(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 395 057**

(51) Int. Cl.:

A61L 31/14 (2006.01)
A61L 17/12 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61L 31/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2000** **E 07075835 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **19.12.2007** **EP 1867348**

(54) Título: **Dispositivos y aplicaciones médicas de polímeros polihidroxialcanoato**

(30) Prioridad:

25.03.1999 US 126180 P
02.07.1999 US 142238 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2013

(73) Titular/es:

METABOLIX, INC. (100.0%)
21 ERIE STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US

(72) Inventor/es:

WILLIAMS, SIMON F.;
MARTIN, DAVID P. y
SKRALY, FRANK

(74) Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 057 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

[0001] La invención presente se refiere en general a implantes médicos que contienen los biopolímeros poli(4-hidroxibutirato) de polihidroxialcanoato ("PHA"), así como a los usos médicos y los métodos para su preparación.

Antecedentes de la Invención

[0002] En el área médica se ha desarrollado un número de polímeros degradables que se descomponen *in vivo* en sus monómeros respectivos en un plazo de semanas o de unos pocos meses. A pesar de la disponibilidad de estos polímeros sintéticos biodegradables, existe una necesidad de desarrollar polímeros degradables que puedan extender aún más el alcance de las propiedades disponibles, particularmente las propiedades mecánicas.

[0003] Los polihidroxialcanoatos son poliésteres naturales termoplásticos y pueden procesarse mediante técnicas tradicionales de polímeros para su uso en una enorme gama de aplicaciones, incluyendo el empaque de bienes de consumo, el forro de los pañales desechables y las bolsas de basura, alimentos y productos médicos. Los esfuerzos iniciales se enfocaban en las aplicaciones de moldeado, en particular para el empaque de bienes de consumo tales como botellas, recipientes de cosméticos, plumas y soportes de pelotas de golf. Las Patentes U.S.números 4826493 y 4880592 describen la producción de películas de poli((R)-3-hdroxibutirato) ("PHB") y poli((R)-3-hidroxibutirato-co-(R)-3-hidroxivalerato ("PHBV") y su uso como refuerzo de la parte posterior de los pañales. La Patente U.S.nº. 5292860 describe la producción del copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) y el uso de estos polímeros para fabricar la película del refuerzo de la parte posterior de pañales y otros elementos desechables. Los materiales del refuerzo de la parte posterior de los pañales y otros materiales para la confección de artículos de higiene personal, biodegradables o reciclables, a partir de copolímeros PHB diferentes del PHBV se describen en los documentos PCT WO 95/20 614, WO 95/20 621, WO 95/23 250, WO 95/20 615, WO 95/33 874, WO 96/08 535, y las Patentes U.S. 5 502 116, 5 536 564 y 5 489 470.

[0004] Una de las propiedades más útiles de los PHAs que los distingue rápidamente de los polímeros derivados de la petroquímica es su biodegradabilidad Producidos naturalmente a través de las bacterias del suelo, los PHAs se degradan mediante exposición subsiguiente a estas mismas bacterias en suelos, abonos o sedimentos marinos. La biodegradación de los PHAs depende de un número de factores, tales como la actividad microbiana del ambiente y el área superficial del elemento. También son factores importantes la temperatura, el pH, el peso molecular y la cristalinidad. La biodegradación comienza cuando los microorganismos comienzan a crecer sobre la superficie de las enzimas de excreción y plásticas que descomponen el polímero en unidades monoméricas de hidroxiácidos, que son entonces asimiladas por los microorganismos y utilizadas como fuentes de carbono para su crecimiento. En ambientes aeróbicos los polímeros se degradan a dióxido de carbono y agua, mientras que en ambientes anaeróbicos los productos de degradación son dióxido de carbono y metano (Williams & Peoples, CHEMTECH, 26:38-44 (1996)). Mientras que se considera ampliamente que el mecanismo para la degradación de PHAs en el ambiente es la vía del ataque enzimático y puede ser relativamente rápido, el mecanismo de degradación *in vivo* en general se entiende que involucra el ataque hidrolítico simple sobre los enlaces éster de los polímeros, en los que pueden o no mediar las proteínas. A diferencia de los polímeros que contienen 2-hidroxiácidos tales como el ácido poliglicólico y el ácido poliláctico, los polihidroxialcanoatos normalmente están compuestos por 3-hidroxiácidos y, en ciertos casos 4-, 5-, y 6-hidroxiácidos. Los enlaces éster derivados de estos hidroxiácidos son menos susceptibles en general a la hidrólisis que los enlaces éster derivados de los 2-hidroxiácidos.

[0005] Los investigadores han desarrollado procesos para la producción de una gran variedad de PHAs y se han incorporado a polímeros alrededor de 100 monómeros diferentes en condiciones de fermentación controlada (Steinbüchel & Valentin, FEMS Microbiol. Lett., 128:219-28 (1995)). Actualmente hay sólo dos composiciones de PHA disponibles comercialmente: PHB y PHBV. Debido a la gran diversidad de sus composiciones, pueden producirse PHAs con una gama de propiedades físicas (Steinbüchel & Valentin, FEMS Microbiol. Lett., 128:219-28 (1995)). Los PHAs disponibles comercialmente, PHB y PHBV, representan sólo un pequeño componente de los conjuntos de propiedades disponibles en los PHAs. Por ejemplo, la elongación a rotura de los PHBs se encuentra entre 4 y 42%, mientras que la misma propiedad en el caso del poli(4-hidroxibutirato) ("P4HB") es de alrededor del 1000% (Saito & Doi, Int. J. Biol. Macromol. 16: 99-104 (1994)). De forma similar, los valores del módulo de Young y la fuerza de tracción para los PHB y PHBV son de 3,5 a 0,5GPa y de 40 a 16 MPa respectivamente (para incrementar el contenido HV a 25% mol.), en comparación con 149 MPa y 104 Mpa respectivamente para P4HB (Saito & Doi, Int. J. Biol. Macromol. 16: 99-104 (1994)).

[0006] Los PHB y PHBV han sido estudiados extensamente para su uso en aplicaciones biomédicas, en adición a su uso comercial como un reemplazo biodegradable de resinas de productos sintéticos. Estos estudios abarcan desde usos potenciales en liberación sostenida (véanse e.g., Koosha, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:117-30 (1989) and Pouton & Akhtar, Adv. Drug Delivery Rev., 18:133-62 (1996)), al uso en la formulación de pastillas, suturas quirúrgicas, vendajes, polvos lubricantes, vasos sanguíneos, bastidores de apoyo de tejido, implantes quirúrgicos para

unir partes tubulares del cuerpo, placas de fijación de fracturas óseas y otros usos ortopédicos, tal como se describen en el documento PCT WO 98/51 812. Los vendajes hechos de PHB se presentan en el documento G.B. 216 354 de Webb, et al. El uso de PHB y PHBV para la preparación de una lámina porosa, flexible bioreabsorbible para la separación de tejidos y la estimulación de su regeneración en tejido blando dañado, constituye un avance del desarrollo médico descrito en el documento EP 754 467 A1 de Bowald et. A., y en el documento EP 349 505 AD. También hay informes que describen el uso de PHBV para apoyar el crecimiento celular ((Rivard, et al., J Appl. Biomat., 6:65-68 (1995)).

[0007] Además de la biocompatibilidad, también a menudo se desea que el dispositivo médico implantado se degrade luego que ha sido cumplida su función primaria. El PHB y PHBV son los únicos PHAs probados como implantes médicos hasta la fecha que han mostrado períodos de degradación *in vivo* muy prolongados, de más de un año para el PHB (Duvernoy, et al. Thorac. Cardiovasc. Surgeon 43:271-74 (1995); Malm, et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 104:600-07 (1992). Para muchas aplicaciones, no es deseable este tiempo de degradación tan largo ya que la persistencia del polímero en el lugar de curación de la herida puede llevar a una respuesta inflamatoria crónica en el paciente. Se ha visto que los parches de PHB de degradación lenta utilizados para regenerar tejido arterial desarrollan una respuesta macrófaga a largo plazo (de más de dos años) (Malm, et al.,. Eur. Surg. Res. 26:298-308 (1994). Se identificaron los macrófagos como involucrados en la degradación de los implantes de PHB y esta respuesta macrófaga a largo plazo parece indicar la presencia de un material de partículas persistente, de lenta degradación, que se origina a partir del implante. Aunque un parche de PHB utilizado para la reparación del pericardio no pudo ser detectado bajo microscopía ligera regular luego de 12 meses de implantación, se observó un pequeño material residual de partículas mediante microscopía de luz polarizada (Malm, et al., Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 26:9-14 (1992)). No queda claro si este material de partículas se queda colocado en el sitio del implante o si éste emigra a través del cuerpo, causando posiblemente complicaciones imprevistas. La suerte biológica, o el impacto médico de este material de partículas, no pueden predecirse sin un estudio a largo plazo. Para minimizar los problemas potenciales asociados a los PHAs de degradación lenta, resulta ventajoso utilizar materiales reabsorbibles con capacidad de degradación *in vivo* más rápida.

[0008] Hay un solo informe que describe la biocompatiblidad o la degradación *in vivo* de cualquier otro polímero de PHA en aplicaciones biomédicas (PCT WO 98/51 812). La Patente U.S. 5 334 698, otorgada a Witholt et. al., expone artículos médicos fabricados con un poliéster activo desde el punto de vista óptico aislado a partir de células *Pseudomonas oleovorans*; sin embargo, no se muestran ejemplos o discusión alguna sobre pruebas realizadas a la fabricación o biocompatibilidad, y no se brindan métodos para obtener el polímero en una forma pura apropiada para su uso médico *in vivo*. Como la bacteria apropiada para la producción de estos polímeros puede producir también una endotoxina, así como otros mediadores inflamatorios, es importante que el polímero sea procesado para eliminar estos contaminantes.

[0009] Para muchas aplicaciones, la velocidad de biodegradación del PHA es adecuada a la vida requerida del producto. Sin embargo, en ciertos casos sería deseable que pudiera ejercerse más control sobre la velocidad a la cual los polímeros se desintegran en el ambiente. Tal control extendería la gama de aplicaciones de esta clase de polímeros. Por ejemplo, una película de PHA puede tener propiedades mecánicas apropiadas para su uso como una película de abono, sin embargo no tener la velocidad de degradación óptima para la aplicación. La posibilidad de controlar la velocidad de degradación del polímero en el ambiente sería por tanto una ventaja distintiva.

[0010] La Patente U.S. 5 935 506 presenta una endoprótesis de PHB. La construcción de la endoprótesis que se reporta se bioreabsorbe rápidamente, contiene una gran cantidad de plastificador. Sin embargo, el enfoque de PHB plastificado no funciona, ya que se mostró una estenosis de la endoprótesis mayor del 90% después de cuatro semanas (véanse Behrend, American J. Cardiol. p. 45, TCT Abstracts (Oct. 1998); Unverdorben, et al., American J. Cardiol. p. 46, TCT Abstracts (Oct. 1998)). Sería ventajoso aportar una endoprótesis bioreabsorbible con propiedades mecánicas mejoradas sin plastificador.

[0011] Por tanto, mientras los polihidroxialcanoatos ofrecen un amplia gama de propiedades mecánicas que son potencialmente útiles en aplicaciones médicas, su uso particularmente *in vivo* como polímeros reabsorbibles se ha limitado debido a su hidrólisis lenta. Sería por tanto deseable el desarrollo de métodos para controlar la velocidad de degradación de los polihidroxialcanoatos.

[0012] El documento PCT WO98/51 812 expone métodos para fabricar una gama amplia de materiales biodegradables, biocompatibles de poliéster conocidos como polihidroxialcanoatos. Estos materiales se pueden producir con una alta pureza y son apropiados para su uso en aplicaciones médicas *in vivo*.

[0013] Es, por tanto, un objeto de esta invención brindar nuevos inventos y usos para composiciones compuestas por o derivadas de polihidroxialcanoatos que se degraden con mayor rapidez en el ambiente y/o *in vivo*.

[0014] Otro objeto de esta invención radica en aportar métodos para la fabricación de artículos y medios a partir de estas composiciones**.**

Resumen de la Invención

[0015] Según la presente invención se brinda un implante médico biocompatible para la unión, fijación, afianzamiento, apoyo, reparación o refuerzo del tejido blando, conteniendo el implante una composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato);

en el que la composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) contiene aditivos que alteran la estabilidad química del polímero,

en el que el homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) tiene un peso molecular medio en el intervalo de 10 000 a 10 000 000 Daltons,

en el que el implante se selecciona entre el grupo que consta de dispositivos guiados de regeneración y reparación de tejido, agentes de relleno y de carga, válvulas para venas, estructura de soporte de médula ósea, dispositivos de aumento de ligamentos, injertos de ligamentos y tendones, sustitutos de injerto de hueso, placas óseas, sistemas de recubrimiento óseo, sustitutos de la piel, sustitutos durales, hemostatos, implantes de células oculares, jaulas de fusión espinal, dispositivos de regeneración de menisco, injertos vasculares, válvulas cardíacas, dispositivos que comprenden un revestimiento formado a partir de la composición de polihidroxialcanoato , en el que el dispositivo es un stent, catéter o sensor, dispositivos de encapsulación celular, malla quirúrgica en forma de un tapón de malla y dispositivos de liberación controlada y donde si el implante es un agente de relleno y de carga entonces es para uso para rellenar defectos o como un material de expansión de esfínter para uso en el tratamiento de la incontinencia de adultos.

[0016] Se brinda también un método para fabricar un implante médico biocompatible para la fijación, soporte, afianzamiento, reparación o refuerzo de tejido blando, conteniendo el implante una composición de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato),

en el que la composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) opcionalmente contiene aditivos que alteran la estabilidad química del polímero,

en el que el homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) tiene un peso molecular medio en el intervalo de 100.00 a 10.000.000 Daltons,

que comprende

aportar una composición de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato).

en donde la composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) opcionalmente comprende aditivos que alteran la estabilidad química del polímero.

en donde el homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) tiene un peso molecular medio en el intervalo de 100.00 a 10.000.000 Daltons,; y

formar o incorporar la composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) en un implante seleccionado del grupo que consta de: dispositivos guiados de regeneración y reparación de tejido, agentes de relleno y de carga, válvulas para venas, estructura de soporte de médula ósea, dispositivos de aumento de ligamento, injertos de ligamentos y tendones, sustitutos de injerto de hueso, sustitutos de piel, sustitutos durales, hemostatos, implantes de células oculares, jaulas de fusión espinal, dispositivos de regeneración de menisco, injertos vasculares, válvulas cardíacas, dispositivo de recubrimientos en los que el dispositivo es un stent, catéter o sensor, dispositivos de encapsulación celular, malla quirúrgica en forma de un tapón de malla y dispositivos de liberación controlada y donde si el implante es un agente de relleno y de carga entonces es utilizado para rellenar defectos o como un material de expansión de esfínter para su uso en el tratamiento de la incontinencia de adultos.

[0017] Las velocidades de degradación de los polímeros pueden manipularse mediante la adición de varios componentes a las composiciones poliméricas, así como la selección de la composición química, el peso molecular, las condiciones de procesamiento y la forma del producto polimérico final. La composición química puede alterarse a través de la selección de monómeros que puedan incorporarse al polímero, mediante alteración de sus enlaces, de la cadena principal química o de los grupos pendientes y/o mediante la manipulación del peso molecular. La composición de polihidroxialcanoato en el implante de la invención presente puede contener aditivos para alterar la velocidad de degradación. Puede incrementarse la porosidad, incluidas las sustancias hidrófilas y/o aumentar el área de exposición al agua, todo lo cual aumentará la velocidad de degradación. Los recubrimientos hidrófobos o la incorporación a, o mezcla con, sustancias hidrófobas con el polímero disminuirá la velocidad de degradación.

[0018] Los implantes preferidos incluyen placas de hueso, sistemas de recubrimiento óseo, malla quirúrgica en forma de tapón de malla, válvulas cardíacas e injertos vasculares, dispositivos guiados de regeneración y reparación de tejido, agentes de relleno y de carga para uso en rellenar defectos o como un material de expansión de esfínter para uso en el

tratamiento de la incontinencia de adultos, válvulas para venas, estructura de soporte de médula ósea, dispositivos de regeneración de menisco, injertos de ligamentos y tendones, implantes de células oculares, jaulas de fusión espinal, sustitutos de la piel, sustitutos durales, sustitutos de injerto de hueso y hemostatos. La composición de polihidroxialcanoatos puede utilizarse tanto en aplicaciones médicas existentes como en nuevas, incluyendo la liberación sostenida de fármacos y otros materiales bioactivos. La composición de polihidroxialcanoato puede también utilizarse para hacer o conformar recubrimientos de una gran diversidad de dispositivos tales como, stents, catéteres y sensores. Sus ventajas en aplicaciones existentes o nuevas radican en el uso de un material sustituto biodegradable en la aplicación, o adición de cualquier otra característica o atributo deseado asociado con la aplicación o uso, tal como una propiedad mecánica o superficial, propiedad física o química, técnica de esterilización, biocompatibilidad, mecanismo de degradación, preferencia de envasado y/o un tema de estabilidad.

