

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 142**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2003 E 03808364 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **10.05.2006 EP 1654373**

54 Título: **Polímero bioabsorbible conteniendo monómeros 2-hidroxiácidos**

30 Prioridad:

10.05.2002 US 379583 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2013

73 Titular/es:

**METABOLIX, INC. (50.0%)
21 ERIE STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US y
TEPHA, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTIN, DAVID, P. y
SKRALY, FRANK, A.**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 142 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

Polímero bioabsorbible conteniendo monómeros 2-hidroxiácidos.

Antecedentes de la invención

- 5 [0001] La presente invención está generalmente en el campo de los métodos para hacer monómeros 2-hidroxiácidos, y los polímeros polihidroxiálcanoato resultantes.
- 10 [0002] Numerosos microorganismos tienen la capacidad de acumular reservas intracelulares de polímeros poli [(X)-3-hidroxiálcanoatos] ("PHA"). Los PHAs son sustancias termoplásticas biodegradables, producidas a partir de recursos renovables, con una amplia variedad de aplicaciones biomédicas e industriales (Williams and Peoples, 1996, CHEMTECH 26, 38-44). Alrededor de 100 monómeros distintos se han incorporado en polímeros PHA, como se informa en la literatura (Steinbüchel and Valentin, 1995, FEMS Microbiol. Lett. 128; 219-228) y recientemente se ha revisado la biología y genética de su metabolismo (Huisman and Madison, 1998, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 21-53).
- 15 [0003] Se han desarrollado procesos de fermentación y recuperación para una gama de tipos de PHA utilizando una variedad de bacterias que incluyen *Azotobacter*, *Alcaligenes latus*, *Comamonas testosteroni* y por ingeniería genética *E. coli* y *Klebsiella*, como recientemente se revisó por Braunegg et al., 1998, Journal of Biotechnology 65: 127-161; Choi and Lee, 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 13-21. Se han examinado enfoques más tradicionales de síntesis de polímeros, incluyendo la condensación directa y polimerización por apertura de anillo de las lactonas correspondientes (Jesudason and Marchessault, 1994, Macromolecules 27: 2595-2602).
- 20 [0004] Se ha descrito la síntesis de polímeros PHA que contienen el monómero 4-hidroxiбутирато (PHB4HB, Doi, Y.1995, Macromol. Symp. 98, 585-599) o poliésteres PHA que contienen 4-hidroxiуалерато y 4-hidroxihexanoato (Valentin et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 507-514 y Valentin et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 710-716). Los copolímeros PHB4HB pueden ser producidos con una variedad de composiciones de monómeros que proporcionan una variedad de propiedades poliméricas (Saito, Y, Nakamura, S., Hiramitsu, M. and Doi, Y., 1996, Polym. Int. 39: 169).
- 25 [0005] WO 99/32536 revela homo-y co-polímeros PHA, basados en ácido 4-hidroxiбутирico, que tienen velocidades de degradación controladas. Estas composiciones pueden ser utilizadas en aplicaciones médicas, tales como ingeniería de tejidos, administración de fármacos y técnicas de tratamiento de imágenes.
- 30 [0006] El homopolímero poli(4-hidroxiбутирато), o P4HB, ha sido sintetizado en *E. coli* recombinante (Hein et al., 1997, FEMS Microbiol. Lett. 153:411-418) utilizando PHA sintasa de *Ralstonia eutropha* procedente de plásmido (phaC) y los genes de 4HB-CoA transferasa de *Clostridium kluyveri* (orfZ).
- [0007] Khelifa et al, 1998, Bioorganic & Medicinal Chem. Lett., 8; 3429-3434, describe la síntesis de polímeros conteniendo 2-hidroxiácidos en *Clostridium butyricum* de aminoácidos L y D-2.
- 35 [0008] Se han descrito también copolímeros PHA de 3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiурропионато (Shimamura et. al., 1994, Macromolecules 27: 4429-4435; Cao et. al., 1997, Macromol. Chem. Phys. 198: 3539-3557). El nivel más alto de 3-hidroxiурропионато incorporado en estos polímeros es 88 mol % (Shimamura et. al., 1994, 27: 4429-4435 Macromoléculas).
- 40 [0009] WO 02/08428A2 a Metabolix Inc. describe bacterias desarrolladas por ingeniería genética para la producción de copolímeros PHA de materias primas de poliол. Aunque más de 100 monómeros diferentes han sido incorporados en PHAs en organismos, nunca se ha informado de la presencia de ácido glicólico en un PHA biosintético. El ácido glicólico es el más sencillo de los hidroxiácidos, y previamente se han sintetizado químicamente polímeros conteniendo ácido glicólico. Por ejemplo, polímeros de ácido glicólico de alto peso molecular son preferiblemente preparados por polimerización por apertura de anillo a partir del dímero cíclico, glicólido. Polímeros conteniendo ácido glicólico se usan en suturas absorbibles, dispositivos de fijaciones internas, andamiajes de ingeniería de tejidos, matrices de liberación de fármacos, etc. Ver, por ejemplo, la patente U.S. Nº. 3.867.190; la patente U.S. Nº. 3,736,646; Fukuzaki, et al., "Un nuevo copolímero biodegradable de ácido glicólico y lactonas con peso molecular relativamente bajo preparado por copolicondensación directa en ausencia de catalizadores " en J. Biomed. Mater. Res. 25(3):315-28 (1991). Se han utilizado polímeros sintéticos que contienen ácido glicólico para dispositivos médicos absorbibles desde los años 70. Ver por ejemplo, Chujo, et al., "Polimerización por apertura de anillo de glicólido " en Makromol. Chem. 100:262-6 (1967); Fukuzaki, et al., "Copolimerización directa de ácido glicólico con lactonas en ausencia de catalizadores " en Eur. Polym. J. 26(4):457-61 (1990); Kricheldorf, et al., "Polilactonas, 2. Copolimerización de glicólido con β -propiolactona, γ -butirolactona o δ -valerolactona" en Makromol. Chem. 186(5):955-76 (1985); Kricheldorf, et al., "Polilactonas, 3. Copolimerización de glicólido con L, L-lactida y otras lactonas" en Makromol. Chem. 12 (Polym. Specific Prop.):955-76 (1985); Nakayama, et al., "Síntesis y biodegradabilidad de copoliésteres novedosos que contienen unidades de γ -butirolactona " en Polymer 39(5):1213-1222 (1998); Nakayama, et al., "Síntesis de poliésteres biodegradables y efecto de la estructura química en la degradación " en Nippon Kagaku Kaishi 1:1-10 (2001). Sin embargo, los copolímeros formados de ácido glicólico y
- 55

diversas lactonas por síntesis química tienen pesos moleculares relativamente bajos. Es más, es difícil controlar la configuración estereo de las unidades de lactona en los copolímeros formados por síntesis química.

5 [0010] Sería útil poder incorporar ácido glicólico en polímeros PHA en los sistemas de producción de bacterias. Esto expandiría más la variedad de propiedades físicas disponibles de la familia PHA de polímeros y la presencia de los monómeros de ácido glicólico proporcionaría un medio para controlar la velocidad de degradación de los PHAs para usos biomédicos e industriales. En concreto, la incorporación de ácido glicólico en PHAs proporcionaría un medio para controlar la velocidad de degradación *in vivo* de dispositivos biomédicos de PHA utilizando un monómero ya con antecedentes de uso seguro en implantes médicos.

