 13 y 14 muestran los procesos completos de la separación de las células para BMMSC y HEK293 registrada. Las superficies de la película de copolímero de PNIPAAm se cubrieron completamente con una lámina de células en el punto inicial. El borde de la película se expuso en primer lugar a medio de cultivo nuevo y frío después de intercambiar el medio. Por consiguiente, la película y el primer punto frío empezaron a crecer más gruesos y a hacerse más hidrófilos, dando como resultado la formación de una ampolla en la lámina de células. A medida que la expansión de la película se dispersa, la lámina de células en el borde se redondea y después se libera, dejando espacio para que el medio de cultivo entre en el espacio entre la lámina de células y la superficie de la película dando como resultado la separación de células continua. Se encontró que la estructuración de la lámina de células era más eficaz para la separación rápida de las células que las células individuales. Debido a que las células no solo estaban sometidas a las fuerzas impulsoras provocadas por el cambio de la expansión de la película y la transición de la capacidad de humectación, sino que también estaban empujadas por los segmentos de células liberados, un proceso dinámico que se muestra esquemáticamente en la Figura 15.

Ejemplo 7 - Reutilización de las películas de copolímero de PNIPAAm

Los estudios previos de Canavan et al. (J Biomed Mater Res 75A: 1-13, 2005) y otros han indicado que una separación a baja temperatura de las células de la superficie del sustrato es menos dañina que una retirada mecánica y digestión enzimática. Tanto la disociación mecánica como la escisión enzimática cambian los aspectos morfológicos de las células debido a daños a las proteínas de la membrana extracelular (ECM). Estos daños a

menudo cambian las actividades de las células. En contraste, cultivando células sobre una superficie de PNIPAAm sensible a la temperatura, es posible permitir que una superficie de ECM se recupere si se seleccionan condiciones de caída de temperatura moderadas. Los resultados de XPS de Canavan et al., pusieron de manifiesto que la pérdida de las proteínas de ECM surgía de su adhesión a las superficies sensibles a la temperatura después de que las células se levantaran. También mostraba que el crecimiento de las células sobre superficies desde las que se retiró una capa inicial de células promovía mejor la adhesión celular, indicando los beneficios de las proteínas ECM residuales. Sus resultados eran consistentes con las observaciones de una fijación de células mejorada y un crecimiento por pre-adsorción de proteínas ECM sobre las superficies de Moran et al., y nosotros mismos. El objetivo de este estudio era ilustrar que nuestras películas de copolímero pueden usarse para cultivos celulares repetidos sin ningún signo de influencia adversa a la adhesión, crecimiento y separación celular.

Durante el 1^{er} ciclo de cultivo celular, se usaron las mismas etapas, condiciones y procedimientos que los descritos en el Ejemplo 5 para tratar los cubreobjetos recubiertos, colocación de las células, cultivo y separación. Después completarse el 1^{er} ciclo, el matraz de cultivo y los cubreobjetos se enjuagaron cuidadosamente con tampón fosfato antes de reutilizarse en el 2^o ciclo. La misma etapa de lavado se realizó antes del 3^o ciclo o más ciclos de cultivo celular que siguieron. El proceso se repitió durante todo el tiempo que se reutilizó el cubreobjetos de vidrio recubierto y el matraz.

El efecto de un crecimiento celular repetido y los ciclos de separación se muestran en las Figuras 16, 17 y 18. Los resultados indican que las películas de copolímero de PNIPAAm podían reutilizarse para la adhesión y separación celular. Las propiedades de la película incluían que la capacidad de humectación de la superficie y el espesor de la película no se vieran afectados por los procesos de un largo tiempo de inmersión y ciclos de calentamiento y enfriamiento sucesivos, de manera que las películas de copolímero de PNIPAAm usadas o tratadas aún proporcionaban suficiente fuerza impulsora para la separación de las células.

Debe observarse que para las películas reutilizadas la acumulación de proteínas tal como fibronectina, laminina y colágeno podía promover el crecimiento celular. La cantidad de proteínas de ECM especiales podría aumentar durante el segundo y posteriores ciclos y después podría alcanzar un equilibrio. La acumulación de proteínas de ECM sobre el cubreobjetos podría proporcionar una superficie más respetuosa para el entorno para reducir la influencia antinatural de la superficie.

Ejemplo 8 - Cultivo de (i) miocitos cardiacos humanos y (ii) células 3T3 sobre películas de copolímero de PNIPAAm

(i) Miocitos cardiacos humanos (HCM)

Las películas de copolímero de PNIPAAm termosensibles se recubrieron sobre cubreobjetos de vidrio, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3, a una concentración de 1 mg/ml. Estos cubreobjetos recubiertos se pusieron en los pocillos de una placa de 24 pocillos en solitario. Se incluyeron los siguientes controles: incluyendo superficies de plástico de cultivo tisular desnudas (placas de 24 pocillos, TPCS); cubreobjetos de vidrio desnudos (G); cubreobjetos adsorbidos con polilisina (G+L); superficie de G+L adsorbida con proteína de medio CM (G+L+CM). En cada pocillo se sembraron 10⁴ células.

Se realizaron ensayos de MTT para comparar la viabilidad de las células que crecían sobre cada superficie frente al tiempo. Los ensayos de MTT se usaron ampliamente para determinar la citotoxicidad de los agentes medicinales potenciales y otros materiales tóxicos, puesto que estos agentes pueden dar como resultado toxicidad celular y, por lo tanto, la disfunción metabólica y disminución del rendimiento en el ensayo. En este trabajo el rendimiento de las células que crecían sobre superficies recubiertas con copolímero se compara con los diferentes controles de superficie. Mecánicamente, las células vivas producían enzimas (reductasas mitocondriales) que reducían el MTT amarillo (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) a formazán púrpura. De esta manera, esta actividad enzimática mide las actividades totales de las células (números y viabilidad) y es indicativa de la extensión del crecimiento de las células activas. En un ensayo de MTT típico usando placas de 96 pocillos, se prepara una solución de MTT a 5 mg/ml. A cada uno de los pocillos se le añade una suspensión de cultivo celular de 200 µl. El medio de cultivo celular de 200 µl se añade también en pocillos separados como un control de blanco. Se permite después que las células se fijen a la superficie del pocillo o al material de muestra. A cada pocillo se le añaden después 20 µl de reactivo de MTT, seguido de incubación a 37 °C durante 3 horas. El MTT/medio de cultivo celular se retira suavemente con una pipeta Pasteur de plástico. Después se añaden 200 µl de alcohol isopropílico acidificado y se incuban durante 30 minutos a 37 °C, y la muestra se agita suavemente cada par de minutos. Después se transfiere a otro conjunto de pocillos y la absorción espectrofotométrica se mide a 540 y 620 nm. Cuando los ensayos se experimentan en pocillos más grandes, se requiere un aumento de escala apropiado. Eso se determinará por el área superficial del pocillo usado, o un material en el pocillo.

Como se muestra en la Figura 19, dentro de los errores experimentales, había poco diferencia entre la película termosensible, el plástico de cultivo y las superficies adsorbidas con PL (polilisina). Las lecturas sobre la superficie de vidrio parecían ser ligeramente menores, consistentes con los menores números de células, pero la tendencia es idéntica entre las diferentes superficies estudiadas. Los valores de DO como, se muestra en el eje Y de la Figura 19,

son proporcionales al número y viabilidad de células que crecen sobre cada superficie.

La adhesión celular se evaluó lavando las células fijadas de forma suelta con tampón después de un cultivo de 24 h. Los porcentajes de las células fijadas a las superficies termosensibles con y sin adsorción de polilisina fueron entre el 80 y el 83 %; aquellas en TPCS desnudo era justo de aproximadamente el 80 % y aquellas en el sustrato de vidrio desnudo eran entre el 78 y el 80 %. Las observaciones morfológicas celulares indicaban que después de 2 días de cultivo, había pocas diferencias visuales entre las células que crecían en las diferentes superficies, excepto que en las de la superficie G+L+CM, los números de célula parecían ser mayores. La transfección GFP de nuevo no mostró efectos visibles que surgieran de la superficie con recubrimiento sobre la forma o morfología de las células.

Hoechst 33258, un tinte de ADN específico que se une a los enlaces A-T únicamente, puede revelar fragmentos nucleares que indican apoptosis. Bajo el microscopio de fluorescencia, las células vivas se muestran suaves, débiles pero visibles a la luz; las células muertas no muestran ningún color. Pero cuando las células entran en la fase de apoptosis, los núcleos de las células y sus citoplasmas muestran tinciones, normalmente en forma de pequeños grumos y forma nuclear anormal. Si hay 3 o más fragmentos o grumos, la célula se considera en el proceso apoptótico. No se observó indicación de apoptosis celular de las superficies recubiertas con PNIPAAm.

Esos análisis concluyeron por tanto que las superficies de la película recubierta termosensible no provocaban ningún efecto adverso sobre la viabilidad celular y el fenotipo.

Se encontró también que las películas de HCM se retiraban fácilmente de las placas de cultivo en el laboratorio al enfriarlas a temperatura ambiente, poniendo las placas en un frigorífico a 4 °C y añadiendo cultivo celular frío. Las células se separaron de unos pocos minutos a 30 minutos. Se descubrió que un pipeteo moderado del líquido de cultivo contra la superficie de la película de células podía acelerar el proceso de separación. Las películas de células libres pueden cortarse y transportarse a diferentes superficies.

