

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
19 de julio de 2018 (19.07.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/130739 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C08F 26/06 (2006.01) C08J 7/04 (2006.01)
C08F 26/10 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070029

(22) Fecha de presentación internacional:

16 de enero de 2018 (16.01.2018)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201730039 16 de enero de 2017 (16.01.2017) ES

(71) Solicitantes: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano 117, 28006 Madrid (ES). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; C/ Donoso Cortés, nº 65, 1º, 28015 Madrid (ES).

(72) Inventores: GALLARDO RUIZ, Alberto; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Serrano 117, 28006 Madrid (ES). RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Juan; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Serrano 117, 28006 Madrid (ES). REINECKE, Helmut; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Serrano 117, 28006 Madrid (ES). ELVIRA PUJALTE, Carlos; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Serrano 117, 28006 Madrid (ES). GARCÍA SÁNCHEZ, Carolina; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Serrano 117, 28006 Madrid (ES). PÉREZ OJEDA, María Eugenia; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Serrano 117, 28006 Madrid (ES). MARTÍNEZ CAMPOS, Enrique; Universidad Complutense de Madrid, C/ Donoso Cortés, nº 65, 1º, 28015 Madrid (ES). SANTOS COQUILLAT, Ana María; Universidad Complutense de Madrid, C/ Donoso Cortés, nº 65, 1º, 28015 Madrid (ES). CIVANTOS FERNÁNDEZ, Ana; Universidad Complutense de Madrid, C/ Donoso Cortés, nº 65, 1º, 28015 Madrid (ES).

(74) Mandatario: CUETO PRIEDE, Sénida; C/ Los Madroños 23, 28891 Velilla de San Antonio (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: VINYL-LACTAM-BASED HYDROGEL COATINGS

(54) Título: RECUBRIMIENTOS TIPO HIDROGEL EN BASE VINIL-LACTAMAS

(57) Abstract: The invention relates to a material formed by a polymer substrate and a hydrogel based on vinyl-lactams and ionic methacrylates. The invention also relates to a method for producing this material and to the use thereof for cell culture and cell monolayer engineering, for preparing 3D scaffolds and manufacturing thermosensitive mechanical actuators.

(57) Resumen: La invención se refiere a un material formado por un sustrato polimérico y un hidrogel basado en vinil-lactamas y metacrilatos iónicos. La invención se refiere también al procedimiento para obtener el material mencionado y a su aplicación para el cultivo de células / ingeniería de monocapas celulares, así como a la preparación de andamiajes 3D ya la fabricación de actuadores mecánicos termosensibles.



WO 2018/130739 A1

RECUBRIMIENTOS TIPO HIDROGEL EN BASE VINIL-LACTAMAS

CAMPO DE LA TÉCNICA

La invención se refiere a un producto que comprende un sustrato polimérico y un
5 recubrimiento tipo hidrogel basado en vinil-lactamas, con o sin metacrilatos,
recubrimiento que ha sido anclado al sustrato polimérico. Entre el sustrato y el
hidrogel se ha formado una interfase híbrida como resultado de la difusión de moléculas
precursoras del hidrogel en las capas externas del sustrato polimérico. Mediante el
control de los parámetros experimentales, el hidrogel formado sobre el sustrato puede
10 bien permanecer íntegro o bien despegarse parcialmente dejando la interfase híbrida,
es decir, dando lugar a un sustrato funcionalizado superficialmente que puede estar
estructurado en dicha superficie mediante la formación de arrugas u otras texturas. Esta
invención se refiere asimismo a la aplicación de estos materiales como soportes para
cultivo celular e ingeniería de láminas celulares (monocapas), preparación de
15 andamiajes 3D y la fabricación de actuadores mecánicos termosensibles.

ESTADO DEL ARTE

El uso de materiales polímeros tales como los sustratos termosensibles en base a poli-
20 *N*-isopropilacrilamida (*pNIPAm*), capaces de, en primer lugar, albergar células hasta
confluencia y, en segundo, permitir el despegado de las células o las monocapas
celulares mediante un estímulo térmico (bajada de temperatura) ha surgido como una
aproximación potencialmente viable en manipulación celular. Este tipo de sustratos
termosensibles son a día de hoy comerciales (UpCell™). Una vez que el crecimiento
25 celular ha alcanzado el nivel deseado de confluencia, una monocapa ó lámina celular
puede ser despegada simplemente mediante una disminución de la temperatura a
temperatura ambiente (es decir, por debajo de la temperatura crítica inferior de
disolución ó *lower critical solution temperature*, LSCT). Esta aproximación de
despegado celular es una forma de recolección celular no destructiva y más moderada
30 que los métodos tradicionales, los cuales requieren de forma casi imprescindible del
uso de enzimas proteolíticas agresivas (generalmente tripsina) o de raspado celular.
Estas técnicas pueden dañar las células recolectadas ya que pueden causar disrupción
de la membrana celular y destruir la matriz extracelular. Esta disrupción constituye una
deficiencia significativa en estas aproximaciones de desagregación celular, y por ello,
35 métodos de despegados alternativos más moderados son deseables.

Por ello, sigue siendo necesario el desarrollo de otras alternativas para dicho despegado suave de células y láminas celulares. Un polímero termosensible alternativo al *pNIPAm* es la poli-vinilcaprolactama (*pVCL*), que es biocompatible y tiene una LCST similar a la del *pNIPAm* (también en un rango de temperaturas fisiológicamente relevante). Sin embargo, se han descrito pocos soportes útiles en recolección celular en base *pVCL*. Lee y col. (*Acta biomaterialia*; 2013; **9**(8): 7691-7698) describieron la preparación de filmes finos de *pVCL* (de unos 50 nm) sobre sustratos tejidos de Nylon, usando técnicas de deposición química en fase vapor, y obtuvieron despegado celular parcial. Yang y col. describieron otro ejemplo (*Polymer Chemistry*; 2015; **6**(18): 3431-3442) en el que prepararon hidrogeles independientes de *VCL* con un metacrilato zwitteriónico, los cuales fueron capaces de despegar células mediante descenso de temperatura.

Soportes tipo hidrogel para manipulación celular en base vinil-pirrolidona –VP–, un componente análogo a *VCL* pero no termosensible, han sido descritos recientemente. En concreto, se ha descrito la preparación de una familia de hidrogeles no termosensibles derivados de VP y con estructura de pseudo-redes dobles (pseudo-DN, en referencia al término inglés *double network*) capaz de albergar células hasta confluencia y permitir posteriormente un rápido despegado o trasplante de la lámina celular mediante una simple agitación mecánica, sin necesidad de superestrato (una lámina extra que se requiere como soporte intermedio para trasplantar células en el producto comercial) (*Journal of Materials Chemistry B*; 2014; **2**(24): 3839-3848). El término pseudo-red doble hace referencia a la tendencia estructural de estas redes a formar redes dobles (DNs), que se definen como redes interpenetradas (IPNs) constituidas por dos redes con alta asimetría en densidad de entrecruzamiento. Los mencionados hidrogeles están constituidos por VP y por diferentes metacrilatos iónicos *M*: aniónico ($M-SO_3^-$), catiónico ($M-N^+$), zwitterión tipo sulfobetaina ($M-N^+-SO_3^-$), zwitterión tipo fosforilcolina ($M-PO_3^-N^+$), o formulaciones pseudo-zwitteriónicas (cantidades estequiométricas de $M-SO_3^-$ y $M-N^+$). Todos estos hidrogeles fueron robustos a pesar de su alto contenido en agua (alrededor de 90 % de agua en el estado en equilibrio). Se encontró que todos los hidrogeles iónicos fueron superiores en adhesión y proliferación celular al control sin componente iónico (sin *M*), lo cual está de acuerdo con la conocida naturaleza antiadhesiva y antiincrustante de *PVP* y de otros polímeros neutros y solubles en agua (PEO (polióxido de etileno), etc.).

Las modificaciones superficiales químicas y topográficas de polímeros robustos mecánicamente pueden modular su interacción con el ambiente a la vez que se mantienen las propiedades mecánicas del bloque. Este hecho parece ser especialmente relevante en campos como la tribología o la medicina, en los que se buscan propiedades resistentes con propiedades superficiales (tanto químicas como topográficas) a medida. Por una parte, la funcionalización de soportes hidrofóbicos para dotarles de características superficiales hidrofílicas es actualmente un requerimiento para ciertas aplicaciones biomédicas. Por otra, superficies arrugadas han encontrado aplicación en múltiples áreas como su uso como plantillas para crear formaciones superficiales ordenadas, o en la fabricación de componentes electrónicos flexibles, o en el diseño de superficies con mojabilidad y propiedades de adhesión/fricción controladas. Además, es importante señalar que soportar los mencionados hidrogeles en forma de recubrimiento sobre materiales mecánicamente robustos, como Nylon o policarbonato, puede mejorar significativamente la manipulación de la capa activa de hidrogel, ya que el soporte del hidrogel puede ser grapado, cosido, fundido, etc., y por lo tanto puede permitir formar constructos complejos. El hidrogel puede incluso ser secado y rehidratado, lo cual es ventajoso en términos de almacenamiento en condiciones limpias y de entrega. Finalmente, estas plataformas pueden ser de interés en campos que requieran de ingeniería de láminas celulares, como el trasplante de tejidos en áreas quemadas o de córnea, ejemplos en los que se puede mejorar el proceso de regeneración tisular.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La expresión “basado en” se debe entender como “formado por” o bien “formado a partir de”, es decir que los constituyentes del producto al que se hace referencia, pueden no estar en el estado inicial en el cual se utilizaron para obtener dicho producto.

La expresión “tipo” o “del tipo” se debe entender como “similar a”, o que comprende un grupo funcional determinado, por ejemplo: “tipo vinil-lactama” se debe interpretar como que incluye al menos un grupo funcional lactama, e incluye cualquier vinil-lactama.

El término “gradiente” se refiere a “gradiente de concentración” y tiene el significado habitual: variación de la concentración tanto del substrato polimérico, como de la red de hidrogel en la interfase.

El término interfase tiene el significado habitual, tal como lo define la IUPAC: la región espacial no homogénea, intermedia, entre dos fases masivas en contacto, y donde las propiedades son significativamente diferentes de, pero relacionadas con, las propiedades de las fases masivas.

El término “rugosidades” se refiere en esta memoria y en esta tecnología a protuberancias que se forman en un material que originalmente era plano (como el caso del poliestireno) y dichas protuberancias son micrométricas y no conforman ninguna estructura.

El término “arrugas” se refiere a lo que en el lenguaje común se llama arrugas, y que tienen picos y valles, confieren una estructura al material y son mayores que las rugosidades. Las arrugas en este caso son por tanto patrones que se han observado sobre PC y sobre PMMA con alternancia de valles y picos simulando una arruga en la piel. Mientras que en el caso del PS no se forman arrugas sino que el sustrato (que era plano originalmente) aumenta su rugosidad debido a la capa de hidrogel.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un producto que comprende:

- a) un sustrato polimérico y
- b) un hidrogel basado en monómeros tipo vinil-lactama, sin metacrilatos o con metacrilatos iónicos, y al menos dos entrecruzantes,

caracterizado porque hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel, formando ambos una red semi-interpenetrada,

El hidrogel forma una red polimérica, y por esta razón en esta memoria en algunas ocasiones se hace referencia a la “red de hidrogel”.

Red *semi-interpenetrada* significa que el hidrogel recubre el sustrato polimérico de forma estable a través de la formación de una capa híbrida entre sustrato e hidrogel, interfase en la que ambas estructuras coexisten formando una estructura integrada en forma de red semi-interpenetrada (semi-IPN). Esta interfase tipo red semi-IPN comprende la red polimérica constitutiva del hidrogel y las cadenas macromoleculares del sustrato polimérico, y se caracteriza por una penetración a escala molecular de dichas cadenas en la mencionada red.

Realizaciones particulares se refieren a un producto que comprende:

a) un sustrato polimérico y

5 b) un hidrogel basado en monómeros tipo vinil-lactama, sin metacrilatos, en el que la vinil-lactama es vinil-caprolactama, el sustrato polimérico es nylon, y dos entrecruzantes que son dimetacrilato de etilenglicol (C1) y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona (C2),

o

a) un sustrato polimérico y

10 b) un hidrogel basado en monómeros tipo vinil-lactama, con metacrilatos iónicos, y al menos dos entrecruzantes,

caracterizado porque hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una estructura de red semi-interpenetrada.

15

El sustrato polimérico puede ser cualquier sustrato polimérico termoplástico.

En un ejemplo preferido, el sustrato polimérico se selecciona de poliestireno (PS), polimetacrilato de metilo (PMMA), nylon, policarbonato (PC), PVC (policloruro de vinilo),
20 poliácido láctico (PLA) o policaprolactona (PCL). En un ejemplo más preferido, el sustrato polimérico es nylon, poliestireno o policarbonato. En un ejemplo aún más preferido, el sustrato polimérico es poliestireno.

En otro ejemplo particular, la vinil-lactama es seleccionada de vinil-caprolactama o vinil-
25 pirrolidona. En un ejemplo más preferido, la vinil-lactama es vinil-caprolactama.

En un ejemplo particular, la relación molar vinil-lactama/metacrilato iónico está en el intervalo 2/1 a 100/1. En un ejemplo más preferido la relación está en el intervalo 6/1 a 12/1.

30

En un ejemplo particular, el metacrilato iónico es un metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquill]trimetilamonio, metacrilatos de dimetilaminoetilo y dietilaminoetilo.

En otro ejemplo particular, el metacrilato iónico es un metacrilato zwitteriónico seleccionado de metacrililoiloxietil fosforilcolina o hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio.

- 5 En otro ejemplo particular, el metacrilato iónico es un metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo.

En otro ejemplo particular, el metacrilato iónico es una mezcla de metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo (por ejemplo, la sal potásica del sulfopropil metacrilato) y de metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacrililoiloxi)alquill]trimetilamonio.

En un ejemplo preferido, los entrecruzantes son seleccionados de etilenglicol di(met)acrilato, trietilenglicol di(met)acrilato, tetraetilenglicol glicol di(met)acrilato, trimetilolpropano tri(met)acrilato, bisfenol A di(met)acrilato, etoxilato bisfenol A di(met)acrilato, pentaeritritol tri-, and tetra(met)acrilato, tetrametileno di(met)acrilato, metilenbisacrilamida, metacrililoiloxietil vinil carbonato, trialilcianurato, metacrililoiloxietil vinil urea, divinil benceno, dialil itaconato, alil metacrilato, dialil phthalato, polisiloxanilbisalquil (met)acrilato, polietilen glicol di(met)acrilato, vinil-metacrilato, divinil-adipato, derivados de divinil-pirrolidona, 1,3-divinilimidazolin-2-ona o combinaciones de los anteriores.

