

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 282**

51 Int. Cl.:

C08G 63/90 (2006.01)

C08G 63/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14723154 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2970572**

54 Título: **Composiciones y dispositivos de poli-4-hidroxitbutirato**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201313801393

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

08.08.2017

73 Titular/es:

**TEPHA, INC. (100.0%)
99 Hayden Avenue East Wing Suite 360
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**MARTIN, DAVID, P.;
GUO, KAI y
WILLIAMS, SIMON, F.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 629 282 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

Composiciones y dispositivos de poli-4-hidroxibutirato

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a dispositivos médicos de poli-4-hidroxibutirato, a las composiciones utilizadas para producir estos dispositivos médicos y a los procesos utilizados para producir estas composiciones. Los dispositivos médicos pueden usarse en muchos tipos de aplicaciones de implantes incluyendo el tratamiento de
10 heridas, la cirugía general, la reparación de hernias, la reparación de nervios, la ingeniería de tejidos, la cirugía craneomaxilofacial ortopédica, la entrega de fármacos, la formación de imágenes cardiovasculares, vasculares, cardiológicas, urológicas, ginecológicas, dentales, la cirugía de oído, nariz y garganta, la cirugía plástica y cosmética y la cirugía oral.

15 **Antecedentes de la invención**

Puede producirse poli-4-hidroxibutirato (P4HB) y copolímeros del mismo usando métodos de fermentación transgénica, véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.548.569 de Williams et al., y se producen en el mercado, por ejemplo, por Tepha, Inc. (Lexington, MA). El poli-4-hidroxibutirato (P4HB, biomaterial TephaFLEX®) es
20 un poliéster termoplástico flexible, fuerte, que, a pesar de su vía de biosíntesis, tiene una estructura relativamente simple como se muestra en la Figura 1.

El polímero pertenece a una clase más amplia de materiales denominados polihidroxialcanoatos (PHA) que son producidos por numerosos microorganismos (véase, por ejemplo, Steinbüchel A., et al. *Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids, FEMS Microbiol. Lett.* 128:219-228 (1995)). En la naturaleza estos poliésteres se producen como gránulos de almacenamiento dentro de las células y sirven para regular el metabolismo energético. También son de interés comercial debido a sus propiedades termoplásticas, biodegradabilidad y facilidad relativa de
25 producción.

Los polímeros de PHA se han dividido en tres clases basándose en el número de átomos de carbono en sus subunidades. Los polímeros de PHA de cadena de longitud corta (o scl-PHA, del inglés *Short-chain-length PHA polymers*) están hechos de monómeros de 3 a 5 átomos de carbono. Los polímeros de PHA de cadena de longitud media (mcl-PHA, del inglés *Medium-chain-length PHA polymers*) contienen de 6 a 14 átomos de carbono en sus unidades monoméricas y los PHA de cadena de longitud larga (lcl-PHA, del inglés *long-chain-length PHAs*) tienen
30 monómeros con más de 14 carbonos. Las propiedades de estos polímeros varían drásticamente dependiendo de su longitud de cadena, incluyendo sus solubilidades y sus propiedades térmicas y mecánicas. El P4HB tiene cuatro átomos de carbono en su unidad monomérica y, por tanto, se clasifica como un scl-PHA.

Se ha intentado la síntesis química de P4HB, pero ha sido imposible producir el polímero con el peso molecular lo suficientemente alto como se necesita para la mayoría de aplicaciones (véase Hori, Y., et al., *Polymer* 36:4703-4705 (1995); Houk, K.N., et al., *J. Org. Chem.*, 2008, 73 (7), 2674-2678; y Moore, T., et al., *Biomaterials* 26:3771-3782 (2005)). De hecho, se ha calculado que es termodinámicamente imposible sintetizar químicamente un homopolímero de alto peso molecular en condiciones normales (Moore, T., et al., *Biomaterials* 26:3771-3782 (2005)).

Las Patentes de los EE.UU. N.º 6.245.537, 6.623.748, 7.244.442 y 8.231.889 describen métodos de fabricación de PHA con niveles bajos de endotoxina. Las Patentes de los EE.UU. N.º 6.548.569, 6.838.493, 6.867.247, 7.268.205, 7.179.883, 7.268.205, 7.553.923, 7.618.448 y 7.641.825 y el documento WO 2012/064526 describen el uso de PHA para fabricar dispositivos médicos. Se han desvelado métodos para controlar el peso molecular de polímeros de PHA en la Patente de los EE.UU. N.º 5.811.272 de Snell et al.
45

Se desvelan PHA con degradación controlada y degradación *in vivo* de menos de un año en la Patente de los EE.UU. N.º 6.548.569, 6.610.764, 6.828.357, 6.867.248 y 6.878.758 de Williams et al. y el documento WO 99/32536 de Martin et al. Se han revisado aplicaciones de P4HB en Williams, S.F., et al., *Polyesters*, III, 4:91-127 (2002) y en Martin, D. et al. *Medical Applications of Poly-4-hydroxybutyrate: A Strong Flexible Absorbable Biomaterial, Biochem. Eng. J.* 16:97-105 (2003). También se han desvelado dispositivos médicos y aplicaciones de P4HB en el documento WO 00/56376 de Williams et al. Varias patentes incluyendo las Patentes de los EE.UU. N.º 6.555.123, 6.585.994 y 7.025.980 describen el uso de PHA en la reparación y la ingeniería de tejidos. Las Patentes de los EE.UU. N.º 8.034.270, 8.016.883, 8.287.909, el documento WO 2011/119742 y el documento WO 2011/159784 desvelan fibras, materiales no tejidos y materiales textiles fabricados mediante extrusión de masas fundidas o hilado en seco de P4HB.
50
55
60

La Patente Alemana N.º DE 3937649A1 de Steinbüchel et al. desvela la producción de P4HB mediante fermentación. El polímero de P4HB se identificó por metanólisis de la biomasa usando cromatografía de gases. El polímero de P4HB, sin embargo, no se purificó a partir de la biomasa.

65

Dos solicitudes de patente, el documento WO 99/32536 de Martin y el documento WO 00/56376 de Williams desvelan un método de producción de P4HB en *Escherichia coli* K12 recombinante. La biomasa resultante que contenía el polímero de P4HB se fluidificó y se liofilizó, y el polímero de P4HB se extrajo con tetrahidrofurano, se filtró, se precipitó, se volvió a disolver en disolvente, se filtró de nuevo, se precipitó, se lavó y se liofilizó. Después de este proceso de purificación, se notificó que el polímero de P4HB tenía la siguiente composición mediante análisis elemental: carbono 55,63 %, hidrógeno 7,41 %, oxígeno 37,28 % y nitrógeno 41 ppm.

También se ha producido polímero de P4HB mediante los métodos desvelados en el documento EP 2534141 A1 de Van Walsem y en el documento WO 2013/023140 de Van Walsem.

Se ha notificado la producción de homopolímero de P4HB a partir de glucosa por Zhou et al. *Hyperproduction of poly(4hydroxybutyrate) from glucose by recombinant Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.* 11:54 (2012). El polímero de P4HB se purificó a partir de la biomasa.