10 [0011] Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar un método para la biosíntesis de PHAs conteniendo ácido glicólico.

15 [0012] Es otro objeto de esta invención el proporcionar métodos para la biosíntesis de PHAs conteniendo ácido glicólico y al menos otro monómero tal como ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido 3-hidroxi-valérico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico, ácido 3-hidroxi-decanoico, ácido 4-hidroxi-butírico o ácido 4-hidroxi-valérico. PHAs específicos de interés que contienen ácido glicólico incluyen poli-ácido-3-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico y poli-ácido-4-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico.

[0013] Es además un objeto de la presente invención proporcionar PHAs que contienen 2-hidroxiácidos por biosíntesis para aplicaciones médicas e industriales.

Resumen de la Invención

20 [0014] Se ha desarrollado una clase de copolímeros PHA conteniendo ácido glicólico y el método de fabricar y utilizar los mismos. Los copolímeros que contienen ácido glicólico pueden ser sintetizados por medio de biosíntesis por la acción de una PHA polimerasa en una célula viva. Al cambiar los antecedentes genéticos de las células uno puede controlar vías metabólicas específicas que producen el tioéster de la Coenzima A de ácido glicólico que puede incorporarse en polímeros PHA por una enzima sintasa de PHB o PHA. En una realización representativa, el método aquí descrito produce polímero conteniendo ácido glicólico por expresión en un organismo genes que codifican polihidroxi-alcanoato sintasa (PHA sintasa) y enzimas para la formación de glicolil-CoA. La PHA sintasa puede ser una sintasa PHB o PHA. Las enzimas para la formación de glicolil-CoA incluyen, por ejemplo, deshidrogenasa aldehído, óxidoreductasa diol, y/o transferasa acil-CoA. Pueden usarse también genes adicionales que codifican acetoacetyl-CoA reductasa, y beta-ketoacil-CoA tiasa para proporcionar otros precursores de comonómero PHA tal como 3-hidroxi-butiril-CoA. En una realización preferida, los PHAs resultantes contienen ácido glicólico y al menos un monómero diferente tal como ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido 3-hidroxi-valérico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico, ácido 3-hidroxi-decanoico, ácido 4-hidroxi-butírico o ácido 4-hidroxi-valérico. PHAs específico de interés que contienen ácido glicólico incluyen poli-ácido 3-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico y poli-ácido-4-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico.

35 [0015] El organismo puede ser una planta transgénica, hongo, levadura, o bacteria. Preferiblemente, el organismo es una bacteria. Más preferiblemente, el organismo es *E. coli*. En una realización más preferida, el *E. coli* tiene mutaciones que cuales expresan constitutivamente vías de oxidación de ácidos grasos.

40 [0016] Los polímeros que contienen monómeros de ácido glicólico pueden ser utilizados para formar diversos dispositivos médicos tales como para la liberación controlada de agentes diagnósticos, profilácticos o terapéuticos, administración de fármacos, andamiajes de ingeniería de tejidos, encapsulación celular; administración dirigida, revestimientos biocompatibles; implantes biocompatibles; regeneración guiada de tejidos; apósitos para heridas; dispositivos ortopédicos; prótesis y cementos óseos; o diagnósticos.

45 [0017] Los polímeros PHA conteniendo ácido glicólico pueden ser utilizados para formar fibras, películas, espumas o artículos moldeados usando técnicas industriales estándar de extrusión en fusión que incluyen hilatura por fusión, soplado por fusión, moldeo por inyección, película colada de moldeo por soplado o moldeo por soplado según sea apropiado. Las fibras hechas de PHAs que contienen ácido glicólico pueden usarse para hacer artículos sin tejer o tejidos útiles para ropa, toallitas desechables y/o artículos sanitarios tal como pañales o artículos de higiene femenina. Los polímeros que contienen ácido glicólico pueden mezclarse con otras sustancias incluyendo polímeros biodegradables tales como ácido poliláctico, almidón o almidones químicamente modificados o poliésteres sintéticos que contienen ácido tereftálico, ácido succínico, 1,4-butanodiol o ácido adipico como bloques de construcción y que pueden ser biodegradables. Los polímeros que contienen ácido glicólico pueden ser formulados con diversas ayudas de proceso incluyen agentes nucleantes, plastificantes, reticulantes, estabilizadores térmicos, colorantes, antibloqueantes y de relleno.

Breve Descripción de los Dibujos

[0018]

55 La Figura 1 muestra la estructura química de poli(4-hidroxi-butirato-coglicolato).

La Figura 2 es la vía para producir poli(4-hidroxibutirato) in MG1655/pFS73.

La Figura 3 ilustra la vía para producir poli(4-hidroxibutirato) a partir de 1,4-butanodiol.

La Figura 4 ilustra la vía para oxidación de 4-hidroxibutiril-CoA por medio de los sistemas *fad* y *ato*.

La Figura 5 muestra la vía para producción de poli(4-hidroxibutirato-co-glicolato).

5 Descripción Detallada de la Invención

I. Definiciones

10 **[0019]** El término P4HB como se utiliza aquí se refiere a un polihidroxiálcanoato formado de un monómero que tiene cuatro átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 4 del hidroxiácido, que es poli(4-hidroxibutirato) (P4HB). El término P4HBGA se refiere a un copolímero de polihidroxiálcanoato formado de un monómero que tiene cuatro átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 4 del hidroxiácido, que es ácido 4-hidroxibutírico, y un monómero que tiene dos átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 2 del hidroxiácido, que es ácido glicólico. Por tanto, el término P4HBGA se refiere a poli (4-hidroxibutirato-co-glicolato) (P4HBGA) (Figura 1).

15 **[0020]** El término "MG1655/pFS73" como se usa aquí se refiere a una cepa de *E. coli* que utiliza ácido 4-hidroxibutírico (4HB) como una alimentación para producir 4-hidroxibutiril-CoA que puede polimerizarse por una PHB o PHA sintasa y se describe en WO/ 0208428 A2.

II. El copolímero Poli(hidroxiálcanoato-co-ácido glicólico)

Composiciones

(1) Composiciones de Polímero

20 **[0021]** Como se utiliza aquí, "materiales 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:



y una o más unidades, por ejemplo entre 1 y 100.000, y preferiblemente entre 10 y 30.000 unidades, de la siguiente fórmula II:



25 donde n es un entero, por ejemplo entre 1 y 15, y en una realización preferida, entre 1 y 4; y

donde R¹, R², R³, y R⁴ pueden independientemente ser hidrógeno o radicales de hidrocarburo que incluyen radicales de hidrocarburo de cadena larga; radicales sustituidos por hidroxilo y halo; radicales hidroxilo; radicales halógenos; radicales sustituidos por nitrógeno; y/o radicales sustituidos por oxígeno.

[0022] Como se utiliza aquí, la fórmula -(CR³R⁴)_n- se define como incluyendo las siguientes fórmulas:

30 -CR³R⁴- (donde n=1);

-CR³R⁴C R^{3'}R^{4'}- (donde n=2); y

-C R³ R⁴C R^{3'} R^{4'}C R^{3''} R^{4''}- (donde n=3);

35 donde R³, R⁴, R^{3'}, R^{4'}, R^{3''}, y R^{4''} pueden ser independientemente radicales de hidrocarburo que incluyen radicales de hidrocarburo de cadena larga; radicales sustituidos por hidroxilo- y halo-; radicales hidroxilo; radicales halógenos; radicales sustituidos por nitrógeno; radicales sustituidos por oxígeno; y/o átomos de hidrógeno.