[0019] Como demuestran los ejemplos, las composiciones de polihidroxialcanoato que contienen poli((4HB) tienen propiedades mecánicas extremadamente favorables, así como el hecho de que son biocompatibles y se degradan dentro de marcos de tiempo apropiados bajo condiciones fisiológicas. Estos materiales de polihidroxialcanoato brindan un intervalo más amplio de velocidades de degradación de polihidroxialcanoatos en comparación con los que actualmente están disponibles.

[0020] También se describen los métodos para el procesamiento de estos materiales para convertirlos en dispositivos que puedan ser implantados o inyectados.

Breve descripción de los Dibujos

[0021]

La Figura 1 es un esquema de biopolímeros de PHA divididos *grosso modo* en grupos de acuerdo a la longitud de sus grupos pendientes y de sus rutas biosintéticas respectivas.

La Figura 2a es un esquema de las rutas mediante las cuales se derivan los grupos pendientes cortos de PHAs. La Figura 2b es un esquema de las rutas mediante las cuales se derivan los grupos pendientes largos de PHAs.

La Figura 3 es un gráfico de la degradación *in vivo* del P4HB en el tiempo (semanas).

Descripción detallada de la invención

[0022] Se han desarrollado implantes médicos que contienen una composición biocompatible de polihidroxialcanoato tal como se define en la Reivindicación 1 que se anexa

Definiciones

[0023] Un “polímero bioerosionable” es un polímero no soluble en agua que se convierte bajo condiciones fisiológicas en material soluble en agua sin tener en cuenta el mecanismo específico involucrado en el proceso de erosión. La “bioerosión” incluye tantos procesos físicos (tales como la disolución) como procesos químicos (tales como escisión de la cadena principal). El prefijo “bio” indica que la erosión ocurre bajo condiciones fisiológicas en oposición a otros procesos de erosión, causados, por ejemplo, por altas temperaturas, ácidos fuertes o bases, luz ultravioleta o condiciones atmosféricas. Los términos “bioreabsorción” y “bioabsorción” se utilizan indistintamente y a menudo implican que el polímero o sus productos de degradación son eliminados mediante actividad celular (e.g. fagocitosis) en un ambiente biológico.

[0024] Tal como se utiliza aquí en referencia a polímeros, el término “degradar” se refiere a escisión en la cadena del polímero, de tal manera que el peso molecular se mantenga aproximadamente constante al nivel de oligómero, manteniendo partículas del polímero después de la degradación. El término “degradación completa” se refiere a la escisión del polímero a nivel molecular de manera que haya esencialmente pérdida total de masa. El término “degradación” tal como se utiliza aquí incluye “degradación completa” a menos que se indique lo contrario.

[0025] Biocompatible se refiere a materiales que no generan una respuesta tóxica o inmunológica severa luego de su implantación o ingestión.

Composiciones de Polihidroxialcanoatos (“PHA”)

<u>COMPOSICIONES DE POLÍMEROS</u>

[0026] “Materiales de PHA” contienen una o más unidades, por ejemplo entre 10 y 100.000 y preferiblemente entre 100 y 30.000 unidades de la siguiente fórmula I:

$$-OCR^1R^2(CR^3R^4)_n\ CO-;$$

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

[0027] La formula $-(CR^3R^4)n-$ incluye las fórmulas siguientes:

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

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

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

en donde R^3, R^4, $R^{3'}$,$R^{4'}$, $R^{3''}$ y $R^{4''}$ pueden ser independientemente radicales hidrocarburo incluyendo radicales hidrocarburo de cadena larga; radicales halo- e hidroxi- sustituidos; radicales hidroxi; radicales halógeno; radicales sustituidos con nitrógeno; radicales sustituidos con oxígeno; y/o átomos de hidrógeno. Por tanto la fórmula I incluye unidades derivadas de 3-hidroxiácidos (n=1), 4-hidroxiácidos (n=2) y 5-hidroxiácidos (n=3).

[0028] Estas unidades pueden ser las mismas en un homopolímero o ser unidades más 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, o, como para los homopolímeros de poli(4-hidroxibutirato) empleados en la presente invención, de 10.000 a 10.000.000 Daltons.

[0029] Los materiales de PHA pueden contener o ser modificados para incluir otras moléculas, tales como compuestos bioactivos y detectables, agentes superficiales activos, otros polímeros degradables o no degradables, así como materiales utilizados para modificar las propiedades mecánicas de los PHAs tales como plastificadores, rellenos, agentes nucleadores, colorantes, estabilizadores, modificadores y aglutinantes.

[0030] PHAs representativos se describen en Steinbüchel & Valentin, FEMS Microbiol. Lett., 128:219-28 (1995).

[0031] Los PHB y P4HB poseen propiedades físicas muy diferentes. Se conocen o pueden prepararse una gama de copolímeros PHA que contienen 4-hidroxibutirato con una gama de propiedades intermedias entre las de los PHB y las de los P4HB (Saito & Doi, Int. J. Biol. Macromol. 16:99-104 (1994)). Sin embargo, no se han informado aplicaciones biomédicas, pruebas de biocompatibilidad ni degradación *in vivo* del P4HB y sus copolímeros. Los copolímeros PHA de 4HB y 3HB que varían en composición del 0 al 100% de 4HB se han producido en *Alcalaigenes eutrophus* (Nakamura, et al. Macromol. 25:4237-31 (1992)) y de 64 a 100% 4HB en *Comamonas acidovorans* (Saito & Doi, Int. J. Biol. Macromol. 16:99-104 (1994)). Sin embargo, estos polímeros eran de una masa molecular modesta (1×10^5 a 5×10^5 g/mol, por GPC) en comparación con la masa molecular producida en *E. coli* recombinante (mayor de 5×10^5 g/mol, GPC).

[0032] Los biopolímeros de PHA pueden dividirse *grosso modo* en tres grupos según la longitud de sus grupos pendientes y sus rutas biosintéticas respectivas (Figura 1). Aquellos con grupos pendientes cortos, tales como polihidroxibutirato (PHB), unidades de un homopolímero de R-3-ácido hidroxibutírico (R-3HB), son materiales termoplásticos altamente cristalinos, y se conocen desde hace más tiempo (Lemoigne & Roukhelman, Annales des fermentations, 5:527-36 (1925)). Un segundo grupo de PHAs que contiene las unidades cortas R-3HB, polimerizadas aleatoriamente con unidades de grupos pendientes mucho más largos de ácidos hidroxi, se reportó primeramente a principios de los años setenta (Wallen & Rohwedder, Environ. Sci. Technol., 8:576-79 (1974)). También se conoce un número de microorganismos que producen específicamente copolímeros de R-3HB con estas unidades de grupos pendientes más largos de ácidos hidroxi y que pertenecen a este segundo grupo (Steinbüchel & Wiese, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:691-97 (1992)). A principios de los años ochenta, un grupo de investigación en los Países Bajos identificó un tercer grupo de PHAs que contenía ácidos hidroxi de grupos pendientes predominantemente más largos (De Smet, et. al., J. Bacteriol., 154:870-78 (1983)).

[0033] Los polímeros a base de PHAs pueden constituir hasta un 90% del peso en seco de las células de las bacterias y se encuentran como gránulos discretos dentro de las células de las bacterias. Estos gránulos de PHA se acumulan en respuesta a la limitación de nutrientes y sirven como materiales de reserva de carbono y energía. Se utilizan rutas distintas por parte de los microorganismos para producir cada tipo de estos polímeros. Una de estas rutas que llevan a los polihidroxialcanoatos de grupos pendientes cortos (SPGPHAs) involucra a tres enzimas, a saber, la tiolasa, la reductasa y la sintasa PHB (también denominada polimerasa). Utilizando esta ruta, se sintetiza el homopolímero de PHB por condensación de dos moléculas de la acetil-Coenzima A para dar acetoacetil-Coenzima A, seguida de reducción de este intermediario a R-3-hidrobutirilo-Coenzima A y 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 del ácido R-4-hidroxi y ácido R-5-hidroxi. La ruta biosintética se encuentra, por ejemplo, en las bacterias *Zoogloea ramigera* y *Alcaligenes eutrophus.* La ruta biosintética que se utiliza para alcanzar el tercer grupo de

PHAs, los polihidroxialcanoatos de grupos pendientes largos (LPGPHAs) todavía es parcialmente desconocida, no obstante, actualmente se piensa que las unidades monoméricas hidroxiacilo que llevan a los LPGPHAs se derivan mediante la oxidación β de ácidos grasos y la ruta del ácido graso (Figura 2b). Los sustratos de la R-3-hidroxiacilo-Coenzima resultante de estas rutas se polimerizan entonces mediante sintasas de PHA (también denominadas polimerasas) que tienen especificidades al sustrato que favorecen las unidades monoméricas más largas en el intervalo C6-C14. Los PHAs de grupos pendientes largos se producen, por ejemplo, por Pseudomonads.

[0034] Presumiblemente, el segundo grupo de PHAs que contienen tanto unidades cortas R-3HB como monómeros de grupos pendientes largos, utilizan ambas rutas mostradas en las Figuras 2a y 2b para aportar los monómeros de ácido hidroxi. Los últimos se polimerizan entonces mediante sintasas de PHA capaces de aceptar estas unidades.

[0035] En total, se han incorporado alrededor de 100 tipos diferentes de ácidos hidroxi a los PHAs mediante métodos de fermentación (Steinbüchel & Valentin, FEMS Microbiol., Lett., 128:219-28 (1995)). Notablemente, estos incluyen PHAs que contienen grupos pendientes funcionalizados tales como grupos ésteres, enlaces dobles, alcoxi, aromáticos, halógenos e hidroxi.

[0036] Un polihidroxialcanoato preferido para aplicaciones médicas es el poli(4-hidroxibutirato) (P4HB). El P4HB es biocompatible, reabsorbible, procesable, fuerte y dúctil. El mantenimiento de la resistencia a la rotura es otro parámetro muy importante en el caso de materiales de suturas y presillas, especialmente los reabsorbibles. Como los materiales reabsorbibles se degradan *in vivo*, sus propiedades físicas y mecánicas cambian como resultado de esta degradación. Por ejemplo, una sutura reabsorbible perderá gran parte de su resistencia a la rotura, y como tal su capacidad de fijación del tejido con mayor rapidez en comparación con el tiempo que demora su reabsorción completa. Las suturas de ácido poliglicólico (PGA) por ejemplo, pierden la mayor parte de su resistencia *in vivo* en un período de tres semanas (Vet. Surg. 21; 192:355-61) pero no se reabsorben completamente antes de las seis semanas. Esta pérdida de su resistencia mecánica es el resultado de la disminución de la masa molecular del polímero. Es importante resaltar que un número de parámetros afectarán las velocidades de reabsorción y la resistencia a la rotura *in vivo*, tales como el tipo de tejido, las tensiones mecánicas y la presencia de infección.

[0037] Los ejemplos demuestran que la velocidad de degradación del P4HB *in vivo* es rápida en relación con otros PHAs sin embargo, su velocidad de reabsorción es más lenta que la de muchos de los materiales utilizados como suturas reabsorbibles. Adicionalmente, tal 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 considera beneficioso para el mantenimiento de las propiedades mecánicas y por ende para la resistencia a la rotura de los PHAs utilizados como materiales para el cierre de heridas. Debido a sus excelentes propiedades mecánicas, mantenimiento de una alta masa molecular, su capacidad de procesamiento, su biocompatibilidad y capacidad de reabsorción, los P4HB y P4HB-co-HA son útiles en una diversidad de dispositivos médicos, incluyendo por ejemplo, materiales reabsorbibles para el cierre de heridas tales como materiales de sutura y engrampado .

FUENTES DE PHAS

[0038] Los materiales de los PHAs que pueden modificarse para alterar sus velocidades de degradación pueden derivarse de una fuente biológica, una fuente enzimática o una fuente química. La fuente biológica puede ser un microorganismo o un organismo superior tal como una planta y puede derivarse mediante ingeniería genética.

[0039] A mediados de los años 1980 algunos grupos de investigación estuvieron muy activos en la identificación y aislamiento de los genes y los productos genéticos responsables de la síntesis del PHA. Estos esfuerzos llevaron al desarrollo de sistemas transgénicos para la producción de PHAs tanto en microorganismos como en plantas, así como métodos enzimáticos para la síntesis del PHA. Tales rutas pueden incrementar aún más los tipos disponibles de PHAs. Estos avances han sido reseñados en Williams & Peoples, CHEMTECH, 26:38-44 (1996) and Williams & Peoples, Chem. Br. 33:29-32 (1997).

[0040] Los métodos que pueden utilizarse para la producción de polímeros de PHA apropiados para su modificación subsiguiente con el objeto de alterar sus velocidades de degradación se describen por ejemplo, en la Patente U.S.4910145 otorgada a Holmes, et al.; Byrom, "Miscellaneous Biomaterials" en Biomaterials (Byrom, Ed.), pp.333-59 (MacMillan Publishers, London 1991); Hocking & Marchessault, "Biopolyesters" en Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers (Griffin, Ed.), pp.48-96 (Chapman and Hall, London 1994); Holmes, "Biologically Produced (R)-3-hydroxyalkanoate Polymers and Copolymers," en Developments in Crystalline Polymers (Bassett Ed.), vol. 2, pp.1-65 (Elsevier, London 1988); Lafferty et al.; "Microbial Production of Poly-b-hydroxybutyric acid" en Biotechnology (Rehm & Reed, Eds.) vol. 66, pp. 135-76 (Verlagsgesellschaft, Weinheim 1988); Müller & Seebach, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:477-502 (1993); Steinbüchel, "Polyhydroxyalkanoic Acids" en Biomaterials (Byrom, Ed.), pp. 123-213 (MacMillan Publishers, London 1991); Williams & Peoples, CHEMTECH, 26: 38-44, (1996); Steinbüchel & Wiese, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:691-697 (1992); las Patentes U.S. 5 245 023; 5 250 430; 5 480 794; 5 512 669; y 5 534 432; Agostini, et al., Polym. Sci., Part A-1, 9:2775-87 (1971); Gross, et al., Macromolecules, 21:2657-68 (1988); Dubois, et al., Macromolecules, 26:4407-12 (1993); Le Borgne & Spassky, Polymer, 30:2312-19 (1989); Tanahashi & Doi,

Macromolecules, 24:5732-33 (1991); Hori, et al., Macromolecules, 26:4388-90 (1993); Kemnitzer, et al., Macromolecules, 26:1221-29 (1993); Hori, et al., Macromolecules, 26:5533-34 (1993); Hocking, et al., Polym. Bull., 30:163-70 (1993); Xie, et al., Macromolecules, 30:6997-98 (1997); la Patente U.S. 5 563 239 otorgada a Hubbs; las Patentes U.S. 5 489 470 y 5 520 116 otorgadas a Noda, et al. Los PHAs derivados de estos métodos pueden estar en cualquier forma, incluyendo una forma sólida o de látex.

[0041] La identificación, clonación y expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de los PHAs a partir de numerosos microorganismos dentro de organismos recombinantes permite la producción de PHAs dentro de organismos que no son productores originales de PHA. Un ejemplo preferido es la *E. coli*, que es un anfitrión bien reconocido para la producción de biofarmacéuticos y PHAs para aplicaciones médicas. Tales organismos recombinantes les aportan a los investigadores un mayor grado de control del proceso de producción del PHA porque están libres de las actividades enzimáticas de fondo para la biosíntesis de precursores de PHA indeseables o de la degradación del PHA. Adicionalmente, la selección adecuada de un organismo recombinante puede facilitar la producción de, o permitir la biocompatibilidad aumentada del PHA producido.

[0042] Los requerimientos mínimos para la síntesis del PHA en un organismo recombinante son una fuente de hidroxialcanoilo-CoA y y una sintasa de PHA apropiada (Gerngross & Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. 92:6279-83(1995)). Los productores recombinantes de PHA requieren por tanto una ruta biosintética para un monómero hidroxialcanoilo-CoA y una sintasa de PHA apropiada. La producción de un homopolímero requiere que el organismo produzca únicamente un sustrato apropiado para la sintasa de PHA, ya que la producción de sustratos múltiples resulta en la formación de una copolímero de PHA. Los organismos recombinantes que contienen un transgen que codifica a una sintasa de PHA son suficientes para la producción de P4HB.