Varias otras patentes han desvelado métodos para purificar otros polímeros de PHA a partir de biomasa, pero ninguna de estas otras composiciones de PHA o métodos de purificación se usan actualmente para producir implantes médicos autorizados o aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA). La Patente de los EE.UU. N.º 5.110.980 de Ramsay et al. desvela el uso de una solución de hipoclorito para digerir biomasa con el fin de extraer poli-3-hidroxicanoatos. La Patente de los EE.UU. N.º 5.942.597 de Noda et al. desvela la extracción con disolvente de polímeros de PHA con temperaturas de fusión de aproximadamente 80 °C o más a partir de biomasa. La Patente de los EE.UU. N.º 6.043.063 de Kurdikar et al. desvela la extracción directa con disolvente de determinados polímeros de PHA a partir de biomasa con disolventes no halogenados. El documento US 6.087.471 de Kurdikar et al. desvela el uso de presión y altas temperaturas para extraer con disolvente polímeros de PHA. La Patente de los EE.UU. N.º 7.070.966 de Schumann et al. desvela métodos para reducir la biomasa y descomponerla enzimáticamente. La Patente de los EE.UU. N.º 7.098.298 de Kinoshita et al. desvela la extracción de polímeros de PHA con un alcohol monohídrico que tiene de 4 a 10 átomos de carbono. La Patente de los EE.UU. N.º 7.118.897 de Narasimha et al. desvela la extracción de polímeros de PHA con disolventes a altas temperaturas y a presión, incluyendo el uso de etanol para extraer polímeros de PHA. La Patente de los EE.UU. N.º 7.226.765 de Narasimha et al. desvela la extracción con disolvente de polímeros de PHA a altas temperaturas. La Patente de los EE.UU. N.º 7.252.980 de Walsem et al. desvela la extracción con disolvente de polímeros de PHA y la recuperación usando centrifugación. La Patente de los EE.UU. N.º 7.393.668 de Yanagita et al. desvela un método para extraer polímeros de PHA a partir de biomasa por ruptura física en presencia de álcali, seguida de tratamiento del polímero de PHA separado con una enzima y/o un tensioactivo para retirar las impurezas que se adhieren al polímero de PHA. La Patente de los EE.UU. N.º 7.435.567 de Osakada et al. desvela métodos para purificar polímeros de PHA mediante la digestión de ácidos nucleicos con ácido hipocloroso. La Patente de los EE.UU. N.º 7.576.173 de Walsem et al. desvela la extracción de polímeros de PHA con combinaciones de disolventes. La Patente de los EE.UU. N.º 8.357.508 de Mantelatto desvela un método de extracción de polímeros de PHA a partir de biomasa mediante la inyección de disolventes de PHA en forma líquida y de vapor en la biomasa y calentando.

El uso de metanol para prelavado de biomasa de polímero de PHA que contiene 4-hidroxivalerato de *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* antes de la extracción con disolvente ha sido desvelado por Gorenflo et al. "Development of a process for the biotechnological production of 4-hydroxyvalerate-containing polyesters and characterization of their physical and mechanical properties", *Biomacromolecules* 2:45-57 (2001). El uso de metanol para prelavado de biomasa de *Pseudomonas putida* KT2440 que contiene polímeros de PHA de longitud de cadena media también ha sido desvelado por Jiang et al. "Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440", *J. Microbiol. Meth.* 67:212-219 (2006). Sin embargo, todavía había presentes impurezas con absorbancias de UV a 241 y 275 nm del polímero de mcl-PHA después del uso de metanol como etapa de prelavado y se necesitaron múltiples etapas adicionales para reducir su presencia. Los autores no identificaron adicionalmente estos contaminantes, pero comentaron que se sabe que los ácidos nucleicos y ácidos aromáticos absorben estas longitudes de onda. Además, el metanol es altamente tóxico para los seres humanos en cantidades pequeñas. *In vivo*, el metanol se metaboliza a través de formaldehído a ácido fórmico, que puede causar ceguera permanente por la destrucción del nervio óptico. La ingestión, la inhalación o la absorción de metanol pueden ser fatales. Por estas razones, el uso de metanol en la preparación de productos implantables debe evitarse y su uso en productos farmacéuticos está limitado y regulado por la FDA como un disolvente de Clase 2 (directriz de la Conferencia Internacional sobre la Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH, por sus siglas en inglés) para Impurezas Q3C de la industria: Disolventes Residuales, 1997).

En la fabricación de los implantes usando polímeros, es deseable que los materiales poliméricos tengan los niveles más bajos posibles de impurezas para evitar o minimizar la reacción del cuerpo a las impurezas. Dichas reacciones indeseables pueden incluir la inflamación, la citotoxicidad, la irritación, la pirogenicidad, la genotoxicidad, la carcinogenicidad y la toxicidad aguda, subcrónica y crónica. Las impurezas pueden ubicarse en tres amplias categorías, a saber, impurezas orgánicas, impurezas inorgánicas y disolventes residuales. La purificación de polímeros de PHA a un nivel al que sean adecuados para su uso en implantes es particularmente difícil debido a su producción en sistemas biológicos. Dicha producción requiere que el proceso de purificación retire una amplia gama de impurezas, incluyendo, por ejemplo, lípidos, proteínas, péptidos, metales pesados, endotoxinas, polisacáridos, ácidos nucleicos, aminoácidos, componentes de la pared celular, materias primas residuales y componentes de

medios residuales si los polímeros de PHA se derivan por fermentación. Estos últimos pueden incluir extracto de levadura, peptona de soja, agentes antiespumantes, antibióticos, sales, aminoácidos, metales traza, azúcares y tampones. La purificación se complica adicionalmente por la conocida afinidad de los polímeros de PHA por las proteínas, su solubilidad relativamente baja o su falta de solubilidad en la mayoría de los disolventes y las dificultades de retirar los disolventes de los polímeros a niveles aceptables. Y todas estas dificultades deben superarse sin dejar de proporcionar polímeros de PHA con buenos rendimientos.

Con el fin de mejorar la pureza y la biocompatibilidad de P4HB, es deseable identificar nuevos métodos de purificación que produzcan P4HB con niveles reducidos de: lípidos, residuos de ignición, contenido de nitrógeno, metales pesados y disolvente residual.

Por tanto un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones de P4HB con una pureza mejorada.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir P4HB con una pureza mejorada.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar implantes fabricados a partir de composiciones de P4HB con una pureza mejorada.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar métodos para el uso humano o animal de implantes de P4HB con una pureza mejorada.

Sumario de la invención

Se han desarrollado composiciones de P4HB con una alta pureza. Las composiciones se preparan mediante el lavado con disolvente de biomasa de P4HB antes de la extracción, precipitando después el P4HB en la solución.

Se han desarrollado métodos que permiten recuperar P4HB a partir de la biomasa de P4HB con los siguientes beneficios: (i) mayor pureza, en la que el polímero contiene menos de 100 ppm de lípidos ensayado como palmitato y menos de 40 ppm de nitrógeno; (ii) un buen rendimiento de polímero con una recuperación de más del 75 % del polímero a partir de la biomasa; (iii) una pérdida mínima de peso molecular del polímero durante la recuperación de manera que el polímero no pierda más del 10 % de su peso molecular promedio en peso durante la recuperación; (iv) un menor número de etapas de recuperación; (v) uso reducido de disolvente durante la extracción; (vi) secado más fácil del polímero; (vii) menor coste; y (viii) proceso global más rápido.

Las composiciones de P4HB altamente puras son adecuadas para la preparación de implantes. Los implantes pueden usarse para la reparación de tejidos blandos y duros.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura química del poli-4-hidroxitirato.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

"Poli-4-hidroxitirato" como se usa en general en el presente documento significa un homopolímero de unidades de 4-hidroxitirato. Puede denominarse en el presente documento P4HB o biomaterial TephafLEX® (fabricado por Tephaf, Inc., Lexington, MA).

"Copolímeros de poli-4-hidroxitirato" como se usa en general en el presente documento significa cualquier polímero de 4-hidroxitirato con una o más unidades diferentes de hidroxácido.

"Agente bioactivo" se usa en el presente documento para referirse a agentes terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico. Incluye sin limitación sustancias fisiológica o farmacológicamente activas que actúan local o sistémicamente en el cuerpo.

"Biocompatible", como se usa en general en el presente documento significa que la respuesta biológica al material o dispositivo es apropiada para la aplicación *in vivo* prevista del dispositivo. Cualquier metabolito de estos materiales también debe ser biocompatible.