Así, la fórmula I incluye unidades derivadas de 3-hidroxiácidos (n=1), 4-hidroxiácidos (n=2), y 5-hidroxiácidos (n=3).

[0023] Los polímeros normalmente tienen un peso molecular sobre 300, por ejemplo entre 300 y 10⁸, y en una realización preferida 10.000 a 10.000.000 Daltons.

40 **[0024]** En una realización preferida, el copolímero es un copolímero que contiene monómeros de 3-hidroxiácido o 4-hidroxiácido y monómeros de glicolato. En una realización específicamente preferida, el copolímero es poli-4-hidroxibutirato-co-glicolato (P4HBGA).

III. Método para biosíntesis de PHAs conteniendo 2-hidroxiácido

Monómero**(1) Síntesis de polihidroxicanoato**

5 [0025] Durante mediados los años 80, diversos grupos de investigación estuvieron activamente identificando y aislando los genes y productos génicos responsables de síntesis de 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 síntesis de PHA. Dichas rutas podrían incrementar más los tipos de PHA disponibles. Estos avances se han revisado en Williams & Peoples, CHEMTECH, 26:38-44 (1996) y Williams & Peoples, Chem. Br. 33:29-32 (1997).

10 [0026] Los métodos que pueden usarse para producir polímeros PHA adecuados para modificación posterior para alterar sus tasas de degradación se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. Nº. 4.910.145 a Holmes, et al.; Byrom, " Biomateriales Variados" en Biomateriales (Byrom, Ed.), pp. 333-59 (MacMillan Publishers, London 1991); Hocking & Marchessault, "Biopolíesteres" en Química y Tecnología de Polímeros Biodegradables (Griffin, Ed.), pp.48-96 (Chapman and Hall, London 1994); Holmes, "Polímeros y Copolímeros (R)-3-hidroxicanoato biológicamente producidos," en Desarrollos en Polímeros Cristalinos (Bassett Ed.), vol. 2, pp. 1-65 (Elsevier, London 1988); Lafferty et al., "Producción Microbiana de ácido Poli-b- hidroxibutírico" en Biotecnología (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" in 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); Patentes de Estados Unidos Nº. 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., Macromoléculas, 21:2657-68 (1988); Dubois, et al., Macromolecules, 26:4407-12 (1993); Le Borgne & Spassky, Polímero, 30:2312-19 (1989); Tanahashi & Doi, Macromoléculas, 24:5732-33 (1991); Hori, et al., Macromoléculas, 26:4388-90 (1993); Kemnitz, et al., Macromoléculas, 26:1221-29 (1993); Hori, et al., Macromoléculas, 26:5533-34 (1993); Hocking, et al., Polym. Bull., 30:163-70 (1993); Xie, et al., Macromoléculas, 30:6997-98 (1997); Patente U.S.Nº. 5.563.239 to Hubbs; Patentes U.S. Nº. 5.489.470 y 5.520.116 a Noda, et al. Los PHAs derivados de estos métodos pueden estar en cualquier forma, incluyendo en forma de látex o sólido.

25 [0027] La identificación, clonación y expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs de diversos microorganismos dentro de organismos recombinantes permiten la producción de PHAs dentro de organismos que no son productores de PHA nativos. Un ejemplo preferido es *E.coli*, que es un huésped conocido para la producción de biofármacos, y PHAs para aplicaciones médicas. Dichos organismo recombinantes proporcionan a los investigadores un mayor grado de control del proceso de producción de PHA porque están libres de actividades enzimáticas de fondo para la biosíntesis de precursores de PHA indeseados o degradación del PHA. Adicionalmente, la selección adecuada de un organismo recombinante puede facilitar la purificación, o permitir la biocompatibilidad aumentada, del PHA producido.

30 [0028] Los requisitos mínimos para la síntesis de PHA en un organismo recombinante son una fuente de hidroxicanoil-CoA y un PHA sintasa apropiado (Gerngross & Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. 92:6279-83(1995)). Los productores de PHA recombinante con ello requieren una vía biosintética para un monómero de hidroxicanoil-CoA y un PHA sintasa adecuado. La producción de un homopolímero necesita que el organismo produzca solamente un sustrato adecuado para la PHA sintasa, ya que la producción de múltiples sustratos da lugar a la formación de un copolímero PHA. Por ejemplo, organismos recombinantes que contienen un transgen que codifica una PHA sintasa son suficientes para la producción de P4HB.

35 [0029] En una realización, el camino que lleva a la producción de poli-4-hidroxibutirato (P4HB) en la cepa de *E. coli* mediante genéticamente modificada MG1655/pFS73 utilizando ácido 4-hidroxibutírico (4HB) como una alimentación se describe en WO/0208428 A2 (Figura 2). Cuando 4HB se utiliza como una alimentación, P4HB se acumula en las células por una vía que implica la activación del 4HB a 4HB-CoA por una reacción de transesterificación con acetyl-CoA catalizado por un acil-CoA transferasa codificada por el gen *orfZ* y la polimerización posterior de 4HB-CoA por PHA sintasa (*phaC*) (Figura 2). Tal como muestra la Figura 3, esta vía puede ser modificada para permitir la producción de P4HB a partir de 1,4-butanodiol. Esta vía modificada implica que los productos de dos genes adicionales (*dhaT* y *aldH*) oxiden el 1,4-butanodiol *in situ* a 4HB. La formación de P4HB procede como en MG1655 mediante *orfZ* y *phaC*.

(2) Síntesis de PHAs conteniendo monómero 2-hidroxiácido

40 [0030] Las vías que llevan a la síntesis de PHAs pueden ser modificados para incorporar glicolato para formar copolímeros que contengan unidades de 2-hidroxiácido. Por ejemplo, bajo ciertas condiciones de fermentación, cepas de *E. Coli* mediante genéticamente modificadas previamente construidas para la producción de P4HB y poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) (PHB4HB) (WO 0208428A2) pueden producir una nueva composición de PHA, poli-4-hidroxibutirato-co-glicolato (P4HBGA) (Figura 1).

45 [0031] La incorporación de monómeros de ácido glicólico puede lograrse por co-expresión, por ejemplo, de una PHA sintasa y enzimas que lleva a la formación de glicolil-CoA en un organismo tal como *E. coli*. Adicionalmente,

controlando los antecedentes genéticos de las cepas del organismo, uno puede controlar la capacidad de las células para incorporar unidades de glicolato dentro del PHA. Por tanto, cambiando el contexto genético de las células, uno puede controlar vías específicas metabólicas para controlar el nivel de co-monómeros de glicolato co-monómero en el polímero PHA.

