

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 208**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61L 27/34** (2006.01)  
**A61L 27/38** (2006.01)  
**A61L 27/50** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C08L 89/00** (2006.01)  
**C07K 14/78** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012** **PCT/ES2012/070431**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012** **WO12168532**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012** **E 12796308 (0)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2737913**

54 Título: **Biopolímero termosensible y bioactivo y método de recolección celular asociado**

30 Prioridad:

**09.06.2011 ES 201130962 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.12.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)**  
**Plaza de Santa Cruz, 5 bajo**  
**47002 Valladolid, ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ-CABELLO, JOSÉ CARLOS;**  
**ARIAS VALLEJO, FRANCISCO JAVIER;**  
**ALONSO RODRIGO, MATILDE;**  
**SANTOS GARCÍA, MERCEDES y**  
**PIERNA ÁLVAREZ, MARÍA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 595 208 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

Biopolímero termosensible y bioactivo y método de recolección celular asociado

La presente invención pertenece al campo de la ingeniería de tejidos y se refiere a un biopolímero y a un almacén de recolección celular que comprende dicho biopolímero que permite la recolección celular de manera sencilla y eficaz. Las células adheridas al almacén se liberan mediante un simple cambio de temperatura, preservando las proteínas de la superficie celular y manteniendo una elevada viabilidad celular. Además, la superficie puede presentar selectividad para diversas líneas celulares ya sea de forma global o localizada y no libera residuos en el tejido generado, debido a que el biopolímero termosensible está covalentemente unido al almacén.

## Técnica anterior

En el campo de la ingeniería de tejidos, la combinación de diversos materiales con células vivas proporciona un medio novedoso e interesante para realizar terapias regenerativas. Las superficies pueden funcionalizarse para proporcionarles propiedades adherentes o antiadherentes, grupos específicos que promueven interacciones entre el material y las células, un comportamiento inteligente (sensibilidad a estímulos) o micro o nanopatrones.

Tanto las superficies inteligentes como los sistemas de liberación de fármacos, los órganos artificiales y los sistemas para medicina regenerativa se desarrollan normalmente usando nuevos materiales biofuncionales con propiedades de interés notable en el campo de la investigación biomédica, siendo dichos materiales sensibles a diferentes estímulos. Más específicamente, hay disponibles materiales que son sensibles a una amplia gama de estímulos tal como luz, temperatura, pH, fuerza iónica o campos eléctricos para dichas aplicaciones. Un estímulo específico puede modificar el estado o la configuración de diversas biomoléculas, alterando de este modo la afinidad de las mismas por una determinada superficie y, en consecuencia, impidiendo la adsorción de las mismas (Hyun, J. *et al.* 2004 *Journal of the American Chemical Society*. 126, 7330-7335). En otras palabras, dichos sistemas responden a estímulos.

Las superficies sensibles a la temperatura obtenidas a partir de determinados materiales experimentan un cambio en su conformación molecular como respuesta a cambios de temperatura en el ambiente. Algunos polímeros presentan un comportamiento opuesto en respuesta a la temperatura. Dichos polímeros se vuelven menos solvatados cuando se incrementa la temperatura y precipitan en solución a la temperatura conocida como "*temperatura crítica inferior de disolución*" (LCST, del inglés *lower critical solution temperature*). Los polímeros que responden a estas características, utilizados en bioaplicaciones incluyen poliacrilamidas N-alquil-sustituidas, polialcoholes o polipéptidos. Estos últimos pueden ser tanto naturales como producidos usando técnicas de ingeniería genética y, en consecuencia, poseer altos niveles de especificidad, contener grupos específicos para un gran número de aplicaciones e incluso ser biodegradables. Los polímeros tipo elastina (ELP, del inglés *elastin-like polymers*) son un excelente ejemplo de dichos polipéptidos (Cole, M. A. *et al.* 2009 *Biomaterials*. 30, 1827-50).

El crecimiento y la liberación de células, más específicamente de láminas de células, es una de las aplicaciones biomédicas más estudiadas y de mayor interés en que se usan superficies inteligentes sensibles a la temperatura.

El modelo para dichos sistemas sensibles a la temperatura más común y ampliamente estudiado es probablemente la poli(N-isopropilacrilamida) (PIPAAm) que fue desarrollada por Okano. La PIPAAm presenta una LCST de 32 °C en solución acuosa. Por debajo de dicha temperatura la PIPAAm está completamente hidratada en solución acuosa, con una conformación extendida, mientras que por encima de la LCST esta deshidratada y compactada. Por tanto, las superficies de PIPAAm permiten modular las interacciones moleculares sobre la base de la temperatura y pueden encontrarse numerosos estudios de adhesión/desadhesión dependiente de la temperatura reversible de proteínas y células de mamífero y bacterias (Cole, M. A. *et al.* 2009 *Biomaterials*. 30, 1827-50).

Se conocen diversos polímeros con propiedades que responden a la temperatura similares a las de PIPAAm, que permiten el cultivo de una amplia gama de células adoptando un estado colapsado por encima de su temperatura de transición (37 °C). Una reducción de la temperatura por debajo de esta temperatura crítica del polímero provoca que dicho polímero se despliegue y comience a liberar células vivas o si dichas células han alcanzado la confluencia, una lámina celular intacta. Por tanto, es posible recolectar rápidamente células individuales o láminas celulares intactas usando simplemente bajando la temperatura (Kikuchi, A *et al.* 1998. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*. 9, 1331-1348).

La liberación de células desde las superficies involucra tanto una reducción de las interacciones entre ellas y la superficie como resultado de la hidratación espontánea de las cadenas poliméricas unidas a dicha superficie como un cambio activo en la morfología y en la actividad metabólica de las células. En consecuencia, como resultado de un simple cambio de temperatura, dichos polímeros sensibles a la temperatura permiten recolectar cultivos confluentes de un gran número de tipos celulares en forma de una capa de células, parecido a lo que puede ser un tejido, manteniendo las interacciones entre células y entre las células y las proteínas de la matriz extracelular (Kushida, A. *et al.* 1999. *Journal of Biomedical Materials Research*. 45, 355-362).

La retirada de células del cultivo siempre ha requerido métodos enzimáticos o mecánicos agresivos que tienen efectos nocivos en la morfología de las células que se están recolectando. Dichos cambios en la morfología han sido recientemente atribuidos a alteraciones de la membrana celular y el glucocálix, y con frecuencia dan como resultado una pérdida de actividad celular. Se ha demostrado que dichos cambios también afectan a la matriz extracelular, la cual es esencial para la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células, que tiene de este modo implicaciones importantes durante el cultivo celular. Se ha demostrado que el método para despegar células mediante un descenso en la temperatura es mucho menos destructivo con respecto a obtener una monocapa de células. Además, dicho método provoca un efecto mucho menor sobre la matriz extracelular en comparación con los otros métodos y técnicas más tradicionales. De hecho, pueden obtenerse láminas de células aparentemente sin ningún daño a la matriz extracelular (Canavan, H. E. *et al.* 2005. *J Biomed Mater Res A*. 75, 1-13). Esta técnica se ha aplicado satisfactoriamente a una amplia gama de tipos celulares incluyendo células del músculo liso, hepatocitos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, macrófagos, células de la microglia y células madre.

Usando láminas celulares recolectadas a partir de superficies funcionalizadas con PIPAAm, Okano *et al.* han establecido lo que se conoce como ingeniería de láminas celulares para crear multicapas de tejidos funcionales con el objeto de tratar un amplio intervalo de enfermedades, tales como la disfunción de la córnea, el cáncer de esófago, la resección traqueal y los problemas cardíacos. Más recientemente se ha desarrollado un tejido tridimensional compuesto por las células y la matriz extracelular depositada altamente vascularizada de las mismas para obtener sistemas parecidos a órganos tales como el corazón y el hígado (Yang, J. *et al.* 2007 *Biomaterials*. 28, 5033-43).

Un avance adicional en este campo ha sido el cultivo conjunto de diferentes tipos celulares sobre la misma superficie. Por ejemplo superficies cubiertas con dos polímeros sensibles a la temperatura diferentes, con temperaturas de transición y secuencias de adhesión celular diferentes, permitiendo de este modo el control del sistema (Tsuda, Y. *et al.* 2005 *Biomaterials*. 26, 1885-93).

Otras estrategias han implicado la inmovilización de péptidos que promueven adhesión celular, tales como RGD (Ozturk, N. *et al.* 2009. *Biomaterials*. 30, 5417-26), factores de crecimiento tales como la insulina, factores de crecimiento epidérmicos o ELP sensibles a la temperatura con propiedades adhesivas (Hatakeyama, H. *et al.* 2006 *Biomaterials*. 27, 5069-78) para promover la unión celular y la comunicación entre las células y el material sobre las superficies inteligentes (Ebara, M. *et al.* 2008 *Advanced Materials*. 20, 3034-3038; Mie, M. *et al.* 2008 *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 86, 283-90). Este enfoque muestra el potencial de dichos sistemas en el campo de la ingeniería de tejidos, ya que no se necesitan factores de crecimiento adicionales. Además, pueden seleccionarse y separarse diferentes tipos celulares mediante el uso de dominios específicos de adhesión celular, por ejemplo células endoteliales usando el dominio REDV (Girotti, A. *et al.* 2004 *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 15, 479-484). De este modo, los polipéptidos, ya sean naturales o sintetizados usando técnicas de ingeniería genética a través de la tecnología del ADN recombinante disponible para sintetizar genes repetitivos (Rodríguez-Cabello J.C. *et al.* 2010 *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 15(4): 479-84, Macewan, S. R. *et al.* 2010 *Biopolymers* 94(1): 60-77), han mostrado un gran potencial en aplicaciones biomédicas ya que dichos péptidos pueden producirse con altos niveles de especificidad, conteniendo grupos funcionales como dominios de adhesión celular, dominios de entrecruzamiento para unión covalente a la superficie y/o dominios que pueden ser reconocidos por proteasas más o menos específicas que convierten dichos polipéptidos en biodegradables. Por tanto, un único polímero puede contener diferentes dominios conservando al mismo tiempo la respuesta inteligente a la temperatura. Los ELP son algunos de los mejores ejemplos de dichos polímeros. Por ejemplo, Na *et al.* han creado biochips basados en células aprovechando la ventaja que proporciona la rápida respuesta de un material inteligente a los estímulos externos para crear superficies mediante adsorción de ELP. La transición inteligente de los ELP significa que cuando dichos compuestos se unen a una superficie de vidrio, dicha superficie cambie de un estado hidrófobo a uno hidrófilo y viceversa, en función de la temperatura, permitiendo de este modo el control de la adhesión reversible de células mediante la temperatura de incubación (Na, K. *et al.* 2008 *Langmuir*. 24, 4917-23; Rodríguez-Cabello, J.C. *et al.* 2010 *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1-35).

Además, se ha demostrado que es posible despegar células individuales o láminas celulares usando membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante un simple y pequeño descenso en la temperatura y la transferencia de dichas células y láminas a una nueva superficie para la creación de multicapas celulares, lo que sugiere el gran potencial de este enfoque (Zhang, H. *et al.* 2006 *Tissue Eng.* 12, 391-401).

Continuando con esta idea, Mie *et al.* han usado técnicas genéticas para desarrollar una nueva matriz extracelular que contiene dos ELP con diferentes funcionalidades (cola de polihistidinas y secuencia RGD) para recolectar una lámina de células desde una placa de cultivo mediante la reducción de la temperatura (Mie, M. *et al.* 2008 *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 86, 283-90).

En consecuencia, los ELP son excelentes candidatos para la recolección celular debido al carácter inteligente con respecto a la temperatura, la biocompatibilidad y la capacidad para incorporar dominios de adhesión celular, entrecruzamiento o biodegradabilidad en la secuencia de los mismos; proporcionando de este modo un alto potencial en aplicaciones biomédicas. Además, dichos sistemas son apropiados para la recolección celular no mecánica y sin tripsina, evitando de esta manera los inconvenientes inherentes a estos procedimientos, tales como

la necesidad de una experiencia exhaustiva y el daño ocasionado en las proteínas de la superficie celular, con la consecuente disminución de la viabilidad celular.

*Tissue Engineering* 122), páginas 391-402 (Febrero de 2006) y *Biophysical journal* 97, páginas 312-320 (2009) proporcionan ejemplos de biopolímeros sensibles a la temperatura.

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a biopolímeros, a superficies sensibles a la temperatura y bioactivas que comprenden los mismos y a su uso para la recolección celular.

La naturaleza sensible a la temperatura de los biopolímeros de la invención permite una recolección celular rápida y eficaz como resultado de un simple cambio de temperatura consiguiendo una viabilidad superior a la conseguida con otros procedimientos descritos en la técnica anterior. Además, debido a que es posible diseñar biopolímeros con secuencias específicas de unión celular a uno o más tipos celulares, es posible construir sustratos selectivos para ingeniería de tejidos.

Los sistemas descritos en la técnica anterior presentan algunas carencias ya que, por ejemplo, parte del polímero depositado en la superficie se introduce en las láminas o células recolectadas como contaminante que se arrastra en las etapas sucesivas con los riesgos que esto conlleva, y todavía no es posible disponer o agrupar de forma eficaz diferentes tipos de células de manera ordenada o estructurada en una lámina. En este sentido, el polímero de la invención presenta una gran ventaja, ya que en lugar de depositarse sobre la superficie de manera indiscriminada, dicho polímero se injerta mediante un enlace covalente de forma controlada de manera que el sistema sigue siendo sensible a la temperatura y eficaz para la recolección celular.

Los autores de la presente invención han descrito un sistema para cultivos celulares en superficie que permite la recolección celular de manera sencilla y eficaz. La superficie sobre la que se cultivan las células se modifica para permitir la unión covalentemente de biopolímeros sensibles a la temperatura, que a su vez unen selectivamente diferentes tipos celulares. Las células adheridas pueden liberarse de la superficie mediante un simple cambio de temperatura, preservando las proteínas de la superficie celular y manteniendo una elevada viabilidad celular. Además, las células pueden unirse a la superficie de cultivo entera o localmente.

Debido a que los biopolímeros sensibles a la temperatura utilizados se injertan mediante enlace covalente en la superficie, la liberación del tejido generado se produce sin arrastrar restos del biopolímero.

En general, el biopolímero de la presente invención se basa en repeticiones de dominios presentes en la elastina natural, que son atóxicos y por tanto adecuados para la interacción con las células. Además, presenta un dominio central bioactivo basado en una secuencia de unión celular y un dominio con grupos reactivos, tal como por ejemplo el grupo amino de la lisina, para el enlace covalente a la superficie de cultivo.

El biopolímero de la presente invención se ha producido mediante la tecnología del ADN recombinante.

Análogamente, la presente invención se refiere a cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para la secuencia de aminoácidos de los biopolímeros de la invención, a los usos de los mismos y a un método de síntesis de los mismos.

En la presente invención se producen superficies bioactivadas con polímeros injertados mediante química "clic". Dichas superficies, que inducen la adhesión celular selectiva, la proliferación celular y el desarrollo de tejidos sobre ellas, responden a la temperatura como sistema para conmutar y controlar su bioactividad. De esta forma, una vez que se han cultivado las células o se ha formado el tejido o las capas celulares, dichas células, tejidos o capas se desadhieren de la superficie sin dañarse ni contaminarse, demostrando de este modo que el sistema de recolección celular es rápido, sencillo de manejar y eficaz. Además, es posible predefinir un patrón sobre la superficie de manera que las células tengan mayor afinidad por diferentes zonas de dicha superficie e incluso se estructuren en la monocapa siguiendo ese mismo patrón.

En consecuencia, la presente invención se fundamenta en tres pilares. El primero de ellos es la posibilidad de anular la capacidad de adhesión celular del amazón como resultado de la sensibilidad a la temperatura del biopolímero. El segundo es la posibilidad de diseñar biopolímeros con diferentes bioactividades o secuencias de unión celular específicas. Y el tercero es la capacidad de injertar los polímeros de manera permanente y controlada de manera que dicha superficie conserve sus anteriores atributos.

Los biopolímeros se han obtenido con un alto grado de eficiencia, complejidad, control y robustez. Dichos atributos surgen al tener en cuenta las fuerzas hidrofóbicas de los aminoácidos. Por tanto, es posible un control preciso y cuantitativo del fenómeno de transición inversa que se da en estos materiales y por tanto de la temperatura ( $T_1$ ) a la que estos polímeros pasan de ser bioactivos a no bioactivos.

Los biopolímeros se han obtenido usando la tecnología de ADN recombinante, mediante la clonación de una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos del biopolímero de la invención en un vector capaz de expresar dicha secuencia. Esta tecnología hace uso de la maquinaria de replicación, transcripción y traducción de los organismos capaces de producir los biopolímeros.

Los biopolímeros de la invención contienen dominios laterales tipo elastina que dotan a dichos biopolímeros de la respuesta térmica necesaria. Además, los biopolímeros contienen un dominio central bioactivo que contiene una secuencia de unión celular (RGD, REDV, etc.). Por último, dichos biopolímeros contienen un dominio reactivo químicamente en sus extremos, tal como por ejemplo los grupos amino de la lisina (Figura 1).

El injerto del polímero a la superficie se realiza mediante la activación de dicha superficie mediante la biofuncionalización de la misma mediante enlace covalente por reacción química de ciclación de tipo "clic". Una vez biofuncionalizada, las células se siembran en la superficie y se cultivan hasta que se produce la formación de tejido. En esta etapa la temperatura se disminuye a un valor inferior a la temperatura de transición del polímero bioactivo, modificando de esta manera la conformación de dicho polímero para proporcionar un sustrato no adherente del que la capa celular se separa espontáneamente.

La explicación a nivel molecular del fenómeno de adhesión-desadhesión se basa en una auto-organización de las cadenas moleculares en la nanoescala, dicha organización se produce como resultado de los cambios de temperatura del sistema. En este proceso, a la temperatura del cultivo y en presencia de agua las cadenas se encuentran en una conformación plegada en la que los dominios de unión celular polares tienden a estar expuestos hacia el exterior. Tras disminuir la temperatura, estas cadenas se despliegan dejando los dominios de unión celular inaccesibles a las células, convirtiéndose en una superficie no adherente de la que se despegan las células (Figura 2).

En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un biopolímero que comprende los péptidos A, B y D, con la estructura [(D-B<sub>n</sub>-A<sub>m</sub>-B<sub>s</sub>)], donde

A tiene la estructura (F<sub>t1</sub>-G-F<sub>t2</sub>), donde

F tiene la estructura X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>, donde X<sub>1</sub> y X<sub>4</sub> pueden ser cualquier aminoácido excepto los aminoácidos prolina, lisina, serina y cisteína, X<sub>2</sub> es el aminoácido prolina, X<sub>3</sub> puede ser el aminoácido glicina o el aminoácido alanina y X<sub>5</sub> es el aminoácido glicina,

G es una secuencia de unión celular,

t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub> tienen valores de entre 8 y 12,

B tiene la estructura Y<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub>-Y<sub>3</sub>-Y<sub>4</sub>-Y<sub>5</sub>, donde Y<sub>1</sub> e Y<sub>4</sub> pueden ser cualquier aminoácido excepto los aminoácidos prolina, lisina, serina y cisteína, Y<sub>2</sub> es el aminoácido prolina, Y<sub>3</sub> puede ser el aminoácido glicina o el aminoácido alanina y Y<sub>5</sub> es el aminoácido glicina,

D comprende un péptido de 2 a 10 aminoácidos iguales o diferentes seleccionados entre una lista que comprende lisina, cisteína, serina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico,

n tiene un valor de entre 10 y 18,

m tiene un valor de entre 1 y 3, y

s tiene un valor de entre 10 y 18.

El péptido A es la secuencia de aminoácidos bioactiva que comprende la secuencia de unión celular. Tanto el péptido B como el péptido F son dominios de tipo elastina. El péptido D es el dominio reactivo ya que dicho péptido contiene los aminoácidos polares que van a permitir el injerto covalente del biopolímero en la superficie a través de los grupos reactivos contenidos en las cadenas laterales del mismo.

De acuerdo con las estructuras descritas que dan origen a los biopolímeros de la invención, las secuencias de aminoácidos (puede usarse el término "péptidos" indistintamente para referirse a las secuencias de aminoácidos) A, B, D, F y G pueden estar unidos por enlace covalente o a través de cualquier otro tipo de enlace que conduzca a una estructura que mantenga las propiedades de los biopolímeros de la presente invención. Dicho enlace se selecciona, pero no se limita a, de la lista que comprende puentes de hidrógeno, apareamiento iónico, asociación hidrofóbica o formación de complejos de inclusión.

