

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 960**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2011 PCT/EP2011/001394**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11116922**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2011 E 11709885 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2550353**

54 Título: **Sustrato termorreactivo con microgeles, procedimiento para su preparación y procedimiento de cultivo para células biológicas**

30 Prioridad:

22.03.2010 DE 102010012252

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

18.10.2017

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
WISSENSCHAFT E.V. (100.0%)
Hansastraße 27c
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**DUSCHL, CLAUD;
LANKENAU, ANDREAS;
LUTZ, JEAN-FRANÇOIS;
LASCHEWSKY, ANDRÉ;
WISCHERHOFF, ERIK;
SCHMIDT, STEPHAN y
HELLWEG, THOMAS**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 637 960 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**SUSTRATO TERMORREACTIVO CON MICROGELES, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN Y PROCEDIMIENTO DE CULTIVO PARA CÉLULAS BIOLÓGICAS**

- 5 La invención se refiere a un sustrato termorreactivo para el alojamiento de células biológicas, en particular a un sustrato, cuyas propiedades de superficie pueden variarse dependiendo de la temperatura. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un sustrato de este tipo, en particular a un procedimiento para la aplicación de material polimérico termorreactivo sobre un cuerpo de sustrato. Además, la invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de células biológicas sobre un sustrato termorreactivo. Se proporcionan aplicaciones de la invención en el cultivo *in vitro* de células biológicas.
- 10 Se conoce generalmente cultivar células biológicas vivas sobre sustratos fuera de un organismo (cultivo *in vitro*). Un sustrato previsto para el cultivo (sustrato de cultivo) tiene normalmente un cuerpo de sustrato sólido, por ejemplo de vidrio o de plástico, cuya superficie (superficie del soporte) está funcionalizada. Con la funcionalización, que comprende por ejemplo un tratamiento con plasma, un revestimiento con proteínas (tal como por ejemplo fibronectina, colágeno) o un revestimiento con polímeros (tal como por ejemplo polilisina), se influye una interacción de las células con la superficie. Existe un interés en sustratos de cultivo que permitan una manipulación dirigida de las células biológicas y en particular una influencia por ejemplo de la adhesión, migración, proliferación, diferenciación o transformación celular (formación de células tumorales). Un problema básico lo representa en particular el desprendimiento cuidadoso de las células de las superficies. Esto se realiza por regla general a través de un tratamiento con enzimas (tripsinización), que puede producir daños en las células y pérdidas de células.
- 15 Mediante experimentos se determinó que pueden verse influidas las propiedades de células biológicas mediante la dureza de la superficie del sustrato de cultivo. Por ejemplo, variaciones de dureza que se consiguieron mediante revestimientos secuenciales con poliacrilamida y biomoléculas condujeron a distintas diferenciaciones de células madre mesenquimales (véase Discher *et al.* en "Cell" 126 (2006) 677-689). Además es sabido que la adhesión de células biológicas depende de la dureza de la superficie del sustrato.
- 20 Además se conocen polímeros termorreactivos. Un polímero termorreactivo se caracteriza porque presenta una temperatura de conmutación (LCST, "*lower critical solution temperature*") en medios acuosos. Los medios acuosos son por ejemplo agua pura, soluciones tampón que pueden obtenerse comercialmente, medios de cultivo celular o mezclas de agua con disolventes orgánicos. Por debajo de la temperatura de conmutación, las soluciones acuosas de polímeros termorreactivos son de una sola fase, por encima de ésta de dos fases. Cuando los polímeros termorreactivos se inmovilizan en superficies, entonces realizan en medios acuosos con superación de la temperatura de conmutación una transferencia de fases (transferencia de conformación): éstos están por debajo de la temperatura de conmutación más fuertemente hidratados que por encima.
- 25 Se determinó que la adhesión sobre sustratos, que están revestidos con el polímero termorreactivo (termosensible) poli-(N-isopropil-acrilamida) ("PNIPam") o derivados del mismo y presentan la hidratación dependiente de la temperatura, puede influirse de manera dirigida dependiendo de la temperatura (véase N. Yamada *et al.* en "Makromol. Chem." 11 (1990) 571; C. Williams *et al.* en "Adv. Mater." 21 (2009) 2161-2164, O. Ernst *et al.* en "LabChip" 7 (2007) 1322). Esta propiedad se mostró también en polímeros a base de polietilenglicol (PEG) (véase E. Wischerhoff *et al.* en "Angew. Chem." 47 (2008) 5666).
- 30 Sustratos convencionales, cuyas superficies están revestidas con polímeros termorreactivos (por ejemplo la patente WO 2004/011669), pueden tener inconvenientes tanto en relación a la preparación del revestimiento como también en relación a la idoneidad para el cultivo celular. Así, la preparación de un sustrato revestido con un polímero termorreactivo requiere varias etapas del proceso costosas, que se realizan con una estructura mecánica también costosa. Además existe sólo una variabilidad limitada de la composición del polímero. Por ejemplo puede modificarse o desaparecer el comportamiento de reacción térmico del polímero termorreactivo, cuando se añade al polímero un segundo componente polimérico. Por tanto existe sólo una flexibilidad limitada en cuanto a la introducción de otra funcionalización de un sustrato revestido con un polímero termorreactivo.
- 35 Para la preparación de sustratos revestidos con polímeros termorreactivos se desarrollaron en la práctica distintos protocolos para la funcionalización del cuerpo de sustrato, tal como por ejemplo reacciones con silanos, un tratamiento con plasma o un tratamiento químico. A este respecto se proporcionan en la superficie del cuerpo del sustrato grupos funcionales, tal es como por ejemplo -NH₂, -COOH o epóxidos, que posibilitan una unión covalente de manera complementaria a las moléculas funcionalizadas, como en particular los polímeros termorreactivos. A este respecto ha resultado desventajosa una capacidad de reproducción y capacidad de control limitada de la funcionalización en particular en relación a la densidad de unión la homogeneidad, así como la limitación a materiales de sustrato especiales y sustancias químicas y una limitación a cuerpos de sustrato duros, planares. La preparación de una superficie con mezclas definidas de distintas
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

moléculas es posible sólo en casos excepcionales especiales y con elevado coste.

Para el cultivo de células biológicas ha resultado desventajosa en particular la siguiente propiedad de los polímeros termorreactivos. En general, un polímero termorreactivo es un polímero que dependiendo de la temperatura atraviesa una transferencia de fases física, en la que se realiza por ejemplo una reorganización de cadenas de polímero. Mientras que la transferencia de fases en una solución líquida está fuertemente definida en un intervalo de temperatura de pocos °C, se caracterizan los polímeros termorreactivos inmovilizados en forma de capas por un ancho perfil de temperatura de la transferencia de fases. Así se encontró que para determinados tipos de células adherentes se requiere un enfriamiento desde 37 °C hasta temperaturas por debajo de 20 °C de hasta una hora, para aflojar la adhesión de la superficie del sustrato (véase "Application Notes" para los sustratos de cultivo UpCell revestidos con PNIPam del fabricante Nunc). Un enfriamiento de este tipo durante este espacio de tiempo es sin embargo indeseable debido a la posible influencia de la función celular unida a ésto. Además se determinó en la práctica que capas de polímero termorreactivo puedan ser eficaces de una manera insuficiente para distintas líneas celulares, tal es como por ejemplo células tumorales MCF7 o células de osteoblastos MG63.

Las técnicas convencionales se caracterizan además por inconvenientes en el cultivo con los denominados co-cultivos. Dado que un tipo celular que va a cultivarse, para el crecimiento o para el mantenimiento de la viabilidad en el estado adherente requiere mensajeros químicos (factores paracrin) de otras células, deben realizarse con frecuencia el cultivo, el crecimiento o procesos manipulativos o analíticos de células adherentes de manera conjunta en el co-cultivo (por ejemplo células madre y células alimentadoras o melanocitos y queratinocitos). Para la posterior separación de las células están a disposición, hasta ahora, solamente procedimientos que se basan en una separación celular en suspensiones celulares líquidas. Para ello deben desprenderse las células del sustrato y transferirse a un dispositivo de separación (citómetro de flujo), lo que tiene inconvenientes considerables debido al gasto de tiempo y preparación y al bajo rendimiento. En particular para muestras con números de células por debajo de 10^5 células no puede realizarse la separación de células convencional, dado que durante la formación de la suspensión y la separación en el citómetro de flujo se pierden excesivamente muchas células.

El objetivo de esta invención es facilitar un sustrato termorreactivo mejorado para el alojamiento de células biológicas, con el que se superen los inconvenientes del estado de la técnica convencional. El objetivo de la invención es en particular facilitar un sustrato termorreactivo mejorado, que se caracterice por una preparación sencilla, una alta flexibilidad en el ajuste de propiedades de superficie, una capacidad de funcionalización ampliada, una idoneidad para un número ampliado de tipos celulares y/o una idoneidad para un cultivo celular cuidadoso y control de la adhesión con bajas diferencias de temperatura. Otro objetivo de la invención es facilitar un procedimiento mejorado para la preparación de un sustrato termorreactivo, en particular para el alojamiento de células biológicas, con el que se superen los inconvenientes de los procedimientos convencionales para la preparación de sustratos. Otro objetivo de la invención es facilitar un procedimiento de cultivo mejorado usando un sustrato termorreactivo, con el que se superen los inconvenientes y las limitaciones de los procedimientos de cultivo convencionales.

Estos objetivos se solucionan mediante un sustrato y procedimientos con las características de las reivindicaciones independientes. Resultan formas de realización y aplicaciones ventajosas de la invención de las reivindicaciones dependientes.

De acuerdo con un primer punto de vista de la invención se facilita un sustrato, en particular para el alojamiento de células biológicas, tal como se define en la reivindicación 1. De acuerdo con un segundo punto de vista de la invención se facilita un procedimiento para la preparación del sustrato de acuerdo con la invención tal como se describe en la reivindicación 15.

De acuerdo con un tercer punto de vista de la invención se facilita un procedimiento para el cultivo de células biológicas sobre el sustrato de acuerdo con la invención, en el que las células biológicas se disponen sobre el sustrato en contacto con los microgeles termorreactivos que quedan al descubierto. De acuerdo con la invención se ajustan las condiciones de cultivo para las células sobre el sustrato de manera que las células se sometan a un desprendimiento sin destrucción (separación del sustrato), a un crecimiento, a una diferenciación y/o a una migración celular.

La facilitación de acuerdo con la invención de un sustrato de cultivo con microgeles termorreactivos presenta una serie de ventajas en relación con el ajuste de propiedades de superficie físicas y/o químicas, la modificación dirigida de propiedades de superficie, la preparación del sustrato y la creación de nuevas aplicaciones o funciones de sustratos de cultivo. Los inventores han determinado que la transferencia de fases de los microgeles termorreactivos se realiza en un pequeño intervalo de temperatura, que es comparable con el perfil de temperatura estrecho de la transferencia de fases de polímeros termorreactivos disueltos. Se evitan, de acuerdo con la invención, perfiles de temperatura amplios a través de intervalos de 20 °C a 30 °C, tal como se producen en capas poliméricas isotropas convencionales.

Los inventores han determinado que la transferencia de fases se caracteriza por una modificación de un parámetro de resistencia del polímero termorreactivo (por ejemplo dureza, capacidad de deformación plástica o elástica, en particular módulo de elasticidad de Young). Con el parámetro de

5 resistencia se modifica la adhesión de las células por debajo y por encima de una temperatura crítica de la transferencia de fases (temperatura de conmutación del polímero). Al mismo tiempo se modifica el contenido en agua del polímero termorreactivo. Como resultado se ve influida la adhesión de las células. El ajuste de la adhesión es posible ventajosamente con mayor fiabilidad y reproducibilidad que

10 en caso de capas de polímero convencionales. Los inventores han determinado que con la transferencia de fases de los microgeles inmovilizados se ofrece o se suspende un aumento esencial del número de interacciones superficiales y con ello se mejora la fiabilidad de una liberación de células controlada por la temperatura.

15 En relación a la modificación dirigida a las propiedades de superficie ha resultado especialmente ventajoso que los sustratos de acuerdo con la invención puedan someterse a una funcionalización para las células biológicas, sin que los microgeles termorreactivos pierdan su comportamiento de reacción. Resultan ventajas para la preparación del sustrato de acuerdo con la invención de la estabilidad de la dispersión de partículas durante semanas o meses y de la capacidad de preparación inmediata para el uso del sustrato tras el revestimiento de la superficie de soporte con los microgeles.

20 La funcionalización de sustratos termorreactivos proporciona nuevas aplicaciones, por ejemplo para un control pasivo de una migración celular en la superficie del sustrato o un desprendimiento dirigido de células en zonas del sustrato predeterminadas.

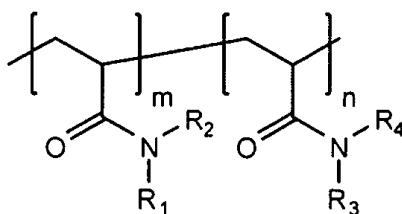
25 El sustrato de acuerdo con la invención es un sustrato de cultivo para células biológicas. El sustrato está configurado para el alojamiento de células biológicas y para la facilitación de condiciones de cultivo fisiológicas. El sustrato está ajustado en particular para el alojamiento de las células en un medio de cultivo líquido, es decir la superficie del soporte es adecuada para alojar el medio de cultivo. El cuerpo del sustrato puede estar fabricado de un material sólido, que es rígido o flexible. El material del cuerpo del sustrato es preferentemente estable a la temperatura y en particular no es termorreactivo. La superficie del soporte es preferentemente una superficie plana, sin embargo puede formarse como alternativa de una manera curvada.

30 Los microgeles termorreactivos contienen un polímero que presenta la transferencia de fases en un intervalo de temperatura fisiológico. La transferencia de fases, que es en particular una transferencia de fases en volumen, se realiza preferentemente a una temperatura por debajo de 40 °C, en particular por debajo de 37 °C, por ejemplo por debajo de 35 °C. Preferentemente se realiza la transferencia de fases a una temperatura por encima de 10 °C, en particular por encima de 20 °C, por ejemplo por encima de 32 °C. El intervalo de temperatura, en el que se realiza la transferencia de fases, es preferentemente más pequeño que 15 °C, en particular más pequeño que 10 °C, tal como por ejemplo 5 °C o menos.

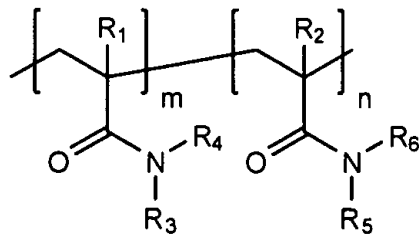
35 Los microgeles termorreactivos están preparados preferentemente a partir de al menos un polímero no cargado y no ionizable. De manera especialmente preferente están constituidos los microgeles al menos en su superficie por el al menos un polímero no cargado y no ionizable. Ventajosamente se minimiza con ello las interacciones indeseadas con la superficie celular.

40 De acuerdo con las formas de realización preferentes de la invención están formados los microgeles termorreactivos de al menos uno de los polímeros de los siguientes polímeros o grupos de polímeros:

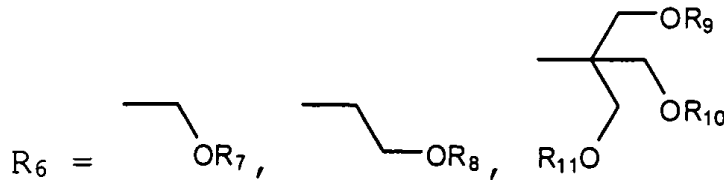
- 45 (1) poli-(N-isopropilacrilamida),
 (2) -X-(-CH₂-CR₁COO-R₂-)_n-(-CH₂-CR₁COO-R₃-)_m-R₄ o un copolímero del mismo,
 (3) -X-[-CH₂-CR₁COO-R₂-]_n-[-CH₂-CR₁COO-R₃-]_m-R₄] o un copolímero del mismo, en el que X es un grupo de acoplamiento a la superficie de soporte, R₁ = H o CH₃, R₂/R₃ = cadenas de hidrocarburo alifático con al menos un grupo éter, preferentemente con 1 a 20 grupos éter (preferentemente poli(óxido de etileno)), y R₄ es -H, una cadena de hidrocarburo alifático o un grupo funcional, tal como por ejemplo halógeno, -N₃, tiocarbonilo, (di)tiocarbamilo
 (4) homo- o copolímeros de la estructura general



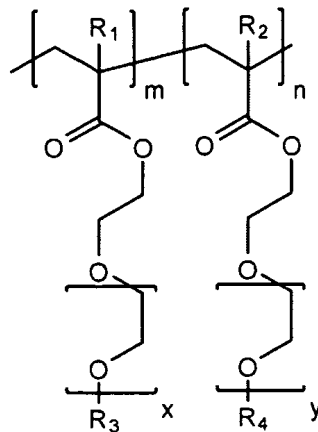
50 con R₁, R₂, R₃ y R₄ = H o alquilo, preferentemente R₁ = isopropilo, R₂ = H, n = 0,
 (5) homo- o copolímeros de la estructura general



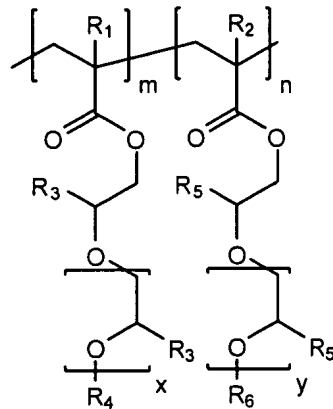
- 5 con $R_1, R_2 = -H, -\text{alquilo}$, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-H$
 con R_3, R_4, R_5 y $R_6 = -H, -\text{alquilo}$, alquenilo, alquinilo, arilo, preferentemente $-R_3 = -\text{isopropilo}$, $-R_4 = -H, -R_5$ y $-R_6 = -\text{C}_2\text{H}_5, -\text{CH}_3$ o $-H$, de manera especialmente preferente $-R_3 = -\text{isopropilo}$ y $-R_4 = -H$ y $m : n = 100 : 0$ y / o R_3, R_4, R_5 y



