



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 350**

51 Int. Cl.:

C08G 63/06 (2006.01)	C08G 63/91 (2006.01)
C08K 3/00 (2006.01)	C08K 5/00 (2006.01)
C08J 9/26 (2006.01)	C08J 9/28 (2006.01)
C08L 67/04 (2006.01)	C12P 7/62 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)	A61L 17/00 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)	A61L 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06075303 .5**

96 Fecha de presentación : **22.12.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1659142**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2006**

54

Título: **Composiciones polihidroxialcanoato que tienen tasas de degradación controladas.**

30

Prioridad: **22.12.1997 US 68455 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73

Titular/es: **METABOLIX, Inc.**
21 Erie Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72

Inventor/es: **Williams, Simon F;**
Martin, David P y
Skraly, Frank A

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 350 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

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a stents que comprenden poli(4-hidroxibutirato) o poli(4-hidroxibutirato-co-alcanoato) copolímeros.

5 Antecedentes de la invención

En el área médica se ha desarrollado un número de polímeros degradables que se descomponen *in vivo* en sus monómeros respectivos en semanas o en unos pocos meses. A pesar de la disponibilidad de estos polímeros sintéticos degradables persiste la necesidad de desarrollar polímeros degradables que ofrezcan una gama más amplia de propiedades mecánicas.

10 Los polihidroxialcanoatos son poliésteres naturales, termoplásticos y pueden ser procesados mediante técnicas tradicionales poliméricas para su uso en una gran diversidad de aplicaciones, incluyendo el empaque de bienes de consumo, acolchado de pañales desechables y bolsas de basura, alimentos y productos médicos. Los esfuerzos iniciales se centraron en aplicaciones mediante moldes, en particular para elementos de empaque para el consumo tales como botellas, contenedores de cosméticos, plumas, montículos de golf y similares. Las Patentes EE.UU. 4 826 493 y 4 880 592 describen la manufactura de películas de PHB y PHBV y su uso como entretela protectora del acolchado de pañales. La Patente EE.UU. No. 5 292 860 describe la manufactura del copolímero PHA poly_(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) y el uso de estos polímeros para producir la entretela protectora del acolchado de pañales, así como otros elementos desechables. Los materiales de la entretela protectora de los pañales y de otros materiales para la producción de artículos biodegradables de higiene personal a partir de copolímeros PHB y no PHBV, se describen en la PCT WO 95/20 621, WO 95/23 250, WO 95/20 615, WO 95/33 874, EE.UU. 5 502 116, EE.UU. 5 536 564, EE.UU. 5 489 470 y WO 96/08535.

25 Una de las propiedades de mayor utilidad de los PHA que los distingue rápidamente de los polímeros derivados de petroquímicos es su biodegradabilidad. Producidos naturalmente mediante bacterias de la tierra, los PHA se degradan mediante exposición subsiguiente a estas mismas bacterias ya sea en tierra, abono o sedimento marino. La biodegradación de los PHA depende de un número de factores tales como la actividad microbiana del entorno y el área de la superficie del elemento. Adicionalmente, la temperatura, el pH, el peso molecular y la cristalinidad, son aspectos importantes. La biodegradación comienza cuando los microorganismos comienzan a crecer en la superficie del plástico y segregan enzimas que descomponen el polímero en unidades monoméricas ácidas hidroxiladas. Los ácidos hidroxilados entonces son tomados por los microorganismos y utilizados como fuentes de carbono para el crecimiento. En ambientes aerobios los polímeros se degradan a dióxido de carbono y agua, mientras que en ambientes anaerobios los productos de la degradación son el dióxido de carbono y el metano (Williams, S.F. and Peoples, O.P. CHEMTECH, 26, 38-44 (1996). Mientras que el mecanismo para la degradación de los PHA en el ambiente es ampliamente considerado como por vía del ataque enzimático y puede ser relativamente rápido, el mecanismo de degradación *in vivo* generalmente se entiende que involucra un ataque hidrolítico simple en los enlaces de éster de los polímeros. Puede o no ser mediante proteínas. A diferencia de los polímeros que comprenden 2-hidroxiácidos como el ácido poliglicólico y poliláctico, los polihidroxialcanoatos normalmente se componen de 3-hidroxiácidos y en ciertos casos hasta de 4, 5 y 6-hidroxiácidos. Los enlaces de ésteres derivados de estos hidroxiácidos generalmente son menos susceptibles a hidrólisis que los enlaces de ésteres derivados de 2-hidroxiácidos.

45 Los investigadores han desarrollado procesos para la producción de una gran variedad de PHA y se han incorporado a polímeros alrededor de 100 monómeros diferentes bajo condiciones controladas de fermentación (Steinbuechel A and Valentín, H.E., FEMS Microbiol. Lett, 128:219-225 (1995)). Actualmente hay solo dos compuestos de PHA disponibles comercialmente, poli-(R)-3-hidroxibutirato (PHB) y poli-(R)-3-hidroxibutirato-co-(R)-3-hidroxivalerato (PHBV). Debido a la gran diversidad de su composición, pueden producirse los PHA con un rango de propiedades físicas (Williams, S.F. and Peoples, O.P., CHEMTECH, 26:38-44 (1996)). Los PHA, PHB y PHBV comercialmente disponibles, representan solo un pequeño componente de los conjuntos de propiedades disponibles a los PHA. Por ejemplo, la extensión para descomponer el PHB y el PHBV fluctúa del 4 al 42%, mientras que la misma propiedad para el poli-4-hidroxibutirato (P4HB) es de alrededor del 1 000% (Saito, Y. and Doi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16: 99-104). De manera similar los valores de los módulos de Young y de resistencia a la tensión para el PHB y el PHBV son de 3,5 a 0,5 GPa y de 40 a 16 MPa, respectivamente (para un contenido HV en aumento a 25 mol %), comparado con 140 MPa y 104 MPa, respectivamente para el P4HB (Saito, Y. and Doi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16: 99-104).

60 En adición a encontrarle uso comercial como un reemplazo biodegradable para resinas de artículos sintéticos, el PHB y el PHBV se han utilizado extensamente para su uso en aplicaciones biomédicas. Estos estudios abarcan desde usos potenciales en liberación controlada que han sido revisados por Koosha, F. et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:117-130 (1989) y Pouton C.W. and Akhtar, S.

Adv. Drug Delivery Rev., 18:133-162 (1996), hasta el uso en formulación de tabletas, suturas quirúrgicas, vendajes, polvos lubricantes, vasos sanguíneos, reconstrucción de tejido, implantes quirúrgicos para unir partes tubulares del cuerpo, placas de fijación de fracturas óseas y otros usos ortopédicos, tal como se describe en la WO 98/51 812 por Metabolix. Quizás el desarrollo médico más avanzado es el uso de PHB y PHBV para preparar una lámina porosa, flexible, bio-reabsorbible para la separación de tejido y la estimulación de la regeneración de tejido en casos de tejido blando dañado, descrito en la Solicitud Europea de Patente 754 467 A1 a Bowald, S. and Johansson_Ruden, G. solicitada el 26 de junio de 1988 y en la EP 0 349 595 A2. Informes recientes también han descrito el uso de PHBV para mantener el crecimiento celular (Rivard, C.H. et al., J. Appl. Biomat., 6: 65-68 (1995)).

Además de la biocompatibilidad, también a menudo se desea que el dispositivo médico implantado se degrade después de haber cumplido su misión principal. El PHB y el PHBV, los únicos PHA probados como implantes médicos hasta la fecha, han mostrado períodos de degradación in vivo muy prolongados, de más de un año para el PHB (Duvernoy, O., Malm, et al. Thorac. Cardiovasc. Surgeon (1995) 43: 271-74. Malm, et al., C. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. (1992) 104: 600-607.). Para muchas aplicaciones, este período de degradación tan extenso es indeseado ya que la persistencia del polímero en el sitio de sanación de una herida puede conllevar un respuesta inflamatoria crónica en el paciente. Se ha constatado que los parches de PHB de degradación lenta utilizados para regenerar tejido arterial educen una respuesta macrófaga a largo plazo (mayor de dos años) (Malm, et al, Eur. Surg. Res. 1994, 26: 298-308). Se identificó a los macrófagos como involucrados en la degradación de los implantes de PHB y esta respuesta macrófaga a largo plazo parece indicar la presencia de material persistente de baja degradación en forma de partículas que se origina a parte del implante. Es más, aunque el parche de PHB utilizado para la reparación del pericardio no podía ser visto mediante microscopía de luz ordinaria luego de 12 meses de implantación, se observó material residual de pequeñas partículas mediante microscopía bajo luz polarizada. (Malm, et al., C. Sand J Thor. Cardiovasc. Surg. 1992, 26; 9-14). No está claro si este material en forma de partículas se mantiene localizado en el sitio del implante o si puede emigrar a lo largo del cuerpo, causando complicaciones no previstas. El destino biológico o el impacto médico de este material en forma de partículas no pueden predecirse sin un estudio a largo plazo. Para minimizar los problemas potenciales asociados con PHA de degradación lenta resulta ventajoso utilizar materiales re-absorbibles con tasas más rápidas de degradación in vivo.

Hay un solo informe que describe la biocompatibilidad o degradación in vivo de cualquier otro polímero PHA en aplicaciones médicas (WO 98/51 812). La Patente EE.UU. No. 5 334 698 a Witholt, B. y Lageveen, RG., menciona artículos médicos producidos con un poliéster óptimamente activo aislado a partir de células *Pseudomonas oleovorans*, sin embargo, no se citan ejemplos o discusión de la fabricación o de pruebas de biocompatibilidad y no se brindan métodos para obtener el polímero en una forma adecuadamente pura para uso médico in vivo. Debido a que las bacterias apropiadas para la producción de estos polímeros pueden producir también una endotoxina así como otros mediadores inflamatorios, es importante que el polímero pueda ser procesado para eliminar estos contaminantes.

Para muchas aplicaciones, la tasa de biodegradación del PHA se adapta satisfactoriamente a la vida útil requerida del producto. Sin embargo, en ciertos casos sería aconsejable ser capaz de ejercer más control sobre la tasa a la que los polímeros se descomponen en el ambiente. Tal control ampliaría el rango de aplicaciones para esta clase de polímeros. Por ejemplo, una película de PHA puede tener propiedades mecánicas deseadas para ser utilizada como una película de estiércol y paja, y sin embargo no tener la tasa óptima de degradación para la aplicación. La capacidad de ser capaz de controlar la tasa de degradación del polímero en el ambiente sería por tanto una ventaja específica.

Por tanto, mientras los polihidroxicanoatos ofrecen una amplia gama de propiedades mecánicas que son potencialmente útiles en aplicaciones médicas, su uso particularmente in vivo como polímeros re-absorbibles se limita debido a su lenta hidrólisis. Por tanto sería apropiado el desarrollo de métodos para controlar las tasas de degradación de los polihidroxicanoatos.

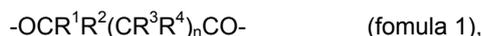
Describimos aquí métodos para el control de tasa de degradación de polihidroxicanoatos.

También describimos nuevas composiciones que comprenden o derivados del polihidroxicanoatos que se degrada mas fácilmente en el medio ambiente y/o *in vivo*.

Métodos para la fabricación de artículos y dispositivos de estas composiciones son también descritos.