[0043] En ausencia de rutas de degradación del PHA, la masa molecular del PHA acumulada en los organismos recombinantes puede ser muy elevada. Se ha informado que el PHB producido en la *E. coli* recombinante tiene una masa molecular de 4×10^6 g/mol (Sim, et al., Nature Biotech. 15:63-67 (1997)). La masa molecular es importante para el control de las propiedades físicas de un PHA dado, porque la masa molecular incrementada de los PHAs producidos en organismos recombinantes puede llevar a propiedades materiales mejoradas, tales como una resistencia a la tracción incrementada y alargamiento a rotura (Kusaka, et al., J.M.S. Pure Appl. Chem. A35: 319-35 (1998)).

[0044] La biosíntesis del P3HB-co-4HB que contiene un nivel bajo de 4HB (1,5%) ha sido descrita en *E. coli* recombinante (Valentin, et al., J. Biotech 58:33-38 (1997)). Es notable que las masas moleculares de estos PHAs eran muy elevadas (mayores de 1×10^6 g/mol). Adicionalmente, ha sido descrita la biosíntesis del P3HB-co-4HB y del homopolímero de P4HB en la *E. coli* recombinante (Hein, et al., FEMS Microbiol. Lett., 153:411-18 (1997)).

[0045] En adición al uso de rutas biológicas para la síntesis del PHA, los polímeros de PHA pueden derivarse también mediante síntesis química. Un enfoque ampliamente utilizado involucra la polimerización en abertura de anillo de los monómeros de lactona-β utilizando varios catalizadores o iniciadores tales como aluminoxanos, di-estaño-oxanos o zinc-alcoxi y compuestos alcoxi-aluminio (véanse Agostini, et al., Polym. Sci., Part A-1, 9:2775-87 (1971); Gross, et al., Macromolecules, 21:2657-68 (1988); Dubois, et al., Macromolecules, 26:4407-12 (1993); Le Borgne & Spassky, Polymer, 30:2312-19 (1989); Tanahashi & Doi, Macromolecules, 24:5732-33 (1991); Hori, et al., Macromolecules, 26:4388-90 (1993); Kemnitzer, et al., Macromolecules, 26: 1221-29 (1993); Hori, et al., Macromolecules, 26:5533-34 (1993); Hocking & Marchessault, Polym. Bull. 30:163-70 (1993). Un segundo enfoque involucra la polimerización por condensación de ésteres y se describe en la Patente U.S. 5 563 239 otorgada a Hubbs, et al. Los investigadores han desarrollado también métodos quimio-enzimáticos para preparar los PHAs. Por ejemplo, Xie et al., Macromolecules, 30:6997-98 (1997) expone una polimerización por abertura del anillo de beta-butirolactona mediante lipasas termofílicas para producir PHB.

[0046] La producción biológica de P4HB o P4HB-co-HA tiene ciertas ventajas sobre los métodos químicos sintéticos tradicionales. La síntesis química de P4HB de masa molecular elevada (mayor de 1×10^5 g/mol) es difícil debido a la tendencia del ácido libre a formar la lactona para formar el anillo de cinco miembros relativamente no restringido y cinéticamente favorecido. Por tanto, la policondensación del ácido 4-hidroxibutírico es difícil de lograr, a la vez que el material que resulta de las reacciones de polimerización de alta presión de abertura del anillo de γ-butirolactona es de muy baja masa molecular (Korte & Gelt, Polymer Lett., 4:685 (1966)) y tendría propiedades mecánicas pobres. Una estrategia sintética alterna para el P4HB, la polimerización por abertura del anillo del radical libre de 2-metileno dioxolano, resulta en un copolímero que contiene unidades de anillo abierto y no abierto (Bailey, et al. J Polym. Sci. Polym. Chem. 20:3021-30 (1982); Bailey, J. Polym. Preprints 25:210-11 (1984)). 4HB ha sido copolimerizado exitosamente con 3HB vía la polimerización del anillo abierto (Hori, et al., Polymer 36:4703-05 (1996)). Sin embargo, el peso molecular de los copolímeros fue modesto (menos de 1×10^5 g/mol), especialmente para las composiciones con más del 80% de 4HB (menos de 2×10^4 g/mol). Adicionalmente muchos de los catalizadores utilizados para la síntesis química de los poliésteres contienen metales tóxicos. Estos contaminantes tóxicos pueden ser evitados utilizando un proceso biológico para producir PHAs.

FORMULACIONES DE PHA QUE TIENEN VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN ALTERADAS

ADITIVOS QUE ALTERAN LAS VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN

[0047] La hidrólisis de los polihidroxialcanoatos se acelera a pHs acídicos o básicos y por tanto la inclusión de aditivos acídicos o básicos o excipientes puede utilizarse para modular la velocidad de degradación de los PHAs. Los excipientes pueden añadirse como partículas, pueden mezclarse con cualquier otro aditivo o agente incorporado o a ser incorporado, o pueden ser disueltos dentro del polímero. Los aditivos que mejoran la velocidad de degradación incluyen ácidos inorgánicos tales como sulfato de amonio y cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácidos benzoicos, péptidos, ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de zinc e hidróxido de zinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y tensioactivos tales como TWEEN™ y PLURONIC™. Tales aditivos pueden utilizarse en concentraciones entre 0,1 y 30% por peso.

[0048] La velocidad de degradación puede mejorarse también mediante aditivos que forman poros o que también pueden incrementar el área de superficie en el polímero o que incrementan 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 pueden ser eliminados mediante lixiviación. Las partículas apropiadas incluyen cristales de sales, proteínas tales como gelatina y azarosa, almidones, polisacáridos tales como alginato y otros polímeros. Los diámetros de las partículas pueden estar entre nanómetros y 500 micrones. También pueden ser liofilizables. Los agentes formadores de poros pueden añadirse en una cantidad entre 0,01% al 90% peso a volumen, tal como a un nivel entre uno y treinta por ciento (w/w, polímero), para aumentar la formación de poros. Por ejemplo, en secado mediante rociado o evaporación de disolvente, un agente tal como una sal volátil, por ejemplo bicarbonato de amonio, acetato de amonio, cloruro de amonio o benzoato de amonio u otra sal liofilizable, se disuelve primero en agua. La solución que contiene el agente formador de poros se emulsiona entonces con la solución del polímero para crear gotas en el polímero del agente formador de poros. Esta emulsión se rocía en seco entonces o se lleva a través de un proceso de evaporación/extracción del disolvente. Después que se precipita el polímero, las micropartículas endurecidas se congelan y liofilizan para eliminar los agentes formadores de poros. Los plastificadores, tales como los ésteres de citrato y otros polímeros como los polihidroxialcanoatos atáxicos, pueden ser añadidos para incrementar el carácter amorfo del polímero.

[0049] Los recubrimientos hidrófobos o los materiales que pueden incorporarse para aumentar las velocidades de degradación incluyen compuestos hidrófobos tales como fosfolípidos, colesterol y otros polímeros, así como tensioactivos. Estos materiales y métodos para formar recubrimientos o la incorporación a materiales se describen en la WO 96/18 420 por Bracco Research SA, WO 92/18 164 por Delta Biotechnology, Ltd., WO 95/03 356 por el Massachusetts Institute of Technology, PCT/EE.UU,97/03 007 por Acusphere, Patente U.S.No. 5 271 961 otorgada a Mathiowitz, et al., Patente U.S.No. 5 711 933 otorgada a Bichon, et al., y Patente U.S.No. 5 705 187 otorgada a Unger. Los ejemplos específicos presentan ácidos grasos y fosfolípidos como emulsionantes para estabilizar la fase aceitosa en la fase acuosa durante el proceso de emulsión/encapsulado, con el resultado de que las microesferas están recubiertas con una capa externa del surfactante. El uso de aditivos tales como grasas, ceras e hidrocarburos de elevado peso molecular también se expone para hidrofobizar las paredes del polímero y para disminuir la velocidad de penetración del agua.

MODIFICACIÓN DE LOS GRUPOS PENDIENTES DE PHA

[0050] Un método alternativo para alterar la velocidad de degradación de los polímeros de PHA involucra la modificación de los grupos pendientes de polihidroxialcanoatos. Los grupos pendientes pueden modificarse total o parcialmente. Los grupos pendientes pueden, por ejemplo, convertirse a grupos acídicos o básicos, tales como ácidos carboxílicos y aminas. Estos tipos de grupos pueden mejorar la degradación alternando los valores locales del pH. Alternativamente, los grupos pendientes pueden ser convertidos a grupos reactivos, tales como alcoholes y aminas, que pueden escindir el cadena principal del polímero por reacción intramolecular o intermolecular. En adición a estas conversiones, los grupos pendientes pueden también convertirse a grupos hidrofílicos para aumentar la asimilación de agentes hidrolíticos tales como el agua, o pueden ser convertidos a grupos que pudieran aumentar la naturaleza amorfa de los polímeros. Los procedimientos requeridos para llevar a cabo la conversión de grupos funcionales de los grupos pendientes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un método apropiado que puede utilizarse para preparar un PHA que incorpora una unidad que altera la velocidad de degradación del polímero, se expone en la WO 98/39 453 otorgada a Hein, et al. Los grupos pendientes apropiados en los polímeros de PHA que alterarán la velocidad de degradación pueden derivarse también directamente mediante fermentación.

MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS PHAS

[0051] La velocidad de hidrólisis de un polihidroxialcanoato depende de un número de factores. Un factor clave es la naturaleza química o reactividad de los enlaces de éster entre los monómeros. La velocidad de degradación de la cadena principal del PHA puede ser alterada por tanto incorporando dentro la cadena principal del polímero enlaces

químicos que son más susceptibles a la hidrólisis o al ataque enzimático. Los ejemplos de monómeros que pueden incorporarse a la cadena principal de los polihidroxialcanoatos para alterar la velocidad de degradación del polímero son ácidos 2-hidroxi, tales como ácido glicólico y ácido láctico, y otros hidroxiácidos que modulan la reactividad del enlace éster, tales como el ácido acético 2-hidroxietoxi. Además de la incorporación de otros hidrácidos que producen ésteres que son más susceptibles al ataque hidrolítico o enzimático, pueden incorporarse otros tipos de funcionalidades dentro la cadena principal del polímero. Por ejemplo, uno o más enlaces éster pueden ser reemplazados por grupos tales como amidas, anhídridos, carbonatos o carbamatos. Los ejemplos de monómeros que pueden incorporarse a la cadena principal de polihidroxialcanoatos son los aminoácidos y aminoalcoholes. Es más, los monómeros multifuncionales pueden incorporarse a la cadena principal de los polihidroxialcanoatos, por ejemplo, trioles o tetraoles. Estos tipos de unidades de monómeros pueden utilizarse también para aumentar o mantener el peso molecular del polímero mediante entrecruzamiento de cadenas internas o para modificar la cristalinidad de los polímeros.

[0052] Puede utilizarse una diversidad de métodos para incorporar enlaces químicos susceptibles a las cadenas principales de los alcanoatos. Por ejemplo, pueden añadirse coalimentaciones durante la fermentación de los PHAs que resultan en la incorporación de los monómeros deseados. Las coalimentaciones apropiadas incluyen ácidos hidroalcoxi acéticos. Estos tipos de monómeros pueden incorporarse también durante la síntesis química de monómeros hidroxiácidos utilizando catalizadores y vía derivados de coenzimas A utilizando catalizadores enzimáticos tales como las sintasas de PHA.

[0053] Pueden incorporarse también enlaces químicos susceptibles a los esqueletos de los polihidroxialcanoatos después de su síntesis inicial. Los métodos para alcanzar esto incluyen transformaciones químicas tales como la inserción de reacciones, irradiación, esterificación, transesterificación (véanse e.g., Otera, et al., Tetrahedron Lett., 27: 2383-86 (1986); Otera J. et al., Org. Chem., 56: 5307-11 (1991), Otera, et al., J. Org. Chem., 54: 4013-14 (1989); y Otera, et al., J Chem. Soc.Chem. Commun. 1742-43 (1991)), reacciones de transposición de ésteres (véase e.g., Stanton & Gagné, J Am. Chem. Soc., 119: 5075-76 (1997) y la mezcla reactiva. En este último caso, las reacciones químicas pueden realizarse en fusión con un catalizador presente. Por ejemplo, los ésteres o poliésteres pueden fusionarse con polihidroxialcanoatos en presencia de catalizadores apropiados para poder modificar químicamente al polihidroxialcanoato.

PROCESAMIENTO DE PHAS INCLUYENDO ENLACES SUSCEPTIBLES

[0054] Los polihidroxialcanoatos pueden manipularse aún más utilizando una gama amplia de técnicas de procesamiento de polímeros. Los métodos para el procesamiento de estos materiales incluyen colado de disolventes, procesamiento en fusión, hilado/ tejido de las fibras, extrusión, moldeado por compresión e inyección, y laminación.

Dispositivos y métodos para producción de los mismos

[0055] Las composiciones de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) son útiles en la preparación de una diversidad de dispositivos médicos biodegradables y/o bioreabsorbibles (implantes) o los recubrimientos de los mismos. Las composiciones biodegradables de polímeros exhiben preferiblemente una biodegradación relativamente lenta, por ejemplo, que tienen una vida media *in vivo* de entre tres y seis meses o menos. El polímero preferiblemente tiene una temperatura de transición relativamente baja del punto de fusión/ transición vítrea, por ejemplo de menos de 136º C, y/o es soluble en un disolvente no tóxico, no halogenado para facilitar su procesamiento.

[0056] Más adelante se describen dispositivos y aplicaciones representativos. Los materiales del estado de la técnica en estos dispositivos y aplicaciones pueden ser reemplazados total o parcialmente con las composiciones biocompatibles del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) descritas en la presente solicitud para brindar las especificaciones del dispositivo, tales como velocidad de degradación y propiedades mecánicas.

(1) PLACAS ÓSEAS Y SISTEMAS DE RECUBRIMIENTO ÓSEO

[0057] Sistemas de fijación biodegradables que constan de placas, placas y malla, y malla, en diferentes configuraciones y longitudes, pueden fijarse al hueso para su reconstrucción. Estos usos incluyen la fijación de huesos craneofaciales y mediofaciales del esqueleto afectados por traumatismo, fijación de fracturas cigomáticas, o para reconstrucción. Las placas pueden ser también contorneadas mediante moldeado. Ejemplos de tales dispositivos del estado de la técnica incluyen el Howmedica LEIBINGER™ Resorbable Fixation System (Howmedica, Rutherford, NJ), y en LACTOSORB™ Trauma Plating System (Biomet, Inc., Warsaw, IN). Placas óseas y sistemas de recubrimiento óseo de polihidroxialcanoatos pueden ser fabricados según los métodos y procedimientos descritos en las Patentes U.S. 5,853,746; 5,735,875; 5,725,529; 5,717,030; 5,662,710; 5,626,611; 5,578,046; 5,373,860; 5,092,883; 4,988,358; 4,683,878; y 3,997,138.

(2) MALLA QUIRÚRGICA

[0058] La malla quirúrgica biodegradable puede utilizarse en cirugía general. Por ejemplo, las mallas quirúrgicas se utilizan en el tratamiento de hernias en las que el tejido conectivo se ha desprendido o como material de tirante para sostener el reposicionamiento y apoyo del cuello de la vejiga en el caso de incontinencia urinaria en la mujer. Tales mallas (tapones) pueden también usarse como implantes de tejido blando para refuerzo del tejido blando; por ejemplo, en la reparación de aponeurosis abdominales y, para defectos de la pared abdominal faciales y capsulares, y tendones rotulianos y de Aquiles, y sustitución de los tendones infraespinosos y ligamentos cruzados craneales. Otros usos incluyen la reducción de defectos faciales, como un parche de tráquea u otro órgano, restauración de órganos, tirantes (incluyendo un tirante intestinal), material de injerto dural, vendajes de heridas o quemaduras y como un tampón hemostático. Ejemplos del estado de la técnica en materia de mallas incluye la Matriz Biosintética de Malla Quirúrgica Brennen (Brennan Medical, St. Paul, MN), Parches GORE- TEX™ (Gore, Flagstaff, AZ), y SEPRAMESH™ (Genzyme Corporation, MA). Las mallas quirúrgicas a base de polihidroxialcanoatos pueden fabricarse según los métodos y procedimientos descritos por Bupta, *Medical textile structures: an overview*" Medical Plastics and Biomaterials, pp. 16-30 (Jan./Feb. 1998) y por los métodos descritos por las Patentes U.S. 5 843 084; 5 836 961; 5 817 123; 5 747 390; 5 736 372; 5 679 723; 5 634 931; 5 626 611; 5 593 441; 5 578 046; 5 516 565; 5 397 332; 5 393 594; 5 368 602; 5 252 701; 4 838 884; 4 655 221; 4 633 873; 4 441 496; 4 052 988; 3 875 937; 3 797 499; y 3 739 773.