"Mezcla" como se usa en general en el presente documento significa una combinación física de polímeros o componentes diferentes, a diferencia de un copolímero que comprende dos o más monómeros diferentes.

"Contenido de carbono" como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje en masa de carbono elemental en una muestra y se determina mediante análisis por combustión.

"Contenido de endotoxinas" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de endotoxina presente en una muestra y se determina mediante el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL).

5 "Contenido de hidrógeno" como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje en masa de hidrógeno elemental en una muestra y se determina mediante análisis por combustión.

10 "Contenido de metales pesados" como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje en masa de metales pesados en una muestra y se determina mediante el método de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, *United States Pharmacopeia*) <231>.

"Contenido de lípidos", como se usa en el presente documento se refiere a la concentración de lípidos en la muestra y se determina mediante análisis por CG después de butanolisis y se expresa en partes por millón (ppm) de ácido palmítico.

15 "Peso molecular" como se usa en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, se refiere al peso molecular promedio en peso (P_m), no al peso molecular promedio en número (P_n) y se mide mediante GPC con respecto a poliestireno.

20 "Contenido de nitrógeno", como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje en masa de nitrógeno elemental en una muestra y se determina mediante el método Kjeldahl de análisis de nitrógeno y se expresa en partes por millón (ppm).

"Contenido de disolvente residual" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de disolvente en una muestra y se determina mediante CG de espacio de cabeza-EM y se expresa en ppm.

25 "Residuo de ignición" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de sustancia residual no volatilizada de una muestra cuando se prende fuego en presencia de ácido sulfúrico y determinado mediante el método de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) <281>.

30 "Reabsorbible" como se usa en general en el presente documento significa que el material se descompone en el cuerpo y, finalmente, se elimina del cuerpo. Los términos "reabsorbible", "degradable", "erosionable" y "absorbible" se usan casi indistintamente en la bibliografía en el campo, con o sin el prefijo "bio". En el presente documento, estos términos se usan indistintamente para describir el material descompuesto y gradualmente absorbido o eliminado por el cuerpo, ya sea que la degradación sea debida principalmente a la hidrólisis o esté mediada por procesos metabólicos.

35 "Contenido de azufre", como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje en masa de azufre elemental en una muestra, se mide por espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente y se expresa en ppm.

40

II. Composición

45 En el presente documento se proporcionan composiciones que contienen P4HB, recuperado de una biomasa de P4HB con los siguientes beneficios: (i) mayor pureza; (ii) una pérdida mínima de peso molecular del polímero durante la recuperación; y (iii) disolvente residual disminuido. No existen restricciones particulares acerca del peso molecular promedio en peso del polímero de P4HB. Sin embargo, en una realización preferida, el peso molecular promedio en peso del polímero de P4HB varía de 20 kDa a 1200 kDa, más preferentemente de 50 kDa a 800 kDa e incluso más preferentemente de 200 kDa a 600 kDa.

50 El polímero de P4HB se extrae después de lavar la biomasa de P4HB con un disolvente adecuado para retirar las impurezas, por ejemplo, impurezas de lípidos y metales pesados.

A. Biomasa de P4HB

55 No existe ninguna restricción particular acerca del microorganismo que puede usarse a condición de que sea un microorganismo que sea capaz de producir y almacenar P4HB en sus células. En una realización preferida, la biomasa de P4HB se concentra mediante centrifugación antes de la purificación y se refrigera o se congela. No es necesario secar completamente la biomasa de P4HB, sin embargo, en una realización particularmente preferida, la biomasa de P4HB se seca hasta un contenido de humedad bajo de menos del 5 % de agua residual, o más preferentemente, de menos del 2 % de agua residual. Los métodos adecuados para el secado de la biomasa incluyen, pero no se limitan a, secado por pulverización, secado al vacío, liofilización o granulación por pulverización.

65 Los ejemplos de microorganismos adecuados que pueden usarse como fuentes de biomasa de P4HB, incluyendo microorganismos mutados y microorganismos modificados genéticamente para producir P4HB, incluyen microorganismos que pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Halobacterium*, *Nocardia*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Aguaspirillum*, *Paracoccus*, *Rhodospirillum*,

Pseudomonas, *Ralstonia*, *Zoogloea*, *Candida*, *Saccharomyces* y *Yarrowia*. Los microorganismos particularmente preferidos para la producción de biomasa de P4HB incluyen la cepa de *E. coli* MBX1177, un derivado de la cepa DH5 α seleccionado por su capacidad de crecer con ácido 4-hidroxibutírico como única fuente de carbono, transformado con pFS30, un plásmido que contiene los genes que codifican la PHA sintasa de *Ralstonia eutropha*, 4-hidroxi-butiril-CoA transferasa de *Clostridium kluyveri*, y β -lactamasa, como se desvela en el documento WO 99/32536 de Martin y el documento WO 00/56376 de Williams. Otros microorganismos que pueden usarse para producir biomasa de P4HB incluyen la cepa mutante SK2813 derivada de *A. eutrophus* JMP222 como se desvela por la Patente Alemana N.º DE 3937649A1 de Steinbüchel et al. y la cepa mutante de *E. coli* JM109 deficiente en genes de semialdehído succinato deshidrogenasa nativa y que alberga genes para la degradación de succinato de *Clostridium kluyveri* y PHB sintasa de *Ralstonia eutropha*, junto con genes para la expresión de cuatro proteínas de unión a PHA, desvelan Zhou et al. *Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.* 11:54 (2012).

Puede cultivarse microorganismos productores de P4HB adecuados mediante métodos conocidos en la técnica y notificados como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, por el documento WO 99/32536 de Martin, el documento WO 00/56376 de Williams, el documento EP 2534141 A1 de Van Walsem, el documento WO 2013/023140 de Van Walsem y las referencias en los mismos), sin ninguna restricción particular. Preferentemente, el microorganismo y las condiciones de cultivo se seleccionan para producir altos contenidos de P4HB. En una realización particularmente preferida, los microorganismos contienen al menos el 50 % en peso de P4HB medido como un porcentaje de peso de células secas.

B. Disolventes de soluciones de lavado

La biomasa de P4HB se suspende preferentemente en etanol y se lava a temperatura ambiente durante una hora. La relación del etanol a la biomasa de P4HB es preferentemente de aproximadamente 4 kg de etanol por kg de biomasa de P4HB. La cantidad óptima de etanol necesaria para lavar la biomasa dependerá de la biomasa de P4HB, de la materia prima utilizada para preparar la biomasa, del tiempo y la temperatura de lavado, del contenido de humedad de la biomasa y de la cantidad de lípidos y otras impurezas que se retiran en la etapa de lavado. También pueden usarse soluciones acuosas de etanol para lavar la biomasa aunque el lavado con etanol absoluto es el método preferido. Como alternativa, puede usarse etanol al 95 % (graduación del 95 %) u otras concentraciones acuosas de etanol.

III. Métodos de extracción de P4HB de mayor pureza

Se han desarrollado métodos que permiten recuperar P4HB a partir de la biomasa de P4HB con los siguientes beneficios: (i) mayor pureza; (ii) un buen rendimiento de polímero; (iii) una pérdida mínima de peso molecular del polímero durante la recuperación; (iv) un menor número de etapas de recuperación; (v) uso reducido de disolvente durante la extracción; (vi) secado del polímero más fácil; (vii) menor coste; y (viii) proceso global más rápido.

A. Lavado de la biomasa de P4HB

Se ha descubierto que el lavado de la biomasa de P4HB con etanol antes de la extracción del polímero de P4HB da como resultado la retirada de lípidos y otras impurezas que de otro modo pueden contaminar el polímero de P4HB extraído. Puesto que el etanol es un mal disolvente (es decir, no disolvente) para P4HB, pero un buen disolvente para lípidos, el lavado retira los lípidos pero no disuelve el P4HB. También se ha descubierto, que la biomasa de P4HB puede lavarse con etanol sin provocar ninguna transesterificación del polímero de P4HB y, por tanto, la etapa de lavado puede realizarse sin ninguna pérdida significativa de peso molecular del polímero. Además, se ha descubierto que el lavado del polímero de P4HB con etanol antes de la extracción retira las impurezas que pueden provocar una decoloración, o una coloración amarillenta, del producto purificado. En conjunto, estas mejoras permiten purificar el P4HB sin las múltiples etapas de precipitación que habitualmente se indican para la extracción de los polímeros de PHA.