Resumen de la invención

La presente invención describe un stent que comprende poli(4-hidroxibutirato-co-hidroxicanoato) copolímero del mismo, donde el hidroxicanoato es definido mediante la formula 1:



donde R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son seleccionados de forma independiente de radicales hidrocarbonatos, halo y radicales sustitutos de hidroxilo, radicales hidroxilo, radicales halogeno, radicales sustituidos de nitrógeno, radicales sustituidos de oxígeno y/o hidrogeno; y n es un entero entre 1 y 15.

- 5 Como se describe en este documento, se han desarrollado composiciones polihidroxicanoato biocompatibles con tasas de degradación controladas. Los polihidroxicanoatos pueden contener aditivos que alteran las tasas de degradación. Los polihidroxicanoatos se pueden formar de mezclas de monómeros o incluir grupos pendientes o modificaciones en sus esqueletos para alterar sus tasas de degradación. Los polihidroxicanoatos pueden ser modificados químicamente. Métodos para la fabricación de dispositivos que aumentan la porosidad o el área de la superficie expuesta pueden ser usados para alterar la degradabilidad. Por ejemplo, como demuestran los ejemplos, se pueden hacer polihidroxicanoatos porosos usando métodos que crean poros, huecos o espacios intersticiales tales como una emulsión o técnica de secado por atomización, o que incorpora partículas lixiviables o liofilizables dentro del polímero. Como se describe en este documento, los ejemplos describen composiciones poli(4HB) que incluye espumas, recubrimientos, mallas y micropartículas. Como se demuestra por los ejemplos y ejemplos de referencia, estas composiciones polihidroxicanoato tienen propiedades mecánicas favorables, así como son biocompatibles y se degradan dentro de marcos de tiempos deseables bajo condiciones fisiológicas. Estos materiales polihidroxicanoato proporcionan un rango mas amplio de tasas de degradación de polihidroxicanoato que las que están disponibles actualmente.

También se describen los métodos para procesar estos materiales, particularmente en caso de aplicaciones terapéuticas, profilácticas o con fines de diagnóstico, o en dispositivos que pueden ser implantados o inyectados.

Breve descripción de los diagramas

- 25 La figura 1 es un esquema de biopolímeros PHA ampliamente divididos en grupos de acuerdo con la longitud de sus grupos colgantes y sus respectivas rutas biosintéticas.

La Figura 2a es un esquema de las rutas mediante las cuales se derivan los grupos de PHA de pendencia corta.

La Figura 3 es un gráfico de degradación del P4HB in vivo en un marco de tiempo (semanas)

- 30 Descripción detallada de la invención

I. Compuestos PHA

Compuestos de polímeros

Un stent de la presente invención comprende un poli(4-hidroxicanoato) o un poli(4-hidroxicanoato-co-hidroxicanoato) copolímero de los mismos, donde el hidroxicanoato es definido por la formula I:



donde n es un entero, por ejemplo entre 1 y 15 y en una realización preferente, entre 1 y 4; y donde R^1 , R^2 , R^3 y R^4 independientemente, pueden ser radicales de hidrocarburo que incluyen radicales de hidrocarburo de cadena larga; halo y radicales hidroxilo-sustituidos, radicales hidroxilo; radicales halógenos, radicales nitrógeno-sustituidos; radicales oxígeno-sustituidos y/o átomos de hidrógeno.

- 40 Tal como se utiliza aquí, la fórmula $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_n-$ se define como incluyendo de las siguiente fórmulas:

$-\text{CR}^3\text{R}^4-$ (donde $n=1$);

$-\text{CR}^3\text{R}^4\text{CR}^3\text{R}^4-$ (donde $n=2$); y

$-\text{CR}^3\text{R}^4\text{CR}^3\text{R}^4\text{CR}^3\text{R}^4-$ (donde $n=3$);

donde R^3 , R^4 , $\text{R}^{3'}$, $\text{R}^{4'}$, $\text{R}^{3''}$, and $\text{R}^{4''}$

- 45 pueden ser independientemente radicales de hidrocarburo que incluyen radicales de hidrocarburo de cadena larga; radicales halo- e hidroxilo-sustituidos; radicales hidroxilo; radicales halógenos; radicales nitrógeno-sustituidos; radicales oxígeno-sustituidos y/o átomos de hidrógeno. Por lo tanto, la fórmula incluye unidades derivadas de 3-ácidos ($n=1$), 4-hidroxiácidos ($n=2$) y 5-ácidos ($n=3$).

- 50 Estas unidades pueden ser las mismas en un homopolímero o pueden ser unidades diferentes, como por ejemplo en un copolímero o terpolímero. Los polímeros típicamente tienen un peso molecular sobre 300, por ejemplo entre 300 y 10^7 y en una realización preferente 10 000 a 10 000 000 Daltons.

5 Los materiales PHA pueden contener o ser modificados para incluir otras moléculas, tales como compuestos bioactivos y detectables, agentes activos sobre la superficie, otros polímeros degradables o no degradables, así como materiales utilizados para modificar las propiedades mecánicas de los PHA tales como plasticadores, rellenos, agentes nucleantes, colorantes, estabilizadores, modificadores y vinculantes.

Los PHA representativos que pueden ser modificados o formulados como se describen aquí son descritos en: Steinbüchel, A. y Valentin, H.E., *FEMS Microbiol., Lett.*, 128:219-228 (1995).

10 Los PHB y P4HB poseen propiedades físicas muy diferentes. Un rango de copolímeros PHA que contienen 4-hidroxibutirato es conocido o puede ser preparado con un rango de propiedades intermedias entre las del PHB y el P4HB (Saito, Y. and Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* (1994) 16: 99-104), sin embargo, las aplicaciones biomédicas, las pruebas de biocompatibilidad y la degradación in vivo del P4HB y sus copolímeros no se ha reportado. Los copolímeros PHA de 4HB y 3HB que varían en composición de 0 a 100% 4HB, se han producido en *Alcaligenes eutrophus* (Nakamura, S., Doi, Y. and Scandola, M. *Macromol.* (1992) 25:4 37-4231) y a partir de 64 a 100% 4HB en *Comamonas acidovorans* (Saito, Y. and Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* (1994) 16:99-104), sin embargo, estos polímeros fueron de masa molecular modesta (1×10^5 a 5×10^5 g/mol, por GPC), en comparación a la masa molecular producida en *E. coli* recombinante (mayor de 5×10^5 g/mol, GPC).

20 Los polímeros PHA pueden ser divididos a grosso modo en tres grupos de acuerdo al largo de sus grupos dependientes y a sus respectivas rutas biosintéticas (Figura 1). Aquellos con rutas dependientes cortas; tales como el polidroxibutirato (PHB), un homopolímero de R-3 unidades de ácido hidroxibutírico (R-3HB), son materiales altamente cristalinos termoplásticos y se han conocido como los más largos (Lemoigne, M. and Roukhelman, N., *Annales des fermentations*, 5:527-536 (1925)). Un segundo grupo de PHA que contienen las unidades cortas R-3HB polimerizadas de manera aleatoria con grupos dependientes de unidades ácidas hidroxiladas más largas, fueron reportadas primeramente a principios de los setenta (Wallen, L.L. and Rohwedder, W.K., *Environ. Sci. Technol.*, 8:576-579 (1974)). También se conoce un número de microorganismos que producen específicamente copolímeros de R-3HB con estas unidades ácidas hidroxiladas de grupos dependientes más largos y pertenecen a este segundo grupo (Steinbüchel, A. and Wiese, S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37:691-697 (1992)). A principios de los ochenta, un grupo de investigación en Los Países Bajos identificó un tercer grupo de PHA que contenían ácidos hidroxilados de grupos dependientes predominantemente más largos (De Smet, M.J. et al., *J. Bacteriol.*, 154: 870-878 (1983)).

35 Los polímeros PHA pueden constituir hasta el 90% del peso de la célula sea de las bacterias y se encuentran como gránulos discretos dentro de las células bacterianas. Estos gránulos PHA se acumulan en respuesta a la limitación de nutrientes y sirven como materiales de reserva de carbono y de energía. Se utilizan rutas distintivas por los microorganismos para producir cada grupo de estos polímeros. Una de estas rutas que lleva al grupo de polihidroxialcanoatos de dependientes corta (SPGPHA) involucra a tres enzimas, a saber tiolasa, reductasa y sintasa PHB (denominada a veces polimerasa). Utilizando esta ruta, el homopolímero PHB es sintetizado por condensación de dos moléculas de la acetil-Coenzima A para arrojar acetoacetil-Coenzima A, seguida de la reducción de este intermedio a R-3-hidroxibutirilo-Coenzima A y la subsiguiente polimerización (Figura 2a). La última enzima en esta ruta, la sintasa, tiene una especificidad de sustrato que puede acomodar unidades monoméricas C3-C5 incluyendo unidades ácidas hidroxiladas R-4 e hidroxiladas R-5. La ruta biosintética se encuentra por ejemplo, en las bacterias *Zoogloea ramigera* y *Alcaligenes eutrophus*. La ruta biosintética que se utiliza para formar el tercer grupo de PHA, el grupo de polidroxialcanoatos de dependientes larga (LPGPHA) es todavía parcialmente desconocido, sin embargo, en la actualidad se piensa que las unidades de hidroxialcilo monomérico que llevan a la LPGPHA se derivan mediante la β -oxidación de ácidos grasos y la ruta del ácido graso (Figura 2b). Los sustratos de la hidroxialcilo-Coenzima R-3 resultantes de estas rutas son entonces polimerizados por las sintasas PHA (a veces denominadas polimerasas) que tienen especificidades de sustrato que favorecen las unidades monoméricas mayores en el rango del C6-C14. Los PHA de grupos dependientes largos se producen por ejemplo por *Pseudomonas*.

55 Presumiblemente, el segundo grupo de PHA que contienen tanto unidades cortas R-3HB y unidades de monómeros de grupos dependientes más largos, utilizan tanto las rutas mostradas en las Figuras 2a y 2b para aportar los monómeros ácidos hidroxilados. Los últimos son entonces polimerizados por sintasas PHA capaces de aceptar estas unidades.

60 En total, alrededor de 100 tipos diferentes de ácidos hidroxilados han sido incorporados a los PHA mediante métodos de fermentación (Steinbüchel, A. and Valentin, H.E., *FEMS Microbiol., Lett.*, 128:219-228 (1995)). Notablemente, estos incluyen PHA que contienen grupos dependientes funcionalizados tales como ésteres, enlaces dobles, y grupos alquoxi, aromáticos, halógenos e hidroxilados.

Un polihidroxialcanoato preferido para aplicaciones médicas es el P4HB. El P4HB es biocompatible, reabsorbible, procesable, fuerte y dúctil. El mantenimiento de la potencia de ruptura es otro parámetro muy importante respecto a los materiales de sutura y engrape, especialmente los reabsorbibles. Debido a que los materiales reabsorbibles son degradados in vivo, sus propiedades físicas y mecánicas cambian como resultado de esta degradación. Por ejemplo, una sutura reabsorbible perderá gran parte de su potencia de ruptura y como tal su capacidad para recomponer el tejido, más rápidamente que el tiempo necesario para su total reabsorción. Las suturas PGA por ejemplo, perderán la mayoría de su potencia dentro de tres semanas in vivo (Vet Surg 21; 192: 355-61), pero no se reabsorberán completamente antes de las seis semanas. Esta pérdida de potencia mecánica es el resultado de la disminución de la masa molecular del polímero. Es importante resaltar que un número de parámetros afectará las tasas de reabsorción y de potencial de ruptura de la sutura in vivo, tales como el tipo de tejido, los esteres mecánicos, la presencia de infección, etc.