(3) REGENERACIÓN/REPARACIÓN GUIADA DE TEJIDO

[0059] La regeneración guiada del tejido es un procedimiento periodontal en donde se coloca una membrana sobre las superficies de un hueso y de una raíz de un área quirúrgica expuesta. La membrana actúa como una barrera que aísla el hueso y el ligamento periodontal de la encía, dando a las células óseas y de ligamentos de más lento crecimiento una oportunidad para regenerarse. El objetivo es fortalecer la adhesión del diente a la mandíbula, proporcionando mejores posibilidades de conservar el diente o la dentadura. Ejemplos del estado de la técnica en materia de membranas que se utilizan en el procedimiento incluye GUIDOR™ (Procordia Oratech A.B., Sweden), Gore Resolut XT™ (W.L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ), VICRYL™ Periodontal Mesh (Ethicon, Sommerville, NJ), y ATRISORB™ Bioabsorbable GTR barrier (Atrix Laboratories, Ft. Collins, CO). Las barreras de reparación guiada a base de polihidroxialcanoatos pueden fabricarse según los métodos descritos por las Patentes U.S. 5,853,746; 5,736,152; 5,543,441; 5,508,036; 5,455,041; 5,368,859; 5,077,049; 5,278,201; 5,250,584; 5,077,049; y 4.938,763.

(4) AGENTES DE RELLENO Y DE CARGA

[0060] Los agentes aumentadores de volumen se usan comúnmente en cirugía plástica para rellenar defectos y también en el tratamiento de la incontinencia de adultos, donde se utiliza como material aumentador de volumen del esfínter. Un ejemplo de tal material es el colágeno. Los dispositivos de relleno y de carga a base de polihidroxialcanoato pueden fabricarse según los métodos y procedimientos descritos en las Patentes de los EE.UU Nos. 5,376,375; 5,702,715; 5,824,333; 5,728,752; 5,599,852; 5,785,642; 5,755,658; y 5,728,752.

(5) VÁLVULAS PARA VENAS

[0061] Las úlceras venosas de la pierna se producen en la parte baja de la pierna y son causadas por insuficiencia venosa, o por el mal funcionamiento de las válvulas en las venas de las piernas. Actualmente, no existe tratamiento disponible para reparar las válvulas defectuosas de las venas. En cambio, se tratan sólo las úlceras con un coste promedio estimado de 2.700 $ por paciente y año. (para una estimación de 600.000 pacientes que sufren de úlceras venosas en la pierna). Por lo tanto, sería conveniente ofrecer la sustitución de las válvulas de la vena, las cuales preferiblemente pueden ser implantadas por un medio mínimamente invasivo o por cirugía rutinaria. Las válvulas de la vena pueden derivarse de polímeros de polihidroxialcanoato, en donde estos polímeros son creados en una estructura de válvula. Los polímeros pueden usarse solos, recubiertos, o modificados con otro agente, como un factor biológico. Pueden ser combinados con otros materiales, y/o hacerse porosos. Alternativamente, los polímeros pueden ser creados en soportes que opcionalmente pueden ser opcionalmente sembrados con células antes de la implantación. Los métodos adecuados para preparar las válvulas y soportes de ingeniería de tejidos sembrados son descritos en Breuer et al., Biotechnology and Bioengineering, 50:562-67 (1996); Niklason et al., Science, 284:489-93 (1999); y Principles of Tissue Engineering (Lanza, et al., Eds.) Academic Press, Austin, 1997.

(6) ESTRUCTURA DE SOPORTE DE MÉDULA ÓSEA

[0062] Una serie de diferentes operaciones quirúrgicas emplea trasplantes de médula ósea. En muchos casos, la médula ósea es tomada de la cresta ilíaca y utilizada en otro lugar para ayudar en la reparación de tejidos y órganos, generalmente hueso. Ejemplos incluyen el uso de médula ósea en la reparación de fracturas óseas, como una fractura de la meseta tibial, procedimientos de la columna vertebral, así como en el tratamiento de anormalidades en las regiones maxilofacial y craneofacial que requieren cirugía. En algunos casos, grandes cantidades de médula ósea son necesarias para estos procedimientos, pero la cantidad de médula ósea disponible es limitada, especialmente en pacientes jóvenes y pequeños. Por lo tanto, es conveniente establecer un método que permita a la cantidad de médula

ósea disponible ser utilizada con eficacia sobre la mayor parte de la zona quirúrgica, y/o en otros sitios, sin pérdida de cualquiera de sus propiedades deseables de reparación y regeneración. También puede ser conveniente proporcionar la médula ósea en una forma más útil para su posterior uso quirúrgico.

[0063] La cobertura o colocación eficaz de médula ósea útil puede aumentarse mezclando, cultivando o combinando la médula ósea con un polímero poroso de polihidroxialcanoato, Esta última estructura de soporte de médula ósea podría estar preparada, por ejemplo, por una técnica de lixiviación de sal descrita en Principles of Tissue Engineering (Lanza, et al., Eds.) Academic Press, Austin, 1997. Después de la recolección, la médula ósea es aceptada en la estructura de soporte de polihidroxialcanoato deseada, por ejemplo, aplicando succión o presión, o por otros medios. El soporte de polihidroxialcanoato también puede incluir otros materiales, como agentes bioactivos, otros polímeros o fosfato de calcio y puede ser formado o moldeado para un uso particular. La estructura de soporte conteniendo la médula ósea puede aplicarse a las zonas quirúrgicas deseadas.

(7) REGENERACIÓN DE MENISCO

[0064] Una necesidad insatisfecha en reparación de menisco se relaciona con defectos localizados en la zona no vascular del menisco donde los vasos sanguíneos no están presentes. No se espera que sanen desgarros o defectos en esta zona. El único tratamiento disponible para desgarros no vasculares es una meniscectomía, donde se elimina la parte del menisco que rodea el desgarro. Este procedimiento es insatisfactorio, ya que la meniscectomía interfiere la capacidad del menisco para funcionar correctamente. Por lo tanto, es muy deseable un producto de regeneración del menisco capaz de facilitar la reparación de desgarros no vasculares.

[0065] Ciertos polihidroxialcanoatos tienen propiedades deseables para su uso como plantilla de regeneración del menisco. Estas propiedades incluyen elasticidad, flexibilidad, resistencia a compresión adecuada y tasas controladas de bioabsorción. La plantilla de regeneración también podría incorporar factores de crecimiento y/o células. Dispositivos de polihidroxialcanoato de regeneración del menisco pueden ser fabricados utilizando una variedad de técnicas diferentes de procesamiento, incluyendo el uso de lixiviación de sal, fundición, disolvente, fibra, y técnicas de procesamiento de espuma. Los dispositivos pueden formarse, por ejemplo, como esponjas, espumas, materiales no tejidos, materiales tejidos. Métodos adecuados para la fabricación de plantillas de polihidroxialcanoato de regeneración de menisco son descritos por Widmer & Mikos, "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering" in Frontiers in Tissue Engineering (Patrick, et al., Eds.) Ch. II.5, pp.107-20 (Elsevier Science, New York, 1998).

(8) INJERTOS DE LIGAMENTOS Y TENDONES

[0066] El ligamento anterior cruzado (LAC) es un cordón ancho, grueso, aproximadamente del tamaño del dedo índice de la persona, que es esencial para guiar la tibia en un camino normal a lo largo del extremo del fémur y mantener la estabilidad de la rodilla. Cuando este ligamento está rasgado o roto, la articulación pierde estabilidad y como consecuencia se produce una posterior destrucción del cartílago articular y meniscal, es decir artritis degenerativa. Una lesión grave como consecuencia de un accidente deportivo generalmente requiere reparación o reconstrucción quirúrgica. La reconstrucción más común del LAC implica el uso de injertos de tendones y músculos isquiotibiales rotulianos, con injertos procedentes de cadáveres que representan una tercera opción. (La sutura es a veces una opción, pero el 50% de estos procedimientos tienden a fallar debido a la tensión en la rodilla). El injerto rotuliano suele ser cultivado con un pedazo de hueso de rótula del paciente junto con un pedazo de hueso de donde se inserta el tendón rotuliano en la tibia. Se considera que es un material fuerte de transplante, pero en donde se retira el hueso puede aumentar la sensibilidad de la rótula y la tibia. El injerto de isquiotibiales es tomado de tendones de la parte interior de la rodilla de forma que no interfiera con la rótula y el tendón; Sin embargo, este injerto es más débil que el injerto rotuliano.

[0067] Un dispositivo conocido como un dispositivo de refuerzo de ligamento (DRL) se introdujo para estos procedimientos reconstructivos cuando se observó que los injertos biológicos experimentan una fase de degeneración y pérdida de fuerza antes de incorporarse. El DRL pretende funcionar para proteger el injerto durante esta fase vulnerable y se ha propuesto para compartir cargas en injertos compuestos, aumentando la fuerza del injerto del ligamento tanto como un 50%. Sin embargo, los dispositivos actuales están pensados para inducir respuestas inflamatorias en la rodilla, por lo que se ha limitado su uso rutinario en reconstrucciones sin complicaciones.

[0068] Los polímeros de polihidroxialcanoato pueden utilizarse para fabricar DRL bioabsorbibles y otros dispositivos de injerto de ligamento y de tendón. Las ventajas de estos dispositivos se basan en su mejor respuesta biológica combinada con su capacidad para proporcionar resistencia temprana al autoinjerto. Dispositivos adecuados pueden ser fabricados, por ejemplo, mediante la transformación de los polihidroxialcanoatos en fibras para ser usado solos, o tras una posterior modificación en formas trenzadas o multi-filamentos. Métodos adecuados para la preparación de estos dispositivos con polihidroxialcanoatos son descritos en las Patentes U.S. 4,792,336 a Hlavacek, et al.

(9) SUSTITUTOS DE INJERTO DE HUESO

[0069] Anualmente, unas 500.000 operaciones quirúrgicas requieren el uso de injertos óseos, por ejemplo, en fusiones vertebrales, fracturas por traumatismos y en cirugía periodontal. En un procedimiento típico, el material de injerto óseo es extraído quirúrgicamente de la cadera del paciente y luego insertado en el lugar de injerto donde se desee que se regenere el hueso. El material de injerto contiene una variedad de agentes promotores de hueso que ayudan a estimular la curación y la formación del nuevo hueso. Este procedimiento con frecuencia proporciona buenos resultados, pero de forma no deseable requiere una segunda operación para extraer el autoinjerto. Para evitar el procedimiento de extracción, los cirujanos pueden utilizar otros tipos de sustitutos de injerto óseo incluyendo productos de hueso de cadáver y compuestos que contienen fosfato de calcio y carbonato de calcio. Los materiales de estos últimos generalmente no funcionan bien, y aparecen problemas de transmisión de enfermedades que siempre acompañan al uso de materiales derivados de un cadáver.

[0070] Por estas razones, están en marcha importantes esfuerzos para desarrollar nuevos sustitutos de injerto óseo basados en el uso de materiales osteoconductivos (estructura de soporte ósea) y/o osteoinductores (hueso nuevo por estimulación biológica). Es cada vez más evidente que estos materiales requieren un vehículo portador para obtener un rendimiento óptimo. Los polímeros de polihidroxialcanoato pueden utilizarse como vehículos portadores. Tales dispositivos pueden ser fabricados según procedimientos descritos por Widmer & Mikos, "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering" in Frontiers in Tissue Engineering (Patrick, et al., Eds.) Ch. II.5, pp.107-20 (Elsevier Science, New York, 1998); Damien, et al., J. Appl. Biomater. 2(3): 187-208 (1991); y Gugala, et al., J. Orthop Trauma, 13(3):187-95 (1999).

(10) SUSTITUTOS DE PIEL

[0071] La pérdida de piel debida a quemaduras o úlceras es un problema médico importante. En casos graves, el tratamiento frecuentemente utiliza autoinjertos que son tomados del paciente. Sin embargo, esta fuente de piel es limitada y el procedimiento da resultados adicionales de morbilidad y cicatrización. Una posible solución a estos problemas radica en el desarrollo de sustitutos de piel humana basada en matrices cultivadas con células, o realizadas por ingeniería de tejidos. Las matrices pueden derivarse de polímeros bioabsorbibles como polímeros de polihidroxialcanoato, los cuales pueden proporcionar una amplia gama de propiedades y opciones de fabricación necesarias para producir sustitutos adecuados de piel. Por ejemplo, las ventajas de los polihidroxialcanoatos en estos productos incluyen estabilidad de la matriz de polihidroxialcanoato para cultivo celular, mejor curación de la herida debido a utilización de un material de matriz menos inflamatorio y facilidad de uso, así como flexibilidad y suturación. Los polímeros de polihidroxialcanoato pueden ser fabricados en matrices adecuadas para uso como sustitutos de piel utilizando los procedimientos descritos por Widmer & Mikos, "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering" in Frontiers in Tissue Engineering (Patrick, et al., Eds.) Ch. II.5, pp.107-20 (Elsevier Science, New York, 1998).

(11) SUSTITUTOS DURALES

[0072] Tras operaciones neuroquirúrgicas, han sido comúnmente utilizados injertos de duramadre de cadáveres para reparar defectos durales. Sin embargo, debido al riesgo de transmisión de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob a través de estos injertos, la Organización Mundial de la Salud ha recomendado que ya no se utilicen injertos durales de cadáveres. Aunque puede utilizarse politetrafluoroetileno como material sintético alternativo permanente para la reparación dural, han aparecido preocupaciones respecto a la biocompatibilidad del material, creciendo el interés por el desarrollo de un sustituto dural bioabsorbible. Los polihidroxialcanoatos con resistencia y flexibilidad apropiadas pueden ser procesados, en dispositivos adecuados para uso como sustitutos durales. Estos dispositivos pueden tomar la forma de materiales porosos y pueden derivarse, por ejemplo de matrices porosas de polihidroxialcanoato, y/o fibras de polihidroxialcanoato transformadas en bandas, telas tejidas o no tejidas. Widmer & Mikos, "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering" in Frontiers in Tissue Engineering (Patrick, et al., Eds.) Ch. II.5, pp.107-20 (Elsevier Science, New York, 1998); y Yamada, et al., J. Neurosurg. 86:1012-17 (1997).

(12) IMPLANTES DE CÉLULAS OCULARES

[0073] Dos monocapas de células, conocidas como epitelio pigmentario retiniano y endotelio corneal son esenciales para la visión normal. En la degeneración macular relacionada con la edad, se cree que se altera la función del epitelio pigmentario retiniano lo que conduce a pérdida visual. La sustitución de este epitelio alterado con un epitelio pigmentario retiniano sano puede proporcionar potencialmente un tratamiento para esta afección debilitante. Se ha intentado el trasplante de suspensiones celulares de donantes pero es problemático, y se ha intentado el trasplante de suspensiones celulares de donantes pero es problemático, y se han dirigido varios intentos a utilizar polímeros bioabsorbibles sintéticos y polímeros de proteína como ingeniería de tejidos de estructuras de soporte para suministrar epitelio pigmentario retiniano y endotelio corneal en el ojo. Los polihidroxialcanoatos pueden utilizarse como estructuras de soporte para proveer estas células y las monocapas derivadas de ellas, en el ojo. Pueden ser procesadas en estructuras de soporte de dimensiones adecuadas (específicamente constructos muy delgados pero todavía fuertes), y no producen

subproductos ácidos, como algunos de los polímeros sintéticos bioabsorbibles comercialmente disponibles, que pueden ser perjudiciales para la función y viabilidad celular. Además, los materiales de polihidroxialcanoato pueden ser fabricados en dispositivos de estructuras de soporte apropiadas con propiedades mecánicas y de manipulación deseables. Se describen métodos adecuados para preparar dispositivos de implante de células oculares de polihidroxialcanoato en Hadlock et al., Tissue Engineering, 5:187-96 (1999), y métodos adicionales para producir otras estructuras de soporte de ingeniería de tejidos adecuadas se describen en Widmer & Mikos, "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering" en Frontiers in Tissue Engineering (Patrick, et al., Eds.) Ch. II.5, pp.107-20 (Elsevier Science, New York, 1998); y, Yamada, et al., J. Neurosurg. 86:1012-17 (1997).

(13) JAULAS DE FUSIÓN ESPINAL

[0074] Las jaulas de fusión espinal son utilizadas para tratar diversas formas de la enfermedad degenerativa del disco, una condición en la que los discos vertebrales, situados entre cada vértebra, ya no son capaces de amortiguar y proteger las vértebras durante el movimiento. Esto puede ocurrir en dolores de espalda graves, y ocasionalmente paralizantes, ya que las vértebras rozan con nervios espinales adyacentes. La afección deriva del desgaste de los cartílagos amortiguadores de choques que separan las vértebras de la columna vertebral, y puede ser debida al envejecimiento o a lesiones. Los discos degenerados se deshidratan perdiendo altura y por tanto acercando unas vértebras a otras.