En un ejemplo más preferido, se usan los entrecruzantes: etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

En un ejemplo preferido, se usan concentraciones de cada uno de los entrecruzantes en el intervalo 0.1-10 % molar (con respecto a los moles de monómeros totales).

En un ejemplo aún más preferido, se usan concentraciones totales de los entrecruzantes en el intervalo 1.6-2 % molar (con respecto a los moles de monómeros totales).

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener el producto descrito anteriormente, donde el procedimiento comprende al menos las siguientes etapas:

- a) mezcla de los monómeros precursores del hidrogel, el derivado de vinil-lactama, el metacrilato iónico, si está presente, y al menos dos entrecruzantes con un fotoiniciador y, opcionalmente, disolvente,

- b) deposición de la mezcla de (a) en la superficie del sustrato polimérico e inducción de la fotopolimerización bajo radiación UV e
- c) hinchamiento del producto obtenido en (b) mediante su inmersión en agua o en etanol.

5 El disolvente puede ser agua, disolventes orgánicos tales como alcoholes, mezclas de agua y alcoholes. Entre los alcoholes se puede usar por ejemplo, metanol, etanol, propanol, o mezclas. Según realizaciones particulares el disolvente es agua.

En un ejemplo preferido, el sustrato polimérico se selecciona de poliestireno (PS), polimetacrilato de metilo (PMMA), nylon, policarbonato (PC), PVC (policloruro de vinilo),
10 poliácido láctico (PLA) o policaprolactona (PCL). En un ejemplo más preferido, el sustrato polimérico es nylon, poliestireno o policarbonato.

En otro ejemplo preferido, la vinil-lactama es seleccionada de vinil-caprolactama o vinil-pirrolidona. En un ejemplo más preferido, la vinil-lactama es vinil-caprolactama.

En un ejemplo particular, el metacrilato iónico es un metacrilato catiónico seleccionado
15 de sales de [2-(metacrililoiloxi)alquil]trimetilamonio.

En otro ejemplo particular, el metacrilato iónico es un metacrilato zwitteriónico seleccionado de metacrililoxietyl fosforilcolina, hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio.

En otro ejemplo particular, el metacrilato iónico es un metacrilato aniónico seleccionado
20 de sales de metacrilatos de sulfoalquilo.

En otro ejemplo particular, el metacrilato iónico es una mezcla de metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo y de metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacrililoiloxi)alquil]trimetilamonio.

En un ejemplo preferido, los entrecruzantes son seleccionados de etilenglicol
25 di(met)acrilato, trietilenglicol di(met)acrilato, tetraetilenglicol glicol di(met)acrilato, trimetilolpropano tri(met)acrilato, bisfenol A di(met)acrilato, etoxilato bisfenol A di(met)acrilato, pentaeritritol tri-, and tetra(met)acrilato, tetrametileno di(met)acrilato, metilenbisacrilamida, metacriloxietil vinil carbonato, trialilcianurato, metacriloxietil vinil urea, divinil benceno, dialil itaconato, alil metacrilato, dialil phthalato,
30 polisiloxanilbisalquil (met)acrilato, polietilen glicol di(met)acrilato, vinil-metacrilato, divinil-adipato, derivados de divinil-pirrolidona, 1,3-divinilimidazolin-2-ona o combinaciones de los anteriores.

En un ejemplo se usan cómo entrecruzantes, por ejemplo etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

En otro ejemplo particular, la radiación UV se mantiene entre 0.1 y 60 minutos. En un ejemplo preferido la radiación se mantiene entre 10 y 60 minutos, y en un ejemplo más preferido, la radiación UV se mantiene 40 minutos.

La presente invención se refiere según realizaciones particulares a un producto que comprende:

- a) un sustrato polimérico seleccionado entre poliestireno, polimetacrilato de metilo, nylon, policarbonato, policloruro de vinilo, poliácido láctico o policaprolactona y
 - b) un hidrogel basado en monómeros de tipo vinil-lactama, sin metacrilatos, o con metacrilatos iónicos y dos entrecruzantes,
- en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

La presente invención se refiere según realizaciones particulares adicionales, a un producto que comprende:

- a) un sustrato polimérico y
 - b) un hidrogel basado en:
 - monómeros de vinil-caprolactama o vinil-pirrolidona, sin metacrilatos, o
 - monómeros de vinil-caprolactama o vinil-pirrolidona con metacrilatos iónicos
- y al menos dos entrecruzantes,
- en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

La presente invención se refiere según realizaciones particulares adicionales, a un producto que comprende:

- a) un sustrato polimérico seleccionado entre poliestireno, polimetacrilato de metilo, nylon, policarbonato, policloruro de vinilo, poliácido láctico o policaprolactona y

b) un hidrogel basado en monómeros de tipo vinil-lactama, metacrilatos iónicos seleccionados entre:

- 5 - un metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquill]trimetilamonio, metacrilatos de dimetilaminoetilo y dietilaminoetilo,
 - un metacrilato zwitteriónico seleccionado de metacriloiloxietil fosforilcolina, hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio metacrilato,
 - 10 - un metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo, y
 - una mezcla de metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo y de metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquill]trimetilamonio,
- y al menos dos entrecruzantes,

15 en el que hay una interfase entre el substrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del substrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

20 La presente invención se refiere según realizaciones particulares adicionales, a un producto que comprende:

- a) un substrato polimérico seleccionado entre poliestireno, polimetacrilato de metilo, nylon, policarbonato, policloruro de vinilo, poliácido láctico o policaprolactona y
 - b) un hidrogel basado en monómeros de tipo vinil-lactama, con metacrilatos iónicos seleccionado entre:
- 25 - un metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquill]trimetilamonio, metacrilatos de dimetilaminoetilo y dietilaminoetilo,
 - un metacrilato zwitteriónico seleccionado de metacriloiloxietil fosforilcolina, hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio metacrilato,
 - 30 - un metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo, y
 - una mezcla de metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo y de metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquill]trimetilamonio,

y al menos dos entrecruzantes que son etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

5 en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

La presente invención se refiere según realizaciones particulares adicionales, a un producto que comprende:

- 10 a) un sustrato polimérico seleccionado entre policarbonato, ó nylon y
b) un hidrogel basado en monómeros de vinipirrolidona (VP) o vinilcaprolactama, con metacrilatos iónicos seleccionado entre: sulfopropilmetacrilato de potasio ($M-SO_3^-$), cloruro de [2- (metacriloiloxi) etil] trimetilamonio ($(M-N^+)$), hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio ($M-N^+-SO_3^-$), 2-metacriloiloxietil fosforilcolina ($M-PO_3^-N^+$), o una mezcla de $M-SO_3^-$ y $M-N^+$) y al
15 menos dos entrecruzantes que son etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

20

La presente invención se refiere según realizaciones particulares adicionales, a un producto que comprende:

- a) un sustrato polimérico seleccionado entre poliestireno y poliácido láctico
25 b) un hidrogel basado en monómeros de vinipirrolidona (VP) o vinilcaprolactama, y al menos dos entrecruzantes que son etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

30

La presente invención se refiere según realizaciones particulares adicionales, a un producto que comprende:

- b) un sustrato polimérico que es nylon y
b) un hidrogel basado en monómeros de vinilcaprolactama (VCL)

y dos entrecruzantes que son dimetacrilato de etilenglicol (C1) y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona (C2),

5 en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

La presente invención se refiere según realizaciones particulares adicionales, a un producto que comprende:

- 10 a) un sustrato polimérico que es policarbonato y
b) un hidrogel basado en monómeros de vinilpirrolidona (VP), con sulfopropilmetacrilato de potasio (M-SO₃) y dos entrecruzantes que son etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

15 en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada-.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del material descrito arriba para obtener materiales para cultivo celular.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del material descrito arriba para el recubrimiento de objetos 3D. Preferiblemente se refiere al uso del material descrito arriba para el recubrimiento de objetos 3D para la fabricación de andamiajes.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del material descrito arriba para la fabricación de actuadores mecánicos termosensibles.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener materiales para cultivo celular que comprende depositar células sobre un soporte constituido por el producto de la presente invención, y hacerlas crecer sobre toda la superficie del producto.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para el recubrimiento de objetos 3D que comprende preparar un hidrogel sobre la superficie de un objeto 3D. Preferiblemente se refiere el método es apropiado para el recubrimiento de objetos 3D para la fabricación de andamiajes.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la fabricación de actuadores mecánicos termosensibles que comprende recubrir un sustrato flexible con un recubrimiento termosensible-

A no ser que se diga lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende uno de los expertos en la técnica al que pertenece esta invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, pueden usarse en la práctica en la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos e ilustraciones se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Esquema del molde usado para preparar el producto, en la que las referencias significan:

- 1 Molde
- 2 Cubierta
- 3 Mezcla
- 4 Espaciador
- 5 Substrato
- 6 Substrato recubierto de hidrogel
- 7 Hidrogel

FIG. 2. Las fotografías indican los cambios ópticos asociados a la VPTT (temperatura de transición de fase de volumen). A temperaturas por encima de la VPTT (imagen izquierda), la red polimérica está colapsada y presenta un aspecto blanco. Al enfriarse primero a la VPTT (imagen central) y más tarde a temperaturas por debajo de la VPTT (imagen derecha) desapareció el color blanco y se observa un recubrimiento transparente que indica una solvatación de la red polimérica.

FIG. 3. Evaluación de la formación de monocapa en el nylon revestido con hidrogel. Al enfriar de 37 a 20 °C (por debajo de VPTT) la monocapa se separa (a) y las células se trasplantan sobre una placa de cultivo. Como se evidencia a las 44h (b) y 144h (c), se puede formar una monocapa completa a partir de las células trasplantadas.

5 **FIG. 4.** Montaje para la fabricación de superficies de PC (policarbonato) modificadas con hidrogeles basados en VP, junto con imágenes de perfilometría óptica ilustrativas de películas de PC originales y de una superficie de PC arrugada obtenida tras la fotopolimerización de una solución precursora (HYD_1) colocada sobre la superficie del PC.

FIG. 5. Evolución de la topografía superficial de PC que conduce a la formación de arrugas en función del tiempo transcurrido entre el contacto de la solución HYD_1 con el sustrato PC y el inicio de la etapa de fotopolimerización: (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 10 min, (D) 20 min y (e) 30 min. W_{AMP} : amplitud de las arrugas, W_P : periodo de las arrugas.

10 **FIG. 6.** (a) Evolución morfológica de las arrugas en función de la mezcla de disolventes empleada (Tamaño de la imagen: $350\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$). Variación del periodo de las arrugas (b) y su amplitud (c) en función del tiempo de exposición de la solución de monómero al sustrato de PC. En la Tabla 1 se proporcionan las referencias de HYD.

15 **FIG. 7.** (a) Medidas de ángulo de contacto estático y (b) ángulo de contacto de avance-retroceso durante 7 ciclos en un PC tratado y no tratado. (C) Imagen de perfilometría óptica de una gotita de agua que avanza en la interfase húmeda-seca. La superficie de la PC arrugada se obtuvo tras la fotopolimerización de una solución precursora HYD_1 colocada sobre la superficie del PC con un tiempo transcurrido de 10 minutos entre el contacto y la irradiación UV.

20 **FIG. 8.** Arriba: Representación de la relación de intensidades entre las señales a $1676\ \text{cm}^{-1}$ observadas en el hidrogel y la banda a $1615\ \text{cm}^{-1}$ asignadas al PC en función de la profundidad de HYD_2 (a-e) y HYD_1 (f-j). Abajo: Evolución del espectro de Raman en función de la profundidad de HYD_2 (k) y HYD_1 (l).

25 **FIG. 9.** Formación de hidrogeles basados en VP y situaciones observadas tras el hinchamiento del hidrogel. Principalmente se observaron dos posibilidades diferentes: (a) separación de las regiones no integradas de los hidrogeles dejando una capa delgada de hidrogel encima de la superficie y (b) los hidrogeles permanecen anclados parcial o totalmente a la superficie. (c) Imágenes ópticas e imágenes ópticas 3D ilustrativas de una superficie de PC después del tratamiento (izquierda) y la superficie de hidrogel complementaria obtenida al secarse (derecha).

30

FIG 10. Crecimiento celular sobre superficies basadas en sustratos de PPMA recubiertos con hidrogeles en base VP (con tratamientos de 0, 15 y 30 minutos). En la primera línea, se puede observar el crecimiento del cultivo de células C166-GFP a 72h

de la siembra. En la segunda línea, trasplantes celulares realizados mediante inversión del material sobre plástico tratado para cultivo celular a 24h post-trasplante. En la tercera línea, cultivos en confluencia a 168h post trasplante.

5 **FIG 11.** Planchas de PS recubiertas de hidrogel termosensible en base VCL sin metacrilato. a) Recubrimiento de PS comercial grueso preparado usando un espaciador de silicona de 0.5 mm. b) Recubrimiento de PS comercial grueso preparado usando un espaciador de latón de 0.1 mm. c) Recubrimiento de PS fino preparado usando un espaciador de latón de 0.1 mm.

10 **FIG. 12.** Imágenes ópticas de la superficie de un cilindro de 3 mm de diámetro tras tratamiento con la solución que incluye vinil-pirrolidona y metacrilato de sulfopropilo potásico (relación molar 6: 1), así como agentes de entrecruzamiento de tipo metacrílico y vinílico. El cilindro se sumergió en la solución descrita anteriormente (mezcla polimerizable descrita anteriormente (monómeros, entrecruzantes, fotoiniciador y tal opcionalmente disolvente) y después de un cierto período de tiempo (0, 15 ó 30 min),
15 todo el sistema se expuso a radiación UV durante 30 minutos. A continuación, el cilindro se sumergió en etanol y el hidrogel se separó de la superficie del cilindro dejando una superficie arrugada con una fina capa superficial de hidrogel.

20 EJEMPLOS

“Molde” se le llama en estos ejemplos al conjunto de substrato polimérico + espaciador + tapa transparente.

