

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 115**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C09D 179/02 (2006.01)

C08G 73/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11460052 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2574664**

54 Título: **Método para la preparación de un sustrato de recubrimiento termosensible, sustrato con un recubrimiento termosensible y su aplicación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2014

73 Titular/es:

**CENTRUM MATERIALÓW POLIMEROWYCH I
WEGLOWYCH PAN (33.3%)
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 34
41819 Zabrze, PL;
CENTRUM LECZENIA OPARZEN (33.3%) y
SLASKI UNIWERSYTET MEDYCZNY (33.3%)**

72 Inventor/es:

**UTRATA-WESOLEK, ALICJA;
WALACH, WOJCIECH;
OLESZKO, NATALIA;
DWORAK, ANDRZEJ;
TRZEBICKA, BARBARA;
KOWALCZUK, AGNIESZKA;
ANIOL, JACEK;
LESIAK, MARTA;
SITKOWSKA, ANNA;
SIERON, ALEKSANDER L.;
KAWECKI, MAREK;
GLIK, JUSTYNA;
KLAMA-BARYLA, AGNIESZKA y
NOWAK, MARIUSZ**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 516 115 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).

MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE UN SUSTRATO DE RECUBRIMIENTO TERMOSENSIBLE, SUSTRATO CON UN RECUBRIMIENTO TERMOSENSIBLE Y SU APLICACIÓN

DESCRIPCIÓN

5 El objeto de esta invención es un método para preparar un sustrato con una capa termosensible, un sustrato con capa termosensible y aplicaciones para este sustrato.

10 El material está previsto para su uso en medicina regenerativa, biología, biotecnología y otros campos relacionados.

15 En el tratamiento de pacientes con quemaduras graves, se aplican numerosas soluciones que están previstas para intercambiar una herida de quemadura por una herida quirúrgica para prevenir la infección. El autotrasplante de piel es la mejor solución. Sin embargo, este método no siempre es eficaz debido a insuficientes sitios donadores. Aplicaciones alternativas de apósitos biológicos, es decir, xenoinjertos o aloinjertos de piel, proporcionan sólo una oportunidad para la infección con patógenos zoonóticos [1-3]. También pueden usarse sustitutos de piel obtenidos mediante ingeniería de tejidos. Se usan como componentes de la piel colágeno, glucosaminoglucanos, poliglicolida o ácido hialurónico o matrices biodegradables [4,5]. Tales componentes constituyen una matriz que puede cubrirse con fibroblastos o queratinocitos obtenidos a través de cultivo *in vitro*. Sin embargo, la aplicación de estos componentes de la piel es bastante cara, y pueden producirse problemas en el proceso terapéutico. Además, la obtención de un número requerido de queratinocitos requiere mucho tiempo y muy a menudo da como resultado su muerte, reduciendo por tanto la eficacia del cultivo. Un cultivo de las propias células cutáneas de un paciente, tales como queratinocitos, y su aplicación individual a la herida es una alternativa a los métodos anteriores. No obstante, un procedimiento de este tipo revela deficiencias esenciales [3,6]. La primera, tal como se describió anteriormente, se refiere al lento cultivo de los queratinocitos. Adicionalmente, tras la proliferación de las células, se usan métodos enzimáticos para separar las células del sustrato, pero las enzimas destruyen tanto la matriz extracelular producida por las células como proteínas importantes. Se disgregan láminas de células (es decir, tras el desprendimiento las células no están unidas entre sí), y la mayoría de ellas mueren. Entonces se aplican queratinocitos a la herida en forma de una suspensión y se crean agrupaciones de células. Por tanto, no es posible el control preciso sobre la disposición de las células para cubrir completamente una herida.

20 La bibliografía científica [7-10] y de patentes describe métodos de cultivo celular sobre sustratos de base sólida a los que se ha unido covalentemente un polímero termosensible. Tales polímeros y copolímeros presentan cambios reversibles en sus propiedades con los cambios en la temperatura; son solubles sólo por debajo de una temperatura dada y por encima de esa temperatura (la denominada temperatura de punto de enturbiamiento, T_{CP}) precipitan a partir de la disolución. Para un sustrato con una capa de polímero o copolímero termosensible con una afinidad por el agua que puede cambiar dentro del intervalo de 0-80°C, el cultivo celular se realiza a una temperatura superior a la temperatura de disolución crítica inferior (LCST) del polímero a la que la superficie es hidrófoba. Tras la proliferación de las células, la temperatura de cultivo se reduce por debajo de la LCST hasta que la capa de polímero o copolímero se vuelve hidrófila. Las células se desprenden del sustrato y pueden retirarse en forma de una lámina. No se requiere la aplicación de métodos enzimáticos o mecánicos de separación celular.

25 La fase de cultivo celular va precedida por la preparación de la superficie relacionada con la modificación del sustrato de base seguido por la unión de la capa de polímero termosensible.

30 Las superficies de los materiales usados como sustratos de base pueden modificarse con métodos químicos y fisicoquímicos dirigidos a producir cambios estructurales en la superficie o cambios en la humectabilidad de la superficie. Tales materiales se usan entonces como sustratos de base que van a combinarse con un polímero termosensible. Con el fin de hacer esto, se aplican comúnmente injerto por radiación o fotoinjerto y conducen a la formación de enlaces químicos entre el sustrato de base y el polímero.

35 Con referencia a los sustratos de base usados en cultivos celulares, los documentos de patente (por ejemplo, documentos JP 6104061 o JP5192130 y otros) comentan sustratos que pueden prepararse de cualquier tipo de polímero (incluyendo polietileno, polipropileno, poli(tereftalato de etileno), poli(tetrafluoroetileno), poliestireno y poli(metacrilato de metilo)), materiales cerámicos, metales inertes y vidrio. La forma y el tipo de sustrato no están limitados, pero se usan habitualmente placas, platos o frascos para cultivo celular.

40 La bibliografía científica y de patentes indica que se usa principalmente poliestireno modificado (TCPS - poliestireno para cultivo tisular) como sustrato de base. En otras publicaciones de patente (documento JP 2006008975 (A)), además de poliestireno, sólo se han descrito superficies de poli(tereftalato de etileno) poroso y vidrio modificadas mediante el uso de un agente de acoplamiento para aplicaciones en cultivo celular. El injerto de polímeros incluyendo poli(N-isopropilacrilamida) sobre un sustrato de este tipo se ha realizado en presencia de un iniciador de radicales.

45 Un sustrato para cultivo celular, cuya superficie está cubierta con un polímero o copolímero termosensible que puede alterar de manera reversible sus propiedades de hidrófilas a hidrófobas con los cambios en la temperatura, es

el objeto de la patente EP0382214 (B1). Se unió una capa de poli(N-isopropilacrilamida) o poli(N,N-dietilacrilamida) en una placa de Petri de poliestireno durante el injerto con irradiación con haz de electrones. Se cultivaron células de tejido endotelial sobre el sustrato en un medio de cultivo celular a una temperatura de 37°C y en presencia de un 5% de CO₂. Tras la proliferación, la temperatura de cultivo se redujo desde 37°C hasta 4°C, y se observó una separación de las células.

Un método de cultivo de células cutáneas y preparación del sustrato fue también el objeto de la solicitud de patente JP5192138 (A) en el que se injertó N-isopropilacrilamida disuelta en alcohol isopropílico sobre una placa de Petri mediante irradiación con haz de electrones. El cultivo de queratinocitos se realizó sobre la placa, esterilizada con óxido de etileno, según el método y las condiciones descritos anteriormente.