- 10 con R_7 a $R_{11} = -H, -\text{alquilo}$, alquenilo, alquinilo, arilo, alquiloilo, al menos un $R = H$,
 (6) homo- o copolímeros de la estructura general



- 15 con $R_1, R_2 = H$ o CH_3 , $R_3, R_4 = H$ o alquilo, $x, y = 0$ a 20 ,
 (7) homo- y copolímeros de la estructura general



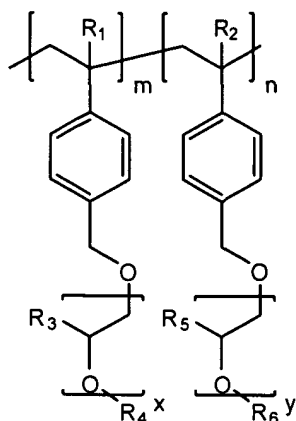
- 20 con $R_1, R_2 = -H, -\text{alquilo}$, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-\text{CH}_3$,
 con $R_3, R_5 = -H, -\text{alquilo}$, alquenilo, alquinilo, arilo, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, de manera

especialmente preferente -H, en el que:

cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$

con $R_4, R_6 = -H$, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente -H y / o -CH₃, de manera especialmente preferente -CH₃, en el que cuando $R_3, R_5 = -H$ y $R_4, R_6 = -CH_3$, $x = 1$ e $y = 7, 5$, entonces se encuentra $m : n$ preferentemente entre 95 : 5 y 90 : 10, de manera especialmente preferente en 93 : 7, y

cuando $R_3, R_5 = -H$ y $R_4, R_6 = -CH_3$, $x = 1$ e $y = 4, 5$, entonces se encuentra $m : n$ preferentemente entre 93 : 7 y 80 : 20, y de manera especialmente preferente en 85 : 15, (8) homo- y copolímeros de la estructura general

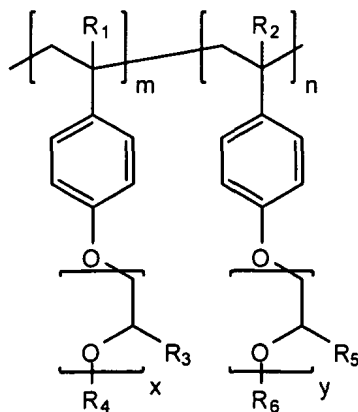


con $R_1, R_2 = -H$, -alquilo, preferentemente -H y -CH₃, de manera especialmente preferente -H,

con $R_3, R_5 = -H$, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente -H y -CH₃, de manera especialmente preferente -H, en el que cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$

con $R_4, R_6 = -H$, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente -H y / o -CH₃, de manera especialmente preferente -H, en el que cuando $R_1, R_2 = -H$, y $R_4, R_6 = -H$, $x = 3$ e $y = 4$, entonces se encuentra $m : n$ preferentemente entre 65 : 35 y 45 : 55, de manera especialmente preferente entre 60 : 40 y 50 : 50,

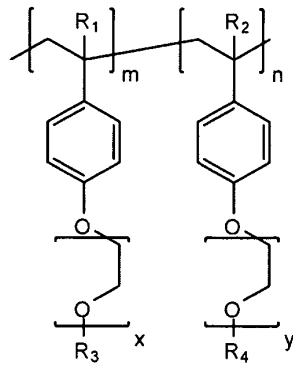
(9) homo- y copolímeros de la estructura general



con $R_1, R_2 = -H$, -alquilo, preferentemente -H y -CH₃, de manera especialmente preferente -H,

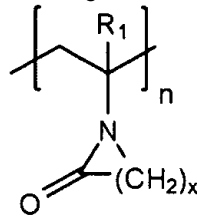
con $R_3, R_5 = -H$, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente -H y -CH₃, de manera especialmente preferente -H, en el que cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$, con $R_4, R_6 = -H$, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente -H y / o -CH₃, de manera especialmente preferente -H,

(10) homo- o copolímeros de la estructura general



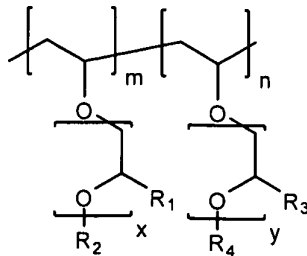
con $R_1, R_2 = H$ o CH_3 , $R_3, R_4 = H$ o alquilo, $x, y = 2$ a 20 ,
 (11) homo- o copolímeros de la estructura general

5



con $R_1 = H$ o CH_3 , $x = 3$ a 5 , copolímeros con $x = 3$ y $X > 3$,
 (12) homo- o copolímeros de la estructura general

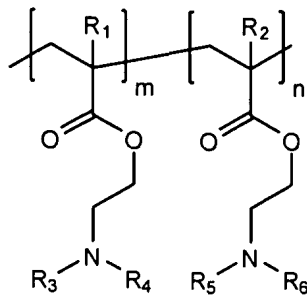
10



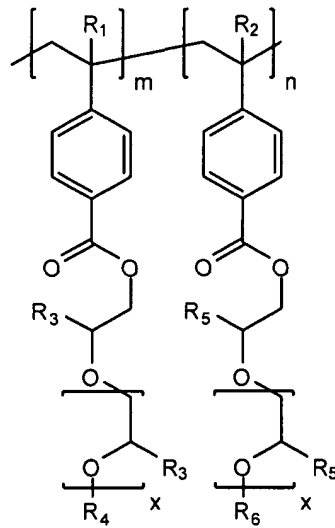
con $R_1, R_3 = -H$, -alquilo, alqueno, alquino, arilo, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-H$, en el que cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$, con $R_2, R_4 = -H$, -alquilo, alqueno, alquino, arilo, preferentemente $-H$ y / o $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-CH_3$,

15

(13) homo- o copolímeros de la estructura general

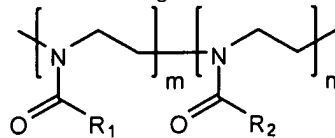


o

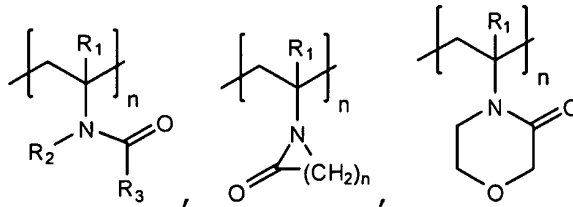


5 con $R_1, R_2 = -H, -alquilo$, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-H$, con $R_3, R_5 = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo$, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-H$, en el que cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$, con $R_4, R_6 = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo$, preferentemente $-H$ y / o $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-H$,

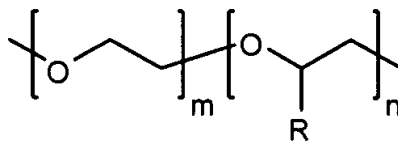
(14) homo- o copolímeros de la estructura general



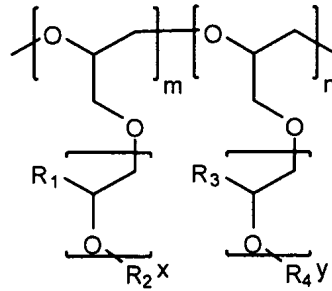
10 con $R_1, R_2 = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo$,
 (15) homo- o copolímeros de la estructura general



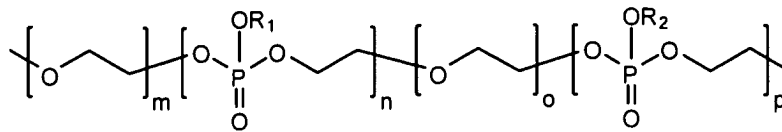
15 o copolímeros de los tres elementos en composiciones
 con $R_1 = -H, -alquilo$, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-H$,
 con $R_2, R_3 = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo$ con $2 \leq n \leq 10$, preferentemente $3 \leq n \leq 6$
 20 (16) homo- o copolímeros de la estructura general



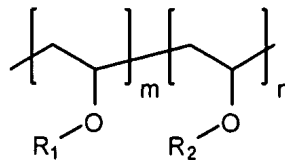
25 con $-R = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo$, preferentemente $-R = -alquilo$, de manera especialmente preferente $-R = -CH_3$,
 (17) homo- o copolímeros de la estructura general



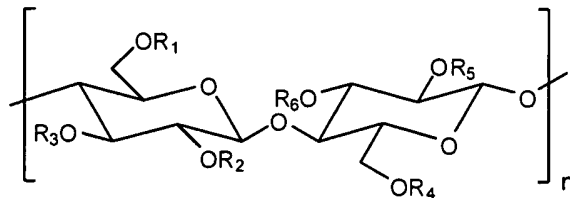
- 5 con R₁, R₃ = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente -H y -CH₃, en el que cuando R₁ ≠ -H, entonces R₃ = -H
 con R₂, R₄ = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente -H y / o -CH₃,
 (18) homo- o copolímeros de la estructura general



- 10 con R₁, R₂ = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo,
 (19) homo- o copolímeros de la estructura general



- 15 con R₁, R₂ = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, preferentemente R₁ = -CH₃, n=0,
 (20) homo- o copolímeros de la estructura general



- 20 con R₁ a R₆ = -H, -alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, -alquiloílo, al menos dos R = H,
 (21) homo- o copolímeros de estructura análoga como en 19, que se basa en otras estructuras de polisacárido distintas de la celulosa,
 (22) homo- o copolímeros con unidades similares a la elastina,
 (23) copolímeros de todas las unidades mencionadas anteriormente con monómeros modificados.

- 25 Los copolímeros mencionados pueden ser copolímeros estadísticos, alternantes o de bloque.
 En los polímeros de acuerdo con (4) a (25), al menos una unidad terminal de la cadena principal de polímero incluye preferentemente un grupo de acoplamiento a la superficie del soporte.
 30 La superficie del soporte puede ser la superficie directa del cuerpo del sustrato, por ejemplo de vidrio, silicio o plásticos, tal como poliestireno, COP (polímero de ciclo-olefina), policarbonato, o puede formarse sobre éste mediante una película metálica, por ejemplo de oro, plata, platino, titanio o cromo. Dependiendo de la composición química de la superficie de soporte puede ser X un grupo funcional, como por ejemplo -SS-, -SH, -COOH, -NH₂ (SS es un grupo disulfuro sustituido en ambos lados de manera simétrica). Preferentemente es n+m > 10.
 35 Estos polímeros han resultado especialmente ventajosos en relación a la biocompatibilidad y la flexibilidad en el ajuste de propiedades de superficie físicas o químicas.
 Los microgeles sobre la superficie del soporte pueden estar formados todos de manera idéntica de un único polímero. Cuando, de acuerdo con una variante alternativa, los microgeles están formados de al menos dos polímeros distintos, pueden resultar ventajas en el ajuste de las propiedades de superficie.
 40 Además pueden estar dispuestos, en este caso, microgeles con distintas composiciones sobre la superficie del soporte. Los microgeles con composiciones distintas pueden estar previstos de manera

separada por ejemplo con zonas parciales, para facilitar sobre la superficie del soporte distintas condiciones de cultivo. Como alternativa pueden estar dispuestos los microgeles con las distintas composiciones mezclados entre sí, distribuidos sobre la superficie del soporte. Como alternativa o adicionalmente pueden presentar los microgeles distintos diámetros. Por ejemplo, pueden estar fijados los microgeles termorreactivos con distintos diámetros separados en distintas zonas parciales de la superficie del soporte o pueden estar dispuestos mezclados entre sí distribuidos por la superficie del soporte.

Ventajosamente pueden prepararse microgeles con un diámetro predeterminado de las partículas dispersadas, coloidales (véase M. Andersson, S.L. Maunu, en "J. Poly. Sci." B 44 (2006) 3305; X. Wu *et al.* en "Coll. Poly. Sci." 272 (1994) 467). Esto permite ajustar de manera dirigida el tamaño, o, en caso de que estén dispuestas las partículas con distintos diámetros, los distintos tamaños de los microgeles termorreactivos. De acuerdo con formas de realización preferentes de la invención los microgeles termorreactivos tienen un diámetro de al menos 10 nm, en particular al menos 20 nm, de manera especialmente preferente al menos 50 nm, como por ejemplo al menos 100 nm. El límite superior del diámetro de partícula asciende preferentemente a 50 μm . De manera especialmente preferente es el diámetro de los microgeles termorreactivos inferior o igual a 30 μm , en particular inferior o igual a 20 μm , tal como por ejemplo 10 μm o inferior, por ejemplo inferior a 1 μm .

De acuerdo con otra variante pueden presentar los microgeles termorreactivos una estructura de núcleo-envoltura, en la que un núcleo puede estar constituido o bien por un material no termorreactivo, en particular una partícula de soporte sólida o por un material termorreactivo reticulado. Preferentemente está constituida la envoltura exclusivamente por el material de polímero termorreactivo. El uso de la partícula de soporte sólida, que puede estar formada por ejemplo de vidrio inorgánico, metal, cerámica o plástico, en particular poli(metacrilato de metilo) o poliestireno, puede tener ventajas en relación a la facilitación de una determinada dureza mínima de la superficie del sustrato de acuerdo con la invención. Preferentemente se produce la conexión de los núcleos de los microgeles termorreactivos mediante interacciones de valencia secundaria (interacciones no covalentes entre moléculas como interacción de van der Waals, enlace por puente de hidrógeno, interacción hidrófoba) o mediante reticulación química.

Además las partículas de núcleo-envoltura ofrecen la posibilidad de integrar cadenas de polímero no reticuladas o débilmente reticuladas en un microgel, sin alterar la conexión mecánica de la partícula. Los microgeles no reticulados o débilmente reticulados ofrecen la ventaja de que las cadenas termorreactivas siguen siendo muy móviles y así pueden soportar mejor la modificación de la conformación en la transferencia de fases. Siempre que se usen partículas débilmente reticuladas, debe ascender la densidad de reticulación a no más de 1 por 20 unidades de repetición y preferentemente debe encontrarse entre 1 por 100 y 1 por 500 unidades de repetición. Para conseguir un efecto termorreactivo destacado, debe aumentar el espesor de la envoltura a al menos 10 nm y como máximo a 400 nm, preferentemente a entre 30 y 100 nm. Ejemplos generales para la fabricación de partículas de núcleo-envoltura se encuentran por ejemplo en Schuller en "Kolloid Z. Z. Polym." 211, 113-121 (1966), Fulda *et al.* en "Prog. Colloid Polym. Sci." 101, 178-183 (1996), o Gao *et al.* en "Macromolecules" 39, 3154-3160 (2006).

Preferentemente, el espesor de la capa de microgeles termorreactivos sobre la superficie del soporte es inferior o igual al diámetro de los microgeles. Los microgeles forman preferentemente junto con las partículas moduladoras una monocapa. Puede estar prevista en particular una monocapa cerrada. Los microgeles pueden formar una sub-monocapa con huecos entre los microgeles.

Dado que los microgeles fijados pueden tener una configuración aplanada, puede ser el espesor de la capa de microgeles termorreactivos más pequeño que el diámetro de partícula. Las monocapas de microgeles tienen la ventaja en comparación con las multicapas de que la adhesión de las células biológicas puede controlarse con mayor fiabilidad.

Como alternativa puede contener una capa varios estratos de los microgeles termorreactivos. En este caso pueden ofrecerse ventajas mediante una mayor robustez frente a defectos. De acuerdo con una forma de realización especialmente preferente de la invención puede estar dotada la superficie de soporte de un agente adhesivo. Como agente adhesivo puede usarse cualquier sustancia que sea adecuada para la inmovilización de los microgeles y sea biocompatible. El agente adhesivo puede formar por ejemplo un enlace covalente con la superficie del soporte y el polímero termorreactivo.

Además, para la inmovilización de los polímeros pueden usarse uniones receptor-ligando biológicas específicas, como por ejemplo la unión de estreptavidina y biotina. Finalmente puede estar diseñado el agente adhesivo para un acoplamiento del polímero mediante una interacción inespecífica, como por ejemplo una interacción de carga, una interacción hidrófoba o una interacción de van-der-Waals. Con estas interacciones se ancla de manera fija el polímero termorreactivo sobre la superficie del soporte de manera dependiente de la temperatura. El anclaje de las partículas sobre la superficie del soporte sigue existiendo independiente de la transferencia de fases del polímero termorreactivo.

De acuerdo con la invención el sustrato está dotado de al menos una sustancia moduladora, dispuesto sobre partículas moduladoras (5.1.5.2). La al menos una sustancia moduladora está dispuesta sobre la superficie del sustrato que queda al descubierto, es decir entre los microgeles termorreactivos y/o de manera que cubre éstos al menos parcialmente. La facilitación de la al menos una sustancia

5 moduladora permite ventajosamente una funcionalización del sustrato. Por consiguiente, esta forma de realización de la invención representa un progreso esencial en comparación con los sustratos de cultivo convencionales con polímeros termorreactivos, que no eran adecuados para una funcionalización de este tipo. A diferencia de esto, la al menos una sustancia moduladora permite una influencia de las condiciones de cultivo sobre el sustrato, sin que se altere el comportamiento frente a la temperatura de los microgeles.