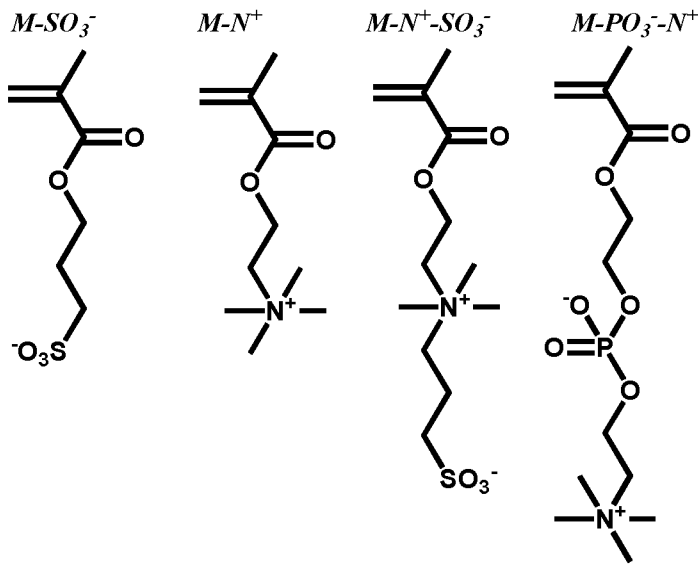
25 1. Recubrimiento de substratos planos de Nylon con hidrogeles a base de VCL y metacrilatos iónicos

Los hidrogeles se sintetizaron mediante polimerización radical convencional en una sola etapa usando agua Milli-Q, alcoholes (etanol o metanol) o mezclas agua / alcohol como disolventes. La mezcla polimerizable consistió en una disolución de vinilcaprolactama (VCL) (en el intervalo 3-9 mol/L, en este ejemplo 6 mol / L), un metacrilato iónico (en el
30 intervalo 0.5-1 mol/L, en este ejemplo 1 ó 0,5 mol/l) seleccionado entre: sulfopropilmetacrilato de potasio ($M-SO_3^-$), cloruro de [2- (metacriloiloxi) etil] trimetilamonio ($M-N^+$), hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio ($M-N^+-SO_3^-$), 2- metacriloiloxietyl fosforilcolina ($M-PO_3^-N^+$), o una mezcla de $M-SO_3^-$ y $M-N^+$), el entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol (C1, en el rango 0.5-4 mol%

35

frente al contenido total de monómero) y el entrecruzante 3,3 '- (propil) -di-1-vinil-2-pirrolidona (C2, 0.1 mol% frente al contenido total de monómero). Hidroxi-ciclohexil fenil cetona (HCPK) se usó como fotoiniciador (0,5% en peso respecto al peso total de monómeros, en este ejemplo 2 % de C1 y 0,1 mol % de C2 frente al contenido total de monómero).

Las fórmulas de los metacrilatos mencionados se representan a continuación:



Las mezclas de reacción se burbujearon con N₂ y se transfirieron a moldes (ver Figura 1) por medio de una jeringa. Para la preparación de sustratos recubiertos con el hidrogel, el molde se construyó con una lámina inferior del sustrato polimérico elegido (en este ejemplo Nylon) y una lámina superior de otro sustrato transparente (polipropileno-PP, polietileno-PE, etc.; en este ejemplo se uso PP) separadas por un espaciador de 0,05 a 1,5 mm de espesor (en este ejemplo se usaron cinta adhesiva de 0.05 mm, láminas de acetato de 0.1 mm y membranas de silicona de 0.5 mm de espesor). La fotopolimerización se llevó a cabo durante 40 minutos bajo una radiación UV (λ = 365 nm) en una lámpara ultravioleta UVP (modelo CL-1000L, 230V). Los sustratos recubiertos con el hidrogel se recuperaron de los moldes retirando las cubiertas transparentes y se dejaron hinchar en agua Milli-Q hasta alcanzar el equilibrio (24 horas). Posteriormente, se lavaron exhaustivamente con agua para eliminar cualquier material soluble.

2. Recubrimiento de sustratos planos de Nylon con hidrogeles basados en VCL y sin M. Su uso como soporte para cultivo celular.

El hidrogel preparado utilizando VCL, así como dimetacrilato de etilenglicol (C1) y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona (C2) como entrecruzantes (es decir, sin M), se preparó como en el ejemplo 1, salvo que no se añadió M y fue elegido para llevar a cabo estudios
5 preliminares de cultivo celular.

La fotopolimerización de la formulación basada en VCL sobre este material (Nylon) produjo un hidrogel con una interfase integrada en la superficie del soporte recubrimiento produjo un recubrimiento termosensible de hidrogel como se muestra en
10 la Figura 2. Este hidrogel era estable y no se separaba o se rompía por manipulación o cambios de temperatura cuando se sumergía en medio acuoso. Aún más, la capa de hidrogel puede ser secada y rehidratada perfectamente.

Este Nylon recubierto se evaluó como soporte de cultivo celular utilizando células
15 endoteliales C166-GFP (Figura 3). Una monocapa celular se formó después de unos pocos días y esta monocapa se pudo separarse completamente por disminución de la temperatura (Figura 3 (a)). Tras el trasplante de la monocapa recuperada sobre una placa de cultivo, las células fueron capaces de crecer y formar de nuevo una monocapa al cabo de pocos días.

20 Todos los hidrogeles se esterilizaron con una disolución de etanol al 70% enjuagando seis veces durante 10 minutos cada uno. A continuación, se lavaron con PBS seis veces, se expusieron a radiación UV durante 30 minutos para cada lado del hidrogel y se lavaron dos veces con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto
25 contenido de glucosa. Para simular la temperatura de las condiciones de cultivo (37°C), temperatura que está por encima de la temperatura de transición, se utilizó una placa caliente con una temperatura constante para el proceso de corte del material obteniendo muestras de 2 cm² que encajaban en las placas de 24 pocillos. Después de cortarlas, las muestras se dejaron durante una noche incubadas con DMEM 10% de suero bovino
30 fetal (FBS) y 1% de antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 µg / ml de sulfato de estreptomicina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

C166-GFP (ATCC® CRL-2583™) es una línea celular endotelial de ratón transfectada con proteína fluorescente verde (GFP). Las condiciones de cultivo son el MEM de
35 Dulbecco (D6429) suplementado con FBS al 10% más penicilina 100 U / mL y sulfato

de estreptomycin 100 µg / ml añadiendo 0,2 mg / ml de antibiótico G-418 al medio de cultivo para la selección de las células GFP retenidas. Las células se sembraron en las redes con una densidad de 3×10^4 células / ml y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Las células fueron monitorizadas utilizando un microscopio de fluorescencia invertida con un filtro FITC ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 488/568 nm).

Los hidrogeles soportando los cultivos celulares fueron dados la vuelta y situados en nuevos pocillos TCP. Posteriormente, se añadió medio frío a cada pocillo para alcanzar $T \leq 27$ °C. Se utilizó una sonda de temperatura para monitorizar este proceso. Después de 45 minutos, los hidrogeles se retiraron y las muestras se reincubaron a 37°C con CO₂. Las células trasplantadas se observaron diariamente usando un microscopio de fluorescencia invertido y se tomaron micrografías. El ensayo Trypan Blue se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

La actividad metabólica de los trasplantes celulares se midió mediante ensayo Alamar Blue siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método es no tóxico, escalable y utiliza el poder natural reductor de las células vivas, generando una medida cuantitativa de la viabilidad celular y la citotoxicidad. En resumen, se añadió colorante Alamar Blue (10% del volumen de cultivo) a cada pocillo, que contenía células vivas sembradas sobre películas, y se incubó durante 90 minutos. Los ensayos se realizaron, en cada tipo de muestra, por triplicado. La fluorescencia ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 535/590 nm) de cada pocillo se midió usando un lector de placas.

3. Recubrimiento de sustratos planos de policarbonato con hidrogeles a base de VP y metacrilatos iónicos

Como punto de partida en todos los casos se utilizó una formulación basada en VP optimizada previamente: agua como disolvente, VP y M-SO₃⁻ en concentraciones de 6 y 1 mol / L respectivamente, dos entrecruzantes (denominados C2 y C1) con porcentajes molares (frente a los monómeros) de 2,0 y 0,1 %, respectivamente. Los hidrogeles se sintetizaron como se ha descrito anteriormente. Un resumen de los tipos de hidrogeles preparados se da en la Tabla 1.

Tabla 1. Se emplearon disoluciones precursoras fotosensibles que comprendían: 6 moles de VP (1,265 ml), 2 moles de M-SO₃⁻ (492 mg), 0,1 mol% de C2 (3,1 mg) y diferentes cantidades de C1 y de disolventes (mezcla de agua y etanol). Los tiempos de contacto utilizados antes de la fotopolimerización fueron 0, 5, 10, 20 y 30 minutos.

5

Nombre		HYD_ 1	HYD_ 2	HYD_ 3	HYD_ 4	HYD_ 5	HYD_ 6	HYD_ 7
C1 (mol %)		2.0	2.0	2.0	2.0	0.5	1.0	4.0
Disolvente (ml)	EtOH	-	-	0.245	0.490	-	-	-
	Agua	0.735	1.000	0.490	0.245	0.735	0.735	0.735

10

Las tapas de polipropileno se retiraron después del fotocurado y se permitió que las redes formadas sobre los sustratos PC se hincharan en etanol hasta que se alcanzó el equilibrio. Posteriormente, los sustratos de PC recubiertos se lavaron exhaustivamente con etanol y agua para eliminar cualquier material soluble y finalmente se secaron para su análisis.

15

En este ejemplo se forman los compuestos con arrugas, se despegan parte del hidrogel al hincharse y se quedan las arrugas.

20

Los perfiles transversales y las imágenes 3D de las superficies arrugadas se caracterizaron mediante un perfilómetro Zeta-20 True Color 3D de Zeta Instruments. Se realizaron medidas de ángulos de contacto estático utilizando un goniómetro de ángulo de contacto (instrumentos Theta, KSV) con el método de gota sésil. Además de los valores del ángulo de contacto estático, se llevaron a cabo valores de ángulo de contacto de avance y retroceso. Se ajustó una jeringa motorizada a una velocidad específica para controlar el caudal volumétrico del líquido hacia o desde la gota sésil. El mecanismo empujó el émbolo de la jeringa durante el procedimiento de avance y lo tiró durante el procedimiento de retirada, dando lugar a un aumento y disminución del

tamaño de la gota, respectivamente. Las imágenes de la gota en crecimiento y encogimiento fueron registradas por el ordenador, típicamente a una velocidad de una imagen cada 1 s. En este estudio, los procesos de avance y retroceso se repitieron al menos 7 veces, llevando el sistema a 7 ciclos.

5

La composición química y los perfiles de profundidad de las películas poliméricas se determinaron utilizando Microscopía Confocal Raman integrada con microscopía de fuerza atómica (AFM) en un microscopio CRM-Alpha 300 RA equipado con láser Nd: YAG (potencia máxima de 50 mW de potencia a 532 nm). Los espectros Raman se adquirieron punto por punto cada 100 nm.

10

La formulación de precursores que ha sido etiquetada como HYD_1, ha mostrado ser capaz de inducir una microestructuración superficial en sustratos de PC, la cual se obtuvo en una sola etapa mediante polimerización iniciada por UV de la solución monomérica HYD_1 depositada sobre un sustrato de PC (usando el montaje representado en la Figura 3), seguido por separación del hidrogel por hinchamiento en etanol.

15

La solución HYD_1 se confinó entre una cubierta transparente y el sustrato de policarbonato usando un espaciador. El hidrogel, resultante después de un tiempo de espera de 10 minutos seguido de la etapa de fotopolimerización UV-vis, se sumergió en una solución de EtOH. Al hincharse, el hidrogel se separa del soporte de PC dejando un sustrato en el que la topografía se ha modificado significativamente. En la Figura 3 se representan imágenes ilustrativas de perfilometría óptica 3D de una superficie de PC no tratada y de otra tras de la etapa de fotopolimerización de UV. En contraste con la superficie de PC plana no tratada, la superficie de las películas obtenidas después de la eliminación de hidrogel muestra arrugas distribuidas aleatoriamente. En particular, en las condiciones descritas anteriormente, se observaron arrugas con dimensiones homogéneas (alrededor de $\sim 30 \mu\text{m}$ en longitud de onda y amplitudes de alrededor de $\sim 9 \mu\text{m}$) sobre toda la superficie. Esta particular topografía de superficie en la superficie del PC debe estar relacionada con la formación de hidrogel y el desprendimiento post-polimerización tras la inmersión en etanol. Debe observarse que los experimentos de control llevados a cabo sin el pequeño porcentaje de 0,1% en moles del compuesto divinílico C2 no produjeron un hinchamiento / desprendimiento homogéneo de hidrogel, ni arrugas. C2 juega un papel clave no sólo para las propiedades de la red, sino también

20

25

30

35

debido a su posible participación en los enlaces entre cadenas ricas en SPM y cadenas ricas en VP. Se han descrito que hetero-uniones análogas mejoran las propiedades mecánicas de redes dobles. Además, un aumento de C1 al 4% molar conduce a un desprendimiento parcial o a un anclaje completo del hidrogel sobre el PC. Esta influencia de C1 en el desprendimiento del hidrogel se abordará más adelante.

Se plantea aquí la hipótesis de que la formación de las arrugas de la figura 3 está relacionada de algún modo con un hinchamiento de PC y, por tanto, con una penetración de la mezcla de monómeros en las capas externas de PC. El desprendimiento del hidrogel tras el hinchamiento en etanol revelaría las arrugas. Para abordar esta hipótesis, se ha estudiado la influencia sobre el arrugamiento superficial de diferentes parámetros que pueden influir en la propuesta difusión de monómeros en PC, tales como el tipo de disolvente o el tiempo de exposición entre el sustrato y la solución fotopolimerizable antes de la irradiación UV. Además, se ha analizado la composición química de la superficie; Primero, los posibles cambios en la humectabilidad de la superficie se analizaron mediante medidas de ángulo de contacto de avance y retroceso. En segundo lugar, los posibles cambios en la composición química de la superficie se investigaron mediante microspectroscopía Raman confocal.

Para analizar la influencia del tiempo de contacto, se puso en contacto la mezcla de monómeros HYD_1 con la superficie del PC y se varió el tiempo de retardo entre el contacto establecido y el inicio del tiempo de irradiación con luz UV entre 0 y 30 min (tengase en cuenta que la muestra representada en la Figura 3 se obtuvo después de un tiempo de retardo de 10 minutos). Como se observa en la Figura 4, la topografía superficial varía gradualmente de un sustrato bastante plano a una superficie arrugada aumentando el tiempo de contacto. Los tiempos de contacto cortos produjeron sólo un ligero aumento de la rugosidad superficial (Figura 4 (a)). Sin embargo, la topografía superficial cambia significativamente manteniendo la solución precursora en contacto con el sustrato durante 5 minutos o más. En esta situación (5 min), la superficie resultante del desprendimiento completo de hidrogel reveló la formación de arrugas con períodos alrededor de $\sim 20 \mu\text{m}$ y amplitudes por debajo de $3 \mu\text{m}$ (Figura 4 (b)). En el periodo de tiempo observado, es decir, desde 0 hasta 30 minutos, se observó un aumento gradual de las dimensiones de las arrugas. Como resultado, las arrugas con periodos comprendidos entre $19 \mu\text{m}$ y $40 \mu\text{m}$ y amplitudes comprendidas entre $2,6 \mu\text{m}$

y 17 μm se pueden prepararse fácilmente aumentando el tiempo transcurrido entre el contacto de la solución precursora y el fotocurado con UV.