5 **[0032]** Las vías que llevan a la producción de PHAs que contienen monómeros de ácido glicólico pueden expresarse en un organismo tal como levadura, bacterias, hongos, y plantas, preferiblemente bacterias, más preferiblemente *E. coli*. Por ejemplo, las cepas de producción de *E. coli* pueden ser manipuladas en base a una cepa madre con gen o genes adicionales para incorporar monómeros de ácido glicólico. Pueden también construirse las vías para generar Glicolil-CoA, in situ. Por ejemplo, Glicolil-CoA, el monómero de glicolato monómero en la biosíntesis de PHAs
10 conteniendo unidades de glicolato, puede formarse por medio de la coexpresión de enzimas que catalizan la oxidación de butanodiol. Pueden construirse otras vías para la producción de PHAs para incorporar genes mediante la expresión de enzimas, por ejemplo, aciltransferasas, que catalizan la formación de glicolil-CoA vía alimentación externa, por ejemplo, alimentación de ácido glicólico.

15 **[0033]** La metodología descrita puede utilizarse para biosintetizar copolímeros que tengan unidades de 2-hidroxiácido y otras unidades de hidroxiácidos tal como 3-hidroxiácido por expresión de genes codificantes, por ejemplo, PHA sintasas, y genes que llevan a la formación de 3-hidroxiacil-CoA, y 2-hidroxiacil-CoA tales como genes de oxidación de butanodiol (dhaT y aldH).

20 **[0034]** Además de usar rutas biológicas para la síntesis de copolímeros PHA que contienen unidades de 2-hidroxiácido, pueden también derivarse copolímeros PHA por síntesis química. Un enfoque ampliamente utilizado implica la polimerización por apertura de anillo de monómeros de lactona con o sin diversos catalizadores o iniciadores (ver, por ejemplo, Chujo, et al., "Polimerización por apertura de anillo de glicólido" en Makromol. Chem. 100:262-6 (1967); Fukuzaki, et al., "Copolimerización directa de ácido glicólico con lactonas en ausencia de catalizadores" en Eur. Polym. J. 26(4):457-61 (1990); Kricheldorf, et al., "Polylactonas, 2. Copolímerización de glicólido con β -propiolactona, γ -butirolactona o δ -valerolactona" en Makromol. Chem. 186(5): 955-76 (1985);
25 Kricheldorf, et al., "Polilactonas, 3. Copolímerización de glicólido con L,L-lactido y otras lactonas" en Makromol. Chem. 12(Propiedades Específicas de Polímeros):955-76 (1985); Nakayama, et al., "Síntesis y biodegradabilidad de copoliésteres novedosos que contienen unidades de γ -butirolactona " en Polímero 39(5):1213-1222 (1998); Nakayama, et al., "Síntesis de poliésteres biodegradables y efecto de la estructura química sobre la biodegradación" en Nippon Kagaku Kaishi 1:1-10 (2001)). Un segundo enfoque implica la polimerización de condensación de ésteres y se describe en la Patente U.S. N^o. 5.563.239 a Hubbs, et al. Investigadores también han desarrollado métodos quimioenzimáticos para preparar PHAs. Por ejemplo, Xie et al., Macromoleculas, 30:6997-98 (1997) revela una polimerización por apertura de anillo de beta-butirolactona por lipasas termofílicas para producir PHB.
30

IV. Composiciones de copolímero PHA y la utilización de las mismas como dispositivos médicos

35 **[0035]** Los polímeros aquí descritos pueden formar diversas composiciones de polímero, que son útiles para preparar una variedad de dispositivos médicos biodegradables. Dispositivos preparados a partir de los copolímeros PHA aquí descritos pueden utilizarse para una amplia gama de diferentes aplicaciones médicas. Ejemplo de dichas aplicaciones incluyen liberación controlada de agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico; administración de fármacos, andamiajes en ingeniería de tejidos; encapsulación de células; administración dirigida, revestimientos biocompatibles; implantes biocompatibles; regeneración guiada de tejidos; apósitos para heridas; dispositivos ortopédicos; prótesis y cementos óseos (incluyendo adhesivos y/o relleno estructural; y diagnósticos.
40

45 **[0036]** Los copolímeros PHA aquí descritos pueden usarse para encapsular, ser mezclados con, o ser iónicamente o covalentemente acoplados con cualquiera de una variedad de agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. Una amplia variedad de sustancias biológicamente activas pueden ser encapsuladas o incorporadas, bien para suministro a un lugar por el polihidroxialcanoato, o para impartir propiedades al polímero, tal como bioadherencia, adherencia celular, aumento del crecimiento celular, inhibición del crecimiento bacteriano, y prevención de formación de coágulos.

50 **[0037]** Ejemplos de agentes terapéuticos y profilácticos adecuados incluyen compuestos inorgánicos y orgánicos sintéticos, proteínas y péptidos, polisacáridos y otros azúcares, lípidos, y secuencias de ácido nucleico ADN y ARN con actividades terapéuticas profilácticas o de diagnóstico. Las secuencias de ácido nucleico incluyen genes, moléculas antisentido que se une a ADN complementario para inhibir la transcripción, 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. Ejemplos de sustancias adecuadas incluyen proteínas tal como anticuerpos, ligandos de receptores, y enzimas, péptidos tal como péptidos de adherencia, sacáridos y polisacáridos, fármacos orgánicos o inorgánicos sintéticos, y ácidos nucleicos. Ejemplos de sustancias que pueden ser encapsuladas incluyen enzimas, factores de coagulación sanguínea, inhibidores o agentes de disolución de coágulos tal como estreptoquinasa y activador plasminógeno de tejido; antígenos para inmunización; hormonas y factores de crecimiento; polisacáridos tales como heparina; oligonucleótidos tales como oligonucleótidos antisentido y ribozimas y vectores retrovirales para uso en terapia génica. El polímero puede también ser utilizado para encapsular células y tejidos. Agentes de diagnóstico representativos son agentes detectables por rayos x, fluorescencia, tomografía por resonancia magnética,
55

radioactividad, ultrasonido, tomografía informatizada (CT) y tomografía por emisión de positrones (PET). Agentes de diagnóstico de ultrasonidos son normalmente un gas tal como aire, oxígeno o perfluorocarbonos.

5 **[0038]** En el caso de la liberación controlada, una amplia gama de diferentes compuestos bioactivos puede ser incorporada dentro de un dispositivo de liberación controlada. Estos incluyen macromoléculas hidrofóbicas, hidrofílicas y de alto peso molecular tales como proteínas. El compuesto bioactivo puede ser incorporado dentro de los PHAs en un porcentaje de carga de entre 0,1% y 70% en peso, más preferiblemente entre 5% y 50% en peso. Los PHAs pueden ser casi de cualquier forma física, tal como polvo, película, artículo moldeado, partículas, esferas, látex, y materiales amorfos o cristalinos. Pueden estar combinados con materiales no-PHA, por ejemplo, otros polímeros. Son adecuados para uso en aplicaciones que requieren materiales moldeables, biocompatibles, de lenta degradación, por ejemplo, dispositivos médicos. Ejemplos de dispositivos médicos que puede ser preparados a partir de polímeros incluyen varillas, tornillos óseos, grapas, suturas quirúrgicas, stents, dispositivos de ingeniería de tejidos, apósitos de heridas, y parches como parches para hernias y parches pericárdicos.

10 **[0039]** Implantes degradables fabricados con los copolímeros PHA aquí descritos puede ser utilizados en una amplia gama de aplicaciones vasculares, ingeniería de tejidos, regeneración guiada de tejidos, y aplicaciones actualmente ofrecidas por otros elastómeros termoplásticos (McMillin, Rubber Chem. Technol., 67:417-46 (1994)). Los implantes pueden incluir otros factores para estimular la reparación y la curación. Dispositivos preferidos son tubos adecuados para paso de fluidos corporales. Estos dispositivos puede ser modificados con factores de adherencia celular, factores de crecimiento, péptidos, y anticuerpos y sus fragmentos.