Cuestiones relacionadas con el cultivo celular, incluyendo muchos tipos de células en una capa y sustratos con al menos un polímero termosensible, fueron el objeto de otras invenciones notificadas (por ejemplo, documento WO2010010837 (A1)) en las que se usan dos o más polímeros injertados sobre un sustrato de base en diferentes zonas para el cultivo celular. Según el documento EP1264877A1, el cultivo celular se realiza sobre el sustrato cubierto con una capa de polímeros con diferentes afinidades por el agua. El sustrato de base puede no sólo ser poliestireno y poli(metacrilato de metilo), sino que también puede incluir otros materiales tales como materiales cerámicos y metales. Cuestiones similares son el objeto de las solicitudes de patente WO2010044417 (A1) y EP2348099 (A1).

En la solicitud EP0470681 (A1), se presentan una descripción y cuestiones referentes al cultivo de muchos tipos de células en agrupaciones de tamaño controlable. La invención US20080009063A1 se refiere al cultivo celular sobre un sustrato cuya superficie está conformada con numerosos cráteres que forman diversos patrones cubiertos con al menos un polímero termosensible. También pueden cultivarse células epidérmicas, según notifica la invención WO0210349 (A1), sobre un sustrato cubierto con una o muchas capas de un polímero termosensible, y la separación de las células del sustrato es posible con el uso de una membrana de polímero.

Una estructura de múltiples capas del sustrato de cultivo celular, el método para su preparación y las células cultivadas sobre el mismo son el objeto de la invención notificada WO2010047171 (A1). Un sustrato de base de poliestireno cubierto con un polímero termosensible (poli(N-isopropilacrilamida)) e injertado mediante radiación con haz de electrones constituye las capas de sustrato. Entonces se silió la capa de polímero termosensible y se cubrió con polietilenglicol antiadhesivo o bien sobre toda la superficie o bien en zonas seleccionadas.

En ejemplos descritos en la bibliografía científica y de patentes y en los ejemplos mencionados anteriormente, la capa de polímero de un sustrato de cultivo celular se hizo de un polímero termosensible: poli(N-isopropilacrilamida) NIPAM [8,9,12-14] y sus derivados, es decir, copolímeros de NIPAM y metacrilato de n-butilo [15,16], NIPAM y etilenglicol [17-19], NIPAM y 2-carboxiisopropilacrilamida (CIPAM) [20-22].

Estos polímeros se injertaron principalmente sobre sustratos hechos de poliestireno modificado (TCPS) en un aparato sofisticado usando tecnología de injerto por radiación. En este procedimiento, la unión covalente del polímero (PNIPAM) al sustrato se produce con su reticulación simultánea y se crea una capa de hidrogel sobre la superficie, en la que las cadenas están unidas entre sí en una reticulación en red.

La densidad de injerto de polímero sobre el sustrato de base oscila entre 5 y 80 µg/cm², y si la densidad de injerto es inferior a 5 µg/cm², las células se cultivan como una monocapa. Sin embargo, pueden producirse problemas con la separación de la lámina de células cultivadas del sustrato. Cuando la densidad de injerto es superior a 80 µg/cm², la capa de polímero es inestable, y puede verse impedida la adhesión celular.

Los términos usados en la descripción se definen tal como sigue:

- LCST - temperatura de disolución crítica inferior

- grupo de terminación - un grupo funcional, nucleófilo, que puede reaccionar con un centro de propagación catiónico en el procedimiento de polimerización catiónica

- enlace covalente - unión química entre átomos con una diferencia de electronegatividad de hasta 1,7 en la escala de Pauling, por ejemplo, C-C, C-O, C-N, etc.

- cepillo de polímero sobre la superficie - una superficie que consiste en cadenas de polímero trabadas en el extremo, injertadas o ancladas que se extienden desde la superficie del sustrato

- TCPS (poliestireno para cultivo tisular) - poliestireno modificado para cultivo celular o tisular

- "injerto a partir de" - tipo de inmovilización de polímero que consiste en la iniciación de la polimerización con un iniciador injertado sobre un sustrato de base y que da como resultado la unión de partículas de monómero posteriores a la cadena de polímero en crecimiento unida al sustrato

- "injerto a" - tipo de inmovilización de polímero que consiste en la unión al sustrato de base de la cadena de polímero formada anteriormente en la fase de polimerización iniciada por un iniciador en disolución

5 - confluencia - el número de células sobre la superficie que define el porcentaje del área ocupada por las células en crecimiento

- mezcla crómica - una disolución de dicromato de sodio en ácido sulfúrico concentrado usada para desengrasar y lavar el vidrio

10 - disolución piraña - una disolución de ácido sulfúrico concentrado con un 30% de peróxido de hidrógeno usada para eliminar la contaminación de superficie

15 - inmovilización de polímero - unión de cadenas de polímero a una superficie sin la pérdida de movilidad de las cadenas

- grupo de iniciación catiónico - grupo cargado positivamente que es parte de un iniciador para iniciar el crecimiento de la cadena de polímero

20 - grupo de unión de sililo - una conexión entre un polímero y un sustrato de base creada en la reacción entre el extremo de la cadena de polímero y un compuesto con un átomo de silicio y un grupo funcional que se ha unido previamente al sustrato

25 - centro de propagación catiónico - grupo de extremo reactivo, cargado positivamente, que puede unir partículas de monómero y reproducir el mismo centro, provocando así el crecimiento de la cadena de polímero en una reacción de polimerización catiónica.

30 Se limpia un sustrato de silicio o vidrio no orgánico y se modifica con grupos reactivos funcionales en una atmósfera de argón para usarse como base para la producción de un sustrato con una capa de polímero termosensible de afinidad por el agua que puede cambiar (LCST) dentro de 0-80°C según esta solicitud de patente. La inmovilización del polímero termosensible se realiza mediante injerto de cadenas con la formación de enlaces covalentes en una disolución. La inmovilización del polímero termosensible se realiza esencialmente a partir de la disolución de homo y copolímeros vivos a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida, preferiblemente en acetonitrilo, en la que se crean enlaces covalentes en la reacción entre los grupos de terminación nucleófilos del sustrato de base (obtenidos como resultado de la modificación del sustrato) y el centro de propagación catiónico en el extremo de la cadena de los polímeros derivados del grupo de 2-oxazolina 2-sustituida.

35 La inmovilización se realiza preferiblemente hasta que se forma una capa de polímero con una conformación en cepillo y una densidad de injerto del polímero de 0,1-1,8 cadenas/nm² sobre un sustrato de base.

40 El grupo de terminación nucleófilo se selecciona preferiblemente de grupos que incluyen grupos amino y sus derivados, grupos hidroxilo y sus derivados, y grupos tiol y sus derivados. El grupo de iniciación catiónico también se selecciona preferiblemente de un grupo que incluye ácido p-toluenosulfónico y sus derivados con ésteres, ácido trifluorometanosulfónico y sus derivados con ésteres, haluros de alquilo, haluros de bencilo, fluoruros de antimonio y boro, ácido sulfúrico y sus ésteres, ácido clorhídrico, ácido peryódico y perclórico y sus sales, cloroformatos, y ácido tricloroacético y sus derivados.