Los ejemplos demuestran que la tasa de degradación del P4HB in vivo es rápida en relación a otros PHA, sin embargo su tasa de reabsorción es más lenta que la de muchos de los materiales utilizados como suturas reabsorbibles. Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 7, los implantes de P4HB mantienen su masa molecular durante el proceso de reabsorción. Este mantenimiento de la masa molecular se espera que sea un beneficio para el mantenimiento de las propiedades mecánicas y como tal de la potencia de ruptura de los PHA utilizados como materiales de cierre de heridas. Debido a sus excelentes propiedades mecánicas, el mantenimiento de una alta masa molecular, su procesabilidad, biocompatibilidad y capacidad de reabsorción, el P4HB y P4HB-co-HA debe ser útil como material reabsorbible para el cierre de heridas, tal como material para suturas y engrape, particularmente como aquí se modifica para incrementar sus tasas de degradación.

Fuentes de los PHA

Los materiales PHA que pueden ser modificados para alterar sus tasas de degradación pueden ser derivados ya sea de una fuente biológica, una fuente enzimática, o una fuente química. La fuente biológica puede ser un microorganismo o un organismo mayor como una planta, y puede ser derivado por ingeniería genética.

A mediados de los años ochenta, diversos grupos de investigación identificaban activamente y aislaban los genes y los productos de los genes responsables de la síntesis del PHA. Estos esfuerzos llevan al desarrollo de los sistemas transgénicos para la producción de PHA tanto en plantas como en microorganismos, así como métodos enzimáticos para la síntesis del PHA. Tales rutas pudieran incrementar aún más los tipos de PHA disponibles. Estos avances han sido revisados en Williams, S.F. and Peoples, O.P., CHEMTECH, 26, 38-44 (1996), and Williams S.F. and Peoples, O.P., Chem. Br. 33, 29-32 (1997).

Los métodos que pueden ser usados para la producción de polímeros PHA adecuados para modificaciones subsecuentes para alterar sus tasas de degradación son descritos en: Patente U.S. No. 4,910,145 a Holmes, P. A. y Lim. G. B.; Byrom, D., "Miscellaneous Biomaterials," in D. Byrom, Ed., "Biomaterials" MacMillan Publishers, London, 1991, pp. 333-359; Hocking, P.J. y Marchessault, R.H. "Biopolyesters", G.J.L. Griffin, Ed., "Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers," Chapman y Hall, London, 1994, pp.48-96; Holmes, P.A., "Biologically Produced (R)-3-hydroxyalkanoate Polímeros y Copolímeros," in D.C. Bassett Ed., "Developments in Crystalline Polymers," Elsevier, London, Vol. 2, 1988, pp. 1-65; Lafferty et al., "Microbial Production of Poly- β -hydroxybutyric acid," H.J. Rehm y G. Reed, Eds., "Biotechnology", Verlagsgesellschaft, Weinheim, Vol. 66, 1988, pp. 135-176; Müller y Seebach, Angew. Chem. Int. Ed Engl. 32:477-502 (1993); Steinbüchel, A. "Polyhydroxyalkanoic Acids," en D. Byrom Ed., "Biomaterials", MacMillan Publishers, London, 1991, pp. 123-213; y, Williams y Peoples, CHEMTECH, 26:38-44, (1996); Steinbüchel y Wiese, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:691-697 (1992); U.S. Patentes Nos. 5,245,023; 5,250,430; 5,480,794; 5,512,669; 5,534,432; Agostini, D.E. et al., Polym. Sci., Part A-1, 9:2775-2787 (1971); Gross, R.A. et al., Macromolecules, 21:2657-2668 (1988); Dubois, P.I. et al., Macromolecules, 26:4407-4412 (1993); Le Borgne, A. y Spassky, N., Polymer, 30:2312-2319 (1989); Tanahashi, N. y Doi, Y., Macromolecules, 24:5732-5733 (1991); Hori, Y.M. et al., Macromolecules, 26:4388-4390 (1993); Kemnitzner, J.E. et al., Macromolecules, 26:1221-1229 (1993); Hori, Y.M. et al., Macromolecules, 26:5533-5534 (1993); Hocking, P.J. y Marchessault, R.H., Polym. Bull., 30:163-170 (1993); Xie, W. et al., Macromolecules, 30: 6997-6998 (1997), y, U.S. Pat. No. 5,563,239 a Hubbs, J.C. y Harrison, M.N. Los PHAs derivados de estos métodos puede tener cualquier forma, incluyendo una forma látex o sólida.

La identificación, clonación y expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de los PHA a partir de diversos microorganismos dentro de los organismos recombinantes, permite la producción de PHA dentro de organismos que no son los productores nativos de los PHA. Tales organismos recombinantes le aportan a los investigadores un mayor grado de control del proceso de producción de los PHA debido a que están libres de las actividades en segundo plano de las enzimas para la biosíntesis de precursores no deseados de los PHA o de la degradación de los PHA. Adicionalmente,

la elección adecuada de un organismo recombinante puede facilitar la purificación de, o permitir la biocompatibilidad incrementada de, los PHA producidos.

5 Los requerimientos mínimos para la síntesis de los PHA en un organismo recombinante son una fuente de hidroxialcanoilo-CoA y una sintasa apropiada de los PHA (Gemgross, T.U. and Martin, D.P. Proc. Nat. Acad. Sci. (1995) 92: 6279-6283). Los productores recombinantes de PHA por tanto, requieren de una ruta biosintética para un monómero hidroxialcanoilo-CoA y una sintasa PHA adecuada. La producción de un homopolímero requiere que un organismo produzca solo un sustrato apropiado para la sintasa PHA, ya que la producción de sustratos múltiples resulta en la formación de un copolímero PHA. Los organismos recombinantes que contienen un transgen que codifica una
10 sintasa de PHA son suficientes para la producción de P4HB.

15 En ausencia de rutas de degradación del PHA, la masa molecular del PHA acumulado en los organismos recombinantes puede ser muy alta. El PHB producido en *E. coli* recombinante se ha reportado con una masa molecular de 4×10^6 g/mol (Sim, S.J. Snell, K.D. Hogan, S.A. Stubbe, J., Rha, C. and Sinskey. *A Nature Biotech.* (1997) 15:63-67). La masa molecular es importante para el control de las propiedades físicas de un PHA dado, debido a que la masa molecular incrementada de los PHA producida en organismos recombinantes puede llevar a propiedades materiales incrementadas, tales como una potencia tensora incrementada y finalmente elongación (Kusaka, S., Iwata, T. and Doi, Y. *J.M.S. Pure Appl. Chem.* (1998) A35:319-335).

20 La biosíntesis del P3HB-co-4HB que contiene un nivel bajo de 4HB (1,5%) ha sido descrita en *E. coli* recombinante (Valentin, H. E., Dennis, D. J. *Biotech* 1997, 58; 33-38). Es de destacar que la masa molecular de estos PHA era muy alta (superior a 1×10^6 g/mol). Adicionalmente, la biosíntesis del P3HB-co-4HB y el homopolímero P4HB en *E. coli* recombinante han sido descritos (Hein, et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 153; 411-418).

25 En adición para el uso de rutas biológicas para síntesis PHA, polímeros PHA pueden también ser derivados por síntesis química. Un método ampliamente utilizado consiste en la polimerización del anillo de apertura de monómeros β lactona usando varios catalizadores o iniciadores tales como aluminóxanos, distannóxanos, o compuestos de zinc alcoxi y aluminio alcoxi (ver Agostini, D.E. et al., *Polym. Sci., Part A-1*, 9:2775-2787 (1971); Gross, R.A. et al., *Macromolecules*, 21:2657-2668 (1988); Dubois, P.I. et al, *Macromolecules*, 26:4407-4412 (1993); Le Borgne, A. and Spassky, N., *Polymer*, 30:2312-2319 (1989) ; Tanahashi, N. and Doi, Y., *Macromolecules*, 24:5732-5733 (1991); Hori, Y.M. et al., *Macromolecules*, 26:4388-4390 (1993); Kemnitzer, J.E. et al., *Macromolecules*, 26:1221-1229 (1993); Hori, Y.M. et al., *Macromolecules*, 26:5533-5534 (1993); Hocking, P.J. and Marchessault, R.H., *Polym. Bull.*, 30:163-170 (1993). Un segundo enfoque consiste en condensación polimerización de ésteres y es descrito en la Patente U.S. No. 5,563,239 a Hubbs, J.C. y Harrison, M.N., y sus referencias. Las investigaciones también han desarrollado métodos químio-enzemáticas para preparar los PHAs. Xie et al., *Macromolecules*, 30:6997-6998 (1997), por ejemplo han reportado una polimerización de anillo de apertura de beta-butirolactona por las lipasas termofilicas para producir PHB.
35

40 La producción biológica de P4HB o P4HB-co-HA tiene ciertas ventajas con respecto a métodos químicos sintéticos tradicionales. La síntesis química de PHB de una alta masa molecular (mayor de 1×10^5 g/mol) es difícil debido a la tendencia del ácido libre a lactonizarse para formar el anillo de cinco miembros relativamente no forzado y cinéticamente favorecido. Por tanto la policondensación de ácido 4-hidroxibutírico es difícil de lograr, mientras que el material resultante de las reacciones de polimerización de apertura en anillo a alta presión del γ -butirolactona es de muy baja masa molecular
45 (Korte, F. and Gelt, W. *Polymer Left.* 1966, 4, 685) y tendría propiedades mecánicas pobres. Una estrategia sintética alternativa para el P4HB, la polimerización de apertura en anillo del radical libre del dioxolane 2-metileno, resulta en un copolímero que contiene unidades de anillo abierto y no abierto (Bailey, et al. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* (1982) 20: 3021-30. Bailey, W. J. *Polym. Preprints* (1984) 25:210-11.). El 4HB ha sido co-polimerizado con éxito con 3HB vía polimerización de apertura en anillo (Hori, Y., Yamaguchi, A. and Hagiwara, T. *Polymer* 1996, 36, 4703-4705.), sin embargo, el peso molecular de los copolímeros fue modesto (menos de 1×10^5 g/mol), especialmente para compuestos con más de 80% de 4HB (menos de 2×10^4 g/mol). Adicionalmente, muchos de los catalizadores utilizados para la síntesis química de poliésteres, contienen metales tóxicos. Estos contaminantes tóxicos pueden evitarse utilizando un proceso biológico para producir los PHA.
50

55 II. Formulaciones de PHA con tasas de degradación alteradas

Las tasas de degradación de los polímeros pueden ser manipuladas mediante adición de varios componentes al compuesto polimérico, así como la selección de la composición química, peso molecular, condiciones de procesamiento y forma del producto polimérico final. La composición química puede ser alterada a través de una selección de monómeros que están incorporados en el polímero, por la alteración de los vínculos, esqueleto químico o grupos pendientes, y/o mediante la manipulación del peso molecular. Una porosidad incrementada, la inclusión de sustancias hidrofílicas,
60

y/o el incremento del área superficial expuesta al agua, incrementarán la tasa de degradación. Los recubrimientos hidrófobos o la incorporación a o la mezcla de sustancias hidrófobas con los polímeros, disminuirá la tasa de degradación.