10 Ventajosamente pueden preverse distintos tipos de sustancias moduladoras de manera individual o en combinación. Por ejemplo pueden preverse sustancias modulares, que aumentan la capacidad de adhesión de las células biológicas (sustancias moduladoras que aumentan la adhesión, moléculas atrayentes de células). Para esto está prevista al menos una de las siguientes sustancias:

- biomoléculas, como por ejemplo fibronectina, colágeno, laminina,
- péptidos que median la adhesión, como por ejemplo péptidos que contienen la serie de aminoácidos RGD,
- polímeros sintéticos, como por ejemplo poli-L-lisina, poliestirenosulfonato, polialilamina, polietilenimina.

15 Como alternativa pueden estar previstas sustancias moduladoras que reducen la capacidad de adhesión de las células biológicas (sustancias moduladoras que reducen la adhesión, moléculas repelentes de células). En este caso se usa al menos una de las siguientes sustancias como sustancia moduladora:

- 20 - proteínas, como por ejemplo albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA),
- péptidos que reducen la adhesión, como por ejemplo péptidos con alta proporción de leucina e isoleucina,
- polímeros sintéticos, como por ejemplo polímeros que contienen cadenas de polietilenglicol ("PEG"), y
- 25 - lípidos.

Pueden estar previstas además sustancias moduladoras que aumentan la adhesión y que reducen la adhesión combinadas sobre un sustrato. Por ejemplo pueden estar dispuestas las sustancias moduladoras con distintas acciones en distintas zonas parciales de la superficie del soporte separadas o mezcladas entre sí distribuidas por la superficie del soporte. En el último caso, mediante la proporción de mezcla de sustancias moduladoras que aumentan la adhesión y que reducen la adhesión puede ajustarse una capacidad de adhesión eficaz en la superficie del sustrato, manteniéndose mediante la facilitación simultánea de los microgeles termorreactivos la fijación o el desprendimiento de células dependiente de la temperatura.

30 De acuerdo con otra variante de la invención puede estar prevista como alternativa o adicionalmente una sustancia moduladora que sea adecuada para inducir reacciones celulares en las células biológicas. Por ejemplo puede estar previsto que una sustancia moduladora se una a receptores de superficie de las células para desencadenar las reacciones. Para esta función están previstas sustancias, como por ejemplo proteínas de la matriz extracelular (ECM) como fibronectina, anticuerpos contra receptores (EGFR), que se unen a factores de crecimiento, o anticuerpos por ejemplo contra CD 28 y CD 3 de células T (activación de la respuesta inmunitaria) de manera especialmente preferente.

35 De acuerdo con la invención se realiza la facilitación de la al menos una sustancia moduladora mediante partículas moduladoras que están constituidas por la al menos una sustancia moduladora o están revestidas con ésta y están dispuestas entre los microgeles termorreactivos sobre la superficie del soporte. Ventajosamente pueden añadirse las partículas moduladoras al microgel y con éste pueden aplicarse sobre la superficie del soporte.

40 Ventajosamente puede estar previsto, de acuerdo con otra forma de realización de la invención, una modulación espacial de las propiedades de superficie del sustrato sobre la superficie del soporte. La superficie del soporte presenta en al menos dos zonas parciales distintas propiedades de superficie.

45 Ventajosamente pueden formarse las zonas parciales porque al menos uno de los microgeles termorreactivos, el agente adhesivo y la al menos una sustancia moduladora se dispone sobre la superficie del soporte con al menos un gradiente de densidad espacial. Al menos uno de los componentes mencionados de la superficie del sustrato está previsto con una densidad espacial, que puede modificarse en al menos una dirección a lo largo de la superficie del soporte. El gradiente de densidad puede formarse gradualmente o de manera continua. La facilitación del al menos un gradiente de densidad permite ventajosamente que las células muestren a lo largo de la superficie del soporte distintas capacidades de adhesión, distintas reacciones frente a la temperatura, distintas reacciones celulares, como por ejemplo distintas diferenciaciones y/o distintas migraciones celulares.

50 De acuerdo con otra forma de realización ventajosa de la invención puede estar prevista sobre la superficie del soporte al menos una cavidad de cultivo. La cavidad de cultivo es un saliente que sobresale por la superficie del soporte, que está formada de manera que cubra parcialmente la superficie del soporte. La cavidad de cultivo comprende, por ejemplo, la configuración de una cavidad abierta por un lado o una bolsa, y está configurada para el alojamiento de al menos una célula biológica. Con la cavidad de cultivo se imitan condiciones de cultivo espaciales, que se proporcionan en el cultivo en la organización celular.

55

60

65

Ventajosamente puede estar formado el al menos un gradiente de densidad para la funcionalización de la superficie del sustrato de modo que las células migren a la cavidad de cultivo para someterse allí a un cultivo posterior y/o diferenciación.

5 El sustrato de acuerdo con la invención está diseñado para el cultivo de células biológicas. Para ello es el cuerpo del sustrato preferentemente una parte de un dispositivo de cultivo, como por ejemplo un recipiente de cultivo o un dispositivo fluídico, en el que pueden cultivarse células, como por ejemplo un microsistema fluídico. El cuerpo del sustrato puede estar unido de manera fija con el dispositivo de cultivo, por ejemplo puede formar la base del recipiente de cultivo, o puede soltarse del dispositivo de cultivo, por ejemplo puede representar una parte que puede colocarse en un recipiente de cultivo.

10 El procedimiento de acuerdo con la invención para el cultivo de células biológicas puede realizarse con una o varias de las siguientes etapas del procedimiento. Así puede estar previsto un ajuste de la adhesión de las células biológicas sobre el sustrato, ajustándose la temperatura del sustrato. El ajuste de la temperatura puede estar previsto globalmente para todo el sustrato o localmente para al menos una zona parcial. Con el ajuste de la temperatura se influye un parámetro de resistencia de la superficie del sustrato. Además puede estar previsto un ajuste de una migración específica del tipo celular de al menos un tipo de células biológicas, estimulándose al menos un tipo de células, por ejemplo al menos un tipo de diferenciación, a lo largo de un gradiente de densidad de una sustancia moduladora para la migración. Además puede estar previsto un ajuste de la migración de al menos un tipo de células por medio del gradiente de densidad de la sustancia moduladora de manera que las células biológicas migran hacia una cavidad de cultivo.

20 Otras particularidades y ventajas de la invención se explican a continuación con respecto a los dibujos adjuntos. Muestran:

- Figura 1: una vista en perspectiva esquemática de una primera forma de realización del sustrato de acuerdo con la invención;
- 25 Figura 2: ilustraciones esquemáticas de la transferencia de fases de microgeles termorreactivos;
- Figura 3: resultados experimentales, que muestran la transferencia de fases de microgeles termorreactivos;
- Figura 4: una ilustración esquemática de un microgel termorreactivo con estructura de núcleo-envoltura;
- 30 Figuras 5 y 6: posibilidades de disposición de los microgeles sin partículas moduladoras;
- Figuras 7 a 8: otras formas de realización de sustratos de acuerdo con la invención;
- Figura 9: una ilustración esquemática de un dispositivo de cultivo, que está dotado del sustrato de acuerdo con la invención;
- 35 Figuras 10 a 12: ilustraciones esquemáticas de otras formas de realización de sustratos de acuerdo con la invención, que están dotados de al menos una sustancia moduladora;
- Figura 13: ilustración esquemática de un sustrato no de acuerdo con la invención, que está dotado de una sustancia moduladora que no se encuentra sobre partículas moduladoras;
- 40 Figuras 14 a 17: ilustraciones esquemáticas de otras formas de realización de un sustrato de acuerdo con la invención (Fig. 14) y de sustratos no de acuerdo con la invención (Fig. 15-17) con gradientes de densidad de componentes de superficie; y

Figura 18: una ilustración esquemática de un sustrato con una cavidad de cultivo.
 Se describen formas de realización preferentes de la invención a continuación en relación a la facilitación de microgeles termorreactivos sobre la superficie del soporte de un sustrato de cultivo y su funcionalización prevista opcionalmente. No se describen las particularidades de procedimientos de cultivo, en particular de procedimientos para la manipulación de células biológicas y su influencia dirigida, dado que éstos son conocidos por el estado de la técnica. Además se resalta que los dibujos adjuntos representan ilustraciones esquemáticas y aumentadas de secciones del sustrato de cultivo de acuerdo con la invención. La aplicación de la invención en la práctica no está limitada a las ilustraciones, sino que puede realizarse con formas, tamaños y composiciones del sustrato modificadas.

55 La figura 1 muestra una vista en perspectiva esquemática de una primera forma de realización del sustrato 10 de acuerdo con la invención con el cuerpo del sustrato 1, sobre cuya superficie (superficie del soporte 2) están dispuestos los microgeles termorreactivos 3. El cuerpo del sustrato 1 está constituido por ejemplo por metales, como oro, titanio, platino, vidrio, oblea de silicio o plástico, como poliestireno, COP, policarbonato, cuya superficie forma la superficie del soporte 2. Los microgeles termorreactivos 3 están formados por las partes constituyentes coloidales de un polímero termorreactivo. Desviándose de la forma esférica ilustrada de manera esquemática pueden presentar los microgeles termorreactivos 3 en la práctica por ejemplo una forma semiesférica o una configuración deformada de manera irregular dependiendo de las condiciones del revestimiento.

60 Los microgeles termorreactivos 3, que se preparan por ejemplo a partir de PNIPam, muestran la transferencia de fases ilustrada esquemáticamente en las figuras 2A a 2C. Los microgeles termorreactivos 3 comprenden un núcleo reticulado 3.1, del cual están formadas cadenas de polímero 3.2 que sobresalen radialmente hacia fuera. Por encima de una temperatura crítica ("Lower Critical

Solution Temperature”, LCST, temperatura de conmutación), que para aplicaciones de cultivo se selecciona normalmente de pocos °C, por ejemplo de 2 °C a 10 °C por debajo de 37 °C, se encuentran las cadenas de polímero 3.2 en un estado colapsado (figura 2A). Con el enfriamiento alrededor de una diferencia de temperatura ΔT predeterminada y quedando por debajo de la temperatura crítica se transfieren las cadenas de polímero 3.2 a un estado no colapsado (hinchado) (figura 2B). El tamaño de los microgeles termorreactivos se describe con un radio hidrodinámico, que en el estado colapsado (R1) es inferior que en el estado no colapsado (R2). En el estado no colapsado, es decir por debajo de la temperatura crítica pueden seguir existiendo entre las cadenas de polímero 3.2 puentes de cadena 3.3 (figura 2C), lo que repercute en las propiedades de deformación mecánica y con ello en las propiedades de adhesión del sustrato 10 para células biológicas.

En un ejemplo práctico se selecciona el radio R1 de las partículas colapsadas por ejemplo en el intervalo de 2 nm a 5 μm . De manera correspondiente puede conseguirse un radio R2 en el estado no colapsado, por ejemplo, en el intervalo de 4 nm a 10 μm (por ejemplo 200 nm a 420 nm ó 300 nm a 480 nm, véase Wu *et al.* en “Coll. Poly. Sci.” 272 (1994) 467; por ejemplo 92 nm a 200 nm, de 42 nm a 97 nm, de 29 nm a 65 nm y de 19 nm a 35 nm, véase M. Andersson *et al.* en “J. Poly. Sci.” B 44 (2006) 3305).

Para inmovilizar los microgeles termorreactivos 3 sobre la superficie de soporte 2, se prepara, en primer lugar, una dispersión de microgel, que contiene las partículas de microgel como partículas coloidales. El radio R1 se ajusta mediante las condiciones de reacción durante la preparación del microgel. La dispersión de microgel puede almacenarse de manera estable.

En la preparación de la dispersión de microgel se ajustan preferentemente los siguientes parámetros de las partículas:

- longitud de la cadena del polímero,
- densidad de reticulación (por ejemplo formación de puentes de cadena),
- radio de partícula R1 en el estado colapsado,
- radio de partícula R2 en el estado no colapsado,
- módulo de elasticidad en el estado colapsado,
- módulo de elasticidad en el estado no colapsado, y
- (opcionalmente) gradiente radial de la rigidez desde el interior hacia el exterior.

Los parámetros de microgel se seleccionan dependiendo de la aplicación del sustrato 10. Aunque con las propiedades mencionadas se fije un intervalo de parámetros complejo, es posible la elección de los parámetros que van a usarse de manera concreta dependiendo de las células que van a cultivarse y las condiciones de cultivo que van a realizarse (geométricas, físicas y químicas) por ejemplo mediante ensayos sencillos o usando valores tabulados. Los inventores han determinado que entre la adhesión de células biológicas sobre los microgeles termorreactivos 3 y sus propiedades elásticas existe una fuerte correlación, de tal modo que mediante la elección en particular de las propiedades elásticas del microgel es posible una optimización de las condiciones de cultivo. Así se determinó, por ejemplo, que con una modificación del módulo E de los microgeles desde 600 kPa (por encima de la LCST) hasta 100 kPa (por debajo de la LCST) (véase la figura 3C) existen muy buenas propiedades de adhesión o bien de separación de células.

Para la preparación del sustrato 10 se aplica el microgel sobre la superficie del soporte 2. Se usa una técnica de deposición en sí conocida, como por ejemplo revestimiento por rotación, inmersión, aplicación por pulverización, sellado o dispensación, por ejemplo con agujas o boquillas de dispensación. Los microgeles termorreactivos 3, que entran en contacto con la superficie del soporte 2, forman con ésta por ejemplo una unión covalente. A continuación se lava la superficie del soporte 2 revestida, por ejemplo con agua, para separar las partículas en exceso, no unidas. Los microgeles termorreactivos 3 fijados en la superficie del soporte 2 pueden formar, tal como se muestra de manera esquemática en la figura 1, un empaquetamiento regular, compacto o como alternativa un empaquetamiento irregular con huecos.

A continuación puede estar previsto un secado de la superficie del soporte 2 dotada de los microgeles 3. El secado no está previsto sin embargo forzosamente. Como alternativa puede estar prevista directamente tras el lavado una funcionalización adicional o el cultivo de células biológicas. Además puede estar prevista una esterilización de la superficie que queda al descubierto de las partículas termorreactivas, por ejemplo mediante radiación ionizante (radiación gamma) o gasificación (por ejemplo con óxido de etileno).

Tal como se ilustra en la figura 1 de manera esquemática, al menos una célula biológica 21 está dispuesta de manera adherente sobre la superficie con microgeles termorreactivos 3 en el estado colapsado. Mediante una disminución de la temperatura puede inducirse la transferencia de fases de los microgeles termorreactivos 3 al estado no colapsado, en el que se ha reducido la dureza de la superficie con los microgeles termorreactivos 3 en comparación con el estado colapsado. Sobre la superficie con la dureza reducida tiene la al menos una célula biológica 21 una capacidad de adhesión reducida, de tal modo que se desprende, por ejemplo y puede separarse por lavado, mediante el medio de cultivo líquido por encima del sustrato (no representado en la figura 1).

Los resultados experimentales, que muestran la transferencia de fases de microgeles termorreactivos 3, están mostrados a modo de ejemplo en la figura 3. La figura 3A ilustra la topografía medida con un

microscopio de fuerza atómica de microgeles individuales 3 (PNIPam) para distintas temperaturas. Las curvas de hinchamiento de los microgeles 3 en el estado adsorbido están mostradas en la figura 3B. La gráfica pequeña en la figura 3B muestra perfiles de altura promedio en el ápex de los microgeles 3 (altura H dependiendo de las coordenadas de diámetro, en cada caso en μm). Finalmente ilustra la

5 figura 3C la dependencia de la temperatura del módulo de elasticidad de Young de los microgeles, que se dedujeron de mediciones con el microscopio de fuerza atómica. Mientras que a 37 °C el módulo de elasticidad es mayor de 300 kPa, se reduce el módulo de elasticidad a 25 °C a valores por debajo de 100 kPa. Al mismo tiempo, las partículas a la temperatura más alta tienen un bajo contenido en agua de aproximadamente el 65 %, mientras que a 25 °C el contenido en agua de los microgeles es

10 aproximadamente el 90 %.

Los resultados experimentales muestran que el comportamiento de reacción térmico de los microgeles 3, en particular el perfil de temperatura estrecho de la transferencia de fases, en el estado adsorbido es comparable con el estado líquido. Los ensayos experimentales con fibroblastos de ratón han dado como resultado que la adhesión de los fibroblastos sobre la superficie en el intervalo de temperatura,

15 en el que se midió la transferencia de fases con la modificación del módulo de Young, pudo ajustarse desde un estado adherente a temperaturas por encima de la transferencia de fases hacia un estado no adherente a temperaturas por debajo de la transferencia de fases. Por encima de la transferencia de fases, por ejemplo a 37 °C las células tienen una superficie de contacto mayor con el sustrato que a temperaturas por debajo de la transferencia de fases.

20 La figura 4 muestra una variante de la invención, que puede seleccionarse en particular dependiendo del objetivo de cultivo concreto. Así está previsto de acuerdo con la figura 4 un microgel termorreactivo 3 con una estructura de núcleo-envoltura. El núcleo 3.4, por ejemplo de látex, no puede modificarse en las condiciones de cultivo y en particular con una modificación de la temperatura. La envoltura 3.5 se forma por el polímero termorreactivo, por ejemplo PNIPam. La preparación de una dispersión de

25 microgel para la formación de partículas con estructura de núcleo-envoltura es en sí conocida (véase Hellweg *et al.* en "Langmuir" 20 (2004) 4330; Fernández-Barbero *et al.* en "Phys Rev E 66" (2002) 051803/1-10). La fijación de microgeles termorreactivos 3 con estructura de núcleo-envoltura sobre la superficie de soporte y el otro tratamiento del sustrato se realiza tal como se ha descrito esto anteriormente en relación a la figura 1.