En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención, G es una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido que se selecciona entre la lista que comprende RGD, LDT, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18 o SEQ ID NO. 19 o un dominio de unión a heparina o un dominio de unión para azúcares derivado de lectina y aglutinina. Preferentemente, G comprende el dominio RGD. Más preferentemente, G es SEQ ID NO. 1.

- El dominio RGD es bien conocido y comprende, como su nombre indica, los aminoácidos arginina, glicina y ácido aspártico. Dicho dominio es reconocido por proteínas de la superficie celular de diversos tipos celulares y funciona como un dominio de adhesión celular. SEQ ID NO. 16 es el dominio REDV, que también es bien conocido y comprende, como su nombre indica, los aminoácidos arginina, ácido glutámico, ácido aspártico y valina; dicho dominio también funciona como un dominio de adhesión celular y es reconocido por células endoteliales. Un dominio de unión a heparina funciona como dominio de unión celular puesto que dicho dominio se une a glucosaminoglucanos de la superficie celular. Análogamente, un dominio de unión a azúcares permite la unión a las células a través de los azúcares que presentan las glucoproteínas de membrana. La lectina y la aglutinina tienen dominios de unión a azúcares bien conocidos. SEQ ID NO. 18 está presente en la laminina y es reconocida por diversos tipos celulares, SEQ ID NO. 19 es reconocida por neuritas, es decir, cualquier proyección del soma de una neurona, ya sea una dendrita o un axón. Estas secuencias, que forman parte del biopolímero de la invención, son reconocidas por sus respectivos tipos celulares y promueven la unión de los mismos. Los biopolímeros que contengan SEQ ID NO. 16 o SEQ ID NO. 19 pueden usarse para generar tejidos vasculares o tejidos nerviosos, respectivamente.
- El dominio G debe presentar una secuencia de unión celular eficaz para que el biopolímero de la invención funcione adecuadamente en un sistema de recolección celular, como muestran los ejemplos de la presente invención.
- En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención,  $X_1$  es el aminoácido valina, leucina o isoleucina. Preferentemente, F es SEQ ID NO. 2.
- En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención,  $Y_1$  es el aminoácido valina, leucina o isoleucina. Preferentemente, B es SEQ ID NO. 3.
- En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención, D comprende un péptido de 3 a 5 aminoácidos idénticos o diferentes seleccionados entre una lista que comprende lisina, cisteína, serina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico.
- En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención, los aminoácidos idénticos o diferentes del péptido del que se compone D se seleccionan entre una lista que comprende lisina, cisteína, serina, asparagina y glutamina. Preferentemente, los aminoácidos del péptido del que se compone D son iguales y son el aminoácido lisina.
- El dominio D debe comprender al menos dos aminoácidos cuya cadena lateral presente un grupo reactivo, siendo necesario dicho grupo para la reacción que permitirá el injerto de la molécula de biopolímero a través de uno de sus extremos a la superficie de cultivo mediante enlaces covalentes. En consecuencia, D comprende entre 2 y 10 aminoácidos polares con un grupo reactivo en la cadena lateral (tal como lisina, cisteína, serina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico), preferentemente entre 3 y 5 de dichos aminoácidos.
- Se prefieren los aminoácidos lisina, cisteína, serina, asparagina y glutamina para la unión covalente entre el biopolímero y la superficie mediante la modificación a azida de los grupos amina de las cadenas laterales de dichos aminoácidos. Cuando se usan dichos aminoácidos en el dominio D, dicho dominio se sitúa en el extremo N-terminal del biopolímero. La lisina es el aminoácido preferido para formar los enlaces covalentes entre el dominio D del biopolímero y la superficie de cultivo debido a la facilidad con la que el grupo amino de la cadena lateral del mismo experimenta una reacción de sustitución nucleófila con el reactivo de azida, como puede verse en los ejemplos de la presente invención.
- Los aminoácidos con un grupo carboxilo en su cadena lateral, tal como ácido aspártico y ácido glutámico, también pueden usarse para unir covalentemente el extremo del biopolímero a la superficie, aunque en este caso mediante otras reacciones bien conocidas por el experto en la materia. Cuando se usan dichos aminoácidos en el dominio D, dicho dominio se sitúa en el extremo C-terminal del biopolímero, ya que el grupo carboxilo terminal del propio biopolímero puede participar también en la formación del enlace covalente con la superficie.
- La lisina es el aminoácido preferido para formar los enlaces covalentes entre el dominio D del biopolímero y la superficie de cultivo debido a la facilidad con la que el grupo amino de la cadena lateral del mismo experimenta una reacción de sustitución nucleófila con el reactivo de azida, como puede verse en los ejemplos de la presente invención.
- En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención,  $t_1$  y  $t_2$  tienen valores de entre 9 y 11.
- En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención, n tiene un valor de entre 12 y 16.
- En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención, m tiene un valor de entre 1 y 2.

En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención, s tiene un valor de entre 12 y 16.

5 En una realización preferida del biopolímero del primer aspecto de la presente invención, D es el péptido SEQ ID NO. 4, B es el péptido SEQ ID NO. 3, n y s tienen un valor de 14, F es el péptido SEQ ID NO. 2, t1 y t2 tienen un valor de 10, G es el péptido SEQ ID NO. 1 y m tiene un valor de 2.

10 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos del biopolímero del primer aspecto de la invención. Preferentemente, dicho ácido nucleico es un vector de expresión.

15 La expresión "vector de expresión" (en lo sucesivo en el presente documento vector de la invención o vector de la presente invención) se refiere a un fragmento de ADN que es capaz de replicarse a sí mismo en un determinado huésped y, como la expresión indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN (inserto) fusionado al mismo. Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender cualquiera de las secuencias nucleotídicas que codifican para cualquiera de los biopolímeros de la invención, fusionadas al mismo, que pueden replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir ningún otro tipo de vectores que se correspondan con la definición dada de un vector.

20 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una célula aislada transfectada con el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.

25 El término "célula", como se usa en la presente invención, se refiere a una célula procariota o eucariota. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar un ADN externo transformado, tal como cualquiera de las cepas de la especie *Escherichia coli* o una bacteria capaz de transferir el ADN de interés al interior de una planta, tal como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*. Preferentemente, la célula se refiere a una célula eucariota vegetal y dentro de este grupo, más preferentemente, a las células pertenecientes al reino *Plantae*. Por tanto, en el caso de que la célula sea una célula vegetal, el término célula comprende, al menos, una célula parenquimática, una célula meristemática o cualquier tipo de célula diferenciada o indiferenciada. Análogamente, también se incluye en esta definición un protoplasto (una célula de una planta que carece de pared celular).

30 El término "transfección" se refiere a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se usa el término transducción) u otras herramientas de transferencia. Para métodos no virales, el término transfección se usa para referirse a células eucariotas de mamífero, mientras que el término transformación se prefiere para describir la transferencia no viral de material genético en bacterias y células eucariotas no animales tales como hongos, algas o plantas.

35 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del biopolímero del primer aspecto de la invención, del ácido nucleico del segundo aspecto de la invención o de la célula del tercer aspecto de la invención, para la preparación de un armazón para la recolección celular.

40 El término "armazón" de recolección celular es una superficie de cualquier tipo sobre la cual pueden adherirse células. Se conocen un gran número de armazones de cultivo celular, tales como placas, partículas, frascos, cubetas, superficies porosas, membranas y demás, que pueden comprender uno o más materiales, tales como plásticos preparados para cultivo celular, vidrio y otros, que a su vez pueden estar pretratados con distintas moléculas que permiten y promueven dicho cultivo celular, tales como fibronectina, colágeno, laminina, polilisina, poliornitina, etc. El armazón se refiere solamente a la superficie sobre la cual se siembran las células y no incluye otros accesorios tales como tapones, tapas, etc.

45 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un armazón de recolección celular que comprende el biopolímero del primer aspecto de la invención. Preferentemente, la unión entre el biopolímero y el armazón implica al menos dos enlaces covalentes por molécula de biopolímero, más preferentemente, tres enlaces covalentes por molécula de biopolímero. Preferentemente, reaccionan los grupos amino o los grupos carboxilo de las cadenas laterales de al menos dos de los aminoácidos del péptido D para formar los enlaces covalentes. Preferentemente, la superficie del armazón es lisa o curva. Más preferentemente, el armazón comprende micropartículas. Preferentemente, dichas micropartículas son esféricas o pseudoesféricas.

50 En el caso de biorreactores, puede ser más interesante realizar el cultivo celular sobre micropartículas que sobre una superficie lisa o sobre una superficie más grande.

55 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso del armazón del quinto aspecto de la invención para la recolección celular.

60 Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo de cultivo y recolección celular que comprende el armazón del quinto aspecto de la invención.

El término “dispositivo” para la recolección celular se refiere al equipo necesario para dicho cultivo celular y puede ser una placa, que incluye el armazón y la tapa o una cámara de cultivo dentro de la cual se localiza el armazón que comprende el biopolímero de la invención y que permite regular las condiciones de temperatura y de presión de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, por ejemplo.

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso del dispositivo de recolección celular del séptimo aspecto de la invención para el cultivo y la recolección celular. Preferentemente, se usa un biorreactor para el cultivo celular.

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere a un método de recolección celular que comprende las siguientes etapas:

- (a) funcionalización de un armazón de cultivo celular,
- (b) unir covalentemente el armazón funcionalizado en la etapa (a) a al menos dos de los aminoácidos del péptido D del biopolímero del primer aspecto de la invención,
- (c) poner en contacto una suspensión celular con el armazón obtenido en (b), y
- (d) recolectar las células adheridas a dicho armazón.

El término “funcionalizar” se refiere a la adición de grupos funcionales.

En una realización preferida del método del noveno aspecto de la presente invención, la funcionalización del armazón se realiza con grupos alquínico, con grupos alqueno, con grupos nitrilo, con grupos carbonilo o con grupos imina. Preferentemente, la funcionalización del armazón se realiza con grupos alquínico.

En una realización preferida del método del noveno aspecto de la presente invención, la recolección de las células adheridas al armazón se realiza mediante una disminución de la temperatura del cultivo celular de 10 a 37 °C.

En una realización preferida del método del noveno aspecto de la presente invención, la siguiente etapa se realiza entre las etapas (c) y (d):

- (c') cultivar las células de (c) hasta que proliferen y formen una monocapa.

Las células en cultivo pueden dividirse, de forma que cuando se siembran, dichas células no cubran toda la superficie de cultivo y, a medida que se dividan, formen una capa de una sola célula de grosor que cubra toda la superficie de cultivo. Esto se conoce como formar una monocapa y alcanzar la confluencia.

En una realización preferida del método del noveno aspecto de la presente invención, antes de la etapa (b) los grupos reactivos de las cadenas laterales de al menos dos de los aminoácidos del péptido D del biopolímero del primer aspecto de la invención se transforman en grupos azida.

En una realización preferida del método del noveno aspecto de la presente invención, la unión covalente de la etapa (b) se realiza mediante cicloadición.

La cicloadición mediante la cual se une el biopolímero de la invención al armazón de recolección celular se basa en una estrategia sintética denominada “química clic”. Dicha estrategia está basada en reacciones que permiten el acoplamiento de bloques modulares de una manera selectiva y eficiente tanto en aplicaciones a pequeña escala como en procesos a gran escala. Las reacciones que pueden considerarse dentro de esta estrategia “clic” deben cumplir una serie de requisitos bien definidos, tales como los siguientes: deben ser modulares, aplicables en una amplia gama de situaciones, de elevado rendimiento, generar como subproductos sustancias no tóxicas y deben ser estereoespecíficas (no necesariamente enantioselectivas). Además, dichas reacciones deben poderse realizar en condiciones suaves, a partir de productos de partida fácilmente disponibles y en ausencia de disolventes orgánicos o en presencia de pequeñas cantidades de los mismos y los productos finales deben ser fáciles de aislar.

Aunque diversos tipos de transformaciones pueden considerarse dentro de la categoría de “química clic”, la cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada por Cu(I), que conduce a 1,2,3 triazoles, es el ejemplo más característico y utilizado. Esto se debe a la facilidad con la que pueden sintetizarse derivados de alquino y azida, junto a la estabilidad cinética y la tolerancia de la misma a una amplia gama de grupos funcionales y condiciones de reacción. Dicha reacción puede realizarse en presencia de grupos funcionales y en rendimientos prácticamente cuantitativos.

Un décimo aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención del biopolímero del primer aspecto de la invención que comprende las siguientes etapas:

- (a) cultivar la célula del tercer aspecto de la invención en las condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.
- (b) purificar el biopolímero codificado por dicho ácido nucleico.

El grado de complejidad composicional impuesto por las necesidades del diseño multifuncional no puede alcanzarse mediante técnicas convencionales de síntesis macromolecular. El biopolímero se obtiene como proteína recombinante, mediante técnicas adaptadas de biología molecular y biotecnológica, en microorganismos o plantas modificados genéticamente.

La secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos del biopolímero de la presente invención, se inserta en un vector de expresión definido anteriormente.

La transfección de una célula, como se ha definido en un párrafo anterior, se realiza usando técnicas conocidas en la técnica anterior, por ejemplo, pero no limitadas a, electroporación, biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención en el ADN de la célula huésped, ya sea genómico, cloroplástico o mitocondrial.

La expresión del ácido nucleico en la célula de la invención conduce a un biopolímero que puede ser purificado mediante técnicas conocidas en la técnica anterior.

Como se usa a lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que limiten la presente invención.

#### Descripción de los dibujos

**Figura 1.** Esquema que muestra el biopolímero de la invención anclado a la superficie de cultivo. Los puntos negros representan los dominios reactivos para la unión covalente al sustrato y las formas de estrellas en el medio de la molécula del biopolímero representan el dominio de reconocimiento celular.

**Figura 2.** Esquema que muestra el cultivo celular sobre el biopolímero y cómo las células se separan cuando la temperatura baja de 37 °C a 4 °C, debido a que el dominio de reconocimiento celular ya no está accesible.

**Figura 3.** Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero 1 con el marcador de peso molecular en la calle de la izquierda y el biopolímero 1 en la calle de la derecha. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

**Figura 4.** Análisis de espectrometría de masas (MALDI-ToF, "desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo") del biopolímero 1 que muestra una Masa Molecular experimental de 31.246 Da. El valor teórico es 31.371 Da y la diferencia entre ambos es atribuible al error de medida. También puede observarse el carácter monodisperso de la molécula a partir de la estrechez del único pico.

**Figura 5.** Análisis de infrarrojos (FTIR-ATR, "Infrarrojos por transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada") del biopolímero 1 en el que pueden observarse las señales características de los grupos amida ( $\sim 1700\text{cm}^{-1}$ ) presentes en los polímeros proteicos diseñados.

**Figura 6.** Análisis de calorimetría diferencial de barrido, (CDB) del biopolímero 1 en el que puede observarse la temperatura de Transición Inversa del mismo (24,2 °C).

**Figura 7.** Funcionalización de los polímeros con grupos azida. Inicialmente (1), se genera "in situ" la azida tríflica  $\text{TfN}_3$ , a partir de la correspondiente azida de sodio menos reactiva. En una segunda etapa (2), la azida tríflica actúa como un nucleófilo en una reacción de sustitución con el grupo amino.

**Figura 8.** Análisis de espectrometría de masas (MALDI-ToF) del biopolímero 1' que muestra el aumento de peso molecular de 46 unidades con respecto al biopolímero 1 precursor, debido a la introducción de los grupos azida, que tienen una masa 24 unidades mayor que los grupos amino.

**Figura 9.** Análisis de espectroscopía de infrarrojos FTIR-ATR del biopolímero 1' que muestra la presencia de bandas de absorción características de los grupos amida de los polímeros proteicos ( $\sim 1700\text{cm}^{-1}$ ) junto con una señal característica para el nuevo grupo azida a  $2100\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 10.** Análisis de CDB del biopolímero 1' que muestra la disminución en 1,3 °C de la temperatura de transición inversa de dicho biopolímero (22,8 °C) con respecto a su precursor (24,2 °C) debido a la introducción de grupos menos polares tales como los grupos azida en la estructura del mismo.

**Figura 11.** Esquema que muestra las etapas de funcionalización de las superficies. En la primera etapa se activa la superficie con grupos hidroxilo usando un reactivo tal como la pirafina. En la etapa posterior se genera la superficie funcionalizada con grupos amino mediante enlace covalente entre el silanol generado "in situ" y los grupos hidroxilo. En la tercera etapa se modifican los grupos amino mediante reacción de amidación para

proporcionar la superficie activada por los grupos alquínulos presentes en el extremo de la molécula de reactivo utilizada.

**Figura 12.** Esquema que muestra la reacción de tipo "clic" de biofuncionalización de la superficie con polímeros de tipo elastina. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre un grupo azida y un grupo alquínulo genera el correspondiente 1,2,3-triazol-1,4-disustituido en una reacción en medio acuoso catalizada por el ion Cu(I) generado "in situ" mediante reducción de Cu(II) en presencia de ascorbato.

**Figura 13.** Análisis comparativo de espectrometría de fotoelectrones de Rayos X (XPS) para el vidrio y para las superficies funcionalizadas con grupos amino, grupos alquínulo y polímero 1'. Se deduce un recubrimiento más exhaustivo de la superficie a la que el polímero se une covalentemente a partir de la proporción de silicio menor que en las otras tres muestras. Además, se observa que aumenta la proporción de nitrógeno para las superficies tratadas con respecto al vidrio original. Esto se esperaba debido al contenido en nitrógeno de los grupos amino y amidas de las muestras funcionalizadas con grupos amino y alquino y en las biofuncionalizadas.

**Figura 14.** Análisis de espectrometría de masas de iones secundarios tiempo de vuelo (ToF-SIMS) de la superficie funcionalizada con el polímero 1'. Se observan iones con una masa de 68 ( $C_4H_6N^+$ ) y 72 ( $C_4H_{10}N^+$ ), típicos de la presencia de un recubrimiento de aminoácidos que contiene valina, 70 ( $C_4H_8N^+$ ), típico de la presencia de un recubrimiento de aminoácido que contiene prolina y 86 ( $C_5H_{12}N^+$ ) que muestra la presencia de un recubrimiento de aminoácido que contiene isoleucina.

**Figura 15.** Imágenes de microscopía óptica por contraste de fases (objetivo x10) del mismo campo a 24 h, 25 h, 26 h y 27 h para las 8 superficies diferentes: A) vidrio, B) polímero 1', C) Polímero 2', D) Polímero 3', E) Polímeros 3' + 4, F) Polímero 4', G) Polímero 5', H) Polímero 6'. La barra de escala corresponde a 100 micrómetros.

**Figura 16.** Evaluación del porcentaje de células adheridas frente al total a lo largo del tiempo para 9 campos aleatorios de tres muestras replicadas en 4 experimentos independientes para las diversas superficies.

**Figura 17.** Evaluación del número total de células adheridas y no adheridas a lo largo del tiempo en 9 campos aleatorios de tres muestras replicadas en 4 experimentos independientes para las diversas superficies.

**Figura 18.** Evaluación de la viabilidad celular de las células despegadas de las superficies biofuncionalizadas (polímero 1') y de células recién tripsinizadas (control) a diferentes tiempos de incubación para células sobre poliestireno mediante la técnica colorimétrica "Alamar Blue" ( $p < 0,05$ ).

## EJEMPLOS

A continuación se ilustra la invención mediante ensayos realizados por los inventores que describen la síntesis del biopolímero de la presente invención así como sus características. Dichos ejemplos se proporcionan para poder comprender la descripción y no se pretende que limiten la presente invención.

### EJEMPLO 1. Obtención de polímeros proteicos recombinantes tipo elastina.

Las secuencias nucleotídicas de síntesis que codifican para las secuencias de aminoácidos de los diversos biopolímeros utilizados, incluyendo el biopolímero de la invención, se diseñaron y sintetizaron como se describe en el documento WO/2010/092224. De forma similar, los biopolímeros se expresaron, se purificaron y se caracterizaron como se describe en el documento WO/2010/092224.

Se diseñaron los siguientes biopolímeros o polímeros:

#### Biopolímero 1 (371 aminoácidos)

Estructura: D – B<sub>14</sub> – A<sub>2</sub>-B<sub>14</sub>.

Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 7:

**MGKKKP-(VPGVG)<sub>14</sub>-((VPGIG)<sub>10</sub>AVTGRGDSPASS(VPGIG)<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-(VPGVG)<sub>14</sub>-V**

Codificado por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO. 8.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC con detección ultravioleta (UV) pueden encontrarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 1. n.d.: no detectado.

|                         |              | <b>Asp</b> | <b>Ser</b> | <b>Gly</b> | <b>Arg</b> | <b>Thr</b> | <b>Ala</b> |
|-------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 2          | 6          | 141        | 2          | 2          | 4          |
|                         | Experimental | 2,63       | 5,2        | 143,6      | 2,35       | 2,06       | 4,45       |
|                         |              | <b>Pro</b> | <b>Val</b> | <b>Met</b> | <b>Lys</b> | <b>Ile</b> | <b>Leu</b> |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 71         | 99         | 1          | 3          | 40         | 2          |
|                         | Experimental | 71,48      | 96,6       | n.d.       | 2,94       | 39,32      | 0,57       |

El rendimiento de la producción fue de 75 mg/l.

- 5 El Peso Molecular teórico para el polímero 1 es de 31.371 Da y el valor determinado experimentalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 3) y por MALDI-TOF usando un espectrómetro Q-Star fue de 31.250 Da (Figura 4). La figura 5 muestra a modo de ejemplo un espectro de infrarrojos (IR) obtenido para el biopolímero 1. La Temperatura de transición obtenida mediante CDB en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fue de 24,2 °C (Figura 6).

10 El biopolímero 1 es un polímero de tipo elastina que contiene una secuencia de adhesión celular que es capaz de funcionar como sistema de recolección celular. A la luz del carácter inteligente del mismo, cuando se supera la temperatura de transición inversa la conformación del mismo cambia drásticamente de manera que se anula la capacidad de adhesión celular del mismo y da como resultado el despegue de las células de la superficie, una vez  
15 que se ha conseguido un cultivo eficaz de dichas células.

La secuencia de aminoácidos A incluye una secuencia bioactiva RGD no específica, que induce la adhesión celular a la superficie bioactiva a temperaturas superiores a la temperatura de transición inversa coincidente con la temperatura del cultivo celular. La secuencia de aminoácidos B se incluye como vehículo de las propiedades  
20 inteligentes del polímero, produciendo una conformación diferente del polímero dependiendo de la temperatura del entorno, y dicha secuencia impide la adhesión celular por debajo de la temperatura de transición inversa anulando el efecto de la secuencia A de adhesión celular.

La secuencia de aminoácidos D incluye tres aminoácidos lisina que llevan los grupos amino necesarios para unir el polímero a la superficie mediante enlace químico covalente, en otras palabras para obtener las superficies  
25 biofuncionalizadas.

#### Biopolímero 2 (371 aminoácidos)

30 Estructura: D – B<sub>14</sub> – C<sub>2</sub>-B<sub>14</sub>

Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 9:

**MGKKKP-(VPGVG)<sub>14</sub>-(VPGIG)<sub>10</sub>AVTGRDGSPASS(VPGIG)<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-(VPGVG)<sub>14</sub>-V**

35 Codificado por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO. 10.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección de UV pueden encontrarse en la  
40 Tabla 2.

Tabla 2. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 2.

|                         |              | <b>Asp</b> | <b>Ser</b> | <b>Gly</b> | <b>Arg</b> | <b>Thr</b> | <b>Ala</b> |
|-------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 2          | 6          | 141        | 2          | 2          | 4          |
|                         | Experimental | 2,00       | 5,98       | 141,40     | 2,00       | 2,00       | 4,30       |
|                         |              | <b>Pro</b> | <b>Val</b> | <b>Met</b> | <b>Lys</b> | <b>Ile</b> | <b>Leu</b> |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 71         | 99         | 1          | 3          | 40         | 2          |
|                         | Experimental | 71,00      | 98,70      | 1,00       | 2,97       | 39,40      | 2,00       |

El rendimiento de la producción fue de 70 mg/l.

El Peso Molecular teórico para el polímero 2 es de 31.371 Da y el valor determinado experimentalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y MALDI-TOF usando un espectrómetro Q-Star fue de 31.265 Da. La Temperatura de transición obtenida mediante CDB en PBS fue de 23,5 °C.

5 El polímero 2 puede ser capaz de funcionar como sistema de recolección celular. A la luz de su carácter inteligente, cuando se supera la temperatura de transición inversa la conformación del mismo cambia drásticamente y la adhesión celular disminuye, dando como resultado de este modo el despegue de las células de la superficie una vez que se ha conseguido un cultivo eficaz de dichas células.

10 Como el polímero 1, el polímero 2 posee las secuencias de aminoácidos B y D. La secuencia de aminoácidos C incluye una secuencia RDG polar no bioactiva.

#### Biopolímero 3 (427 aminoácidos)

15 Estructura: D – B<sub>84</sub>

Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 11:

MGKKKP-(VPGVG)<sub>84</sub>-V

20 Codificado por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO. 12.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV pueden encontrarse en la Tabla 3.

25 Tabla 3. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 3.

|                         |              | Gly    | Pro   | Val    | Met  | Lys  |
|-------------------------|--------------|--------|-------|--------|------|------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 169    | 85    | 169    | 1    | 3    |
|                         | Experimental | 172,00 | 85,40 | 166,00 | n.d. | 2,99 |

El rendimiento de producción fue de 35 mg/l.

30 El Peso Molecular teórico para el polímero 3 es de 35.191 Da y el valor determinado experimentalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y MALDI-TOF en un espectrómetro Q-Star fue de 35.152 Da. La Temperatura de transición obtenida mediante CDB en PBS fue de 29,4 °C.

35 El polímero de tipo elastina conocido como polímero 3 tiene la capacidad de funcionar como sistema de recolección celular debido a su carácter inteligente, aunque el número de células adheridas es inferior debido a la ausencia de una secuencia bioactiva de adhesión celular. Las secuencias de aminoácidos B y D son las mismas que las de los polímeros 1 y 2.

#### Biopolímero 4 (371 aminoácidos)

40 Estructura: B<sub>14</sub>- A<sub>2</sub> – B<sub>14</sub>

Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 13:

45 MESLLP-(VPGVG)<sub>14</sub>-((VPGIG)<sub>10</sub>AVTGRGDSPASS(VPGIG)<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-(VPGVG)<sub>14</sub>-V

Codificado por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO. 14.

50 La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV pueden encontrarse en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 4.

|                         |              | Asp  | Ser   | Glu   | Gly    | Arg  | Thr   |      |
|-------------------------|--------------|------|-------|-------|--------|------|-------|------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 2    | 7     | 1     | 140    | 2    | 2     |      |
|                         | Experimental | 2,11 | 6,44  | 1,14  | 144,29 | 2,75 | 1,95  |      |
|                         |              | Ala  | Pro   | Val   | Met    | Lys  | Ile   | Leu  |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 4    | 71    | 99    | 1      | 0    | 40    | 2    |
|                         | Experimental | 4,09 | 70,62 | 95,89 | n.d.   | 0,00 | 39,20 | 2,27 |

El rendimiento de la producción fue de 42 mg/l.

El Peso Molecular teórico para el polímero 4 es de 31.371 Da y el valor determinado experimentalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y MALDI-TOF en un espectrómetro Q-Star fue de 31.388 Da. La Temperatura de transición obtenida mediante CDB en PBS fue de 23,8 °C.

El polímero 4 se usa en un sistema que comprende dos biopolímeros, el primero de ellos, el polímero 3, es capaz de injertarse en la superficie y el segundo de ellos, el polímero 4, es capaz de inducir adhesión celular de manera que el sistema es útil como sistema de recolección celular debido a la sinergia del efecto de los polímeros.

En otro experimento realizado, el polímero 4 se utiliza injertado en la superficie una vez que se ha modificado su grupo amino terminal a un grupo azida y sin contener la secuencia D rica en lisinas en el extremo amino terminal.

Las secuencias de aminoácidos A y B son las mismas que las del polímero 1.

#### Biopolímero 5 (699 aminoácidos)

Estructura: H-I<sub>6</sub>

Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 15:

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSH-MESLLP-[(VPGIG)<sub>2</sub>(VPGKG)(VPGIG)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
AVTGRGDSPASS [(VPGIG)<sub>2</sub>(VPGKG)(VPGIG)<sub>2</sub>]<sub>6</sub>-V**

Codificado por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO. 20.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV pueden encontrarse en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 5.

|                         |              | Asp   | Ser    | Glu    | Gly    | Arg   | Thr   |      |
|-------------------------|--------------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 6     | 24     | 1      | 255    | 7     | 6     |      |
|                         | Experimental | 5,22  | 21,67  | 1,15   | 253,12 | 6,95  | 5,65  |      |
|                         |              | Ala   | Pro    | Val    | Met    | Lys   | Ile   | Leu  |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 12    | 128    | 128    | 2      | 24    | 96    | 3    |
|                         | Experimental | 11,85 | 130,23 | 127,95 | n.d.   | 23,55 | 96,87 | 3,95 |

El rendimiento de la producción fue de 51 mg/l.

El Peso Molecular teórico para el polímero 5 es de 60.661 Da y el valor determinado experimentalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y MALDI-TOF en un espectrómetro Q-Star fue de 60.556 Da. La Temperatura de transición obtenida mediante CDB en PBS fue de 32,2 °C.

La secuencia de aminoácidos I es similar a la secuencia A, que porta la secuencia de adhesión celular RGD, pero con la particularidad de que un aminoácido isoleucina del pentapéptido en posición 3 y del pentapéptido en posición 8 de la serie de 10 pentapéptidos que flanquean a la secuencia de adhesión RGD, ha sido cambiado por otro de lisina, que porta grupos amino capaces de ser transformados en grupos azida. De esta manera, dicha secuencia se una a la superficie a través de múltiples enlaces covalentes repartidos a lo largo de la cadena del biopolímero 5, impidiendo de este modo que cambie sustancialmente la conformación de dicha cadena con la temperatura y por tanto demostrando ser un sistema de recolección celular menos eficaz.

#### Biopolímero 6 (343 aminoácidos)

Estructura: D-A<sub>3</sub>

Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 21:

**MGKKKP-((VPGIG)<sub>10</sub>AVTGRGDSPASS(VPGIG)<sub>10</sub>)<sub>3</sub>-V**

Codificado por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO. 22.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV pueden encontrarse en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 6.

|                         |              | Asp   | Ser   | Gly    | Arg  | Thr   | Ala  |
|-------------------------|--------------|-------|-------|--------|------|-------|------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 3     | 9     | 127    | 3    | 3     | 6    |
|                         | Experimental | 3,14  | 8,57  | 128,25 | 3,19 | 2,87  | 6,05 |
|                         |              | Pro   | Val   | Met    | Lys  | Ile   |      |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 64    | 64    | 1      | 3    | 60    |      |
|                         | Experimental | 64,57 | 65,11 | n.d.   | 2,85 | 61,62 |      |

5

El rendimiento de la producción fue de 83 mg/l.

10

El Peso Molecular teórico para el polímero 6 es de 29461 Da y el valor determinado experimentalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y MALDI-TOF en un espectrómetro Q-Star fue de 29.269 Da. La Temperatura de transición obtenida mediante CDB en PBS fue de 23,0 °C.

15

El polímero de tipo elastina conocido como polímero 6 contiene la secuencia de aminoácidos A, que porta la secuencia de adhesión celular RGD repetida tres veces a lo largo de la cadena polipeptídica y contiene la secuencia D, que es la misma que en los polímeros 1-3, lo que le permite unirse al armazón mediante enlace covalente.

#### EJEMPLO 2. Modificación de polímeros 1-6.

##### Modificación del biopolímero 1 para obtener el biopolímero 1'

20

La obtención del biopolímero 1' se realiza por transformación de la secuencia del péptido D, que contiene aminoácidos lisina que llevan grupos amino en la posición gamma. Dichos grupos amino se transforman para posteriormente realizar la reacción de ciclación de tipo "clic". El péptido D transformado se denomina péptido E.

25

Los grupos amino de las lisinas del péptido E se han transformado en grupos azida, por medio de una sustitución utilizando azida triflica generada "*in situ*" como nucleófilo (Figura 7), obteniéndose un rendimiento de la reacción del 89 %. Esto conduce a un polímero inteligente que contiene una secuencia de adhesión celular bioactiva y que puede injertarse por vía química a la superficie.

30

El biopolímero 1' se caracterizó mediante espectrometría MALDI-TOF y proporcionando dicho análisis un peso molecular de 31.296 Da para el polímero (masa molar teórica 31.475 Da, figura 8), observándose un lógico aumento de 46 g/mol debido a la transformación de los grupos amino de las lisinas contenidas en el mismo por grupos azida.

35

El espectro de infrarrojo (FTIR-ATR) del biopolímero 1' obtenido muestra una señal característica de los grupos azida a una frecuencia de  $2.100\text{cm}^{-1}$  (Figura 9), mientras que en el espectro de IR del biopolímero precursor 1 (Figura 5) no se observa ninguna señal de este tipo.

40

Se confirmó el éxito y alcance de la reacción de modificación del polímero 1 examinando el análisis de aminoácidos realizado para el biopolímero 1', que mostró una disminución notable del número de aminoácidos de lisina, permaneciendo el resto de los aminoácidos inalterados. De esta manera, se puede deducir que se han modificado los grupos amino de dichas lisinas y se han transformado en grupos azida, estimándose que se han transformado un 46 % de las lisinas (Tabla 7).

Tabla 7.- Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 1'.

|                         |              | Asp   | Ser   | Gly    | Arg  | Thr   | Ala  |
|-------------------------|--------------|-------|-------|--------|------|-------|------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 2     | 6     | 141    | 2    | 2     | 4    |
|                         | Experimental | 1,73  | 5,5   | 143,05 | 2,28 | 2,16  | 4,33 |
|                         |              | Pro   | Val   | Met    | Lys  | Ile   | Leu  |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 71    | 99    | 1      | 3    | 40    | 2    |
|                         | Experimental | 71,22 | 96,05 | n.d.   | 1,61 | 40,23 | 0,51 |

La respuesta inteligente del biopolímero 1' ocurre a una temperatura de 22,8 °C e inferior en 1,3 °C a la del biopolímero 1 (24,2 °C). Este comportamiento es debido a la introducción de un grupo fuertemente apolar, concretamente el grupo azida, frente al grupo amino de partida (Figura 6).

5 Modificación de los biopolímero 2-6 para obtener los biopolímero 2'-6'.

Los biopolímeros 2-6 se modificaron como se ha descrito para el biopolímero 1 para proporcionar los biopolímeros 2'-6', respectivamente.

10 Los polímeros modificados se caracterizaron de manera similar a 1'. Se realizó un análisis de aminoácidos de dichos polímeros, se determinaron los pesos moleculares (por MALDI-TOF) y las temperaturas de transición inversa (por CDB) de los mismos y los espectros de infrarrojo (FTIR-ATR) de los mismos se analizaron, todos los cuales condujeron a conclusiones semejantes a las alcanzadas anteriormente. Todos estos datos se detallan a continuación.

15 Biopolímero 2' modificado

|                         |              | <b>Asp</b> | <b>Ser</b> | <b>Gly</b> | <b>Arg</b> | <b>Thr</b> | <b>Ala</b> |
|-------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 2          | 6          | 141        | 2          | 2          | 4          |
|                         | Experimental | 2          | 6,36       | 144,53     | 2,35       | 2,19       | 4,8        |
|                         |              | <b>Pro</b> | <b>Val</b> | <b>Met</b> | <b>Lys</b> | <b>Ile</b> | <b>Leu</b> |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 71         | 99         | 1          | 3          | 40         | 2          |
|                         | Experimental | 70,76      | 94,87      | n.d.       | 1,62       | 40,3       | 0,38       |

20 Rendimiento de la reacción: 94 %

Masa molecular teórica: 31.475 Da

Masa molecular experimental media (MALDI-TOF): 31.291 Da

25 Temperatura de transición (CDB) en PBS: 21,8 °C

Tasa de transformación de lisinas: 46 %

30 Biopolímero 3' modificado

Tabla 9. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 3'.

|                         |              | <b>Gly</b> | <b>Pro</b> | <b>Val</b> | <b>Met</b> | <b>Lys</b> |
|-------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 169        | 85         | 169        | 1          | 3          |
|                         | Experimental | 169,39     | 97,84      | 154,78     | n.d.       | 1,51       |

35 Rendimiento de la reacción: 80 %

Masa molecular teórica: 35.295 Da

Masa molecular experimental media (MALDI-TOF): 35.185 Da

40 Temperatura de transición (CDB) en PBS: 27,7 °C

Tasa de transformación de lisinas: 50 %

Biopolímero 4' modificado

45

Tabla 10. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 4'.

|                         |              | Asp  | Ser   | Glu   | Gly    | Arg  | Thr   |      |
|-------------------------|--------------|------|-------|-------|--------|------|-------|------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 2    | 7     | 1     | 140    | 2    | 2     |      |
|                         | Experimental | 2,35 | 6,83  | 1,25  | 145,53 | 2,64 | 2,11  |      |
|                         |              | Ala  | Pro   | Val   | Met    | Lys  | Ile   | Leu  |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 4    | 71    | 99    | 1      | 0    | 40    | 2    |
|                         | Experimental | 4,22 | 70,15 | 97,78 | n.d.   | 0,00 | 39,40 | 2,14 |

Rendimiento de la reacción: 90 %

Masa molecular teórica: 31398 Da

5 Masa molecular experimental media (MALDI-TOF): 31.327 Da

Temperatura de transición (CDB) en PBS: 24,2 °C

#### Biopolímero 5' modificado

10 Tabla 11. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 5'.

|                         |              | Asp    | Ser    | Glu  | Gly    | Arg   | Thr  | Ala   |
|-------------------------|--------------|--------|--------|------|--------|-------|------|-------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 6      | 24     | 1    | 255    | 7     | 6    | 12    |
|                         | Experimental | 4,83   | 20,33  | 1,04 | 252,67 | 7,31  | 5,71 | 11,94 |
|                         |              | Pro    | Val    | Met  | Lys    | Ile   | Leu  |       |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 128    | 128    | 2    | 24     | 96    | 3    |       |
|                         | Experimental | 131,42 | 128,55 | n.d. | 8,49   | 97,74 | 4,62 |       |

Rendimiento de la reacción: 85 %

Masa molecular teórica: 61.285 Da

15 Masa molecular experimental media (MALDI-TOF): 60.900 Da

Temperatura de transición (CDB) en PBS: 22,2 °C

Tasa de transformación de lisinas: 54 %

#### Biopolímero 6' modificado

20 Tabla 12. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 6'.

|                         |              | Asp   | Ser   | Gly    | Arg  | Thr   | Ala  |
|-------------------------|--------------|-------|-------|--------|------|-------|------|
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 3     | 9     | 127    | 3    | 3     | 6    |
|                         | Experimental | 3,08  | 8,92  | 129,16 | 3,26 | 2,74  | 6,18 |
|                         |              | Pro   | Val   | Met    | Lys  | Ile   |      |
| Análisis de aminoácidos | Teórico      | 64    | 64    | 1      | 3    | 60    |      |
|                         | Experimental | 65,15 | 64,58 | n.d.   | 0,52 | 60,83 |      |

Rendimiento de la reacción: 50 %

Masa molecular teórica: 29.565 Da

25 Masa molecular experimental media (MALDI-TOF): 29.302 Da

Temperatura de transición (CDB) en PBS: 21,5 °C

Tasa de transformación de lisinas: 83 %

### EJEMPLO 3. Producción de superficies biofuncionalizadas con los polímeros

30 Una vez que se han modificado los biopolímeros con grupos azida, se obtuvieron las superficies biofuncionalizadas en dos etapas: la primera comprendió en la activación de la superficie de vidrio con grupos alquínico y la segunda en el injerto de los polímeros a dicha superficie a través de un enlace químico covalente.

### Activación de la superficie

En primer lugar se activó la superficie con solución "piraña", una mezcla 7:3 en volumen de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) capaz de eliminar la capa de óxido de silicio presente en la superficie del vidrio dejando grupos hidroxilo libres (-OH) expuestos en la superficie. En la figura 11 se representa el proceso de activación realizado en la superficie del vidrio. Las reacciones sobre la superficie se controlan, entre otras técnicas, mediante la medición del ángulo de contacto de una gota de agua sobre la superficie obtenida después de cada etapa. El cambio en la hidrofobia puede verse mediante la variación de su ángulo de contacto, que disminuye de 48,1 ° para la superficie no activada a 27,3 ° para la superficie activada, cuya hidrofilia aumenta por la presencia de los grupos hidroxilo expuestos en la superficie.