[0075] La enfermedad degenerativa del disco puede ser tratada quirúrgicamente después de que otros tratamientos no ofrezcan alivio. Procedimientos quirúrgicos conocidos como nucleotomía o laminectomía se emplean a veces para retirar el tejido que está causando dolor. La cirugía final es la fusión espinal, en donde el área de las vértebras afectada se deshabilita o inmoviliza eliminando el movimiento que es responsable de causar el dolor. El procedimiento tradicional de fusión espinal solía involucrar el uso de material de injerto óseo, con o sin tornillos de pedículo y placas, para fusionar vértebras adyacentes. Sin embargo, este procedimiento es traumático, causa un daño muscular importante, una significativa pérdida de sangre y supone un periodo de recuperación largo y a veces doloroso. Cada vez más cirujanos están utilizando un procedimiento relativamente nuevo con jaulas de fusión espinal para fusionar dos o más vértebras en una masa ósea estable. En este procedimiento, una jaula que se compone de un cilindro hueco es implantada en el espacio del disco, después de ser retirado el disco defectuoso, y rellenada de material de injerto óseo. La fusión se produce a medida que crece el hueso nuevo en las jaulas de fusión a través de los orificios del cilindro. Las jaulas también sirven para restablecer la altura del espacio del disco mientras cicatriza la columna vertebral. Normalmente, un cirujano puede emplear dos jaulas una al lado de otra en una intervención, y lo que es más importante, la intervención puede realizarse a través de pequeñas incisiones hechas bien desde el frente o la espalda del paciente. La intervención tiene grandes beneficios, permitiendo al cirujano una forma de evitar cortar importantes músculos de la espalda y tener que reposicionar la delicada médula espinal. Durante la intervención los tiempos de recuperación son más rápidos, se obtienen mejores fusiones y resultados, y se produce menos pérdida de sangre.

[0076] Los polihidroxialcanoatos pueden ser fabricados en jaulas de fusión espinal o partes de jaulas usando técnicas de procesamiento convencionales tales como fusión, disolvente y procesamiento de fibra. Las ventajas de utilizar polihidroxialcanoatos en esta aplicación serían su capacidad para servir como constructos de transición proporcionando la estabilidad inicial requerida antes de la formación de una fusión estable, pero bioabsorbindose cuando ya no son necesarios-eliminando la presencia y los peligros potenciales de un objeto extraño en el cuerpo. La reabsorción del polihidroxialcanoato también aseguraría que todo el soporte del peso es transferido a la columna y al lugar de fusión, ayudando a evitar cualquier reabsorción subsiguiente de hueso, pérdida de resistencia, inestabilidad o movimiento del dispositivo de fusión. Esto puede lograrse ya sea haciendo una jaula espinal completamente de polímeros de polihidroxialcanoato, mezclas o compuestos de otros materiales, o incorporando a tal dispositivo un componente de polihidroxialcanoato que transfiere fuerza y deformación fuera de la jaula de fusión y a la columna vertebral a medida que el componente se bioabsorbe. El componente puede ser, por ejemplo, una varilla, arandela, tornillo, pasador, puntal, placa, grapa o una combinación de tales elementos. También pueden fabricarse dispositivos de polihidroxialcanoatos de los que se esperaría que proporcionaran mejores resultados, especialmente por promover la formación de nuevo crecimiento de hueso. Estos dispositivos pueden incorporar sustancias promotoras de fusión en el polímero lo que no se consigue fácilmente con los dispositivos y jaulas de fusión metálicas actuales. Los polímeros también pueden configurarse en formas porosas y no porosas. Los diseños y métodos que pueden utilizarse para preparar jaulas espinales de polihidroxialcanoatos son descritos en las Patentes U.S. 5,895,426; 4,936,848; 4,961,740; 5,910,315; 5,645,598; 4,743,236; 5,665,122; y 5,910,315.

(14) HEMOSTATOS

[0077] Los polihidroxialcanoatos pueden utilizarse para fabricar dispositivos de hemostato. Hay ciertas propiedades que los materiales de apósitos para heridas idealmente deben poseer, que incluyen la capacidad para quitar el exceso de exudado de la herida, proteger la herida de lesiones mecánicas, y reducir el riesgo de infección. El apósito de la herida debe estar libre de sustancias tóxicas, y no debe adherirse a la herida ya que perturbaría el proceso de curación. Los apósitos comúnmente utilizados incluyen apósitos celulósicos como malla de algodón, gasa de algodón, almohadillas de

algodón, almohadillas de lana, almohadillas de algodón/rayón con la cara de materiales no tejidos. Otros apósitos contienen poliuretanos, polioles de poliuretano, y o polisacáridos naturales o polímeros de proteínas como el colágeno. Estos apósitos pueden ser impregnados, recubiertos o de otra manera contener agentes como alginatos que elevan la capacidad de absorción del apósito y pueden estimular la coagulación por sangrado de heridas, y u otros agentes como sales de plata, antisépticos, analgésicos, y o conservantes. Los apósitos pueden estar preparados, por ejemplo, como revestimientos de fibras, esponjas, espumas, redes, sustratos fibrosos. Los apósitos pueden estar preparados para tener un rango de poros de diferentes tamaños y densidades. Los apósitos pueden utilizarse en el tratamiento de una variedad de tipos de heridas, incluyendo úlceras por presión, úlceras de decúbito, úlceras de estasis venosa, heridas infectadas, heridas quirúrgicas abiertas y profundas e incisiones, sellado de incisiones percutáneas o pinchazos y quemaduras.

[0078] Las ventajas del uso de los polímeros de polihidroxialcanoato en aplicaciones de hemostato incluyen la capacidad para proporcionar un microclima, y o una estructura de soporte del tejido, para la regeneración del tejido. Es posible producir un hemostato que se bioabsorba in vivo, porque los polihidroxialcanoatos son bioabsorbibles. Alternativamente, se pueden preparar apósitos no absorbibles, particularmente para aplicación externa. También se puede preparar un hemostato de PHA para incluir otros agentes como los alginatos, sales de plata, antisépticos, analgésicos y conservantes. La hidrofobicidad, hidrofilidad, capacidad de absorción, propiedades de superficie y propiedades mecánicas del hemostato pueden modificarse, por ejemplo, variando la naturaleza de los ácidos de hidroxi-monómero incorporados en el polímero. También es posible incorporar polioles en los polímeros de polihidroxialcanoato para cambiar estas propiedades. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la PCT WO 97/07153 y patente U.S. 5,994,478. Los polihidroxialcanoatos también pueden utilizarse como componentes de un dispositivo de hemostato, por ejemplo, con un material de poliuretano o colágeno. Ejemplos de los métodos adecuados para la preparación de un hemostato son descritos en las patentes U.S. 3,978,855; 4,664,662; 5,021,059; 5,676,689; 5,861,004; y 5,914,125.

(15) VÁLVULAS CARDÍACAS E INJERTOS VASCULARES

[0079] El flujo unidireccional de sangre a través de todo el sistema circulatorio es controlado por las válvulas del corazón. Los seres humanos tienen un total de cuatro válvulas del corazón: la válvula tricúspide, la válvula pulmonar, la válvula mitral y la válvula aórtica. Con la excepción de la válvula mitral que tiene sólo dos cúspides (o valvas), cada válvula tiene tres cúspides que se ven obligadas a abrir y cerrar por diferencias de presión dentro del corazón. La cardiopatía valvular, que se caracteriza por una válvula cardiaca defectuosa, menoscaba la capacidad del corazón para funcionar correctamente. Esto puede ser causado por procesos degenerativos, defectos congénitos, endocarditis bacteriana o fiebre reumática, y resulta de las oscilaciones de la presión y la circulación arterial del paciente, llevando a soplos cardíacos, insuficiencia cardíaca o infarto de miocardio (insuficiente flujo sanguíneo al músculo cardíaco).

[0080] Actualmente, hay un número de diferentes metodologías empleadas para tratar la enfermedad de las válvulas cardíacas, incluyendo tratamientos farmacológicos, reparación de la válvula y remplazo de la válvula. En situaciones de no vida, los fármacos utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva generalmente se emplea en primer lugar para hacer que el corazón trabaje más y bombee sangre por todo el cuerpo. Sin embargo, una vez que la enfermedad valvular progresa hasta el punto en que es afectada significativamente la capacidad del corazón para bombear sangre, generalmente se recomienda la cirugía para reparar o remplazar la válvula enferma. Muchos cirujanos prefieren reparar una válvula del corazón cuando sea posible; Sin embargo, en muchos casos esto no es posible o los beneficios son de corta duración.

[0081] La cirugía de remplazo valvular es un procedimiento traumático que involucra la colocación de un paciente en bypass cardiopulmonar mientras la válvula enferma se reemplaza con una prótesis de válvula artificial. Actualmente hay dos tipos principales de prótesis de válvula artificial: válvulas cardíacas mecánicas y válvulas de tejido cardíaco. Cada tipo tiene sus ventajas y sus inconvenientes. Las válvulas mecánicas, por ejemplo, se caracterizan por su durabilidad y fiabilidad. Sin embargo, un gran inconveniente es la necesidad de que el destinatario para poder colocársela tenga que seguir un tratamiento permanente con anticoagulantes que consiste en un control continuo de los niveles de anticoagulantes. Las actuales válvulas de tejido, derivadas de fuentes heterólogas (vacas y cerdos), por otro lado, no requieren tratamiento con anticoagulantes, son silenciosas, proporcionan patrones de flujo fisiológico, y generalmente tienen formas de fallo de desarrollo lento en lugar de fallo catastrófico. El principal problema asociado con estas válvulas es su poca durabilidad. La mayoría de las actuales válvulas de tejido generalmente duran entre cinco y quince años antes de que necesiten ser reemplazadas debido a un deterioro gradual del tejido (no vivo). La mayoría de expertos coinciden en que si se pudiese resolver el problema de la durabilidad, las válvulas de tejido serían la opción más clara para el tratamiento de una enfermedad cardíaca, ya que ningún material sintético ha demostrado tener las propiedades necesarias para soportar flexiones bidireccionales unos 40 millones de veces al año sin producir trombosis. Además, las válvulas mecánicas no pueden utilizarse para reparar las valvas de la válvula. Una posible solución que podría reconducir las deficiencias de los actuales reemplazos de válvula es desarrollar una válvula cardíaca de ingeniería de tejido. La válvula inicialmente constaría de un material de estructura de soporte de la válvula del corazón que podría ser cultivado con las células adecuadas, implantado y servir como un constructo de transición que se absorbe dejando una válvula de tejido cardíaco vivo completamente nuevo in vivo. En el enfoque, la válvula cardíaca de ingeniería de tejidos

puede ser sembrada e inmediatamente implantada, o sembrada y cultivada en un bioreactor antes de su implantación. En última instancia la formación del tejido y del polímero de bioabsorción puede completarse antes de la implantación o preferiblemente continuar después de la implantación. Las ventajas del desarrollo de las válvulas cardíacas de ingeniería de tejidos serían muchas más. En primer lugar, el producto final sería una válvula cardíaca durable de por vida capaz de soportar las exigencias del cuerpo. Puede ser derivada de tejido no inmunogénico, obviando la necesidad de tratamiento con anticoagulantes, además, el tejido puede derivarse de una fuente autóloga, eliminando virtualmente el riesgo de transmisión de enfermedad. En el caso de los bebés y niños donde el crecimiento es una preocupación, el uso de una válvula de tejido vivo eliminaría la necesidad de reemplazar la válvula a medida que el paciente creciese. Finalmente, en casos donde es preferible la reparación más que la sustitución, la solución de ingeniería de tejidos potencialmente proporcionaría una fuente de tejido vivo adecuada.

[0082] Las válvulas cardiacas hechas por ingeniería de tejidos y los componentes de las válvulas cardiacas, como las valvas o los soportes, derivados de polímeros de polihidroxialcanoato, que ofrecen propiedades mecánicas y perfiles de bioabsorción necesarios, pueden ser producidos por construcción de estructura de soporte porosa de la válvula cardiaca de estos polímeros solos o con otros materiales. Preferiblemente, estas estructuras de soporte derivan de espumas y o de polímeros de polihidroxialcanoato fibrosos. Las estructuras de soporte, si se desea, pueden recubrirse con otros agentes tales como proteínas para facilitar la fijación y proliferación celular. Las estructuras de soporte son a continuación, entonces, cultivadas con las células adecuadas. Las células adecuadas incluyen células cardiovasculares y vasculares, células de músculo liso, células endoteliales, así como células madre. Idealmente, las células son autólogas pero otras opciones no inmunogénicas también son aceptables. El constructo cultivado puede luego incubarse en un biorreactor antes de la implantación. Preferentemente, el biorreactor somete la válvula del corazón a los cambios de flujo y presión, esencialmente imitando las condiciones in vivo. Un biorreactor pulsátil es preferido. En cualquier momento después del cultivo, el constructo cultivado puede implantarse in vivo. Preferiblemente, esto es una a dos semanas después del cultivo. Se describen métodos ilustrativos del enfoque por Breuer, et al. Biotechnology & Bioengineering, 50:562-67 (1996); Shinoka, et al., Ann. Thorac. Surg. 60:S513-6, (1995); Zund et al., Euro. J. Cardio-thoracic Surgery 11:493-97 (1997).

(16) INJERTOS VASCULARES

[0083] Los injertos vasculares actualmente se insertan para reparar o remplazar los vasos sanguíneos en peligro, en los sistemas arteriales o venosos, que han sido objeto de daños o enfermedades como la aterosclerosis, enfermedad aneurismática y lesiones traumáticas. Actualmente, existen tres opciones de injertos, es decir, un auto-injerto, un injerto sintético o un injerto criopreservado cuando un auto-injerto no está disponible. La elección entre un auto-injerto y un injerto sintético depende de varios factores.

[0084] En general, los injertos sintéticos están restringidos a aplicaciones que implican la sustitución de los vasos de tamaño grande y mediano. Normalmente, estos vasos sintéticos permanecen abiertos al flujo sanguíneo alrededor de 5 años antes de que empiecen a fallar. Injertos sintéticos de menor diámetro, sin embargo, donde los caudales de sangre son más bajos, generalmente fallan rápidamente, y por ello no son utilizados en procedimientos como el injerto bypass de la arteria coronaria (CABG), el más común de los procedimientos quirúrgicos cardíacos, que requiere vasos de menor diámetro. Cuando no se puede utilizar injertos vasculares sintéticos (como en CABG), el procedimiento preferido supone el uso de un autoinjerto, lo que supone un segundo procedimiento quirúrgico traumático para extraer una adecuada arteria o vena del paciente. En algunos casos, los vasos extraídos pueden ser adecuados para su uso, y en otros casos, puede haber una escasez de autoinjertos extraíbles especialmente si el paciente previamente ya ha sufrido la misma operación. [Se ha estimado que el 40% de los pacientes CABG que reciben bypass de la vena safena requerirán posteriormente una intervención dentro de los diez años siguientes a la operación original (Vector Securities International, Thoratec Laboratories Company Report, November 1997)]. Por estas razones, hay una fuerte necesidad de desarrollar un injerto vascular, especialmente para intervenciones de CABG y para intervenciones de injerto por debajo de la rodilla, que permanecerán abiertos al flujo sanguíneo, así como injertos de mayor diámetro para mejorar las tasas de permeabilidad. Los injertos vasculares de ingeniería de tejidos, compuestos por estructuras de soporte vascular de células cultivadas, que pueden derivarse de polímeros de polihidroxialcanoato, ofrecen tal solución a estos problemas. Estos polímeros ofrecen una combinación adecuada, ya sean solos o con otros materiales, de propiedades mecánicas y de tasas de bioabsorción. Los injertos vasculares de polihidroxialcanoato derivados de ingeniería de tejidos pueden ser producidos formando una estructura tubular de diámetro adecuado (normalmente de diámetro interno de 3-10 mm) y cultivando este constructo con células adecuadas. Idealmente, el polihidroxialcanoato es poroso por naturaleza, y la construcción puede ser laminada. (En una variación de este enfoque, una construcción no cilíndrica puede ser cultivada y posteriormente formada en un constructo tubular). El constructo tubular cultivada puede ser implantado directamente, o preferentemente incubado en un bioreactor antes de su implantación.Preferentemente, el biorreactor es capaz de someter al constructo a condiciones similares a las experimentadas in vivo, concretamente el flujo pulsátil. Las células son idealmente autólogas, y/o no inmunogénicas. Las células adecuadas consisten en células cardiovasculares, células vasculares, células endoteliales, células musculares lisas, así como células madre. Métodos ilustrativos del enfoque son descritos por Shinoka, J. Thoracic & Cardiovascular Surgery, 115:536-546, Niklason, Science, 284:489-493 (1999).