Aditivos que alteran las tasas de degradación.

- 5 La hidrólisis de polihidroxialcanoatos se acelera a pHs ácidos o básicos y por tanto, la inclusión de aditivos ácidos o básicos o excipientes, puede utilizarse para modular la tasa de degradación de los PHA. Los excipientes puede añadirse como partículas, pueden mezclarse con cualquier otro aditivo o agente incorporado o a ser incorporado, o puede disolverse dentro del polímero.

- 10 Los aditivos que enriquecen la tasa de degradación pueden incluir ácidos inorgánicos tales como el sulfato de amonio y el cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como el ácido cítrico, los ácidos benzoicos, los péptidos, ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como un carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de zinc e hidróxido de zinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermita, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y surfactantes como Tween™ and Pluronic™. Tales aditivos se utilizan preferiblemente en concentraciones entre 0,1 y 30% por peso.

- 20 La tasa de degradación también puede mejorarse mediante aditivos que forman poros o de lo contrario incrementando el área superficial en el polímero o aumentando el contenido amorfo del polímero. Los agentes formadores de poros se añaden generalmente como partículas e incluyen compuestos solubles en agua tales como sales inorgánicas y azúcares que se retiran mediante lixiviación. Las partículas apropiadas incluyen cristales de sales, proteínas tales como una gelatina y azarosa, almidones, polisacáridos tales como el alginato y otros polímeros. Los diámetros de las partículas pueden estar entre nanómetros a 500 micrones. También pueden ser liofilizables. Los agentes formadores de poros pueden incluirse en una cantidad entre 0,01% y 90% del peso a volumen, preferiblemente a un nivel entre uno al 30% (w/w, polímero), para incrementar la formación de poros. Por ejemplo, en la evaporación de solvente o el secado mediante rociado, un agente formador de poros tal como una sal volátil, por ejemplo, el bicarbonato de amonio, acetato de amonio, el cloruro de amonio o el benzoato de amonio u otra sal liofilizable, se disuelve primero en agua. La solución que contiene el agente formador de poros entonces se emulsifica con la solución del polímero para crear gotas del agente formador de poros en el polímero. Esta emulsión se seca entonces mediante rociado o se lleva a través de un proceso de extracción/evaporación de solvente. Después el polímero se precipita, se congelan las micropartículas endurecidas y se liofilizan para retirar los agentes formadores de poros. Los plasticantes, tales como los ésteres de citrato y otros polímeros como los polihidroxialcanoatos atáticos pueden añadirse para aumentar el carácter amorfo del polímero.

- 35 Los recubrimientos o materiales hidrófobos que pueden incorporarse para aumentar las tasas de degradación incluyen compuestos hidrófobos tales como fosfolípidos, colesterol y otros polímeros, así como surfactantes. Estos materiales y métodos para la formación de recubrimientos o la incorporación a los materiales se describen en la WO 96/18420 por Bracco Research SA, WO 92/18164 por Delta Biotechnology, Ltd., WO 95/03356 por el Massachusetts Institute of Technology, PCT/US97/03007 por Acusphere, Patente EE.UU. No. 5,271,961 a Mathiowitz, et al., Patente EE.UU. No. 5,711,933 a Bichon, et al., y Patente EE.UU. No. 5,705,187 a Unger. Ejemplos específicos presentan a los ácidos grasos y a los fosfolípidos como emulsificantes para estabilizar la fase grasa en la fase acuosa durante el proceso de emulsión/encapsulado, con el resultado de que las microesferas se recubren con una capa exterior del surfactante. El uso de aditivos tales como grasas, ceras e hidrocarburo de alto peso molecular son expuestas también para hidrofobizar las paredes del polímero y para ralentizar la penetración del agua.

Modificación de grupos PHA pendientes

- 50 Un método alternativo para alterar la tasa de degradación de polímeros PHA implica la modificación de los grupos polihidroxialcanoato pendientes. Los grupos pendientes pueden ser modificados en su totalidad o en parte. Los grupos pendientes pueden, por ejemplo, ser convertidos a ácidos o grupos básicos, tales como ácidos carbolíxicos y aminas. Estos tipos de grupos pueden mejorar la degradación mediante la alteración de valores pH locales. Alternativamente, los grupos pendientes pueden ser convertidos a grupos reactivos, tales como el alcohol y aminas, que pueden hender el esqueleto polímero ya sea por una reacción intramolecular o intermolecular. En adición a estas conversiones, los grupos pendientes pueden también ser convertidos a grupos hidrofílicos para aumentar el consumo de agentes hidrolíticos como el agua, o pueden ser convertidos a grupos que incrementaran la naturaleza amorfa de los polímeros. Los procedimientos requeridos para llevar a cabo la conversión de un grupo funcional de los grupos pendientes son bien conocidos por aquellos expertos en la materia. Un método adecuado que puede ser utilizado para la preparación de un PHA de la invención (incorporando una unidad que altera la tasa de degradación del polímero) se enseña en WO 98/39453 por Hein, Sohling, Gottschalk, y Steinbuchel. Adecuados grupos pendientes en

polímeros PHA que alteraran la tasa de degradación pueden también ser derivados directamente mediante fermentación.

Modificación química de los PHA

- 5 La tasa de hidrólisis de un polihidroxicanoato depende sobre un número de factores. Un factor clave es la naturaleza química o la reactividad de los vínculos de éster entre monómeros. La tasa de degradación del esqueleto PHA puede así ser alterado incorporando en el esqueleto del polímero vínculos químicos que son más susceptibles para la hidrólisis, o el ataque enzimático. Ejemplos de monómeros que pueden ser incorporados en esqueletos polihidroxicanoato para alterar la tasa de degradación del polímero son 2-ácidos hidroxí, tales como el ácido glicólico y el ácido láctico, y otros
- 10 hidroxiacidos que modulan la reactividad del vínculo de éster, tales como el ácido acético 2-hidroxi. Además de incorporar otros hidroxiacidos que producen ésteres que son más susceptibles al ataque hidrolítico o enzimático, otros tipos de funcionalidades pueden ser incorporados en el esqueleto del polímero. Por ejemplo, uno o más de los vínculos de éster pueden ser reemplazados por grupos tales como el amida, anhídrido, carbonato, o carbamato. Ejemplos de
- 15 monómeros que pueden ser incorporados en el esqueleto de polihidroxicanoato son aminoácidos y aminoalcoholes. Además, monómeros multifuncionales pueden ser incorporados en los esqueletos polihidroxicanoato, por ejemplo, trioles o tetraoles. Estos tipos de unidades de monómeros pueden también ser usados para aumentar o mantener peso molecular del polímero por reticulación intercatenaria, o cristalinidad modificada de los polímeros.
- 20 Una variedad de métodos pueden ser usados para incorporar vínculos químicos susceptibles en los esqueletos polihidroxicanoato. Por ejemplo, co-canales pueden ser añadidos durante la fermentación de los PHA que resulta en la incorporación de monómeros deseados. Co-canales adecuados incluyen ácidos hidroxialcoxi acéticos. Estos tipos de monómeros pueden también ser incorporados durante la síntesis química de monómeros hidroxiacidos usando catalizadores, y vía derivativas coenzimas A usando catalizadores enzimáticos tales como el PHA sintasas.
- 25

- Vínculos químicos susceptibles pueden también ser incorporados en esqueletos polihidroxicanoato después de su síntesis inicial. Los métodos para lograr esto incluye transformaciones químicas tales como reacciones de inserción, irradiación, esterificación, transesterificación (ver por ejemplo, Otera, J. et al., *Tetrahedron Lett.*, 27:2383-2386 (1986), Otera J. et al., *J. Org. Chem.*, 56: 5307-5311 (1991),
- 30 Otera, J. et al., *J. Org. Chem.*, 54:4013-4014 (1989) y Otera, J. et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1742-1743 (1991)), reacciones metafeis de éster (ver por ejemplo, Stanton, M.G. y Gagné, M. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 119:5075-5076 (1997) y sus referencias), y la mezcla reactiva. En este último caso, las reacciones químicas puede llevarse a cabo en la dilución con un catalizador presente. Por ejemplo, los ésteres o poliésteres puede ser diluido con polihidroxicanoatos en presencia de catalizadores adecuados con el fin de modificar químicamente el polihidroxicanoato.
- 35

Tratamiento de los PHA incluyendo vínculos susceptibles

- Los polihidroxicanoatos pueden ser además manipulados usando un amplio rango de técnicas de tratamiento de polímeros. Métodos preferidos para el tratamiento de estos materiales incluyen: fundición de solvente, tratamiento de dilución, procesamiento/hilatura/tejido de la fibra, extrusión,
- 40 inyección y moldeo de compresión, y laminación.

III. Métodos para la producción de dispositivos médicos

- Las composiciones de polímero son útiles para la preparación de una variedad de dispositivos médicos biodegradables. Los polímeros biodegradables preferentemente muestran una biodegradación relativamente lenta, por ejemplo, teniendo una vida media *in vivo* de entre tres y seis meses o menos. Los polímeros preferiblemente tienen una temperatura de transición punto/vidrio de fusión relativamente bajo, por ejemplo, menos de 136°C, y/o son solubles en un solvente no tóxico y no halogenado, para un tratamiento fácil.
- 45

- Cuando se implantan los PHAs depirogenados en el cuerpo, estos materiales muestran muy poca reacción inflamatoria aguda o reacción adversa en los tejidos. No hay respuesta inflamatoria significativa o formación de tejido en forma de escaras. El reclutamiento de células inflamatorias es mínimo. El examen histológico de los dispositivos extraídos demuestra que los materiales son esencialmente inertes. En correspondencia, los dispositivos fabricados a partir de los PHA pueden implantarse con efectos adversos mínimos al tejido circundante. La liberación de los productos de la degradación del ácido hidroxí a partir de los materiales implantados es típicamente lenta y bien tolerada por el cuerpo. Por tanto se espera que los PHA mantengan sus propiedades materiales durante meses y eventualmente se degradarán a materiales no tóxicos.
- 50
- 55

Los dispositivos preparados a partir de los PHA pueden utilizarse en un amplio rango de diversas aplicaciones médicas. Los ejemplos de tales aplicaciones incluyen la liberación controlada, la aportación de medicamentos, las escayolas de ingeniería de tejidos, el encapsulado celular;

recubrimientos biocompatibles, distribución dirigida; implantes biocompatibles; regeneración dirigida de tejidos, vendajes, dispositivos ortopédicos, prostéticos y cementos óseos (incluyendo adhesivos y/o rellenos estructurales) y diagnósticos.