5 Además del tiempo de contacto, la naturaleza y la relación de los disolventes empleados para la mezcla fotosensible pueden tener una fuerte influencia en el proceso de hinchamiento superficial del PC. Para HYD_1 se utilizó una cantidad pequeña y optimizada de agua como disolvente. Para abordar esta cuestión, se han estudiado las muestras HYD_2 a HYD_4 en la Tabla 1, en las que se han variado la cantidad y la naturaleza del disolvente.

10

Las dimensiones de las arrugas (amplitud y periodo) variaron claramente dependiendo del disolvente empleado. En la Figura 5 se representan imágenes de perfilometría óptica 3D y dos gráficos adicionales que representan la variación de las características de las arrugas en función del tiempo de contacto para diferentes soluciones precursoras.

15

Usando la solución HYD_2, con una cantidad de agua más grande que en el caso de HYD_1, las arrugas observadas son claramente más pequeñas (que las observados usando HYD_1). Por otra parte, la sustitución parcial de agua por EtOH da lugar a arrugas con dimensiones mayores. Además, un aumento en la cantidad de EtOH en la mezcla de disolventes dio lugar a arrugas con períodos y amplitudes mayores. Por lo tanto, más allá de la adición de agua, la incorporación de un disolvente adicional con mayor afinidad al sustrato nos permitió ajustar con precisión las dimensiones de arrugas resultantes. En particular, como se representa en la Figura 5, se obtuvieron directamente superficies rugosas estructuradas con periodos entre 10 y 100 μm y amplitudes que oscilan entre 1-20 μm .

25

En cuanto a la naturaleza química de la superficie, las mediciones de ángulo de contacto estático llevadas a cabo tanto en PC planar no modificado como en PC modificado, indicaron un aumento de la humectabilidad superficial, es decir, la superficie tratada se vuelve más hidrófila (Figura 6 (a)). Para este estudio se ha seleccionado una muestra de tipo HYD_1 con 10 minutos de tiempo de contacto. Las mediciones de ángulos de avance y retroceso evidenciaron cambios de superficie significativos. En la Figura 6 (b) se representan los ángulos de contacto de avance y retroceso de 7 ciclos para sustratos tratados y no tratados. El sustrato precursor, es decir PC puro, presenta ángulos de avance de aproximadamente 90-93° y valores de ángulo de contacto de retroceso de 15-18°. Estos valores permanecen constantes durante todos los ciclos explorados. Sin

35

embargo, para las superficies tratadas con la mezcla fotosensible y tras el desprendimiento de hidrogel, el ángulo de contacto de avance presenta diferencias significativas entre el primer y los siguientes ciclos. Mientras que en el primer ciclo el ángulo de avance presenta valores alrededor de 82° , los valores medidos para los siguientes ciclos son alrededor de $10\text{-}12^\circ$. Esta observación indica que en el primer ciclo la interfaz tratada requiere una primera humectación para llegar a ser altamente hidrofílica. Muy probablemente, parte del hidrogel formado permanece anclado a la interfase hidratada durante los siguientes ciclos. El avance del frente de agua durante las mediciones de ángulo de avance ha sido representado usando un perfilómetro óptico (Figura 6 (c)). La gotita de agua moja los valles formados por las arrugas y avanza formando una fina capa de agua. Igualmente, como se esperaba, el ángulo de contacto de retroceso en las películas tratadas es muy bajo con valores por debajo de 10° .

Los experimentos de ángulos de contacto evidencian la formación de una capa superficial hidrófila, pero no proporcionan ninguna información sobre la composición química de la superficie y el perfil de profundidad del tratamiento. La información sobre estos dos aspectos fue obtenida por Raman Confocal. Antes de la investigación de los sustratos modificados, se evaluaron las diferencias entre los espectros Raman del hidrogel basado en PVP y el sustrato PC. Por comparación de estos dos espectros hemos observado varias señales características. En primer lugar, la señal encontrada a 1675 cm^{-1} corresponde a los grupos C=O del hidrogel en base PVP. Sin embargo, los grupos funcionales carbonilo presentes en el PC proporcionan una señal Raman a 1613 cm^{-1} . Además, las bandas encontradas a 1495 , 1457 , 1425 cm^{-1} corresponden a la deformación de metileno de la cadena principal del material de PVP. Por último, la banda a 944 cm^{-1} se corresponde al modo de respiración del anillo de pirrolidona y las observadas a 860 y 768 cm^{-1} a los modos de anillo.

En el espectro Raman observado para el sustrato de PC tratado se puede observar claramente la formación de una capa superior en la que la composición química es una mezcla de PC e hidrogel en base VP. Otra característica interesante de la microscopía de Raman Confocal está relacionada con la posibilidad de obtener perfiles de profundidad que muestren la variación de la composición química desde la superficie hasta el interior del PC. Para este análisis se empleó la parte superior de una colina de arrugas como referencia y los espectros Raman se registraron a diferentes profundidades de hasta $30\text{ }\mu\text{m}$. Los espectros de Raman de HYD_1 obtenidos a

diferentes profundidades a diferentes tiempos de contacto, muestran una variación gradual de los espectros de un hidrogel puro compuesto principalmente por PVP, a PC puro a una profundidad de 30 μm . Al normalizar la señal a 1615 cm^{-1} asignada a la C=O del PC, se puede observar fácilmente una disminución gradual por ejemplo de las

5 bandas a 1495, 1457, 1425 cm^{-1} debido a la deformación del metileno de la cadena principal o la banda a 1678 cm^{-1} debidas al C=O del hidrogel formado. Como resultado, una comparación de la bandas a 1676 cm^{-1} del hidrogel y la banda a 1615 cm^{-1} característica de PC permite estimar la variación de la composición química y la profundidad de la capa modificada. Como se muestra en la Figura 7, la representación

10 de la relación entre ambas señales permite construir perfiles transversales que indican la extensión de la modificación superficial. Un aumento del tiempo de contacto de la solución fotopolimerizable sobre el sustrato antes de la etapa de irradiación UV-vis, conduce a un aumento de las características dimensionales de las arrugas.

15 A medida que aumenta el tiempo de contacto, la mezcla de monómeros penetra más profundamente en el PC, se produce un mayor hinchamiento y aparecen inestabilidades superficiales. La fotopolimerización forma la red basada en VP (en realidad, las capas externas integradas de hidrogel / PC forman una estructura semi-interpenetrada) y "congela" la deformación superficial. El desprendimiento del hidrogel, finalmente, revela

20 las arrugas en la interfase. De acuerdo con las observaciones descritas anteriormente usando el perfilómetro óptico 3D, el tamaño de las arrugas aumenta a medida que la capa modificada aumenta también. Por lo tanto, el proceso de formación de arrugas está directamente relacionado con el grado de hinchamiento.

25 La Figura 7 también muestra la relevancia de la concentración de monómeros al comparar HYD_1 con HYD_2. Mientras que HYD_1 se prepara usando 0,735 ml de agua, HYD_2 contiene 1 ml de agua (es menos concentrado). En primer lugar, como se representa en los perfiles transversales y se resumen en las gráficas (Figura 7 (k) y (l)), los perfiles indican una mayor difusión de los componentes precursores de hidrogel al

30 aumentar la concentración de monómero. Considerando que HYD_2 exhibe perfiles de penetración de monómeros con espesores por debajo de 15 μm , HYD_1 evidenció que la región superficial afectada es superior a 25 μm de espesor.

35 En el escenario anterior de hinchamiento en gradiente y deformación superficial, las arrugas se hacen visibles si el hidrogel es capaz de separarse en la interfase deformada.

En base a literatura relacionada, el desprendimiento del hidrogel puede estar relacionado con las tensiones originadas en la superficie tras el hinchamiento del hidrogel y está influenciada por el número de puntos de anclaje establecidos entre el hidrogel y el sustrato PC. Este número de puntos de anclaje está fuertemente relacionado con el grado de entrecruzamiento. Como se mencionó anteriormente, un aumento de C1 conduce a un desprendimiento parcial o a un anclaje completo del hidrogel al sustrato PC (dependiendo del tiempo de contacto). Un valor de C1 entre 0,5 y 1% molar resultó, sin embargo, en un desprendimiento completo del hidrogel del PC, que conduce al arrugamiento aquí descrito. Curiosamente, la superficie de este hidrogel (Figura 8 (c)) también exhibe la formación de arrugas, que son complementarias a las arrugas observadas en la superficie del PC. Un modelo hipotético se ha desarrollado de acuerdo con estos resultados (ver Figura 8). Las redes de mayor densidad de entrecruzamiento son capaces de absorber una cantidad limitada de disolvente y por lo tanto presentan un hinchamiento reducido y tensiones menores relacionadas con el fenómeno de hinchamiento. El número de puntos de anclaje entre la interfaz y el hidrogel aumenta también. Por lo tanto, se propone un grado de entrecruzamiento crítico, por debajo del cual existe una ruptura del enlace en la interfase y un desprendimiento de hidrogel. Esto se debe al reducido número de puntos de anclaje y a la mayor extensión de las tensiones durante el hinchamiento, en comparación con los grados de entrecruzamiento por encima del punto crítico, que son capaces de mantener anclado el hidrogel completo.

Como conclusión, puede establecerse que la mezcla seleccionada de agentes monómeros / entrecruzantes, al entrar en contacto con el PC, difunde e hincha la superficie del polímero. Como resultado, tras el hinchamiento del hidrogel formado en EtOH o agua, se produce un desprendimiento controlado del hidrogel, dejando una fina capa de hidrogel en la superficie del PC. Esta fina capa de hidrogel es consecuencia del proceso inicial de difusión y de hinchamiento de la superficie del PC por los precursores del hidrogel. La difusión observada tiene dos consecuencias simultáneas. En primer lugar, se altera la composición química superficial del PC y se obtiene una superficie con mayor hidrofiliidad. En segundo lugar, la difusión e hinchamiento de la superficie del PC induce inestabilidades superficiales que finalmente dan lugar a la formación de superficies arrugadas. Curiosamente, mediante la modificación de la composición de la solución precursora, así como del tiempo de contacto, se obtiene un control razonable sobre las características de arrugas (periodo y amplitud).

Uso en cultivos celulares

Estos soportes son capaces de permitir la adhesión y proliferación de células endoteliales C166-GFP. Se ha observado que las células pueden crecer sobre toda la superficie del material, tanto dentro de las arrugas como en la parte más superficial del mismo. Además, la actividad proliferativa del cultivo sobre el soporte es mayor que sobre el hidrogel VP libre. Finalmente, se ha comprobado que la capacidad de trasplante del cultivo celular desde estos soportes no disminuye respecto al hidrogel VP original. De este modo, se han obtenido trasplantes celulares por inversión desde los soportes a nuevas superficies de PS, totalmente viables y con una actividad metabólica similar a la obtenida con hidrogeles VP.

4. Recubrimiento de sustratos planos de polimetacrilato de metilo (PMMA) y poliestireno (PS) con hidrogeles basados en VP y metacrilato aniónico

El hidrogel se preparó como en el ejemplo 3, salvo que se usó PMMA o PS en vez de PC como sustrato, y que solo se hicieron, a modo de demostración, recubrimientos con la sal potásica de sulfopropilmetacrilato como comonomero. Al igual que en el ejemplo 3 se prepararon recubrimientos usando diferentes tiempos de residencia de la formulación (0, 15 y 30 minutos) (Figura 10). Con estos sustratos de nuevo se observó un despegado de la capa de hidrogel que no forma parte de la interfase, aunque en este caso la superficie no forma arrugas sino forma rugosidades.

Estos recubrimientos se estudiaron como soportes en cultivo celular siguiendo el protocolo indicado en el ejemplo 2. Para los recubrimientos de PMMA (Figura 11), tras la siembra con células endoteliales C166-GFP autofluorescentes, se pudo comprobar que todas las superficies evaluadas son biocompatibles (permiten la adhesión y la proliferación). La topografía de la superficie, que incluye surcos y rugosidades, favorece la adhesión respecto al hidrogel de vinilpirrolidona (VP) original. Debido a su composición, se había descrito que el crecimiento celular se daba en forma de cúmulos. En materiales basados en recubrimientos de VP sobre PMMA este comportamiento persiste para todos los tratamientos (casi no hay diferencias entre 0, 15 y 30). Sin embargo, se puede observar que las células en la base de los cúmulos se adhieren preferentemente a los surcos de la microestructura. Las células proliferan

correctamente en función del tiempo, siendo posible destacar cierta mejora respecto al hidrogel VP original.

Se ha descrito que los hidrogeles VP originales permiten el despegado espontáneo de monocapas celulares mediante agitación mecánica o mediante inversión del hidrogel y contacto con otra superficie de cultivo. De manera similar, los materiales basados en VP sobre PMMA conservan esta propiedad, permitiendo el trasplante celular de manera similar al hidrogel original. Tras el trasplante, se ha observado que los cultivos conservan una buena viabilidad y continúan su actividad proliferativa, alcanzando la confluencia a 7 días post-trasplante.

10

5. Recubrimiento de sustratos planos de poliestireno (PS) con hidrogeles basados en VCL y sin metacrilatos. Su uso como soporte para cultivo celular.

El hidrogel se preparó como en el ejemplo 2, salvo que se usó PS en vez de Nylon como sustrato, y láminas de latón de 0.1 mm para fabricar los como espaciadores, además de los materiales indicados en el ejemplo 1. Se evaluaron tanto planchas gruesas de PS comercial, como planchas finas (0.5 mm) preparadas en la prensa, Se prepararon además recubrimientos control sin disolvente (polimerización en masa). Se observó que se obtuvieron recubrimientos estables al usar etanol como disolvente así como en la polimerización en masa. En la Figura 11 se muestran recubrimientos obtenidos con diferentes condiciones. El recubrimiento fue estable durante los procesos de hinchamiento y deshinchamiento. La transparencia del recubrimiento depende del uso o no de disolvente y del tipo de PS. Las muestras obtenidas con planchas comerciales de PS y espaciadores de latón fueron altamente transparentes.

Se han evaluado como soportes de cultivo celular y se han comportado de forma similar al ejemplo 2.