15 **[0040]** Los métodos preferidos de fabricación de dispositivos médicos incluyen la colada de disolventes, tratamiento de fusión, moldeo por extrusión, inyección y por compresión, y secado por atomización. Las partículas son preferiblemente preparadas directamente a partir de un proceso basado en fermentación, o por una técnica de evaporación de disolventes, técnica de doble emulsión, o por microfluidización, utilizando métodos disponibles en la técnica. (Koosha, F. Ph.D. Dissertation, 1989, Univ. Nottingham, Reino Unido, Diss. Abstr. Int. B 51:1206 (1990); Bruhn, B.W. y Müller, B.W. Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 18:668-69 (1991); Conti, B. et al., J Microencapsulation, 9:153-166 (1992); Ogawa, Y. et al., Chem. Pharm. Bull., 36:1095-103 (1988); Mathiowitz, E. and Langer, R. "Microesferas de polianhidridos como sistemas de administración de fármacos," M. Donbrow Ed., en "Microcapsules Nanopart. Med. Pharm. " CRC, Boca Raton, Florida, 1992, Ch. 5, pp. 99-123.)

20 **[0041]** Los copolímeros PHA aquí descritos pueden ser fabricados en dispositivos adecuados para la curación de heridas. Por ejemplo, pueden prepararse materiales de fibra sin tejer para este fin a partir de polímeros produciendo primero fibras de polímero, presionando los polímeros a través de una salida perforada, utilizando procedimiento conocidos por los expertos en la técnica. Las fibras pueden ser después fabricadas en una membrana porosa (pañó) extendiéndolas sobre una sujeción sólida y sometiendo a moldeo por compresión. El grosor del dispositivo es preferiblemente menor a 500 µm. El dispositivo de curación de herida puede ser preparado por perforación de una película o membrana utilizando un láser para lograr porosidad, o utilizando una técnica de filtración para preparar un material poroso. El tamaño de los poros debería idealmente ser suficientemente pequeño para bloqueo de células y otra materia de tejido. Los dispositivos de curación de heridas pueden ser colocados *in vivo* para separar tejidos y estimular la regeneración de tejidos.

25 **[0042]** Los copolímeros PHA aquí descritos pueden ser utilizados para encapsular células. Utilizando procesos conocidos por los expertos en la técnica, las células primero pueden ser pre-revestidas. Maysinger, Reviews in the Neurosciences, 6:15-33 (1995). Utilizando un procedimiento de encapsulación de partículas como la técnica de doble emulsión, las células pueden ser entonces encapsuladas por PHAs. Ogawa, et al., Chem. Pharm. Bull., 36:1095-103 (1988). Las células encapsuladas pueden ser después implantarse *in vivo*.

30 **[0043]** Los copolímeros PHA aquí descritos pueden ser fabricados de andamiajes en ingeniería de tejidos utilizando una amplia gama de técnicas de procesado de polímeros. Métodos preferidos de fabricación de PHA para andamiajes en ingeniería de tejidos incluyen colada de disolventes, procesamiento en fusión, procesamiento/hilado/tejido de fibras, moldeo por compresión, inyección y extrusión, y lavado con disolventes. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la técnica.

35 **[0044]** Un método preferido para la fabricación de un andamiaje de ingeniería de tejidos de copolímeros PHA aquí descritos implica la utilización de una extrusora, tal como una extrusora Brabender. Por ejemplo, esta técnica puede usarse para preparar tubos extruidos adecuados para implantación en una variedad de longitudes y tamaños.

40 **[0045]** Otro método preferido implica preparar un andamiaje de PHA sin tejer a partir de fibras. Las fibras pueden ser producidas de la fusión o solución, y procesadas en telas sin tejer utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las propiedades de las telas sin tejer pueden ser ajustadas variando, por ejemplo, el material de PHA, las dimensiones de las fibras, la densidad de las fibras, el grosor del tejido, la orientación de las fibras, y el método del tratamiento de las fibras. Las membranas pueden, si se desea, ser adicionalmente procesadas. Por ejemplo, estas membranas pueden construirse en forma de tubos huecos.

45 **[0046]** Otro método preferido implica procesar en fusión o disolvente un PHA adecuado en un molde apropiado y perforar el material utilizando un láser o otro medio para alcanzar la porosidad deseada. También son preferidos los

- 5 métodos que incluyen enrollar una plancha de PHA moldeada por compresión en un bucle y sellar térmicamente. La plancha PHA puede opcionalmente ser enrollada con otro material, como un segundo polímero biodegradable. Por ejemplo, el último material podría ser un tejido sin tejer de ácido poliglicólico, ácido poliláctico, o un copolímero de ácidos glicólicos y lácticos. Dicho procedimiento debería proporcionar un tubo laminado adecuado para utilizar en la ingeniería de nuevos vasos, conductos y tubos. Los PHAs pueden también ser utilizados para revestir otros andamiajes en ingeniería de tejidos. Dichos materiales podrían derivarse de otros polímeros degradables. El revestimiento puede realizarse, por ejemplo, con una solución de base disolvente, o por técnicas de fusión, o utilizando un látex de PHA.
- 10 **[0047]** Los dispositivos de ingeniería de tejidos aquí descritos pueden ser sembrados con células antes de la implantación o tras la implantación. Las células pueden ser cosechadas de una sección saludable de tejido del donante, expandidas *in vitro* utilizando técnicas de cultivo de células, y sembradas después en un andamiaje (o matriz) bien antes o después de la implantación. Alternativamente, las células pueden obtenerse de tejido de otro donante o de líneas celulares existentes.
- 15 **[0048]** Los copolímeros PHA aquí descritos puede utilizarse para revestir otros dispositivos y materiales. Dichos revestimientos pueden mejorar sus propiedades para la aplicación médica, por ejemplo, mejorar su biocompatibilidad y propiedades mecánicas, y personalizar su degradación y perfiles de liberación controlada. Los copolímeros PHA aquí descritos pueden estar revestidos sobre otros dispositivos utilizando los procedimientos de fabricación antes descritos. El espesor del revestimiento puede ajustarse a las necesidades de la aplicación específica cambiando el peso de revestimiento o concentración aplicada, y/o por sobre-revestimiento.
- 20 **[0049]** Los Copolímeros PHA aquí descritos pueden estar fabricados en stents utilizando una amplia variedad de técnicas de procesamiento de polímeros. Los métodos preferidos de fabricación de stents de PHA incluyen colada de disolvente, procesamiento en fusión, procesamiento /hilado de fibras, extrusión, moldeo por inyección y moldeo por compresión. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la técnica
- 25 **[0050]** Previo a la implantación, un artículo de polímero bioabsorbible debe esterilizarse para evitar enfermedad e infección del destinatario. La esterilización es realizada antes de sembrar un dispositivo de polímero con células. La esterilización térmica de artículos que contienen PHA es a menudo poco práctica puesto que el tratamiento térmico podría deformar el artículo, especialmente si el PHA tiene una temperatura de fusión por debajo de la requerida para el tratamiento de esterilización térmica. Este problema puede resolverse utilizando gas de óxido de etileno frío como agente de esterilización. La exposición de un artículo que contiene PHA a vapores de óxido de etileno antes de la implantación esteriliza el artículo haciéndolo adecuado para la implantación. Durante la esterilización con gas de óxido de etileno frío, el artículo que contiene PHA mantiene su forma. Este tipo de tratamiento es adecuado idealmente para esterilización de artículos moldeados o preformados donde la forma del artículo juega un importante papel en su correcto funcionamiento.
- 30 **[0051]** Los dispositivos aquí descritos pueden ser administrados sistémicamente o localmente, o incluso utilizados *in vitro*, particularmente para cultivo celular. Los métodos preferidos para administrar sistémicamente los dispositivos son por inyección, inhalación, administración oral e implantación. Otros métodos adecuados para administrar los dispositivos incluyen administrar los dispositivos tópicamente, como una loción, ungüento, parche, o apósito.
- 35 **[0052]** Los polímeros PHA aquí descritos son ampliamente útiles como sustitutos de los polímeros petroquímicos tradicionales en una variedad de aplicaciones con particular utilidad cuando es ventajosa la biodegradabilidad o producción a partir de recursos renovables.
- 40 **[0053]** Los siguientes ejemplos ilustran además los métodos aquí revelados y los copolímeros formados de esa manera.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de P4HB en MBX1928