30 Los microgeles termorreactivos 3 pueden formar - sin partículas moduladoras - una monocapa cerrada (figura 5; esta variante no es objeto de la invención) o una monocapa no cerrada, interrumpida por huecos (figura 6) sobre la superficie del soporte 2. La disposición regular de los microgeles termorreactivos 3 de acuerdo con la figura 5 puede generarse mediante auto-organización (formación del empaquetamiento más compacto). Por el contrario, en el caso de la capa no cerrada de acuerdo con la figura 6 puede conseguirse la disposición regular de los microgeles termorreactivos 3 mediante un tratamiento previo de la superficie del soporte, por ejemplo con islas de agente adhesivo aplicadas localmente. Desviándose de las figuras 5 y 6 pueden formar los microgeles termorreactivos 3

35 disposiciones irregulares sobre la superficie del soporte 2.

Las figuras 7 y 8 ilustran de manera esquemática que el anclaje de los microgeles termorreactivos 3 sobre la superficie del soporte 2 puede mejorarse cuando sobre ésta está dispuesto un agente adhesivo 4. El agente adhesivo 4 puede cubrir completamente la superficie del soporte 2 (figura 7) y así puede formar la superficie del soporte modificada que queda al descubierto para la fijación de los microgeles termorreactivos 3. La figura 8 muestra una sección del sustrato de acuerdo con la invención 10 con los microgeles termorreactivos 3 en el estado colapsado (figura 8A) por encima de la

40 temperatura crítica y en el estado no colapsado (figura 8B) por debajo de la temperatura crítica. La figura 8B ilustra además de manera esquemática las variantes de unión previstas entre el agente adhesivo 4 con por un lado el cuerpo del sustrato 1 y por otro lado las partículas termorreactivas 3. Así, en los extremos libres de las cadenas de polímero 3.2 de los microgeles termorreactivos 3 pueden estar previstos sitios de unión 3.6 para una unión covalente o bioespecífica 4.1 con el agente adhesivo

45 4. Los sitios de unión 3.6 pueden formarse en la preparación del microgel. Las uniones covalentes se basan en por ejemplo compuestos de epóxido, carboxi, amino, hidrazida, tiol o maleimida en los extremos de las cadenas de polímero 3.2. Para la formación de la unión covalente o bioespecífica 4.1 está dotada la capa de agente adhesivo 4 de manera correspondiente de sitios de unión 4.2, que reaccionan con los sitios de unión 3.6 de los microgeles termorreactivos 3. Al mismo tiempo forman los

50 sitios de unión 4.2 con el cuerpo del sustrato 1 uniones covalentes o bioespecíficas. Las uniones bioespecíficas pueden formarse en particular mediante uniones de receptor-ligando, como por ejemplo entre estreptavidina y biotina.

En la parte izquierda de la figura 8B está ilustrado esquemáticamente que la acción del agente adhesivo 4 pueda basarse en una interacción inespecífica 4.3 por un lado con las partículas termorreactivas 3 y por otro lado con el cuerpo del sustrato 1.

60 El agente adhesivo 4 comprende por ejemplo una capa de biotina con un espesor de 1 nm a 1 μm (véase Spinke *et al.* en "J. Chem. Phys." 99 (1993) 7012; Hong *et al.* en "Progr. Colloid Polym. Sci." 93 (1993) 98; Zao *et al.* en "Electroanal." 18(2006) 1737). La capa se forma con procedimientos en sí conocidos, tal como por ejemplo revestimiento por rotación o auto-ensamblaje de la solución, sobre la

65 superficie del cuerpo del sustrato 1.

El sustrato 10 de acuerdo con la invención puede ser parte de un dispositivo de cultivo 30, tal como se ilustra a modo de ejemplo en la figura 9. El dispositivo de cultivo 30 comprende un recipiente de cultivo 31 con una base 32 y una pared lateral 33 circundante. El recipiente de cultivo 31 está previsto para el alojamiento de un medio de cultivo 34 líquido, que puede introducirse mediante una conducción de entrada 35 en el recipiente de cultivo 31 y puede eliminarse mediante una conducción de salida 36 del recipiente de cultivo 31. El sustrato 10 de acuerdo con la invención está dispuesto sobre la base 32. Como alternativa, la base 32 forma el sustrato 10. Sobre el lado del sustrato 10 que se dirige hacia el interior del recipiente de cultivo 31 están dispuestas las partículas termorreactivas 3 de manera que quedan al descubierto. Sobre el sustrato 10 se encuentran células biológicas 20, 21.

La figura 9 ilustra además de manera esquemática un dispositivo de ajuste de la temperatura 40 y un dispositivo de manipulación 50. Con el dispositivo de ajuste de la temperatura 40 puede ajustarse la temperatura del sustrato 10 o de zonas parciales (segmentos) del sustrato 10 de manera dirigida desde una temperatura por encima hasta una temperatura por debajo de la temperatura crítica de la transferencia de fases de los microgeles termorreactivos 3. El dispositivo de ajuste de la temperatura comprende por ejemplo un dispositivo de calentamiento, tal como por ejemplo una calefacción por resistencia, o una combinación de un dispositivo de calentamiento y un dispositivo de enfriamiento, tal como por ejemplo una refrigeración Peltier. El dispositivo de manipulación 50 comprende por ejemplo una conducción de entrada 51, por la que puede arrastrarse una suspensión celular hacia el recipiente de cultivo 31.

Además puede estar dotado el dispositivo de cultivo 30 de un dispositivo de observación, por ejemplo un microscopio, y un dispositivo de medición, por ejemplo un detector de temperatura (no representado).

Las figuras 10 a 17 ilustran distintas variantes de la funcionalización de un sustrato con al menos una sustancia moduladora, que puede estar prevista de acuerdo con la invención con partículas moduladoras (por ejemplo figuras 10 a 12) o no de acuerdo con la invención como capa moduladora (por ejemplo figuras 13, 15) sobre la superficie del soporte del sustrato. Generalmente comprende la al menos una sustancia moduladora una sustancia química individual o una composición de sustancias químicas, a la que las células biológicas presentan una capacidad de adhesión modificada en comparación con los microgeles termorreactivos (ejemplos véase anteriormente) y/o con la que pueden inducirse reacciones celulares en las células biológicas.

Sustancias que desencadenan reacciones celulares son generalmente sustancias que mediante unión a receptores de superficie de las células biológicas producen, por ejemplo, una adhesión reforzada, una migración (migración celular), una diferenciación (en particular diferenciación de células madre), una modificación del estado de activación o una modificación de la malignidad. Las sustancias de este tipo son por ejemplo:

- quimiocinas, tal como por ejemplo FGF, inducen quimiotaxis, o
- osteonectina (induce diferenciación de células madre en células de músculo cardíaco).

Ventajosamente, la combinación de sustancias moduladoras de distinta acción permite el ajuste dirigido de propiedades de superficie físicas o químicas predeterminadas. Dado que la al menos una sustancia moduladora pueda añadirse durante la preparación del microgel a la dispersión de partículas coloidales del polímero termorreactivo, pueden combinarse libremente los microgeles termorreactivos y la al menos una sustancia moduladora como módulos. La superficie del sustrato de acuerdo con la invención puede configurarse como un bloque de construcción modular.

En el ejemplo mostrado esquemáticamente en la figura 10 están combinados microgeles termorreactivos 3, partículas de plástico, que están revestidas con moléculas atrayentes de células (partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión) y partículas de plástico, que están revestidas con moléculas repelentes de células (partículas moduladoras 5.2 que reducen la adhesión). Las partículas moduladoras 5.1, 5.2 presentan un diámetro, que se selecciona por ejemplo en el intervalo de 50 nm a 1 µm.

La figura 11 ilustra esquemáticamente las distintas acciones de la combinación de microgeles termorreactivos 3 con partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión y partículas moduladoras 5.2 que reducen la adhesión (simbolizadas en la figura 11A). De acuerdo con la figura 11B, las partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión hacen que, mediante un número relativamente elevado de sitios de unión para la unión adherente de la célula 21, se forme una superficie de contacto relativamente pequeña entre la célula 21 y la superficie del sustrato. Con la superficie de contacto más pequeña contacta la célula 21 con relativamente pocos microgeles termorreactivos 3, de tal modo que se reduce su acción en una transferencia de fases dependiente de la temperatura. Como resultado se consigue una fuerte unión de la célula 21 al sustrato 10.

De acuerdo con la figura 11C, las partículas moduladoras 5.2 que reducen la adhesión producen un efecto contrario. La célula 21 se extiende sobre la superficie del sustrato 10, para encontrar sitios de unión para los contactos de adhesión de la célula 21. De manera correspondiente, la célula 21 mantiene el contacto con un número relativamente grande de microgeles termorreactivos 3. Por consiguiente repercute una transferencia de fases de los microgeles termorreactivos 3 más fuertemente que en el caso de las partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión (figura 11B). La adhesión de la célula 21 sobre la superficie del sustrato 10 se reduce.

Mediante un ajuste de las proporciones de mezcla cuantitativas de los microgeles termorreactivos 3 con al menos un tipo de partículas moduladoras 5.1, 5.2 en la dispersión para la preparación de los microgeles pueden variarse, por consiguiente, ventajosamente las propiedades de adhesión (parámetros de adhesión o desprendimiento) de la superficie del sustrato a través de un amplio intervalo, conservándose el carácter termorreactivo de la superficie y teniendo la superficie propiedades de adhesión óptimas para un tipo celular o varios tipos celulares. Ventajosamente pueden generarse las proporciones de mezcla en soluciones de soporte para la preparación de las dispersiones de una manera sencilla mediante pesada. El uso de la dispersión de microgeles, que contiene las partículas del polímero termorreactivo y las partículas moduladoras, permite la transferencia conjunta hacia la superficie de soporte del sustrato en una única etapa de deposición. Las proporciones de tamaño seleccionadas en la ilustración esquemática de la figura 11 por un lado de la célula biológica 21 y por otro lado de los microgeles 3, 5.1 y 5.2 se han seleccionado por motivos técnicos de dibujo. A diferencia de la ilustración pueden usarse tamaños de partícula considerablemente más pequeños, por ejemplo a 50 nm o inferior a esto, o también partículas más grandes, por ejemplo 10 μm .

De acuerdo con otra variante de la invención pueden combinarse sobre la superficie del sustrato 10 partículas con distintos tamaños, tal como se ilustra a modo de ejemplo en la figura 12. Por ejemplo, pueden tener las partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión un radio más grande que los microgeles termorreactivos 3 (figura 12A). En este caso se refuerza la acción que aumenta la adhesión de las partículas moduladoras 5.1, dado que éstas están mucho más accesibles en comparación con los microgeles termorreactivos 3 para la célula 21. A diferencia de esto, de acuerdo con la figura 12B, con partículas moduladoras 5.2 que reducen la adhesión, cuyo radio es menor que el radio de los microgeles termorreactivos 3, se reduce la acción de las partículas moduladoras 5.2. Otras combinaciones, tales como por ejemplo partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión más pequeñas y/o partículas moduladoras 5.2 que reducen la adhesión más grandes son igualmente posibles.

Como resultado pueden ajustarse no sólo las propiedades de adhesión de la superficie, sino que también puede facilitarse una determinada granulosis de la superficie. La facilitación de una superficie granulosa significa que se genera una topología de superficie con elevaciones y concavidades. Ventajosamente puede adaptarse la granulosis de la superficie a las dimensiones típicas del patrón de adhesión de un determinado tipo celular (células de endotelio capilar humanas y bovinas, véase C.S. Chen *et al.* en "Science" 276 (1997) 1425; y células musculares C2C12, véase U. Joos *et al.* en "Eur. J. Cell Bio." 85 (2006) 225).

La figura 13 ilustra una variante, que no es objeto de la invención, en la que la al menos una sustancia moduladora se facilita en combinación con los microgeles termorreactivos 3 como capa moduladora 5.3 que aumenta la adhesión o como capa moduladora 5.4 que reduce la adhesión.

Las figuras 14, 15 y 16 ilustran disposiciones, en las que los microgeles termorreactivos, el agente adhesivo y/o la sustancia moduladora están dispuestos sobre la superficie del soporte del cuerpo del sustrato con al menos un gradiente de densidad. Estas formas de realización son ventajosas en particular para la manipulación de células biológicas durante el cultivo en co-cultivos. Mediante la formación de gradientes de densidad pueden modificarse las propiedades de superficie del sustrato de modo que se induzca una migración (migración celular) de las células adherentes dependiendo del tipo celular. Para ello puede estar previsto un gradiente de concentración (figuras 14, 15) y/o un gradiente de función (figura 16) de al menos una sustancia moduladora con propiedades quimiotácticas.

De acuerdo con la figura 14, sobre la superficie del soporte 2 del cuerpo del sustrato 1 están dispuestos microgeles termorreactivos 3 y partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión de modo que en una primera zona parcial 1.1 una densidad de superficie de las partículas termorreactivas 3 más elevada en comparación con las partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión y en una segunda zona parcial 1.2 por el contrario una densidad de los microgeles termorreactivos 3 menor en comparación con las partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión. Como resultado se forma un gradiente de densidad 6 que se caracteriza a lo largo de la superficie de soporte 2 por una densidad de superficie creciente de las partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión o una densidad de superficie decreciente de los microgeles termorreactivos 3.

El gradiente de densidad 6, que está ilustrado esquemáticamente en la figura 14, puede generarse en la práctica gradualmente mediante la deposición de microgeles con distintas composiciones sobre distintas zonas parciales del cuerpo del sustrato 1.

De acuerdo con la figura 14 está previsto para el cultivo de células biológicas 21 de un primer tipo celular de interés junto con células alimentadoras 22, la formación del co-cultivo en la primera zona parcial 1.1 con una elevada proporción de las partículas termorreactivas 3 (etapa S1). Tras el cultivo, que comprende por ejemplo una diferenciación de las células 21, migran las células alimentadoras 22 con la acción específica de las partículas moduladoras 5.1 que aumentan la adhesión desde la primera zona parcial 1.1 (migración 7, etapa S2). A continuación se realiza el desprendimiento de las células 21 de interés, induciéndose mediante una modificación de la temperatura del sustrato 10 la transferencia de fases de los microgeles termorreactivos 3 y reduciéndose considerablemente en la

zona parcial 1.1 la capacidad de adhesión para las células biológicas 21. Las células 21 pueden separarse entonces del sustrato 10, por ejemplo con un dispositivo de manipulación, tal como se muestra éste en la figura 9.

5 Para estimular las células de manera específica del tipo celular con respecto a la migración, están a disposición una serie de sustancias moduladoras. Por ejemplo actúa fMLP (formil metionil-leucil-prolina) exclusivamente sobre la migración de células de leucemia HL 60, mientras que otros tipos celulares permanecen invariables.

10 El principio mostrado esquemáticamente en la figura 14 de la migración selectiva 7 de un tipo celular a partir de una mezcla de células adherentes puede generalizarse de manera correspondiente a la mezcla de más de dos tipos celulares, seleccionándose la sustancia moduladora que aumenta la adhesión de modo que al menos un tipo celular migra desde la mezcla o al menos un tipo celular permanece invariable y no muestra ninguna migración. Ventajosamente pueden separarse con ello pequeñas muestras de células con bajas cantidades de células en particular por debajo de 10^5 células tras el co-cultivo.

15 Para el desprendimiento de las células 21 están a disposición distintas opciones. De acuerdo con las figuras 15 y 16 puede reducirse la temperatura de todo el sustrato 10 por debajo de la temperatura crítica (LCST). Esto es posible en particular cuando las células 22 que permanecen de manera adherente en la zona parcial 1.2 permanecen imparciales por la transferencia de fases de las partículas termorreactivas 3. Como alternativa puede estar prevista una reducción local de la temperatura, tal como está ilustrado esquemáticamente en la figura 16. En esta forma de realización de la invención está dispuesto el dispositivo de ajuste de la temperatura 40 (véase también la figura 9) de manera que actúa localmente sobre la zona parcial 1.1 del cuerpo de sustrato 1. En este caso puede inducirse la transferencia de fases de los microgeles termorreactivos 3 de manera localmente limitada en la zona parcial 1.1, mientras que los microgeles termorreactivos en otras zonas parciales permanecen invariables.

20 La migración específica del tipo celular sobre la superficie del sustrato requiere sin embargo no forzosamente un gradiente de densidad. Como alternativa o adicionalmente pueden añadirse sustancias 8 que actúan de manera quimiotáctica al medio de cultivo, tal como se ilustra esquemáticamente en la figura 17.

30 De acuerdo con la figura 17 se usa un sustrato 10 de acuerdo con la invención, sobre cuyo cuerpo de sustrato 1 están dispuestas las partículas termorreactivas 3 distribuidas de una manera homogénea. Tras el co-cultivo de las células 21, 22 sobre el sustrato 10 (etapa S1) se realiza la adición de sustancias 8 que actúan de manera quimiotáctica en el medio de cultivo, de modo que se induce una migración 7 de las células. Mediante la elección de la sustancia 8 que actúa de manera quimiotáctica puede inducirse la migración 7 de manera específica del tipo celular. Por ejemplo, fMLP produce exclusivamente una migración de células de leucemia HL 60, mientras que células de líneas celulares que se obtuvieron de tejido sano permanecen invariables.

35 Para el desprendimiento de las células 21 de interés se realiza en la etapa S3 una reducción de la temperatura localmente limitada. Las partículas termorreactivas 3 muestran la transferencia de fases en el estado no colapsado, de modo que la célula 21 puede desprenderse.