Una de las principales ventajas del uso de etanol para lavar la biomasa de P4HB es su clasificación como disolvente de Clase 3 (directriz de la Conferencia Internacional sobre la Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH, por sus siglas en inglés) para Impurezas Q3C de la industria: Disolventes Residuales, 1997). Los disolventes de Clase 3 son los disolventes que se considera que tienen un bajo potencial tóxico para el hombre y no tienen límite de exposición fijado basado en la salud.

En una realización preferida, la biomasa de P4HB se suspende en etanol y se lava a temperatura ambiente durante una hora. La relación del etanol a la biomasa de P4HB es preferentemente de aproximadamente 4 kg de etanol por kg de biomasa de P4HB. La cantidad óptima de etanol necesaria para lavar la biomasa dependerá de la biomasa de P4HB, de la materia prima utilizada para preparar la biomasa, del tiempo y la temperatura de lavado, del contenido de humedad de la biomasa y de la cantidad de lípidos y otras impurezas que se retiran en la etapa de lavado. También pueden usarse soluciones acuosas de etanol para lavar la biomasa aunque el lavado con etanol absoluto es el método preferido. Como alternativa, puede usarse etanol al 95 % (graduación del 95 %) u otras concentraciones acuosas de etanol.

En una realización particularmente preferida, la biomasa de P4HB derivada de *E. coli* K12 recombinante se lava con etanol para retirar impurezas. Se ha descubierto que el uso de etanol para extraer las impurezas de la biomasa de P4HB de *E. coli* K12 es muy eficiente. Durante la etapa de lavado, el etanol normalmente se decolorará con un aspecto amarillento a medida que las impurezas se extraen en el etanol. Estas impurezas se han identificado principalmente como ácidos grasos saturados e insaturados mediante análisis por CG, siendo los ácidos grasos C16:0 y C18:1 y el oleato los más prevalentes. Al final de la etapa de lavado, el extracto de etanol concentrado (que tiene el aspecto de un alquitrán de color negro) tiene un alto contenido de nitrógeno que normalmente podría ser aproximadamente del 0,65 % en peso. Como tal, se ha demostrado que el lavado con etanol retira los contaminantes que contienen nitrógeno, así como los lípidos y los contaminantes coloreados.

Después del lavado con etanol, la biomasa puede separarse del lavado de etanol mediante un método de separación sólido-líquido y puede recogerse mediante cualquier medio adecuado. En una realización preferida, la biomasa de P4HB se recoge por filtración o centrifugación. Si se desea, puede realizarse un lavado adicional de la biomasa de P4HB recogida o la biomasa de P4HB puede aclararse con etanol o etanol acuoso durante la recogida. Aunque no es necesario secar completamente la biomasa de P4HB después de retirar el lavado de etanol, en una realización preferida, la biomasa de P4HB lavada con etanol se seca al aire. En una realización particularmente preferida, la biomasa de P4HB se seca a una concentración de etanol residual de entre el 1 y el 30 % en peso de etanol. Se ha descubierto que la presencia de mayores cantidades de etanol residual en la biomasa de P4HB lavada no afecta adversamente al rendimiento de recuperación del polímero o al peso molecular promedio en peso del producto.

En comparación con los procedimientos de extracción acuosa, se ha descubierto que el lavado de la biomasa con etanol produce una biomasa de P4HB que es más fácil de secar. Cuando se requiere una biomasa de P4HB seca, el lavado con etanol no solo retira las impurezas, sino que también desplaza el agua de la biomasa, lo que facilita considerablemente el secado. Como resultado, el lavado con etanol puede suponer un ahorro en los costes de secado y acelerar y simplificar el proceso de recuperación.

B. Extracción de biomasa de P4HB

Después de que la biomasa de P4HB se haya lavado con etanol, el polímero de P4HB puede extraerse con un disolvente. Idealmente, el polímero de P4HB tiene una alta solubilidad en disolventes utilizados para extraer el polímero. Los disolventes preferidos para la extracción del polímero de P4HB de la biomasa lavada con etanol incluyen cloruro de metileno, cloroformo, dicloroetano, tetracloroetano, tricloroetano, dibromometano, bromoformo, tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida y 1,4-dioxano. La relación de disolvente a biomasa depende del contenido de polímero de la biomasa y de la naturaleza del disolvente. Si se usa demasiado poco disolvente, la viscosidad de la solución de polímero extraído puede volverse demasiado alta haciendo difícil el procesamiento adicional de la solución de polímero. En una realización particularmente preferida, la cantidad necesaria de disolvente se ajusta de manera que se forme una solución de disolvente de polímero que contenga el 2-5 % en peso de polímero de P4HB hacia el final de la extracción.

Se ha descubierto que la cantidad de disolvente requerida para extraer el polímero de P4HB con un buen rendimiento se reduce significativamente cuando se usa etanol para lavar la biomasa antes de la extracción del polímero. Además de ahorrar el coste de un disolvente adicional, el volumen de extracción reducido también disminuye la cantidad de disolvente para el polímero de P4HB que posteriormente se necesita para precipitar el polímero en la solución de disolvente. Aunque se prefiere precipitar el polímero en la solución para proporcionar un polímero con la mayor pureza posible, se produce una reducción de los costes de evaporación del disolvente si el polímero simplemente se concentra después de la extracción y no se precipita.

C. Precipitación del polímero de P4HB y secado

El polímero de P4HB puede recogerse a partir de soluciones de disolventes de P4HB, que se han extraído de biomasa de P4HB lavada con etanol, mediante la precipitación del polímero con un no disolvente. Esto es preferible a la cristalización del polímero en una solución de disolvente, que puede requerir cantidades muy grandes de disolvente con el fin de producir un producto altamente puro y, por tanto, puede ser muy costosa.

El no disolvente utilizado para precipitar el polímero de P4HB en una solución en disolvente de P4HB es preferentemente un alcohol o alcohol acuoso que sea un mal disolvente para el polímero de P4HB. Pueden usarse agua, etanol, etanol acuoso y el metanol para precipitar el P4HB, sin embargo, el metanol no es un no disolvente preferido debido a la potencial toxicidad de los residuos de metanol en el producto purificado. En una realización particularmente preferida, el mismo tipo de disolvente (o una solución acuosa del disolvente) que se usa para lavar la biomasa de P4HB también se usa como el no disolvente para precipitar el polímero de P4HB en la solución de polímero de P4HB. Esto es particularmente deseable, ya que limita el número de disolventes utilizados en el proceso de extracción y, por tanto, limita el número de residuos de disolvente es necesario retirar y someter a ensayo en el producto purificado final. En una realización particularmente preferida, se usa etanol para lavar la biomasa de P4HB y se usa etanol o etanol acuoso como un no disolvente para precipitar el polímero en una solución en disolvente de P4HB. En una realización aún más preferida, la biomasa de P4HB se lava con etanol y el polímero se precipita en

una solución en disolvente de P4HB con soluciones acuosas de etanol que contienen el 30-80 % en peso de etanol. El P4HB puede lavarse después de la precipitación con etanol o una solución acuosa de etanol.

5 La relación de no disolvente a la solución en disolvente de P4HB que se requiere para precipitar el polímero de P4HB dependerá del no disolvente, del disolvente para el P4HB, de la temperatura, del peso molecular del P4HB y del rendimiento de recuperación deseado. En un procedimiento habitual, la relación de no disolvente de P4HB a disolvente de P4HB varía de 1:2 a 4:1 y más preferentemente es más cercana a 1:1.