(ii) Cultivos de células 3T3

Este experimento de cultivo celular comprendía dos partes:

(a) también se han usado ensayos MTT como se ha descrito anteriormente para evaluar la viabilidad de las células 3T3 frente al tiempo y comparar las superficies de la película termosensible (recubierta con soluciones de etanol de 1 y 2 mg/ml usando el copolímero principal) con controles (plásticos de cultivo de tisular (TCPS), cubreobjetos de vidrio desnudos y superficie recubierta con polilisina).

(b) se observó de nuevo la separación térmica enfriando de 37 °C a 20 °C en 15-20 min.

Como para el apartado (i) anterior, todo el cultivo celular y los estudios de separación de células termosensibles se basaron en placas de 24 pocillos, cada muestra tenía 4 repeticiones. Las películas de copolímero se recubrieron sobre el cubreobjetos usando recubrimiento por centrifugación, como se ha descrito en el Ejemplo 3.

En la Figura 20 se muestran los resultados de MTT (representados en términos de absorbancia de luz relativa proporcional al número y viabilidad de las células). En general, los resultados muestran una tendencia ampliamente consistente de aumento en el número de células frente al tiempo. Los datos eran bastante parecidos y mostraron una pequeña dispersión durante los dos primeros días, pero después del tercer día, la extensión de la variación se hizo mayor. En el día 6, el último de las mediciones de MTT, los números de células parecían ser mucho menores sobre el vidrio, pero mostraron el número más alto sobre el plástico desnudo de TPCS. Los números de células de las superficies recubiertas con película termosensible eran intermedios. Dado que las variaciones estaban ampliamente dentro de los errores experimentales, los resultados de nuevo mostraron un pequeño efecto adverso que surgía de las superficies de película recubierta con polímero termosensible.

La separación de las células termosensibles de las células 3T3 se evaluó para las células cultivadas durante 3, 4 y 7 días en las mismas condiciones que las usadas para el ensayo de MTT. Las placas de 24 pocillos se sacaron después de la incubadora (a 37 °C) y se dejaron en la mesa (a 20 °C) durante 15-20 min, seguido de agitación moderada usando una micropipeta de 200 µl (para los controles también, con tratamientos y condiciones idénticas) para romper las láminas y fragmentos de células. Se observó que en los días 3 y 4, la mayor parte de las superficies estaban totalmente cubiertas con células. Para el día 7, la superficie entera estaba totalmente invadida con células densas. Se descubrió que siguiendo los mismos procedimientos de separación termosensibles que los descritos, las células podrían separarse fácilmente de estas superficies cultivadas en diferentes intervalos de tiempo.

En resumen, los ensayos de MTT mostraron que las células crecían sobre superficies recubiertas justo tan viables como sobre las superficies de control. Las superficies recubiertas a 1 y 2 mg/ml mostraban una separación de las células fácil a una cobertura de células baja, media y alta (cultivadas en los días 3, 4 y 7), que mostraba que las células podrían retirarse fácilmente por debajo (días 3 y 4) y por encima de la confluencia total (día 7). Estos resultados estaban soportados por 3-4 repeticiones para cada superficie de muestra.

Ejemplo 9 - Síntesis de poli(N-isopropilacrilamida-co-hidroxipropil metacrilato-co-3-trimetoxisilpropil metacrilato-co-dodecilmecrilato) (abreviado copolímero de PNIPAAm/dodecilmecrilato)

5 Usando un proceso análogo al usado en el Ejemplo 1, se hicieron reaccionar 9,05 g de NIPAAm (80 % en moles del total), 0,72 g (5 % en moles del total) de HPM, 1,24 g (5 % en moles del total) de TMSPM y 2,54 g de dodecilmecrilato (10 % en moles del total) para proporcionar un polímero de poli(N-isopropilacrilamida-co-hidroxipropil metacrilato-co-3-trimetoxisilpropilmetacrilato-co-dodecilmecrilato) con la proporción de monómero de 16: 1: 1: 2. Brevemente, los cuatro monómeros anteriores, junto con 40 ml de alcohol anhidro, se añadieron en el
10 matraz de tres bocas conectado con un condensador. Después de 10 min de flujo de nitrógeno, se añadieron 0,16 g de AIBN (1 % en moles del total) y se mezclaron mediante agitación magnética. La reacción se realizó en un baño de glicerol a 60 °C durante 12 horas bajo un flujo de nitrógeno constante con agitación. Después de la reacción, el disolvente de etanol se retiró por evaporación rotatoria. Se usó una pequeña cantidad de acetona para redissolver la muestra. El producto se purificó por precipitación en n-hexano tres veces. El producto final se secó por congelación durante 24 horas y después se almacenó en un refrigerador para su uso futuro.

15 La estructura de este polímero se muestra en la Figura 21.

El polímero resultante se usó para formar películas sensibles a la temperatura usando el mismo proceso que el descrito en el Ejemplo 3 anterior.

Ejemplo 10 - Estudios celulares para comparar el copolímero de PNIPAAm y el copolímero de PNIPAAm/dodecilmecrilato

25 El rendimiento de fijación y separación de células usando células 3T3 se evaluó sembrando células 3T3 en pocillos que contenían cubreobjetos de vidrio recubiertos con el polímero PNIPAAm/dodecilmecrilato formado a concentraciones de 0,2 mg/ml a 2 mg/ml. El recubrimiento de la película y el cultivo de las células se mantuvieron en las mismas condiciones que las usadas para evaluar las películas de PNIPAAm. Se encontró que las películas de copolímero de PNIPAAm/dodecilmecrilato soportaban la fijación y el crecimiento de las células así como la separación de las células cuando la temperatura disminuía de 37 °C a 20 °C. A medida que las películas se hacían más gruesas, las células tendían a aborrecerlas, y el nivel de adherencia se reducía. No obstante, las células formaron grandes grumos. Estas observaciones eran similares a aquellas de las películas más gruesas recubiertas del copolímero de PNIPAAm, que mostraban que la incorporación del grupo dodecilo para alterar la naturaleza hidrófoba del copolímero y las películas recubiertas no provocaba ningún efecto adverso sobre el rendimiento de las superficies de la película termosensible en lo que respectaba a la fijación, crecimiento y separación de las células.

35 Las células 3T3 cultivadas sobre películas de copolímero de PNIPAAm/dodecilmecrilato recubiertas a partir de 0,5 mg/ml de solución podían conducir a la recogida de grandes piezas de láminas de células si las células se cultivaban a o por encima de la confluencia completa y el medio de cultivo en el pocillo no se alteraba, por ejemplo, por pipeteado. La separación de las películas de células podría promoverse y acelerarse si se creara un defecto en la
40 película de células raspando un orificio o una línea usando la punta de una pipeta. La formación de láminas o películas de células proporciona materiales de construcción útiles para fabricar tejidos funcionales 3D útiles para una selección de aplicaciones incluyendo ingeniería de tejidos, selección de fármacos y desarrollo de dispositivos médicos.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un copolímero sensible a la temperatura para formar un recubrimiento de película sobre la superficie de un sustrato de cultivo celular, comprendiendo el copolímero unidades monoméricas hidrófilas sensibles a la temperatura, unidades monoméricas hidrófobas y/o hidrófilas no sensibles a la temperatura y medios de reticulación para unir covalentemente el copolímero a la superficie del sustrato.
- 10 2. Un copolímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde las unidades monoméricas son monómeros metacrílicos, acrílicos y/o de bisacrilamida sustituidos.
- 15 3. Un copolímero de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde los monómeros sensibles a la temperatura se seleccionan entre N-alquil acrilamidas sustituidas y N-alquil metacrilamidas sustituidas, N,N-di-alquil acrilamida sustituida y N,N-di-alquil metacrilamida sustituida o mezclas de las mismas.
- 20 4. Un copolímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el monómero sensible a la temperatura se selecciona entre N-isopropilacrilamida y N-isopropilmetacrilamida o una mezcla de las mismas.
- 25 5. Un copolímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los monómeros hidrófobos y/o hidrófilos son monómeros de acrilato N-sustituido o metacrilato N-sustituido.
- 30 6. Un copolímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medio de reticulación es un grupo funcional reactivo presente como parte de las unidades monoméricas sensibles a la temperatura o hidrófilas/hidrófobas o el medio de reticulación es un constituyente monomérico adicional del copolímero que tiene un grupo funcional que reacciona con los grupos funcionales presentes sobre la superficie del sustrato.
- 35 7. Un copolímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medio de reticulación es un grupo de reticulación de silano seleccionado entre un grupo metoxisilano y/o un grupo etoxisilano.
- 40 8. Un copolímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el copolímero es poli (N-isopropilacrilamida-co-hidroxipropil metacrilato-co-3-trimetoxisililpropil metacrilato) o poli(N-isopropilacrilamida-co-hidroxipropil metacrilato (HPM)-co-3-trimetoxisililpropil metacrilato (TMSPM)-co-dodecilmecrilato).
- 45 9. Un proceso para la preparación de un copolímero sensible a la temperatura de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el proceso la polimerización de unidades monoméricas sensibles a la temperatura y una o más unidades monoméricas hidrófobas y/o hidrófilas adicionales.
- 50 10. Un sustrato que tiene una superficie sobre la cual las células pueden crecer y dividirse en el cultivo, donde dicha superficie está recubierta con un recubrimiento de película polimérica formado a partir de un copolímero sensible a la temperatura como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y dicho recubrimiento de película polimérica está unido covalentemente a la superficie del sustrato.
- 55 11. Un sustrato de acuerdo con la reivindicación 10, donde el sustrato es un recipiente de cultivo celular.
- 60 12. Una solución de recubrimiento para recubrir la superficie de un sustrato, comprendiendo la solución de recubrimiento un copolímero sensible a la temperatura como se define en las reivindicaciones 1 a 8 disuelto en un disolvente.
- 65 13. Un kit de partes que comprende un copolímero sensible a la temperatura como se define en las reivindicaciones 1 a 8 y un disolvente para disolver el copolímero para formar una solución que puede aplicarse posteriormente a la superficie del sustrato.
14. Un método para formar un recubrimiento de película sensible a la temperatura sobre una superficie de un sustrato, comprendiendo dicho método disolver un copolímero sensible a la temperatura como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 8 en un disolvente para formar una solución, aplicar la solución sobre la superficie del sustrato, retirar el disolvente e hibridar el copolímero a la superficie del sustrato.
15. Un método para separar las células de la superficie de un sustrato que está recubierto con un copolímero sensible a la temperatura como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el método enfriar el sustrato para hidratar el copolímero sensible a la temperatura y, de esta manera, separar las células presentes sobre la superficie del sustrato.
16. Un método para cultivar células que comprende sembrar sobre un sustrato como se ha definido en las reivindicaciones 10 u 11 en presencia de un medio de cultivo y mantener la temperatura a una temperatura de incubación para permitir que las células crezcan y se dividan, y después reducir la temperatura para recoger las células.