40 La figura 18 muestra otra variante de la invención, en la que el sustrato 10 está dotado de una cavidad de cultivo 9. La cavidad de cultivo 9 puede usarse para la simulación in vitro de procesos de diferenciación en nichos de células madre. Así se colocan previamente en el organismo biológico células madre en cavidades con un revestimiento bioquímico y/o celular predeterminado (véase David T. Scadden en "Nature" 441 (2006) 1075; M.C.Dusseiller *et al.* en "Biointerphases" 1 (2006) P1) y se someten a una diferenciación.

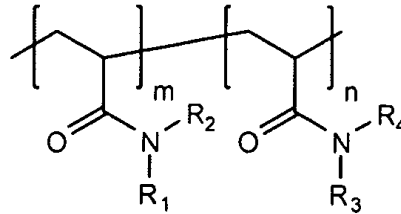
45 Un ejemplo de un nicho de células madre de este tipo son los folículos pilosos. Con la cavidad de cultivo 9 del sustrato 10 de acuerdo con la invención se crea un microentorno para células biológicas 21, en el que se imitan las condiciones en el organismo. Las técnicas de manipulación de células convencionales para el revestimiento de cavidades de cultivo artificiales con células biológicas requieren el uso de pinzas ópticas o elementos de acción dielectroforética. Esto es desventajoso en cuanto al gasto de aparatos y a los procedimientos complejos. Este problema se soluciona con el sustrato de acuerdo con la invención de acuerdo con la figura 18 de manera que las células migran de manera dirigida hacia la cavidad de cultivo 9.

50 De acuerdo con la etapa S1 en la figura 18 se aplica una mezcla de células compuesta de células biológicas 21, 22, que deben disponerse en la cavidad de cultivo 9, en una primera zona parcial 1.1 del cuerpo de sustrato 1 y eventualmente se cultiva. En una segunda etapa S2 se realiza la migración dirigida de las células 21, 22 hacia la cavidad de cultivo 9, usándose uno de los mecanismos mencionados anteriormente, por ejemplo un gradiente de densidad y/o una sustancia quimiotáctica que actúa desde el medio de cultivo.

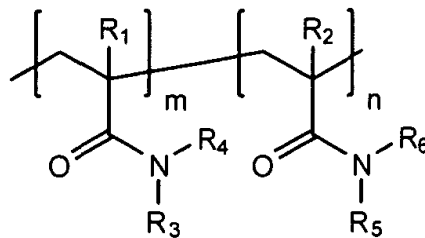
60 Las características de la invención divulgadas en la descripción mencionada anteriormente, los dibujos y las reivindicaciones pueden ser importantes tanto de manera individual como también en combinación para la realización de la invención en sus distintas configuraciones.

REIVINDICACIONES

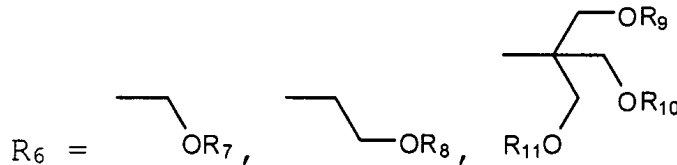
1. Sustrato (10), en particular para el alojamiento de células biológicas (20, 21, 22), que comprende
 - un cuerpo del sustrato (1), que presenta una superficie del soporte (2),
caracterizado porque
 - sobre la superficie del soporte (2) están fijados microgeles termorreactivos (3), es decir unas partículas que contienen un polímero termorreactivo, con un diámetro de 10 nm a 10 µm y además está previsto en el sustrato al menos una sustancia moduladora (5), con la que las células biológicas presentan una capacidad de adhesión, que se diferencia de la capacidad de adhesión de las células biológicas en los microgeles termorreactivos (3), y/o con la que pueden inducirse reacciones celulares mediante unión a receptores de superficie de las células biológicas, y
 en el que la al menos una sustancia moduladora (5) está dispuesta sobre unas partículas moduladoras (5.1, 5.2).
2. Sustrato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
 - los microgeles termorreactivos (3) están formados de al menos un polímero no cargado y no ionizable.
3. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que los microgeles termorreactivos (3) están formados de al menos uno de los polímeros (homo- o copolímeros):



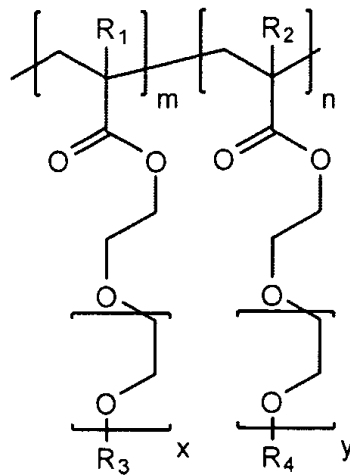
con R₁, R₂, R₃ y R₄ = H o alquilo, preferentemente R₁ = isopropilo, R₂ = H, n = 0,



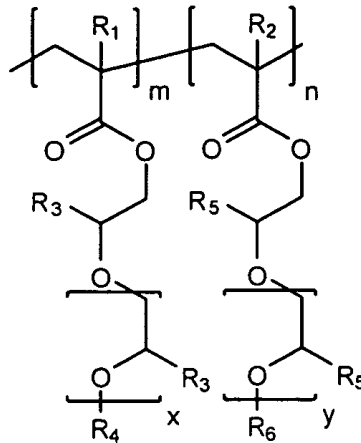
con R₁, R₂ = -H, -alquilo, preferentemente -H y -CH₃, de manera especialmente preferente -H, con R₃, R₄, R₅ y R₆ = -H, -alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, preferentemente -R₃ = isopropilo, -R₄ = -H, -R₅ y -R₆ = -C₂H₅, -CH₃ o -H, de manera especialmente preferente -R₃ = isopropilo y -R₄ = -H y m : n = 100 : 0 y / o R₃, R₄, R₅ y



con R₇ a R₁₁ = -H, -alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquiloílo, al menos un R = H,



con $R_1, R_2 = H$ o CH_3 , $R_3, R_4 = H$ o alquilo, $x, y = 0$ a 20 ,



5

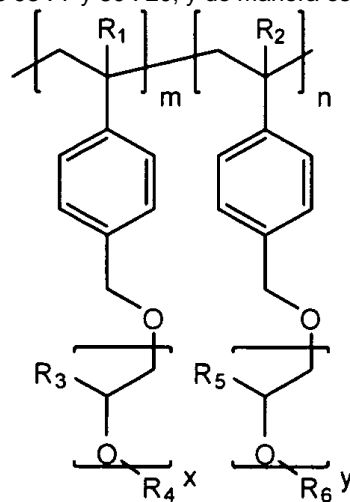
con $R_1, R_2 = -H$, alquilo, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-CH_3$
 con $R_3, R_5 = -H$, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera
 especialmente preferente $-H$, en cualquier caso debe aplicarse: cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 =$
 $-H$,

10

con $R_4, R_6 = -H$, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, preferentemente $-H$ y / o $-CH_3$, de manera
 especialmente preferente $-CH_3$, en el que cuando $R_3, R_5 = -H$ y $R_4, R_6 = -CH_3$, $x = 1$ e $y = 7,5$,
 entonces se encuentra $m : n$ preferentemente entre $95 : 5$ y $90 : 10$, de manera especialmente
 preferente en $93 : 7$, y

15

cuando $R_3, R_5 = -H$ y $R_4, R_6 = -CH_3$, $x = 1$ e $y = 4,5$, entonces se encuentra
 $m : n$ preferentemente entre $93 : 7$ y $80 : 20$, y de manera especialmente preferente en $85 : 15$,

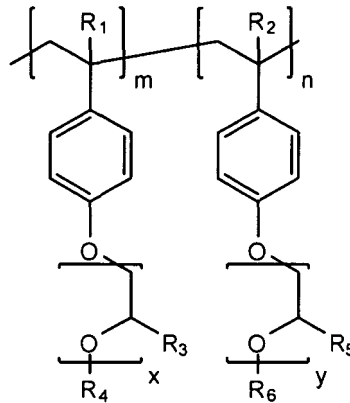


5

con $R_1, R_2 = -H, -alquilo$, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-H$,
 con $R_3, R_5 = -H, -alquilo, -alqueniilo, alquinilo, arilo$, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera
 especialmente preferente $-H$, en cualquier caso debe aplicarse: cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 =$
 $-H$,

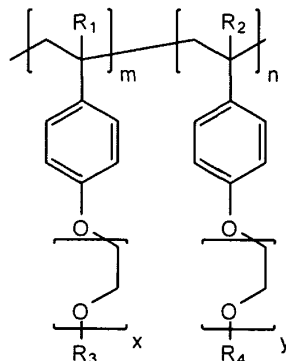
10

con $R_4, R_6 = -H, -alquilo, -alqueniilo, alquinilo, arilo$, preferentemente $-H$ y / o $-CH_3$, de manera
 especialmente preferente $-H$, en el que cuando $R_1, R_2 = -H$, y $R_4, R_6 = -H$, $x = 3$ e $y = 4$,
 entonces se encuentra $m : n$ preferentemente entre $65 : 35$ y $45 : 55$, de manera especialmente
 preferente entre $60 : 40$ y $50 : 50$,



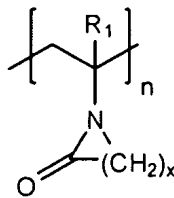
15

con $R_1, R_2 = -H, -alquilo$, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera especialmente preferente $-H$,
 con $R_3, R_5 = -H, -alquilo, -alqueniilo, alquinilo, arilo$, preferentemente $-H$ y $-CH_3$, de manera
 especialmente preferente $-H$, en el que cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$
 con $R_4, R_6 = -H, -alquilo, -alqueniilo, alquinilo, arilo$, preferentemente $-H$ y / o $-CH_3$, de manera
 especialmente preferente $-H$,



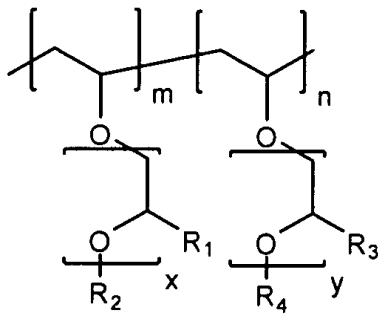
20

con $R_1, R_2 = H$ o CH_3 , $R_3, R_4 = H$ o $alquilo$, $x, y = 2$ a 20 ,



25

con $R_1 = H$ o CH_3 , $x = 3$ a 5 , copolímeros con $x = 3$ y $X > 3$,



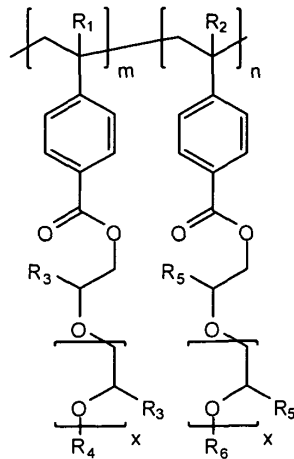
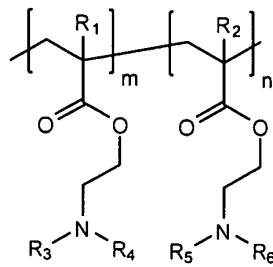
5

con $R_1, R_3 = -H, -\text{alquilo}, \text{alqueno}, \text{alquino}, \text{arilo}$, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-H$, en cualquier caso debe aplicarse:

cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$,

con $R_2, R_4 = -H, -\text{alquilo}, \text{alqueno}, \text{alquino}, \text{arilo}$, preferentemente $-H$ y / o $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-\text{CH}_3$,

10



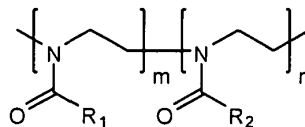
15

con $R_1, R_2 = -H, -\text{alquilo}$, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-H$, con $R_3, R_5 = -H, -\text{alquilo}, \text{alqueno}, \text{alquino}, \text{arilo}$, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-H$, en el que:

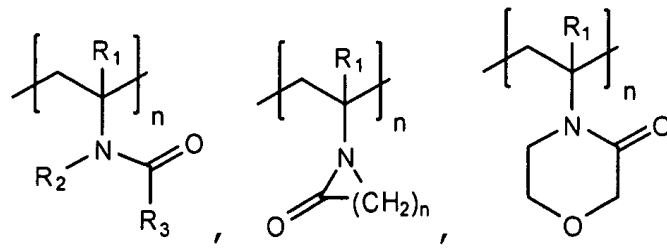
cuando $R_3 \neq -H$, entonces $R_5 = -H$,

con $R_4, R_6 = -H, -\text{alquilo}, \text{alqueno}, \text{alquino}, \text{arilo}$, preferentemente $-H$ y / o $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-H$,

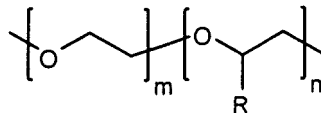
20



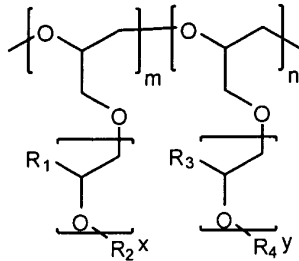
con $R_1, R_2 = -H, -\text{alquilo}, \text{alqueno}, \text{alquino}, \text{arilo}$,



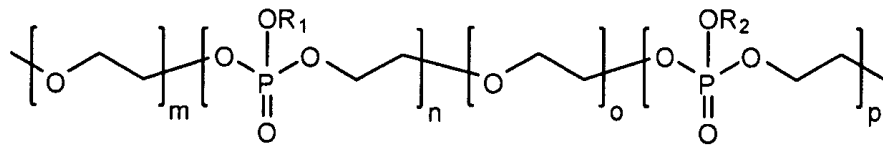
5 o copolímeros de los tres elementos en composiciones,
 con $R_1 = -H, -\text{alquilo}$, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, de manera especialmente preferente $-H$,
 con $R_2, R_3 = -H, -\text{alquilo}$, alquenoilo, alquinoilo, arilo con $2 \leq n \leq 10$, preferentemente $3 \leq n \leq 6$,



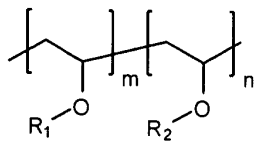
10 con $-R = -H, -\text{alquilo}$, alquenoilo, alquinoilo, arilo, preferentemente $-R = \text{alquilo}$, de manera especialmente preferente $-R = -\text{CH}_3$,



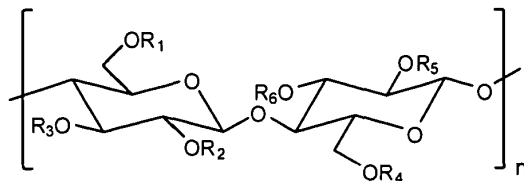
15 con $R_1, R_3 = -H, -\text{alquilo}$, alquenoilo, alquinoilo, arilo, preferentemente $-H$ y $-\text{CH}_3$, en el que cuando $R_1 = -H$, entonces $R_3 = -H$,
 con $R_2, R_4 = -H, -\text{alquilo}$, alquenoilo, alquinoilo, arilo, preferentemente $-H$ y / o $-\text{CH}_3$,



20 con $R_1, R_2 = -H, \text{alquilo}$, alquenoilo, alquinoilo, arilo,



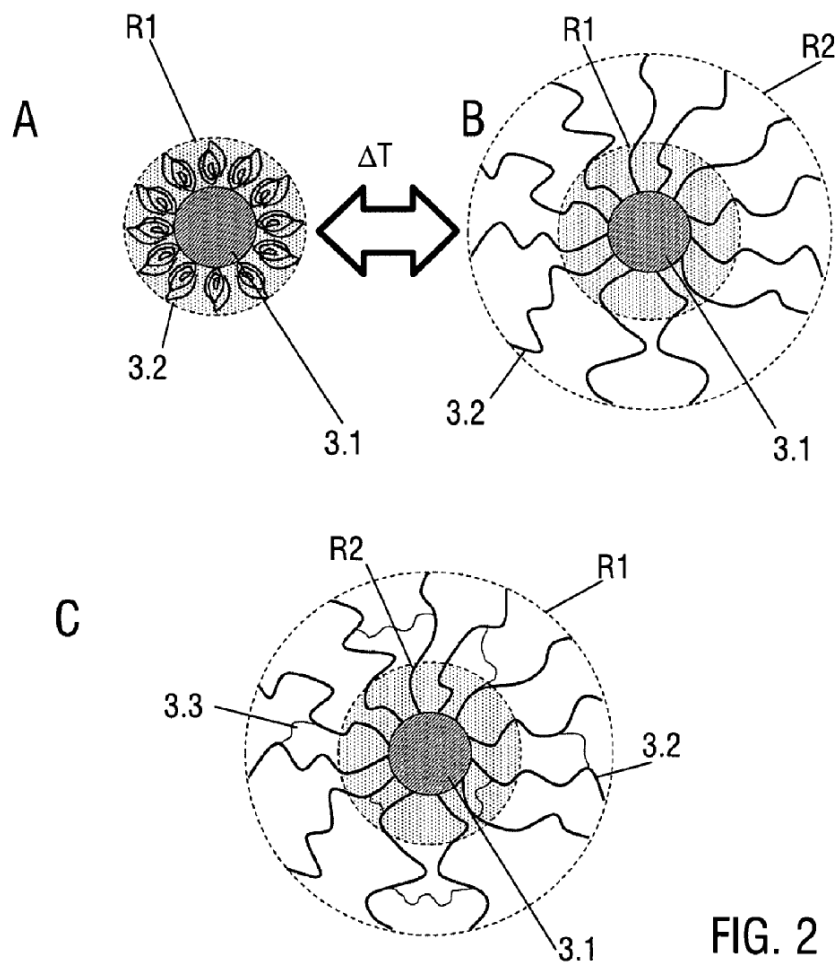
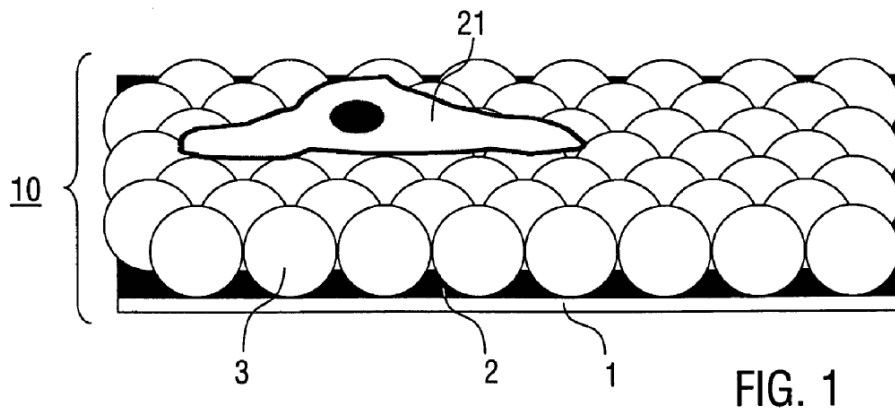
25 con $R_1, R_2 = -H, -\text{alquilo}$, alquenoilo, alquinoilo, arilo, preferentemente $R_1 = -\text{CH}_3, n = 0$,
 y estructuras análogas, que se basan en otras estructuras de polisacárido distintas de la celulosa,