45 Se limpia un sustrato de silicio o vidrio no orgánico y se modifica con grupos funcionales reactivos en una atmósfera protectora de argón para usarse como base para la producción de un sustrato con una capa de polímero termosensible de afinidad por el agua que puede cambiar (LCST) dentro de 0-80°C según otras variantes de la invención. La inmovilización del polímero termosensible se realiza en una disolución mediante injerto de cadenas para formar enlaces covalentes. La inmovilización de los polímeros termosensibles a partir de un grupo de homo y copolímeros de 2-oxazolina 2-sustituida se realiza esencialmente en una disolución, preferiblemente de acetonitrilo, en la que se producen enlaces covalentes durante la polimerización del monómero a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida, tal como se describe mediante la fórmula (1). La polimerización se inicia mediante un iniciador catiónico que aparece sobre el sustrato de base que es un resultado de la modificación del sustrato.

50 La inmovilización se realiza preferiblemente hasta que se forma una capa de polímero con una conformación en cepillo y una densidad de injerto del polímero de 0,1-1,8 cadenas/nm² sobre el sustrato de base.

55 El iniciador de la polimerización catiónica se selecciona preferiblemente de un grupo que incluye ácido p-toluenosulfónico y sus derivados con ésteres, ácido trifluorometanosulfónico y sus derivados con ésteres, haluros de alquilo, haluros de bencilo, cloroformatos, y ácido tricloroacético y sus derivados.

60 El contenido de los grupos de iniciación debe oscilar entre el 10,0 y el 0,08 por ciento en moles en relación con al menos un monómero del grupo de 2-oxazolina 2-sustituida.

65

El sustrato consiste en un sustrato de base de silicio o vidrio no orgánico que se ha modificado mediante la unión covalente de un grupo de unión de sililo a través de un grupo funcional con la capa de polímero. La capa de polímero se inmoviliza sobre el sustrato durante el injerto de las cadenas de polímero o copolímero termosensible. Esencialmente, la capa de polímero está compuesta por un polímero o copolímero a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida y tiene una conformación en cepillo de polímero. La densidad de las cadenas conectadas al grupo funcional del grupo de unión de sililo es de 0,1-1,8 cadenas/nm².

La capa de polímero preferiblemente se une covalentemente al grupo funcional del grupo de unión de sililo mediante el elemento de fórmula (2).

La capa de polímero preferiblemente también se une covalentemente al grupo funcional del grupo de unión de sililo mediante el elemento de fórmula (3).

El sustrato con una capa termosensible compuesta por homo y (co)polímeros a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida se aplica entonces al cultivo de células, particularmente células cutáneas.

La investigación relacionada con sustratos termosensibles, tanto en el campo de materiales aplicados (que no se han reconocido completamente) como en los propios procedimientos, muestra que la necesidad de un aparato altamente especializado y caro es a menudo una restricción importante para lograr resultados positivos.

Esta invención proporciona una solución, tanto en cuanto a la producción del sustrato termosensible como al uso de nuevos materiales poliméricos a partir de un grupo de homo y copolímeros de 2-oxazolina 2-sustituida. El presente trabajo permite que el sustrato se obtenga sin la aplicación de un aparato altamente especializado en las fases individuales del procedimiento, con parámetros que permiten el cultivo celular, especialmente el de células cutáneas, y con la capacidad para separar la lámina de células simplemente reduciendo la temperatura por debajo de la LCST. El sustrato, con su estructura de superficie que consiste en una conformación en cepillo de polímero, difiere de los sustratos con superficies termosensibles a base de PNIPAM, que se describen en la bibliografía científica y de patentes, en los que las cadenas de polímero no están aisladas, sino unidas por reticulaciones en red y tienen una capa de hidrogel formada sobre su superficie. La estructura de la conformación en cepillo de polímero obtenida en el método descrito en esta patente se caracteriza por una respuesta fuerte y rápida a un estímulo de temperatura.

La figura 1 muestra la fórmula estructural del monómero a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida. Las figuras 2 y 3 muestran fórmulas estructurales para los enlaces entre la capa de polímero y el grupo funcional del grupo de unión de sililo, mientras que las imágenes 1-12 presentan los resultados de cultivo celular sobre los sustratos derivados según esta invención y sobre los sustratos control.

La invención se refiere a un sustrato con una capa de polímero termosensible con afinidad por el agua que puede cambiar (LCST) dentro de 0-80°C y a un método para su producción. La preparación del sustrato se lleva a cabo en varias fases, incluyendo la fase de preparación del sustrato de base y fases posteriores del procedimiento en las que se realiza la inmovilización del polímero termosensible sobre el sustrato de base usando los métodos de "injerto a partir de" e "injerto a" para crear la capa de polímero.

La capa de polímero se sintetiza sobre el sustrato de base de silicio o vidrio no orgánico que contiene grupos funcionales hidroxilo que pueden modificarse adicionalmente para permitir la unión covalente estable del sustrato de base con el polímero termosensible. Para la inmovilización del polímero sobre el sustrato por medio del método de "injerto a", la funcionalización se produce mediante la introducción de grupos de terminación nucleófilos que incluyen grupos amina y sus derivados, grupos hidroxilo y sus derivados, y grupos tiol y sus derivados sobre el sustrato de base. En el diseño a modo de ejemplo, se usó 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) para introducir los grupos amina sobre el sustrato de base.

En el método de "injerto a partir de", se introducen grupos que inician la polimerización catiónica en el proceso de inmovilización al sustrato de base. Estos grupos incluyen ácido p-toluenosulfónico y sus derivados con ésteres, ácido trifluorometanosulfónico y sus derivados con ésteres, haluros de alquilo, haluros de bencilo, cloroformiatos, y ácido tricloroacético y sus derivados. En el diseño a modo de ejemplo de la invención, se usó 3-[bis(2-hidroxiethyl)amino]propiltrietoxi-silano esterificado con anhídrido trifluorometanosulfónico para introducir el grupo trifluorometanosulfónico sobre el sustrato de base y es esencial que el contenido de los grupos de iniciación con relación a al menos un monómero a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida ascienda a desde el 10,0 hasta el 0,08 por ciento en moles.

Todas las actividades conectadas con la preparación del sustrato se han realizado en una cámara laminar con el uso de disolventes y disoluciones filtrados para minimizar la posibilidad de contaminación.

Los sustratos de base con superficies modificadas que contienen un grupo de unión de sililo con los grupos funcionales mencionados anteriormente se usaron para la unión covalente estable con un polímero o copolímero a partir de un grupo de homo y copolímeros de 2-oxazolina 2-sustituida. Se realizó simultáneamente una

inmovilización del polímero controlada sobre la superficie.

Según una variante de la invención, se forman enlaces covalentes con el sustrato durante la iniciación de la polimerización catiónica de los monómeros mediante el iniciador sobre el sustrato de base, y se forman enlaces entre el átomo de nitrógeno del monómero de 2-oxazolina 2-sustituida y los grupos alquilo del grupo de unión de sililo. En otra variante de la invención, los enlaces se forman durante la terminación de las cadenas de polímero en crecimiento en la reacción con los grupos funcionales del grupo de unión de sililo. En esta variante, los enlaces pueden producirse entre el átomo de nitrógeno del grupo amina, o el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, o el átomo de azufre del grupo tiol con el átomo de carbono de la última unidad de la poli(2-oxazolina 2-sustituida).

En las disoluciones modelo, se han usado poli(2-isopropil-2-oxazolina) y un copolímero de 2-etil-2-oxazolina y 2-nonil-2-oxazolina para ilustrar el método de "injerto a" tal como se muestra en el diagrama 1. Se usó poli(2-isopropil-2-oxazolina) para ilustrar el método de "injerto a partir de", tal como se muestra en el diagrama 2.