- 5 Los PHA pueden encapsularse, mezclarse con, o aparearse iónica o covalentemente a cualquier variedad de agentes terapéuticos, profilácticos o diagnósticos. Puede encapsularse o incorporarse una amplia variedad de materiales biológicamente activos, ya sea para su distribución a un sitio por parte del polihidroxialcanoato, o para impartirle propiedades al polímero, tales como la bioadhesión, la adhesión celular, mejoramiento del crecimiento celular, inhibición de crecimiento bacteriano y prevención de formación de coágulos.
- 10 Los ejemplos de agentes terapéuticos y profilácticos apropiados incluyen compuestos sintéticos inorgánicos y orgánicos, proteínas y péptidos, polisacáridos y otros azúcares, lípidos y secuencias de ácido nucleico del ADN y ARN que tengan actividad terapéutica, profiláctica o diagnóstica. Las secuencias de ácidos nucleicos incluyen genes, moléculas antisense que se vinculan al ADN complementario para inhibir la transcripción y ribozimas. Compuestos con una amplia gama de pesos moleculares pueden ser encapsulados, por ejemplo, entre 100 y 500 000 gramos o más por mol. Los ejemplos de materiales apropiados incluyen proteínas, tales como anticuerpos, ligaduras receptoras y enzimas, péptidos tales como péptidos de adhesión, sacáridos y polisacáridos, medicamentos sintéticos inorgánicos y orgánicos y ácidos nucleicos. Los ejemplos de materiales que pueden ser encapsulados incluyen enzimas, factores de coagulación sanguínea, inhibidores o agentes disolventes de coágulos, tales como la estreptoquinasa y activadores plasminógenos del tejido, antígenos para la inmunización; hormonas y factores de crecimiento; polisacáridos tales como la heparina; oligonucleótidos tales como oligonucleótidos antisense y ribozimas y vectores retrovirales para uso en terapia de genes. El polímero también puede utilizarse para encapsular células y tejidos. Los agentes de diagnóstico representativos son agentes detectables mediante fluorescencia de rayos X, imágenes de resonancia magnética, radioactividad, ultrasonido, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones. Los agentes de diagnóstico ultrasónico son típicamente un gas tal como el aire, oxígeno o perfluorocarbonos.

- 30 En el caso de liberación controlada, puede incorporarse una amplia gama de diferentes compuestos bioactivos a un dispositivo de liberación controlada. El compuesto bioactivo puede incorporarse a los PHA en un porcentaje de carga de entre 0,1% y 70% por peso, preferiblemente entre 5% y 50% por peso. Los PHA pueden estar en casi cualquier forma física, tal como polvo, película, artículo moldeado, partículas, esferas, látex y materiales cristalinos o amorfos. Pueden combinarse con materiales adicionales no PHA, por ejemplo, otros polímeros. Es apropiado para uso en aplicaciones que requieran materiales moldeables, biocompatibles y de degradación lenta, por ejemplo, dispositivos médicos. Los ejemplos de dispositivos médicos que pueden prepararse a partir de los polímeros incluyen varillas, tornillos óseos, presillas, suturas quirúrgicas, fijadores, dispositivos de ingeniería de tejidos, dispositivos de distribución de medicamentos, apósitos para heridas, y parches tales como parches para hernias y parches para el pericardio. La presente invención proporciona stents.

- 40 Los implantes degradables fabricados con el PHA pueden utilizarse en una amplia gama de aplicaciones ortopédicas y vasculares, en ingeniería de tejidos, regeneración dirigida de tejidos y aplicaciones en las que actualmente se utilizan otros elastómeros termoplásticos (McMillin, Rubber Chem. Technol., 67:417-46 (1994)). Los implantes pueden incluir otros factores para estimular la reparación y la sanación. Los dispositivos preferidos son tubos apropiados para el paso de fluidos corporales. Estos dispositivos pueden ser modificados con factores de vinculación celular, factores de crecimiento, péptidos y anticuerpos y sus fragmentos.

- 50 Los métodos preferidos para la fabricación de dispositivos médicos incluyen dispersión de solventes, procesamiento mediante derretido, extrusión, inyección, moldeo por compresión y secado por aspersión. Las partículas se preparan preferiblemente directamente a partir de un proceso basado en la fermentación, o mediante una técnica de evaporación de solvente, técnica de emulsión doble o mediante microfluidización, utilizando métodos disponibles en la técnica. Koosha, F. Ph.D. Dissertation, 1989, Univ. Nottingham, UK., Diss. Abstr. Int. B 51:1206 (1990); Bruhn, B.W. and Müller, B.W. Proceed Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 18:668-69 (1991); Conti, B. et al., J. Microencapsulation, 9:153-166 (1992); Ogawa, Y. et al., Chem. Pharm. Bull., 36:1095-103 (1988); Mathiowitz, E. and Langer, R. "Polyanhydride microspheres as drug delivery systems," M. Donbrow Ed., en "Microcapsules Nanopart. Med Pharm." CRC, Boca Raton, Florida, 1992, Ch. 5, pp. 99-123.)

- 60 Como se describe en este documento, los PHA pueden fabricarse en forma de dispositivos apropiados para la sanación de heridas. Por ejemplo, los materiales de fibras no tejidas con este objetivo, pueden prepararse a partir de los polímeros produciendo primero las fibras de polímeros, presionando los polímeros a través de una salida perforada, utilizando procedimientos conocidos a aquellos expertos en la técnica. Las fibras pueden fabricarse entonces en forma de una membrana porosa (tela) dispersándolas sobre un sostén sólido y sujetándolas a moldeo por compresión. El espesor del dispositivo es preferiblemente menor a 500 µm. El dispositivo de sanación de heridas también puede

prepararse perforando una película o membrana utilizando un láser para lograr la porosidad, o utilizando una técnica de lixiviación para preparar un material poroso. El tamaño de los poros debe idealmente ser lo suficientemente pequeño para aislar células y otros tejidos. Los dispositivos de sanación de heridas pueden colocarse in vivo para separar los tejidos y estimular su regeneración.

5 Como se describe en este documento, los PHA pueden utilizarse para encapsular células. Utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, las células pueden primeramente ser pre-revestidas. Maysinger, *Reviews in the Neurosciences*, 6:15-33 (1995). Utilizando un procedimiento de encapsulado de partículas tales como la técnica de doble emulsión, las células pueden entonces ser encapsuladas por parte del PHA: Ogawa, et.al. *Chem Pharm. Bull*, 36:1095103 (1998). Las células
10 encapsuladas pueden entonces implantarse in vivo.

Como se describe en este documento, los PHA pueden fabricarse en escayolas de ingeniería de tejidos utilizando una amplia gama de técnicas de procesamiento de polímeros. Los métodos preferidos de fabricación de escayolas de ingeniería de tejidos de PHA incluyen dispersión de solventes, procesamiento mediante derretido, procesamiento/tejido/hilado de fibras, extrusión,
15 inyección y moldeo por compresión, laminación y dispersión de solvente/lixiviación de solvente. Tales métodos son conocidos por parte de los expertos en la técnica.

Como se describe en este documento, un método preferente de fabricación de escayolas de ingeniería de tejidos mediante los PHA involucra el uso de un extrusor, tal como un extrusor Brabender. Por ejemplo, esta técnica puede utilizarse para preparar tubos por extrusión apropiados para la
20 implantación en un rango de longitudes y tamaños.

Otro método preferente, como se describe en este documento, involucra la preparación de una escayola de PHA no tejida a partir de fibras. Las fibras pueden ser producidas a partir del derretido o solución y procesadas en forma de no tejido utilizando métodos conocidos por parte de aquellos
25 expertos en la técnica. Las propiedades del no tejido pueden ser personalizadas variando por ejemplo el material del PHA, las dimensiones de la fibra, la densidad de la fibra, el espesor del material, la orientación de la fibra y el método de procesamiento de la fibra. Las membranas porosas pueden, si se desea, ser procesadas posteriormente. Por ejemplo, estas membranas pueden conformarse en forma de tubos huecos.

Como se describe en este documento, otro método preferente involucra el derretido del PHA o su procesamiento mediante solvente en un molde apropiado y la perforación del material utilizando un láser u otro medio para alcanzar la porosidad deseada. También se prefieren métodos que incluyen el enrollado de una lámina de PHA moldeado por compresión en forma de un lazo sellándolo al calor. La lámina de PHA puede ser enrollada opcionalmente con otro material, tal como un segundo polímero biodegradable. Por ejemplo, el último material pudiera ser un no tejido de ácido poliglicólico, ácido poliláctico o un copolímero de ácidos glicólico y láctico. Tal procedimiento debe aportar un tubo laminado apropiado para su uso en la ingeniería de nuevos vasos, conductos y tubos. El PHA puede también utilizarse para cubrir otras escayolas de ingeniería de tejidos. Tales materiales pudieran derivarse a partir de otros polímeros degradables. El recubrimiento puede realizarse por ejemplo, con una solución basada en solvente, o mediante técnicas de derretido o utilizando un látex PHA.

40 Los dispositivos de ingeniería de tejidos aquí descritos pueden ser plantados mediante células antes de la implantación o después de la implantación. Las células pueden ser cultivadas a partir de una sección sana del tejido del donante, expandidas in Vitro utilizando técnicas de cultivo celular y entonces plantadas en una escayola (o matriz) antes o después de la implantación. Alternativamente, las células pueden obtenerse de tejido de otros donantes o de líneas existentes de células.

45 Los PHA pueden utilizarse para recubrir otros dispositivos y materiales. Tales recubrimientos pueden mejorar sus propiedades con fines médicos, por ejemplo, mejorando su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y adaptando su nivel de degradación y de liberación controlada. Los PHA pueden ser recubiertos dentro de otros dispositivos utilizando procedimientos de fabricación tales como los antes descritos. El espesor del recubrimiento puede ajustarse a las necesidades de la aplicación en específico cambiando el peso del recubrimiento o la concentración aplicada y/o debido a un exceso de recubrimiento.
50

Los PHA pueden fabricarse incorporados a fijadores, utilizando una amplia gama de técnicas de procesamiento de polímeros. Los métodos preferentes de fabricación de estos fijadores incluyen la dispersión de solventes, procesamiento de derretidos, procesado/hilado de fibras, extrusión, moldeo por inyección y por compresión. Tales métodos son conocidos por aquellos expertos en la técnica.
55

Antes de la implantación, puede esterilizarse un artículo polimérico reabsorbible para evitar enfermedad e infección al receptor. La esterilización se lleva a cabo antes de plantar el dispositivo polimérico en las células. La esterilización del PHA mediante calor donde existan otros artículos no es práctica ya que el tratamiento mediante calor puede deformar el artículo, especialmente si el PHA tiene una temperatura de fusión por debajo de la requerida para el tratamiento de esterilización. Este
60

problema se resuelve utilizando gas de óxido de etileno frío como agente esterilizador. La exposición de un artículo que contenga un PHA a vapores de óxido de etileno antes de la implantación esteriliza el artículo haciéndolo apropiado para el implante. Durante la esterilización con este gas en frío el artículo que contiene el PHA mantiene su forma. Este tipo de tratamiento es ideal para la esterilización de artículos moldeados o pre-conformados donde la forma del artículo juega un papel importante en su funcionamiento adecuado.

Los dispositivos aquí descritos pueden administrarse sistémicamente o localmente o incluso usado in vitro, particularmente para el cultivo de célula. Los métodos preferentes de administración sistémica son la inyección y la implantación, administración oral y implantación. Otros métodos adecuados para la administración de dispositivos incluyen la administración de dispositivos tópicamente, como una loción, pomada, parche, o vendaje.

Los compuestos y métodos descritos aquí serán entendidos con mayor claridad mediante los ejemplos siguientes, que no son limitantes.

