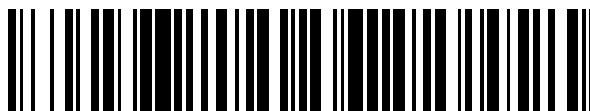


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 525**

51 Int. Cl.:

C08G 63/06 (2006.01)

C08G 63/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2012** **PCT/US2012/057277**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013** **WO13049161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012** **E 12769859 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017** **EP 2760911**

54 Título: **Hidrólisis controlada de poli-4-hidroxibutirato y copolímeros**

30 Prioridad:

27.09.2011 US 201161539695 P

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

16.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GUO, KAI y
MARTIN, DAVID, P.

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 2 659 525 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

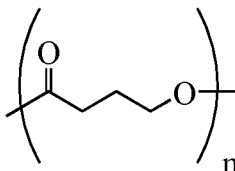
Hidrólisis controlada de poli-4-hidroxibutirato y copolímeros

5 Campo de la invención

Generalmente, la presente invención se refiere a métodos para controlar la hidrólisis de poli-4-hidroxibutirato y copolímeros del mismo, y a composiciones de poli-4-hidroxibutirato y copolímeros del mismo con pesos moleculares medios expresados en peso específicos. Las composiciones se pueden usar en dispositivos médicos implantables, aplicaciones de liberación controlada, tales como administración de fármacos, y se pueden usar determinadas composiciones para la administración terapéutica de 4-hidroxibutirato. Las composiciones también se pueden usar en mezclas, y como intermedios en síntesis.

Antecedentes de la invención

Se pueden producir poli-4-hidroxibutirato (P4HB) y copolímeros del mismo usando métodos de fermentación transgénicos, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.548.569 de Williams et al, y se producen comercialmente, por ejemplo, por TephA, Inc. (Lexington, MA). Poli-4-hidroxibutirato (P4HB, TephAFLEX® biomaterial) es un poliéster fuerte, plegable termoplástico que, a pesar de su ruta biosintética, tiene una estructura relativamente simple.



El polímero pertenece a una gran clase de materiales denominados polihidroxiácidos (PHAs) que se producen por medio de 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 la energía el metabolismo energético. También son de interés comercial por sus propiedades termoplásticas y relativa facilidad de producción. La Figura 1 muestra las diferentes rutas actualmente conocidas para producir P4HB.

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

Patentes de Estados Unidos Nos 6.245.537, 6.623.748 y 7.244.442 describen métodos de preparación de PHAs con escasa o nula endotoxina, que es adecuado para aplicaciones médicas. las patentes de Estados Unidos Nos. 6.548.569, 6.838.493, 6.867.247, 7.268.205 y 7.179.883 describen el uso de PHAs para fabricar dispositivos médicos. Los copolímeros de P4HB incluyen 4-hidroxibutirato copolimerizado con 3-hidroxibutirato o ácido glicólico (solicitud de patente de Estados Unidos Nº. 20030211131 por Martin y Skraly, patente de Estados Unidos Nº. 6.316.262 de Huisman y col, y la patente de Estados Unidos Nº. 6.323.010 de Skraly y col.). Los métodos de control del peso molecular de los polímeros de PHA por medio de métodos biosintéticos se han divulgado por medio de la patente de Estados Unidos Nº. 5.811.272 de Snell y col.

Los PHAs con degradación controlada y degradación in vivo menor de un año se divulga en la patente de Estados Unidos Nº. 6.548.569, 6.610.764, 6.828.357, 6.867.248 y 6.878.758 de Williams y col. y el documento WO 99/32536 de Martin y col. Las solicitudes de P4HB se han revisado en Williams, S.F., y col., Polyesters, Coleman, 4:91-127 (2002), y por Martin, D. y col. Medical Applications of Poly-4-hydroxybutyrate: A Strong Flexible Absorbable Biomaterial, Biochem. Eng. J. 16:97-105 (2003). También se han divulgado dispositivos médicos y aplicaciones de P4HB en el documento WO 00/56376 de Williams y col. Diversas patentes que incluyen las patentes de Estados Unidos Nos. 6.555.123, 6.585.994 y 7.025.980 describen el uso de PHAs en reparación de tejido e ingeniería.