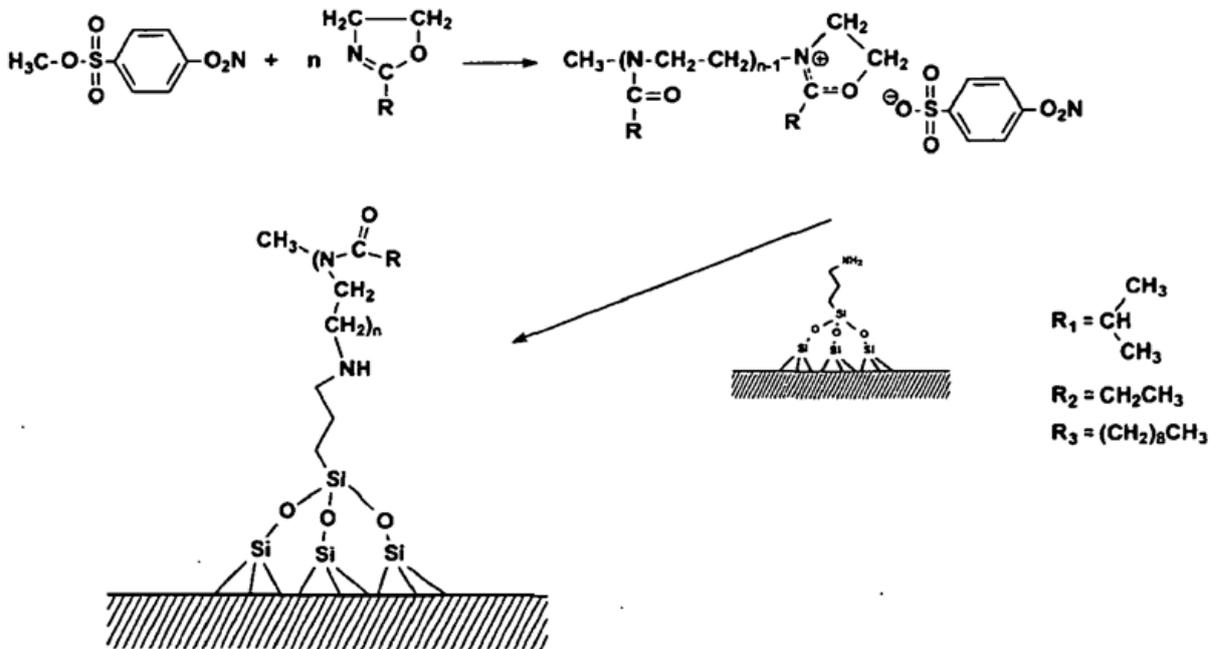


Diagrama 1

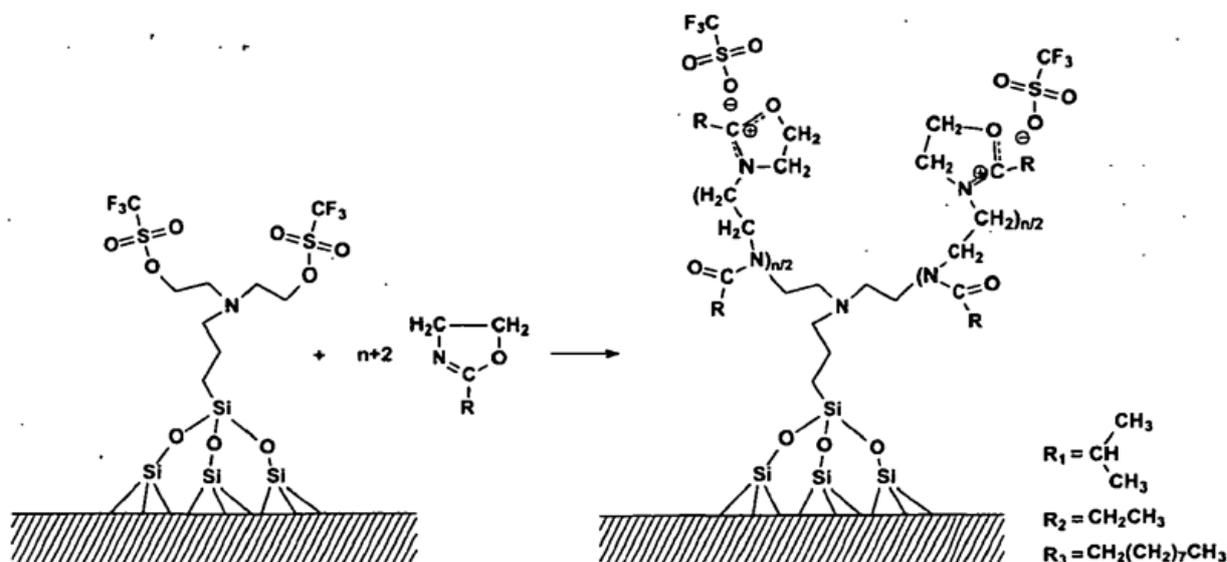


Diagrama 2

- 5 Los polímeros y copolímeros mencionados anteriormente son biocompatibles con células cutáneas y no presentan toxicidad ni siquiera a altas concentraciones de (co)polímero en un medio de cultivo. Estos polímeros tienen grupos amida en su cadena de polímero, por tanto se asemejan a estructuras peptídicas, lo que puede influir en su interacción con células cutáneas. Además, en estudios se ha encontrado que cambiando la composición del copolímero, es decir, la composición de los meros de 2-etil-2-oxazolona y 2-nonil-2-oxazolona, la temperatura de transición de fase (LCST) puede controlarse libremente desde 10°C hasta 80°C. Sin embargo, debido a circunstancias que surgen de las temperaturas adecuadas para cultivo celular, este intervalo se limita a de 20°C a 37°C. PNIPAM es actualmente el polímero termosensible usado más a menudo para sustrato de cultivo celular y su injerto sobre un sustrato produce una capa que muestra un cambio en las propiedades a una temperatura distinta (la LCST). También se han usado copolímeros de NIPAM sobre una superficie pero no permiten un cambio en la temperatura de transición de fase (LCST) en un intervalo aplicable para cultivo celular.

15 Análisis de las pruebas realizadas confirman que, como resultado de los métodos usados para la inmovilización del polímero y copolímero de 2-oxazolona 2-sustituida, se han obtenido superficies termosensibles de alta densidad de injerto de cadenas (0,1-1,8 cadenas/nm²) en las que el (co)polímero está unido covalentemente al sustrato de base por un extremo de la cadena creando un denominado cepillo de polímero sobre la superficie.

20 La capa de polímero producida en el diseño a modo de ejemplo con los métodos de "injerto a" e "injerto a partir de" consiste en poli(2-isopropil-2-oxazolona) o un copolímero de 2-etil-2-oxazolona y 2-nonil-2-oxazolona sobre un sustrato de vidrio. La capa de polímero cambia de manera reversible sus propiedades de hidrófilas a hidrófobas con cambios en la temperatura ambiental en el intervalo de 20°C a 37°C.