Ejemplo 1: Producción de P4HB en *Escherichia coli* recombinante

Filtrado de *E. coli* MBX1177, un derivado del filtrado DH5 α elegido por su capacidad para crecer con un ácido 4-hidroxibutírico (4HB) como única fuente de carbono, se transformó con pFS30, un plásmido conteniendo de los genes codificadores de la sintasa de PHA a partir de *Ralstonia eutropha*, transferasa CoA-4-hidroxibutirilo a partir de *Clostridium kluweri* y β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina. La sintasa y transferasa están bajo el control del promotor *trc*, que es inducible mediante isopropilo- β -D-thiogalactopyranosida (IPTG) en pFS30. Estas células crecieron primeramente en 100 ml LB (Luria Broth, Disco, Detroit, Mich; 25 g/L). más 100 μ g/ml de ampicilina durante la noche en una probeta Erlenmeyer de 250 ml a 37° C removiendo a 200 rpm. Este cultivo fue utilizado en su totalidad como un inoculum para la fermentación producida en un recipiente de 7L. La primera etapa de la fermentación consistió en el crecimiento de una biomasa en 5L de LB-ampicilina a 37°C removiendo a 800 rpm y aereación a un volumen volumétrico de aire/min (vvm). Después de 17 horas, el volumen se ajustó a 6L añadiendo un litro de medio, de manera tal que el volumen total contuviera por litro: 2,5 g de polvo LG, 5 g. de 4HB como sal de sodio, 2 g. de glucosa, 50 mmol de fosfato de potasio (pH7), 7 g. de ácido fosfórico, 100 μ g de ampicilina y 0,1 mmol de IPTG. En este momento, la temperatura se ajustó a 33°C y la tasa de remoción se redujo a 400 rpm. Las adiciones periódicas de glucosa y 4HB de sodio se realizaron cuando el pH estuvo significativamente por debajo o sobre 7, respectivamente, debido a que la adición de glucosa causa una lenta disminución del pH y la adición del 4HB provoca un lento ascenso del pH. El pH no se controló automáticamente. La fermentación continuo en esta forma durante otras 70 horas, en cuyo momento se había alimentado un total de 34 g/L de glucosas y 15 g/L de 4HB. Las células se asentaron a 4°C durante 2 días, luego de cuyo tiempo la fase líquida se extrajo por bombeo y la pasta de células se fluidizó en un Microfluidizador M110-EH (Microfluidics Corporation, Newton, Mass) at 18 000 psi. El material resultante se liofilizó y extrajo con tetrahidrofuran (THF, 3% wt/vol P4HB) con calentamiento (60°C) y remoción mecánica. El extracto resultante de THF se filtró a presión a través de filtros de profundidad de micro-fibra de vidrio (2,3 μ m) y Teflón (2 μ m). El polímero se precipitó en un volumen equivalente de agua y se liofilizó. El polímero se re-disolvió en THF (3% wt/vol P4HB) con calentamiento (60°C) y la solución se filtró a través de filtros de profundidad de micro-fibra (2,3 μ m) y Teflón (2 μ m) y se precipitó en agua/THF (1:1). El precipitado se lavó con agua/THF (1.1) y se liofilizó para arrojar una espuma de color blanco (20 g). Este material se identificó como poli-4-hidroxibutirato y se mostró como no-citotóxico mediante ensayo de difusión agar (ISO 10 993 Toxicon Corp., Bedford, MA). Análisis elemental (C 55,63%, H 7,41%, O 37,28%, N 41 ppm). El análisis GC muestra muy bajo nivel de lípidos en el polímero purificado. El análisis NMR muestra los picos esperados y ausencia de lípidos.

Ejemplo 2: Producción de poli (4HB-co-2HB) en *Escherichia coli* recombinante. (Ejemplo de referencia)

Los filtrados de *E. coli* MBX1177/pFS30 y MBX184 (CGSC6966)/pFS30 se precultivaron en 300 ml de ampicilina-LB en una probeta Erlenmeyer de un litro a 30°C durante la noche removiendo a 200 rpm. Dos alícuotas de 100 ml de cada precultivo se centrifugaron (2 000 x g., 10 minutos) y las células obtenidas de cada alícuota se re-suspendieron en 100 ml de un medio que contenía, por litro: 6,25 g. de polvo LB, 2 g. glucosa, 50 mmol de fosfato de potasio (ph 7), 100 μ g ampicilina y 100 μ mol IPTG. El medio también contenía 2-ácido hidroxibutírico (2HB) y 4HB; en un frasco las concentraciones fueron de 8 g/L 2HB y 2 g/L 4HB y en el otro las concentraciones de los dos ácidos eran de 5 g/L cada una. Ambos ácidos se añadieron a las probetas como sales de sodio; las masas dadas para los ácidos no incluían la masa de sodio. Estas cuatro probetas (dos probetas para cada filtrado) se incubaron a 30°C durante otras 48 horas con remoción a 200 rpm. Las células se retiraron del medio mediante centrifugación (2 000 x g., 10 minutos), se lavaron una vez en agua, se centrifugaron nuevamente y liofilizaron. El análisis mediante cromatografía gaseosa se llevó a cabo en la masa de células liofilizada para analizar el contenido y composición del polímero, ver Tabla 2. Los contenidos celular y composición de los PHA producidos se muestran en la Tabla 2. Cuando la tasa de 2HB a 4HB era de

4:1, el contenido de 2HB del polímero era superior al 19% para ambos filtrados, mediante el análisis GC, mientras que a una tasa de 1:1 de 2HB a 4HB, el contenido de 2HB del polímero era de aproximadamente 1%. El 4HB se incorporaba con mayor rapidez al polímero que el 2HB; por tanto, cuando el 4HB estaba presente en 5 g/L, el contenido total del polímero de las células era menor que cuando estaba presente en 2 g/L. Los polímeros producidos por el MBX184/pFS30 se extrajeron de las células y se analizaron. La masa de células liofilizada se incubó en 5 ml de cloroformo a 37°C durante 2 horas. El desecho de las células se retiró mediante centrifugación (2 000 x g., 5 minutos) y la solución resultante del polímero se añadió por goteo a 50 ml de etanol para precipitarla. El polímero precipitado se centrifugó del etanol al igual que arriba. En el caso de la tasa 4:1 2HB:4HB el polímero fue difícil de centrifugar del etanol; formaba una bruma cuando se añadía al etanol pero no todo se podía recolectar mediante centrifugación, probablemente debido a que el peso molecular de este polímero era algo bajo. El polímero aislado de la probeta con 1:1 2HB:4HB se precipitó fácilmente del etanol, y fue recuperado casi totalmente. El análisis GC de estas muestras extraídas (Tabla 2), muestra que el contenido de 2HB era ligeramente menor que cuando el análisis se hacía en células completas. Es posible que los residuos de 2HB en la cadena de polímeros se hidrolice durante la extracción, disminuyendo por tanto el contenido aparente en las muestras extraídas. El hecho de que el peso molecular del polímero extraído sea aparentemente menor que cuando el contenido de 2HB era superior, es consistente con esta explicación.

Se llevó a cabo un segundo experimento con MBX184/pFS30. Estas células se pre-cultivaron en 400 ml de ampicilina LB en una probeta Erlenmeyer de un litro a 30°C durante la noche con remoción a 200 rpm. Se añadieron 20 ml de medio a cada frasco de manera que el volumen total contuviera, por litro: 2,5 g. adicionales de polvo LG, 2 g. de 4HB como sal de sodio, 2 g. de glucosa, 50 mmol de fosfato de potasio (ph 7), 100 µg de ampicilina, 50 µmol de IPTG y 2, 4, 6 u 8 g. de 2HB como sal de sodio. Los frascos se incubaron durante otras 48 horas a 30°C y a 200 rpm. Las células se retiraron del medio mediante centrifugación (2 000 x g., 10 minutos) se lavaron una vez con agua, se centrifugaron nuevamente y se liofilizaron. La masa seca de células se sometió a análisis GC como arriba. La Tabla 3 muestra el contenido celular y composición de los polímeros así obtenidos. A tasas bajas de 2HB:4HB, se incorporó poco o ningún 2HB al polímero, sin embargo cuando esta tasa era de 3:1 o 4:1, la incorporación de 2HB al polímero fue significativa. El contenido total de polímero de todas las células fue relativamente bajo, probablemente debido a que los ácidos no están presentes en concentraciones lo suficientemente altas para permitir la asimilación y/o incorporación para continuar a una tasa alta.

Ejemplo 3: Producción de poli-(4HB-co-3HB) en E. coli recombinante. (Ejemplo de referencia)

El filtrado MBX1177/pFS30 se pre-cultivó en 100 ml de ampicilina LB en cuatro probetas Erlenmeyer de 250 ml por separado a 30°C durante la noche con remoción a 200 rpm. Se realizó una adición de 200 ml de medio en cada probeta de manera que el volumen total contenido, por litro fuera: 2,5 g adicionales de polvo LG, 4 g. de 4HB como sal de sodio, 4 g. de glucosa, 50 mmol de fosfato de potasio (pH 7), 100 µg de ampicilina, 50 µmol IPTG; y 0,25, 0,75 o 1 g. de 3-butirato (3HB) como sal de sodio. Las probetas se incubaron durante otras 48 horas a 30°C y 200 rpm. Las células se retiraron del medio por centrifugación (2000 x g., 10 minutos), se lavaron una vez con agua, se centrifugaron nuevamente y se liofilizaron. Se llevó a cabo el análisis por cromatografía gaseosa en la masa liofilizada de células para analizar el contenido y composición del polímero. La prueba estándar utilizada para probar las unidades de 3-hidroxibutirato en el polímero fue poli(3-hidroxibutirato). Los contenidos celulares y composiciones del PHA producido se muestran en la Tabla 4. A medida que la tasa de 4HB/3HB en el medio disminuía, el contenido de 3HB del polímero incrementaron en forma monotónica, mientras que el contenido total de las células era similar en todas las pruebas. Esto implica que la composición del medio puede utilizarse como predicción para controlar la composición del copolímero sin afectar significativamente la producción total del polímero. El polímero se extrajo del resto de la masa celular liofilizada. Para todas las muestras, la masa liofilizada se mezcló con alrededor de tres veces su volumen de 1, 2-dicloroetano y se incubó con una remoción suave en una probeta cerrada a 37°C durante 6 horas. La materia en partículas se separó de la solución de polímero por centrifugación (2000 x g., 10 minutos). La solución resultante se añadió por goteo a 10 veces su propio volumen de etanol y al polímero precipitado se le permitió separarse de la solución. El exceso se extrajo y el polímero húmedo restante se asentó hasta que pareció estar seco, entonces se liofilizó para completar el secado. Las propiedades térmicas de estos compuestos P4HB-co-3HB se muestran en la Tabla 5.

Ejemplo 4: Degradación de P4HB in vitro e in vivo.

La degradación del P4HB se estudió in vitro e in vivo. Se examinaron tres configuraciones diferentes de variación de la porosidad (0%, 50% y 80% de porosidad). Se perforaron pequeños discos (5 mm. de diámetro) a partir de las películas de P4HB moldeadas a presión y de espesor uniforme. Las muestras porosas de P4HB se produjeron utilizando la técnica de lixiviación de sal antes descrita. El comportamiento de la degradación in Vitro se estudió incubando los discos en un buffer de fosfato estéril (8 mM de fosfato de sodio, 2 mM de fosfato de potasio, 140 mM de NaCl, 10 mM de KCl, pH

7,4, conteniendo NaN_3 como preservativo) a 37°C . El comportamiento de la degradación in vivo se estudió después de la implantación en bolsones subcutáneos en ratas.