6. Recubrimiento de sustratos planos de poliácido láctico (PLA), con hidrogeles basados en VCL y sin metacrilatos

Los recubrimientos se prepararon de forma similar al ejemplo 2, salvo que se usó PLA en vez de Nylon como sustrato.

Se han evaluado como soportes de cultivo celular de igual manera que en el ejemplo 2. En este caso, el crecimiento sobre el material es óptimo, formando rápidamente una monocapa sobre todo el recubrimiento.

La interfase es similar a las anteriores en este ejemplo.

7. Recubrimientos micrométricos arrugados en de substratos no planos.

5 Además de las superficies planas, el sistema desarrollado permite el recubrimiento de estructuras curvas y complejas. Como ejemplo de realización, la pieza elegida es un cilindro de 3 mm de diámetro fabricado en policarbonato. El cilindro se sumergió en una disolución de mezcla de vinilpirrolidona, metacrilato de sulfopropilo (en proporción molar de 6/1) y entrecruzantes tipo dimetacrilato y divinilo, y se irradió con luz UV durante 30 min. La iniciación del proceso de fotopolimerización se realiza instantáneamente (tiempo de contacto previo 0 min), así como después de 15 y después de 30 min. Como ocurría en el caso de superficies planas y se muestra en la Figura 10, la rugosidad aumenta con el tiempo de contacto. En este caso el PC utilizado y las condiciones elegidas dan lugar a la formación de arrugas se produce ya para tiempos de contacto (previos a la fotopolimerización) cortos.

15

REIVINDICACIONES

1. Un producto que comprende:

a) un sustrato polimérico y

b) un hidrogel basado en monómeros tipo vinil-lactama, sin metacrilatos o con metacrilatos iónicos, y al menos dos entrecruzantes,

5

caracterizado porque hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una estructura de red semi-interpenetrada.

10 2. Un producto según la reivindicación 1, que comprende:

a) un sustrato polimérico y

b) un hidrogel basado en monómeros tipo vinil-lactama, sin metacrilatos, en el que la vinil-lactama es vinil-caprolactama, el sustrato polimérico es nylon, y los dos entrecruzantes son dimetacrilato de etilenglicol - C1- y 3,3 '- (propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona - C2-,

15

o

a) un sustrato polimérico y

b) un hidrogel basado en monómeros tipo vinil-lactama, con metacrilatos iónicos, y al menos dos entrecruzantes,

20

caracterizado porque hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una estructura de red semi-interpenetrada-.

3. Un producto según la reivindicación 1, que comprende:

25

a) un sustrato polimérico y

b) un hidrogel basado en monómeros tipo vinil-lactama con metacrilatos iónicos, y al menos dos entrecruzantes,

caracterizado porque hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una estructura de red semi-interpenetrada-.

30

4. Producto según la reivindicación 3, en el que el sustrato polimérico se selecciona entre poliestireno, polimetacrilato de metilo, nylon, policarbonato, policloruro de vinilo, poliácido láctico y policaprolactona.

35

5. Producto según la reivindicación 3, en el que el sustrato polimérico es nylon, poliestireno o policarbonato.
6. Producto según la reivindicación 3, en el que la vinil-lactama se selecciona vinil-caprolactama o vinil-pirrolidona.
7. Producto según la reivindicación 6, en el que la vinil-lactama es vinil-caprolactama.
8. Producto según la reivindicación 6, en el que la relación molar vinil-lactama/metacrilato iónico está en el intervalo 2/1 a 100/1.
9. Producto según la reivindicación 3, en el que el metacrilato iónico es un metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquill]trimetilamonio, metacrilatos de dimetilaminoetilo y dietilaminoetilo.
10. Producto según la reivindicación 3, en el que el metacrilato iónico es un metacrilato zwitteriónico seleccionado de metacriloiloxietil fosforilcolina o hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio metacrilato.
11. Producto según la reivindicación 3, en el que el metacrilato iónico es un metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo.
12. Producto según la reivindicación 3, en el que el metacrilato iónico es una mezcla de metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo y de metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquill]trimetilamonio.
13. Producto según una de las reivindicaciones 3 a 12, en el que los entrecruzantes son seleccionados de etilenglicol di(met)acrilato, trietilenglicol di(met)acrilato, tetraetilenglicol glicol di(met)acrilato, trimetilolpropano tri(met)acrilato, bisfenol A di(met)acrilato, etoxilato bisfenol A di(met)acrilato, pentaeritritol tri-, and tetra(met)acrilato, tetrametileno di(met)acrilato, metilenbisacrilamida, metacriloietil vinil carbonato, trialilcianurato, metacriloietil vinil urea, divinil benceno, dialil itaconato, alil metacrilato, dialil phthalato, polisiloxanilbisalquil (met)acrilato, polietilen glicol di(met)acrilato, vinil-metacrilato, divinil-adipato, derivados de divinil-pirrolidona, 1,3-divinilimidazolin-2-ona o combinaciones de los anteriores.

14. Producto según la reivindicación 13, en el que los entrecruzantes están presentes cada uno de ellos en concentraciones en el intervalo 0.1-10 % molar con respecto a los moles de monómeros totales.

5

15. Producto según la reivindicación 13, en el que los entrecruzantes son etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

16. Producto según la reivindicación 1, que comprende:

10

a) un sustrato polimérico que es nylon o poliestireno y

b) un hidrogel basado en monómeros de vinilpirrolidona, VP, o vinilcaprolactama y dos entrecruzantes que son dimetacrilato de etilenglicol y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona,

en el que hay una interfase entre el sustrato y el hidrogel, interfase formada por un gradiente de ambos, del sustrato y de la red del hidrogel -formando ambos una red semi-interpenetrada.

15

17. Un producto según una de las reivindicaciones 1 a 16, que está estructurado en su superficie.

20

18. Un producto según la reivindicación 17, que está estructurado en su superficie mediante la formación de arrugas.

19. Un procedimiento para obtener el producto definido en una de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende al menos las siguientes etapas:

25

a) mezcla de los monómeros precursores del hidrogel, el derivado de vinil-lactama, el metacrilato iónico, si está presente, y al menos dos entrecruzantes con un fotoiniciador,

b) deposición de la mezcla de (a) en la superficie del sustrato polimérico e inducción de fotopolimerización bajo radiación UV e

30

c) hinchamiento del producto obtenido en (b) mediante su inmersión en agua o en etanol.

20. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que el sustrato polimérico se selecciona de poliestireno, polimetacrilato de metilo, nylon, policarbonato, poliácido láctico o policaprolactona.
- 5 21. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que en el que el sustrato polimérico es nylon o policarbonato.
22. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 19 a 21, en el que la vinil-lactama se selecciona vinil-caprolactama o vinil-pirrolidona.
- 10 23. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que la vinil-lactama es vinil-caprolactama.
24. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 19 a 23, en el que el metacrilato iónico es un metacrilato catiónico seleccionado de sales de [2-(metacriloiloxi)alquil]trimetilamonio.
- 15 25. Un procedimiento según las reivindicaciones 19 a 23, en el que el metacrilato iónico es un metacrilato zwitteriónico seleccionado de metacriloiloxietil fosforilcolina o hidróxido de [3-(metacriloilamino)propil]dimetil(3-sulfopropil) amonio metacrilato.
- 20 26. Un procedimiento según las reivindicaciones 19 a 23, en el que el metacrilato iónico es un metacrilato aniónico seleccionado de sales de metacrilatos de sulfoalquilo.
- 25 27. Un procedimiento según las reivindicaciones 19 a 23, en el que los entrecruzantes son seleccionados de etilenglicol di(met)acrilato, trietilenglicol di(met)acrilato, tetraetilenglicol glicol di(met)acrilato, trimetilolpropano tri(met)acrilato, bisfenol A di(met)acrilato, etoxilato bisfenol A di(met)acrilato, pentaeritritol tri-, and tetra(met)acrilato, tetrametileno di(met)acrilato, metilenbisacrilamida, metacriloiloxietil vinil carbonato, trialilcianurato, metacriloiloxietil vinil urea, divinil benceno, dialil itaconato, alil metacrilato, dialil phthalato, polisiloxanilbisalquil (met)acrilato, polietilen glicol di(met)acrilato, vinil-metacrilato, divinil-adipato, derivados de divinil-pirrolidona, 1,3-divinilimidazolin-2-ona o combinaciones de los anteriores.
- 30

28. Un procedimiento según la reivindicación 27, en el que los entrecruzantes son etilenglicol di(met)acrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

5 29. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27, en el que la radiación UV se mantiene entre 10 y 60 minutos.

10 30. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 28, en el que los entrecruzantes se usan en un porcentaje comprendido entre 0,1% y 20% en moles respecto al contenido total de monómeros.

31. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 28, en el que los entrecruzantes se usan cada uno de ellos en un porcentaje comprendido entre 0,1% y 10% en moles respecto al contenido total de monómero.

15 32. Uso del material definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para obtener materiales para cultivos celulares.

20 33. Uso del material definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 189, para el recubrimiento de objetos 3D.

34. Uso del material definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para la fabricación de actuadores mecánicos termosensibles.