25 Se han usado sustratos con una capa de polímero termosensible para evaluar la capacidad de las células cutáneas (fibroblastos) para proliferar y crear una capa de células homogénea y posteriormente la separación de las células en forma de una lámina sin métodos de separación enzimáticos o mecánicos. El tiempo requerido para el desprendimiento de la lámina de células depende del polímero y las condiciones de desprendimiento y varía desde varios minutos hasta varias horas, tal como se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

35 1.1. Modificación del sustrato de vidrio

Se desengrasó el sustrato de vidrio, que consistía en placas de vidrio de borosilicato de diferentes tamaños ($\phi = 13$ mm y 24X40 mm), y se enjuagó tres veces con agua, entonces se dejó durante 1 hora en una mezcla crómica (5 g de dicromato de sodio, 5 ml de agua y 90 ml de ácido sulfúrico concentrado) y se enjuagó 5 veces con agua. Después de eso, se dejaron las placas en una disolución de NaOH 1 M durante 1 hora y se enjuagaron 5 veces con agua. Se colocaron las placas húmedas en un baño de HCl 0,1 M durante 1 hora y entonces se enjuagaron con agua y se mojaron en un baño de ácido acético al 1% durante 1 hora. Tras enjuagar 5 veces con agua, se colocaron las placas en una disolución de 3-aminopropiltrióxido al 1% con una disolución de ácido acético 3 mM en agua. Tras 24 horas, se enjuagaron las placas con una mezcla de agua/acetonitrilo 1:1 (v:v) y se colocaron en un baño de

agua en un baño ultrasónico durante 20 segundos. Entonces, se enjuagaron las placas 5 veces con agua y se secaron a presión reducida a temperatura ambiente. Se injertaron los sustratos de vidrio obtenidos en una fase posterior a una disolución de poli(2-isopropil-2-oxazolina).

5 1.2. Preparación de un polímero vivo de 2-isopropil-2-oxazolina

En un reactor de vidrio sellado equipado con un agitador magnético, se mezclaron 45 ml de acetonitrilo seco, 7,6 g de 2-isopropil-2-oxazolina y 0,12 g de ácido p-nitrobencenosulfúrico como iniciador, y se calentó la disolución hasta 80°C. Se dejó la reacción durante 120 horas. Tras enfriar, se transfirió la disolución bajo una atmósfera de argón al reactor que contenía las placas de vidrio modificadas.

1.3. Inmovilización

Tras la reacción, se dejaron los sustratos de vidrio con APTES en el reactor en contacto con la disolución de polímero de 2-isopropil-2-oxazolina vivo y se mezcló durante 48 horas. Entonces se sacaron las placas y se enjuagaron 3 veces con agua/acetonitrilo 1:1 y 3 veces con agua y se colocaron en un baño ultrasónico durante aproximadamente 20 segundos. Tras enjuagar con agua adicionalmente, se secaron las placas a presión reducida a temperatura ambiente.

20 Como resultado de la inmovilización del polímero sobre el sustrato de vidrio, se obtuvo una capa de polímero con una densidad de cadenas injertadas de 0,8 cadenas/nm².

1.4. Cultivo celular

25 Se obtuvieron células cutáneas (fibroblastos) durante el aislamiento a partir del fragmento de piel tomado de un paciente del Centro de Tratamiento de Quemados (Centrum Leczenia Oparzen) y tras cultivo primario. Entonces se guardaron las células en bancos.

1.4.1. Preparación del sustrato para la siembra de células

30 Se esterilizaron sustratos de vidrio con diferentes tamaños de placa ($\phi = 13$ mm y 24x40 mm), cubiertos con una capa de poli(2-isopropil-2-oxazolina), con óxido de etileno. Después de eso se colocaron los sustratos en placas de Petri y se expusieron a incubación en un medio de cultivo de DMEM-ATMP a aproximadamente 20°C durante 2 horas, entonces se colocaron en un incubador a 37°C y el 95% de humedad con un exceso del 5% de CO₂ durante 3 horas.

Se trataron las placas control con TCPS de la misma manera antes de la siembra de células de fibroblastos.

1.4.2. Cultivo celular y desprendimiento

40 Se sembraron en placa células cutáneas tomadas del banco de tejidos sobre sustratos preparados según el método anterior, 100.000 células sobre un sustrato de 13 mm de diámetro y sobre una placa control con TCPS, y 250.000 células sobre un sustrato de 24X40 mm y sobre una placa control con TCPS. Se reemplazó el medio de cultivo por medio nuevo cada 48 horas.

45 Se realizó el cultivo hasta que se obtuvo una confluencia de aproximadamente el 60-70%. Entonces, se separaron las células del sustrato en forma de una lámina.

50 Para separar las células, se colocó el sustrato con las células unidas en un incubador en un entorno que garantiza una temperatura de 20°C. Se reemplazó el medio de cultivo por un medio de cultivo a una temperatura de 20-25°C para acelerar el proceso de desprendimiento.

Conclusiones

55 Sustratos de vidrio que contienen una capa de polímero termosensible de poli(2-isopropil-2-oxazolina) unida covalentemente al sustrato mediante el método de "injerto a" proporcionan un sustrato eficaz para el cultivo de células cutáneas (fotografía 1). La fotografía 2 presenta el cultivo celular sobre una placa control con TCPS.

60 Las células cutáneas se desprenden del sustrato como una lámina sólo tras una reducción en la temperatura. No se requiere la aplicación de métodos enzimáticos para el desprendimiento de las células del sustrato. Los fibroblastos se desprenden espontáneamente del sustrato de polímero de 13 mm de diámetro tras 2 min de incubación a una temperatura reducida. Tras de 15 min a varias horas, se obtuvo una lámina de células uniforme desprendida del sustrato (fotografía 3). No se observó desprendimiento de células en la placa control con TCPS tras la reducción de la temperatura (fotografía 4). Fibroblastos cultivados sobre una superficie de polímero de 24x40 mm se desprendieron de este sustrato tras varias horas de incubación a una temperatura reducida. No se observó desprendimiento de células en la placa control con TCPS tras la reducción de la temperatura.

Ejemplo 2

2.1. Modificación del sustrato de vidrio

Se desengrasaron sustratos de placas de vidrio de borosilicato de diferentes tamaños ($\phi = 13$ mm y 24x40 mm) y se enjuagaron con agua. Se dejaron las placas durante 1 hora en una mezcla crómica y se enjuagaron de nuevo con agua. Entonces se dejaron las placas durante 1 hora en una disolución de NaOH 1 M y se enjuagaron de nuevo. Se colocaron las placas húmedas en un baño de HCl 0,1 M durante 1 hora y entonces se enjuagaron con agua y se mojaron en un baño de ácido acético al 1% durante 1 hora. Tras enjuagar con agua, se colocaron las placas en una disolución al 1% de 3-[bis(2-hidroxietil)amino]propiltrietoxisilano en una disolución de ácido acético 3 mM en agua. Tras 24 horas se enjuagaron las placas con una mezcla de agua/acetonitrilo 1:1 (v:v) y se colocaron en agua en un baño ultrasónico durante 20 segundos, entonces se enjuagaron con agua y se secaron. Entonces se pusieron las placas en un reactor hermético a través del cual se había soplado previamente argón, y se añadió una disolución de 0,5 g de anhídrido trifluorometanosulfónico con una adición de 0,4 g de piridina en cloruro de metileno a una temperatura de aproximadamente 0°C. Se llevó a cabo la reacción a esta temperatura durante 6 horas; entonces se elevó la temperatura hasta 10°C y se mezcló la disolución durante 12 horas.

Se retiró la disolución y se enjuagaron las placas tres veces con cloruro de metileno bajo una atmósfera de argón seco y luego dos veces con acetonitrilo seco. Entonces se secaron las placas a temperatura ambiente a baja presión.

2.2. Inmovilización del polímero

Se colocaron las placas secas en una atmósfera de argón en un reactor en el que se introdujo la disolución de 2-isopropil-2-oxazolona (6,9 g) en acetonitrilo seco (450 ml). Se realizó la polimerización durante 220 horas a 75°C. Tras la finalización, se colocaron las placas en una disolución de 2,7 g de KOH en 450 ml de metanol durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, se enjuagaron las placas con agua y se secaron a presión reducida a temperatura ambiente.