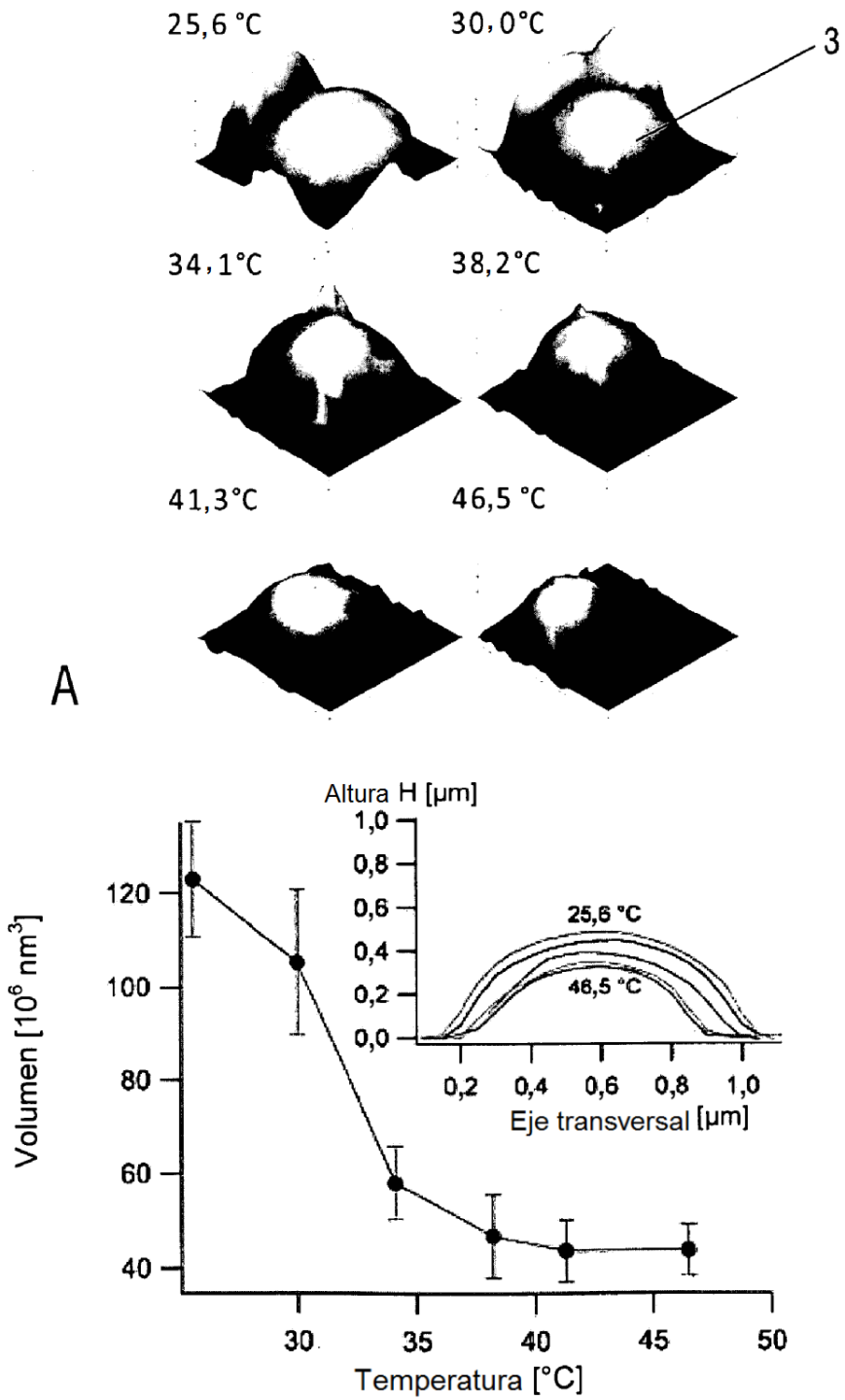


30 con R_1 a $R_6 = -H, -\text{alquilo}$, alquenoilo, alquinoilo, arilo, alquiloilo, al menos dos $R = H$,
 homo- o copolímeros con unidades similares a la elastina, y copolímeros de todas las unidades mencionadas anteriormente con monómeros modificados.

4. Sustrato de acuerdo con la reivindicación 3, en el que al menos una unidad terminal de la cadena principal de polímero contiene un grupo de acoplamiento a la superficie del soporte (2).
5. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que los microgeles termorreactivos (3) están formados de al menos uno de los polímeros: - poli-(N-isopropilacrilamida),
 - $-X(-CH_2-CR_1COO-R_2)_n(-CH_2-CR_1COO-R_3)_m-R_4$ o copolímeros del mismo, y
 - $-X-[-CH_2-CR_1COO-R_2-]_n-[-CH_2-CR_1COO-R_3-]_m-R_4$ o copolímeros del mismo, en los que X es un grupo de acoplamiento a la superficie de soporte, $R_1 = H$ o CH_3 , $R_2/R_3 =$ cadenas de hidrocarburo alifático con grupos éter, y R_4 es H, una cadena de hidrocarburo alifático o un grupo funcional.
6. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - los microgeles termorreactivos (3) están formados de al menos dos polímeros distintos y/o presentan distintos diámetros.
7. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - los microgeles termorreactivos (3) presentan un diámetro que asciende al menos a 50 nm y/o como máximo a 10 μm .
8. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - los microgeles termorreactivos (3) presentan una estructura de núcleo-envoltura.
9. Sustrato de acuerdo con la reivindicación 8, con al menos una de las características
 - exclusivamente la envoltura de los microgeles termorreactivos (3) es termorreactiva,
 - la conexión de los núcleos de los microgeles termorreactivos (3) se produce mediante interacciones de valencia secundaria,
 - la conexión de los núcleos de los microgeles termorreactivos (3) se produce mediante reticulación química,
 - las cadenas de polímero en la envoltura de los microgeles termorreactivos (3) están no reticuladas,
 - las cadenas de polímero en la envoltura de los microgeles termorreactivos (3) están reticuladas, siendo el número de puntos de reticulación no superior a 1 por 20 unidades de repetición no reticuladas, y
 - el espesor de la envoltura de los microgeles termorreactivos (3) asciende a al menos 10 nm.
10. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - los microgeles termorreactivos (3) junto con las partículas moduladoras (5.1, 5.2) forman una monocapa, en particular una monocapa cerrada.
11. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - la superficie de soporte (2) está dotada de un agente adhesivo (4).
12. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - al menos uno de los microgeles termorreactivos (3), el agente adhesivo y la sustancia moduladora forman sobre la superficie de soporte (2) al menos un gradiente de densidad (6).
13. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - sobre la superficie del soporte (2) está prevista al menos una cavidad de cultivo (9).
14. Sustrato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - el cuerpo del sustrato (1) es parte de un dispositivo de cultivo (30).
15. Procedimiento para la preparación de un sustrato (10) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, con las etapas:
 - facilitar el cuerpo del sustrato (1) con la superficie del soporte (2),
 - preparar una dispersión de los microgeles termorreactivos (3),
 - aplicar la dispersión sobre la superficie del soporte (2), y
 - fijar los microgeles termorreactivos (3) sobre la superficie del soporte (2),
 en el que el procedimiento comprende además la aplicación de al menos una sustancia moduladora (5) sobre partículas moduladoras sobre la superficie del soporte (2).
16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, con al menos una de las etapas
 - aplicar un agente adhesivo (4) sobre la superficie del soporte, y
 - esterilizar la superficie del soporte (2).

17. Procedimiento para el cultivo de células biológicas (20, 21, 22) sobre un sustrato (10) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14, con las etapas:
- depositar las células biológicas (20, 21, 22) sobre el sustrato (10), y
 - ajustar las condiciones de cultivo de manera que las células biológicas (20) se someten a un crecimiento, a una diferenciación y/o a una migración (7).
- 5
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, con al menos una de las etapas
- ajustar la adhesión de las células biológicas (20, 21, 22) sobre el sustrato (10) mediante un ajuste de la temperatura,
 - ajustar una migración (7) específica del tipo celular de al menos un tipo de células biológicas (20, 21, 22) por medio de un gradiente de densidad de una sustancia moduladora que actúa de manera específica del tipo celular y
 - ajustar la migración (7) de al menos un tipo de células biológicas (20, 21, 22) por medio de un gradiente de densidad de una sustancia moduladora de manera que las células biológicas (20, 21, 22) migran hacia una cavidad de cultivo (9).
- 10
- 15