5 Preparación del P4HB poroso. Se mezclaron cristales clasificados de cloruro de sodio ($80\text{-}100\ \mu\text{m}$) con P4HB derretido. La tasa de sal del polímero puede ajustarse para producir la porosidad deseada, mientras que el tamaño de la partícula puede ajustar para producir poros de diverso tamaño. La mezcla de sal polimérica se presionó hasta lograr una película fina. Después de permitir que se solidificara, la película se retiró del apoyo mylar. La película se extrajo exhaustivamente con agua para retirar la sal, dejando una película porosa de P4HB.

10 Degradación acelerada del P4HB. La degradación del P4HB se estudió in vivo. Se examinaron tres configuraciones diferentes de diversa porosidad (0%, 50% y 80% de porosidad). Se perforaron pequeños discos (5mm diam.) a partir de películas de P4HB moldeadas por compresión, siendo de espesor uniforme. Las muestras porosas de P4HB se produjeron utilizando una técnica de lixiviación salina. El comportamiento de la degradación in vivo se estudió luego de la implantación en bolsones subcutáneos en ratas. Las muestras se retiraron en diversos momentos. La masa molecular se midió mediante GPC y la pérdida de masa se midió mediante cuantificación del 4HB restante mediante análisis CG. Los resultados se muestran en la Figura 3. Como muestra la Figura 3, la pérdida de masa en la muestra varía con la porosidad. Las muestras de películas porosas al 50% y 80% mostraron una pérdida de masa del 5%, 20% y 75%, respectivamente, en el período de seis semanas, mientras que la pérdida promedio de masa molecular de estas muestras también disminuyó significativamente (20 al 50%). Estos datos demuestran que la tasa de degradación de las PHA puede modificarse y controlarse alterando la porosidad e incrementando el área superficial.

Resultados

25 Los implantes de P4HB mostraron una respuesta inflamatoria mínima, mucho menor que la de un tamiz PGA no tejido. Esta es una buena indicación de la biocompatibilidad de estos materiales. Las muestras fueron retiradas en diversos momentos y evaluadas histológicamente tanto con respecto a los implantes como al tejido circundante. La masa molecular se midió por GPC y la pérdida de masa se midió por cuantificación del 4HB restante mediante análisis GC. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. Como muestra la Tabla 6, el P4HB no se degrada significativamente in Vitro en un período de 10 semanas. Todas estas muestras mantuvieron su peso inicial y se produjo una disminución del 20 al 40% en la masa molecular promedio. Las muestras incubadas in vivo mostraron una degradación más pronunciada. La pérdida de masa varió con la porosidad. Las muestras porosas de película y al 50% y 80% mostraron una pérdida de masa del 20%, 50% y 100% respectivamente en un período de 10 semanas, mientras que la pérdida promedio de masa molecular de estas muestras se redujo significativamente (20 al 50%).

35 El examen de las muestras mediante luz microscópica y microscopia ambiental (ESEM) no demuestra cambio discernible en las muestras in Vitro durante el período de 10 semanas de incubación. Por otra parte, los implantes sin vivo muestran signos distintivos de degradación. La superficie de estos materiales se degrada progresivamente durante el período de implantación de 10 semanas. Luego de una semana, las muestras de películas muestran algunos signos de ruptura y desorden, que progresan a erosión superficial en las nueve semanas siguientes.

45 Los datos de la degradación in vitro sugieren que el P4HB es relativamente estable ante la hidrólisis simple, a diferencia de otros poliésteres utilizados en aplicaciones bioreabsorbibles, tales como el PGA, PLA y sus copolímeros. Sin embargo, la degradación de los implantes indica que el P4HB puede ser degradado in vivo, sugiriendo un modo de degradación mediado biológicamente. Los datos muestran degradación incrementada con porosidad incrementada, que indica que el área superficial del implante del polímero juega un papel en su degradación in vivo. Esto sugiere que la degradación de los polímeros P4HB in vivo ocurre en la superficie del implante, a diferencia de los materiales de PGA o PLA que degradan a través del implante por hidrólisis, con disminución asociada de la masa molecular y pérdida de las propiedades mecánicas. Estos datos sugieren que la tasa de degradación del P4HB puede modificarse y controlarse alterando su área de superficie. También, se espera que este tipo de degradación de la superficie resultará en una tasa relativamente baja de pérdida de la masa molecular permitiendo el mantenimiento de las propiedades materiales del polímero más allá de las de los poliésteres médicos absorbibles existentes. Los implantes de P4HB se toleraron muy bien y mostraron solo una mínima reacción a cuerpos extraños. Estos resultados muestran que estos materiales tienen ventajas significativas sobre los poliésteres biomédicos existentes.

Ejemplo 5: Moldeo por compresión

60 El P4HB fue comprimido hasta lograr una película fina utilizando una prensa hidráulica Carver. Los rodillos se calentaron hasta 115°C y el P4HB se comprimó entre dos láminas de mylar utilizando espaciadores metálicos. El espesor del espaciador y la presión de la prensa pueden ajustarse para controlar el espesor de la película. La película se retiró de la prensa y se le permitió enfriarse a temperatura ambiente. Después de solidificar (en cuestión de segundos), la película pudo ser retirada

del material de sostén del mylar. Los datos mecánicos de este material se muestran en la Ejemplo 6: Moldeo por compresión de P4HB poroso.

- 5 Los cristales clasificados de cloruro de sodio (80-180 Pm) se mezclaron con P4HB derretido tal como se describe en los ejemplos 4 y 5. La tasa de sal del polímero puede ajustarse para producir la porosidad deseada, mientras que el tamaño de la partícula puede ajustarse para producir poros de diversos tamaños. La mezcla de la sal del polímero se presionó hasta una película fina utilizando las condiciones descritas en el Ejemplo 6. Después de permitir que el material se solidificara, la película se retiró del soporte del mylar. La película se extrajo exhaustivamente con agua para retirar la sal, dejando una película porosa de P4HB. El retiro de la sal se monitoreó mediante análisis de cloruro en el supermatant y se confirmó mediante análisis elemental de la película lixiviada (menos de 0,5% de cloruro). Los datos mecánicos para el P4HB poroso al 50%, y 80% (pP4HB50 y pP4Hb80, respectivamente), se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo 7: Siembra de célula de escayolas de P4HB

- 15 El P4HB poroso (tal como se describe en el ejemplo 6) se esterilizó mediante tratamiento con óxido de etileno frío. Se sembró con células vasculares ovinas y se cultivó in Vitro. Los datos preliminares indicaron muy buena adhesión del material a estas células. Esta es una demostración más de la biocompatibilidad de este material. El número de células adheridas al material puede ser cuantificado utilizando un contraste de ADN y compararlo con las escayolas de ingeniería de tejidos estándares, tamiz PGA.

- 20 Ejemplo 8: Orientación de la fibra.

Las tiras moldeadas por compresión del P4HB se estiraron uniaxialmente. La muestra se encogió y se aclaró, mostrando signos de arqueamiento. Después de este proceso de estirado, el polímero pareció más fuerte y algo más flexible, demostrando una orientación uniaxial de la muestra.

Ejemplo 9: Método de separación termal por fase para la producción de espuma de P4HB.

- 25 El P4HB se disolvió en dioxano a 1 a 5% wt/vol. Esta solución de polímero se dispersó como una película gruesa y se solidificó mediante enfriamiento en hielo por debajo del punto de fusión del dioxano. El solvente se evaporó de este material sólido a baja presión para arrojar una espuma porosa con dimensiones aproximadas a las de la película gruesa del inicio. El análisis por ESEM de este material mostró una estructura altamente porosa del tipo esponja. La concentración de polímero y el proceso de enfriamiento pueden variarse para alterar la porosidad de la espuma. Antes de congelarla, la solución del polímero puede conformarse en una diversidad de formas, descomponerse en partículas de material o utilizarse como recubrimiento. Por tanto, esa técnica de separación termal en fases puede utilizarse para producir una gran variedad de figuras tridimensionales de P4HB altamente porosas.

- 35 Ejemplo 10: Recubrimiento de P4HB de un tamiz PGA no tejido.

- 40 El P4HB se disolvió en tetrahidrofuran a 1% wt/vol. Se introdujo un tamiz PGA no tejido de 1 mm de espesor (Albany International, densidad bruta de 52 mg/cc) en esta solución de manera que los vacíos de aire se eliminaran. El tamiz recubierto se secó al aire y el procedimiento de recubrimiento se repitió. Los análisis microscópicos de luz y ESEM del tamiz recubierto mostraron que durante el proceso de secado el polímero emigraba a las intersecciones de la fibra, y funcionaba para atar las fibras. Esta técnica de enlace de fibras se vio que aumentaba dramáticamente la fuerza y maniobrabilidad del tamiz PGA. La prueba de tensión de acuerdo a ASTM D638, mostró que la fuerza de tensión, el módulo de Young y la elongación final de este material fue de 130 psi, 240 psi y 171%. Esto constituye una mejora sensible sobre el material no recubierto que era muy frágil para probar estos parámetros.

- 45 Ejemplo 11: Recubrimiento de espuma de P4HB de un tamiz PGA no tejido.

- 50 El P4HB se disolvió en dioxano a 2,5% wt/vol. Se introdujo un tamiz PGA no tejido de 1 mm. de espesor (Albano Internacional, densidad bruta de 52 mg/cc) en esta solución de manera que los vacíos de aire se eliminaran. El tamiz recubierto se enfrió sobre hilo de manera que la solución de recubrimiento se solidificara. El tamiz se secó por congelación para retirar el dioxano. El análisis microscópico de luz del tamiz recubierto mostró que durante el proceso de secado por congelación el polímero formó una espuma en forma de red a lo largo del tamiz PGA. Este material espumoso tiene buena maniobrabilidad. El alta área de superficie y las propiedades mecánicas incrementadas son atractivas para una diversidad de aplicaciones.

Ejemplo 12: Formación de microsferas de P4HB.

- 55 El P4HB se disolvió en diclorometano al 1% wt/vol. Un volumen de 1 ml de esta solución se mezcló con 5 ml de una solución de 0,5% wt/vol. de dodecilsulfato de sodio (SDS). La mezcla de dos fases se mezcló mecánicamente para arrojar una emulsión. Un chorro de nitrógeno se pasó en forma de

burbujas a través de la mezcla durante 1 hora a lo largo de la mezcla con remoción rápida para facilitar la remoción del diclorometano. La suspensión resultante contenía microesferas de P4HB de alrededor de 1-10 μm , determinadas bajo un microscopio óptico de contraste de fase.

Sumario

- 5 Los polihidroxialcanoatos tales como el homopolímero P4HB y copolímeros que contienen 4HB tienen propiedades físicas y características de degradación que lo hacen muy atractivo en implantes para uso en aplicaciones médicas. Estos polímeros pueden fabricarse e introducirse en implantes tales como fibras, láminas, espumas, recubrimientos, estructuras, filamentos y similares para uso de estos materiales médicos implantables.