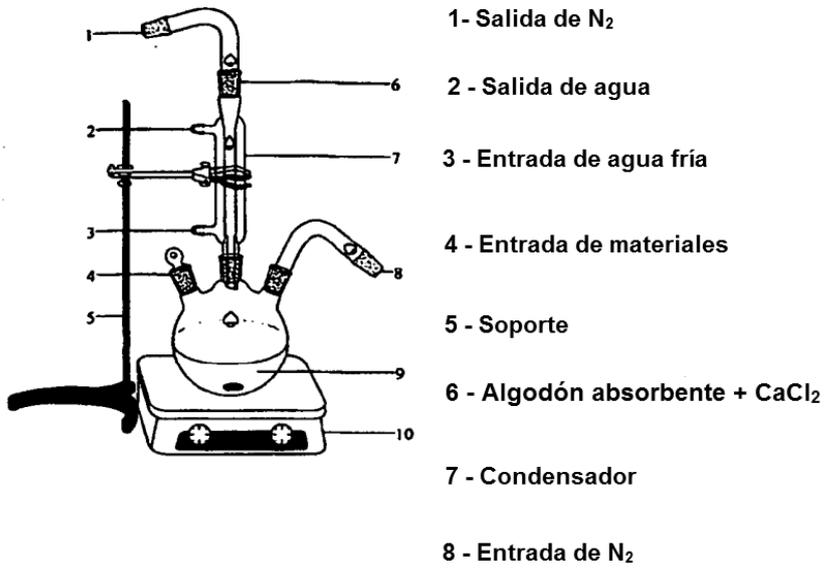


Figura 1

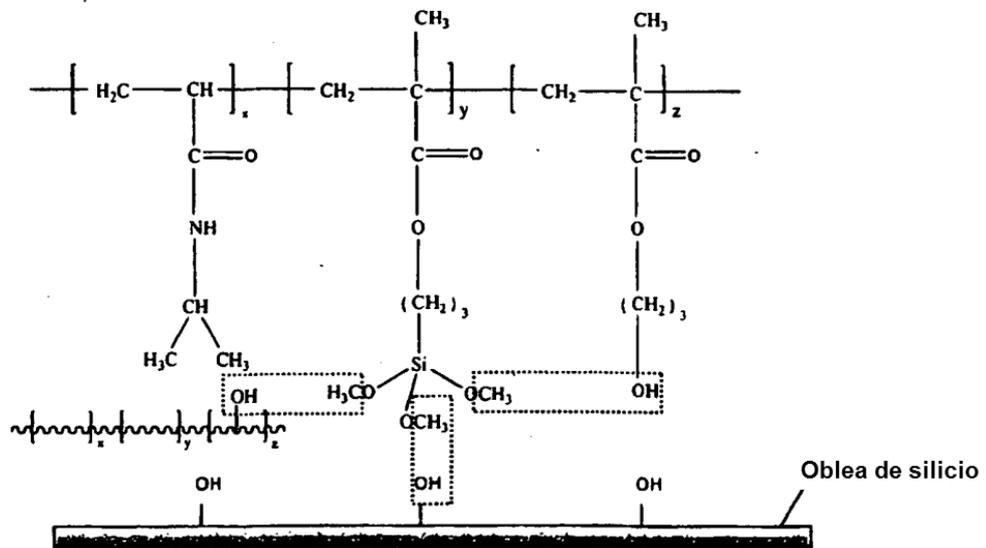


Figura 2

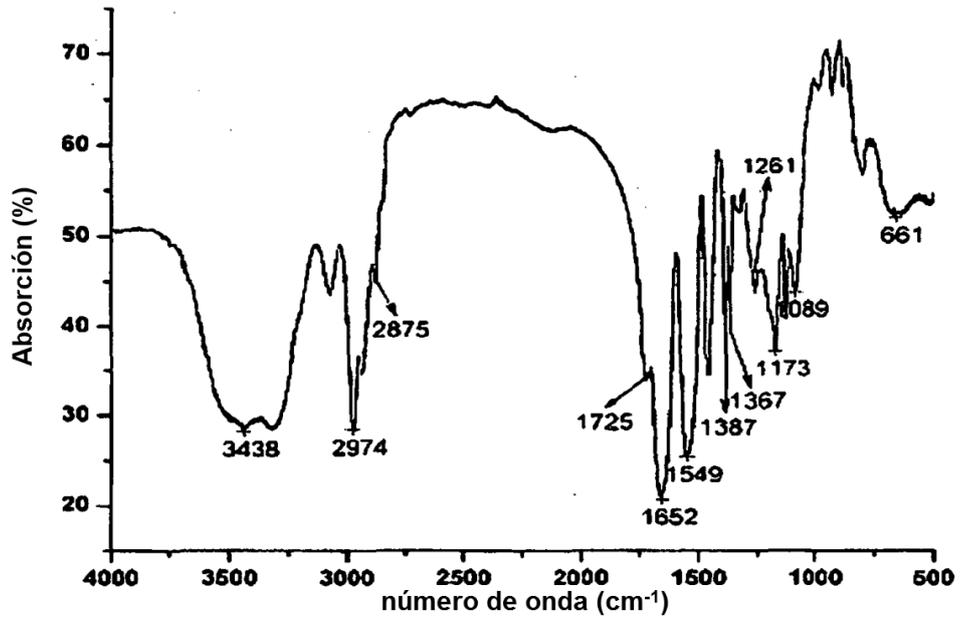


Figura 3

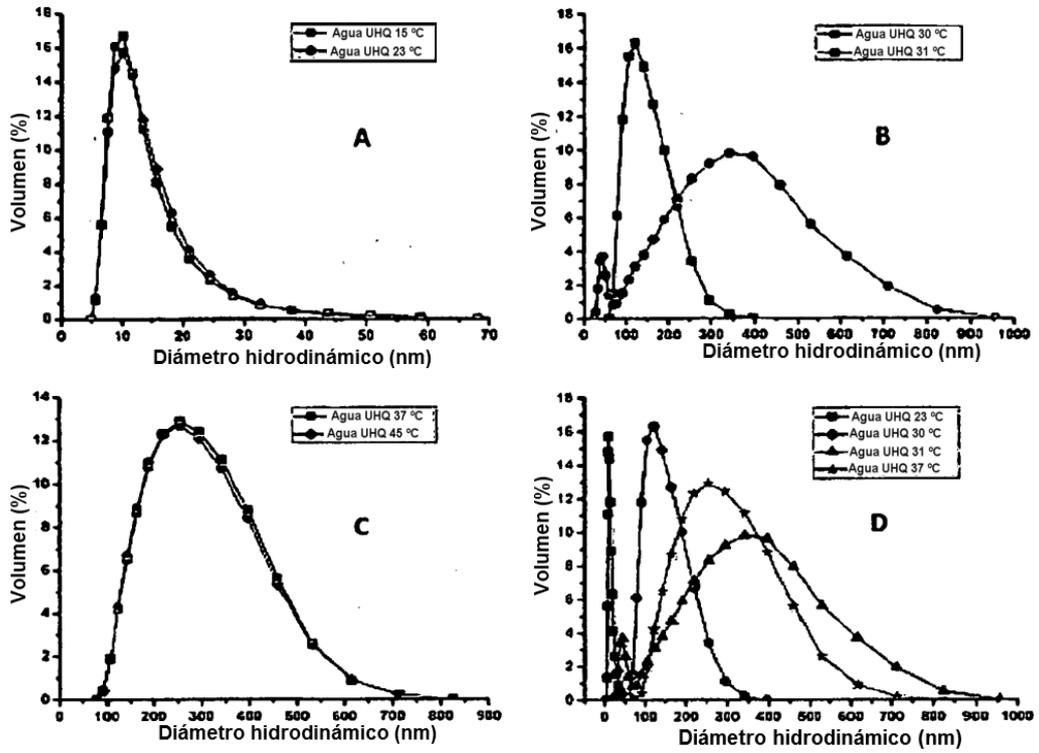