10 No existen limitaciones particulares acerca de la temperatura que debe usarse para precipitar el polímero de P4HB en la solución de disolvente, sin embargo, la temperatura debe ser menor que el punto de ebullición de la solución de disolvente y mayor que su temperatura de congelación. En una realización preferida, la temperatura de la etapa de precipitación debe ser inferior a 50 °C y superior a 0 °C y más preferentemente a una temperatura inferior a 25 °C.

15 El polímero de P4HB precipitado puede recogerse por cualquier medio adecuado para la separación de sólidos y líquidos incluyendo el uso de filtración y centrifugación. El polímero de P4HB recogido puede lavarse adicionalmente con un no disolvente para P4HB. En una realización preferida, el polímero de P4HB recogido puede lavarse con etanol o etanol acuoso. El lavado adicional con etanol también puede usarse para desplazar el agua del polímero recogido con el fin de que sea más fácil secar el polímero de P4HB.

20 Una de las principales ventajas del método desvelado en el presente documento es que puede obtenerse un polímero de P4HB altamente puro con una única etapa de precipitación. Pueden realizarse etapas adicionales de precipitación volviendo a disolver el polímero de P4HB en un disolvente y repitiendo el procedimiento de precipitación. Sin embargo, en la realización preferida, el polímero de P4HB se purifica con una sola etapa de precipitación, lo que elimina el requisito de usar grandes cantidades de disolvente para la purificación de P4HB.

25 Después de recoger el polímero precipitado, se eliminan los disolventes del P4HB y se seca mediante cualquier medio adecuado. Los métodos adecuados para retirar el disolvente residual y secar el polímero incluyen el secado al aire y secado al vacío. También pueden usarse desecantes para secar el polímero y pueden usarse temperaturas elevadas para acortar el tiempo necesario para retirar el disolvente residual y secar el polímero.

D. Comparación de métodos de purificación

35 En los procedimientos desvelados anteriormente por el documento WO 99/32536 de Martin y el documento WO 00/56376 de Williams, se usó un proceso de cinco etapas para purificar el P4HB. Las etapas incluyen: (a) una etapa para fluidificar y liofilizar la biomasa de P4HB, (b) una etapa para extraer el polímero de P4HB con tetrahidrofurano (THF) a 60 °C y filtrar la materia insoluble, (c) una etapa para precipitar el polímero de P4HB en agua, (d) una etapa para volver a disolver el polímero de P4HB en disolvente y filtrarlo de nuevo para retirar la materia insoluble y (e) una etapa para precipitar el polímero, lavar el polímero y liofilizar el polímero. Este proceso produce un polímero de P4HB con la siguiente especificación: (i) contenido de carbono del 55,63 %; (ii) contenido de hidrógeno del 7,41 %; y contenido de nitrógeno de 41 ppm. El contenido de lípidos del polímero de P4HB no se desvela en el documento WO 99/32536 de Martin ni en el documento WO 00/56376 de Williams, sin embargo, con fines comparativos, se determinó como se describe en el Ejemplo 5 y se descubrió que es de aproximadamente 900 ppm de ácido graso de palmitato (véase el Ejemplo 6).

45 Por el contrario, los nuevos métodos desarrollados y desvelados en el presente documento, permiten purificar el polímero de P4HB esencialmente en tres etapas: (a) una etapa para lavar la biomasa que contiene P4HB con etanol, (b) una etapa para extraer con disolvente la biomasa de P4HB y filtrar la materia insoluble y (c) una etapa para precipitar el polímero de P4HB en el disolvente con un sistema de no disolvente de alcohol acuoso, lavar el polímero de P4HB con etanol o etanol acuoso y eliminar el disolvente y secar el polímero de P4HB. El nuevo proceso no solo tiene significativamente menos etapas, sino que también produce un polímero de P4HB de mayor pureza. La siguiente tabla muestra una comparación una al lado de la otra de las etapas de extracción de P4HB desveladas en el documento WO 99/32536 y el método de extracción descrito en la presente solicitud

WO 99/32536	Método desvelado
Fluidificar y liofilizar	Lavar la biomasa con etanol
Extraer el PHA con THF	Extraer con disolvente el P4HB y filtrar la materia insoluble
Precipitar el P4HB en agua	-
Redisolver el P4HB en THF y retirar las impurezas	-
Precipitar el P4HB en el disolvente, lavar y liofilizar el polímero	Precipitar el P4HB del disolvente en no disolvente, lavar, eliminar los disolventes y secar

55 En una realización preferida, la pureza del polímero de P4HB purificado de acuerdo con los métodos descritos en las secciones IIA, IIB y IIC cumple con la siguiente especificación: (i) contenido de carbono del 55,81 % ± 0,5 %; (ii)

contenido de hidrógeno del 7,02 % ± 0,3 %; (iii) contenido de lípidos de <100 ppm (medido como palmitato); (iv) contenido de disolvente residual <5 ppm; (v) contenido de 4-hidroxibutirato del 99,7 % ± 2 % en peso; (vi) residuo tras la ignición del <0,2 %; (vii) contenido de metales pesados de <20 ppm; y contenido de azufre de <50 ppm. Como se muestra en el Ejemplo 2, el nuevo proceso también produce un polímero de P4HB con un contenido de nitrógeno de menos de 40 ppm.

IV: Métodos de fabricación de implantes con P4HB de alta pureza

Los implantes fabricados usando polímero de P4HB de alta pureza tienen propiedades sustancialmente mejoradas para muchas aplicaciones médicas. En particular, estos implantes son biocompatibles, reabsorbibles, tienen bajos niveles de impurezas orgánicas, impurezas inorgánicas y disolventes residuales que puedan reaccionar con el cuerpo tras la implantación. Los bajos niveles de estas impurezas reducirán o minimizarán las reacciones indeseables tales como la inflamación, la citotoxicidad, la irritación, la pirogenicidad y la toxicidad subcrónica y crónica. Los dispositivos fabricados con o que incluyen P4HB de alta pureza pueden prepararse con un contenido de endotoxina de menos de 20 unidades de endotoxina por dispositivo.