45 Descripción de las Cepas MBX1628 y M BX1928

- 50 **[0054]** MBX1928 está basada en la cepa MG1655 (CGSC#6300) de *Escherichia coli* de tipo salvaje y expresa cuatro genes insertados: *aldH* (aldehído deshidrogenasa) de *E. coli*, *dhaT* (diol oxidoreductasa) de *Klebsiella pneumoniae* (Johnson and Lin, 1987, J. Bacteriol. 169:2050-2054), *orfZ* (acil-COA transferasa) de *Clostridium kluyveri* (Söhling and Gottschalk, 1996, J Bacteriol. 178:871-880), y *phaC* (PHA sintasa) de *Ralstonia eutropha*. Los genes *aldH* y *dhaT* se insertan en el cromosoma (junto con el gen marcador de resistencia a la tetraciclina del transposón Tn10), y los genes *orfZ* y *phaC* están presentes en un plásmido, junto con el marcador de resistencia a la kanamicina del plásmido pACYC177. MBX1628 tiene los mismos genes insertados que MBX1928, excepto que está basado en la cepa *Escherichia coli* LS5218 (CGSC#6966). LS5218 y MG1655 están estrechamente relacionadas con la excepción destacada de que LS5218 contiene dos mutaciones, *fadR601* y *atoCcon*. Como resultado de estas mutaciones, el gen represor *fadR* para el sistema *fad* no está activo, y el sistema *fad* no es reprimido, mientras que el inductor para el sistema *ato* (*atoC*) es expresado constitutivamente, de modo que el sistema *ato* es constitutivo.
- 55

[0055] MBX1870 es idéntico a MBX1628, excepto que expresa el gen *Pseudomonas oleovorans* alkK (acil-COA transferasa) (van Bellen et al., 1992, Mol. Microbiol. 6:3121-3136) en lugar del gen *orfZ* de *Clostridium kluveri*.

[0056] Las cepas antes descritas se resumen en la Tabla 1. Los genes insertados permiten que estas cepas produzcan PHAs cuando se les alimenta una materia prima apropiada, tal como 1,4-butanodiol.

5 Tabla 1. Descripción de las cepas de *E. coli* utilizadas.

| Cepa | Cepa padre | Genotipo relevante | Genes insertados |
|---------|------------|--|-------------------------------|
| MBX1628 | LS5218 | <i>fadR601, atoC</i> (con) | <i>aldH, dhaT, orfZ, phaC</i> |
| MBX1870 | LS5218 | <i>fadR601, atoC</i> (con) | <i>aldH, dhaT, alkK, phaC</i> |
| MBX1928 | MG1655 | <i>fadR⁺ atoC⁺</i> | <i>aldH, dhaT, orfZ, phaC</i> |

10 [0057] La clonación y aislamiento de diversos genes necesarios para la construcción de los constructos de genes aquí revelados están bien documentados (ver, por ejemplo, Skraly et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:98-105 (1998); Söhlng and Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996); Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). La construcción de los diversos constructos de gen aquí descritos está también dentro del conocimiento en la técnica (Herrero et al., J. Bacteriol. 172:6557-67 (1990)). Técnicas de conjugación de los genes *aldH*, *dhaT*, y *tetA* en el cromosoma bacteriano, es decir, *E. coli*, y transformación son descritos en, por ejemplo, Herrero et al., *ibid*; Miller, Experimentos en Genética Molecular, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972; Sambrook et al., *supra*.

15 Identificación de P4HB2GA

20 [0058] Diversas pruebas analíticas confirman la presencia de ácido glicólico en el polímero. Tras la extracción del polímero de la biomasa y purificación por precipitación selectiva, el polímero fue analizado por resonancia magnética nuclear (NMR). En el espectro NMR, la presencia del conómmero de ácido glicólico se indica por un pico único a 4,6 ppm y dos tripletes adicionales a 4.2 y 2.5 ppm con picos sospechados bajo el multiplete a 1.9 ppm. El pico único procede de ácido glicólico mientras que los picos adicionales surgen de diferentes pares de 4HB-GA y GA-4HB.

25 [0059] Muestras de polímero con un alto contenido de comonomero estaban disponibles de experimentos de velocidad de alimentación baja con la cepa MBX1870. Estas muestras fueron útiles para identificar el pico de comonomero por GC. El pico de ácido glicólico tiene un tiempo de retención relativamente corto de unos 4,0 minutos y una forma de pico parecida a otros derivados hidroxiacidos de éster butilo. Estándares de glicólico y adición de muestras de copolímero confirmaron este pico como butil glicolato.

Descripción General de butanolisis GC

30 [0060] Biomasa de PHA seca (5-20 mg) fue digerida a 110 °C durante 2 horas en 3 mL de reactivo de butanolisis t (9 partes de butanol, 1 parte de ácido clorhídrico concentrado, conteniendo 2 mg/ml de difenilmetano). Tras enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se lavó con 3 mL de agua, y la capa orgánica superior se extrajo para el análisis de GC. El análisis GC se realizó en un HP6890 GC equipado con una columna SPB-1 y un detector FID. Las condiciones GC fueron como sigue: 80°C 2 minutos, 10 °C /min hasta 250 °C, 250 °C 2 minutos; gas portador, helio, 2 mL/min; relación de división aproximada 1:50; volumen de inyección 1 µL. Se realizaron determinaciones cuantitativas mediante comparaciones de zonas de pico contra los estándares gamma-butirolactona y glicólido (el dímero cíclico de ácido glicólico), para los ácidos 4-hidroxi-butírico y glicólico, respectivamente.

35 Descripción General del análisis GPC

40 [0061] Se extrajeron muestras de polímero a partir de la biomasa seca (0,5 g) en cloroformo (10 mL) durante al menos 2 horas. La solución resultante se filtró mediante un filtro de papel y el polímero se precipitó por adición de la solución de cloroformo a metanol (50 mL). El polímero precipitado se recogió y dejó secar al aire. Se analizó una solución del polímero en cloroformo (1 mg/mL) a temperatura ambiente por GPC utilizando un caudal de 1 mL/minuto en una columna mixta de 5 µm PLGel de Polymer Labs (Amherst, MA). Se calculó el peso molecular promedio en peso respecto a estándares de poliestireno de polidispersidad estrecha.