25

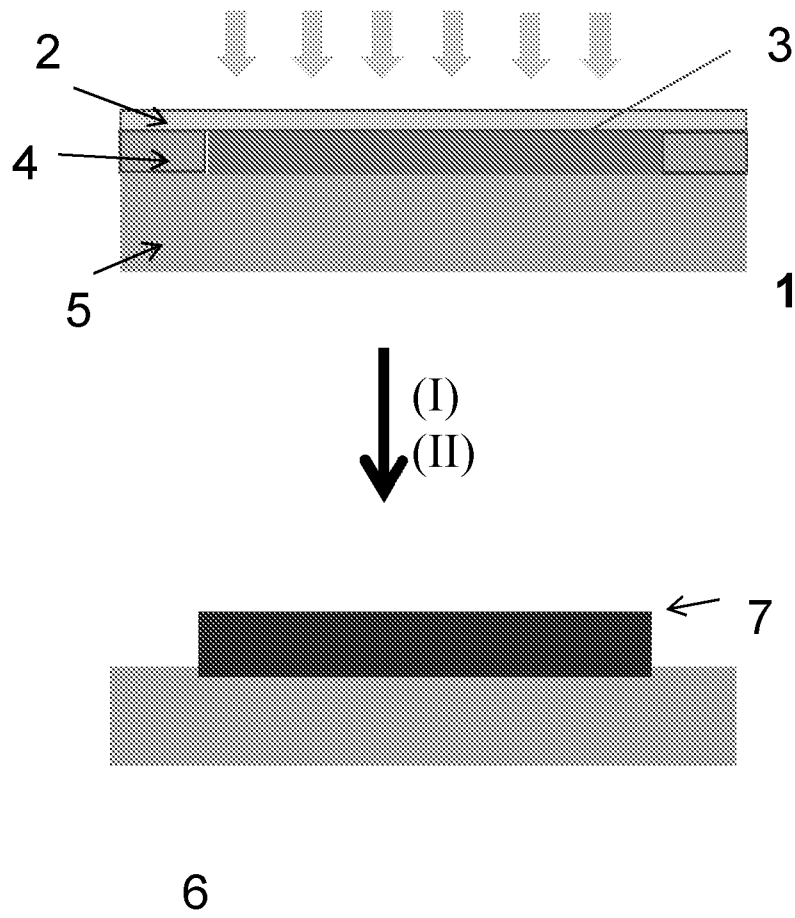


FIG 1

$T < V_{PTT}$



$T \sim V_{PTT}$



$T > V_{PTT}$

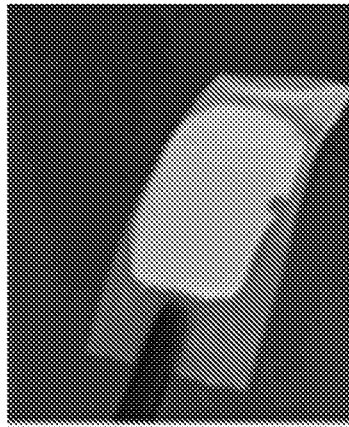


FIG. 2

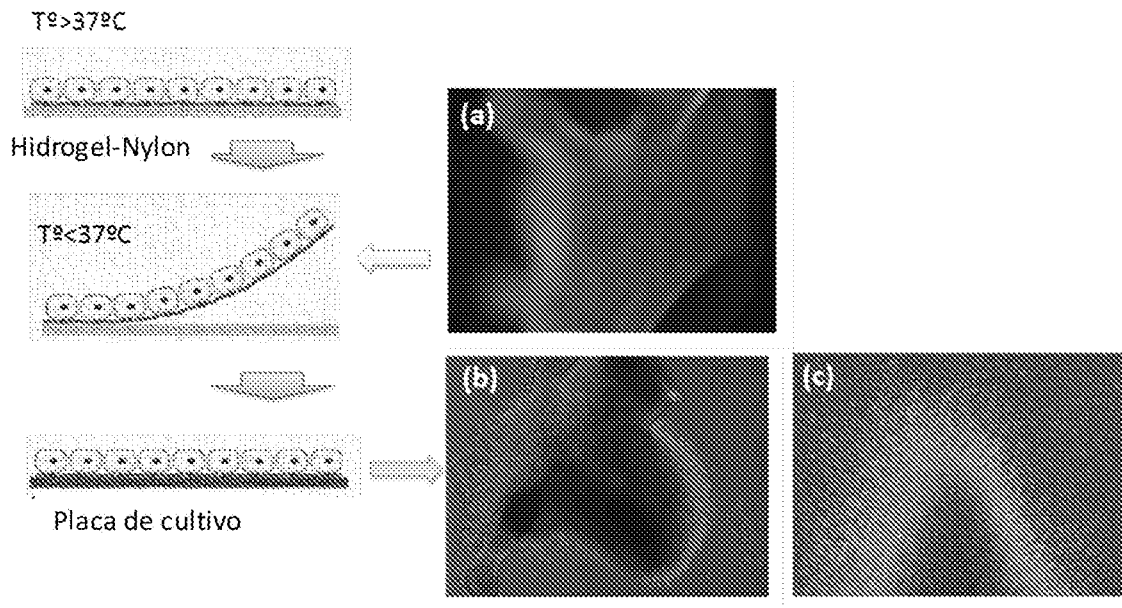


FIG. 3

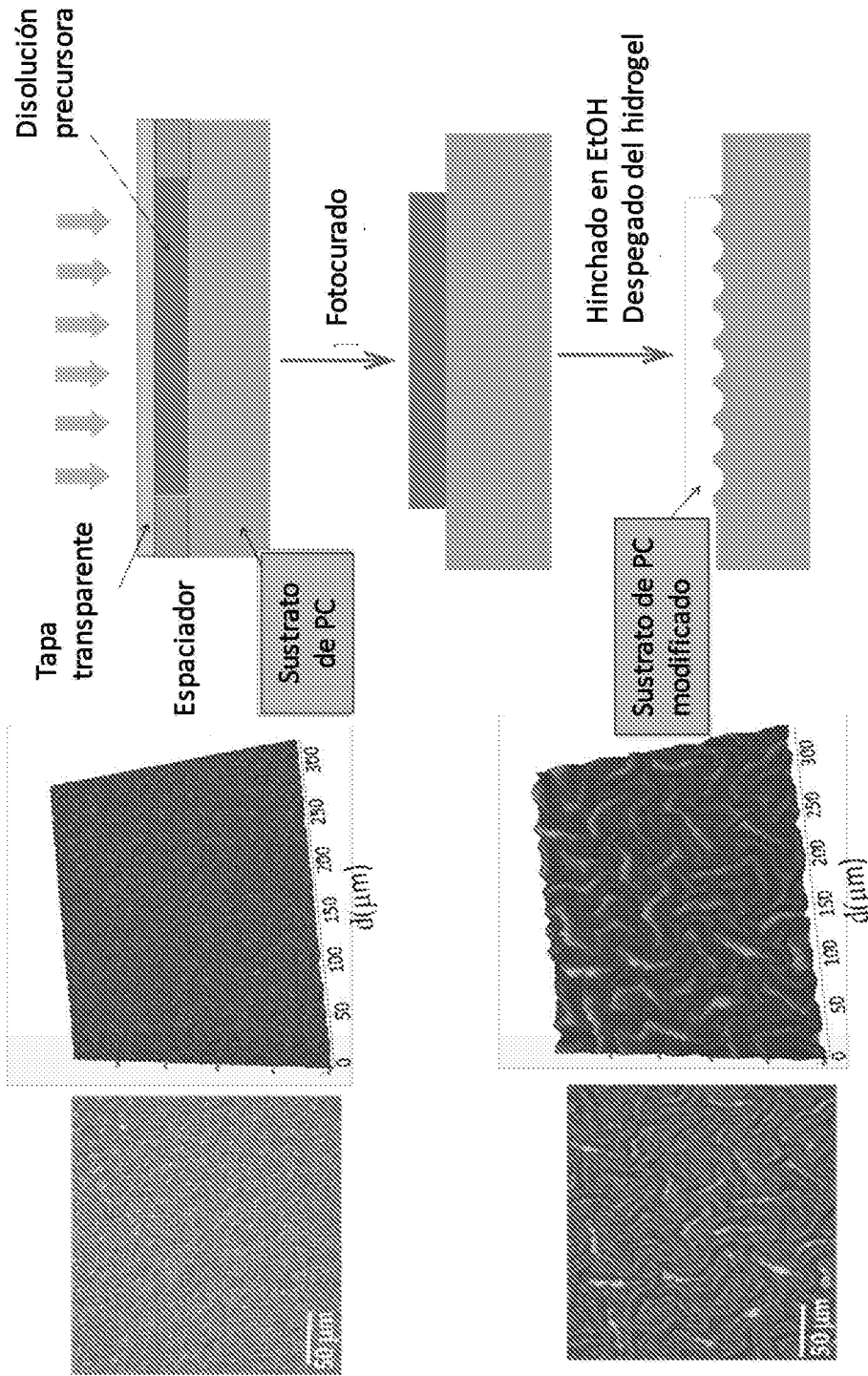


FIG. 4

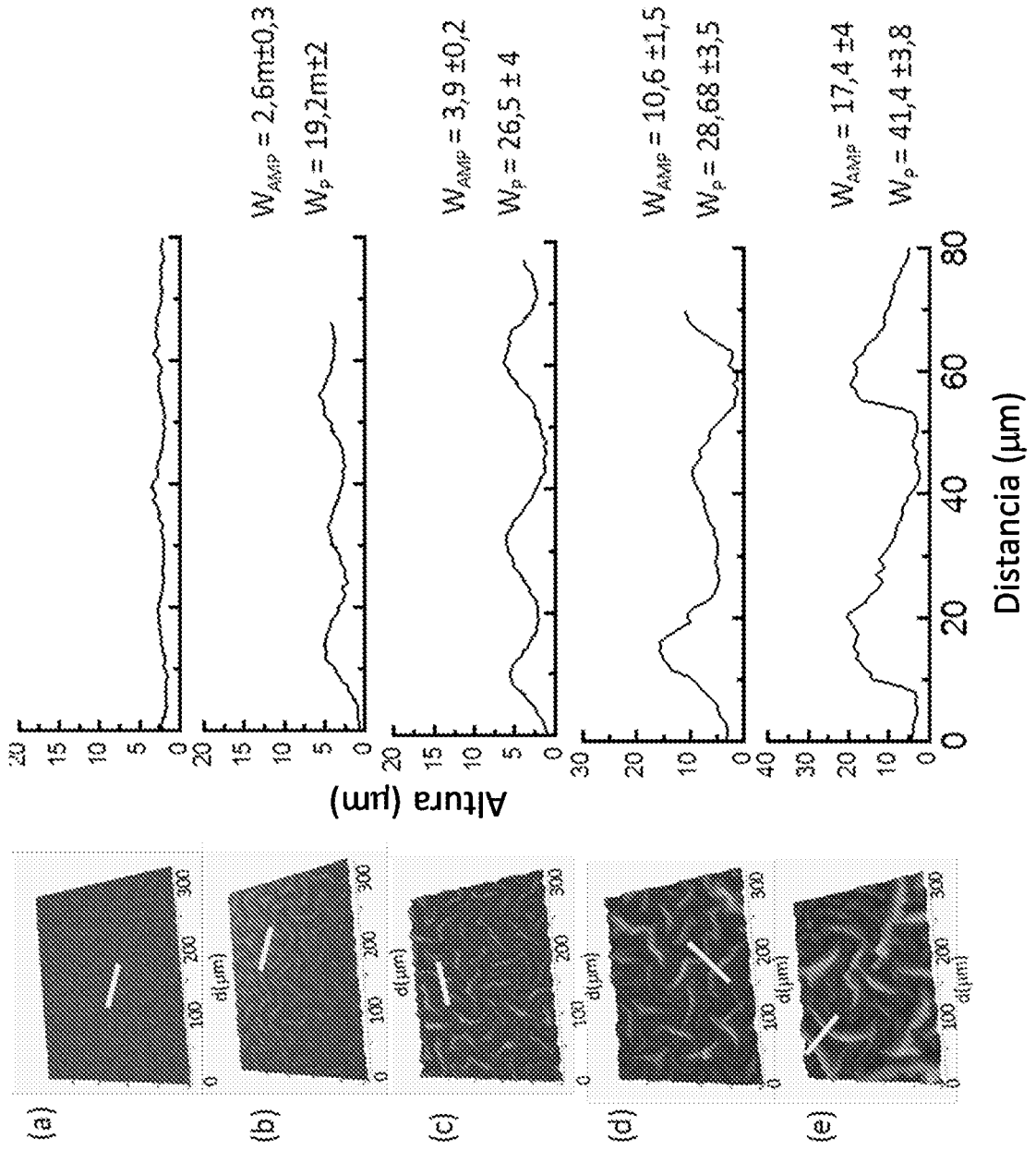


FIG. 5

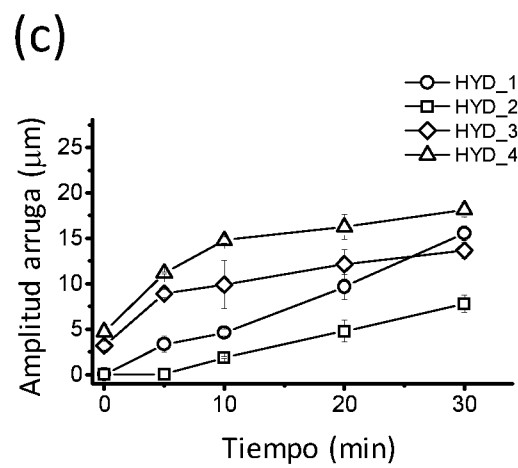
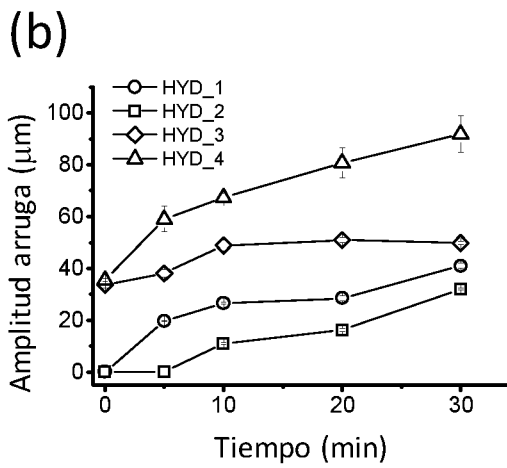
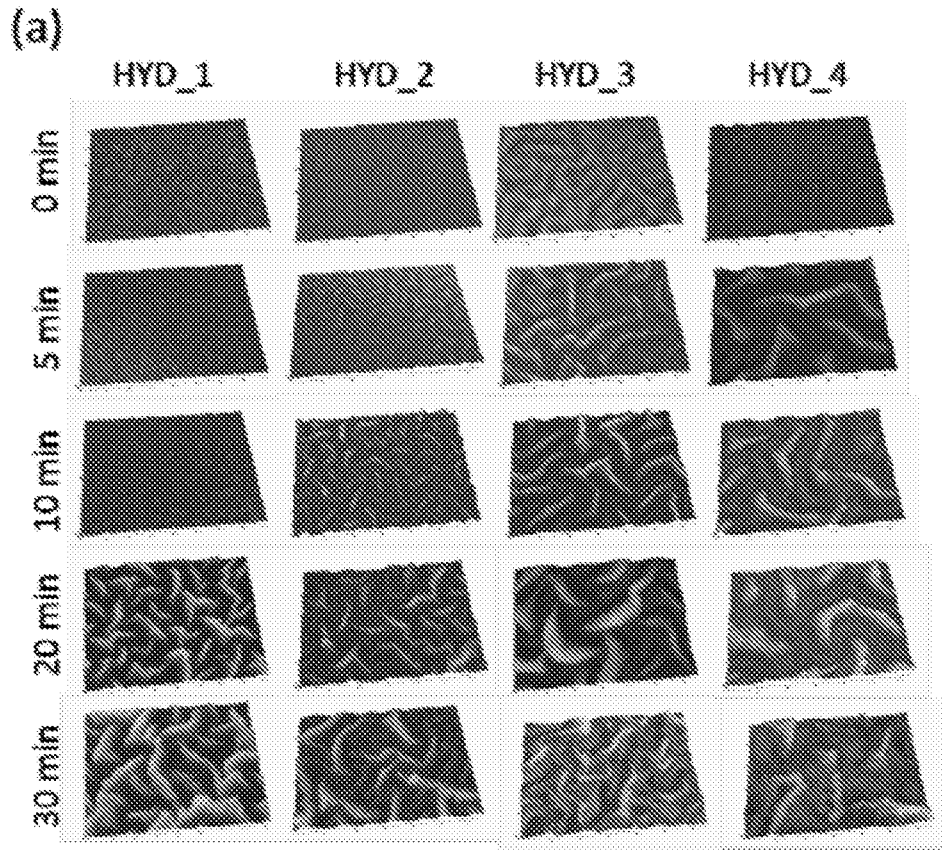