C

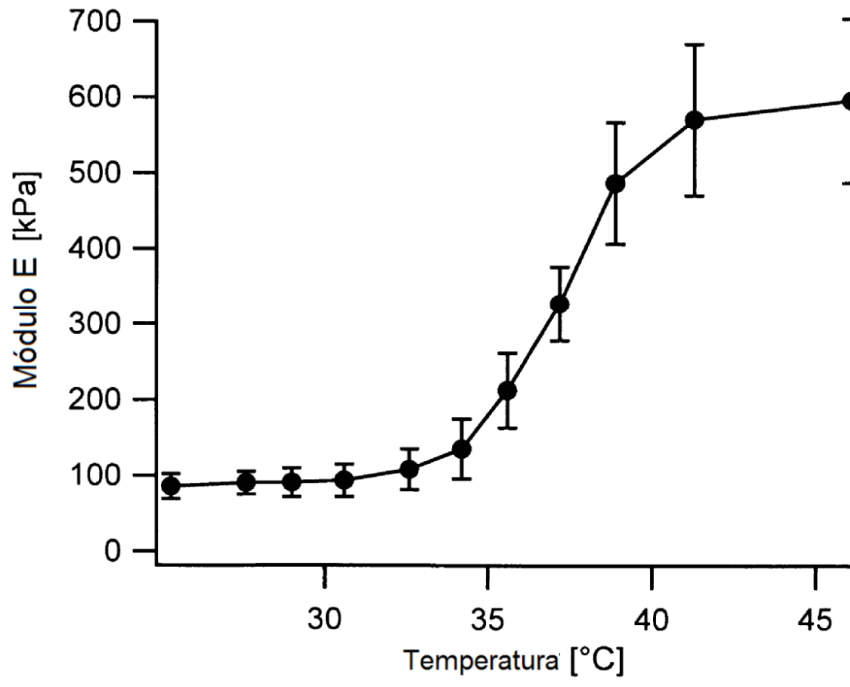


FIG. 3

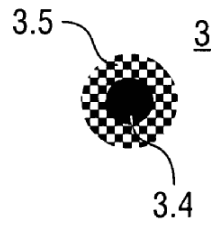


FIG. 4

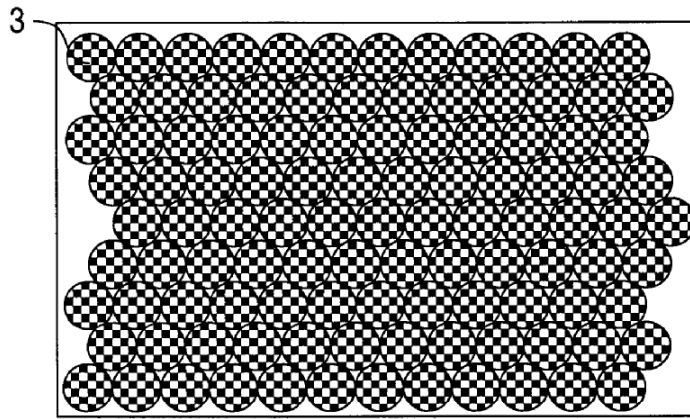


FIG. 5

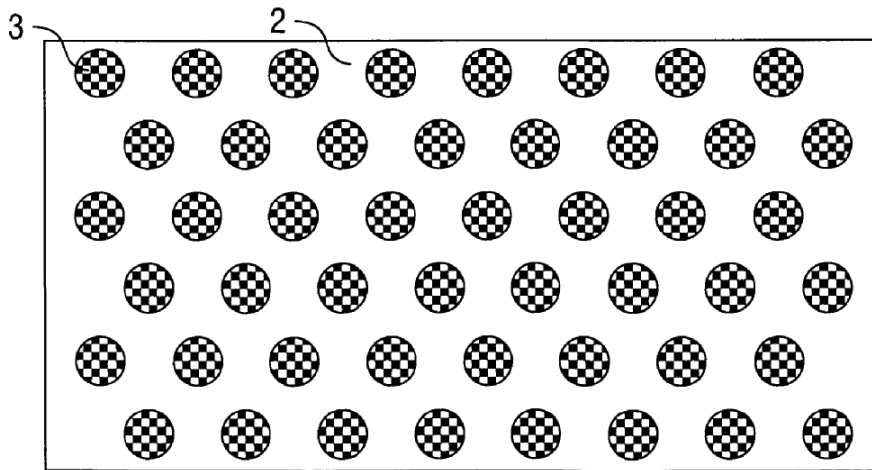


FIG. 6

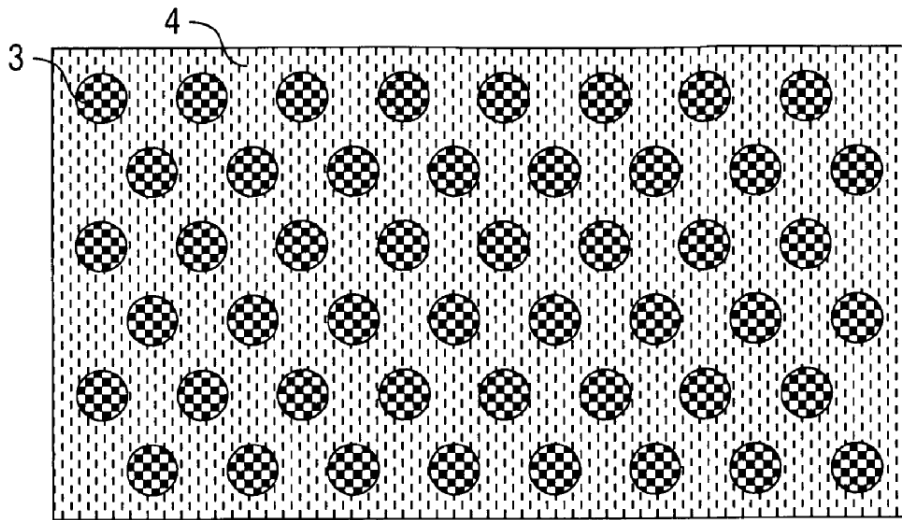


FIG. 7

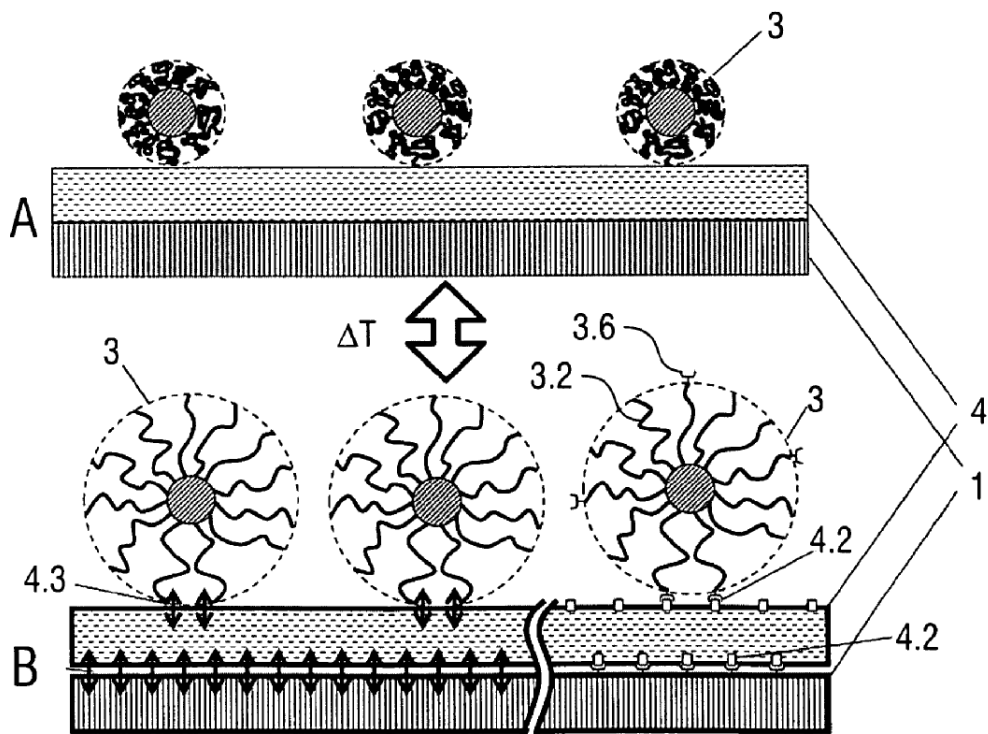


FIG. 8

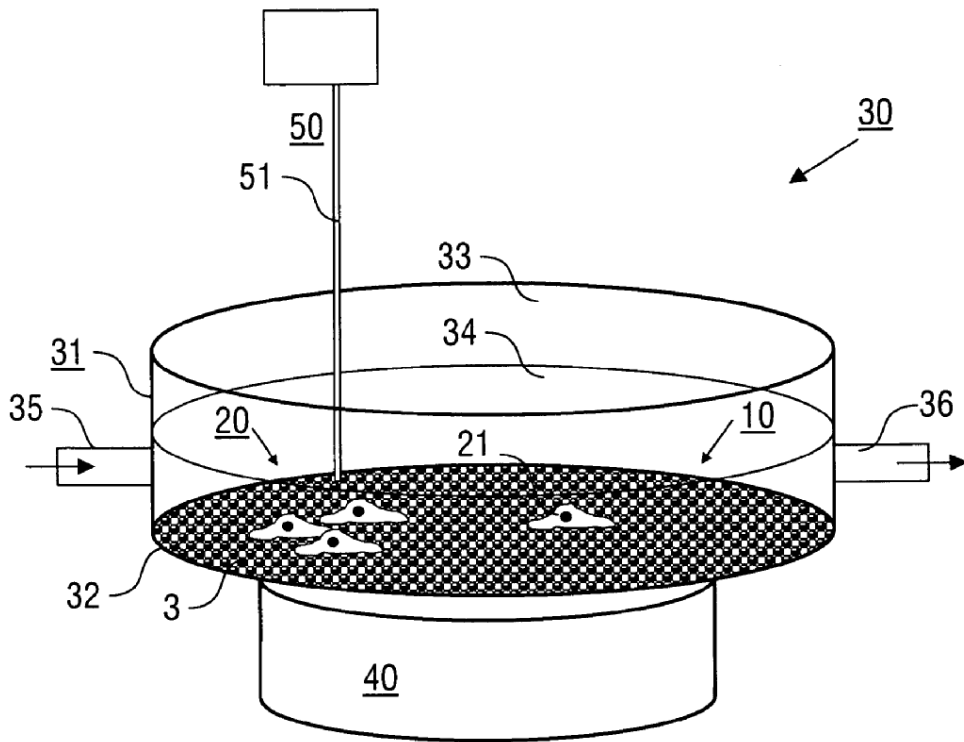


FIG. 9

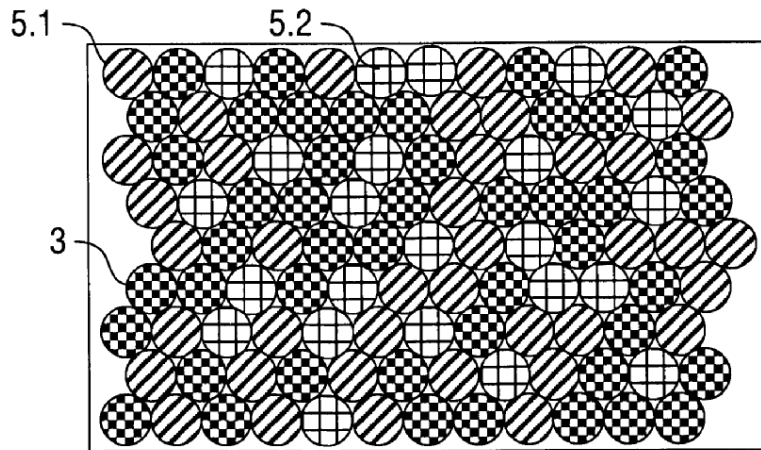


FIG. 10

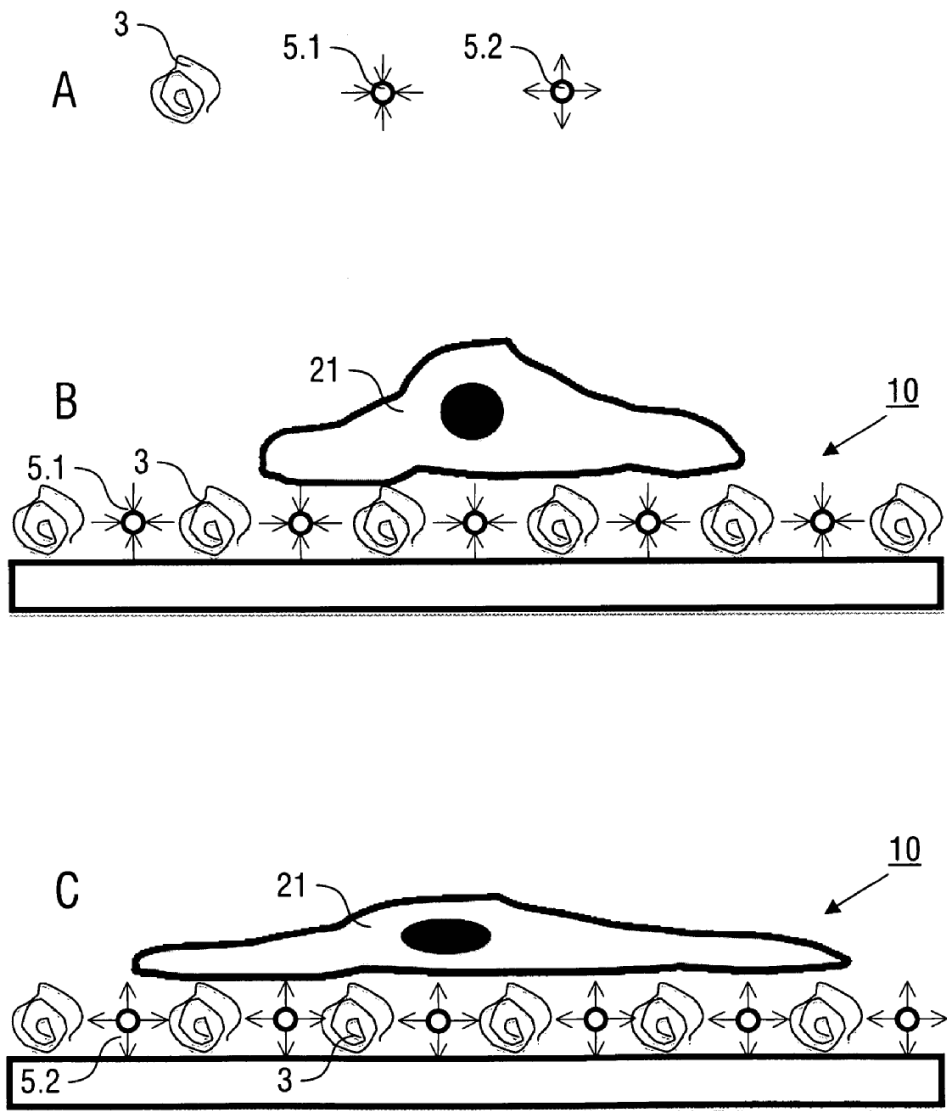


FIG. 11

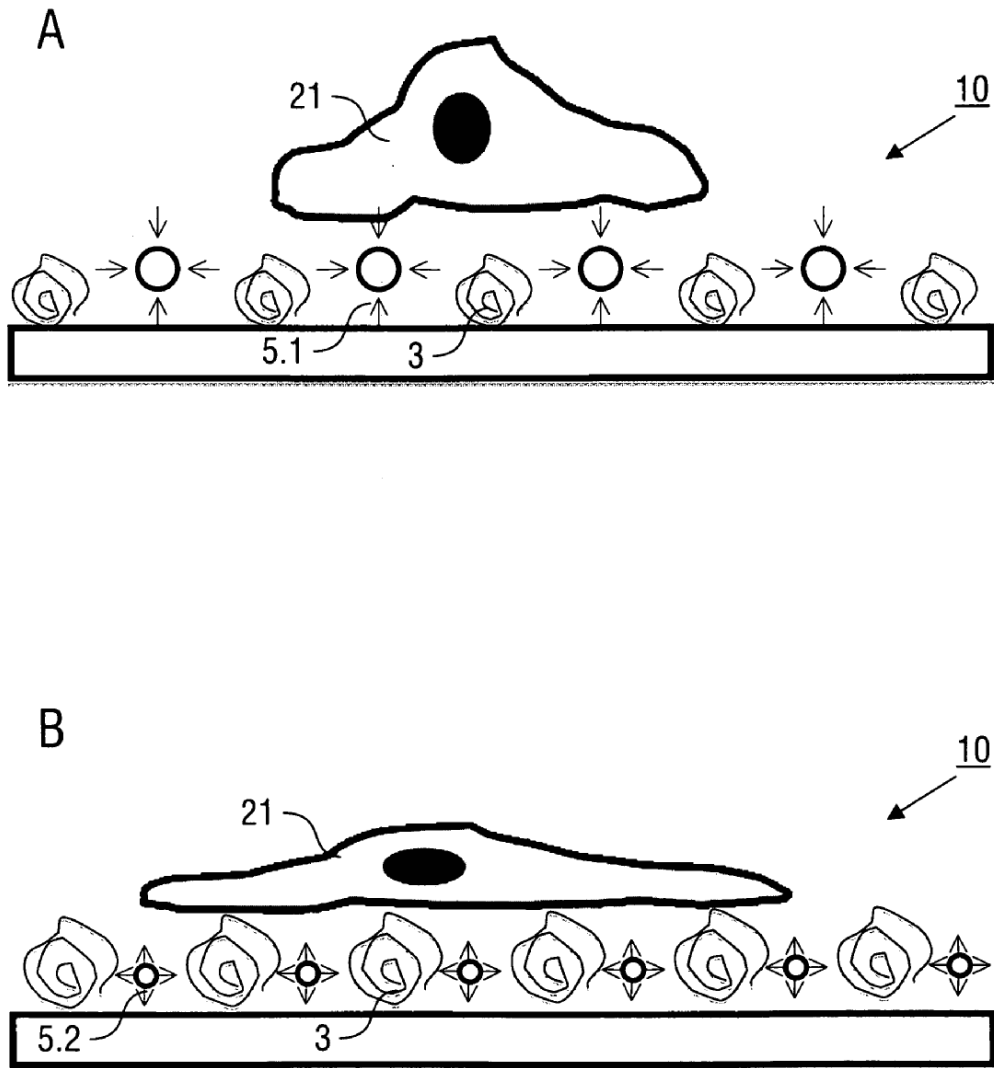


FIG. 12

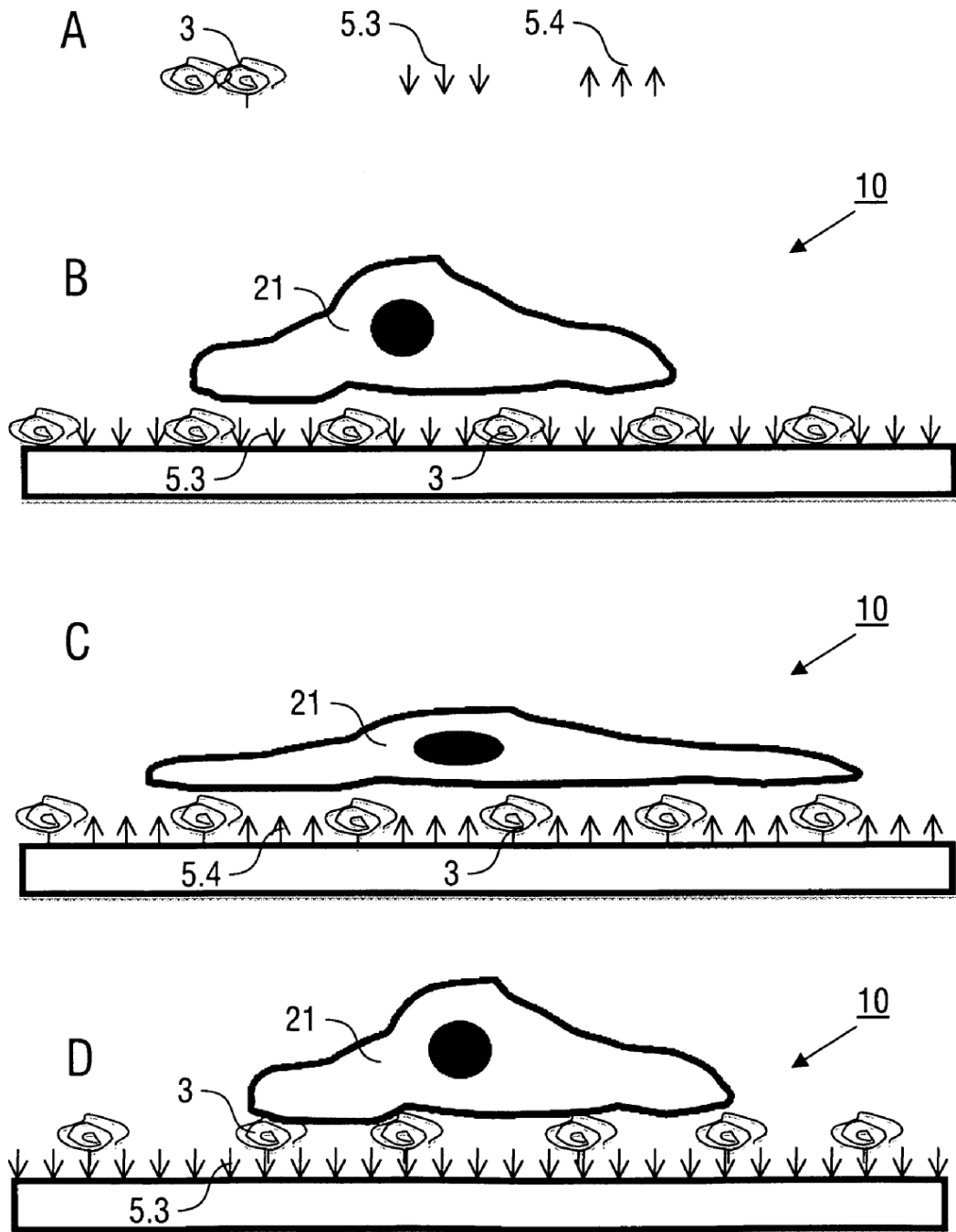
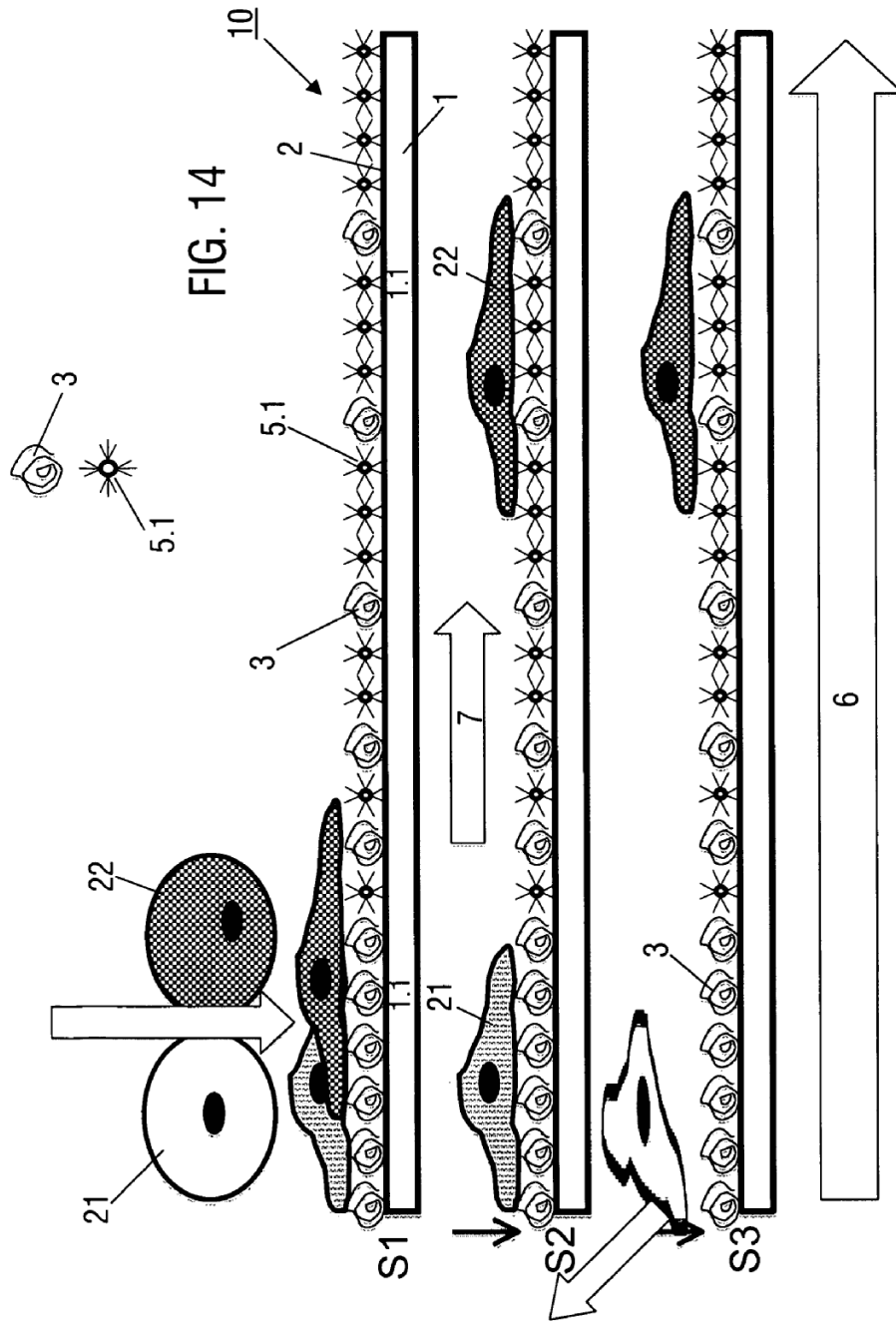
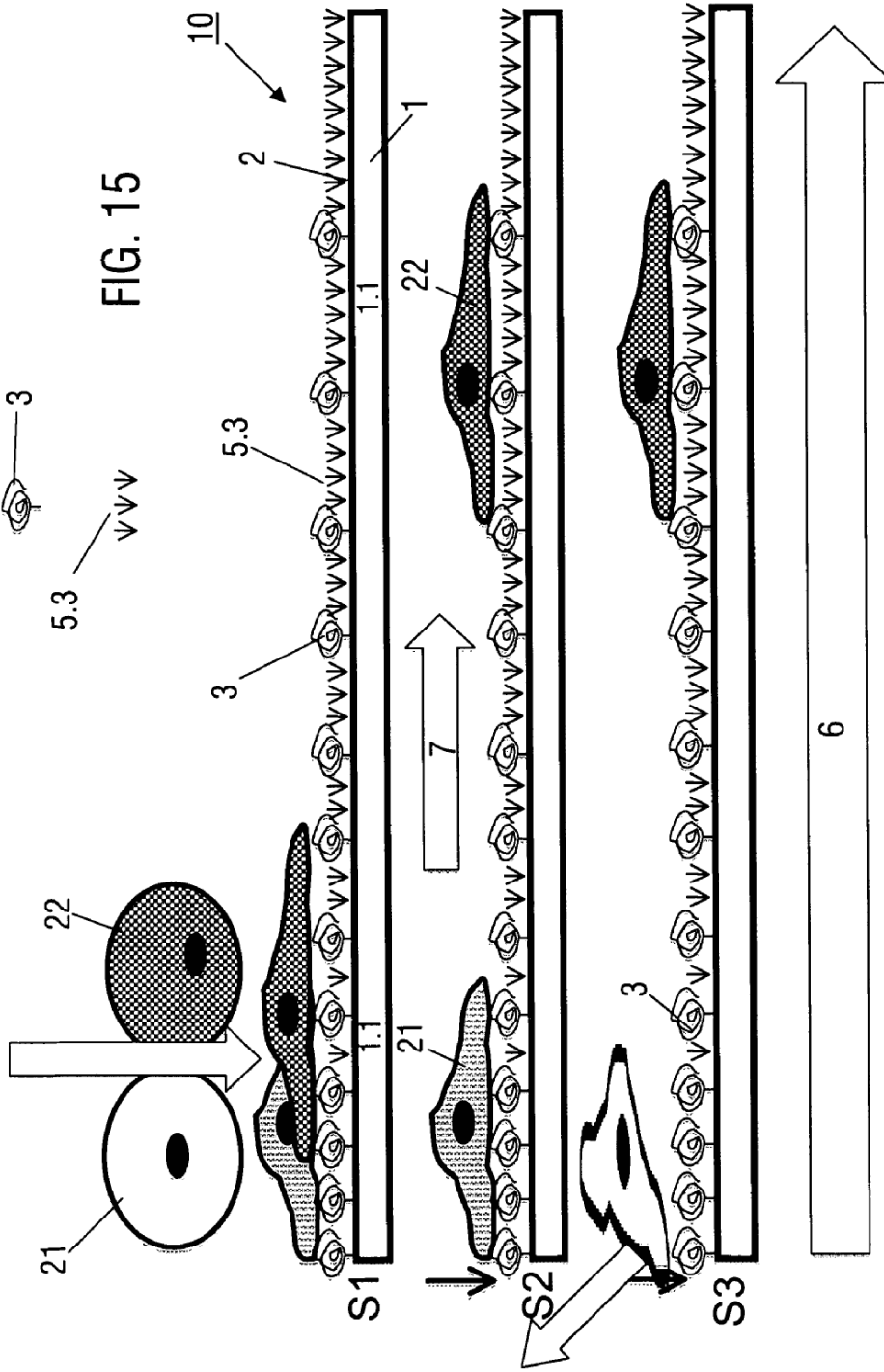
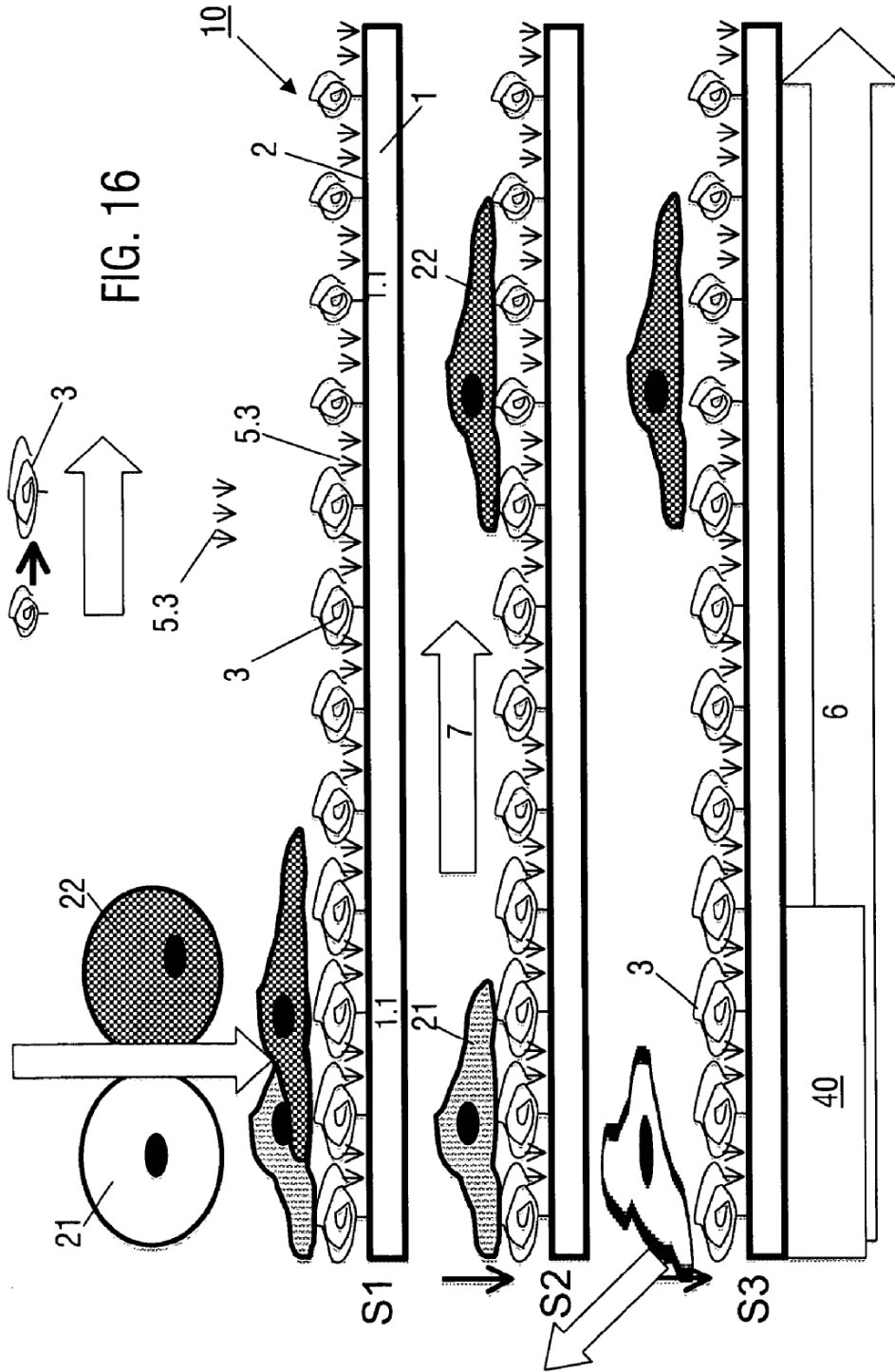
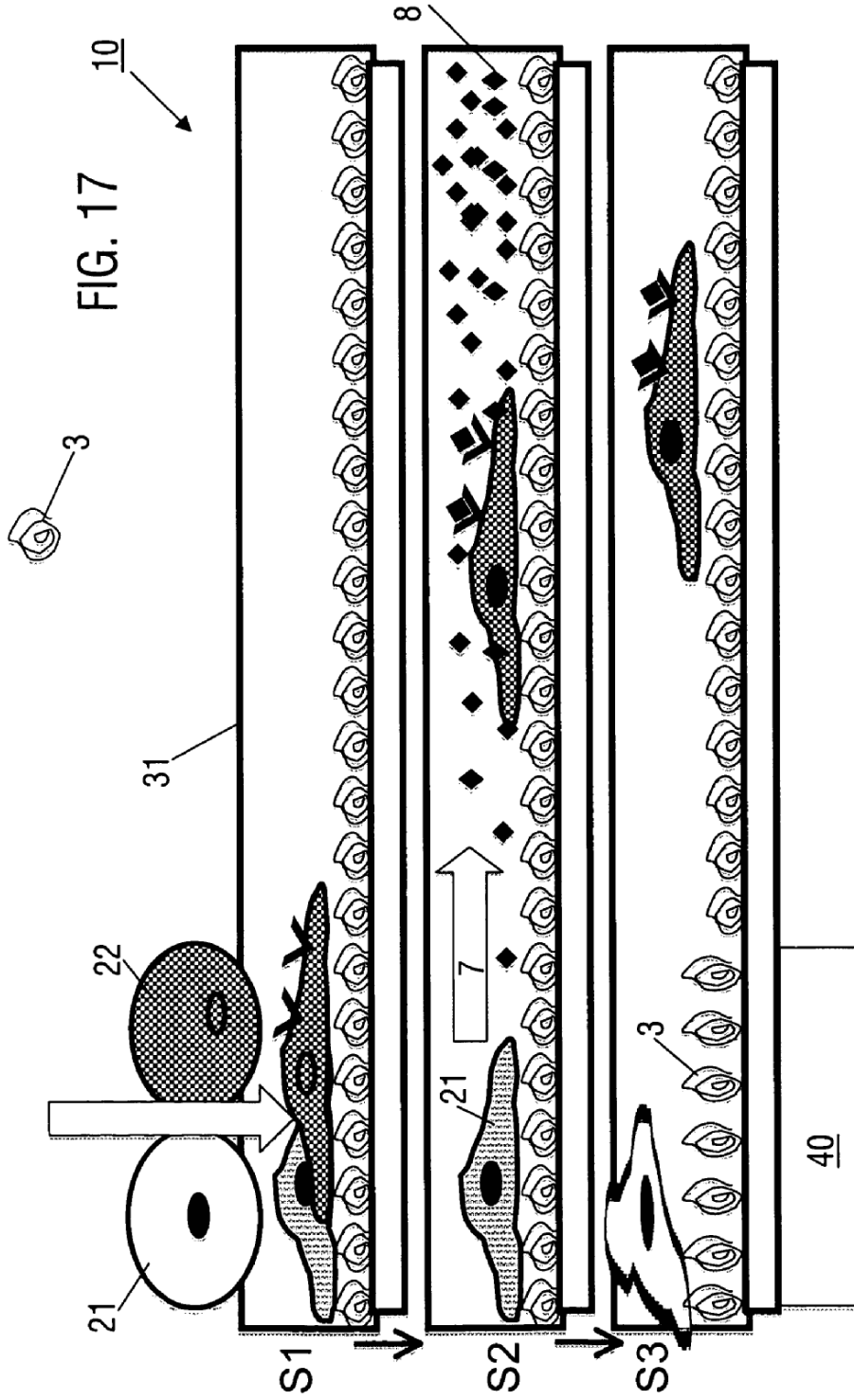


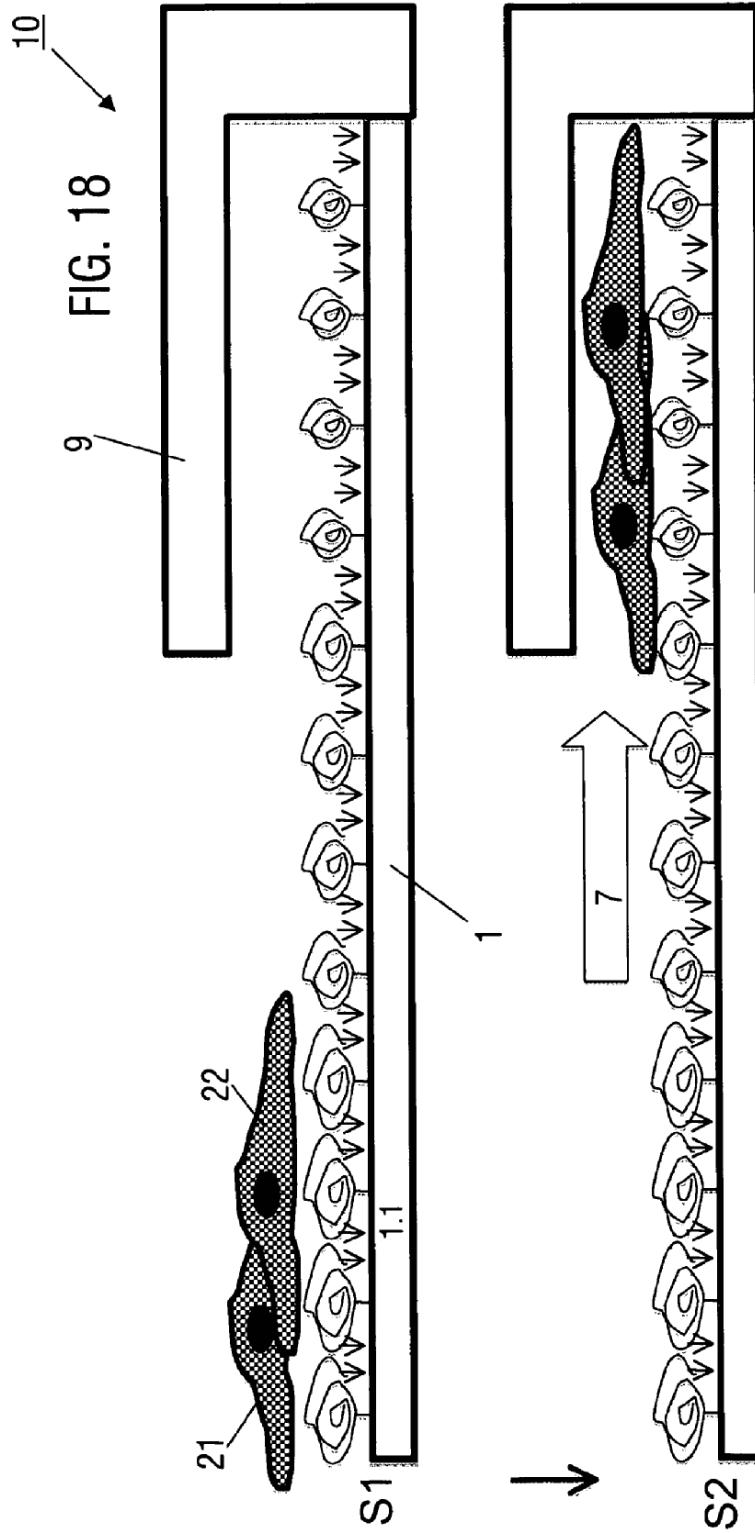
FIG. 13











REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2004011669 A [0006]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- DISCHER et al. *Cell*, 2006, vol. 126, 677-689 [0003]
- N. YAMADA et al. *Makromol. Chem.*, 1990, vol. 11, 571 [0005]
- C. WILLIAMS et al. *Adv. Mater.*, 2009, vol. 21, 2161-2164 [0005]