Procesos de Fermentación

45 [0062] Se cultivaron inóculos de fermentación en 200 mL de medio LB estéril (10 g/L triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L NaCl) suplementado con 50 mg/L de sulfato de kanamicina y 15 mg/L de hidrocloreuro de tetraciclina. Cada inóculo se incubó a 30°C en un agitador giratorio agitado a aproximadamente 200 rpm durante 16 a 18 horas, después se usó para inocular un fermentador de 2 o 5L. El medio de fermentación inicial contenía, por litro: glucosa, 5 g; extracto de levadura, 20 g; peptona de soja, 20 g; Na (NH₄)HPO₄, 3,5 g; K₂HPO₄·3H₂O, 7,5 g; KH₂PO₄, 3,7 g;

MgSO₄, 0,602 g; FeSO₄·7H₂O, 5,56 mg; CoSO₄·7H₂O, 5,62 mg; ZnSO₄·7H₂O, 0,58 mg; MnCl₂·4H₂O, 3,96 mg; CaCl₂·H₂O, 3,34 mg; CuCl₂·2H₂O, 0,34 mg; hidrocloreto de tiamina, 10 mg; MAZU DF-204 o antiespumante Breox FMT-30, 0,2 mL; sulfato de kanamicina, 50 mg; hidrocloreto de tetraciclina, 15 mg. Las soluciones de alimentación de glucosa y 1,4-butanodiol estaban ambas a una concentración de 500 g/L.

5 Condiciones de Fermentación

[0063] La fermentación se condujo a 30°C. El pH se controló a 7,0 (± 0,2) por adición de NH₄OH diluido (15%) o ácido sulfúrico diluido (3%). El flujo de aire se fijó a un caudal constante (1 vvm). El oxígeno disuelto se controló a 25% de saturación variando la velocidad del agitador. Las mediciones en línea de pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y agitación (rpm) se hicieron por adquisición continua de datos. La concentración de glucosa y OD₆₀₀ se midieron fuera de línea.

[0064] Tras la inoculación del fermentador, las células se cultivaron a un OD₆₀₀ de 50 (aproximadamente 4-5 horas). La producción de PHA se inició por la adición por lotes de 1,4-butanodiol en 1 a 5 g/L (dependiendo de la velocidad de alimentación deseada de 1,4-butanodiol). Después de ello el fermentador se suplementó con alimentaciones de glucosa y 1,4-butanodiol. La velocidad de alimentación de 1,4- butanodiol se mantuvo a 1 a 5 g/L/hr. La alimentación de glucosa se mantuvo en aproximadamente 5 g/L/hr. Se midió la concentración de glucosa fuera de línea inicialmente cada hora y la velocidad de alimentación se ajustó para mantener la concentración de glucosa <1 g/L (preferiblemente cerca de 0,1 g/L). La fermentación se condujo durante aproximadamente un total de 48 horas. Se recogieron células por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos y se lavaron con agua. Los gránulos de células se secaron por liofilización para posterior extracción del polímero en cloroformo y análisis. La composición y concentración del polímero en la biomasa se analizó por butanolisis GC. El peso molecular del PHA se determinó por análisis GPC de las muestras de polímero purificadas. Los resultados para las distintas cepas a diferentes velocidades de alimentación se muestran en la Tabla 2 abajo.

Tabla 2. Análisis de composición, rendimiento y peso molecular de PHA producido en *E. coli* modificada genéticamente a diversas velocidades de alimentación de 1,4-butanodiol.

| Cepa | Velocidad de alimentación de 1,4-butanodiol (g/L-h) | Glicolato en PHA (wt. %) | Rendimiento de PHA (g/L) | M _w de PHA (g/mol) |
|----------|---|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| MBX1628* | 5 | 3 | 57 | 581,000 |
| MBX1628* | 3 | 2 | 71 | 330,000 |
| MBX1870 | 3 | 0 | 18 | N.D.** |
| MBX1870 | 2 | 2 | 25 | N.D.** |
| MBX1870 | 1 | 12 | 15 | N.D.** |
| MBX1928 | 5 | 0 | 31 | 455,000 |
| MBX1928* | 3 | 0 | 66 | 529,000 |
| MBX1928 | 2 | 0 | 42 | 669,000 |

* Los valores de los datos son promedios de dos experimentos separados.
 ** N.D. = no determinado

[0065] Las cepas con vías constitutivas de degradación de ácidos grasos (MBX1628 y MBX1870) incorporaron ácido glicólico en el producto de polímero cuando se alimentó 1,4-butanodiol, mientras que la cepa con vías de tipo salvaje (y de ahí no inducido) de degradación de ácidos grasos (MBX1928) no incorporaban ácido glicólico bajo las mismas condiciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producir un polímero de polihidroxicanoato comprendiendo ácido glicólico, en un organismo seleccionado del grupo que consta de levadura, bacterias, hongos, y plantas, el método comprendiendo:
- 5 (a) expresar en el organismo genes codificando un polihidroxicanoato (PHA) sintasa y enzimas para la formación de glicolil-CoA de 1,4-butanodiol; y
- (b) cultivar el organismo en la presencia de 1,4-butanodiol de manera que se forma y se incorpora glicolil-CoA en un polímero PHA;
- donde la vía para la degradación de ácidos grasos es inducida en el organismo; y donde las enzimas para la formación de glicolil-CoA incluye aldehído deshidrogenasa, diol óxidoreductasa, y acil-CoA transferasa.
- 10 2. Uso de un organismo, seleccionado a partir del grupo que consiste en levadura, bacterias, hongos, y plantas, para convertir 1,4- butanodiol en glicolil Co-A y por ello producir un polímero de polihidroxicanoato que comprende ácido glicólico, donde el organismo expresa genes codificando un polihidroxicanoato (PHA) sintasa y enzimas para la formación de glicolil-CoA incluyendo aldehído deshidrogenasa, diol oxidoreductasa, y acil-CoA transferasa; y donde la vía de degradación de ácidos grasos es inducida en el organismo.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o uso de la Reivindicación 2 donde la PHA sintasa es una sintasa de poli(3-hidroxicanoato) o poli(4-hidroxicanoato).
4. El método de la reivindicación 1 o uso de la Reivindicación 2 donde el organismo comprende además uno o más genes codificando enzimas seleccionadas del grupo que consiste en acetoacil-CoA reductasas y beta-ketoacil-CoA tiolasas.
- 20 5. El método de la reivindicación 1 o uso de la Reivindicación 2 donde la PHA sintasa es poli(3-hidroxicanoato) sintasa.
6. El método de la reivindicación 1 o uso de la Reivindicación 2 donde la PHA sintasa es poli(4-hidroxicanoato) sintasa.
- 25 7. El método de la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2 donde la PHA sintasa es poli(4-hidroxibutirato) sintasa.
8. El método de la reivindicación 1 o uso de la Reivindicación 2 donde el organismo es una bacteria.
9. El método de la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2 donde el organismo es *E. coli*.
10. El método de la reivindicación 1 o uso de la Reivindicación 2 donde el organismo es *E. coli* que tiene mutaciones seleccionadas de mutaciones constitutivas fadR601 y atoC.
- 30 11. El método de la reivindicación 1, o el uso de la Reivindicación 2, donde la aldehído deshidrogenasa es de *E. coli*, donde la diol óxidoreductasa es de *Klebsiella pneumoniae*, y donde la acil-CoA transferasa es de *Clostridium kluyveri*.
12. El método de la Reivindicación 1 o el uso de la Reivindicación 2 donde el polímero de polihidroxicanoato es poli(4-hidroxibutirato-co-glicolato).
- 35 13. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 ó 3 a 12 donde el polímero de polihidroxicanoato así producido está formado en fibras, películas, espumas, artículos moldeados, o un dispositivo médico, tal como un dispositivo médico seleccionado del grupo que consta de dispositivos para la liberación controlada de agentes de diagnóstico, profilácticos o terapéuticos; administración de fármacos; andamiajes o matrices en ingeniería de tejidos; dispositivos para encapsulación de células; dispositivos para la administración dirigida de agentes de diagnóstico, profilácticos o terapéuticos; revestimientos biocompatibles; implantes biocompatibles; dispositivos guiados de regeneración de tejidos; apósitos para heridas; dispositivos ortopédicos; prótesis y cementos óseos; dispositivos diagnósticos, varillas, tornillos óseos, grapas, suturas quirúrgicas, stents, y parches tales como parches para hernias y parches pericárdicos.
- 40 14. El método de la Reivindicación 13 donde el polímero de polihidroxicanoato así producido se forma en fibras y las fibras son usadas para hacer artículos sin tejer o tricotados útiles en telas, toallitas desechables y/o artículos sanitarios.
- 45 15. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 3 a 12 donde el polímero de polihidroxicanoato así producido se mezcla con otras sustancias, tales como polímeros biodegradables como ácido poliláctico, almidón o almidones químicamente modificados o poliésteres sintéticos que contienen ácido tereftálico, ácido succínico, 1, 4-butanodiol o ácido adípico como bloques de construcción y que pueden ser biodegradables.
- 50

16. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 3 a 12 donde el polímero polihidroxialcanoato así producido se formula con una ayuda de procesamiento seleccionada de nucleantes, plastificantes, agentes de reticulación, estabilizadores térmicos, colorantes, rellenos y agentes antibloqueantes.

Figura 1.

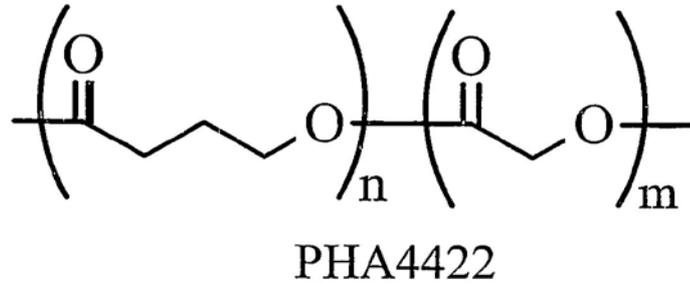


Figura 2.

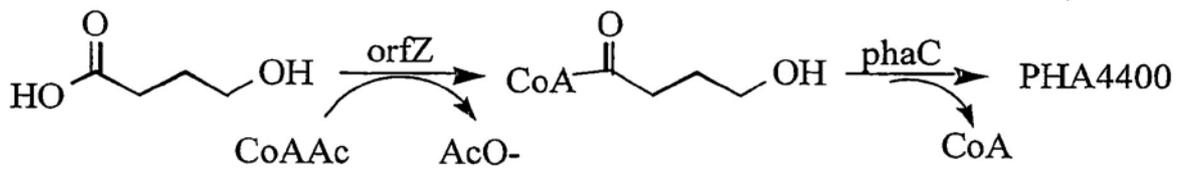


Figura 3.

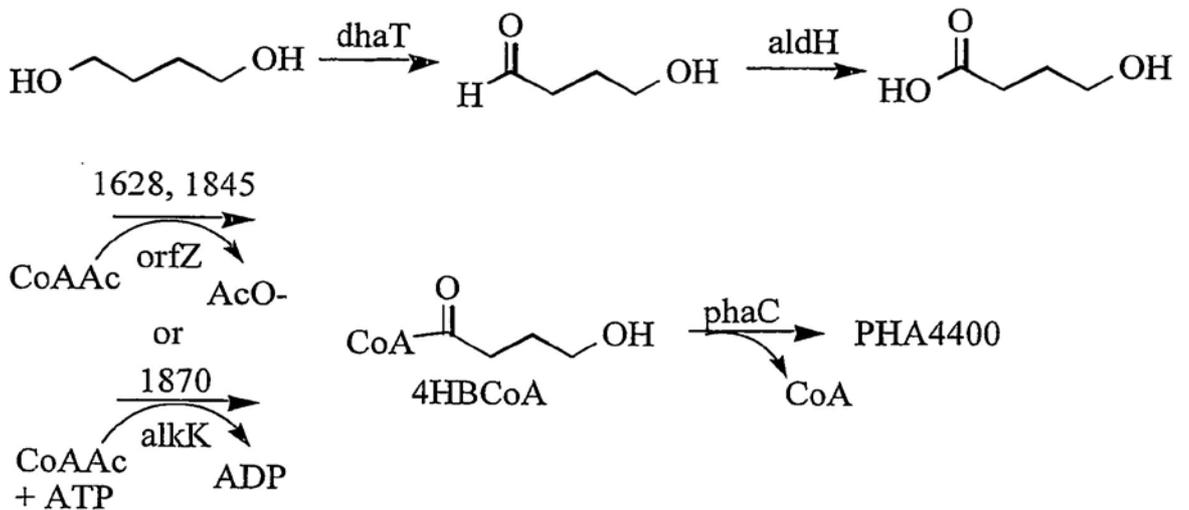


Figura 4.

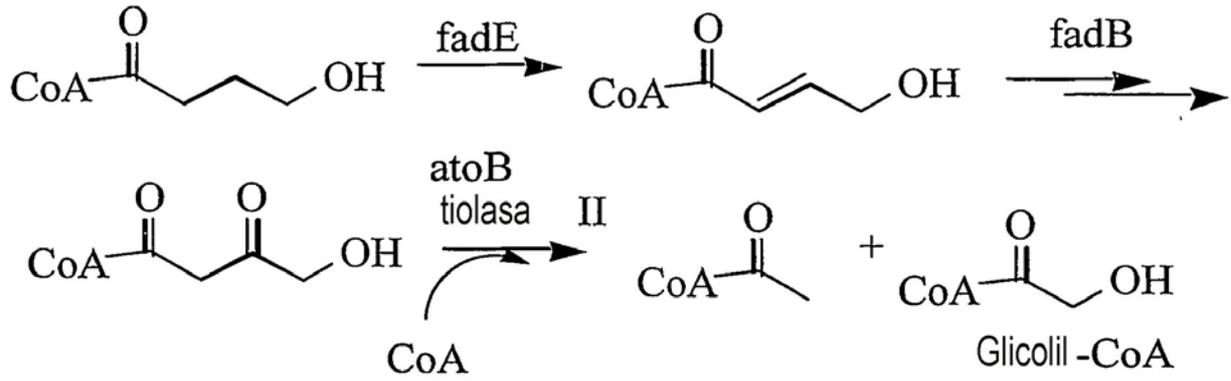


Figura 5.