Cada etapa de modificación de la superficie se caracteriza también mediante el análisis por espectrometría de fotoelectrones de Rayos X (XPS), que permite obtener la concentración atómica de los elementos presentes en la superficie con una profundidad analítica de aproximadamente 5 nm. La presente técnica también es capaz de proporcionar información relativa al estado químico de los elementos presentes. En las superficies de vidrio se observa una elevada proporción de Si y O junto con una pequeña proporción de C y de otros elementos presentes como contaminantes. La proporción de Si disminuye ligeramente y la de O aumenta para la superficie activada, junto con una pequeña disminución del C ambiental (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados de XPS de las superficies de vidrio, vidrio activado con solución "piraña" y superficies amino y alquino silanizadas.

|       | VIDRIO |                 | VIDRIO<br>ACTIVADO |                 | AMINO |                 | ALQUINO |                 |
|-------|--------|-----------------|--------------------|-----------------|-------|-----------------|---------|-----------------|
|       | (eV)   | Conc. Atóm. (%) | (eV)               | Conc. Atóm. (%) | (eV)  | Conc. Atóm. (%) | (eV)    | Conc. Atóm. (%) |
| C 1s  | 285    | 12,1            | 285                | 9,8             | 282   | 33,96           | 283     | 48,24           |
| O 1s  | 532    | 41,81           | 532                | 64,4            | 530   | 39,52           | 530     | 25,13           |
| N 1s  | 400    | 0,23            | 400                | 0               | 397   | 2,06            | 397     | 8,15            |
| Si 2p | 102    | 29,7            | 102                | 25,8            | 100   | 24,46           | 101     | 18,18           |

La siguiente etapa comprende la obtención de una superficie funcionalizada con grupos amino, por reacción de los grupos hidroxilo libres expuestos en la superficie recién activada con 3-aminopropilsilanol, generado "in situ" a partir de 3-aminopropiltrimetoxisiloxano (APTS) (Figura 11). La técnica habitual para determinar la modificación de la superficie implica la medida del ángulo de contacto de una gota sobre la superficie, observándose un razonable aumento de la hidrofobia (ángulo de contacto que varía desde 27,3 ° para la superficie activada con grupos hidroxilo libres hasta un ángulo de 78,1 ° para la superficie funcionalizada con grupos aminopropilsiloxano). La superficie también se caracteriza mediante el análisis por XPS. La presencia del grupo aminopropilo se confirma mediante dicho análisis, ya que la presencia de un pico de N 1s, que no está presente en la superficie de vidrio de partida, ni en la superficie activada por la solución de piraña, se observa a 397 eV (Tabla 13) y la proporción de C aumenta para superar eso debido a la posible contaminación ambiental.

Por último, la superficie funcionalizada con grupos alquino se forma mediante amidación de los grupos amino presentes en la superficie con anhídrido pentinico, que lleva grupos alquino terminales, en una reacción catalizada por una base como la trietilamina (Figura 11).

En la figura 11, que muestra las etapas de reacción realizadas, puede verse también que se realizaron mediciones del ángulo de contacto de una gota de agua sobre las superficies obtenidas después de cada etapa. Dichas mediciones permitieron estudiar los cambios de hidrofobia de las superficies y por tanto sirvieron como primer método de control o seguimiento de cada etapa de reacción. Por tanto, la hidrofobia de la superficie funcionalizada con grupos alquino disminuye ligeramente con respecto a la superficie aminofuncionalizada, como se observa a partir de la disminución del ángulo de contacto a 64,5 ° para el anterior.

La superficie alquino funcionalizada presenta un mayor recubrimiento que la superficie amino funcionalizada, como se ve en su análisis de XPS por la disminución de la proporción de Si 2p. Además, se observa una disminución en la proporción de O y una mayor proporción relativa de C y de N, confirmando de este modo la adición del grupo alquino (Tabla 13).

Se obtiene información adicional sobre la estructura molecular del injerto a partir de la comparación de los espectros de alta resolución de las distintas regiones de interés. Es posible identificar los diferentes estados de oxidación de los elementos a estudiar, mediante la deconvolución de sus correspondientes espectros. En el espectro de alta

resolución de la región N 1s de la superficie aminosilanzada puede verse un solo pico a 399,5 eV correspondiente al grupo amino. En el espectro de la superficie alquilosilanzada muestra un segundo pico de nitrógeno a 401,7 eV correspondiente al nitrógeno de mayor estado de oxidación de la amida, lo cual ensaya la formación de un enlace covalente tipo amida. La proporción observada de los dos picos de N de diferente estado de oxidación nos permite deducir por deconvolución que se ha formado un 30 % de acoplamiento de grupos alquililo, proporción suficiente sin ser excesiva para la posterior funcionalización de la superficie con polímeros proteicos.

Los análisis de espectroscopía ToF-SIMS para las superficies amino y alquililo funcionalizadas muestran un espectro similar en ambos casos, difiriendo dichos espectros del observado para la superficie sin funcionalizar fundamentalmente en los iones de masa 23 ( $\text{Na}^+$ ), 30 ( $\text{CH}_4\text{N}^+$ ) y 45 ( $\text{CH}_3\text{NO}^+$ ) (Tabla 14). La menor intensidad del ión  $\text{Na}^+$  permite deducir nuevamente un mayor recubrimiento en las superficies amino y alquililo funcionalizadas. Además, en las superficies funcionalizadas se observan dos nuevos iones ausentes en las superficies no funcionalizadas, en concreto un ión de masa 30 ( $\text{CH}_4\text{N}^+$ ), que aparece con mayor intensidad para la muestra alquililo que para la muestra amino y el ión de masa 45 ( $\text{CH}_3\text{NO}^+$ ), con una intensidad similar en ambas superficies, lo que permite deducir una composición orgánica en el recubrimiento.

Tabla 14. ToF-SIMS de las superficies de vidrio y de las superficies amino y alquililosilanzadas. Inten.: intensidad.

|                                            | VIDRIO | AMINO  | ALQUINO |
|--------------------------------------------|--------|--------|---------|
| Masa del ion                               | Inten. | Inten. | Inten.  |
| 23 ( $\text{Na}^+$ )                       | 66155  | 13703  | 9006    |
| 30 ( $\text{CH}_4\text{N}^+$ )             | 658    | 8780   | 8015    |
| 42 ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+$ )    | 4552   | 11616  | 5504    |
| 45 ( $\text{CH}_3\text{NO}^+$ )            | 1882   | 8736   | 8494    |
| 68 ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}^+$ )    | 1344   | 544    | 1087    |
| 70 ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ )    | 898    | 72     | 132     |
| 72 ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}^+$ ) | 1164   | 134    | 100     |
| 86 ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$ ) | 134    | 196    | 219     |

#### Biofuncionalización de las superficies mediante cicloadición de tipo "clic"

Los biopolímeros modificados 1'-6' se han enlazado covalentemente a la superficie funcionalizada con grupos alquililo por reacción de cicloadición tipo "clic", entre los grupos azida contenidos en los polímeros y los grupos alquililo expuestos en la superficie (Figura 12).

La formación de un 1,2,3-triazol 1,4-disustituido se produce tras la cicloadición 1,3-dipolar tipo Huisgen en medio acuoso, catalizada por el ión  $\text{Cu(I)}$  generado "in situ" por reducción del ión  $\text{Cu(II)}$  en presencia de ascorbato. Este tipo de reacción transcurre en condiciones suaves de reacción, presenta una gran tolerancia al agua, al oxígeno y a otros grupos funcionales presentes y puede realizarse en una gran variedad de disolventes, tanto próticos como apróticos proporcionando elevados rendimientos (Figura 12).

Las superficies con los biopolímeros injertados 1'-6' se han caracterizado por XPS. En el caso de la superficie funcionalizada con el biopolímero 1' se observa un mayor espesor de capa y un mayor recubrimiento que en las superficies obtenidas previamente con funciones amino y alquililo, debido a una menor proporción de Si 2p presente (4,21 %) y una mayor proporción de C 1s (59,15 % de concentración atómica) (Tabla 15), en comparación con las superficies amino y alquililosilanzadas, lo cual indica que la reacción es eficaz y hay una presencia importante del biopolímero 1' injertado a la superficie, ya que la proporción 59:23:11 está de acuerdo con el porcentaje de dichos elementos en dicho polímero. Este comportamiento es similar para el resto de las superficies biofuncionalizadas con los polímeros 2'-6' analizadas como puede observarse en la tabla 14. A modo de ejemplo, la figura 14 muestra el análisis de XPS de las distintas etapas de funcionalización de la superficie hasta la obtención de la superficie funcionalizada con el biopolímero 1'.

Tabla 15.- XPS de las superficies funcionalizadas con polímero 1', polímero 2', polímero 3', polímero 4 adsorbido sobre polímero 3' injertado (3'+4), polímero 4', polímero 5' y polímero 6'.

|      | POLÍM. 1' |             | POLÍM. 2' |             | POLÍM. 3' |             |
|------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|      |           | Conc. Atóm. | (eV)      | Conc. Atóm. |           | Conc. Atóm. |
| Pico | (eV)      | ( % )       |           | ( % )       | (eV)      | ( % )       |
| C 1s | 284       | 59,15       | 284       | 69,99       | 284       | 64,24       |
| O 1s | 529       | 23,19       | 529       | 15,29       | 529       | 18,18       |

|       | POLÍM. 1' |             | POLÍM. 2' |             | POLÍM. 3' |             |
|-------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|       |           | Conc. Atóm. | (eV)      | Conc. Atóm. |           | Conc. Atóm. |
| Pico  | (eV)      | ( % )       |           | ( % )       | (eV)      | ( % )       |
| N 1s  | 398       | 11,16       | 398       | 8,65        | 398       | 9,1         |
| Si 2p | 101       | 4,21        | 101       | 5,18        | 101       | 6,59        |

|       | POLÍM. 3'+4 |             | POLÍM. 4' |             | POLÍM. 5' |             | POLÍM. 6' |             |
|-------|-------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|       |             | Conc. Atóm. |           | Conc. Atóm. |           | Conc. Atóm. |           | Conc. Atóm. |
| Pico  | (eV)        | ( % )       | (eV)      | ( % )       | (eV)      | ( % )       | (eV)      | ( % )       |
| C 1s  | 284         | 49,62       | 284       | 50,75       | 284       | 54,6        | 284       | 60,25       |
| O 1s  | 529         | 20,17       | 529       | 24,87       | 529       | 21,6        | 529       | 25,73       |
| N 1s  | 398         | 8,59        | 398       | 8,21        | 398       | 13,5        | 398       | 9,24        |
| Si 2p | 100         | 7,4         | 100       | 16,17       | 100       | 9,19        | 100       | 4,78        |

Los análisis de espectroscopía ToF-SIMS para las superficies injertadas con los polímeros modificados 1'-6' muestran un espectro que difiere del observado para las superficies amino y alquínilo funcionalizadas y que permite deducir que existe un recubrimiento de tipo proteico debido a la aparición de los iones típicos a los que dan lugar los aminoácidos valina, prolina, isoleucina y glicina. A modo de ejemplo, en la figura 14 se muestra el análisis de ToF-SIMS de la superficie funcionalizada con el polímero 1'. En ella se observan los iones de masa 68 ( $C_4H_6N^+$ ) y 72 ( $C_4H_{10}N^+$ ), típicos de la presencia de un recubrimiento de aminoácidos valina; aparece un ión de masa 70 ( $C_4H_8N^+$ ), típico de la presencia de un recubrimiento de aminoácido prolina y la aparición de un ión de masa 86 ( $C_5H_{12}N^+$ ) muestra la presencia de un recubrimiento de aminoácido isoleucina. Ninguno de estos picos está presente en la superficie funcionalizada con grupos alquínilo, lo que permite corroborar un recubrimiento de tipo proteico en las nuevas superficies injertadas con el polímero 1'. Este comportamiento es similar en todas las superficies estudiadas a excepción de la superficie biofuncionalizada con el polímero 3', para el cual la ausencia de aminoácidos isoleucinas se manifiesta en una menor proporción del ión de masa molecular 86 (Tabla 16). Hay que destacar que la presencia del ión de masa 86 en el sistema 3'+4 demuestra la eficaz adsorción del polímero 4 sobre la superficie injertada con el polímero 3'.

Tabla 16. ToF-SIMS de las de las superficies funcionalizadas con polímero 1', 2', 3', 4, 3' + 4, 4', 5' y 6'. I: intensidad.

|                       | POL. 1' | POL. 2' | POL. 3' | POL. 3'+4 | POL. 4' | POL. 5' | POL. 6' |
|-----------------------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|
| Masa del ion          | I       | I       | I       | I         | I       | I       | I       |
| 23 ( $Na^+$ )         | 22442   | 8555    | 1897    | 12747     | 7555    | 36885   | 7554    |
| 30 ( $CH_4N^+$ )      | 16977   | 13366   | 34745   | 18046     | 15230   | 33629   | 15440   |
| 42 ( $C_2H_4N^+$ )    | 5039    | 4078    | 11670   | 5032      | 6025    | 7065    | 5778    |
| 45 ( $CH_3NO^+$ )     | 2048    | 1947    | 9890    | 4224      | 2200    | 2168    | 3474    |
| 68 ( $C_4H_6N^+$ )    | 8562    | 6397    | 19439   | 6172      | 8324    | 13359   | 8418    |
| 70 ( $C_4H_8N^+$ )    | 23383   | 21665   | 22179   | 32149     | 21535   | 46895   | 24335   |
| 72 ( $C_4H_{10}N^+$ ) | 21709   | 21179   | 34054   | 14888     | 20214   | 33960   | 27004   |
| 86 ( $C_5H_{12}N^+$ ) | 9390    | 6617    | 1999    | 6553      | 7550    | 22150   | 35714   |

El análisis de la superficie con el biopolímero injertado 4' por XPS (Tabla 15) y ToF-SIMS (Tabla 16) indica que la reacción no es eficaz con un único grupo amino terminal y que la superficie no muestra un recubrimiento adecuado del biopolímero 4' injertado, como se deduce de los resultados obtenidos por estas técnicas, los cuales muestran la presencia de una proporción elevada de Si 2p (16,17 %) en la superficie, junto con una menor proporción de C 1s (50,75 %).

El análisis de la superficie con los biopolímeros injertados 5' y 6' por XPS (Tabla 15) y ToF-SIMS (Tabla 16) indica que la reacción es eficaz, que hay una presencia importante de biopolímero en la superficie y que el recubrimiento ha sido adecuado tanto con el biopolímero 5' como con el 6'. Para comprobar si el comportamiento inteligente de los biopolímeros se mantiene cuando éstos se han injertado en las superficies y por tanto que estos sistemas son viables como sistemas de recolección celular, se han realizado medidas de ángulos de contacto en muestras

tratadas térmicamente. Se hicieron medidas por encima (a 37 °C) y por debajo de la temperatura de transición (a 10 °C) obteniéndose los valores a las dos temperaturas escogidas que se muestran en la tabla 17.

Para la superficie funcionalizada con el biopolímero 1' se observan valores diferentes del ángulo de contacto a 10°C y 37°C de  $76,8 \pm 1,2^\circ$  y  $65,2 \pm 0,8^\circ$ , respectivamente, como consecuencia del diferente plegamiento en la estructura del biopolímero 1'. Se observa cómo la hidrofobia de la superficie es mayor al superar la temperatura de transición del biopolímero. Esto es debido a que el polímero pasa de un estado hidratado a uno no hidratado cuando supera su temperatura de transición (Tt), es decir que disminuye su carácter hidrofílico con la temperatura. Los resultados se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Ángulos de contacto de las superficies funcionalizadas con polímeros 1'-6' a diferentes temperaturas.

| SUPERFICIE    | ÁNGULO a 10 °C       | ÁNGULO a 37 °C       | $\Delta T$   |
|---------------|----------------------|----------------------|--------------|
| Polímero 1'   | $65,2 \pm 0,8^\circ$ | $76,8 \pm 1,2^\circ$ | $11,6^\circ$ |
| Polímero 2'   | $65,9 \pm 1,0^\circ$ | $74,9 \pm 0,7^\circ$ | $9,0^\circ$  |
| Polímero 3'   | $59,7 \pm 2,1^\circ$ | $64,8 \pm 1,1^\circ$ | $5,1^\circ$  |
| Polímero 3'+4 | $49,0 \pm 1,9^\circ$ | $53,2 \pm 4,2^\circ$ | $4,2^\circ$  |
| Polímero 4'   | $60,3 \pm 0,5^\circ$ | $64,1 \pm 1,5^\circ$ | $3,8^\circ$  |
| Polímero 5'   | $67,5 \pm 0,7^\circ$ | $65,3 \pm 0,6^\circ$ | $2,4^\circ$  |
| Polímero 6'   | $43,5 \pm 1,2^\circ$ | $49,1 \pm 2,0^\circ$ | $5,6^\circ$  |

El escaso recubrimiento de la superficie con el polímero 4' se observa de nuevo en la pequeña disminución que presenta el ángulo de contacto de la superficie funcionalizada con dicho polímero 4', el cual solo varía  $3,8^\circ$  para la superficie a 10 °C ( $60,3 \pm 0,5^\circ$ ) y 37 °C ( $64,1 \pm 1,5^\circ$ ), respectivamente. Puesto que la estructura del polímero 4' es totalmente análoga a la del polímero 1', la pequeña variación observada denota la escasa presencia de polímero en la superficie, por lo cual se observan valores similares a los descubiertos en la superficie no injertada recubierta de grupos alquínilo ( $64,5^\circ$ , figura 11). Las mediciones de ángulos de contacto realizadas en la superficie biofuncionalizada con el biopolímero 5' (Tabla 17) muestran que la hidrofobia de dicha superficie varía apreciablemente con la temperatura, observándose valores de  $65,3 \pm 0,6$  a 37 °C y de  $67,5 \pm 0,7$  a 10 °C. Estos valores muestran cómo el polímero 5', al estar unido covalentemente a la superficie por varios puntos a lo largo de su cadena, no presenta la libertad de movimiento necesaria para cambiar su conformación con la temperatura y, por tanto, puede perder su capacidad como sistema de recolección celular.

Aunque se mantiene el comportamiento inteligente del biopolímero 6' en la superficie como se deduce de las medidas de ángulos de contacto realizadas en la superficie (Tabla 17), observándose de nuevo una disminución en la hidrofobia de la superficie al bajar la temperatura por debajo de la de transición, de  $49,1 \pm 1,2$  a 37 °C a  $43,5 \pm 2,0$  a 10 °C, los valores observados corroboran la mayor hidrofilia del polímero injertado 4' por la presencia de las tres secuencias polares de adhesión celular RGD.

#### Biofuncionalización de las superficies mediante cicloadición de tipo "clic" del polímero 3' y posterior adsorción del polímero 4

Se usó un sistema que comprende dos biopolímeros, el primero de ellos es capaz de injertarse en la superficie (polímero 3') y el segundo (polímero 4), con capacidad de inducir adhesión celular de manera que el sistema resulta eficaz como sistema de recolección celular por la sinergia del efecto de ambos polímeros.

En el polímero 4, la secuencia bioactiva RGD induce la adhesión celular a la superficie bioactiva a temperaturas superiores a la de la transición inversa y coincidentes con la del cultivo celular.

En el polímero 4, el péptido B se incluye como vehículo de las propiedades inteligentes del polímero, que impide la adhesión celular por debajo de la temperatura de transición inversa, anulando de este modo el efecto de las zonas más polares que favorecen la adhesión celular. El biopolímero modificado 3' se enlazó covalentemente por reacción química mediante reacción de cicloadición de tipo "clic", entre los grupos azida contenidos en el polímero y los grupos alquínilo presentes en la superficie. El procedimiento fue el mismo que el descrito para los polímeros 1' y 2'.

Una vez obtenidas las superficies biofuncionalizadas con el polímero 3' injertado químicamente se produce la adsorción del polímero 4, por medio de la inmersión de las superficies previamente preparadas en una solución acuosa del biopolímero 4. La superficie con el sistema de biopolímeros 3' y 4 se caracterizó mediante XPS; que mostró un mayor espesor de capa y un mayor recubrimiento que en las superficies funcionalizadas con grupos amino y/o alquínilo, lo que se deduce de la menor proporción de Si 2p y de la mayor proporción de C 1s (Tabla 15) encontrada para las superficies biofuncionalizadas con polímero 4, en comparación con las superficies amino y

alquinosilinizadas; indicando de este modo una presencia importante de biopolímeros sobre la superficie.