IV. Métodos de fabricación de los dispositivos (implantes)

[0085] Los métodos de fabricación de los dispositivos médicos incluyen el vaciado con disolventes, procesamiento en fusión, extrusión, inyección y moldeado por compresión, afirmación de fibras y secado mediante rociado. Las partículas se preparan preferiblemente de manera directa a partir de un proceso basado en la fermentación, o mediante una técnica de evaporación de disolventes, técnica de emulsión doble o mediante microfluidización, utilizando métodos disponibles en la técnica. (Koosha, Ph.D. Dissertation, 1989, Univ. Nottingham, UK., Diss. Abstr. Int. B 51:1206 (1990); Bruhn & Müeller, Proceed Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 18:668-69 (1991); Conti, et al., J. Microencapsulation, 9: 153-66 (1992); Ogawa, et al., Chem. Pharm. Bull., 36:1095-103 (1988); Mathiowitz & Langer, "Polyanhydride microspheres as drug delivery systems," in Microcapsules Nanopart. Med. Pharm. (Donbrow, Ed.) ch. 5, pp. 99-123 (CRC, Boca Raton, Florida 1992)).

[0086] Los PHAs pueden fabricarse en forma de dispositivos apropiados para curación de heridas. Por ejemplo, pueden prepararse materiales fibrosos no tejidos con este objeto a partir de tales polímeros produciendo primero fibras de polímeros, presionando los polímeros a través de un orificio perforado, utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Las fibras pueden fabricarse entonces en forma de una membrana porosa (tela) dispersándolas sobre un soporte sólido y sujetándolas a moldeado por compresión. El espesor del dispositivo puede ser menor de 500 µm. También puede fabricarse un dispositivo de curación de heridas 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 ser idealmente lo suficientemente pequeño como para cerrar el paso a las células y a otras materias de tejidos. Los dispositivos de curación de heridas pueden posicionarse *in vivo* para separar tejidos y estimular la regeneración de los mismos.

[0087] El homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) puede utilizarse para encapsular células con el fin de preparar un implante según la presente invención. Utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, las células se pre-revisten primeramente (véase Maysinger, Reviews in the Neurosciences, 6:15-33 (1995)). Utilizando un procedimiento de encapsulado de partículas tal como la técnica de emulsión doble, las células pueden entonces ser encapsuladas por los PHAs (Ogawa, et al., Chem. Pharm. Bull., 36:1095-103 (1988). Las células encapsuladas pueden entonces ser implantadas *in vivo*.

[0088] El homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) pueden utilizarse para recubrir otros dispositivos seleccionados de un stent, catéter o sensor. Tales recubrimientos pueden mejorar sus propiedades con vistas a la aplicación médica, por ejemplo, mejorar su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y adaptando sus perfiles de degradación y de liberación sostenida. El homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) puede estar recubierto en este dispositivos por ejemplo utilizando los procedimientos de fabricación, con una solución basada en disolventes o mediante técnicas de fusión, o utilizando látex de PHA. El espesor del recubrimiento puede ajustarse a las necesidades de la aplicación específica cambiando el peso de la capa de recubrimiento o la concentración aplicada, y/o mediante sobre-recubrimiento.

[0089] Pueden utilizarse métodos para fabricar los dispositivos que aumentan la porosidad o el área de la superficie de exposición para alterar la capacidad de degradación. Por ejemplo, como demuestran los ejemplos, el homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) poroso puede fabricarse utilizando métodos que crean poros, huecos o espacios intersticiales, tales como una técnica de emulsión o atomización o que incorporan partículas capaces de liofilización o lixiviación dentro del polímero.

[0090] Métodos adicionales para la fabricación de dispositivos a base de polihidroxialcanoatos se describen en Biomaterials Science (Ratner, et al., Eds.) Academic Press, San Diego, California 1996; Biomedical Applications of Polymeric Materials (Tsuruta, et al., Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993; Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds (Atala, et al., Eds.) BirhaUSer, Boston, 1997; Wound Closure Biomaterials and Devices, (Chu, Jet al., Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 1997; Polyurethanes in Biomedical Applications (Lamba, et al., Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 1998; Handbook of Biodegradable Polymers (Domb, et al., Eds.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1997.

Utilización de los dispositivos

[0091] Los implantes de polihidroxialcanoatos (incluyendo los recubrimientos) pueden ser provistos por cualquier medio incluyendo cirugía abierta o un método mínimamente invasivo acceso tal como ingestión, inyección o inserción. Es más, en dependencia de la aplicación, la composición puede modificarse aún más para incluir otros materiales, tales como agentes bioactivos como factores de crecimiento, medicamentos, agentes antimicrobianos, factores de angiogénesis o materiales que modifican las propiedades del dispositivo tales como otros polímeros, plastificadores, nucleadores y rellenos.

[0092] Cuando los PHAs depirogenados se implantan en el cuerpo, estos materiales muestran muy poca, si alguna, reacción inflamatoria o cualquier otra reacción adversa en el tejido. No hay respuesta inflamatoria significativa o formación de cicatriz en el tejido. El reclutamiento de células inflamatorias es mínimo. El examen histológico de los

dispositivos ex-plantados demuestra que los materiales son esencialmente inertes. En correspondencia, los dispositivos construidos de PHAs pueden implantarse con un efecto adverso mínimo en el tejido circundante. La liberación de los productos de la degradación de ácidos hidroxi a partir de los materiales implantados es típicamente muy lenta y se tolera bien por el cuerpo. Por tanto, se espera que los PHAs mantengan sus propiedades materiales durante meses y que eventualmente se degraden a materiales no tóxicos.

[0093] Los dispositivos preparados a partir de homopolímero de P(4HB) pueden utilizarse en una amplia gama de aplicaciones médicas diferentes. Ejemplos de tales aplicaciones incluyen liberación controlada, encapsulación celular, recubrimiento biocompatible para stents, catéteres y para sensores y regeneración guiada del tejido.

[0094] Los PHAs empleados en los homopolímeros poli(4-HB) de la presente invención pueden encapsularse, ser mezclados con o acoplarse iónicamente o de forma covalente a cualquier variedad de agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. Pueden incorporarse o encapsularse una gran diversidad de materiales biológicamente activos, para entrega en un sitio mediante el polihidroxialcanoato o para impartir propiedades al polímero, tales como bioadherencia, fijación celular, mejora del crecimiento celular, inhibición del crecimiento bacteriano y prevención de formación de coágulos.

[0095] Ejemplos de agentes terapéuticos y profilácticos apropiados incluyen compuestos sintéticos inorgánicos y orgánicos, proteínas y péptidos, polisacáridos y otros azúcares, lípidos y secuencias de ácidos nucleicos de ADN y ARN que tengan actividades terapéuticas, profilácticas o diagnósticas. Las secuencias de ácido nucleico incluyen genes, moléculas antisentido que enlazan a los ADN complementarios para inhibir la trascripción y ribozimas. Pueden ser encapsulados compuestos con un amplio intervalo de peso molecular, por ejemplo, entre 100 y 500.000 gramos o más por mol. Los ejemplos de materiales apropiados incluyen proteínas tales como anticuerpos, ligandos de receptores y enzimas, péptidos tales como péptidos de adherencia, sacáridos y polisacáridos, medicamentos sintéticos orgánicos e inorgánicos y ácidos nucleicos. Los ejemplos de materiales que pueden ser encapsulados incluyen enzimas, factores de formación de coágulos, inhibidores o agentes disolventes de coágulos tales como la estreptocinasa y el activador plasminógeno de tejido; antígenos para inmunización; hormonas y factores de crecimiento; polisacáridos tales como la heparina; oligonucleótidos tales como los oligonucleótidos antisentido y ribozimas y vectores retrovirales para uso en terapia de genes. El polímero puede utilizarse también para encapsular células y tejidos. Los agentes diagnóstico representativos son agentes detectables por rayos X, fluorescencia, resonancia magnética, radioactividad, ultrasonido, tomografía computarizada (CT) y tomografía por emisión de positrones (PET). Los agentes de diagnóstico mediante ultrasonido son típicamente un gas como el aire, el oxígeno o perfluorocarbonos.

[0096] En el caso de liberación sostenida, puede incorporarse una amplia gama de diferentes compuestos bioactivos a un dispositivo de liberación sostenida. Estos incluyen macromoléculas hidrófobas, hidrófilas y de alto peso molecular tales como las proteínas. El compuesto bioactivo puede incorporarse al P4HB en un porcentaje de carga de entre 0,1% y 70% en peso, más preferiblemente entre 5% y 50% en peso. Las composiciones de poli(4-HB) pueden ser empleadas en casi todas las formas físicas, tales como polvos, películas, elementos moldeados, partículas, esferas, látex y materiales cristalinos o amorfos. Pueden combinarse con materiales adicionales no de PHA por ejemplo, otros polímeros.

[0097] Antes de la implantación, un artículo polimérico bioreabsorbible debe ser esterilizado para evitar enfermedad e infección del receptor. La esterilización se realiza antes de la siembra de un dispositivo polimérico con células. La esterilización térmica de artículos que contienen PHA no es práctica ya que el tratamiento térmico puede deformar el artículo, especialmente si el PHA tiene una temperatura de fusión por debajo de la requerida para el tratamiento de esterilización. Este problema se resuelve utilizando gas de óxido de etileno frío como agente esterilizador. La exposición de un artículo que contiene PHA a vapores de óxido de etileno antes de la implantación esteriliza el artículo haciéndolo apropiado para su implantación. Durante la esterilización con gas de óxido de etileno frío o radiación gamma, el artículo que contiene PHA mantiene su configuración. Este tipo de tratamiento es apropiado para la esterilización de artículos moldeados o preconformados en los que la configuración del artículo juega un papel importante en un funcionamiento apropiado de los mismos.

[0098] Los dispositivos en la presente solicitud descritos pueden administrarse de manera sistémica o localmente. Los métodos de administración sistémica son mediante inyección, inhalación, administración oral e implantación.

[0099] Los implantes y métodos descritos en la presente solicitud se entenderán mejor con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Producción de P4HB en *E. coli* Recombinante

[0100] La cepa MBX1177 de *E. coli*, un derivado de la cepa DH5α seleccionada por la capacidad de crecimiento con ácido 4-hidroxibutírico (4HB) como la única fuente de carbono, se transformó con pFS30, un plásmido contentivo de los genes que codifican la sintasa PHA de la Ralstonia eutropha, 4-hidroxibutirilo-CoA transferasa de Clostridium kluyveri, y β-lactamasa que le confieren resistencia a la ampicilina. La sintasa y transferasa están bajo el control del promotor trc,

que es inducible mediante isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG) en pF30. Estas células se cultivaron primeramente en 100ml LB (Luria Broth, Difco, Detroit, Mich; 25 g/L) más 100 µg/ml de ampicilina durante la noche en un frasco Erlenmeyer de 250 ml a 37ºC removiendo a 200 r.p.m. Todo este cultivo se utilizó como un inóculo para la fermentación llevada a cabo en un recipiente de 7L. La primera etapa de la fermentación consistió en crecimiento de la biomasa en 5L de ampicilina LB a 37ºC con remoción a 800 r.p.m y aireación a 1 volumen volumétrico de aire/min (vvm). Después de 17 horas el volumen se ajustó a 6L añadiendo un litro de medio, tal que el volumen total contuviera, por litro: 2,5 g de polvo LB, 5 g 4HB como sal de sodio, 2 g de glucosa, 50 mmol de fosfato de potasio (pH 7), 7 g de ácido fosfórico, 100 µg de ampicilina y 0,1 mol de IPTG. En este momento, la temperatura se ajustó a 33ºC, y la velocidad de remoción se redujo a 400 r.p.m. Las adiciones periódicas de glucosa y sodio 4HB se hicieron cuando el pH estaba significativamente por debajo o sobre 7, respectivamente, debido a que la adición de glucosa provocaba que el pH disminuyera lentamente y la adición de 4HB provocaba que el pH aumentara lentamente. El pH no se controló automáticamente. La fermentación procedió de esta forma durante otras 70h, en cuyo momento se había añadido un total de 34 g/L de glucosa y 15 g/L de 4HB. Se permitió el asiento de las células a 4ºC durante dos días, después de lo cual se expulsó mediante bombeo la fase líquida y la mezcla pastosa de células se fluidizó en un Microfluidizador EH M110 de Microfluidics Corporation (Newton, Mass.) a 18.000psi. El material resultante se liofilizó y extrajo en tetrahidrofurano (THF, 3% p/v P4HB) con calentamiento (60ºC) y remoción mecánica. El extracto THF resultante se filtró a presión a través de microfibras de vidrio (2,3 µm) y filtros de profundidad de Teflón (2 µm). El polímero se precipitó dentro de un volumen equivalente de agua y se liofilizó. El polímero se redisolvió en THF (3% p/v P4HB) con calentamiento (60º C) y la solución se filtró a través de micro fibra de vidrio (2,3 µm) y filtros de profundidad de Teflón (2 µm) y se precipitó en agua /THF (1:1). El precipitado se lavó con agua/THF (1:1) y se liofilizó para aportar una espuma de color blanco (20g). Este material se identificó como poli(4-hidroxibutirato y se vio que no era citotóxico mediante un ensayo de difusión agar (ISO 10993, Toxicon Corp, Bedford, MA). El análisis elemental fue C 55,63%, H 7,41%, O 37,28%, N 41 ppm. El análisis GC muestra lípidos muy bajos en el polímero purificado. El análisis NMR muestra los picos esperados y no lípidos.

Ejemplo de Referencia 2: Producción de Poli((4HB-co-2HB) en *E. coli* recombinante

[0101] Cepas de MBX1177/pFS30 y de MBX184 (CGSC6966)/pFS30 se precultivaron en 300 ml de ampicilina LB en un frasco Erlenmeyer de un litro a 30ºC durante la noche con remoción a 200rpm. Se centrifugaron dos alícuotas de 100 ml de cada precultivo (2 000 x g, 10 minutos) y las células obtenidas de cada una de estas alícuotas se resuspendieron en 100 ml en un medio que contenía, por litro: 6,25 g de polvo LB, 2g de glucosa, 50 mmol de fosfato de potasio (pH 7), 100 µg de ampicilina y 100 µmol IPTG. El medio contenía también ácido 2-hidroxibutírico (2HB) y 4HB; en un recipiente las concentraciones eran 8 g/L 2HB y 2 g/L 4HB y en el otro las concentraciones de los dos ácidos eran cada una 5 g/L. Ambos ácidos se añadieron a los recipientes como sales de sodio, las masas dadas para los ácidos no incluían la masa de sodio. Estos cuatro recipientes (dos para cada cepa) se incubaron a 30ºC durante otras 48 horas con remoción a 200rpm. Las células se retiraron del medio por centrifugado (2000 x g, 10 minutos) se lavaron una vez con agua, se centrifugaron de nuevo y liofilizaron. Se llevó a cabo el análisis por cromatografía gaseosa sobre la masa celular liofilizada para analizar el contenido y composición del polímero. Los contenidos celulares y composiciones de los PHAs producidos se muestran en la Tabla 2. Cuando la relación de 2HB a 4HB era de 4:1, el contenido de 2HB del polímero era superior al 19% para ambas cepas mediante análisis GC, mientras que a una relación de 1:1 de 2HB a 4HB, el contenido del polímero era de alrededor del 1%. El 4HB se incorporaba con mayor rapidez al polímero que el 2HB; por tanto, cuando el 4HB estaba presente a 2 g/L el contenido total del polímero de las células era menor que cuando estaba presente a 5 g/L. Los polímeros producidos por el MBX184/pFS30 se extrajeron de las células y se analizaron. La masa celular liofilizada se incubó en 5 ml de cloroformo a 37ºC durante 2 horas. Se retiró el desecho de las células por centrifugado (2000 x g, 5 minutos) y la solución del polímero resultante se añadió por goteo a 50 ml de etanol para precipitarla. El polímero precipitado se centrifugó a partir del etanol tal como se describió anteriormente. En el caso de la relación 4:1 2HB:4HB, el polímero fue difícil de centrifugar del etanol; formó una bruma cuando se añadió al etanol, pero no se pudo recuperar totalmente por centrifugado, probablemente porque el peso molecular de este polímero era algo bajo. El polímero aislado del recipiente 1:1 2HB:4HB se precipitó fácilmente a partir del etanol y se recuperó 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 realizaba en células enteras. Es posible que los residuos de 2HB en la cadena del polímero se hidrolicen durante la extracción, disminuyendo por tanto el contenido aparente de 2HB en las muestras extraídas. El hecho de que el peso molecular del polímero extraído sea aparentemente menor cuando el contenido de 2HB es mayor es consistente con esta explicación.