10 Tabla 1: Propiedades térmicas y mecánicas de polímeros médicos seleccionados

Polímero	T _m	T _g	Tensor	Módulo	Elongación	Degradación
	(°C)	(°C) ^o	Str. (psi)	(psi)	%	
¹ P4HB	60	-51	7 500	9 400	1 000	Depende config.
¹ pP4FM50 ^a	60	51	895	2 155	164	Depende config.
¹ pP4HB80 ^b	60	51	180	257	100	Depende config.
⁶ P4HB-3HB 10%	50	42	9 000	14 500	1 080	No reportado
¹ PHB	175	0	4 000	110 000	4	más de 52 semanas
² PGA	230	35	10 000	1 000 000	17	8 semanas
³ PDLLA	Am	53	5 000	300 000	5	Menos de 8 semanas
³ PLLA	175	55	10 000	500 000	8	Más de 8 semanas
² DLPLG 50/50	Am	48	7 000	300 000	5	3-8 semanas
⁵ LDPE			2 000	400-700		No degradable
⁵ HDPE			4 000	100-1 000		No degradable
5UHMWPE			7 250	450		No degradable
PP			4 000	20 000	200-700	No degradable

PET			8 500		50	No degradable
PTFE			3,000 @	50 000	300	No degradable

Resultados

^apP4HB50, 50% poro P4HB, ver ejemplo 7.

^bpP4HB80, 80% poro P4HB, ver ejemplo 7.

5 Referencias

1. De este trabajo medido de acuerdo a ASTM D638 a temperatura ambiente y una tasa de filtrado de 0,05 o 0,1 plgd/min.

2. Hutmacher et al. Int. J. Oral Max. Imp. 1996, 11, 667-678

3. Nobes et al. sometido

10 4. Mark, Physical Properties of Polymers Handbook, American Inst. of Physics, Woodbury, New York, 1996.

5. Schwartz, S.S. and Goodman, S. H. Plastic Materials and Processes, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1982.

6. Saito, Y. and Doi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16: 99-104

15 Tabla 2. Análisis GC de poli(4HBco_2HB) de MBX1177/pFS30 y MBX184/pFS30

Filtrado	4HB, g/L	2HB, g/L	PHA total, % de dcwa	P4HB, % de PHAb	P2HB, % de PHAb
184/30	2	8	18,3	70,8	19,2
					(14.2) ^c
184/30	5	5	47,1	98,8	1,2
					(0,9) ^c
1177/30	2	8	13,0	62,3	27,7
1177/30	5	5	40,1	98,9	1,1

^adcw: peso de célula seca

20 ^bdeterminado mediante análisis GC. Alrededor de 20 mg. de masa celular liofilizada se sometió a butanolisis a 110°C durante 3 horas en 2 ml de una mezcla que contenía (por volumen) 90% 1-butanol y 10% ácido hidrociorhídrico concentrado, con 2 mg/ml de ácido benzoico añadido como un estándar interno. Los componentes solubles en agua de la mezcla resultante se removieron por extracción con 3 ml de agua. La fase orgánica (1 µL a una tasa de separación de 1:50 a una tasa de flujo total de 2 ml/min) se analizó en una columna capilar GC de sílice fundido SPB-1 (30 m; 0,32 mm ID; película de 0,25 µm; Supelco; Bellefonte, Pa) con el siguiente perfil de temperatura: 80°C, 2 min; 10°C por minuto a 250°C; 250°C, 2 min. El estándar utilizado para probar la presencia de unidades de 4-

25

hidroxybutarato en el polímero fue γ -butirolactona. El estándar utilizado para probar las unidades de 2-hidroxibutirato en el polímero fue sodio (2-hidroxibutirato).

^clos porcentos en paréntesis se determinaron mediante análisis GC como arriba, pero luego de la extracción del polímero en cloroformo y subsiguiente precipitado en etanol.

5

Tabla 3. Análisis GC de poli(4HB-co-2HB) de MBX184/pFS30.

Muestra	4HB, g/L	2HB, g/L	PHA total, % de dcwa	P4HB, % de PHAb	P2HB, % de PHAb
1	2	2	8,2	100	0
2	2	4	5,6	100	0
3	2	6	5,7	84,1	15,9
4	2	8	4,1	54,3	45,7

^adcw: peso célula seca

^bdeterminado mediante análisis GC. Ver tabla 2 para más detalle

Tabla 4: Análisis GC de poli (4HB-co-3HB) de MBX1177/pFS30

Muestra	4HH, g/L,	3HB, g/L	PHA total, % de dcw ^a	P4HB, % de PHA ^b	P3HB, % de PHA ^b
3a	4	0,25	49,3	98,0	2,0
3b	4	0,5	46,7	94,2	5,8
3c	4	0,75	56,6	91,7	8,3
3d	4	1	51,8	89,4	10,6

10

^adcw: peso célula seca

^bdeterminado mediante análisis GC. Ver Tabla 2 para detalles. El estándar utilizado para probar la presencia de unidades de 4-hidroxibutirato en el polímero fue γ -butirolactona. El estándar utilizado para probar unidades de 3-hidroxibutirato en el polímero fue poli(3-hidroxibutirato).

15

Tabla 5. Propiedades del P4HB y P4HB-co-3HB de MBX1177/pFS30

Muestra	% ^a	% ^a	Tm ^b	dH Tm1 ^b	Tg ^b	Tx ^b	Tm2 ^b	Mw ^c
P4HB	100	0	60	45	-51	-16	X	1,000,000
3b	94,2	5,8	47	36	-52	-4	44	1,500,000

3c	91,7	8,3	40	20	-53	Nd	39	1,900,000
3d	89,4	10,6	39	17	-53	Nd	Nd	1,100,000

nd - no detectado

^a Determinado mediante análisis GC, ver Tabla 2 para detalles._

5 ^b Determinado mediante análisis DSC . A Perkin Elmer Pyris, se utilizó un calorímetro de scanning diferencial. Las masas de muestra fueron de aproximadamente 4-8 mg. El programa termal utilizado fue como sigue: 25°C, 2 min; calentar a 195°C a 10°C por min; mantener a 195°C 2 min; enfriar a -80°C a 300°C por min; mantener a -80°C por 2 min; calentar a 195°C a 10°C por min. La temperatura de fusión (Tm) y la entalpía de fusión de este pico de fusión (dHTm) se determinó en el primer ciclo de calentamiento. La temperatura de transición del vidrio (Tg), la temperatura de cristalización (Tx) y la temperatura de fusión (Tm2) se determinaron durante el segundo ciclo de calentamiento.

10 ^c Determinado por análisis. Los polímeros aislados se disolvieron en cloroformo a aproximadamente 1 mg/ml y las muestras (50 PL) se cromatografiaron en una columna Waters Stryagel HT6E a una tasa de flujo de 1 ml de cloroformo por minuto a temperatura ambiente, utilizando un detector refractario de índice. Las masas moleculares se determinaron con relación a los estándares de poliestireno de polidispersión estrecha.

Tabla 6: Degradación de P4HB in vitro. Porcentaje de la masa original restante y masa molecular de la película, muestras de P4HB incubadas en buffer de fosfato, porosas 50% y 80% (8mM de fosfato de sodio, 2 mM fosfato de potasio, 140 mM de NaCl, 10 mM de KCL, pH 7,4, conteniendo NaN₃ como preservativo) a 37°C.

Implantación (semanas)	Peso de la película % restante ^a	Masa molecular de la película ^b	50% Peso % restante ^b	50% Masa molecular ^b	80% Peso % restante ^a	80% Masa molecular ^b
0	108	1 144 592	96	963 145	123	1 291 117
1	97	1 160 707	93	1 103 860	99	968 245
2	101	1 008 496	98	1 055 614	106	1 072 328
4	100	887 005	96	725 089	116	987 665
6	109	896 521	97	764 260	95	1 049 079
10	92	772 485	90	605 608	100	727 543

20

^a Determinado mediante análisis GPC. Ver Tabla 3 para los detalles.

^b Determinado por análisis cuantitativo GC. Ver Tabla 2 para los detalles

Tabla 7: Degradación de P4HB in vitro. Porcentaje de la masa original restante y masa molecular de la película, muestras de P4HB implantadas subcutáneamente en ratas

Implantación (semanas)	Peso de la película % restante ^a	Masa molecular de la película ^b	50% Peso % restante ^b	50% Masa molecular ^b	80% Peso % restante ^a	80% Masa molecular ^b
0	108	1 144 592	96	963 145	123	1 291 117
1	103	1 091 107	109	1 026 821	88	1 132 492
2	95	1 054 873	94	973 830	35	943 960
4	92	1 007 736	73	989 629	39	881 919
6	90	797 170	74	901 330	28	689 157
10	80	716 296	48	647 175	0	n/D

N/D No determinado

5 a Determinado mediante análisis GPC. Ver Tabla 3 para los detalles.

b Determinado por análisis cuantitativo GC. Ver Tabla 2 para los detalles. A menudo los explantes pesaban más que el implante original debido a la presencia de tejido adherente o sangre coagulada. En consecuencia: la masa de P4HB en el explante se determinó por análisis cuantitativo GC. El porcentaje en peso de P4HB restante se calculó como esta masa dividida por el implante original.

REIVINDICACIONES

1. Un stent que comprende un copolímero poli(4-hidroxibutirato) o un copolímero poli(butirato-co-hidroalcanoato) del mismo, donde el hidroxialcanoato es definido por la fórmula I:



donde,

- 5 R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son seleccionados independientemente de radicales de hidrocarburos, radicales sustituidos halógeno de hidróxido, radicales de hidroxilo, radicales halógeno, radicales sustituidos de nitrógeno, radicales sustituidos de oxígeno y/o hidrógeno; y
- n es un entero entre 1 y 15.
2. El stent de la Reivindicación 1, donde n es 1 a 4.
- 10 3. El stent de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, donde el peso molecular del polímero o copolímero es entre 300 y 10^7 Daltons.
4. El stent de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el peso molecular del polímero o copolímero es entre 10,000 y 10,000,000 Daltons.
- 15 5. El stent según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el copolímero es poli(4-hidroxibutirato-co-3-hidroxibutirato).
6. El stent según la Reivindicación 1, que comprende además un agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico.
- 20 7. El stent según la Reivindicación 6, donde el agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico es seleccionado del grupo que comprende genes, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, moléculas antisentido, ribozimas, vectores retrovirales, para uso en terapias de genes, anticuerpos y sus fragmentos, factores de unión de células, ligandos de receptores, enzimas, péptidos de adhesión, sacáridos, polisacáridos, fármacos sintéticos orgánicos o inorgánicos, factores de coagulación de la sangre, inhibidores de coagulación de la sangre, agentes trombolíticos, antígenos para la inmunización, hormonas, factores de crecimiento y agentes de diagnóstico detectables por rayo-x,
- 25 fluorescencia, imágenes por resonancia magnética, radioactividad, ultrasonido, tomografía por computadora (CT) o tomografía de emisiones de positrones (PET).
8. El stent según la Reivindicación 7, donde: el agente trombolítico es seleccionado de estreptoquinasa y activador tisular del plasminógeno; el polisacárido es heparina; el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido; el agente de diagnóstico detectable por ultrasonido es un gas
- 30 seleccionado de aire, oxígeno y perfluorocarbonos.
9. El stent según la Reivindicación 1, donde el polímero encapsula células o tejido.
10. El stent según la Reivindicación 1, donde el poli(4-hidroxibutirato) o un copolímero del mismo está en la forma de una capa.