Los implantes fabricados con o que incluyen polímero de P4HB de alta pureza y mezclas que contienen P4HB, pueden usarse para la reparación, la regeneración y el reemplazo de tejido blando y duro. Estos implantes pueden usarse en dispositivos médicos, incluyendo, pero no limitados a: sutura, sutura con espículas, sutura trenzada, sutura con monofilamento, sutura híbrida de fibras de monofilamento y multifilamento, trenzados, ligaduras, mallas de punto o tejidas, tubos de punto, catéteres, mallas de monofilamento, mallas de multifilamento, parches, dispositivo de cicatrización de heridas, vendaje, vendaje de cicatrización de heridas, apósitos para quemaduras, apósitos para úlceras, sustituto de la piel, hemostático, dispositivo de reconstrucción traqueal, dispositivo de rescate de órganos, sustituto de la duramadre, parche de la duramadre, guía del nervio, dispositivo de regeneración o reparación nerviosa, dispositivo de reparación de hernia, malla de hernia, tapón de hernia, dispositivo para herida temporal o soporte de tejidos, armazón de ingeniería de tejidos, dispositivo de reparación/regeneración tisular guiada, membrana antiadhesión, barrera antiadhesión, membrana de separación de tejidos, membrana de retención, cabestrillo, dispositivo para reconstrucción del suelo pélvico, dispositivo de suspensión uretral, dispositivo para el tratamiento de la incontinencia urinaria, dispositivo para el tratamiento del reflujo vesicoureteral, dispositivo de reparación de la vejiga, dispositivo de reparación del músculo del esfínter, partículas inyectables, microesferas inyectables, dispositivo de formación de volumen o de carga, armazón de médula ósea, pinza, abrazadera, tornillo, pasador, clavo, clavo de la cavidad medular, placa ósea, tornillo de interferencia, tachuela, sujeción, remache, grapa, dispositivo de fijación para un implante, sustituto de injerto óseo, relleno de huecos óseos, anclaje de sutura, anclaje óseo, dispositivo de reparación de ligamento, dispositivo de aumento de ligamento, injerto de ligamento, dispositivo de reparación del ligamento cruzado anterior, dispositivo de reparación de tendón, injerto de tendón, dispositivo de aumento de tendón, dispositivo de reparación del manguito rotador, dispositivo de reparación del menisco, dispositivo de regeneración del menisco, dispositivo de reparación del cartílago articular, dispositivo de reparación osteocondral, dispositivo de fusión espinal, dispositivo para el tratamiento de la osteoartritis, viscosuplemento, endoprótesis vascular, incluyendo endoprótesis vasculares coronarias, cardiovasculares, periféricas, uretrales, uretrales, urológicas, gastroenterológicas, nasales, oculares o neurológicas y recubrimientos de endoprótesis vasculares, injerto de endoprótesis vascular, parche cardiovascular, globo de catéter, dispositivo de cierre vascular, dispositivo de reparación de la comunicación intracardiaca, incluyendo pero no limitado a dispositivos de reparación de la comunicación interauricular y dispositivos de cierre del PFO (foramen oval permeable, por sus siglas en inglés), dispositivos de cierre de la orejuela auricular izquierda (LAA, por sus siglas en inglés), parche de pericardio, válvula venosa, válvula del corazón, injerto vascular, dispositivo de regeneración miocárdica, malla periodontal, membrana de regeneración tisular guiada del tejido periodontal, implante de células oculares, dispositivo de formación de imágenes, implante coclear, dispositivo de embolización, dispositivo de anastomosis, dispositivo de siembra de células, dispositivo de encapsulación de células, dispositivo de liberación controlada, dispositivo de entrega de fármacos, dispositivo de cirugía plástica, dispositivo de elevación mamaria, dispositivo de mastopexia, dispositivo de reconstrucción mamaria, dispositivo de aumento mamario (incluyendo dispositivos para el uso con implantes mamarios), dispositivo de reducción mamaria (incluyendo dispositivos para la retirada, el remodelado y la reorientación del tejido mamario), dispositivos para la reconstrucción mamaria después de la mastectomía con o sin implantes mamarios, dispositivo reconstructivo facial, dispositivo de estiramiento de la frente, dispositivo de elevación de las cejas, dispositivo de elevación de los párpados, dispositivo de estiramiento facial, dispositivo de ritidectomía, dispositivo de elevación con hilo (para elevar y sostener las zonas flácidas de la cara, la frente y el cuello), dispositivo de rinoplastia, dispositivo para el aumento malar, dispositivo de otoplastia, dispositivo de estiramiento de cuello, dispositivo de mentoplastia, dispositivo de reparación cosmética y dispositivo para la revisión de cicatrices faciales.

Un agente biológicamente activo es una sustancia utilizada, por ejemplo, para el tratamiento, prevención, diagnóstico, curación o mitigación de una enfermedad o trastorno, una sustancia que afecta a la estructura o función del cuerpo, o profármacos, que se convierten en biológicamente activos o más activos después de haber sido situados en un entorno fisiológico predeterminado. Los agentes bioactivos incluyen sustancias biológicamente, fisiológicamente o farmacológicamente activas que actúan localmente o sistémicamente en el cuerpo humano o animal. Los ejemplos pueden incluir, pero no se limitan a, fármacos de molécula pequeña, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, moléculas que afectan a la migración celular, moléculas que afectan a la división

celular, moléculas que afectan a la proliferación y a la diferenciación celular, moléculas que estimulan la modificación fenotípica de las células, moléculas que afectan a la angiogénesis, moléculas que afectan a la vascularización, moléculas que afectan a la disposición de la matriz extracelular, ligandos de señalización, polímeros de plasma rico en plaquetas, péptidos, proteínas, anticuerpos, factores de crecimiento, fibronectina, laminina, vitronectina, integrinas, antibióticos, esteroides, hidroxiapatita, partículas de plata, vitaminas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, quitosano y derivados del mismo, alginato y derivados del mismo, colágeno, azúcares, polisacáridos, nucleótidos, oligonucleótidos, lípidos, ácido hialurónico y derivados del mismo, moléculas antisentido, aptámeros, ARNip, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. "Agente bioactivo" incluye un único agente de este tipo y también se pretende que incluya una pluralidad.

La presente invención se entenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Lavado de biomasa de P4HB con etanol

Una biomasa que contiene P4HB (P_m de 468 kDa, mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) con respecto a patrones de poliestireno), preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO 99/32536 de Martín, se suspendió en etanol a temperatura ambiente. Después de una hora, la biomasa de P4HB se retiró por filtración y el lavado de etanol se concentró para producir un alquitrán de color negro. El análisis del alquitrán por RMN- 1H demostró que el extracto de etanol de la biomasa de P4HB estaba compuesto casi en su totalidad de lípidos saturados e insaturados. También se determinó el contenido de nitrógeno del alquitrán y se descubrió que era del 0,65 % en peso.

Ejemplo 2: Purificación de biomasa de P4HB lavada con etanol

La biomasa de P4HB lavada con etanol derivada del Ejemplo 1 se centrifugó en una centrífuga de cesta para retirar la mayor parte de la solución de lavado con etanol. El polímero de P4HB se extrajo en un disolvente orgánico, se precipitó en etanol acuoso (30 %) y se recogió para el análisis. Se descubrió que el contenido de nitrógeno del polímero de P4HB extraído de la biomasa de P4HB lavada con etanol era de 37 ppm según se determinó mediante el método Kjeldahl (Bradstreet, *Anal. Chem.*, 26(1):185-187 (1954)). Las fracciones de masa de carbono e hidrógeno del polímero de P4HB purificado se determinaron mediante análisis por combustión elemental usando un instrumento LECO CHN 2000 (siguiendo las instrucciones del fabricante) y se descubrió que eran del 55,89 % y el 7,05 %, respectivamente. Estos valores se parecen a los valores teóricos para poli-4-hidroxibutirato: carbono 55,81 % e hidrógeno 7,02 %. No se observó ninguna pérdida significativa de peso molecular del polímero de P4HB. El peso molecular promedio en peso del polímero de P4HB purificado se determinó mediante GPC con respecto a poliestireno y se descubrió que era de 449 kDa (frente a 468 kDa antes de la purificación) lo que indica que la etapa de lavado con etanol no provocó ninguna pérdida de peso molecular por transesterificación del P4HB con etanol. La pureza del polímero de P4HB se determinó mediante análisis por CG (cromatografía de gases) (como se describe en el Ejemplo 3) y se descubrió que era del 99,5 %. El análisis por RMN de protón del polímero de P4HB purificado demostró que el polímero era de alta pureza con poca evidencia de lípidos contaminantes a 1,2 ppm en el espectro de RMN. El contenido de endotoxinas del polímero de P4HB purificado era de 0,22 unidades de endotoxina (UE)/g que es lo suficientemente bajo para permitir la fabricación de implantes usando P4HB con un contenido de endotoxinas de menos de 20 unidades de endotoxina por dispositivo.

Ejemplo 3: Análisis de pureza de P4HB por CG

La pureza de un polímero de P4HB en una muestra desconocida puede medirse mediante cromatografía de gases después de la derivatización del polímero usando una reacción de butanólisis para formar ésteres volátiles. La reacción de butanólisis es una reacción de transesterificación catalizada por ácido con 1-butanol, que convierte el polímero de P4HB en dos derivados principales, butil-4-hidroxibutirato y butil-4-clorobutirato. Este último produce un pico agudo en el cromatógrafo de CG que puede ser integrado fácilmente y su pico es proporcional a la cantidad de P4HB en la muestra.