Como resultado de la inmovilización del polímero sobre el sustrato de vidrio, se obtuvo una capa de polímero con una densidad de cadenas injertadas de 1,1 cadenas/nm².

2.3. Cultivo celular

Se obtuvieron células cutáneas (fibroblastos) durante el aislamiento a partir del fragmento de piel tomado de un paciente del Centro de Tratamiento de Quemados (Centrum Leczenia Oparzen) y tras cultivo primario. Entonces se guardaron las células en bancos.

2.3.1. Preparación del sustrato para la siembra de células

Se llevó a cabo la preparación del sustrato tal como se detalla en el ejemplo 1.

2.3.2. Siembra en placa de células sobre los sustratos

Se llevaron a cabo la siembra y el cultivo de células tal como se detalla en el ejemplo 1.

Conclusiones

Sustratos de vidrio que contienen una capa de polímero termosensible de poli(2-isopropil-2-oxazolona) unida covalentemente al sustrato mediante el método de "injerto a partir de" proporcionan un sustrato eficaz para el cultivo de células cutáneas (fotografía 5). La fotografía 6 presenta el cultivo celular sobre una placa control con TCPS.

Las células cutáneas se desprenden del sustrato como una lámina sólo bajo una reducción de la temperatura. No se requiere la aplicación de métodos enzimáticos para el desprendimiento de las células del sustrato.

Los fibroblastos se desprendían espontáneamente del sustrato de polímero de 13 mm de diámetro tras 5 min de incubación a una temperatura reducida. Tras varias horas, se obtuvo una lámina de células uniforme desprendida del sustrato (fotografía 7). No se observó desprendimiento de células de la placa control con TCPS tras la reducción de la temperatura (fotografía 8). Fibroblastos cultivados sobre una superficie de polímero de 24X40 mm se desprendieron del sustrato tras varias horas de incubación a una temperatura reducida.

No se observó desprendimiento de células de la placa control con TCPS tras una reducción en la temperatura.

Ejemplo 3

3.1. Modificación del sustrato de vidrio

Se sumergieron sustratos de vidrio de tamaños de placa variables ($\phi = 13$ mm y 24X40 mm) en una disolución piraña durante 2 horas, entonces se enjuagaron tres veces con agua y se secaron a 120°C durante 24 horas. Las placas limpiadas se sililaron con APTES. Se sumergieron las placas en una disolución de APTES al 1% (v/v) en etanol. Se llevó a cabo la reacción bajo un flujo constante de argón durante 2 horas. Entonces se enjuagaron los sustratos tres veces en etanol y se secaron a 120°C durante 24 horas. Se colocaron las placas obtenidas en el reactor y se expusieron a injerto con una disolución de cadenas de copolímero vivo de 2-etil-2-oxazolina y 2-nonil-2-oxazolina.

3.2. Preparación de la disolución de copolímero vivo de 2-etil-2-oxazolina y 2-nonil-2-oxazolina

Se añadieron los reactantes 2-etil-2-oxazolina (14,7 g), 2-nonil-2-oxazolina (3,3 g), 4-nitrobenzenosulfonato de metilo (0,36 g) y acetonitrilo (36 ml) a un reactor separado equipado con una válvula de vidrio-teflón bajo un flujo de argón constante. Se sometió el contenido del reactor a tres ciclos de congelación-descongelación. Tras descongelar, se puso el reactor en un baño de aceite y se realizó la reacción a 80°C durante 48 horas. Tras enfriar, se trasladó la disolución al reactor original bajo una atmósfera de argón.

3.3. Inmovilización del polímero

Se trasladó la disolución del copolímero vivo de 2-etil-2-oxazolina y 2-nonil-2-oxazolina al reactor que contenía los sustratos de vidrio que se habían sometido a la reacción con APTES. Se añadieron aproximadamente 300 ml de acetonitrilo seco al reactor. Se dejaron las placas en contacto con la disolución y se agitó el contenido del reactor durante 72 horas. Tras el tiempo dado, se retiraron las placas del reactor, se enjuagaron tres veces con acetonitrilo y se secaron a 120°C.

Como resultado de la inmovilización del polímero sobre el sustrato de vidrio, se obtuvo una capa de polímero con una densidad de cadenas injertadas de 0,6 cadenas/nm².

3.4. Cultivo celular

Se obtuvieron células cutáneas (fibroblastos) durante el aislamiento a partir del fragmento de piel tomado de un paciente del Centro de Tratamiento de Quemados (Centrum Leczenia Oparzen) y tras cultivo primario. Entonces se guardaron las células en bancos.

3.4.1 Preparación del sustrato para el cultivo celular

Se esterilizaron los sustratos de vidrio de diferentes tamaños ($\phi = 13$ mm y 24x40 mm), cubiertos con una capa de copolímero de 2-etil-2-oxazolina y 2-nonil-2-oxazolina mediante el método de "injerto a", con óxido de etileno. Después de eso, se colocaron los sustratos sobre placas de Petri.

Se llevó a cabo la preparación del sustrato adicional tal como se detalla en el ejemplo 1.

3.4.2. Cultivo y desprendimiento de células

Se llevaron a cabo la siembra y el cultivo de células tal como se detalla en el ejemplo 1.

Conclusiones

Sustratos de vidrio que contienen una capa de copolímero termosensible de 2-etil-2-oxazolina y 2-nonil-2-oxazolina unida covalentemente al sustrato proporcionan un sustrato eficaz para el cultivo de células cutáneas (fotografía 9). La fotografía 10 presenta el cultivo celular sobre una placa control con TCPS.

Las células cutáneas se desprenden del sustrato como una lámina sólo tras una reducción en la temperatura. No se requiere la aplicación de métodos enzimáticos para el desprendimiento de las células del sustrato.

Los fibroblastos se desprenden espontáneamente del sustrato de polímero con un tamaño de 13 mm y 24x40 mm tras varias horas de incubación a una temperatura reducida (fotografía 11). En el caso de las placas más grandes, se requirieron agitación de las placas extra y enjuague cuidadoso con el medio para desprender la lámina de células.

No se observó desprendimiento de células de la placa control con TCPS tras una reducción en la temperatura (fotografía 12).

Documentos de patente citados en la descripción

JP6104061, JP5192130, JP2006008975 (A), EP0382214 (B1), JP5192138 (A), WO2010010837 (A1), EP1264877A1, WO2010044417 (A1), EP2348099 (A1), EP0470681 (A1), US20080009063A1, WO210349 (A1),

WO2010047171 (A1).