Figura 4

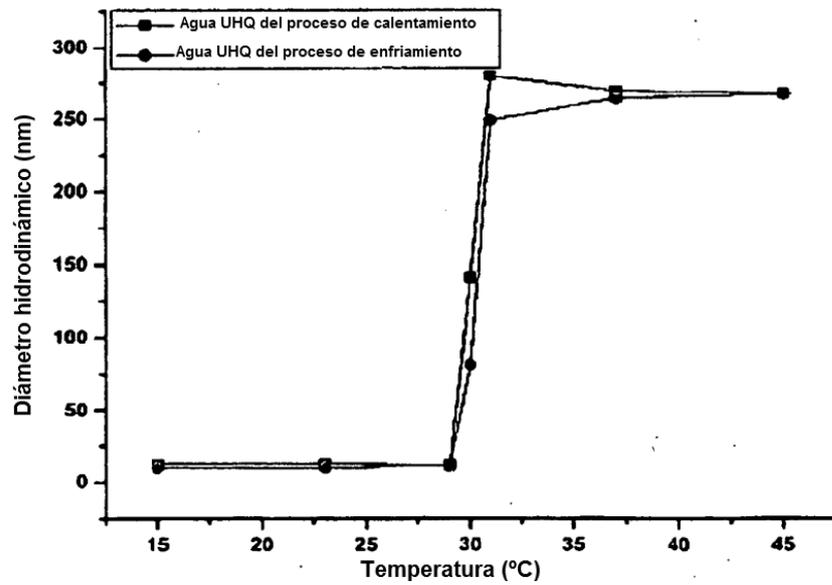


Figura 5

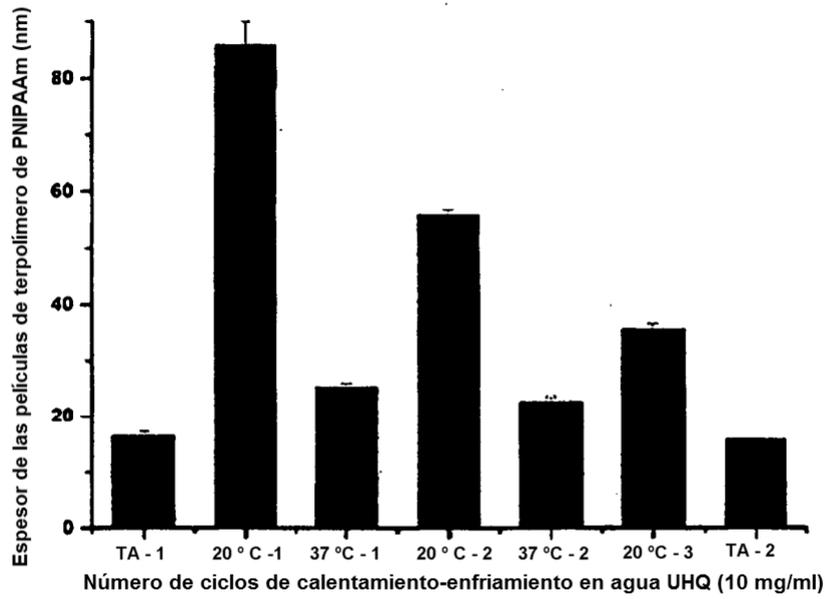


Figura 6

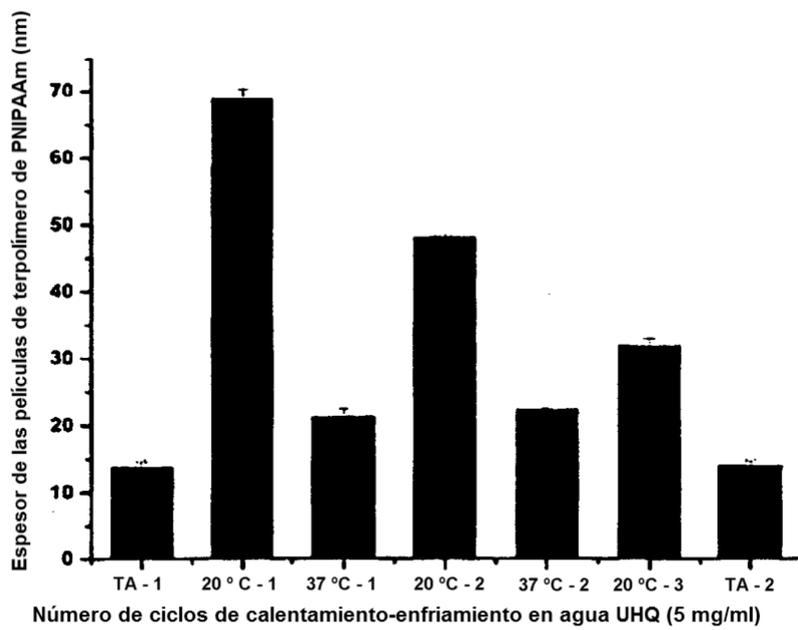


Figura 7