[0102] Se llevó a cabo un segundo experimento con MBX184/pFS30. Estas células se precultivaron en 400 ml de ampicilina B en un frasco Erlenmeyer de un litro a 30ºC durante la noche con remoción a 200rpm. Se hizo una adición de 20 ml de medio a cada frasco de manera que el volumen total contuviera, por litro: 2,5 adicionales de polvo LB, 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 IPTG y 2, 4, 6 u 8 g de 2HB como sal de sodio. Los frascos se incubaron durante 48 horas adicionales a 30ºC y 200 r.p.m. Las células se retiraron del medio por centrifugado (2000 x g, 10 minutos), lavadas una vez con agua, centrifugadas de nuevo y liofilizadas. La masa seca de células se sometió al análisis GC tal como se describió anteriormente. La Tabla 3 muestra el contenido celular y la composición de los polímeros así obtenidos. A relaciones bajas 2HB:4HB se incorporó poco o ningún 2HB al polímero, sin embargo, cuando esta relación era de 3:1 o 4:1, la incorporación de 2HB al polímero

era significativa. El contenido total de polímero de todas las células fue bastante bajo, probablemente porque los ácidos no están presentes en concentraciones lo suficientemente altas para permitir que la asimilación y/o incorporación procediera a una velocidad mayor.

Tabla 2: Análisis GC de Poli(4HB-co-2HB) a partir de MBX1177/pFS30 y MBX184/pFS30

Cepa	4HB, g/L	2HB, g/L	PHA total, % dcw[a]	P4HB, % de PHA[b]	P2HB, % de PHA[b]
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

[a]: pcs: peso célula seca.

[b]: determinado por análisis GC. Alrededor de 20mg de masa celular liofilizada se sometió a butanlisis a 110ºC durante 3 horas en 2 ml de una mezcla contentiva (por volumen) 90% 1-butanol y 10% ácido clorhídrico concentrado, con 2 mg/ml de ácido benzoico añadido como un estándar interno. Los componentes solubles en agua de la mezcla resultante se retiraron mediante extracción con 3mL de agua. La fase orgánica (1µ L a una relación de 1:50 a una velocidad total de flujo de 2 ml/min) se analizó sobre una columna capilar para GC de sílice fundida SPB-1 (30 m; 0,32 mm ID; una película 0,25 µm; Supelco; Bellefonte, Pa.) con el siguiente perfil de temperaturas: 80ºC, 2 min; 10ºC por min. hasta 250ºC; 250ºC, 2 min. El estándar utilizado para examinar la presencia de unidades de 4-hidroxibutirato en el polímero fue la γ-butirolactona. El estándar utilizado para examinar las unidades de 2-hidroxibutirato en el polímero fue sodio (2-hidroxibutirato).

[c]: los porcentajes en paréntesis se determinaron mediante análisis GC al igual que el anterior, pero después de la extracción del polímero en cloroformo y la subsiguiente precipitación en etanol.

Tabla 3: Análisis GC de Poli(4HB-co-2HB) de MBX184/pFS30

Muestra	4HB, g/L	2HB, g/L	PHA total, % de dcw[a]	P4HB, % de PHA[b]	P2HB, % de PHA[b]
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

[a]: pcs: peso célula seca.

[b]: determinado por análisis GC. Véase Tabla 2 para los detalles

Ejemplo de Referencia 3: Producción de poli(4HB-co-3HB) en *E Coli* recombinante

[0103] La cepa MBX1177/pFS30 se precultivó en 100 ml de ampicilina LB en cuatro frascos Erlenmeyer de 250ml a 30ºC durante la noche con remoción a 200 pm. Se añadieron 20 ml de medio a cada frasco de manera tal que el volumen total contuviera, por litro: 2,5 g adicionales de polvo de LB, 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 de IPTG y 0,25, 0,75 ó 1 g de 3-hidroxibutirato (3HB) como sal de sodio. Los frascos se incubaron durante 48 horas adicionales a 30ºC y 200 pm. Las células se retiraron del medio mediante centrifugado (2000 x g, 10 minutos), lavadas una vez con agua, centrifugadas de nuevo y liofilizadas. El análisis cromatográfico de gas se llevó a cabo sobre la masa de células liofilizadas para analizar el contenido y composición del polímero. El estándar utilizado para examinar las unidades de 3-hidroxibutirato en el polímero fue el poli(3-hidroxibutirato). Los contenidos y composiciones celulares del PHA producidas se exponen en la Tabla 4. Al disminuir la relación de 4HB/3HB en el medio, el contenido de 3HB del polímero aumentaba de forma monotónica, mientras que el contenido total del polímero de las células era similar en todas las pruebas, lo que indica que la composición del medio puede utilizarse de manera predecible 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 celular liofilizada se mezcló con alrededor de tres veces su propio volumen de 1,2-dicloroetano e incubó con una remoción ligera en un tubo cerrado a 37ºC durante 6 horas. La materia de partículas se separó de la solución del polímero mediante centrifugado (2000 x g, 10 minutos). La solución resultante se añadió por goteo a unas 10 veces su propio volumen de etanol, y el polímero precipitado se asentó en la solución. Se descartaron los elementos flotantes y el polímero húmedo resultante se mantuvo en reposo hasta que pareciera seco. El polímero entonces se liofilizó para un secado total. Las propiedades térmicas de estas composiciones de P4HB-co-3HB se muestran en la Tabla 5.

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

Muestra	4hb, 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

[a]: pcs: peso célula seca.

[b]: determinado por análisis GC. Véase Tabla 2 para los detalles. El estándar utilizado para examinar la presencia de unidades de 4-hidroxibutirato en el polímero fue γ-butirolactona. El estándar utilizado para examinar las unidades de 3-hidroxibutirato en el polímero fue poli(3-hidroxibutirato).

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

Muestra	%[a]4HB	%[a]3HB	Tm[b](ºC)	dHTm1[b](J/g)	Tg[b](ºC)	Tx[b](ºC)	Tm2b(ºC)	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 por análisis GC. Véase Tabla 2 para detalles

[b]: determinado por análisis DSC. Utilizando un calorímetro diferencial de barrido A Perkin Elmer Pyris 1. Las masas de las muestras eran de aproximadamente 4-8 mg. El programa térmico utilizado fue: 25ºC, 2 min; calentar hasta 195ºC a 10ºC por min; mantener a 195ºC; enfriar hasta -80ºC a 300ºC por min; mantener a -80ºC por 2 min; calentar hasta 195ºC a 10ºC por min. La temperatura de fusión Tm y la entalpía de fusión de este pico de fusión (dHTml) se determinaron en el primer ciclo de calentamiento. La temperatura de transición vítrea (Tg), la temperatura de cristalización (Tx) y la temperatura de fusión (Tm2) se determinaron durante el segundo ciclo de calentamiento.

[c]: determinado por análisis GPC. Los polímeros aislados se disolvieron en cloroformo a aproximadamente 1 mg/ml y las muestras (50 µL) se cromatografiaron en una columna Water Stryagel HT6E a una velocidad de flujo de 1 ml de cloroformo por minuto a temperatura ambiente utilizando un detector de índice de refracción. Las masas moleculares se determinaron relativas a los estándares de poliestireno de una polidispersidad estrecha.

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

[0104] La degradación del P4HB se estudió *in vitro* e *in vivo*. Se examinaron tres configuraciones diferentes de diversa porosidad (0%, 50% y 80% de porosidad). Se poncharon discos pequeños (5 mm de diámetro) a partir de películas de

P4HB de espesor uniforme moldeadas mediante compresión. Las muestras porosas de P4HB se produjeron utilizando la técnica de lixiviación mediante sal descrita a continuación. El comportamiento de la degradación *in vitro* se estudió incubando los discos en un búfer de fosfato estéril (8 mM de fosfato de sodio, 2 mM de fosfato de potasio, 140 mM de ClNa, 10 mM de KCl, pH 7,4, contentivo de NaN_3 como preservante) a 37ºC. El comportamiento de la degradación *in vivo* se estudió después de la implantación en bolsas subcutáneas en ratas.

PREPARACIÓN DE P4HB POROSO

[0105] Los cristales clasificados de cloruro de sodio (80-180 µm) se mezclaron con P4HB fundido (debe notarse que la proporción de sal del polímero puede ajustarse para producir la porosidad deseada, mientras que el tamaño de la partícula puede ajustarse para producir poros de tamaño diverso). La mezcla de sal del polímero se comprimió hasta lograr una película fina. Después de permitir que el material se solidificara, la película se retiró del soporte de mylar. La película se extrajo exhaustivamente con agua para retirar la sal, dejando una película porosa de P4HB.

DEGRADACIÓN ACELERADA DE P4HB

[0106] Se estudió la degradación de P4HB *in vivo*. Se examinaron tres configuraciones diferentes de diversa porosidad (0%, 50% y 80% de porosidad). Se poncharon discos pequeños (5 mm de diámetro) a partir de películas de P4HB de espesor uniforme moldeadas mediante compresión. Las muestras porosas de P4HB se produjeron utilizando una técnica de lixiviación mediante sal. El comportamiento de la degradación *in vivo* se estudió después de la implantación en bolsas subcutáneas en ratas. Las muestras se retiraron en momentos diferentes. La masa molecular se midió mediante GPC y la pérdida de masa se midió por cuantificación del 4HB remanente mediante análisis CG. Los resultados se muestran en la Figura 3. Como muestra la Figura 3, la pérdida de masa de la muestra variaba con la porosidad. Las muestras de la película, de 50% y 80% de porosidad mostraron un 5%, 20% y 75% de pérdida de masa respectivamente en un período de seis semanas, mientras que la pérdida media de masa molecular de estas muestras también disminuyó significativamente (20 al 50%). Estos datos demuestran que la velocidad de degradación de los PHAs puede modificarse y controlarse alterando la porosidad y aumentando el área superficial.

RESULTADOS

[0107] Los implantes de P4HB mostraron una respuesta inflamatoria muy mínima, mucho menor que para la de una malla no tejida de PGA. Esta es una buena indicación de la biocompatibilidad de estos materiales. Las muestras se retiraron en momentos diferentes y se evaluaron histológicamente tanto 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 remanente mediante análisis GC. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. Como muestra la Tabla 6, el P4HB no se degrada significativamente luego de un período de 10 semanas *in vitro*. Todas las muestras mantuvieron su peso inicial, y se produjo de un 20% a un 40% de disminución en la masa molecular media. Las muestras incubadas *in vivo* mostraron una degradación mucho más pronunciada. La pérdida de masa variaba con la porosidad. Las muestras de película, del 50% y del 80% de porosidad mostraron un 20%, 50% y 100% de pérdida de masa respectivamente en un período de más de 10 semanas, mientras que la pérdida media de masa molecular de estas muestras también disminuyó significativamente (20 al 50%).

[0108] El examen microscópico de luz y mediante microscopia electrónica por barrido ambiental (ESEM) de las muestras muestra cambios poco discernibles para las muestras *in vitro* en el período de diez semanas de incubación. En contraste, los implantes *in vivo* muestran señales distintivas de degradación. La superficie de estos materiales se degradaba progresivamente durante el período de implantación de 10 semanas. Después de una semana, las muestras de película mostraban algunas señales de rotura que progresaban a erosión superficial y formación de agujeros en las nueve semanas siguientes.

[0109] Los datos de la degradación *in vitro* sugieren que el P4HB es relativamente estable a 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 indicaba que el P4HB puede degradarse *in vivo*, sugiriendo un modo de degradación mediado biológicamente. Los datos muestran un incremento en la degradación con incremento de la porosidad, lo 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 de P4HB *in vivo* ocurre en la superficie del implante, a diferencia de los materiales PGA o PLA que se degradan a través del implante mediante hidrólisis, con disminución asociada de la masa molecular y pérdida de las propiedades mecánicas. Estos datos sugieren que la velocidad de degradación del P4HB puede modificarse y controlarse alterando su área superficial. También, se espera que este tipo de degradación superficial resulte en una pérdida de masa molecular relativamente lenta permitiendo el mantenimiento de las propiedades materiales del polímero por un tiempo mayor que en el caso de los poliésteres médicos absorbibles existentes. Los implantes de P4HB se toleraron bien y mostraron solo una reacción mínima como cuerpo extraño. Estos resultados muestran que estos materiales tienen ventajas significativas sobre los poliésteres médicos existentes.

Tabla 6: Degradación de P4HB *In Vitro*: Porcentaje de la Masa Original Remanente y de la Masa Molecular

Implantación (semanas)	Reman.[a] de película, % peso	Masa mol. de la película[b]	Reman.[a] al 50% en peso, %	Porcent. de masa molec.[b] al 50%	Reman.[a] al 80% en peso, %	Porcent. de masa molec.[b] al 80% por.
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

[a]: determinado por análisis GC. Véase Tabla 3 para los detalles

[b]: determinado por análisis cuantitativo GC. Véase Tabla 2 para los detalles

Tabla 7: Degradación de P4HB *in Vivo*. Porcentaje de la Masa Original Remanente y Masa Molecular

Implantación (semanas)	Reman.[a] de película, % peso	Masa mol. de la película[b]	Reman.[a] al 50% en peso, %	Porcent. de masa molec.[b] al 50%	Reman.[a] al 80% en peso, %	Porcent. de masa molec.[b] al 80% por.
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	nd

[a]: determinado por análisis GPC. Véase Tabla 3 para los detalles

[b]: determinado por análisis GC. Véase Tabla 2 para los detalles. Los explantes a menudo pesaban más que el implante original debido a la presencia de tejido adherente o sangre coagulada. Por tanto, la masa de P4HB en el explante se determinó por análisis GC cuantitativo. El porcentaje del peso del P4HB remanente se tomó como esta masa dividida por el implante original.

Ejemplo 5: Moldeado por compresión

[0110] El P4HB se comprimió hasta lograr una película fina utilizando una prensa hidráulica Carver. Las platinas se calentaron hasta 115ºC. El P4HB se comprimió entre dos láminas de mylar utilizando espaciadores metálicos. El espesor del espaciador y la presión de la prensa se ajustaron para controlar el espesor de la película. La película se retiró de la prensa y se enfrió a temperatura ambiente. Después de la solidificación (en materia de segundos) la película se separó fácilmente del material de apoyo del mylar. Los datos mecánicos de este material se muestran en la Tabla 1. La rápida solidificación del P4HB demuestra su rápida cristalización.

Tabla 1: Propiedades térmicas y mecánicas de polímeros médicos seleccionados

Polímero	Tm(ºC)	Tq(ºC)	Res. Tracción (psi)	Módulo (psi)	Elongación (%)	Degradación
[1]P4HB	60	-51	7.500	9.400	1000	Depende de conf.
[1]pP4HB50[a]	60	-51	895	2.155	164	Depende de conf.

[1]pP4HB80[b]	60	-51	180	257	100	Depende de conf.
[6]P4HB-3HB 10%	50	-42	9.000	14.500	1080	No informado
[1]PHB	175	0	4.000	110.000	4	>52 semanas
[2]PGA	230	35	10.000	1.000.000	17	8 semanas
[3]PDLLA	Am	53	5.000	300.000	5	<8 semanas
[3]PLLA	175	55	10.000	500.000	8	>8 semanas
[2]DLGLG 50/50	Am	48	7.000	300.000	5	3-8 semanas
[5]LDPE			2.000		400-700	No degradable
[5]HDPE			4.000		100-1000	No degradable
[5]UHMWPE			7.250		450	No degradable
PP			4.000	20.000	200-700	No degradable
PET			8.500		50	No degradable
PTFE			3.000 @ Rendimiento	50.000	300	No degradable

[a]pP4HB50, P4HB 50% poroso, véase ejemplo 7

[b]pP4HB80, P4HB 80% poroso, véase ejemplo 7

Referencias de la tabla:

1. De este trabajo medido según la ASTMD638 a temperatura ambiente y a una velocidad de cepa de 0,05 o 0,1 cm./min.

2. Hutmatcher et.al. Int. Oral Max. Imp. 1996, 11:667-78.

3. Nobes et. Al.. enviada.

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. Intl. J. Biol. Macromol. (1994) 16:99-104.

Ejemplo 6: Moldeado por compresión de P4HB poroso

[0111] Cristales clasificados de cloruro de sodio (80-180 µm) se mezclaron con el P4HB fundido descrito en los Ejemplos 4 y 5. (La proporción de la sal del polímero puede ajustarse para producir la porosidad deseada, mientras que el tamaño de partículas puede ajustarse para producir poros de diverso tamaño). La mezcla de sal del polímero se comprimió hasta lograr una película fina utilizando las condiciones descritas en el Ejemplo 6. Después de permitir que el material solidificara, la película se retiró del apoyo del mylar. La película se extrajo exhaustivamente con agua para retirar la sal, dejando una película porosa de P4HB. La remoción de la sal se monitoreó mediante análisis de cloruros en el material flotante y se confirmó mediante análisis elemental de la película lixiviada (menos de 0,5% de cloruro). Los datos mecánicos para P4HB con 50% y 80% de porosidad (pP4HB50 y pP4HB80, respectivamente) se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo 7: Siembra de células en estructuras de soporte de P4HB

[0112] El P4HB poroso, tal como lo describe el Ejemplo 6, se esterilizó mediante tratamiento en frío con óxido de etileno. Se sembró con células vasculares bovinas y se cultivó *in vitro*. Los datos preliminares indicaron buena sujeción de estas células al material. Esto es una demostración más de la biocompatibilidad de este material. El número de

células que se fijaron al material se puede cuantificar utilizando un ensayo de ADN comparándolo con los estándares para los bastidores de apoyo de ingeniería de tejidos, malla PGA.