El reactivo para la reacción de butanólisis se prepara mezclando partes iguales (v/v) de 1-butanol y ácido clorhídrico 4 M (HCl) en 1,4-dioxano para producir una solución de HCl 2 M en butanol/dioxano. Puede añadirse a la solución un patrón interno, tal como difenilmetano, a una concentración de 2,0 mg/ml para normalizar los volúmenes de inyección.

La reacción de butanólisis se realiza mediante la adición de 3 ml del reactivo de butanólisis (preparado como se ha descrito anteriormente) a una masa conocida de una muestra de P4HB (aproximadamente 25 mg) en un vial. El vial se cierra herméticamente y se calienta a 90-92 °C durante 16-20 horas. (Puede generarse una curva patrón mediante la butanólisis de cantidades conocidas de gamma-butirolactona (GBL) de alta pureza) Después de calentar, los viales se dejan enfriar, se añaden 3 ml de agua y el contenido del vial se mezcla minuciosamente y después se deja que se separe. Después, el contenido de P4HB en la muestra puede determinarse mediante el análisis por CG de la capa orgánica separada en el vial, usando las muestras patrón de GBL para crear una curva patrón.

El análisis por CG se realiza mediante la inyección de 1 µl de la fase orgánica que contiene los ésteres butílicos volátiles en un cromatógrafo de gases adecuado. Una configuración de CG adecuada comprende un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) equipado con un automuestreador, un detector de ionización de llama y una columna capilar SPB-35 de Supelco, Inc. (PA, EE.UU.) (30 m x 0,25 mm x 0,25 micrómetros) con helio utilizado como gas vehículo a 2 ml/min. La temperatura de entrada se fija a 225 °C y la relación de división es 50:1. El programa de temperatura del horno se fija a 80 °C durante 2 min, aumentando 10 °C por minuto hasta 280 °C y manteniendo a 280 °C durante 2 minutos. En el detector, la temperatura se fija a 290 °C, el caudal de hidrógeno es de 40 ml/min, la constitución del gas helio se establece en 45 ml/min y el caudal de aire del detector se fija a 450 ml/min.

La masa de 4HB en el polímero de P4HB se determina a partir integración del pico agudo de butil-4-clorobutirato en el cromatógrafo de CG. La masa de 4HB en la muestra puede determinarse a partir de la curva patrón de GBL (trazada como la masa frente al área integral del pico de butil-4-clorobutirato. La pureza de la muestra se determina como el porcentaje en masa de 4HB respecto al número de veces de masa de polímero 100 %. La pureza del P4HB purificado por métodos descritos en el presente documento es del 99,7 +/- 2 % en peso.

Ejemplo 4: Ejemplo adicional de purificación de P4HB a partir de biomasa de P4HB

Una biomasa de P4HB preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO 99/32536 de Martin et al. puede prelavarse con etanol para retirar los contaminantes y ácidos grasos coloreados antes de la extracción con disolvente del polímero usando el siguiente procedimiento.

La biomasa de P4HB seca se suspende en etanol absoluto a una relación de 1 kg de biomasa a 4 kg de etanol y la mezcla se agita enérgicamente durante una hora a temperatura ambiente. La suspensión de biomasa resultante se transfiere a una centrifuga de cesta y la suspensión se centrifuga para retirar el disolvente de lavado. Durante la centrifugación, un lavado adicional con etanol se realiza para desplazar aún más el disolvente de lavado. Se realiza una centrifugación para reducir el contenido de disolvente residual de la biomasa a menos del 15 % en peso. Después del lavado, la biomasa se retira de la centrifuga, se analiza para determinar los compuestos volátiles residuales y se recoge para la extracción del polímero.

La biomasa lavada recogida se transfiere a un recipiente de extracción y se extrae en un disolvente adecuado a una temperatura elevada durante 4 horas. Los disolventes de extracción adecuados incluyen: disolventes orgánicos polares, tales como cloroformo, diclorometano, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetona, dioxano y mezclas de éstos. Después de completar la extracción, el extracto se filtra para retirar los residuos celulares y la materia insoluble y el polímero se precipita mediante el bombeo del filtrado en un no disolvente para P4HB. Una solución de etanol y agua (etanol al entre 30-80 % en peso) se usa como no disolvente. Cuando el filtrado se bombea en esta solución acuosa de etanol, el P4HB precipita en forma de un sólido y se recoge y se lava adicionalmente con etanol. Después del lavado, el polímero de P4HB recogido se transfiere a un horno de secado al vacío y se seca a 45 °C al vacío.

Ejemplo 5: Análisis del contenido de ácidos grasos (lípidos) de P4HB por CG

El análisis de ácidos grasos en una muestra de P4HB se realiza de una manera similar al análisis de pureza de butanólisis por CG del Ejemplo 3, excepto porque se usa un ácido graso como patrón cuantitativo, en lugar de GBL. El palmitato de ácido graso, o su éster metílico, es un patrón adecuado. La reacción de butanólisis convierte los ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos, en los correspondientes ésteres butílicos de ácidos grasos. Estos ésteres volátiles se analizan mediante inyección en una CG como en el Ejemplo 3. Se usa ácido palmítico, el lípido más prevalente en animales, plantas y microorganismos, como un lípido o ácido graso representativo para evaluar la pureza y el contenido de lípidos de una muestra, a pesar de que también pueden estar presentes otros ácidos grasos o lípidos en la muestra. Se genera una curva patrón para el área del pico de palmitato de butilo frente a su masa y se usa para determinar el contenido de ácidos grasos de la muestra de P4HB. La concentración de ácidos grasos se notifica como ppm de ácido graso palmitato.

Ejemplo 6: Determinación del nivel de lípidos en el polímero de P4HB purificado de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO 99/32536 de Martin

Se analizaron por triplicado siete muestras de polímero de P4HB purificado de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO 99/32536 de Martin para determinar el contenido de lípidos como en Ejemplo 5. Se descubrió que la cantidad de lípido en las muestras estaba en un intervalo de 304 a 2207 ppm y se descubrió que el promedio era de 873 ppm, con una desviación típica de 629 ppm.

En comparación, se descubrió que el contenido de lípidos residuales encontrado en muestras de P4HB purificado por el método del Ejemplo 2 era inferior a 100 ppm.

Ejemplo 7: Determinación del contenido de metales pesados, residuo de ignición, disolvente residual y contenido de azufre en polímero de P4HB de alta pureza