#### **EJEMPLO 4. Ensayos de adhesión celular**

##### **5    Estudio del proceso de recolección celular usando superficies bioactivas**

El estudio del proceso de recolección celular mediante este tipo de superficies se dividió en dos partes: la recolección de células individuales y la recolección de una lámina celular usando membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

10

##### **Recolección de células individuales**

Las superficies biofuncionalizadas con el biopolímero de tipo elastina se esterilizan mediante luz UV durante 30 minutos por cada lado. Además, los pocillos de las placas de múltiples pocillos de poliestireno de 24 pocillos se tratan con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 % en PBS y se mantienen toda la noche a 4 °C para evitar que las células se unan de manera inespecífica. Después, las placas se lavan tres veces con PBS y las superficies biofuncionalizadas estériles se colocan en los pocillos correspondientes. También se siembran por separado fibroblastos humanos (línea celular HFF-1). Dichos fibroblastos se cultivan en frascos de 250 ml con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 15 % de suero fetal bovino (FBS) y penicilina-estreptomicina al 1 % a 37 °C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % en aire. Una vez que las células han alcanzado la confluencia se recolectan mediante el tratamiento con Tripsina al 0,25 % y al 0,02 % ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en PBS. Tras la centrifugación de la suspensión celular resultante se resuspenden en DMEM suplementado con penicilina-estreptomicina al 1 %. La suspensión celular se diluye hasta tener  $2 \times 10^4$  células/pocillo y se distribuyen alícuotas de 500 µl en cada pocillo sobre cada una de las superficies biofuncionalizadas y se incuban a 37 °C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % en aire. La morfología de las células se evalúa y se fotografía a los 30 minutos, 4, 8 y 24 horas (h) (Figura 15), a partir de la siembra, por contraste de fases mediante un microscopio óptico equipado con un sistema de cámara digital. El experimento se repite cuatro veces, con las mismas condiciones, evaluando tres réplicas en cada uno de ellos y analizando las células de las fotos generadas en 9 campos elegidos al azar en cada superficie.

30

Después de 24 h de cultivo las placas de múltiples pocillos que contienen las superficies con las células adheridas se enfrían a 4 °C. Después de la incubación durante 1 h (25 h desde el inicio del experimento), 2 h (26 h desde el inicio del experimento) y 3 h (27 h desde el inicio del experimento) adicionales, la morfología celular se observa y se fotografía como se ha indicado anteriormente, considerando las células redondeadas como no adheridas y las células extendidas como adheridas (Figura 16 y 17).

35

El porcentaje de células adheridas y el número total de células adheridas se representa como el valor medio ( $n = 4$ ) con su desviación típica. Se usan superficies de vidrio no biofuncionalizadas, sin ningún tipo de recubrimiento como controles de adhesión y de recolección.

40

En la figura 15B la superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 1', el cual contiene la secuencia peptídica bioactiva RGD, muestra una muy buena adhesión a los 30 minutos, semejante a la del vidrio (Figuras 16 y 17). A las 24 h esta adhesión tanto en porcentaje como en número de células sigue siendo comparable a la de la superficie de vidrio como puede comprobarse en las imágenes tanto en su extensión como en la morfología celular (Figura 15B).

45

Sin embargo, a diferencia de las superficies de vidrio sin recubrimiento, se observa que cuando se disminuye la temperatura, por debajo de la T<sub>t</sub> del polímero, las células comienzan a desprenderse, apareciendo grandes huecos entre ellas y dichas células comienzan a adquirir una morfología más redondeada (Figura 15B).

50

Por tanto, se observa que a partir de las 24 h el número de células adheridas disminuye mientras que se produce un gran aumento en el número de células no adheridas, que corresponden a las células de morfología más redondeada, que no interactúan con la superficie pero mantienen las interacciones entre ellas y con su matriz extracelular. Las células muestran por tanto una alta capacidad de adhesión y una respuesta al cambio de temperatura que hace que se despeguen. En consecuencia, para la constitución de un sistema de recolección celular efectivo, es tan importante la presencia de una secuencia bioactiva de adhesión celular por la cual las células se adhieren eficazmente, como la capacidad que muestra este polímero injertado en la superficie para cambiar de conformación en función de la temperatura y pasar a comportarse como no adherente.

55

La Figura 15C muestra la superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 2', que contiene la secuencia peptídica RDG, que es la versión desordenada de RGD y en el que la capacidad de adhesión del péptido RGD está anulada. El número de células que consiguen adherirse en esta superficie es significativamente menor con respecto a la superficie de vidrio y a la superficie del polímero 1' (Figura 15A, B). Además, esta adhesión es claramente más débil.

60

La morfología de las células después de 24 h de incubación muestra que pocas células consiguen unirse de forma efectiva a la superficie injertada con el biopolímero modificado 2'. Esto provoca un rápido despegue en cuanto se

65

produce el cambio de temperatura (Figura 17) como puede observarse en la fotografía que corresponde a la incubación durante 25 h (Figura 15C). Dicha superficie por tanto muestra baja capacidad de adhesión pero mantiene la respuesta inteligente al cambio de temperatura propia de los polímeros de tipo elastina siendo insuficiente para constituir un sistema efectivo de recolección celular (Figura 16).

La superficie de la figura 15F corresponde a una superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 3', que no contiene ninguna secuencia peptídica bioactiva. El número de células que consiguen adherirse es significativamente menor con respecto a la superficie de vidrio y a superficie injertada con el biopolímero modificado 1'. Además, la adhesión celular a la superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 3' es lábil. La morfología de las células después de la incubación durante 24 h muestra que el número de células que consiguen unirse de forma efectiva a la superficie es pequeño (Figura 16). Esta baja e ineficaz adhesión provoca un rápido despegue de las células sobre la superficie en cuanto se produce el cambio de temperatura, como puede observarse en la fotografía que corresponde a la incubación durante 25 h de la figura 15D y en la figura 17. En consecuencia, dicha superficie muestra una baja capacidad de adhesión celular, lo que hace que no sea un sistema efectivo para realizar la recolección celular, a pesar de que mantiene la respuesta inteligente al cambio de temperatura propia de los polímeros de tipo elastina.

La figura 15E muestra superficies funcionalizadas con el biopolímero modificado 3' sobre el que se adsorbe el biopolímero 4, el cual contiene la secuencia peptídica bioactiva RGD. Este sistema de dos polímeros muestra muy buena adhesión celular a los 30 minutos, aunque dicha adhesión es inferior a la del vidrio y a la de la superficie funcionalizada con el polímero 1', como muestran las figuras 16 y 17. La adhesión celular a la superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 3' sobre el que se adsorbe el biopolímero 4 sigue siendo significativamente menor a las 24 h, aunque las células conservan una morfología similar (Figuras 15E y 17). En contraste claro con la superficie de vidrio, una disminución de la temperatura por debajo de la Tt del polímero provoca que las células comiencen a despegarse adquiriendo una morfología más redondeada. Por tanto, a partir de las 24 h, las células adheridas disminuyen mientras que se produce un gran aumento en el número de células no adheridas, de morfología redondeada. Las células permanecen interactuando entre ellas y con su matriz extracelular, pero no con la superficie. Las células muestran por tanto, a la vista de las imágenes y de las gráficas, una alta capacidad de adhesión y una respuesta al cambio de temperatura que hace que se despeguen. Este podría ser un sistema efectivo para realizar la recolección celular, aunque no tanto como el constituido por el polímero 1', que además de ser más eficaz tanto en la adhesión como en la desadhesión mediante tratamiento térmico (Figuras 15B y 16) solo requiere la presencia de un único polímero injertado en la superficie. Además, hay que considerar que la recolección de las células provenientes de esta superficie arrastraría consigo restos del polímero 4, a diferencia del ejemplo con el polímero 1', en el cual no se arrastran restos debido a la unión covalente del biopolímero a la superficie. Otra desventaja del sistema formado por el biopolímero 3' injertado y el biopolímero 4 adsorbido es el hecho de que el polímero 4 esté tan solo adsorbido, lo cual puede provocar su liberación inespecífica al medio durante el cultivo celular.

En la figura 15F se muestra la superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 4', el cual contiene la secuencia peptídica bioactiva RGD y no presenta restos de lisinas en el extremo. Dicho polímero 4' puede injertarse en la superficie una vez modificado su grupo amino terminal, si bien se observa que la modificación únicamente del grupo amino terminal del biopolímero no es suficiente para conseguir un recubrimiento completo de la superficie tratada. Esta superficie muestra una escasa adhesión celular a los 30 minutos debido a que el insuficiente recubrimiento de la superficie de vidrio hace que las células se tengan que adherir a las partes expuestas del vidrio funcionalizado con grupos alquínico, donde la adhesión no es efectiva. Como resultado, la posterior desadhesión de las células por el tratamiento térmico no es efectiva y estas permanecen adheridas a la superficie (Figuras 16 y 17). La poca eficiencia de la reacción de acoplamiento del biopolímero 4' a la superficie hace inviable el uso de este biopolímero para la obtención de un sistema de recolección celular.

Estos hallazgos demuestran que la unión entre el biopolímero y el armazón debe implicar al menos dos enlaces covalentes por molécula de biopolímero, más preferentemente, tres enlaces covalentes por molécula de biopolímero. Por tanto, estos resultados corroboran los obtenidos anteriormente para esta superficie con la medición de los ángulos de contacto (Tabla 17), que indicaban un recubrimiento menor de la superficie cuando se empleaba el biopolímero 4', puesto que no se observaba un cambio importante con la temperatura.

Como puede verse en la figura 15G, la superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 5', que contiene 24 restos de lisina y seis repeticiones de la secuencia peptídica bioactiva RGD repartidas a lo largo de toda la cadena de aminoácidos, muestra una adhesión celular muy buena a los 30 minutos, semejante a la del vidrio y a la del biopolímero 1'. A las 24 h esta adhesión sigue siendo comparable a la de la superficie de vidrio, como puede comprobarse en las imágenes, tanto en el nivel de recubrimiento de la superficie como en la morfología celular (Figura 15G).

Sin embargo, se observa que cuando disminuimos la temperatura, por debajo de la Tt del biopolímero 5', las células no se despegan de la superficie del sustrato. Esto implica que la unión del biopolímero a través de restos situados a lo largo de toda la molécula no permite el cambio conformacional con la bajada de temperatura como se corroboró en la invariabilidad del ángulo de contacto sobre dicha superficie (Tabla 17). El biopolímero 5' no es por tanto útil

para la constitución de un sistema de recolección celular efectivo, volviéndose a demostrar de este modo que es tan importante la presencia de una secuencia bioactiva de adhesión celular por la cual las células se adhieren eficazmente, como la capacidad que debe conservar el biopolímero injertado en la superficie para cambiar su conformación en función de la temperatura. La unión por varios puntos del esqueleto peptídico del biopolímero 5' a la superficie no permite el cambio de conformación necesario en el biopolímero para que las células puedan desadherirse. En conclusión, el biopolímero 5' tampoco sería útil para la obtención de un sistema de recolección celular.

Como puede verse en la figura 15H, la superficie funcionalizada con el biopolímero modificado 6', que contiene la secuencia peptídica bioactiva RGD repetida tres veces a lo largo de la cadena de aminoácidos y también tres restos de lisina en su extremo amino terminal, muestra una adhesión semejante a la del vidrio a los 30 minutos de incubación. A las 24 h esta adhesión sigue siendo comparable tanto en el área recubierta como en la morfología celular (Figuras 15H y 17). Sin embargo, se observa que cuando disminuimos la temperatura por debajo de la Tt del biopolímero, las células no se despegan de la superficie del sustrato (Figura 17). Esto implica que la presencia de varias secuencias bioactivas RGD a lo largo de la cadena peptídica no permite el cambio de conformación adecuado en la molécula capaz de provocar el despegue masivo de las células, quedando probablemente en la nueva conformación algún resto de la secuencia RGD expuesto, suficiente para que las células permanezcan adheridas a él. Este resultado concuerda con la escasa variación con la temperatura de los ángulos de contacto de esta superficie (Tabla 17). El biopolímero 6' no es por tanto útil para la recolección celular ni para la constitución de un sistema de recolección celular efectivo. Se vuelve a demostrar por tanto que es tan importante la presencia de una secuencia bioactiva de adhesión celular por la cual las células se adhieren eficazmente, como la capacidad del biopolímero injertado en la superficie para cambiar su conformación en la manera adecuada, exponiendo o no la secuencia bioactiva a las células, en función de la temperatura.

Después de 3 horas a 4 °C (27 h desde el inicio del experimento) se evaluó la viabilidad de las células presentes sobre las superficies mediante la técnica fluorescente "*Kit de tinción de células vivas-muertas*" (Abcam). Las células vivas o de color verde y las células muertas o de color rojo se contaron a partir de 9 fotografías correspondientes a diferentes campos aleatorios de cada superficie. El porcentaje de células vivas se calcula con su desviación típica correspondiente (n=4).

En este experimento se comprobó que las células presentes en las superficies biofuncionalizadas con los polímeros modificados 1', 2', 3', 3'+4, 5'y 6' después del tratamiento térmico presentan unos porcentajes de viabilidad superiores al 90 % (Tabla 18) en todos los casos, con lo que se demuestra que ni el cultivo sobre los biopolímeros ni el tratamiento térmico provocan un efecto adverso sobre la viabilidad de las células.

Tabla 18. Viabilidad celular evaluada usando la técnica fluorescente "*Kit de tinción de células vivas-muertas*"

| Material         | % de Células Vivas | Desviación Típica |
|------------------|--------------------|-------------------|
| VIDRIO           | 99,15              | 1,33              |
| (POLIMERO 1')    | 99,38              | 0,97              |
| (POLIMERO 2')    | 97,68              | 4,00              |
| (POLIMERO 3')    | 97,41              | 1,79              |
| (POLIMEROS 3'+4) | 90,08              | 4,02              |
| (POLIMERO 4')    | 98,54              | 1,52              |
| (POLIMERO 5')    | 95,42              | 2,34              |
| (POLIMERO 6')    | 97,38              | 3,41              |

Se evalúa también la vitalidad de los fibroblastos despegados tras las 27 h de cultivo sobre las superficies funcionalizadas con el polímero modificado 1'. Por tanto, los fibroblastos despegados se analizan mediante su cultivo en placas de poliestireno TC durante 1, 3, 10 y 14 días a 37 °C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % en aire usando la técnica colorimétrica "*Alamar Blue*". Como control se utilizó el mismo número de fibroblastos obtenidos mediante la técnica de tripsinización cultivados en las mismas placas de poliestireno TC durante 1, 3, 10 y 14 días a 37 °C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %. El experimento se repite cuatro veces, con las mismas condiciones, evaluando tres réplicas en cada uno de ellos.

El resultado obtenido es un aumento constante en la actividad metabólica a lo largo del tiempo sin encontrar diferencias significativas con los controles (P<0,05), por lo que las células son viables y capaces de proliferar (Figura18) alcanzando a los fibroblastos tripsinizados a lo largo del tiempo. Por tanto, se pone de manifiesto que el uso del biopolímero 1' es un método más eficaz para la recolección celular que no afecta a las proteínas de la membrana celular y por tanto mantiene intactas las interacciones entre célula-célula y célula-matriz extracelular. Además, este ensayo nos demuestra nuevamente que el tratamiento térmico no tiene ningún efecto adverso sobre la viabilidad celular.

Recolección de una lámina celular mediante membranas de PVDF

Las superficies de vidrio funcionalizadas e injertadas con el biopolímero 1' se esterilizan mediante luz UV durante 30 minutos por cada lado.

Además, los pocillos de las placas de pocillos múltiples de poliestireno de 24 pocillos se tratan con BSA al 0,1 % en PBS y se mantienen toda la noche a 4 °C para evitar que las células se unan de manera inespecífica. Después, los pocillos se lavan tres veces con PBS y las superficies de vidrio funcionalizadas e injertadas con el biopolímero 1' ya estériles se colocan en los pocillos correspondientes.

Después se realiza el sembrado celular. Se usan fibroblastos HFF-1 durante todo el experimento. Los fibroblastos se cultivan en frascos de 250 ml con DMEM suplementado con FBS al 10 % y penicilina-estreptomicina al 1 % a 37 °C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % en aire. Cuando las células llegan a confluencia se recolectan mediante el tratamiento con Tripsina al 0,25 % y EDTA al 0,02 % en PBS. Esta digestión enzimática se interrumpe mediante la adición de DMEM suplementado con penicilina-estreptomicina al 1 %. La suspensión celular se ajusta a  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Se distribuyen alícuotas de 500 µl en cada pocillo sobre las superficies de vidrio funcionalizadas e injertadas con el biopolímero 1' e incubadas a 37 °C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % en aire hasta que las células alcanzan la confluencia. Una vez alcanzada la confluencia del cultivo, se disminuye la temperatura del cultivo a 4 °C. Después de 1 hora a 4 °C, se coloca la membrana de PVDF dentro de los pocillos. El medio de cultivo se retira de forma que la membrana de PVDF se adhiere a la lámina de células. Las placas se incuban durante 0,5 h de nuevo a 4 °C. Transcurrido este tiempo y con ayuda de unas pinzas, la membrana de PVDF adherida a la lámina de células se transfiere a una nueva placa de poliestireno. Al añadir medio de cultivo frío, la membrana de PVDF flota y se recoge mediante unas pinzas, quedando únicamente la lámina celular en el pocillo. Se confirmó la buena viabilidad de las células que comprenden la lámina estudiando la proliferación de las mismas de forma cualitativa una vez transferida a una nueva placa de cultivo.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Valladolid

<120> Un biopolímero bioactivo sensible a la temperatura y método de recolección celular asociado

<130> PCT2080.3

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser  
1 5 10

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de VPGVG de elastina humana.

<400> 2

Val Pro Gly Ile Gly  
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Pro Gly Val Gly  
1 5

5      <210> 4  
      <211> 6  
      <212> PRT  
      <213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Realización preferida de péptido D.  
<400> 4

Met Gly Lys Lys Lys Pro  
1 5

|    |                    |
|----|--------------------|
| 19 | <210> 5            |
|    | <211> 19           |
|    | <212> PRT          |
|    | <213> Homo sapiens |
| 20 | <400> 5            |

Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Ile Pro Arg Glu Asp Val Asp Tyr His  
1 5 10 15

Leu Tyr Pro

25      <210> 6  
         <211> 6  
         <212> PRT  
         <213> Homo sapiens

30            <400> 6

Pro Arg Arg Ala Arg Val  
1 5

35      <210> 7  
         <211> 371  
         <212> PRT  
         <213> Secuencia artificial

40      <220>  
         <223> Polímero 1.  
         <400> 7

Met Gly Lys Lys Lys Pro Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
1 5 10 15

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
20 25 30

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
35 40 45

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
50 55 60

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ile  
65 70 75 80

Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly  
85 90 95

Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
100 105 110

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val  
115 120 125

Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val  
130 135 140

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
145 150 155 160

Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
165 170 175  
Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
180 185 190  
Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly  
195 200 205  
Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
210 215 220  
Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val  
225 230 235 240  
Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val  
245 250 255  
Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
260 265 270  
Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
275 280 285  
Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Val  
290 295 300  
Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
305 310 315 320  
Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
325 330 335  
Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
340 345 350  
Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
355 360 365  
Val Gly Val  
370

<210> 8  
<211> 1113  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia codificante para el polímero 1.

<400> 8

atgggtaaaa aaaagccggt accgggcgtg ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg 60  
ggcgttccgg gtgtgggtgt tcccgggtgc ggggttcctg gggtaggagt ccccgagtc 120

ggtgttccag gggtcggtgt tcctggcgtg ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggcgtg 180  
 ggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcgtg ggtgttccgg gtgtgggcgt accgggcatc 240  
 ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcatc ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcatc 300  
 ggtgtgccag gcattggtgt gccgggcatc ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcatc 360  
 ggtgtgccag gcattggtgc agtaaccggt cgtggggatt ctctgcgtc cagcgtcccg 420  
 ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg 480  
 ggcatcgggtg tgccaggcat tgggtgtgccg ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgcca 540  
 ggcatcgggtg tgccgggcat tgggtgtaccg ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg 600  
 ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcatcgggtg tgccaggcat tgggtgtgccg 660  
 ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcatcgggtg tgccaggcat tgggtgcagta 720  
 accggtcgtg gggattctcc tgcgtccagc gtcccgggca tcggtgttcc gggcattggt 780  
 gtgccgggca tcggtgttcc gggcattggt gtgccgggca tcggtgtgcc aggcattggt 840  
 gtgccgggca tcggtgttcc gggcattggt gtgccaggca tcggtgtgcc gggcattggt 900  
 gtaccgggcg tgggcgttcc aggcgtgggt gttccgggtg tgggcgttcc ggggtgtgggt 960  
 gttcccgggtg tcgggggttcc tggggtagga gtcccgggag tcggtgttcc aggggtcgggt 1020  
 gttcctggcg tgggtgttcc ggggtgtgggc gttccgggcg tgggtgttcc ggggtgtgggc 1080  
 gttccaggcg tgggtgttcc ggggtgtgggc gta 1113

<210> 9  
 <211> 371  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polímero 2.