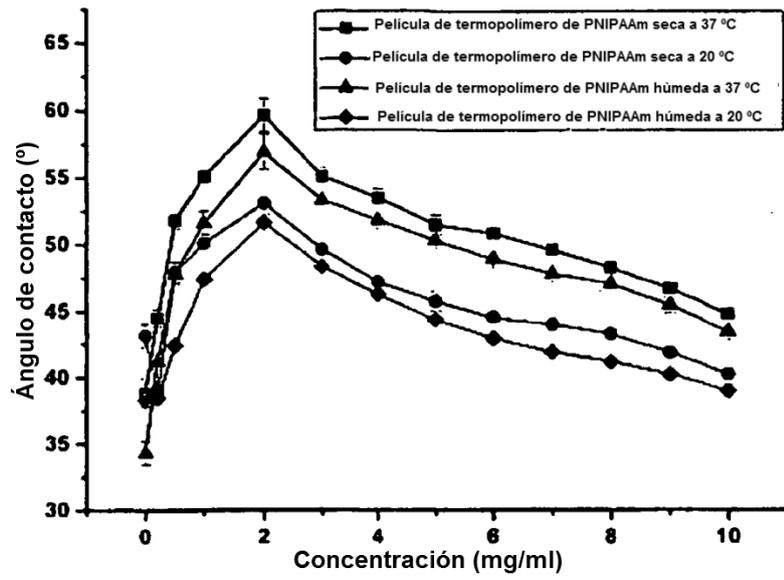


Figura 8

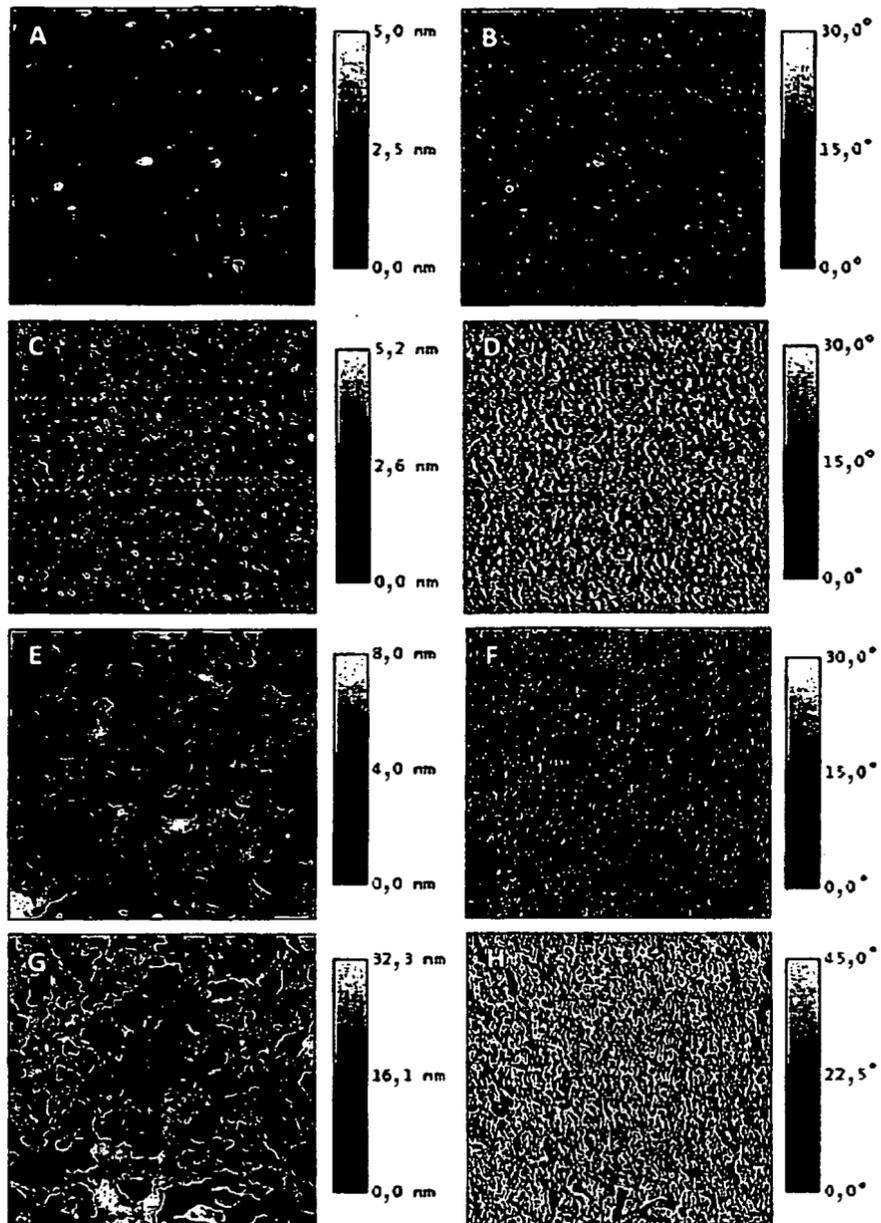


Figura 9

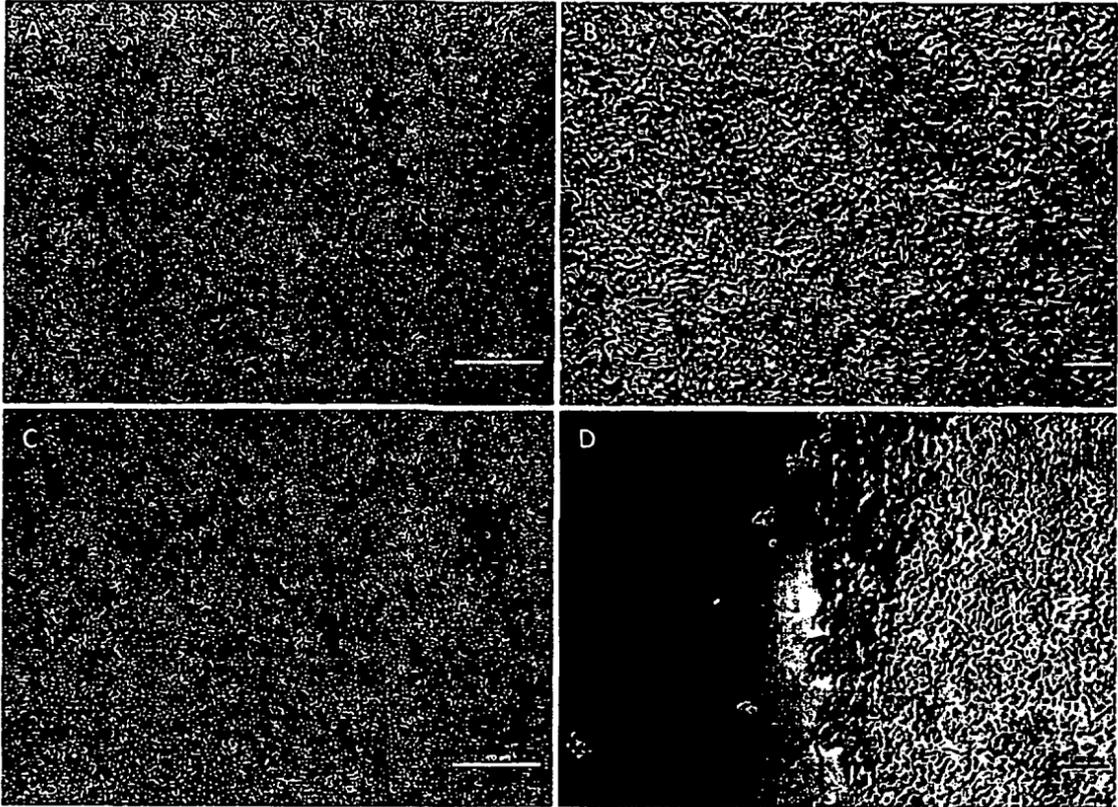


Figura 10

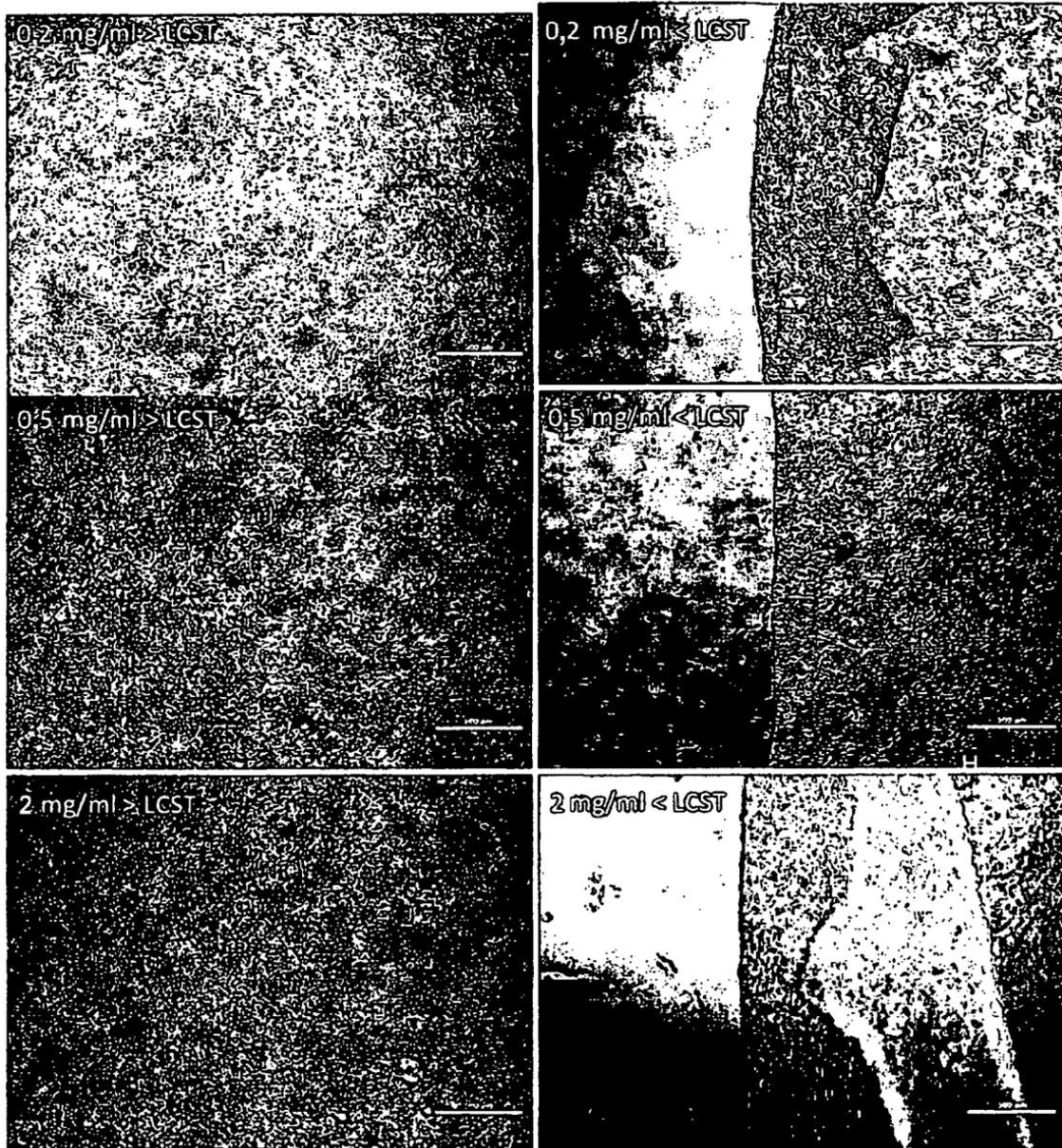