- O. ERNST et al. *Lab Chip*, 2007, vol. 7, 1322 [0005]
- E. WISCHERHOFF et al. *Angew. Chem.*, 2008, vol. 47, 5666 [0005]
- M. ANDERSSON ; S.L. MAUNU. *J. Poly. Sci.*, 2006, vol. B 44, 3305 [0026]
- X. WU et al. *Coll. Poly. Sci.*, 1994, vol. 272, 467 [0026]
- BEISPIEL SCHULLER. *Kolloid Z. Z. Polym.*, 1966, vol. 211, 113-121 [0028]
- FULDA et al. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 1996, vol. 101, 178-183 [0028]
- GAO et al. *Macromolecules*, 2006, vol. 39, 3154-3160 [0028]
- HELLWEG et al. *Langmuir*, 2004, vol. 20, 4330 [0056]
- FERNÁNDEZ-BARBERO et al. *Phys Rev*, 2002, vol. E 66, 051803, , 1-10 [0056]
- SPINKE et al. *J. Chem. Phys.*, 1993, vol. 99, 7012 [0060]
- HONG et al. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 1993, vol. 93, 98 [0060]
- ZAO et al. *Electroanal.*, 2006, vol. 18, 1737 [0060]
- C.S. CHEN et al. *Science*, 1997, vol. 276, 1425 [0073]
- U. JOOS et al. *Eur. J. Cell Bio.*, 2006, vol. 85, 225 [0073]
- DAVID T. SCADDEN. *Nature*, 2006, vol. 441, 1075 [0084]
- M.C. DUSSEILLER et al. *Biointerphases*, 2006, vol. 1, 1 [0084]