<400> 9

Met Gly Lys Lys Lys Pro Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
 1 5 10 15  
 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
 20 25 30  
 Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
 35 40 45  
 Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
 50 55 60  
 Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly  
 85 90 95

Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
100 105 110

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val  
115 120 125

Thr Gly Arg Asp Gly Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val  
130 135 140

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
145 150 155 160

Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
165 170 175

Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
180 185 190

Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly  
195 200 205

Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
210 215 220

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val  
225 230 235 240

Thr Gly Arg Asp Gly Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val  
245 250 255

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
260 265 270

Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
275 280 285

Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Val  
290 295 300

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
305 310 315 320

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
325 330 335

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
340 345 350

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
355 360 365

Val Gly Val  
370

<210> 10  
 <211> 1113  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia codificante para el polímero 2.

<400> 10

10

```

atgggtaaaa aaaagccggt accgggcggt ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg      60
ggcgttccgg gtgtgggtgt tcccgggtgtc ggggttcctg gggtaggagt ccccggagtc      120
gggtgttccag ggggtcgggtgt tcctggcggtg ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggcggt      180
gggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcggtg ggtgttccgg gtgtgggcgt accgggcatc      240
gggtgttccgg gcattgggtgt gccgggcatc ggtgttccgg gcattgggtgt gccgggcatc      300
gggtgtgccag gcattgggtgt gccgggcatc ggtgttccgg gcattgggtgt gccgggcatc      360
gggtgtgccag gcattgggtgt agtaaccggt cgtgatgggt ctctgctgc cagcgtccc      420
ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcacgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg      480
ggcatcgggtg tgccaggcat tgggtgtgccg ggcacgggtg ttccgggcat tgggtgtgcca      540
ggcatcgggtg tgccgggcat tgggtgtaccg ggcacgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg      600
ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcacgggtg tgccaggcat tgggtgtgccg      660
ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcacgggtg tgccaggcat tgggtgcagta      720
accggtcgtg atgggtcttc tgcgtccagc gtcccgggca tcggtgttcc gggcattggt      780
gtgccgggca tcggtgttcc gggcattggt gtgccgggca tcggtgtgcc aggcattggt      840
gtgccgggca tcggtgttcc gggcattggt gtgccaggca tcggtgtgcc gggcattggt      900
gtaccgggcg tgggcgttcc aggcgtgggt gttccgggtg tgggcgttcc ggggtgtgggt      960
gttcccggtg tcggggttcc tggggtagga gtccccggag tcggtgttcc aggggtcgggt      1020
gttcttggcg tgggtgttcc ggggtgtgggc gttccgggcg tgggtgttcc ggggtgtgggc      1080
gttccaggcg tgggtgttcc ggggtgtgggc gta                                     1113
    
```

<210> 11  
 <211> 427  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Polímero 3.

20

<400> 11

```

Met Gly Lys Lys Lys Pro Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
1      5      10     15
val Pro Gly val Gly val Pro Gly val Gly val Pro Gly val Gly Val
20     25     30
    
```

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
35 40 45

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
50 55 60

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val  
65 70 75 80

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
85 90 95

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
100 105 110

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
115 120 125

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
130 135 140

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val  
145 150 155 160

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
165 170 175

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
180 185 190

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
195 200 205

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
210 215 220

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val  
225 230 235 240

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
245 250 255

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
260 265 270

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
275 280 285

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
290 295 300

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val  
305 310 315 320

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
325 330 335

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
340 345 350

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
355 360 365

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
370 375 380

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val  
385 390 395 400

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
405 410 415

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
420 425

<210> 12

<211> 1281

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante para el polímero 3.

<400> 12

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgggtaaaa aaaagccggt accgggcggtg ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg | 60  |
| ggcgttccgg gtgtgggtgt tcccgggtgtc ggggttcctg gggtaggagt ccccggagtc | 120 |
| ggtgttccag gggtcggtgt tcctggcggtg ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggctgt | 180 |
| ggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcggtg ggtgttccgg gtgtgggcgt accgggctgt | 240 |
| ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg ggcgttccgg gtgtgggtgt tcccgggtgtc | 300 |
| ggggttcctg gggtaggagt ccccggagtc ggtgttccag gggtcggtgt tcctggcggtg | 360 |
| ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggctgt ggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcggtg | 420 |
| ggtgttccgg gtgtgggcgt accgggctgt ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg  | 480 |
| ggcgttccgg gtgtgggtgt tcccgggtgtc ggggttcctg gggtaggagt ccccggagtc | 540 |
| ggtgttccag gggtcggtgt tcctggcggtg ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggctgt | 600 |
| ggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcggtg ggtgttccgg gtgtgggcgt accgggctgt | 660 |
| ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg ggcgttccgg gtgtgggtgt tcccgggtgtc | 720 |
| ggggttcctg gggtaggagt ccccggagtc ggtgttccag gggtcggtgt tcctggcggtg | 780 |
| ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggctgt ggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcggtg | 840 |

ggtgttccgg gtgtgggcgt accgggagtg ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg 900  
 ggcgttccgg gtgtgggtgt tccgggtgtc ggggttcctg gggtaggagt cccgggagtc 960  
 ggtgttccag gggtcgggtgt tcctggcgtg ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggagtg 1020  
 ggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcgtg ggtgttccgg gtgtgggcgt accgggagtg 1080  
 ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg ggcgttccgg gtgtgggtgt tccgggtgtc 1140  
 ggggttcctg gggtaggagt cccgggagtc ggtgttccag gggtcgggtgt tcctggcgtg 1200  
 ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggagtg ggtgttccgg gtgtgggcgt tccaggcgtg 1260  
 ggtgttccgg gtgtgggcgt a 1281

<210> 13

<211> 371

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polímero 4.

<400> 13

Met Glu Ser Leu Leu Pro Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
 1 5 10 15  
 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
 20 25 30  
 Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
 35 40 45  
 Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
 50 55 60  
 Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly  
 85 90 95  
 Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
 100 105 110  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val  
 115 120 125  
 Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val  
 130 135 140  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
 145 150 155 160  
 Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 165 170 175

Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
180 185 190

Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly  
195 200 205

Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
210 215 220

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val  
225 230 235 240

Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val  
245 250 255

Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
260 265 270

Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
275 280 285

Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Val  
290 295 300

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly  
305 310 315 320

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val  
325 330 335

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro  
340 345 350

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly  
355 360 365

Val Gly Val  
370

<210> 14  
<211> 1113  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia codificante para el polímero 4.

<400> 14

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggaatccc tgctgccggt accgggcggt ggcgttccag gcgtgggtgt tccgggtgtg  | 60  |
| ggcgttccgg gtgtgggtgt tcccgggtgtc ggggttcctg gggtaggagt ccccggagtc | 120 |
| ggtgttccag gggtcgggtgt tcctggcggt ggtgttccgg gtgtgggcgt tccgggcggt | 180 |

ggtgttccgg gtgtgggCGT tccaggCGTg ggtgttccgg gtgtgggCGT accgggcatc 240  
 ggtgttccgg gcattggTgt gccgggcatc ggtgttccgg gcattggTgt gccgggcatc 300  
 ggtgtgccag gcattggTgt gccgggcatc ggtgttccgg gcattggTgt gccgggcatc 360  
 ggtgtgccag gcattggTgt agtaaccggt cgtggggatt ctCctgcgtc cagcgtcccc 420  
 ggcacCGgtg ttccgggcat tggTgtgccg ggcacCGgtg ttccgggcat tggTgtgccg 480  
 ggcacCGgtg tgccaggcat tggTgtgccg ggcacCGgtg ttccgggcat tggTgtgcca 540  
 ggcacCGgtg tgccgggcat tggTgtaccg ggcacCGgtg ttccgggcat tggTgtgccg 600  
 ggcacCGgtg ttccgggcat tggTgtgccg ggcacCGgtg tgccaggcat tggTgtgccg 660  
 ggcacCGgtg ttccgggcat tggTgtgccg ggcacCGgtg tgccaggcat tggTgcagta 720  
 accggtcgtg gggattctcc tgcgtccagc gtcccgggca tcggtgttcc gggcattggT 780  
 gtgccgggca tcggtgttcc gggcattggT gtgccgggca tcggtgtgcc aggcattggT 840  
 gtgccgggca tcggtgttcc gggcattggT gtgccaggca tcggtgtgcc gggcattggT 900  
 gtaccgggCG tgggcgttcc aggcgtgggt gttccgggtg tgggcgttcc gggTgtgggt 960  
 gttccCGgtg tcgggggttcc tggggtagga gtcccgggag tcggtgttcc aggggtcggT 1020  
 gttCctggcG tgggtgttcc gggTgtgggc gttccgggCG tgggtgttcc gggTgtgggc 1080  
 gttccaggCG tgggtgttcc gggTgtgggc gta 1113

<210> 15  
 <211> 699  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polímero 5.

<400> 15

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
 1 5 10  
 Arg Gly Ser His Met Glu Ser Leu Leu Pro Val Pro Gly Ile Gly Val  
 20 25 30  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
 35 40 45  
 Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 50 55 60  
 Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 85 90 95  
 Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
 100 105 110

Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly  
                   115                                  120                                  125  
 Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
                   130                                  135                                  140  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
  145                                  150                                  155                                  160  
 Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
                                   165                                  170                                  175  
 Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val Thr Gly  
                                   180                                  185                                  190  
 Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
                   195                                  200                                  205  
 Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
                   210                                  215                                  220  
 Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly  
  225                                  230                                  235                                  240  
 Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
                                   245                                  250                                  255  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
                                   260                                  265                                  270  
 Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
                   275                                  280                                  285  
 Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val Thr Gly  
  290                                  295                                  300  
 Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
  305                                  310                                  315                                  320  
 Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
                                   325                                  330                                  335  
 Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly  
                   340                                  345                                  350  
 Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
                   355                                  360                                  365  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
  370                                  375                                  380

Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val Thr Gly  
 405 410 415  
 Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 420 425 430  
 Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
 435 440 445  
 Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly  
 450 455 460  
 Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
 465 470 475 480  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
 485 490 495  
 Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 500 505 510  
 Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val Thr Gly  
 515 520 525  
 Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 530 535 540  
 Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
 545 550 555 560  
 Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly  
 565 570 575  
 Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
 580 585 590  
 Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro  
 595 600 605  
 Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 610 615 620  
 Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val Thr Gly  
 625 630 635 640  
 Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly  
 645 650 655

# ES 2 595 208 T3

Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile  
660 665 670

Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly  
675 680 685

Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Ile Gly Val  
690 695

<210> 16  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Glu Asp Val  
1

<210> 17  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Gly Glu Ala  
1

<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Ile Gly Ser Arg  
1 5

<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un biopolímero sensible a la temperatura que comprende los péptidos A, B y D, con la estructura  $[(D-B_n-A_m-B_s)]$ , donde

A tiene la estructura  $(F_{t1}-G-F_{t2})$ , donde

F tiene la estructura  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ , donde  $X_1$  y  $X_4$  pueden ser cualquier aminoácido excepto los aminoácidos prolina, lisina, serina y cisteína,  $X_2$  es el aminoácido prolina,  $X_3$  puede ser el aminoácido glicina o el aminoácido alanina y  $X_5$  es el aminoácido glicina,  
G es una secuencia de unión celular,  
 $t_1$  y  $t_2$  tienen valores de entre 8 y 12,

B tiene la estructura  $Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5$ , donde  $Y_1$  e  $Y_4$  pueden ser cualquier aminoácido excepto los aminoácidos prolina, lisina, serina y cisteína,  $Y_2$  es el aminoácido prolina,  $Y_3$  puede ser el aminoácido glicina o el aminoácido alanina y  $Y_5$  es el aminoácido glicina,

D comprende un péptido de 2 a 10 aminoácidos idénticos o diferentes seleccionados entre una lista que comprende lisina, cisteína, serina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico,

n tiene un valor de entre 10 y 18,

m tiene un valor de entre 1 y 3, y

s tiene un valor de entre 10 y 18.

2. El biopolímero de acuerdo con la reivindicación 1 donde G es una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido seleccionado de la lista que comprende RGD, LDT, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18 o SEQ ID NO. 19 o un dominio de unión a heparina o un dominio de unión a azúcares derivado de lectina y aglutinina.

3. El biopolímero de acuerdo con cualquiera de las dos reivindicaciones 1 o 2 donde D es el péptido SEQ ID NO. 4, B es el péptido SEQ ID NO. 3, n y s tienen un valor de 14, F es el péptido SEQ ID NO. 2,  $t_1$  y  $t_2$  tienen un valor de 10, G es el péptido SEQ ID NO. 1 y m tiene un valor de 2.

4. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos del biopolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una célula aislada transfectada con el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.

6. Uso del biopolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, del ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o de la célula de acuerdo con la reivindicación 5 para la preparación de un almacén de recolección celular.

7. Un almacén de recolección celular que comprende el biopolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, preferentemente donde la unión entre el biopolímero y el almacén implica al menos dos enlaces covalentes por molécula de biopolímero, más preferentemente tres enlaces covalentes por molécula de biopolímero.

8. El almacén de recolección celular de acuerdo con la reivindicación 7 **caracterizado por que** la superficie del mismo es lisa o curva, preferentemente dicho almacén de recolección celular se caracteriza por que comprende micropartículas.

9. Uso del almacén de acuerdo con la reivindicación 8 para la recolección celular.

10. Un dispositivo de cultivo y recolección celular que comprende el almacén de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.

11. Uso del dispositivo de recolección celular de acuerdo con la reivindicación 10 para el cultivo y la recolección celular.

12. Un método de recolección celular que comprende las siguientes etapas:

(a) funcionalizar un almacén de cultivo celular,

(b) unir covalentemente el almacén funcionalizado en la etapa (a) a al menos dos de los aminoácidos del péptido D del biopolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

(c) poner en contacto una suspensión celular con el almacén obtenido en (b), y

(d) recolectar las células adheridas a dicho almacén, preferentemente disminuyendo la temperatura del cultivo celular de 37 a 10 °C.

13. El método de recolección celular de acuerdo con la reivindicación 12 donde el armazón se funcionaliza con grupos alquínilo, grupos alqueno, grupos nitrilo, grupos carbonilo o con grupos imina, preferentemente con grupos alquínilo.
- 5 14. El método de recolección celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 donde, antes de la etapa (b), los grupos reactivos de las cadenas laterales de al menos dos de los aminoácidos del péptido D del biopolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se transforman en grupos azida.
- 10 15. El método de recolección celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14 donde el enlace covalente de la etapa (b) se forma mediante cicloadición.