Figura 11

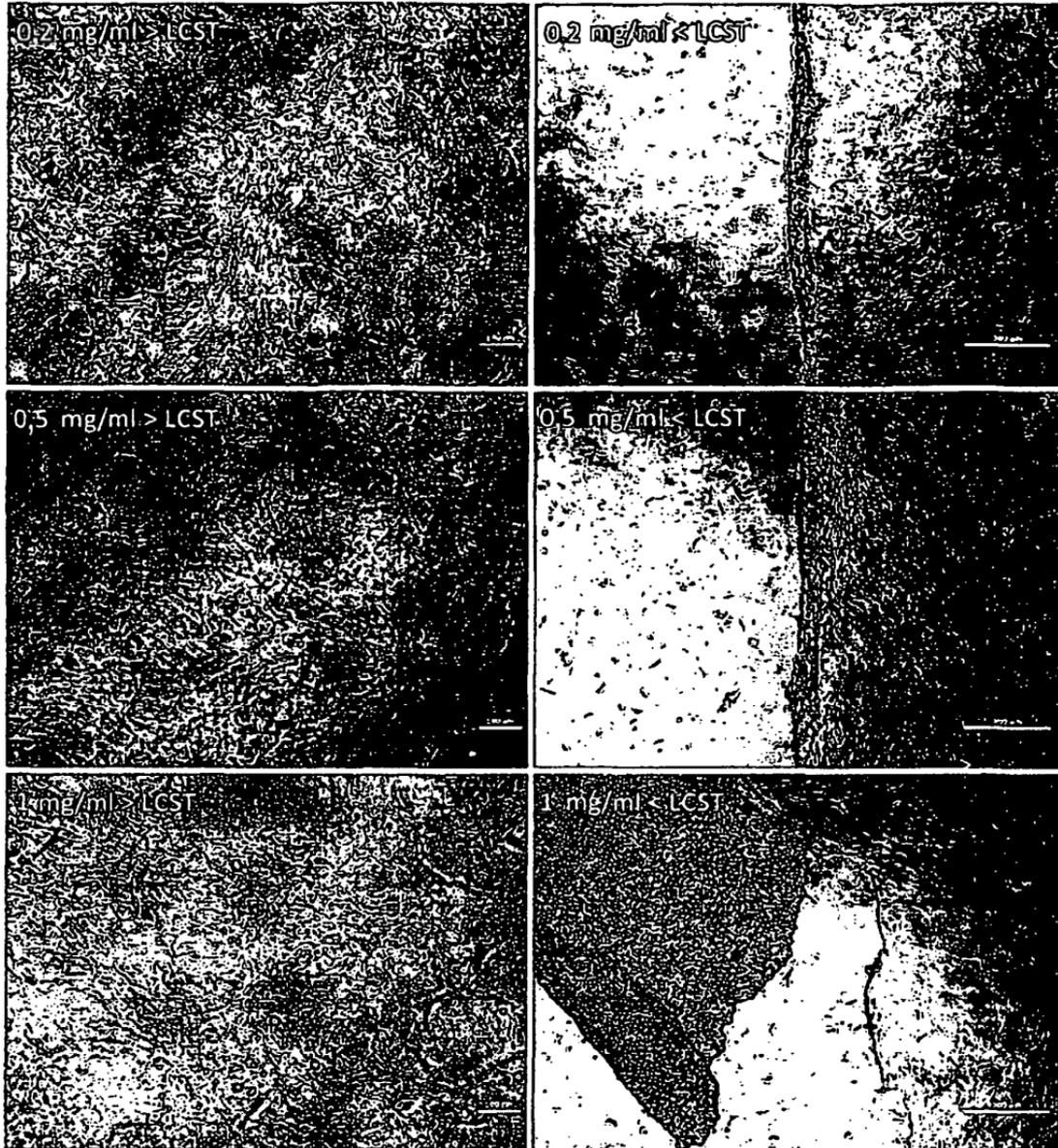


Figura 12

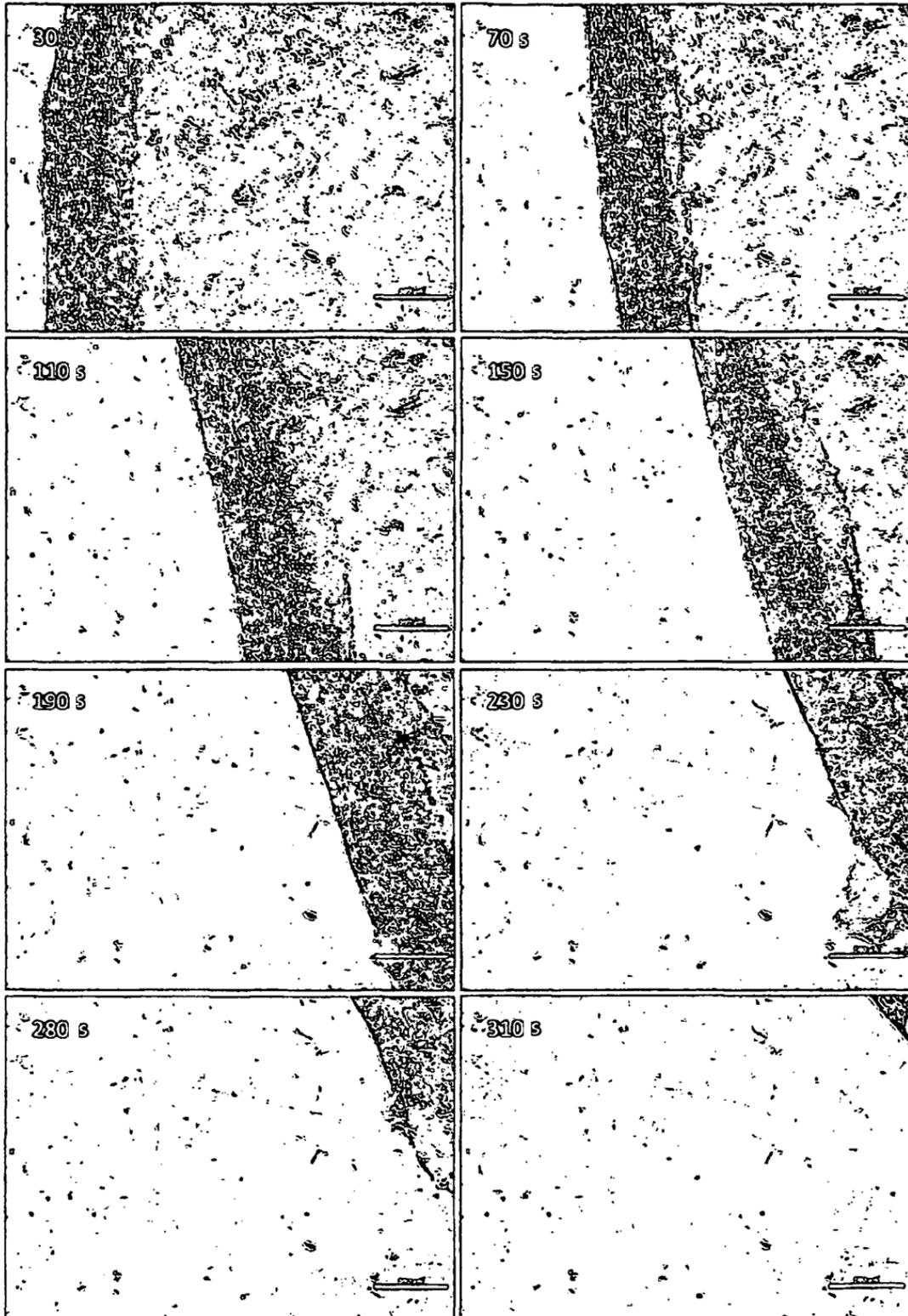


Figura 13

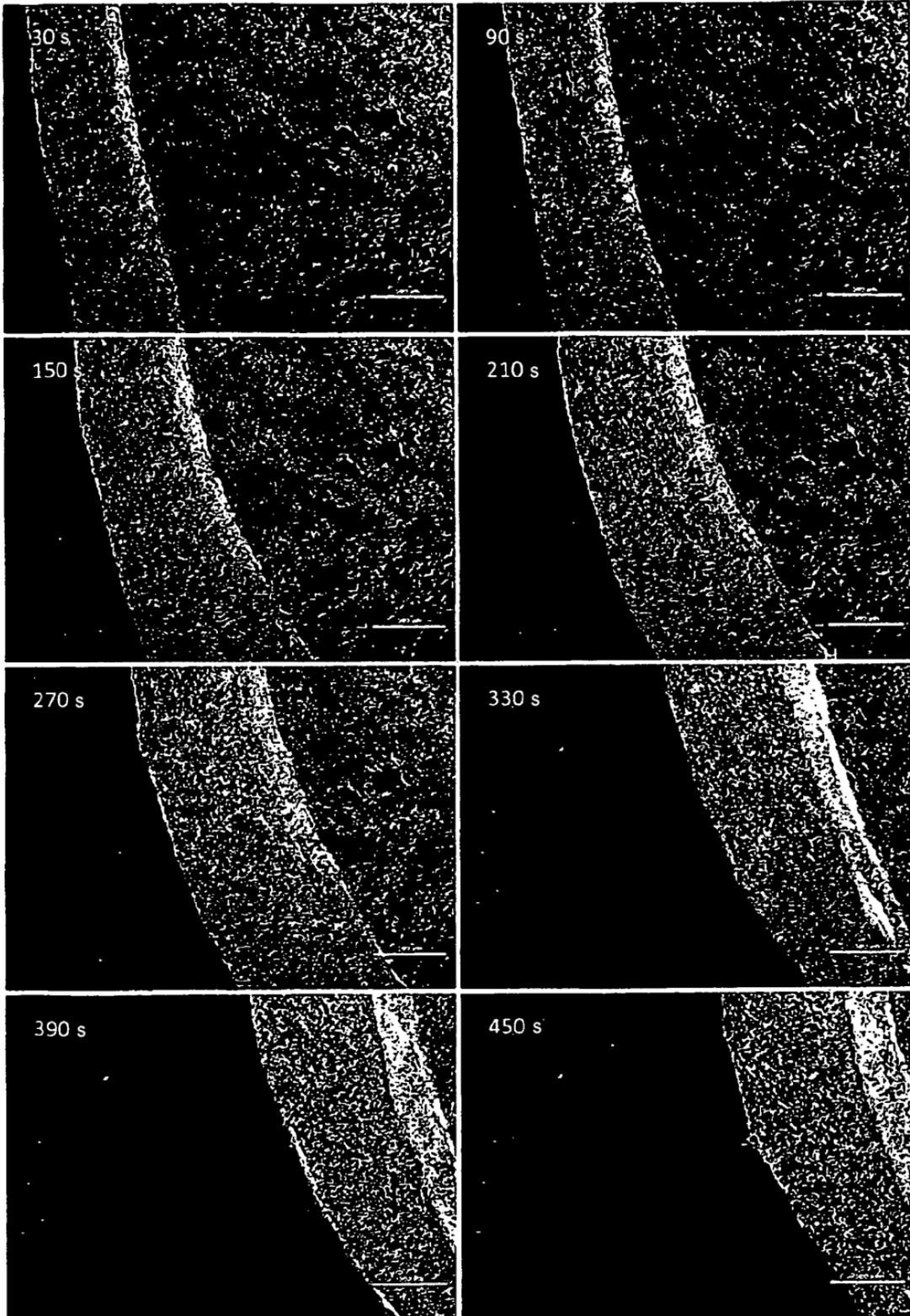


Figura 14