FIG. 6

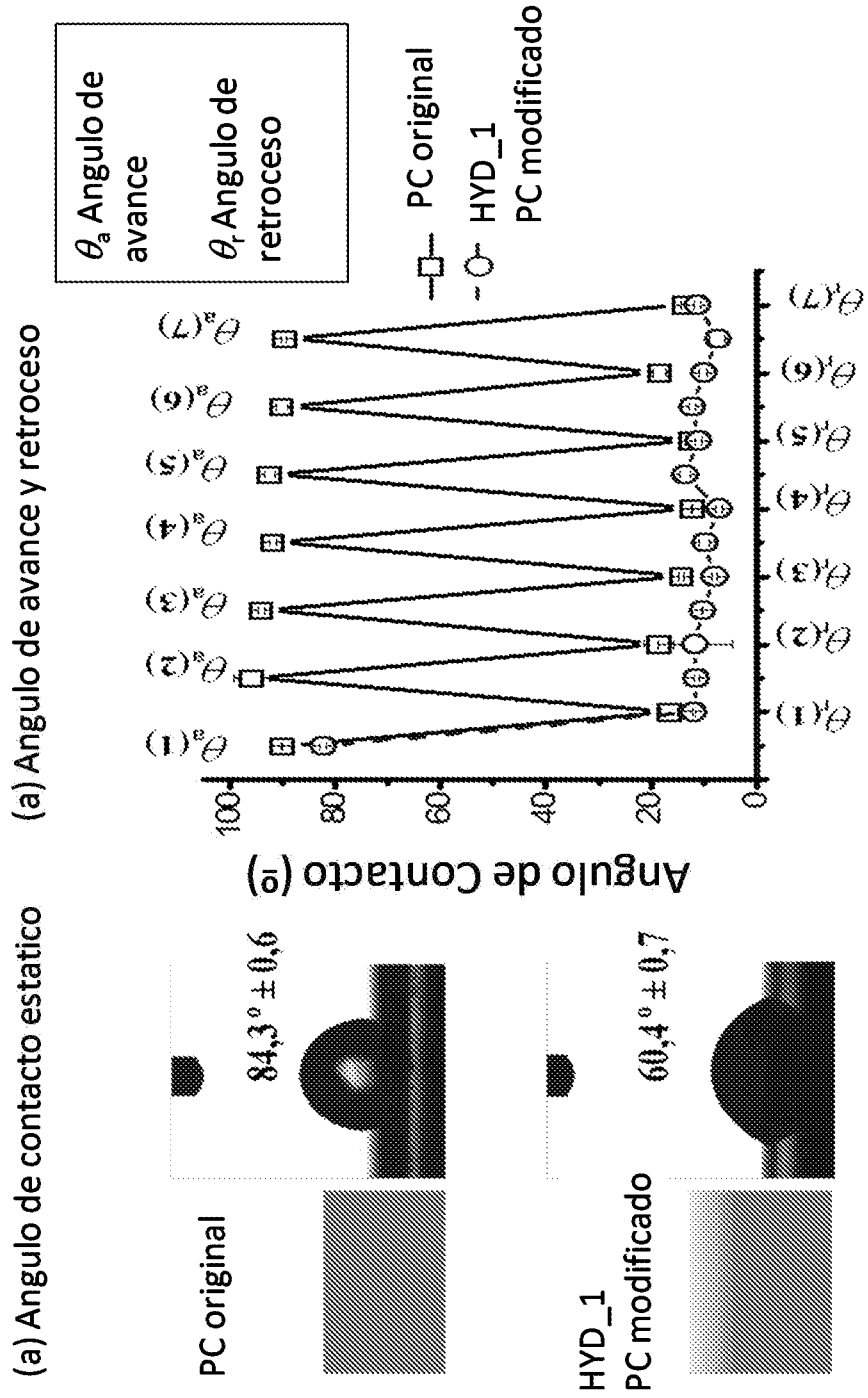


FIG. 7

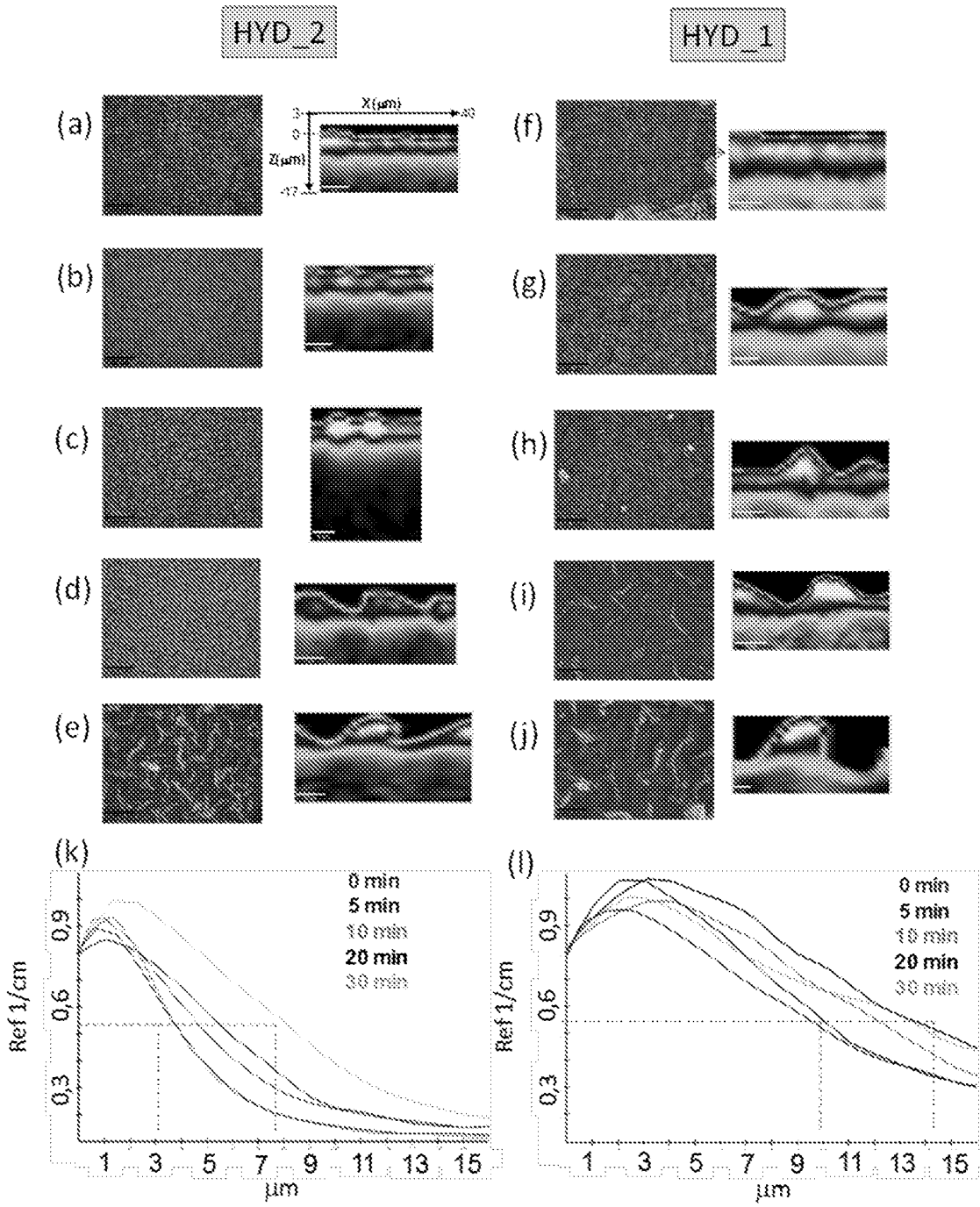


FIG. 8

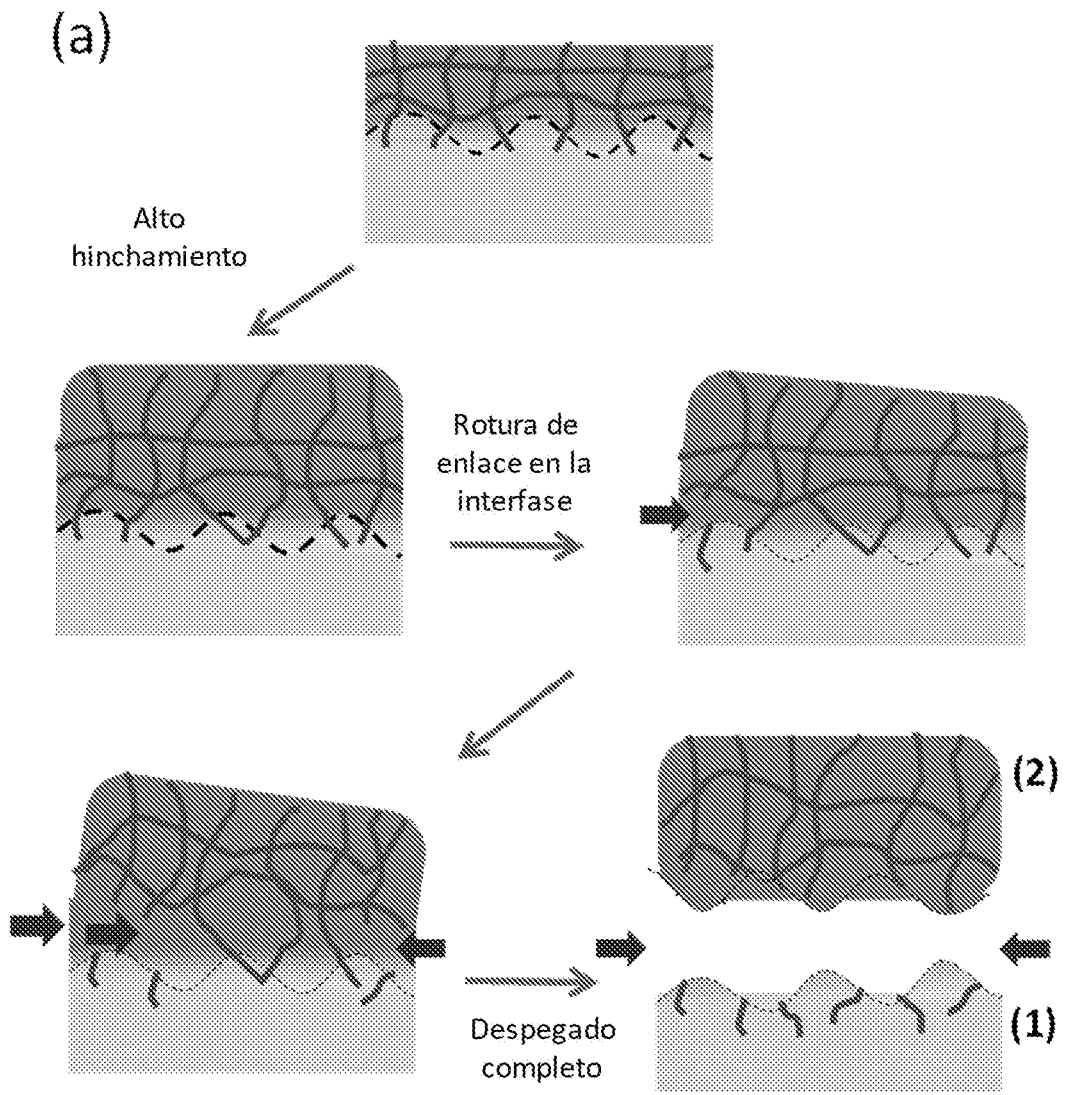


FIG. 9

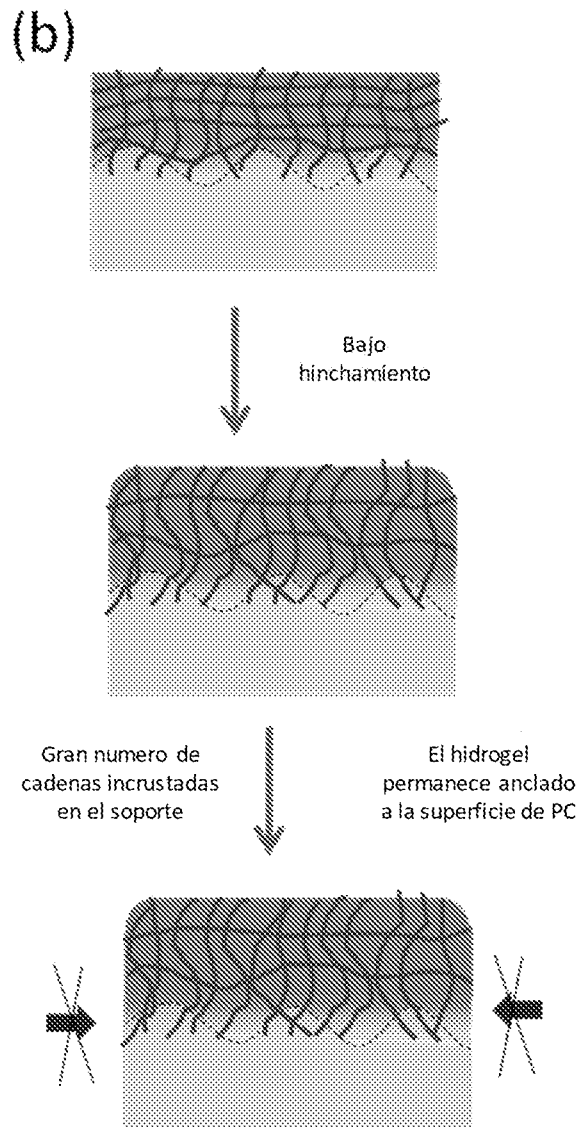
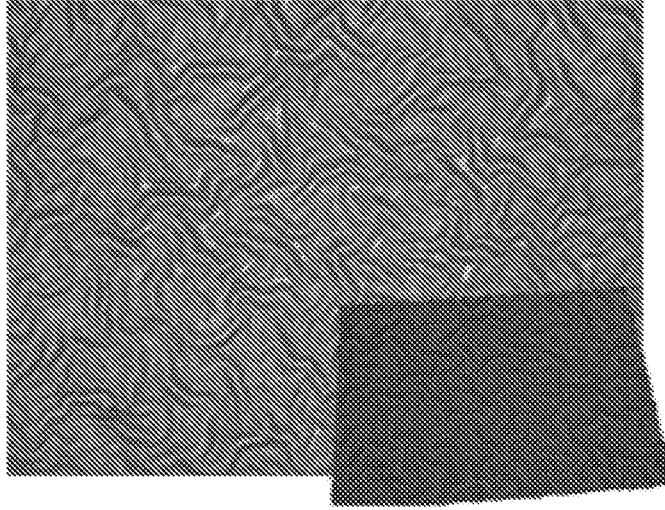


FIG. 9 cont.

(c) (1) Superficie de PC



(2) Superficie de hidrogel seca

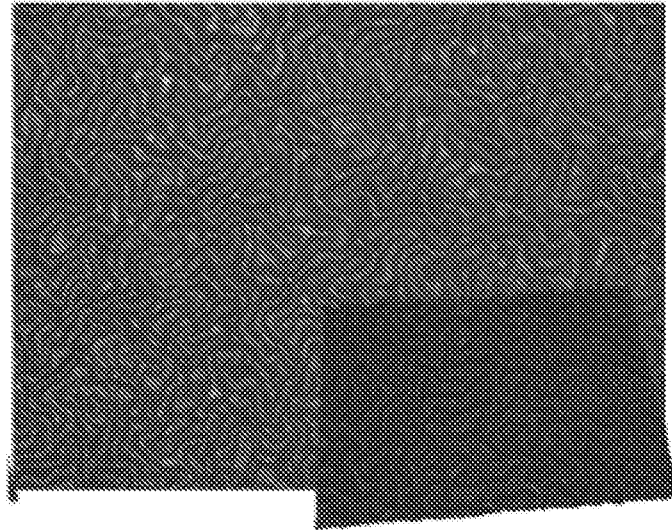


FIG. 9 cont.