FIG. 1

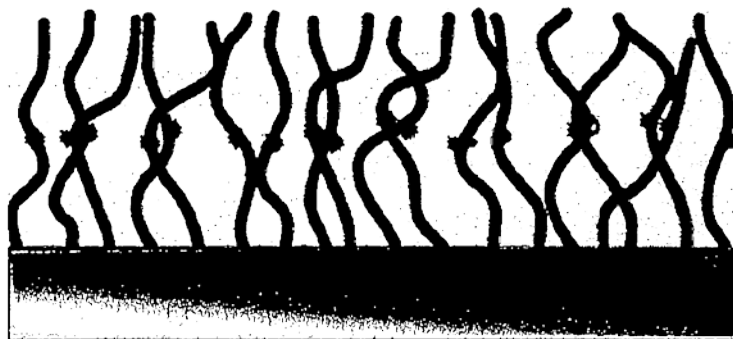


FIG. 2

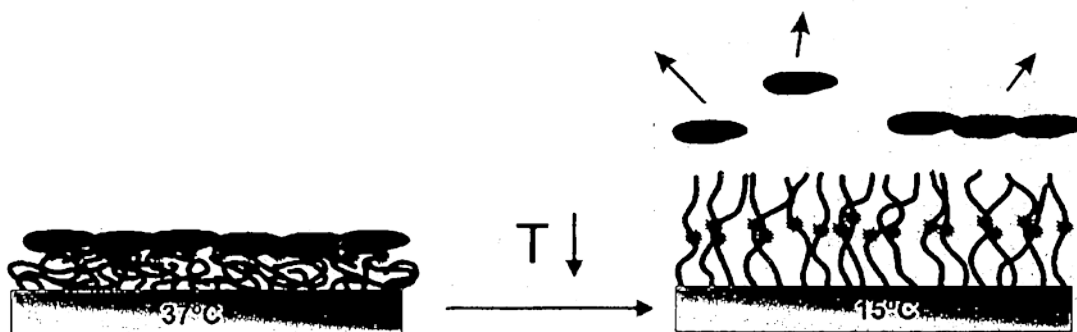


FIG. 3



FIG. 4

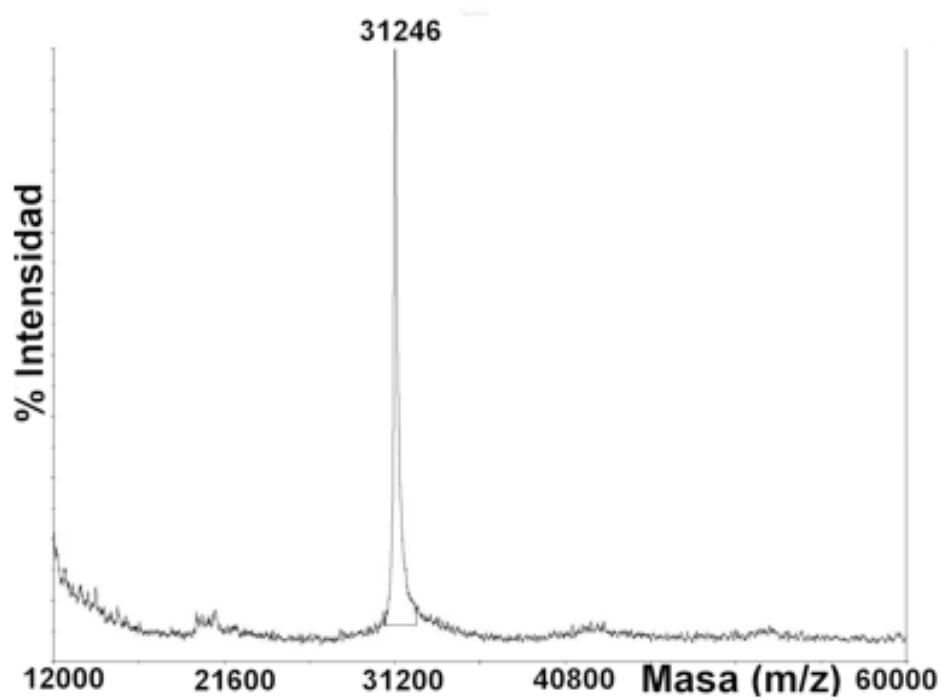


FIG. 5

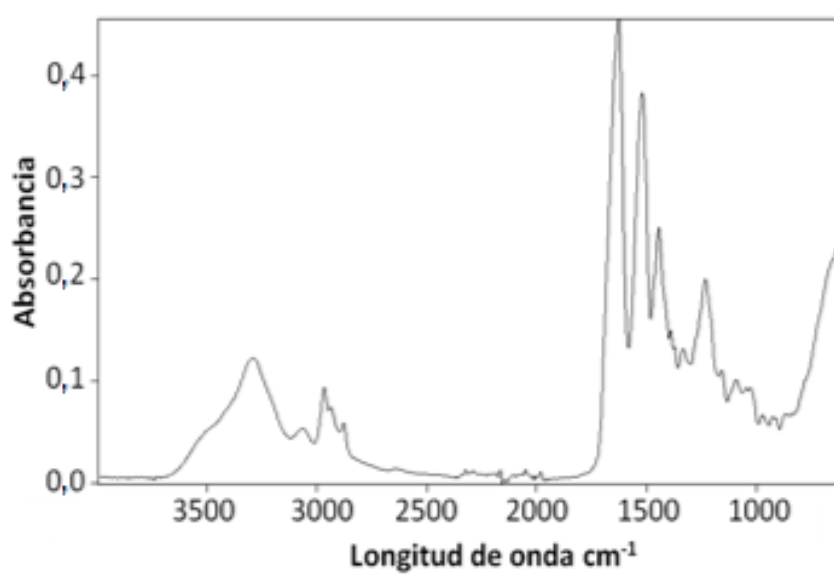


FIG. 6

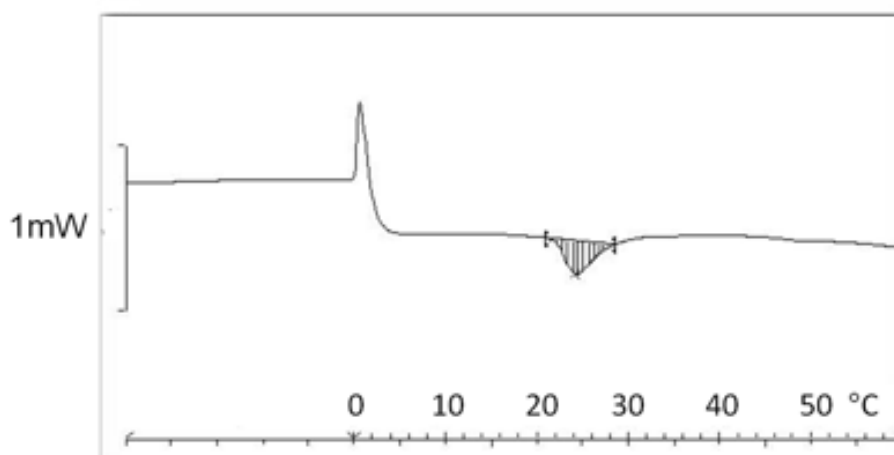


FIG. 7

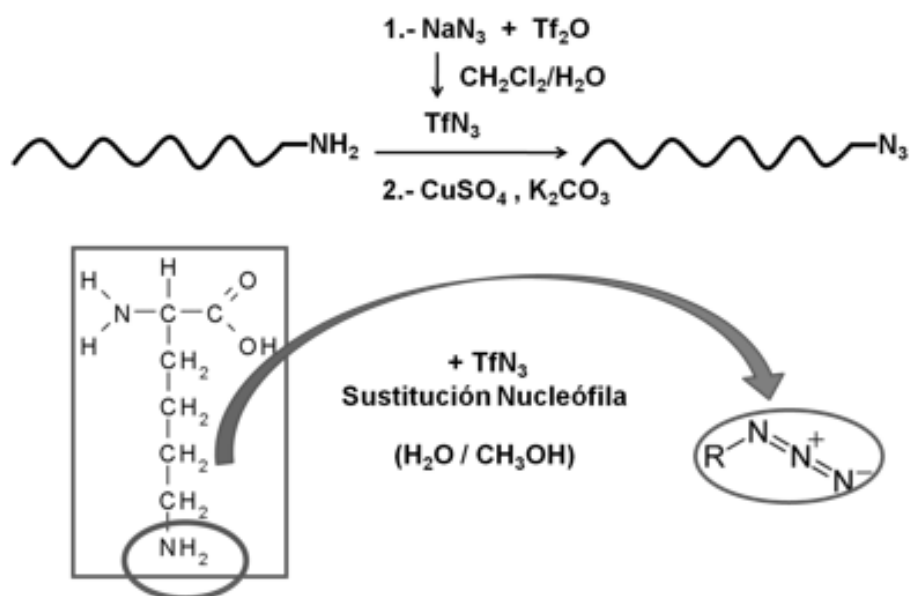


FIG. 8

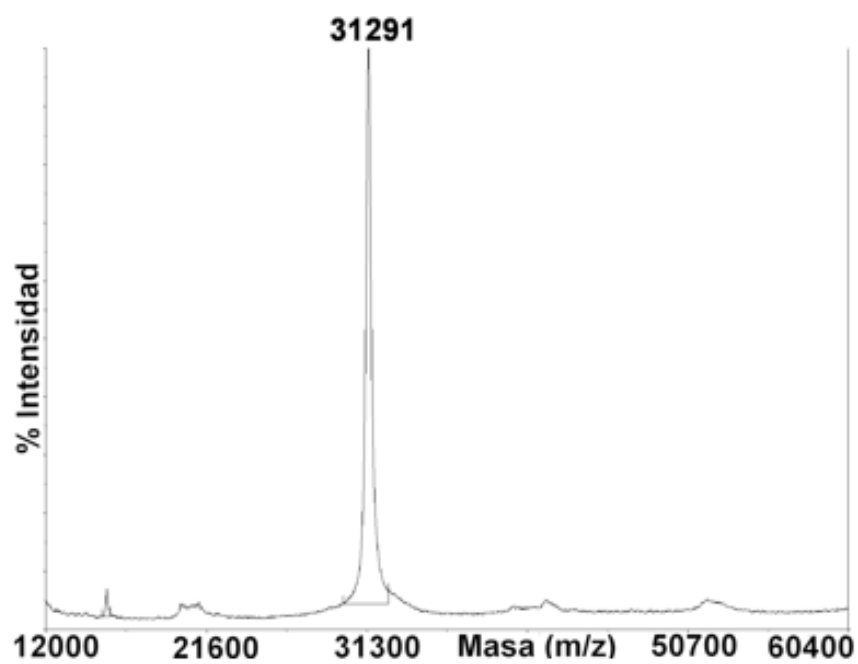


FIG. 9

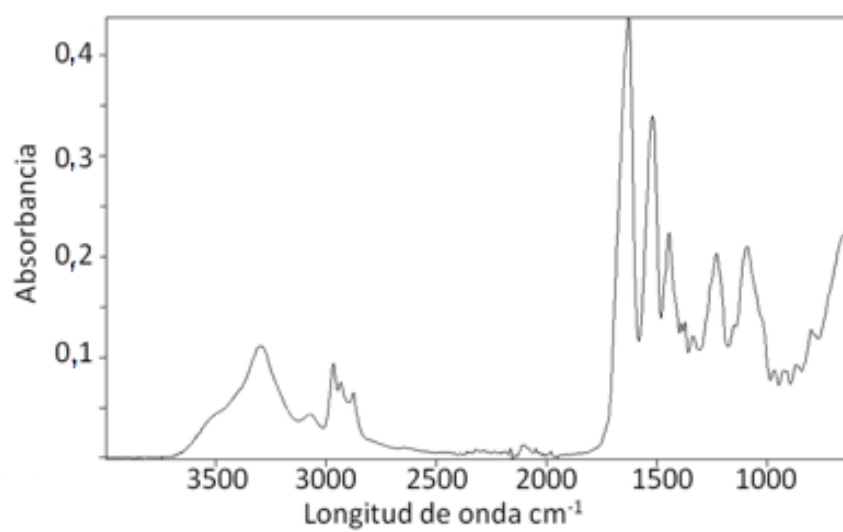


FIG. 10

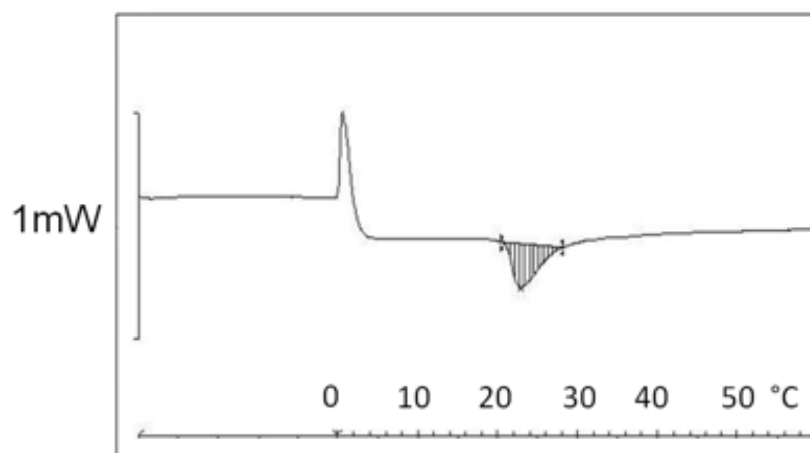


FIG. 11

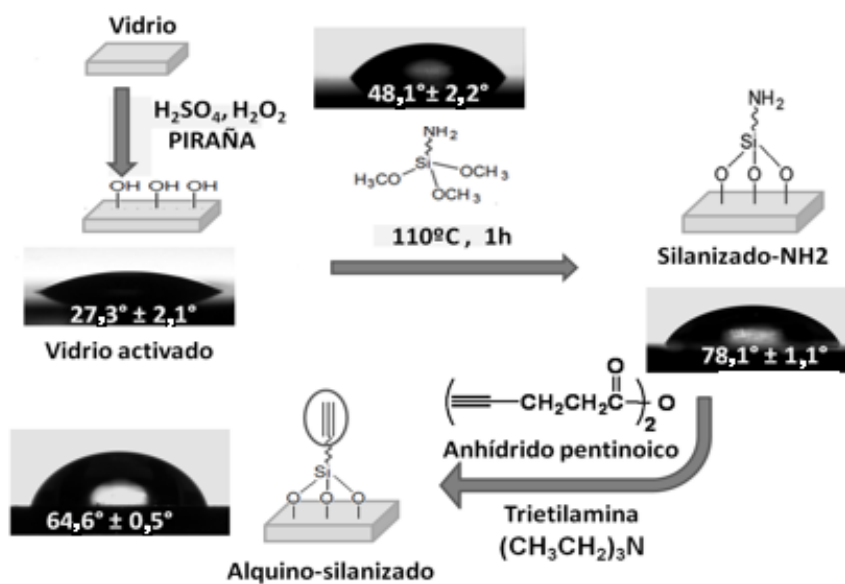


FIG. 12