En liberación controlada existe actualmente necesidad de P4HB y copolímeros del mismo que intervalos de peso molecular expresado en peso definidos de forma estrecha. Controlando estos intervalos, se pueden desarrollar composiciones que permitan la liberación controlada de una amplia gama de agentes bioactivos. Las composiciones particularmente deseadas incluyen polímeros con pesos moleculares medios expresados en peso menores de 250.000 y más preferentemente menores de 100.000. Preferentemente, las composiciones deberían tener una

polidispersidad menor de 3, y más preferentemente menor de 2,5.

Además de ser útil en liberación controlada, las composiciones de bajo peso molecular de P4HB y los copolímeros de las mismas pueden ser útiles en la preparación de otras sustancias químicas, polímeros, copolímeros, y para la mezcla con otros materiales. Por ejemplo, P4HB de bajo peso molecular y los copolímeros del mismo, se pueden usar en la preparación de poliuretanos o como nucleantes o cargas en mezclas.

La patente de Estados Unidos N°. 6.623.730 de Williams y Martin divulga el uso de oligómeros de P4HB y profármacos para modular los niveles endógenos de 4-hidroxibutirato, y métodos para preparar estos oligómeros por medio de hidrólisis de P4HB. El método divulgado usa alícuotas de metóxido de sodio para hidrolizar P4HB disuelto en un disolvente (THF anhidro) para proporcionar los oligómeros de P4HB del peso molecular deseado. Partiendo de un polímero con peso molecular de 430.000 g/mol, se usa metóxido de sodio para producir pesos moleculares de P4HB de 320.000, 82.000 y 25.000. Las desventajas de este procedimiento son las siguientes: (i) el uso de metóxido puede tener como resultado la esterificación terminal de las cadenas de poliéster (produciendo ésteres metílicos); (ii) la solubilidad relativamente baja de P4HB en THF (y otros disolventes) requiere grandes volúmenes para disolver el polímero lo cual resulta difícil de manipular, caro y de elevado coste de retirada; y (iii) las condiciones básicas podrían conducir potencialmente a reacciones de eliminación en el polímero que provoquen reacciones secundarias no deseadas.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos para producir P4HB y copolímeros del mismo por medio de hidrólisis de P4HB de peso molecular elevado y copolímeros sin el uso de disolventes.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir P4HB y copolímeros del mismo por medio de hidrólisis de P4HB de alto peso molecular y copolímeros sin el uso de condiciones básicas que puedan esterificar los grupos del extremo terminal del polímero o provocar la eliminación básica de las cadenas poliméricas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para la hidrólisis de P4HB y copolímeros del mismo que mantengan los polímeros en estado sólido durante la hidrólisis dando como resultado un fácil aislamiento de los productos hidrolizados.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones de P4HB y copolímeros del mismo que se puedan usar en aplicaciones médicas, por ejemplo, en dispositivos médicos implantables o para la liberación controlada de sustancias bioactivas, incluyendo la liberación controlada de 4-hidroxibutirato.

Sumario de la invención

Se han desarrollado métodos de preparación de polímeros P4HB y copolímeros del mismo que son útiles para preparar sistemas de liberación controlada, y como intermedios en la síntesis química. Estos métodos evitan el uso de disolventes orgánicos, y las condiciones básicas que pueden provocar las reacciones de transesterificación con los grupos del extremo terminal polimérico o reacciones de eliminación.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un dispositivo médico que comprende un polímero o copolímero de poli-4-hidroxibutirato, en el que el polímero o copolímero procede de hidrólisis ácida de un polímero o copolímero de poli-4-hidroxibutirato de peso molecular elevado, en el que el polímero o copolímero tiene un peso molecular medio expresado en peso de 1.000 a 100.000 Da, tal y como se mide por medio de cromatografía de permeabilidad de gel con respecto a poliestireno, en el que el polímero o copolímero tiene una polidispersidad entre 3 y 1, y en el que el polímero o copolímero de poli-4-hidroxibutirato de peso molecular elevado se produce por medio de microorganismos.