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

- 5 1. Fishman J.A., Patience C. American Journal of Transplantation 2004, 4, 1383-1390.
2. Onons D., Cooper D.K.C., Alexander T.J.L. Xenotransplantation 2000, 7, 143-155.
- 10 3. Klama-Baryla A., Kraut M., tabut W., Maj M., Kawecki M., Nowak M., Glik J., Cichowski A., Szydto A., Lesiak M., Aniot J., Sieron A.L. The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research 2011, 2(22), 77-86.
4. Han C., Zhang L., Sun J., Shi H., Zhou J., Gao C. Journal of Zhejiang University 2010, 11, 524-530.
- 15 5. Klama-Baryla A., Glik J., Kawecki M., Nowak M., Sieron A.L. The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research 2009, 1, 90-99.
6. Klama-Baryla A., Glik J., Kawecki M., Nowak M., Sieron A.L. The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research 2008, 3(11), 96-103.
- 20 7. Yamato M., Akiyama Y., Kobayashi J., Yang J., Kikuchi A., Okano T. Prog. Polym. Sci. 2007, 32, 1123.
8. Yamato M., Utsami M., Kushida A., Konno Ch., Kikuchi A., Okano T. Tissue Eng. 2001, 7, 473.
9. Kumar P.R.A., Sreenivasan K., Kumary T.V., J. Appl. Polym. Sci. 2007, 105, 2245.
- 25 10. Nagase K., Kobayashi J., Okano T. J. R. Soc. Interface 2009, 6, 293.
11. Hutter N. A., Reitingner A., Zhang N., Steenackers M., Williams O. A., Garrido J. A., Jordan R. Phys. Chem. Chem. Phys., 2010, 12, 4360.
- 30 12. Kikuchi A., Okano T. J. Control. Release 2005, 101, 69.
13. Okano T., Yamada N., Okuhara M., Sakai H., Sakurai Y. Biomaterials 1995, 16, 297.
- 35 14. Akiyama Y., Kikuchi A., Yamato M., Okano T. Langmuir 2004, 20, 5506.
15. Tsuda Y., Kikuchi A., Yamato M., Nakao A., Sakurai Y., Umezu M., Okano T. Biomaterials, 2005, 26, 1885.
- 40 16. Tsuda Y., Kikuchi A., Yamato M., Sakurai Y., Umezu M., Okano T. J. Biomed. Mater. Res. 2004, 69A, 70.
17. Nitschke M., Götze T., Gramm S., Werner C. eXPRESS Polymer Letters 2007, 1, 660.
18. Kwon O.H., Kikuchi A., Yamato M., Okano T. Biomaterials 2003, 24, 1223.
- 45 19. Schmaljohann D. e-Polymers 2005, 021, 1.
20. Hatakeyama H., Kikuchi A., Yamato M., Okano T. Biomaterials 2005, 26, 5167.
21. Hatakeyama H., Kikuchi A., Yamato M., Okano T. Biomaterials 2006, 27, 5069.
- 50 22. Ebara M., Yamato M., Aoyagi T., Kikuchi A., Sakai K., Okano T. Biomacromolecules 2004, 5, 505.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un sustrato con una capa de polímero termosensible de afinidad por el agua que puede cambiar (LCST) dentro de 0-80°C, en el que:

i. se limpia un sustrato de base de silicio o vidrio no orgánico y se modifica con grupos funcionales reactivos y entonces

ii. se inmoviliza un polímero termosensible mediante injerto de cadenas y formación de enlaces covalentes en una atmósfera protectora de argón y en una disolución,

caracterizado porque la inmovilización del polímero termosensible se realiza a partir de una disolución de homo y copolímeros vivos de 2-oxazolina 2-sustituida, donde se crean enlaces covalentes en la reacción entre:

los grupos de terminación nucleófilos del sustrato de base obtenidos como resultado de la modificación del sustrato y

el centro de propagación catiónico en el extremo de la cadena de los polímeros a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmovilización se realiza hasta que se forma una capa de polímero con una conformación en cepillo y una densidad de injerto de polímero de 0,1-1,8 cadenas/nm² sobre el sustrato de base.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por la selección de un grupo de terminación nucleófilo de un grupo que incluye grupos amino y sus derivados, grupos hidroxilo y sus derivados, y grupos tiol y sus derivados.

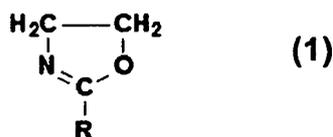
4. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por la selección de un grupo de iniciación catiónico de un grupo que incluye ácido p-toluenosulfónico y sus derivados con ésteres, ácido trifluorometanosulfónico y sus derivados con ésteres, haluros de alquilo, haluros de bencilo, fluoruros de antimonio y boro, ácido sulfúrico y sus ésteres, ácido clorhídrico, ácido peryódico y perclórico y sus sales, cloroformatos, y ácido tricloroacético y sus derivados.

5. Método para producir el sustrato con una capa de polímero termosensible de afinidad por el agua que puede cambiar (LCST) dentro de 0-80°C, en el que:

i. se limpia un sustrato de base de silicio o vidrio no orgánico y se modifica con grupos funcionales reactivos y entonces

ii. se inmoviliza un polímero termosensible mediante injerto de cadenas con la formación de enlaces covalentes bajo una atmósfera protectora de argón y en una disolución,

caracterizado porque la inmovilización de los polímeros termosensibles a partir de un grupo de homo y copolímeros de 2-oxazolina 2-sustituida se realiza en una disolución, donde se crean enlaces covalentes durante la polimerización de un monómero a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida tal como se describe mediante la fórmula (1) iniciada por un iniciador de la polimerización catiónica presente sobre el sustrato de base que es un resultado de la modificación del sustrato,



R representa un grupo alquilo C₂-C₉.

6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la inmovilización se realiza hasta que se forma una capa de polímero con una conformación en cepillo y una densidad de injerto de polímero de 0,1-1,8 cadenas/nm² sobre el sustrato de base.

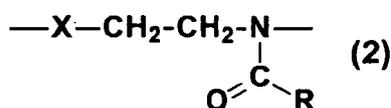
7. Método según la reivindicación 5 ó 6, caracterizado porque el iniciador de la polimerización catiónica se selecciona de un grupo que incluye ácido p-toluenosulfónico y sus derivados con ésteres, ácido trifluorometanosulfónico y sus derivados con ésteres, haluros de alquilo, haluros de bencilo, cloroformatos,

y ácido tricloroacético y sus derivados.

5 8. Método según las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque el contenido de grupos de iniciación en relación con al menos un monómero del grupo de 2-oxazolina 2-sustituida asciende a desde el 10,0 hasta el 0,08 por ciento en moles.

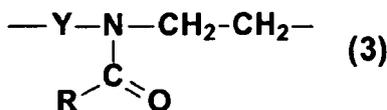
10 9. Sustrato que consiste en un sustrato de base de silicio o vidrio no orgánico modificado mediante la unión covalente de un grupo de unión de sililo a través de un grupo funcional con una capa de polímero inmovilizada sobre el sustrato durante el injerto de las cadenas de polímero o copolímero termosensible, caracterizado porque la capa de polímero es de conformación en cepillo de polímero y se representa por un polímero o copolímero a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida, y la densidad de las cadenas conectadas al grupo funcional del grupo de unión de sililo es de 0,1-1,8 cadenas/nm².

15 10. Sustrato según la reivindicación 9, caracterizado por una capa de polímero que está unida covalentemente al grupo funcional de un grupo de unión de sililo mediante el elemento facilitado en la fórmula (2),



20 X representa un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o azufre del grupo de unión de sililo, mientras que R representa un grupo alquilo C₂-C₉ del monómero de 2-oxazolina 2-sustituida.

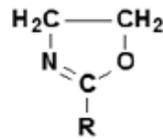
11. Sustrato según la reivindicación 9, caracterizado por una capa de polímero que está unida covalentemente al grupo funcional de un grupo de unión de sililo mediante el elemento mostrado en la fórmula (3),



25 Y representa el grupo alquilo del grupo de unión de sililo de una cadena lineal o ramificada, mientras que R representa un grupo alquilo C₂-C₉ del monómero de 2-oxazolina 2-sustituida.