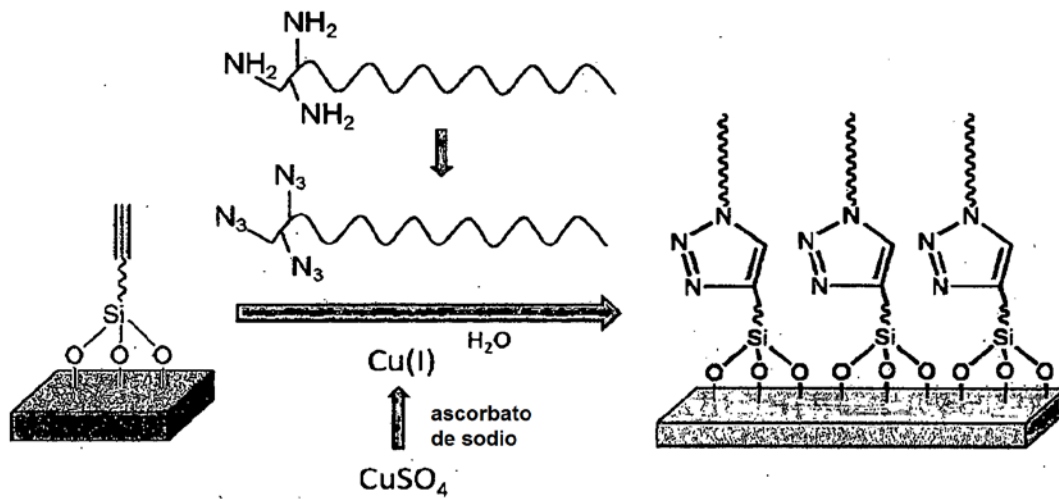


FIG. 13

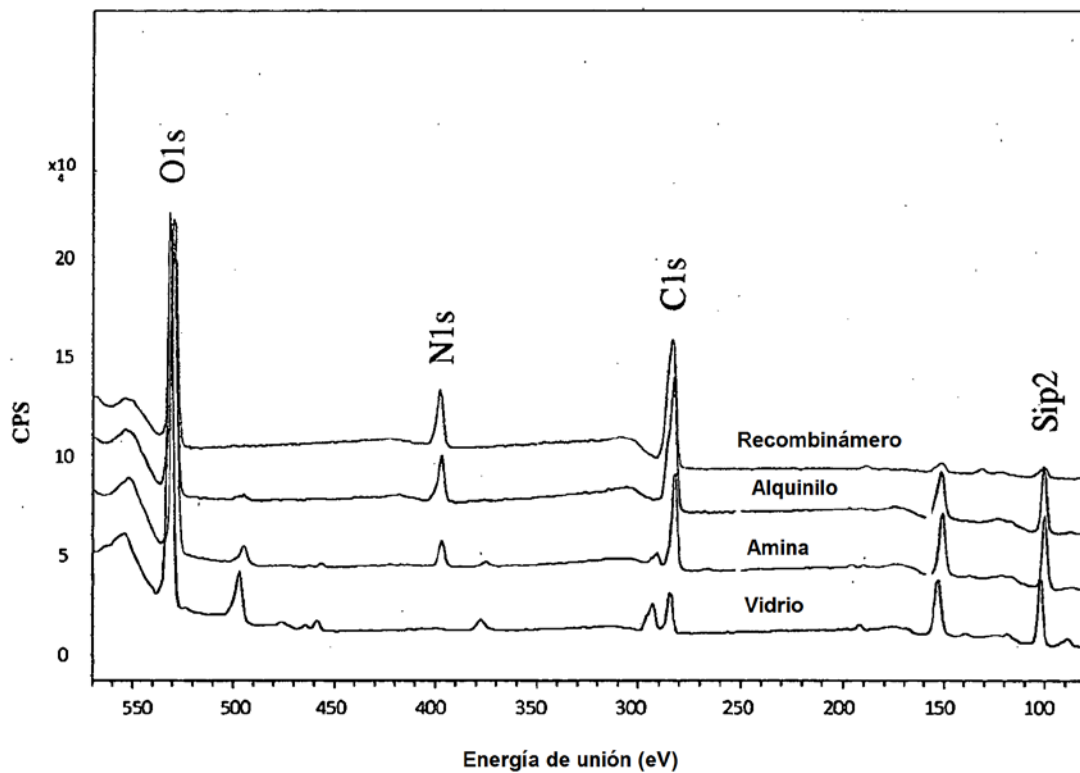


FIG. 14

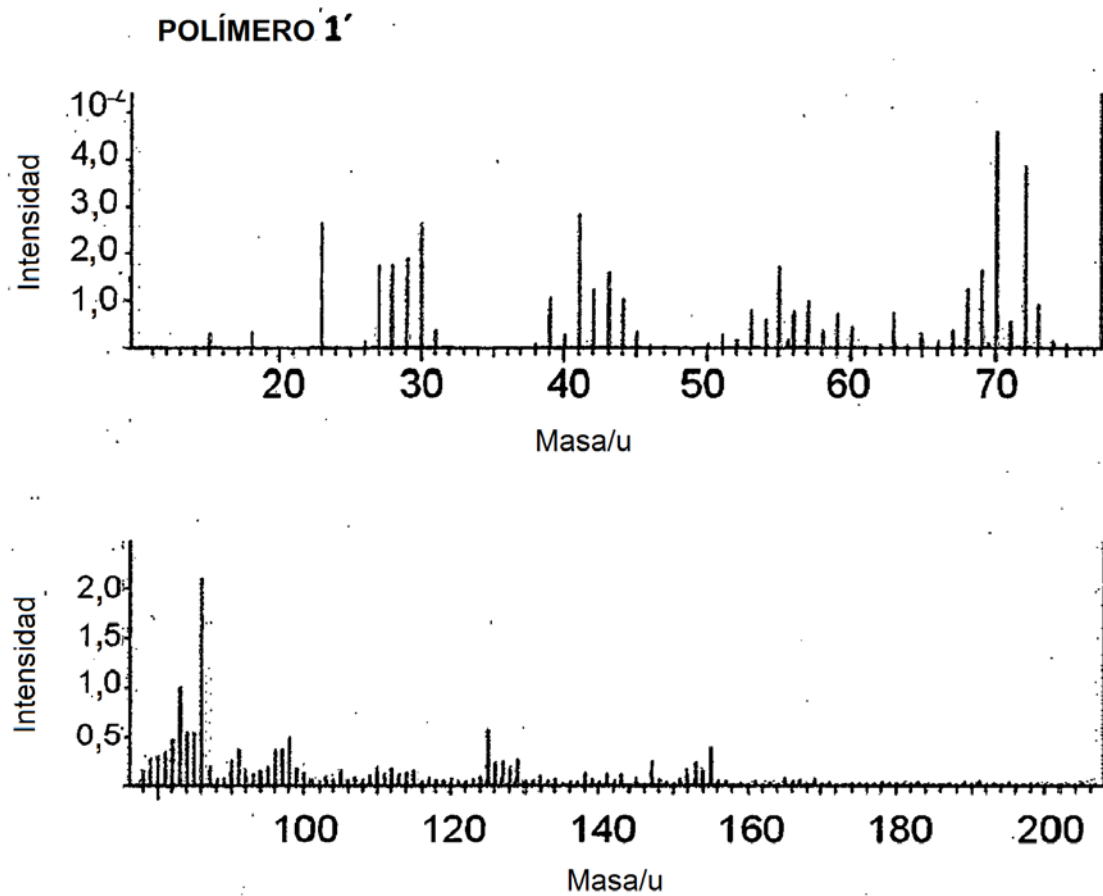
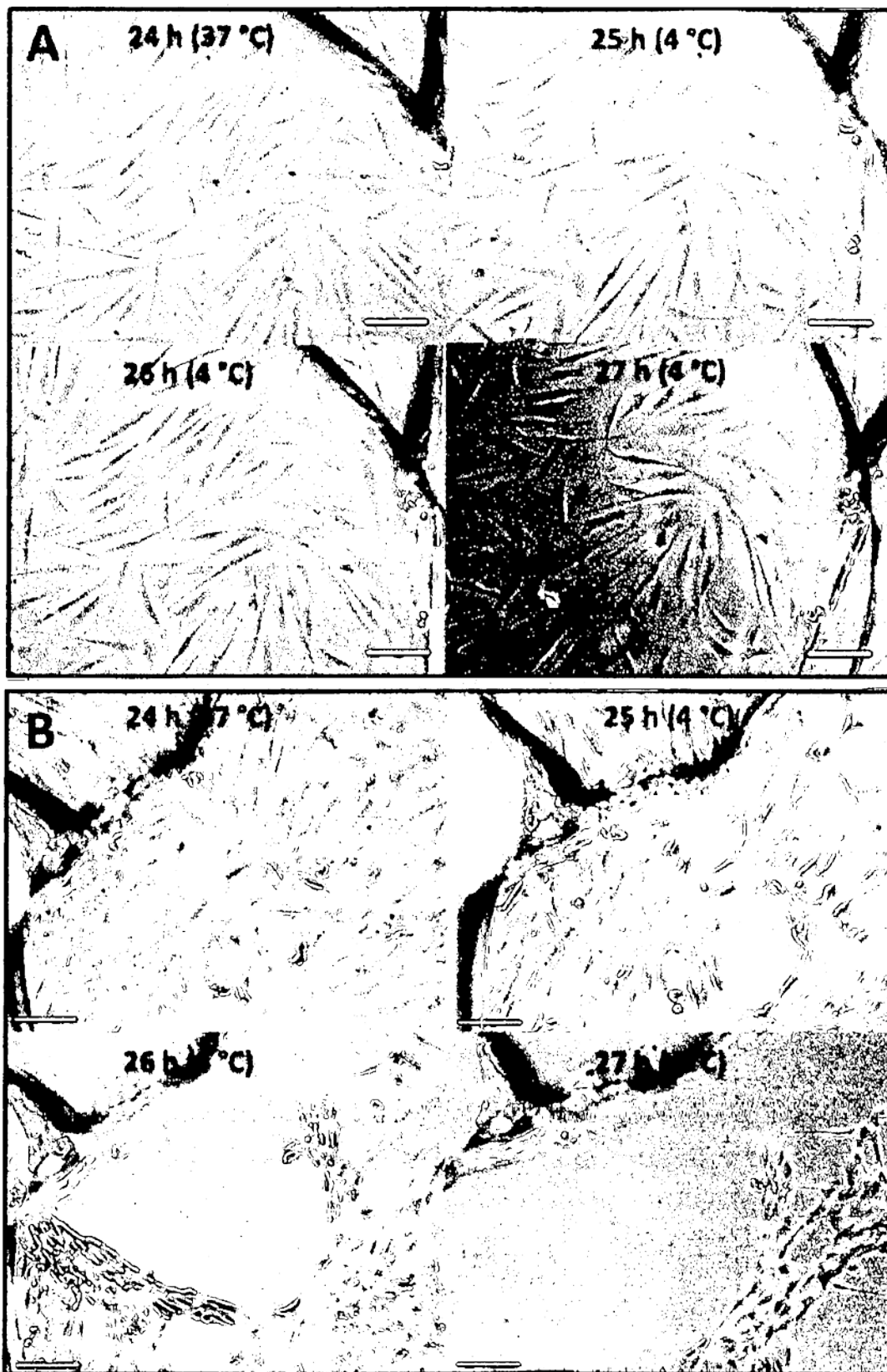
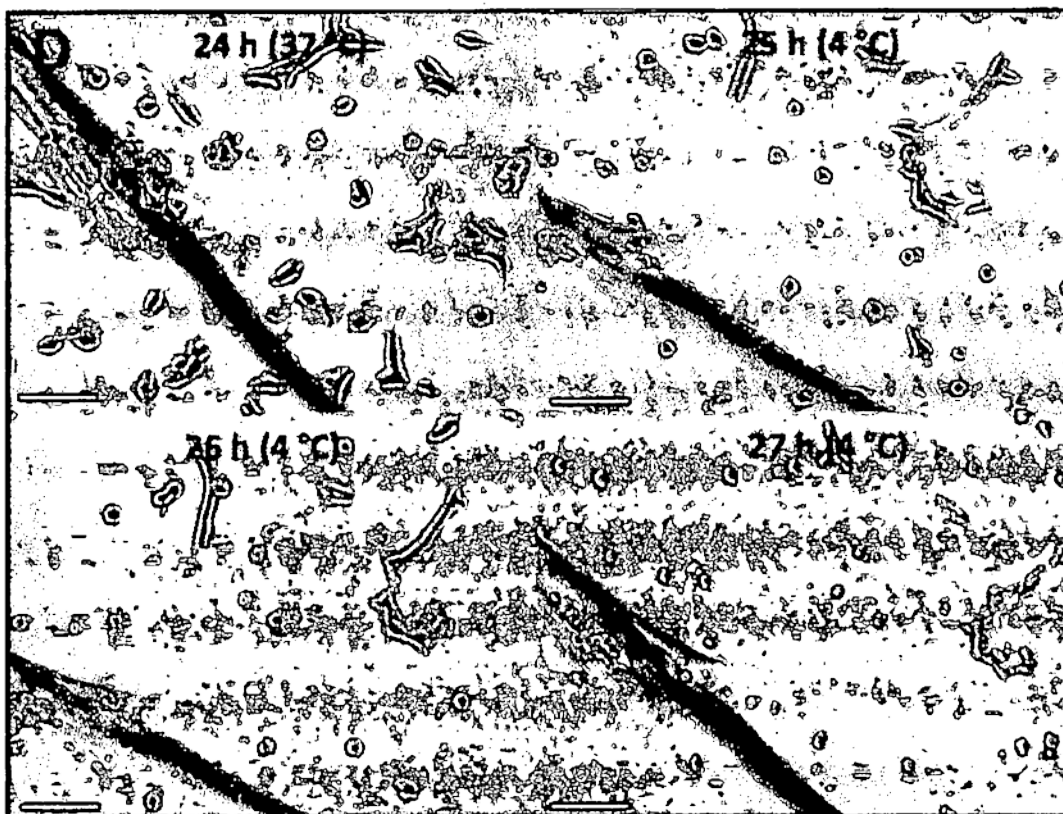
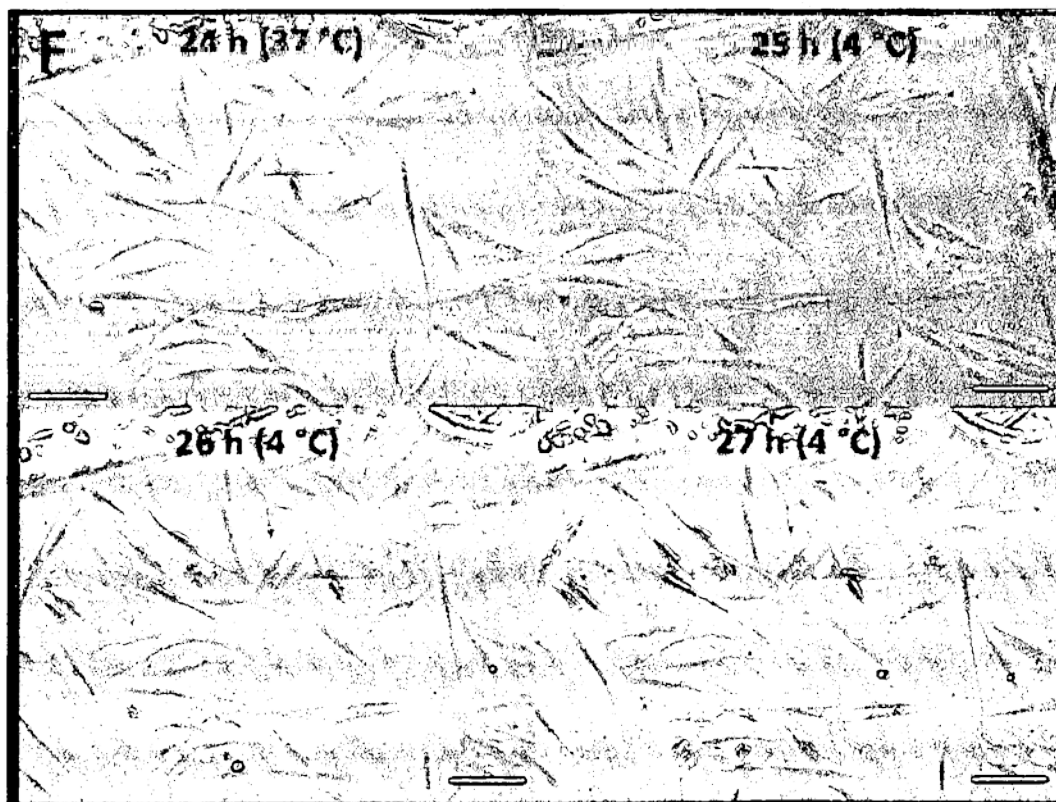
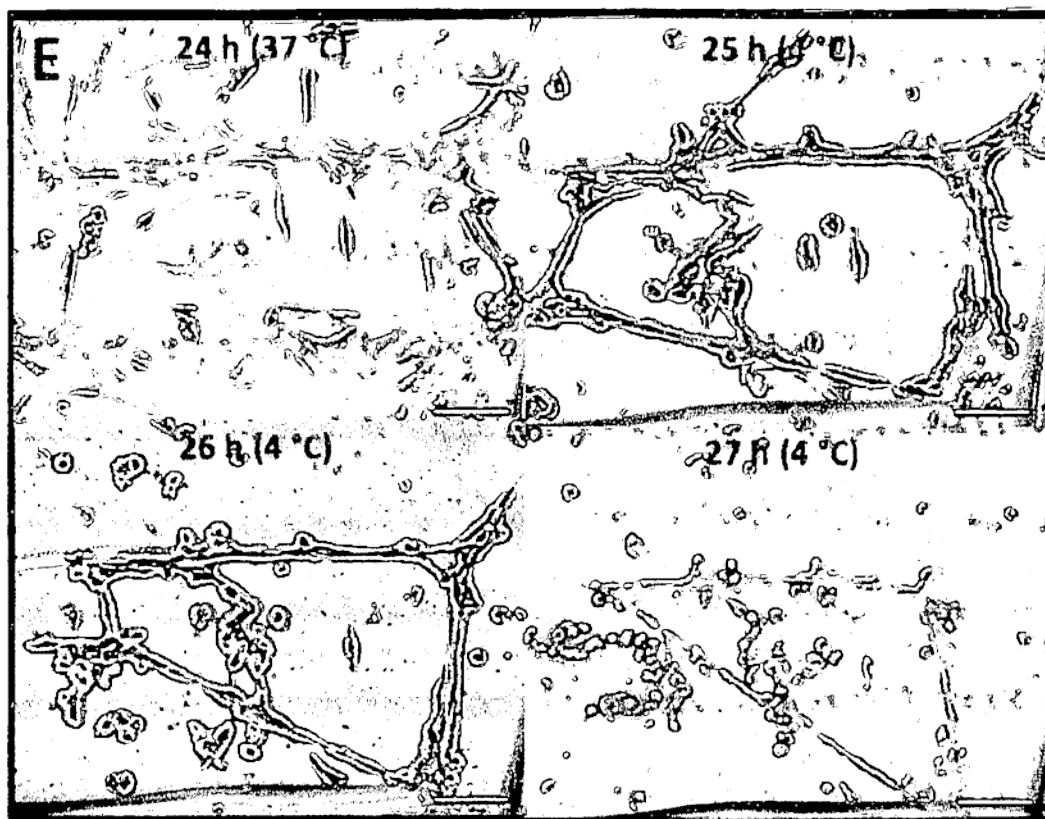


FIG. 15







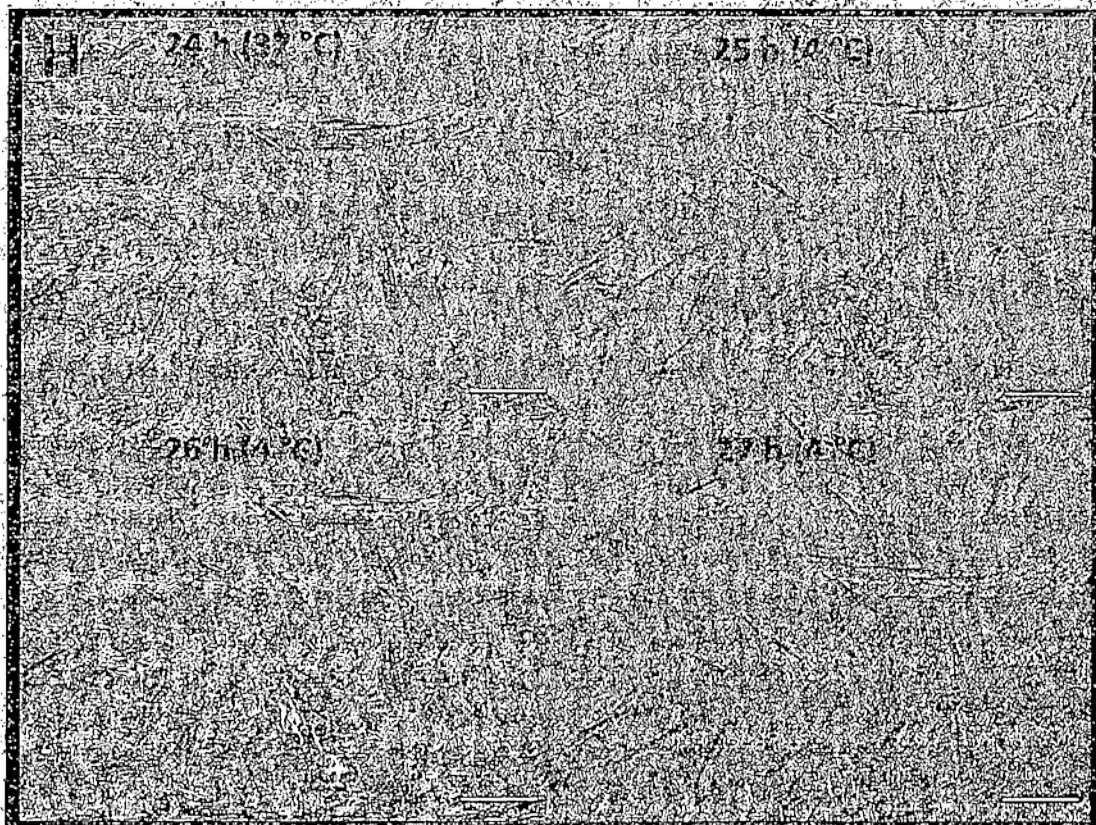
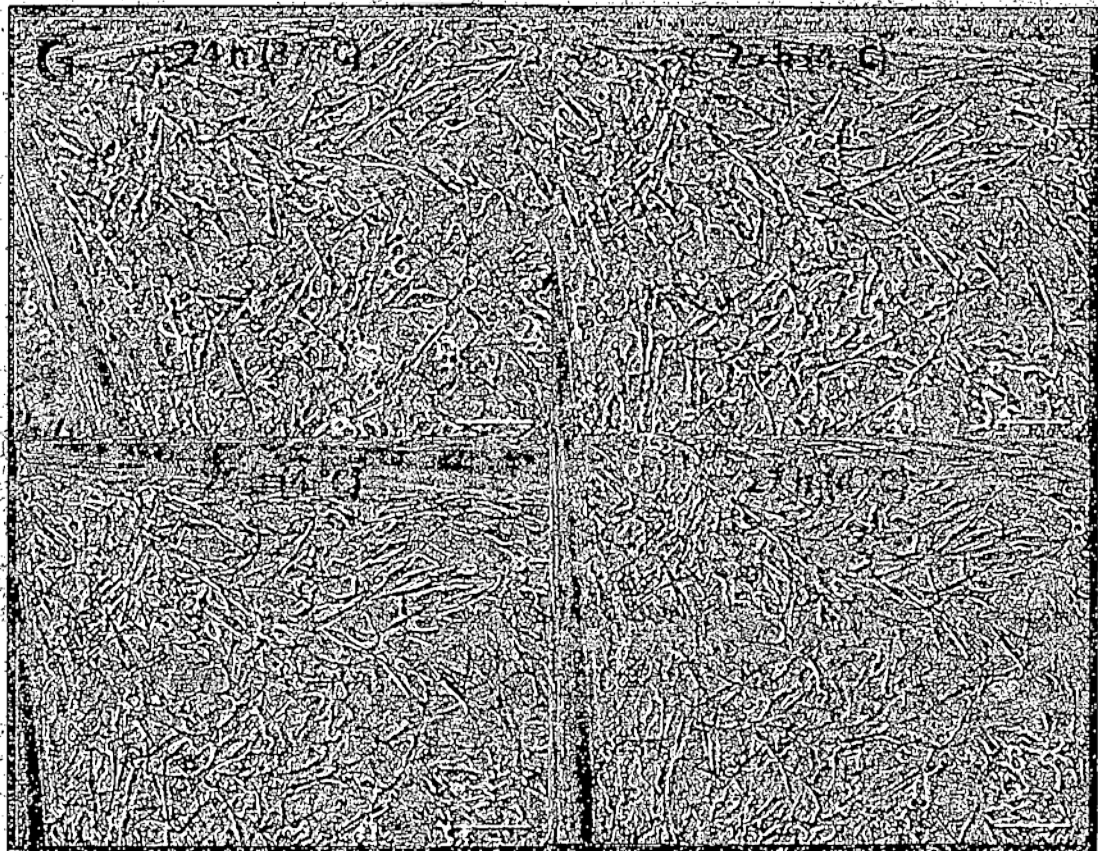


FIG. 16

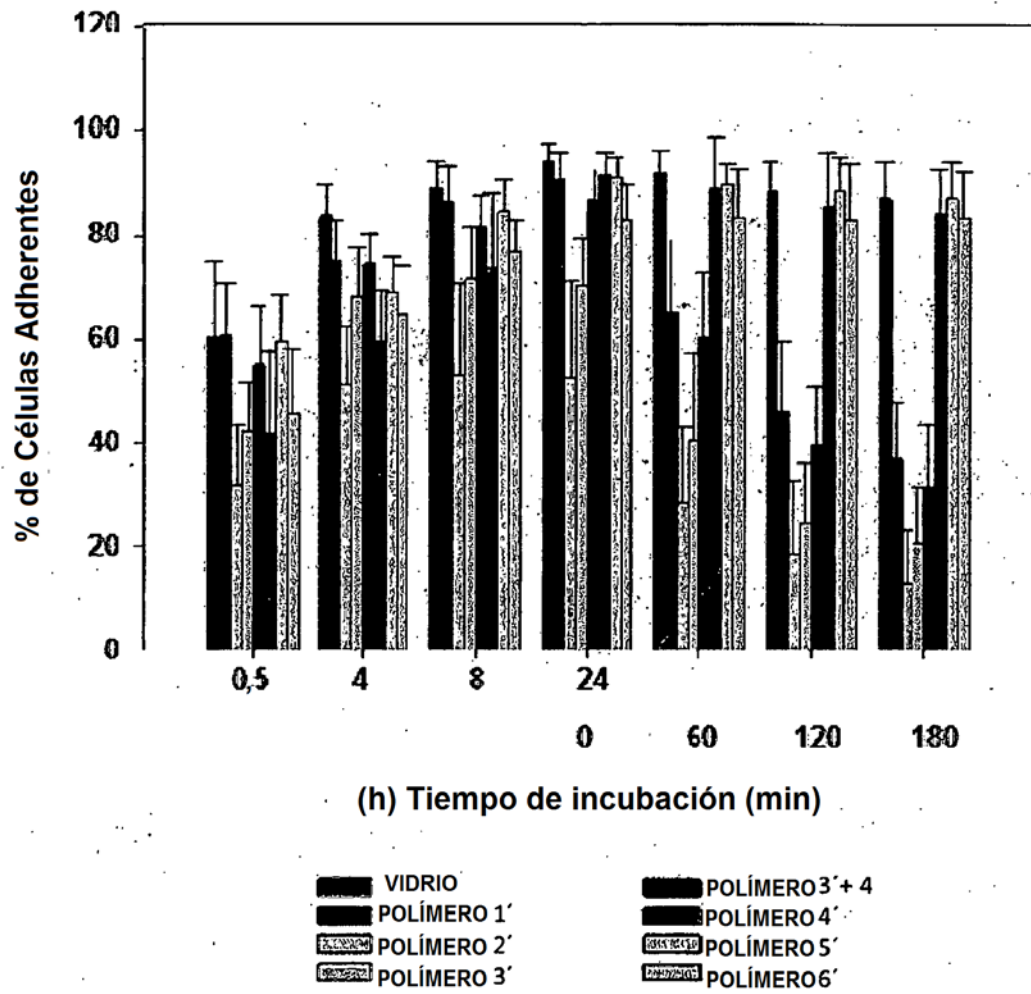


FIG. 17

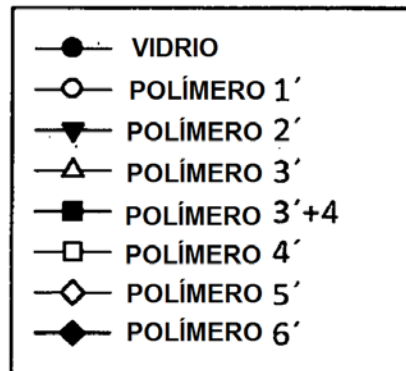
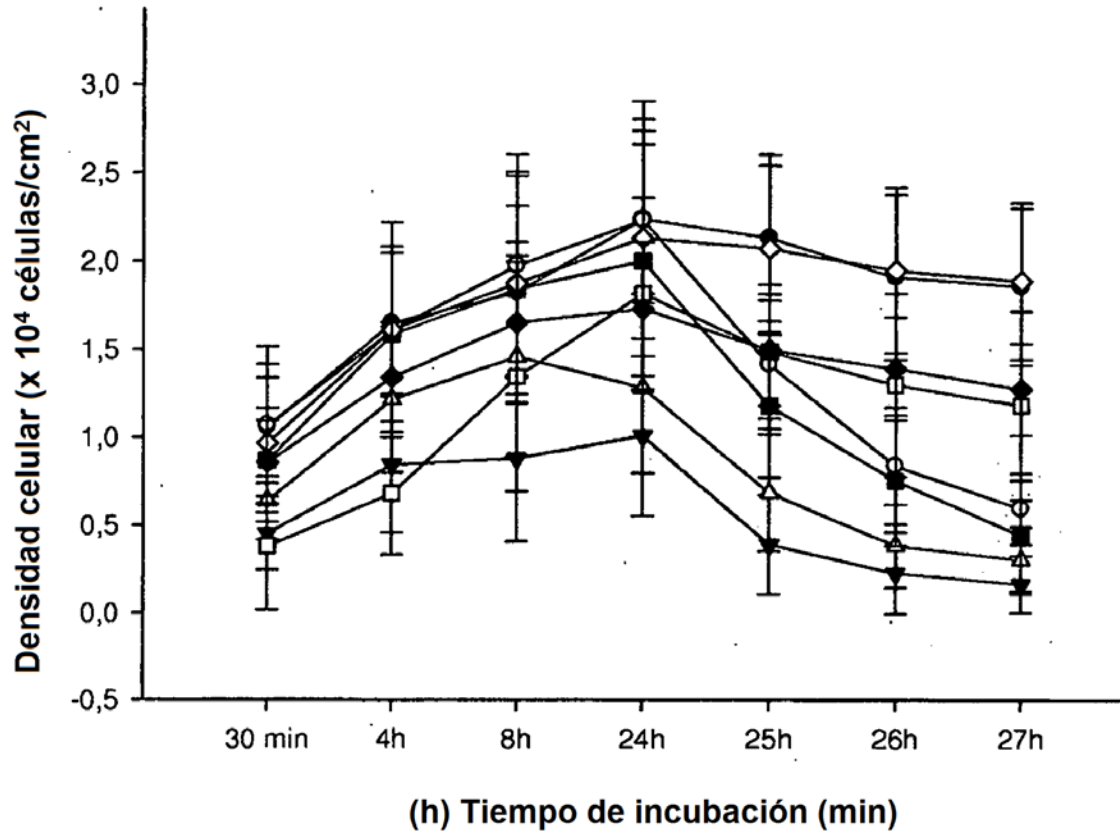


FIG. 18