Ejemplo 8: Orientación de la fibra de P4HB

[0113] Las tiras de P4HB moldeadas mediante compresión se estiraron uniaxialmente. La muestra se volvió más estrecha y se aclaró, mostrando señales de adoptar forma de collarín. Después de este procesamiento de estiramiento, el polímero parecía más resistente y algo más flexible, demostrando una orientación uniaxial de la muestra.

Ejemplo 9: Producción de espuma de P4HB

[0114] Se utilizó un método térmico de separación por fases para lograr espuma de P4HB. Primeramente, se disolvió el P4HB en dioxano de 1 a 5% p/v. Esta solución de polímero se fundió como una película fina y se solidificó por enfriamiento en hielo por debajo del punto de fusión del dioxano. El disolvente se evaporó a partir de este material sólido a baja presión para aportar una espuma porosa con las dimensiones aproximadas de la película gruesa inicial. El análisis ESEM de este material mostró una estructura altamente porosa de tipo esponjoso. La concentración de polímero y el proceso de enfriamiento pueden variarse para alterar la porosidad de la espuma. Antes de la congelación, la solución del polímero puede conformarse en una variedad de formas, desmenuzarse en material partículado o utilizarse como recubrimiento. Por tanto, esta técnica de separación térmica por fases puede utilizarse para producir una gran variedad de formas tridimensionales altamente porosas de P4HB.

Ejemplo 10: Recubrimiento con P4HB de una malla no tejida de PGA

[0115] El P4HB se disolvió en tetrahidrofurano al 1% p/v. Una malla de PGA no tejida de 1 mm de espesor (*Albany Internacional*, densidad bulto 52 mg/cc) se introdujo dentro de esta solución de manera tal que se eliminaran los huecos (vacíos) de aire. La malla recubierta se secó al aire y se repitió el procedimiento de recubrimiento. El análisis microscópico de luz y ESEM de la malla recubierta mostró que durante el proceso de secado el polímero emigró a las intersecciones de fibra y funcionó para unir las fibras. Esta técnica de unión de fibras mejoró sustancialmente la resistencia y maniobrabilidad de la malla de PGA. El análisis de tracción según la ASTM D638, mostró que la resistencia a la tracción, el módulo de Young y la elongación final de este material fueron 130psi., 240psi. y 171%, respectivamente. Esto constituye una mejora significativa con respecto al material no recubierto que era muy frágil para realizarle la prueba de estos parámetros.

Ejemplo 11: Recubrimiento con espuma de P4HB de una malla no tejida de PGA

[0116] El P4HB se disolvió en dioxano a 2,5% p/v. Una malla de PGA no tejida de 1 mm de espesor (*Albany Internacional*, densidad en bulto 52 mg/cc) se introdujo dentro de esta solución de manera tal que se eliminaran las vacuolas de aire. La malla recubierta se enfrió con hielo de manera que se solidificara la solución de recubrimiento. La malla se secó por congelación para eliminar el dioxano. El análisis microscópico de luz de la malla recubierta mostró que durante el proceso de secado mediante congelación el polímero formó una espuma en forma de red a lo largo de la malla PGA. Este material espumoso tiene buena maniobrabilidad. La elevada área superficial y las propiedades mecánicas incrementadas son atractivas con respecto a una gama de aplicaciones.

Ejemplo 12: Formación de microesferas de P4HB

[0117] El P4HB se disolvió en diclorometano al 1% p/v. Se mezcló un volumen de 1 ml de esta solución con 5 ml de una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5% p/v. La mezcla de dos fases se mezcló mecánicamente para dar una emulsión. Se burbujeó una corriente de nitrógeno a través de la mezcla durante una hora con agitación rápida para facilitar la eliminación del diclorometano. La mezcla se agitó al aire durante la noche para lograr la eliminación completa del diclorometano. La suspensión resultante contenía microesferas de P4HB de alrededor de 1-10 μm, según se determinó por un microscopio óptico de contraste de fases.

Conclusiones de los ejemplos

[0118] El homopolímero de P4HB tiene propiedades físicas y características de degradación que lo hacen muy atractivo como implante para su uso en aplicaciones médicas. Este polímero puede fabricarse en forma de fibras, láminas, espumas, recubrimientos, estructuras, filamentos y similares para su uso como material médico implantable.

REIVINDICACIONES

1. Un implante médico biocompatible para la sujeción, fijación, apoyo, reparación o refuerzo del tejido blando, comprendiendo el implante una composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato),

en el que la composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) comprende opcionalmente aditivos que pueden alterar la estabilidad química del polímero,

en el que el homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo entre 10.000 y 10.000.000 de Daltons,

en el que el implante se selecciona entre el grupo que consta de regeneración guiada del tejido y dispositivos de reparación, agentes de relleno y de carga, válvulas para venas, estructura de soporte de médula ósea, dispositivos de aumento del ligamento, injertos de ligamentos y tendones, sustitutos de injerto de hueso, placas de hueso, sistemas de recubrimiento óseo, sustitutos de la piel, sustitutos durales, hemostatos, implantes de células oculares, jaulas de fusión espinal, dispositivos de regeneración de menisco, injertos vasculares, válvulas cardíacas, dispositivos que comprenden un revestimiento formado a partir de la composición de polihidroxialcanoatos en el que el dispositivo es un stent, catéter o sensor, dispositivos de encapsulación de célula, malla quirúrgica en forma de un tapón de malla; y dispositivos de liberación controlada; y donde si el implante es un agente de relleno y de carga entonces es para su uso en cirugía plástica para rellenar defectos o como un material aumentador de volumen del esfínter para su uso en el tratamiento de la incontinencia de adultos.

2. El implante de la Reivindicación 1 en el que la velocidad de degradación de la composición de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) se controla mediante incremento de la porosidad de la composición de poli(4-hidroxibutirato).

3. El implante de la Reivindicación 1, en el que la composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) contiene aditivos seleccionados entre el grupo que consta de sustancias hidrófilas, sustancias hidrófobas y recubrimientos que alteran la absorción de agua por parte de la composición.

4. El implante de la Reivindicación 1 que contiene aditivos que alteran la estabilidad química del polímero.

5. El implante de la Reivindicación 4 en el que los aditivos promueven escisión de cadena.

6. El implante de la Reivindicación 4 en el que los aditivos se seleccionan entre el grupo que consta de ácidos, bases, electrófilos, nucleófilos, plastificadores, polímeros, agentes formadores de poros y agentes diseñados para reducir la cristalinidad del polímero.

7. El implante de la Reivindicación 1 que comprende agentes formadores de poros.

8. El implante de la Reivindicación 7 en el que los agentes formadores de poros son partículas liofilizables.

9. El implante de la Reivindicación 7 en el que los agentes formadores de poros absorben agua.

10. El implante de la Reivindicación 1 en el que el implante es un dispositivo guiado de regeneración y reparación de tejido periodontal.

11. El implante de la Reivindicación 1 en el que el implante es un sustituto dural en forma de materiales porosos derivados de matrices de polihidroxialcanoato porosas, y/o fibras de polihidroxialcanoato transformadas en redes, telas tejidas o no tejidas.

12. Un método para la fabricación de un implante médico biocompatible para la sujeción, fijación, apoyo, reparación o refuerzo del tejido blando, comprendiendo el implante una composición de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato),

en el que la composición de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) comprende opcionalmente aditivos que alteran la estabilidad química del polímero,

en el que el homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo entre 10.000 y 10.000.000 Daltons,

que comprende

la provisión de una composición de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato),

en el que opcionalmente la composición de homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) comprende aditivos que alteran la estabilidad química del polímero,

en el que el homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo entre 10.000 y 10.000.000 de Daltons; y

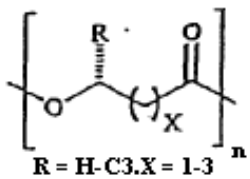
formar o incorporar la composición del homopolímero de poli(4-hidroxibutirato) a un implante seleccionado entre el grupo que consta de: dispositivos de regeneración guiada y/o reparación del tejido, agentes de relleno y de carga, válvulas para venas, estructuras de soporte de médula ósea, dispositivos de aumento del ligamento, injertos de ligamentos y tendones, sustitutos de injerto de hueso, sustitutos de piel, sustitutos durales, hemostatos, implantes de células oculares, jaulas de fusión espinal, dispositivos de regeneración de menisco, injertos vasculares, válvulas cardíacas, revestimientos de dispositivos en los que el dispositivo es un stent, catéter o sensor, dispositivos de encapsulación de célula, malla quirúrgica en forma de un tapón de malla; y dispositivos de liberación controlada; y

donde si el implante es un agente de relleno y de carga entonces es para su uso en cirugía plástica para rellenar defectos o como material de expansión de esfínter para su uso en el tratamiento de la incontinencia de adultos.

13. El implante según la Reivindicación 1, en el que el implante contiene además un agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico.

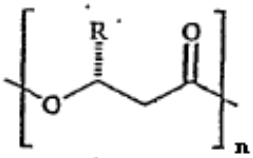
14. El implante según la Reivindicación 13, en el que el agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico se selecciona entre el grupo que comprende, genes, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, moléculas de sentido inverso, ribozimas, vectores retrovirales para uso en terapia de genes, anticuerpos y sus fragmentos, factores de sujeción celular, ligandos de receptores, enzimas, péptidos de adhesión, sacáridos, polisacáridos, medicamentos sintéticos orgánicos o inorgánicos, factores de coagulación sanguínea, inhibidores de coagulación sanguínea, agentes de disolución de coágulos, antígenos para inmunización, hormonas, factores de crecimiento y agentes de diagnóstico detectables mediante rayos X, fluorescencia, imágenes de resonancia magnética, radioactividad, ultrasonido, tomografía computarizada (CT) o tomografía por emisión de positrones (PET).

15. El implante según la Reivindicación 14, en el que: el agente de disolución de coágulos se selecciona entre estreptocinasa y activador plasminógeno de tejidos; el polisacárido es heparina; el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido; el agente diagnóstico detectable por ultrasonido es un gas seleccionado entre aire, oxígeno y perfluorocarbonos.



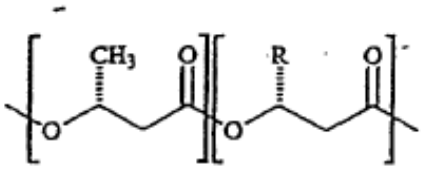
R = H-C3.X = 1-3

Grupo PHAs pendiente corto



R = C3 -C11

Grupo PHAs pendiente largo



R = C3 -C11

Grupo PHAs pendiente corto/largo

FIGURA 1

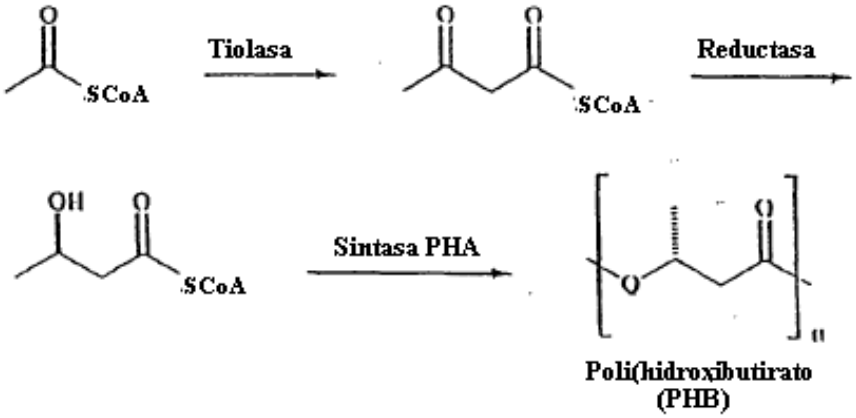


FIGURA 2a

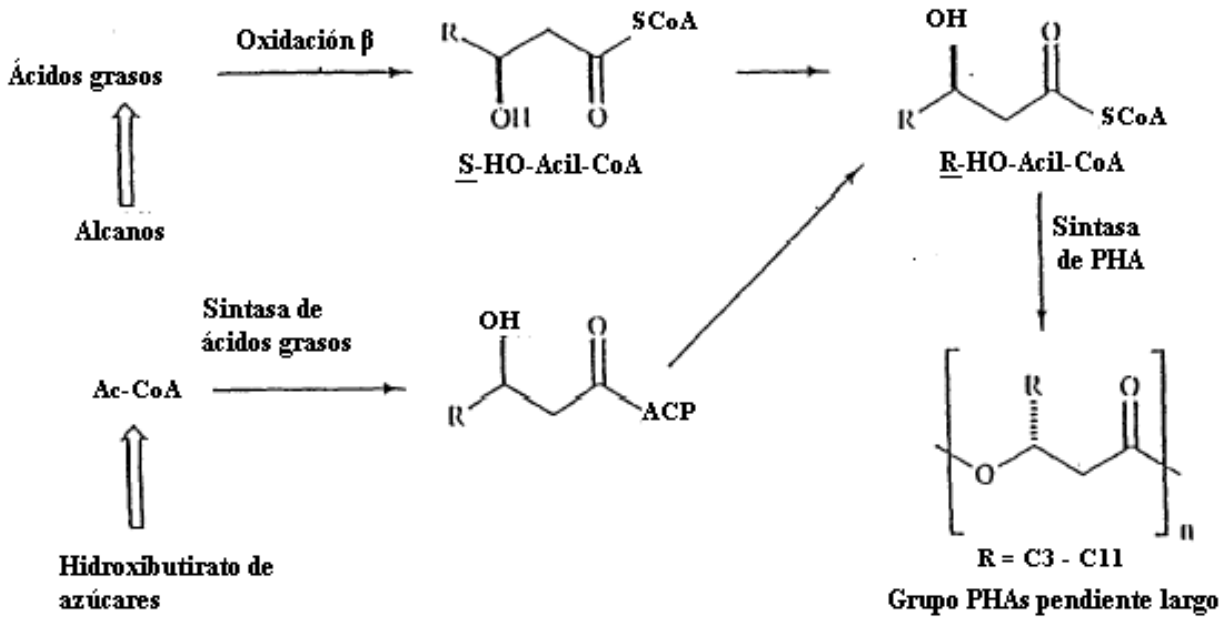


FIGURA 2b

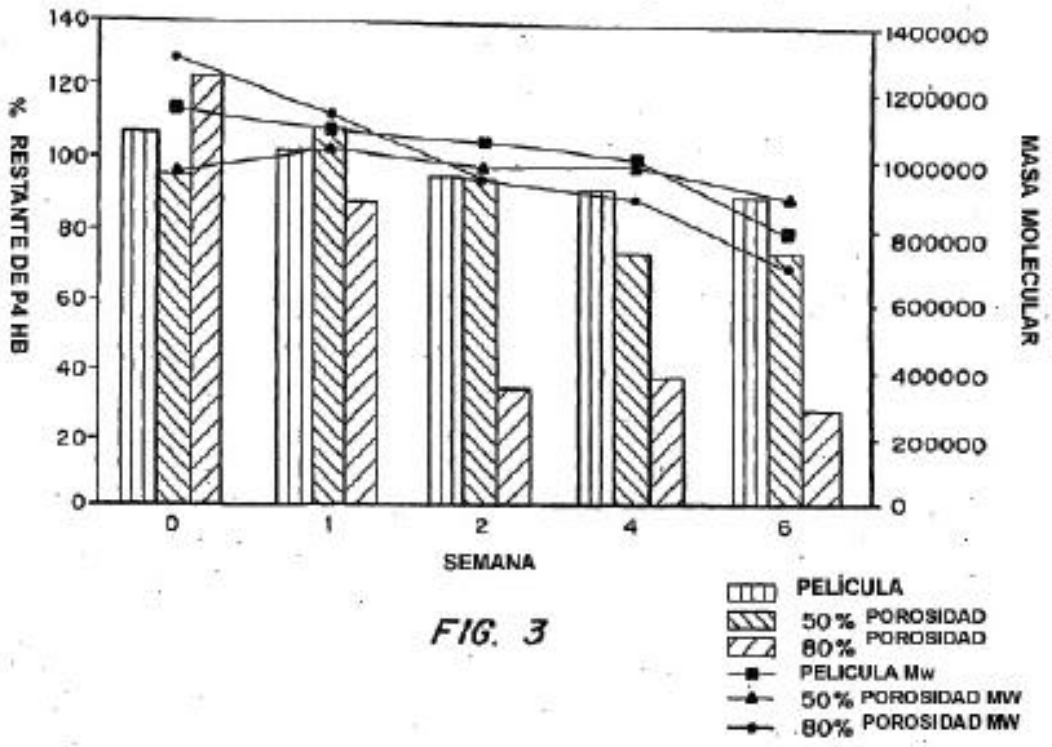


FIG. 3