- 5 Se analizó el polímero de P4HB purificado de acuerdo con el método descrito en el presente documento para determinar el contenido de metales pesados, residuo de ignición, la presencia de disolvente residual y el contenido de azufre. El contenido de metales pesados del polímero se determinó mediante USP <231> (un procedimiento colorimétrico basado en la precipitación de sulfuros metálicos insolubles) y se descubrió que era de <20 ppm. El residuo tras la ignición del polímero purificado se determinó mediante USP <281> y se descubrió que era del <0,1 %.
- 10 La cantidad de disolvente residual en el polímero se midió por CG de espacio de cabeza-EM usando un HP 5890 II GC equipado con un detector 5972 MS y una columna capilar ZB-5 (60 m x 0,32 mm DI x 1 µm FC). Las muestras de polímero se calentaron en viales tapados a 130 °C durante una hora antes del análisis. Se descubrió que el contenido de disolvente residual del polímero de P4HB era de <5 ppm. El contenido de azufre del polímero de P4HB purificado se determinó por espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente y se descubrió que era de <50 ppm.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende polímero de poli-4-hidroxibutirato, teniendo la composición un contenido de lípidos de menos de 100 ppm de ácido palmítico medido mediante análisis por cromatografía de gases después de butanólisis.
2. La composición de la reivindicación 1, que tiene al menos una propiedad seleccionada entre el grupo que consiste en: (i) un contenido de nitrógeno de 40 ppm o menos determinado por el método Kjeldahl de análisis de nitrógeno; (ii) un contenido de carbono del 55,81 % \pm 0,5 % determinado mediante análisis por combustión elemental; y (iii) un contenido de hidrógeno del 7,02 % \pm 0,3 % determinado mediante análisis por combustión elemental.
3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 en donde la composición tiene: (a) un contenido de disolvente residual de menos de 5 ppm determinado por cromatografía de gases de espacio de cabeza-espectrometría de masas (CG-EM); (b) un contenido de 4-hidroxibutirato en el poli-4-hidroxibutirato del 99,7 % \pm 2 % en peso determinado por cromatografía de gases; (c) un residuo tras la ignición de menos del 0,2 % determinado por el método de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) <281>; (d) un contenido de metales pesados inferior a 20 ppm determinado por el método de la USP <231>; o (e) un contenido de azufre de menos de 50 ppm determinado por espectroscopía de emisión óptica de plasma.
4. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 en donde la composición se produce mediante el lavado con etanol de una biomasa que comprende el polímero, preferentemente en donde la biomasa se lava con al menos 4 gramos de etanol por gramo de biomasa y/o en donde la biomasa deriva de un microorganismo, tal como *Escherichia coli* K12.
5. La composición de la reivindicación 4 en donde el polímero se extrae con un disolvente de la biomasa lavada con etanol, y opcionalmente en donde el polímero se precipita en el disolvente con un no disolvente para el polímero, se recoge y se seca.
6. La composición de la reivindicación 5 en donde el disolvente se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, dioxano, acetato de etilo, carbonato de dimetileno, sulfóxido de dimetilo, dimetil formamida, metil etil cetona, acetato de butilo, propionato de butilo y carbonato de dietilo.
7. La composición de la reivindicación 5 en donde el no disolvente para el polímero es un alcohol; alcohol acuoso, tal como etanol acuoso o agua.
8. La composición de la reivindicación 7 en donde el no disolvente para el polímero comprende etanol y el etanol se usa para lavar la biomasa.
9. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 en donde la composición se usa para formar un dispositivo médico con un nivel de pirógenos de menos de 20 unidades de endotoxina por dispositivo determinado por el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*.
10. Un dispositivo médico formado de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el dispositivo se esteriliza con gas de óxido de etileno frío, irradiación gamma o irradiación de haz de electrones.
11. El dispositivo médico de la reivindicación 10 en donde el dispositivo se usa para la reparación, la regeneración o la sustitución de tejido blando o duro y opcionalmente en donde el dispositivo es un implante para la reparación, la regeneración o la sustitución de tejido blando o duro.
12. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 en donde la composición se usa como un recubrimiento sobre un dispositivo médico.
13. El dispositivo médico de la reivindicación 10 en donde el dispositivo se selecciona entre el grupo: sutura, sutura con espículas, sutura trenzada, sutura con monofilamento, sutura híbrida de fibras de monofilamento y multifilamento, trenzados, ligaduras, mallas de punto o tejidas, tubos de punto, catéteres, mallas de monofilamento, mallas de multifilamento, parches, dispositivo de cicatrización de heridas, vendaje, vendaje de cicatrización de heridas, apósitos para quemaduras, apósitos para úlceras, sustituto de la piel, hemostático, dispositivo de reconstrucción traqueal, dispositivo de rescate de órganos, sustituto de la duramadre, parche de la duramadre, guía del nervio, dispositivo de regeneración o reparación nerviosa, dispositivo de reparación de hernia, malla de hernia, tapón de hernia, dispositivo para herida temporal o soporte de tejidos, armazón de ingeniería de tejidos, dispositivo de reparación/regeneración tisular guiada, membrana antiadhesión, barrera antiadhesión, membrana de separación de tejidos, membrana de retención, cabestrillo, dispositivo para reconstrucción del suelo pélvico, dispositivo de suspensión uretral, dispositivo para el tratamiento de la incontinencia urinaria, dispositivo para el tratamiento del reflujo vesicoureteral, dispositivo de reparación de la vejiga, dispositivo de reparación del músculo del esfínter, partículas inyectables, microesferas inyectables, dispositivo de formación de volumen o de carga, armazón de médula ósea, pinza, abrazadera, tornillo, pasador, clavo, clavo de la cavidad medular, placa ósea, tornillo de

interferencia, tachuela, sujeción, remache, grapa, dispositivo de fijación para un implante, sustituto de injerto óseo, relleno de huecos óseos, anclaje de sutura, anclaje óseo, dispositivo de reparación de ligamento, dispositivo de aumento de ligamento, injerto de ligamento, dispositivo de reparación del ligamento cruzado anterior, dispositivo de reparación de tendón, injerto de tendón, dispositivo de aumento de tendón, dispositivo de reparación del manguito rotador, dispositivo de reparación del menisco, dispositivo de regeneración del menisco, dispositivo de reparación del cartílago articular, dispositivo de reparación osteocondral, dispositivo de fusión espinal, dispositivo para el tratamiento de la osteoartritis, viscosuplemento, endoprótesis vascular, incluyendo endoprótesis vasculares coronarias, cardiovasculares, periféricas, ureterales, uretrales, urológicas, gastroenterológicas, nasales, oculares o neurológicas y recubrimientos de endoprótesis vasculares, injerto de endoprótesis vascular, parche cardiovascular, globo de catéter, dispositivo de cierre vascular, dispositivo de reparación de la comunicación intracardíaca, incluyendo pero no limitado a dispositivos de reparación de la comunicación interauricular y dispositivos de cierre del PFO (foramen oval permeable), dispositivo de cierre de la orejuela auricular izquierda (LAA), parche de pericardio, válvula venosa, válvula del corazón, injerto vascular, dispositivo de regeneración miocárdica, malla periodontal, membrana de regeneración tisular guiada del tejido periodontal, implante de células oculares, dispositivo de formación de imágenes, implante coclear, dispositivo de embolización, dispositivo de anastomosis, dispositivo de siembra de células, dispositivo de encapsulación de células, dispositivo de liberación controlada, dispositivo de entrega de fármacos, dispositivo de cirugía plástica, dispositivo de elevación mamaria, dispositivo de mastopexia, dispositivo de reconstrucción mamaria, dispositivo de aumento mamario (incluyendo dispositivos para el uso con implantes mamarios), dispositivo de reducción mamaria (incluyendo dispositivos para la retirada, el remodelado y la reorientación del tejido mamario), dispositivos para la reconstrucción mamaria después de la mastectomía con o sin implantes mamarios, dispositivo reconstructivo facial, dispositivo de estiramiento de la frente, dispositivo de elevación de las cejas, dispositivo de elevación de los párpados, dispositivo de estiramiento facial, dispositivo de ritidectomía, dispositivo de elevación con hilo (para elevar y sostener las zonas flácidas de la cara, la frente y el cuello), dispositivo de rinoplastia, dispositivo para el aumento malar, dispositivo de otoplastia, dispositivo de estiramiento de cuello, dispositivo de mentoplastia, dispositivo de reparación cosmética y dispositivo para la revisión de cicatrices faciales.

14. La composición de la reivindicación 1, en la que el P4HB es producido por un microorganismo y se purifica a partir de una biomasa.

15. La composición de las reivindicaciones 1 o 14, en la que el P4HB tiene un peso molecular promedio en peso, medido por cromatografía de permeación en gel (GPC) con respecto a poliestireno, de 20 kDa a 1.200 kDa, más preferentemente de 50 kDa a 800 kDa e incluso más preferentemente de 200 kDa a 600 kDa.

Estructura química de P4HB

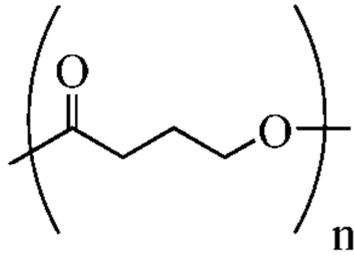


FIGURA 1