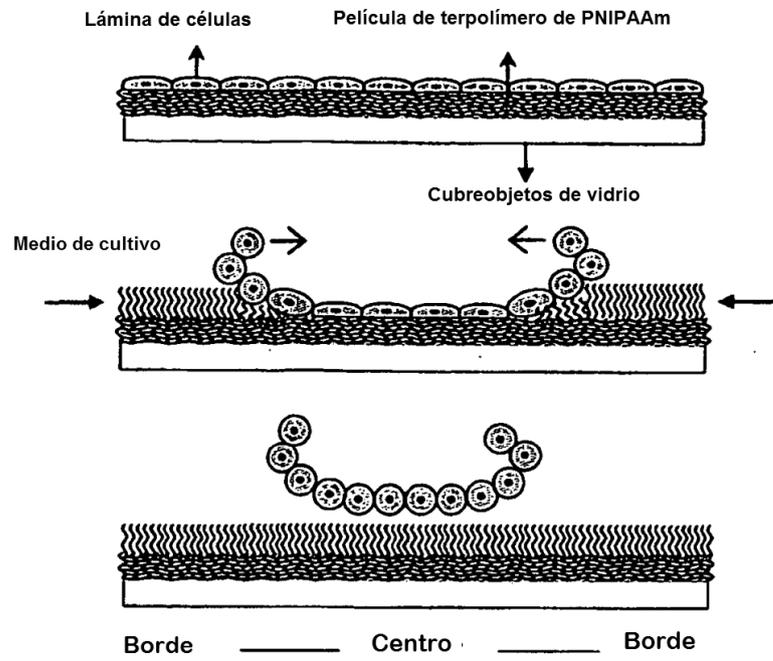


Figura 15

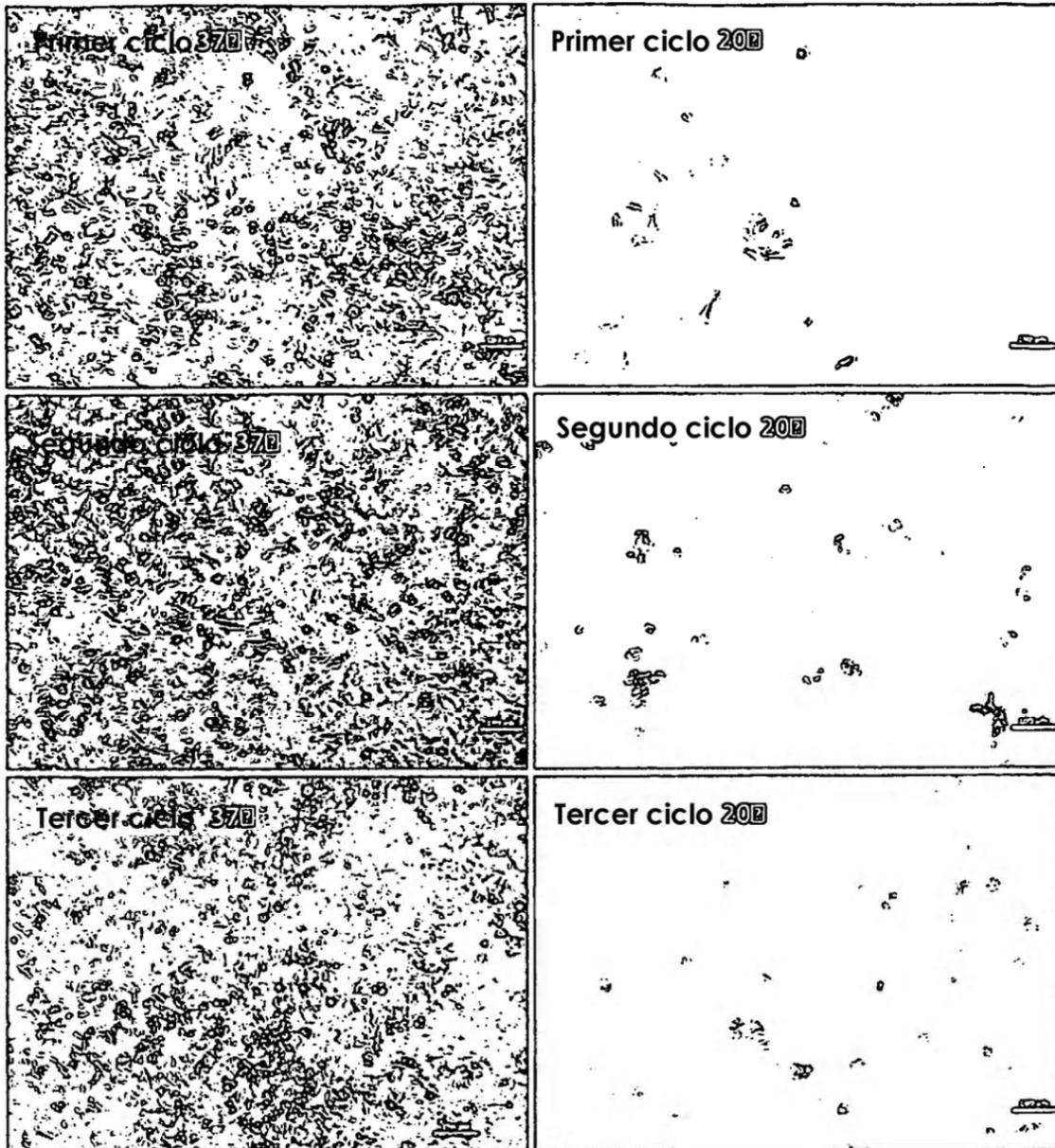


Figura 16

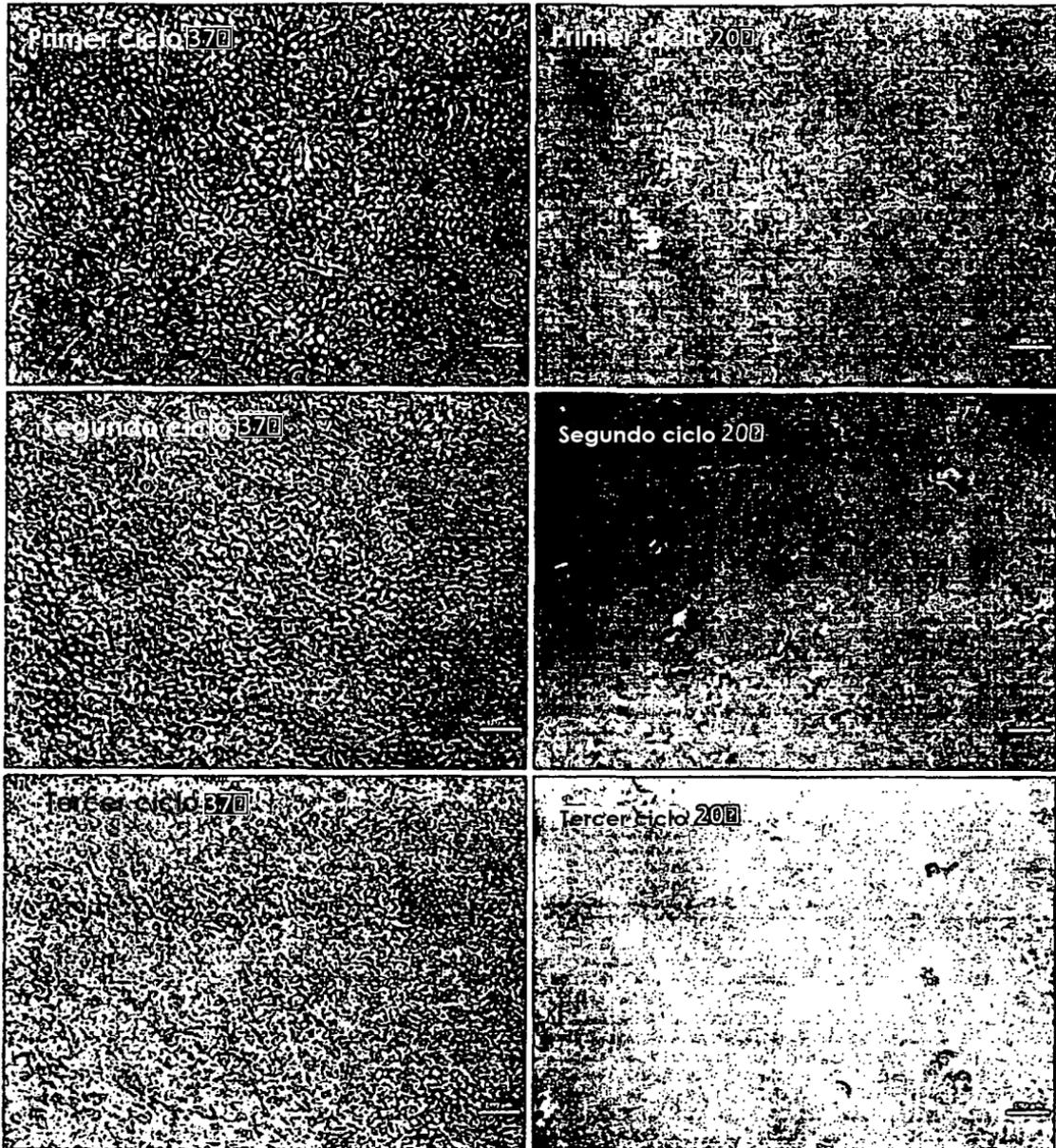


Figura 17

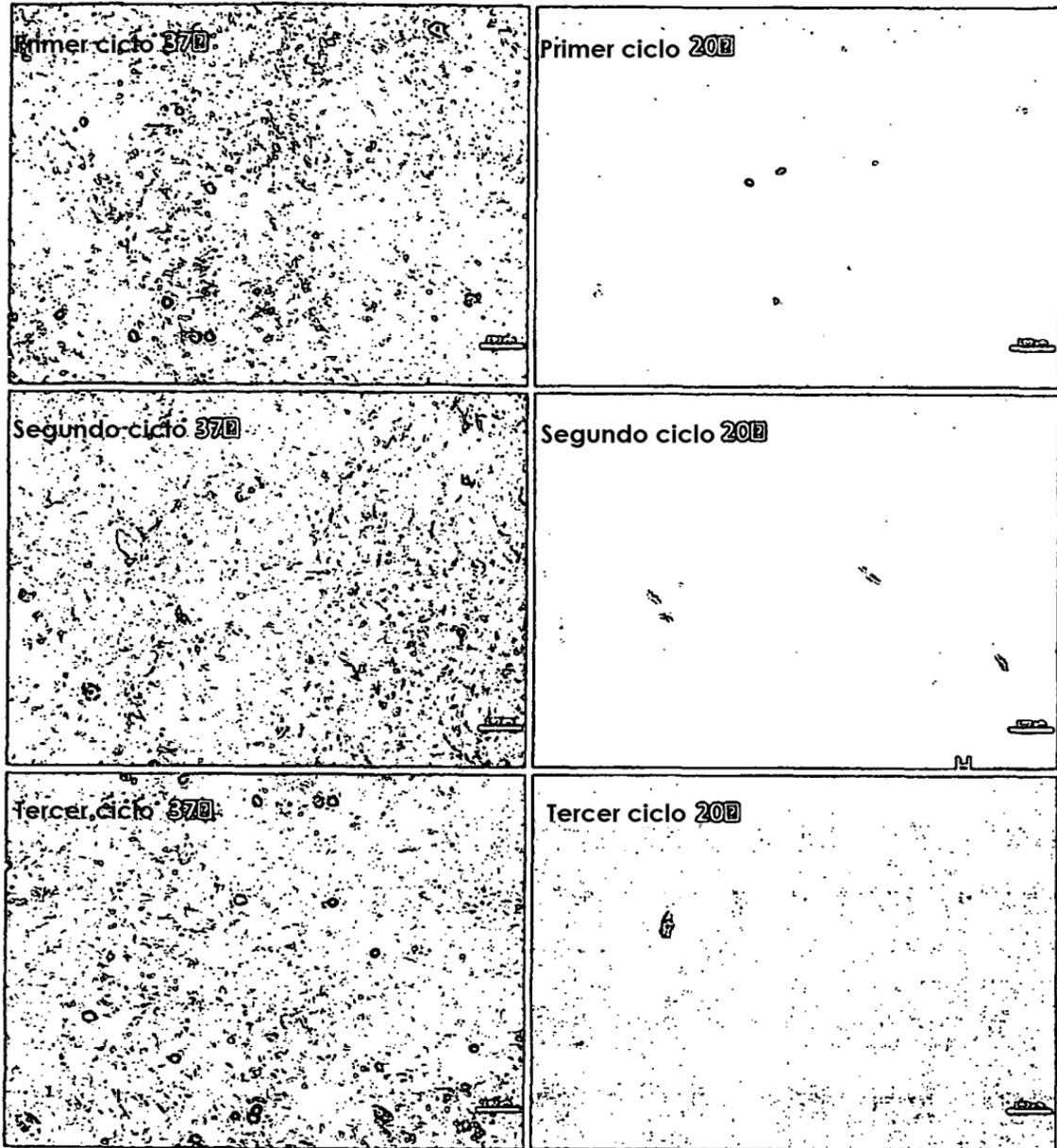