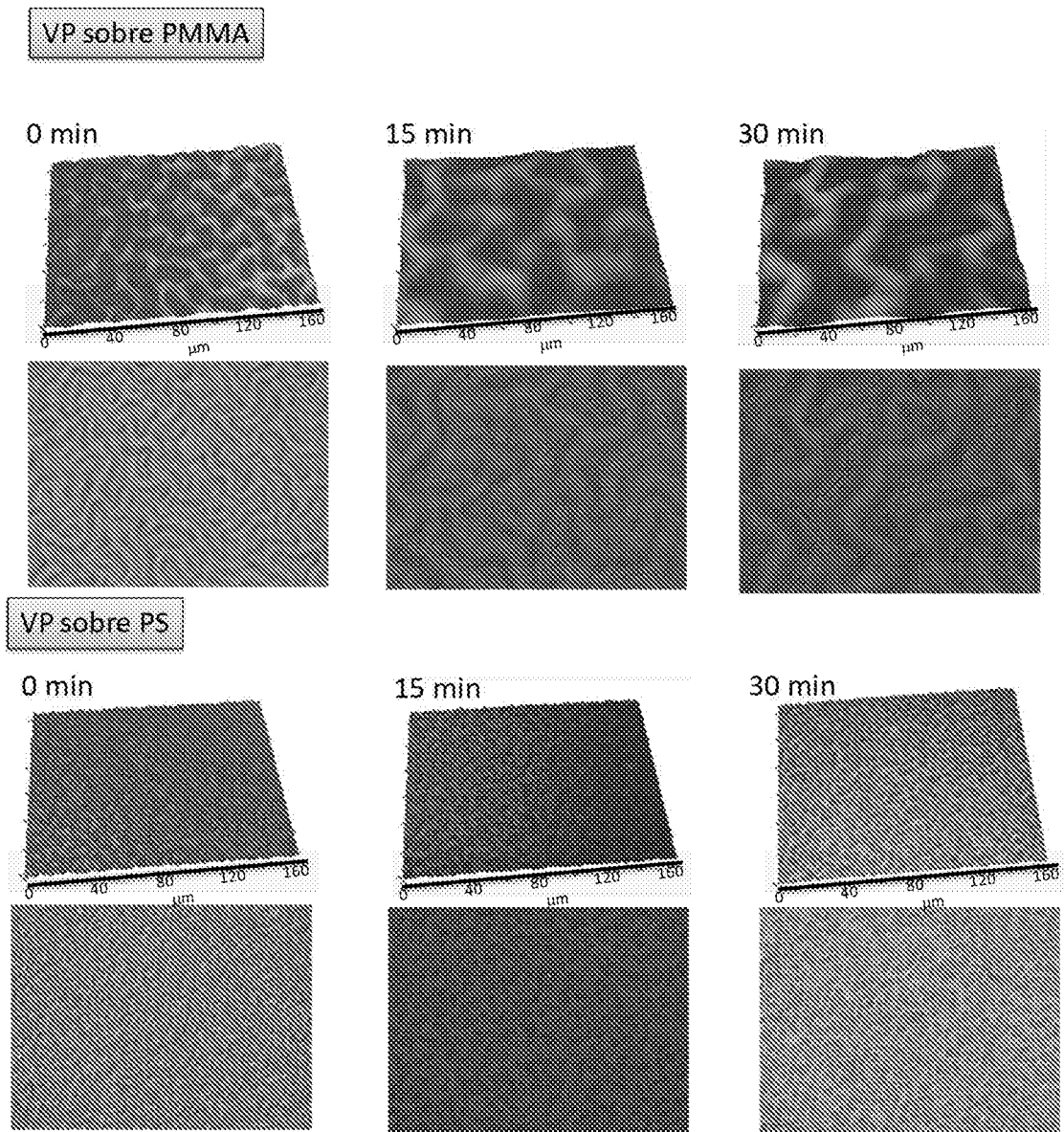


Fig.10

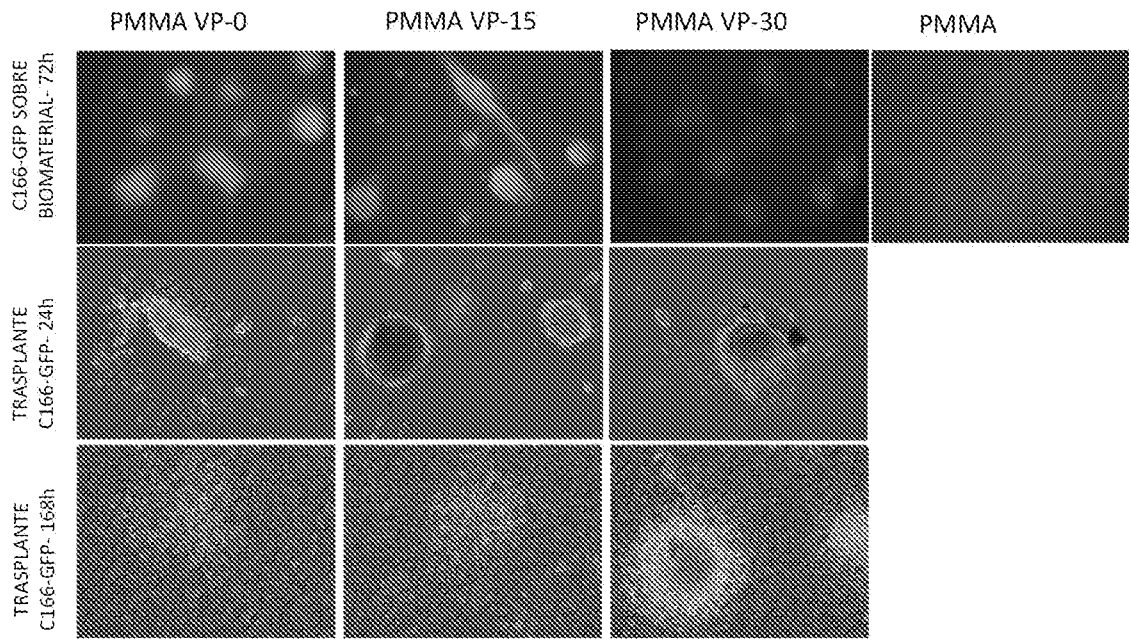


FIG 11

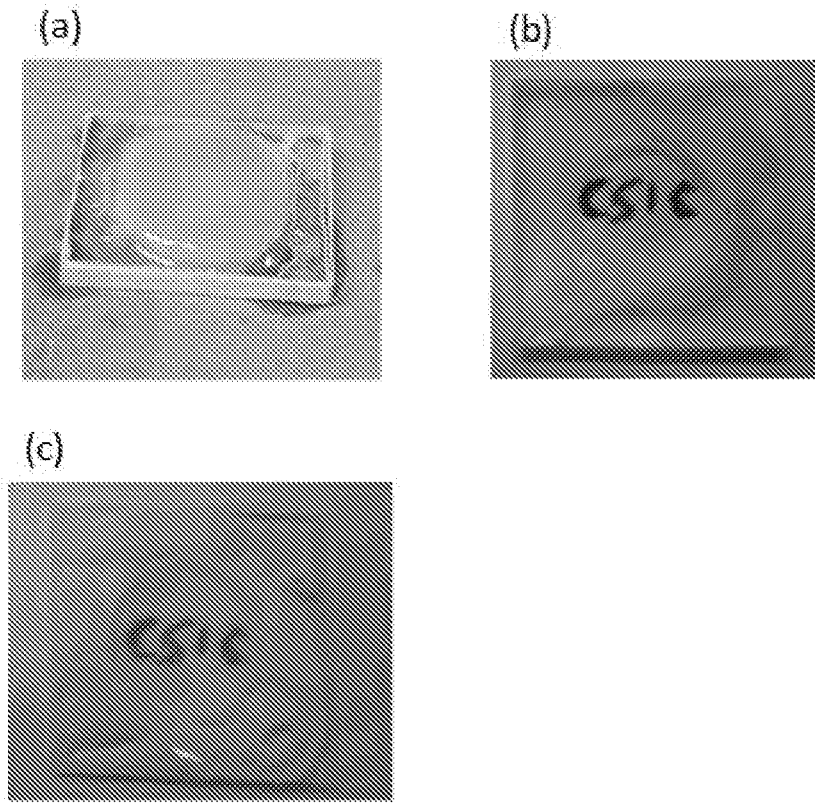


Fig. 12

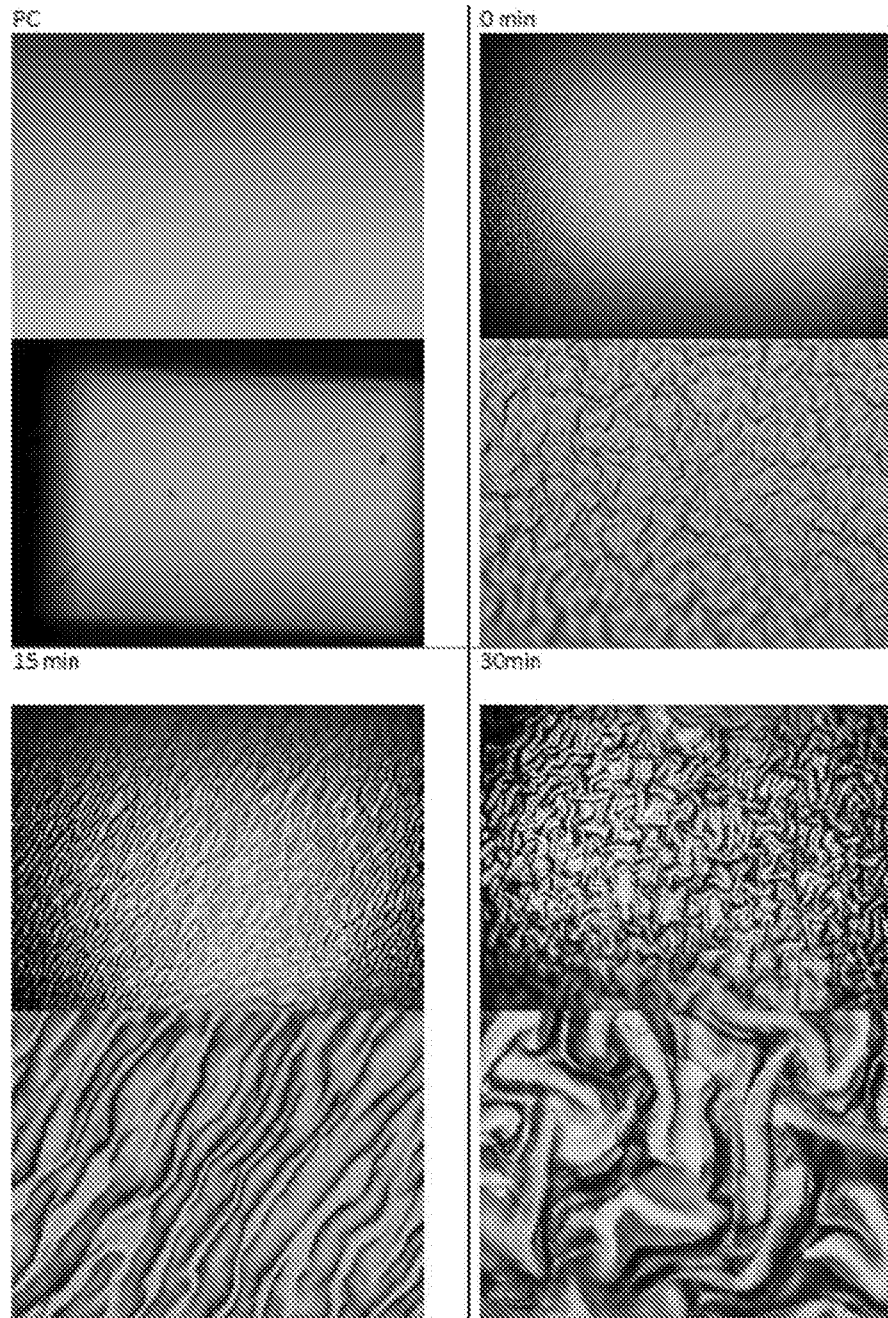


FIG. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08F, C08J, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, Bases de datos de patentes de texto completo, NPL, XPESP, COMPDX, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009191634 A1 (MARTIN ARTHUR W. et al.) 30/07/2009, paragraphs [0026], [0035], table 2, claim 14.	1, 17-22, 27, 29-34
Y		2-16, 23-26, 28
Y	WO 2014195552 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS et al.) 11/12/2014, examples.	2-16, 23-26, 28
A	BORA LEE et al. Initiated chemical vapor deposition of thermoresponsive poly (N-vinylcaprolactam) thin films for cell sheet engineering. Acta Biomaterialia, 2013, Vol. 9, pages 7691-7698. See abstract.	1-34
A	YOUN MOOK LIM et al. Cell Sheet Detachment from Poly(N-vinylcaprolactam-co-N-isopropylacrylamide) Grafted onto Tissue Culture Polystyrene Dishes. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2007, Vol. 13, N° 1, pages 21-26. See page 22.	1-34

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
30/05/2018

Date of mailing of the international search report
(31/05/2018)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Bautista Sanz

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498553

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070029

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BHUVANESH GUPTA et al. Radiation Grafting of Acrylic Acid/N-Vinyl Pyrrolidone Binary Mixture onto Poly(ethylene terephthalate) Fabric and Growth of Human Mesenchymal Stem Cell. Journal of Applied Polymer Science, 2010, Vol. 115, pages 116-126. See the whole document.	1-34
A	BEATA BUTRUK et al. Polyvinylpyrrolidone-based coatings for polyurethanes-The effect of reagent concentration on their chosen physical properties. Chemical and Processing Engineering, 2012, Vol. 33, N° 4, pages 563-571. See page 564.	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2018/070029

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2009191634 A1	30.07.2009	WO2009099539 A2 WO2009099539 A3	13.08.2009 27.05.2010
----- WO2014195552 A1	----- 11.12.2014	----- ES2526469 A1 ES2526469 B1	----- 12.01.2015 26.10.2015
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070029

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08F26/06 (2006.01)

C08F26/10 (2006.01)

C08J7/04 (2006.01)

C12N5/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070029

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C08F, C08J, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, Bases de datos de patentes de texto completo, NPL, XPESP, COMPDX, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 2009191634 A1 (MARTIN ARTHUR W et al.) 30/07/2009, párrafos [0026], [0035], tabla 2, reivindicación 14.	1, 17-22, 27, 29-34
Y		2-16, 23-26, 28
Y	WO 2014195552 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS et al.) 11/12/2014, ejemplos.	2-16, 23-26, 28
A	BORA LEE et al. Initiated chemical vapor deposition of thermoresponsive poly (N-vinylcaprolactam) thin films for cell sheet engineering. Acta Biomaterialia, 2013, Vol. 9, páginas 7691-7698. Ver resumen.	1-34
A	YOUN MOOK LIM et al. Cell Sheet Detachment from Poly(N-vinylcaprolactam-co-N-isopropylacrylamide) Grafted onto Tissue Culture Polystyrene Dishes. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2007, Vol. 13, Nº 1, páginas 21-26. Ver página 22.	1-34

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
30/05/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
31 de mayo de 2018 (31/05/2018)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Bautista Sanz
Nº de teléfono 91 3498553

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070029

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	BHUVANESH GUPTA et al. Radiation Grafting of Acrylic Acid/N-Vinyl Pyrrolidone Binary Mixture onto Poly(ethylene terephthalate) Fabric and Growth of Human Mesenchymal Stem Cell. Journal of Applied Polymer Science, 2010, Vol. 115, páginas 116-126. Ver todo el documento.	1-34
A	BEATA BUTRUK et al. Polyvinylpyrrolidone-based coatings for polyurethanes- The effect of reagent concentration on their chosen physical properties. Chemical and Processing Engineering, 2012, Vol. 33, Nº 4, páginas 563-571. Ver página 564.	1-31

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2018/070029

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2009191634 A1	30.07.2009	WO2009099539 A2 WO2009099539 A3	13.08.2009 27.05.2010
-----	-----	-----	-----
WO2014195552 A1	11.12.2014	ES2526469 A1 ES2526469 B1	12.01.2015 26.10.2015
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C08F26/06 (2006.01)

C08F26/10 (2006.01)

C08J7/04 (2006.01)

C12N5/00 (2006.01)