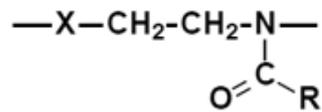
30 12. Aplicación del sustrato con una capa de polímero termosensible hecha de homo y copolímeros a partir de un grupo de 2-oxazolina 2-sustituida según las reivindicaciones 9 a 11, u obtenida mediante el método definido en las reivindicaciones 1 a 8, para cultivos celulares, particularmente células cutáneas.

FÓRMULA 1



R representa un grupo alquilo C₂-C₉.

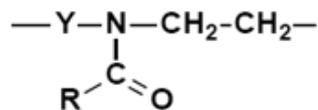
FÓRMULA 2



X representa un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o azufre del grupo de unión de sililo.

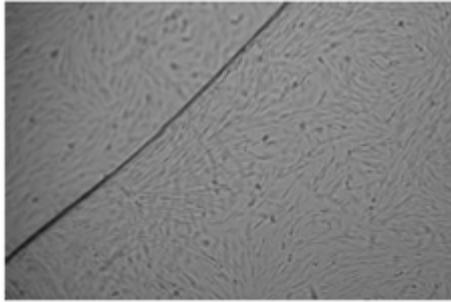
R representa un grupo alquilo C₂-C₉ del monómero de 2-oxazolina 2-sustituida.

FÓRMULA 3

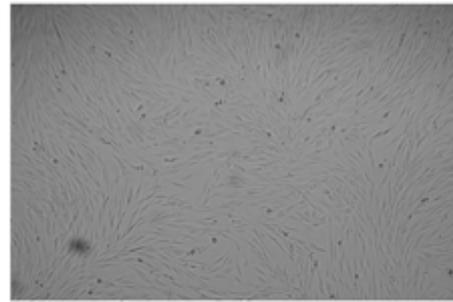


Y representa el grupo alquilo de un grupo de unión de sililo de cadena lineal o ramificada.

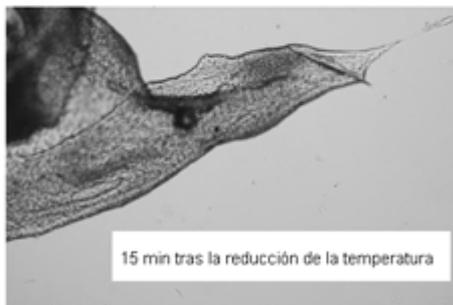
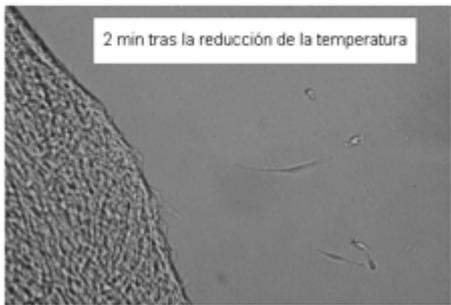
R representa un grupo alquilo C₂-C₉ del monómero de 2-oxazolina 2-sustituida.



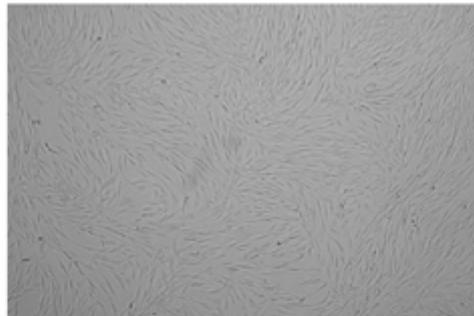
Fotografía 1



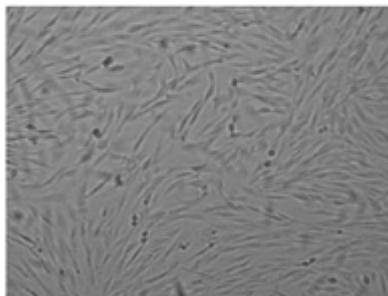
Fotografía 2



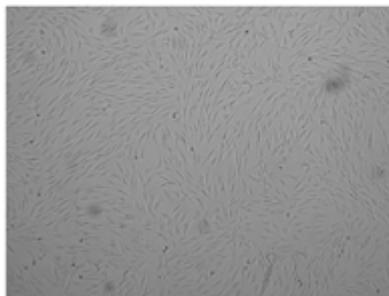
Fotografías 3



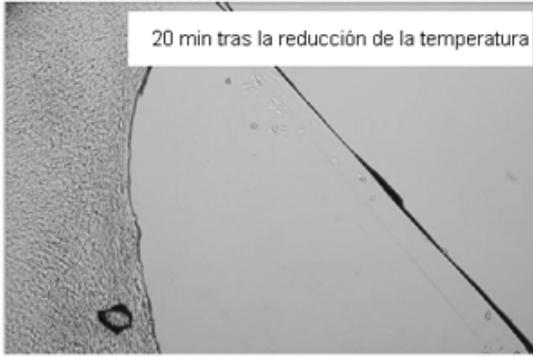
Fotografía 4



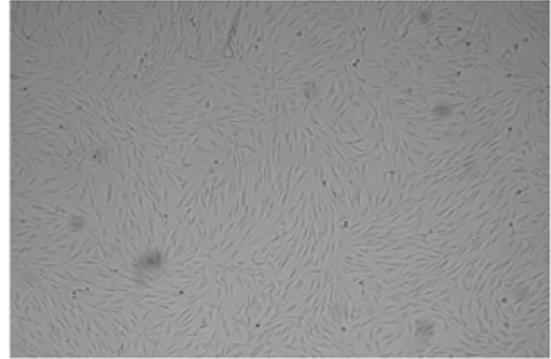
Fotografía 5



Fotografía 6



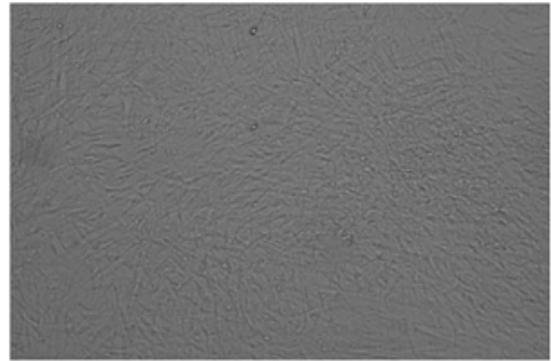
Fotografía 7



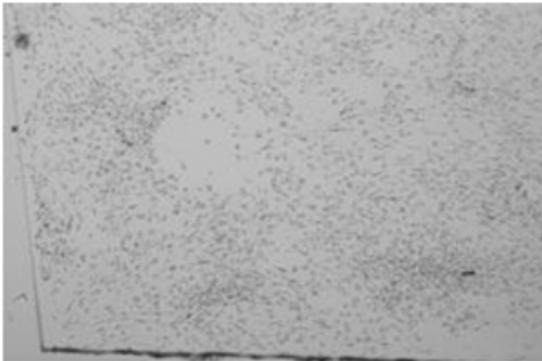
Fotografía 8



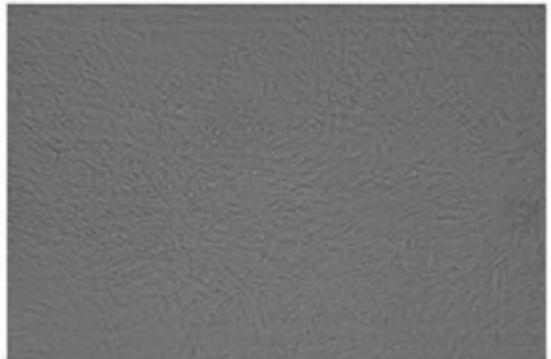
Fotografía 9



Fotografía 10



Fotografía 11



Fotografía 12