Figura 18

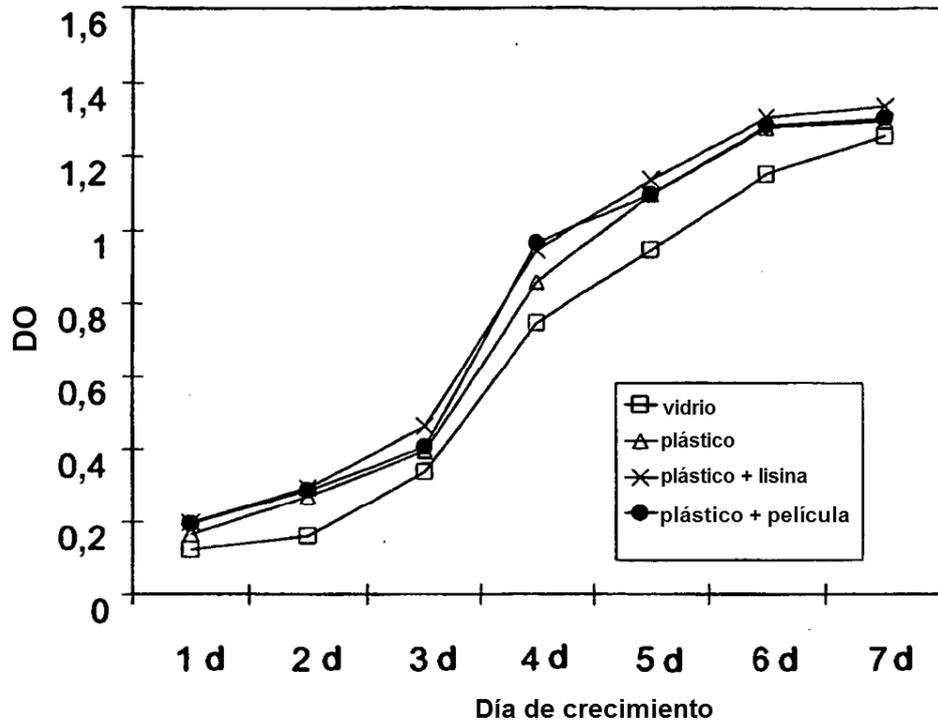


Figura 19

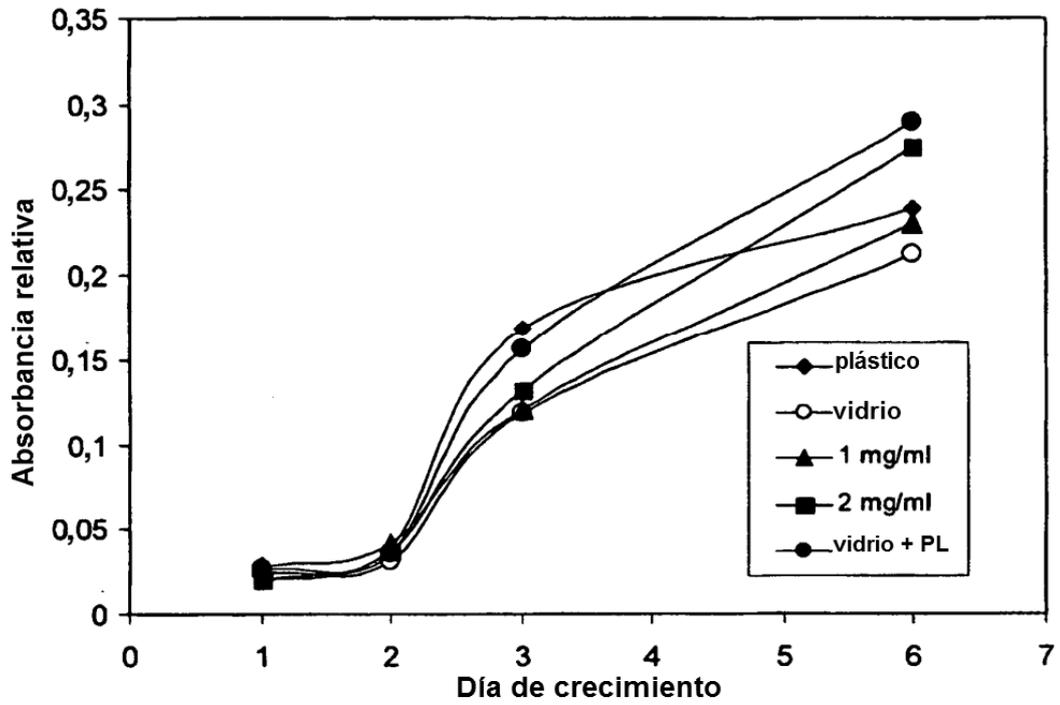


Figura 20

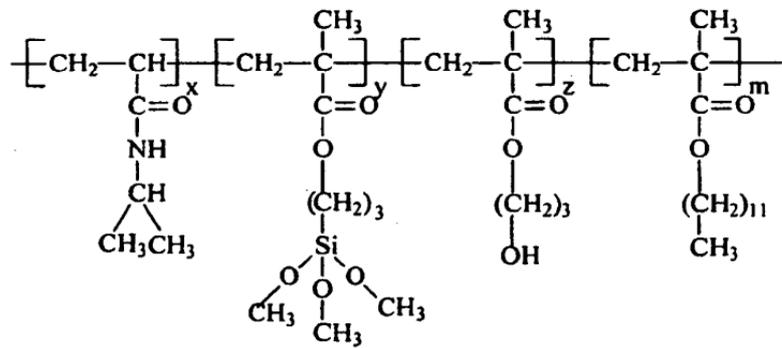


Figura 21