La presente invención también proporciona un método de preparación de un polímero de poli-4-hidroxibutirato de peso molecular bajo o un copolímero del mismo, comprendiendo el método suspender un polímero o copolímero de peso molecular elevado en una solución acuosa de ácido para hidrolizar el polímero para formar un polímero o copolímero de peso molecular bajo y aislar el polímero. Una realización preferida es un método para producir polímeros de P4HB con peso molecular medio expresado en peso menor de 250.000, y más preferentemente, menor de 100.000, que son útiles en liberación controlada. Una realización particularmente preferida utiliza ácido acético para hidrolizar microgránulos de polímeros de P4HB y copolímeros mientras se encuentran en suspensión.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de mecanismos que conducen a la biosíntesis de poli-4-hidroxibutirato.

La Figura 2 es un espectro de RMN ¹H del producto de hidrólisis de P4HB en ácido acético durante 27,5 horas.

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

- 5 "Poli-4-hidroxibutirato" tal y como se usa generalmente en la presente memoria, significa un homopolímero que comprende unidades de 4-hidroxibutirato. Puede hacerse referencia en la presente memoria a P4HB o un biomaterial TephafLEX® (fabricado por Tephaf, Inc., Lexington, MA).
- 10 "Copolímeros de poli-4-hidroxibutirato" tal y como se usa generalmente en la presente memoria hace referencia a cualquier polímero que comprenda 4-hidroxibutirato con una o más unidades de hidroxí ácido diferentes.
- 15 "Liberación controlada" o "liberación modificada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un perfil de liberación en el que se escogen las características de transcurso de tiempo de liberación del fármaco y/o ubicación para lograr los objetivos de conveniencia o terapéuticos no ofrecidos por las formas de dosificación convencionales tales como soluciones, suspensiones, o formas de dosificación de disolución temprana. La liberación retardada, la liberación prolongada y la liberación por pulsos y sus combinaciones son ejemplos de liberación modificada.
- 20 "Agente bioactivo" se usa en la presente memoria para hacer referencia a agentes terapéuticos, profilácticos y/o diagnósticos. Incluye sin limitación sustancias fisiológica o farmacológicamente activas que actúan local o sistémicamente en el cuerpo. Un agente biológicamente activo es una sustancia usada para, por ejemplo, el tratamiento, prevención, diagnosis, cura o mitigación de una enfermedad o trastorno, una sustancia que afecta a la estructura o función del cuerpo, o profármacos, que se vuelven biológicamente activos o más activos una vez que se han colocado en un entorno fisiológico predeterminado. Los agentes bioactivos incluyen sustancias, biológica, fisiológica o farmacológicamente activas que actúa local o sistémicamente en el cuerpo humano o animal. Los ejemplos pueden incluir, pero sin limitación, fármacos de molécula pequeña, péptidos, proteínas, anticuerpos, azúcares, polisacáridos, nucleótidos, oligonucleótidos, aptámeros, ARNs, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. "Agente bioactivo" incluye un agente individual y también pretende incluir una pluralidad
- 25 "Mezcla" tal y como se usa generalmente en el presente documento significa una combinación física de distintos polímeros, al contrario que un copolímero formado por dos o más monómeros diferentes.
- 30 "Peso molecular" tal y como se usa en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, se refiere al peso molecular ponderado medio (Mw), no al peso molecular medio expresado en número (Mn) y se mide por medio de cromatografía de permeabilidad de gel (GPC) con respecto a poliestireno.
- 35 "Adsorbible" tal y como se usa generalmente en la presente memoria significa que el material se rompe en el cuerpo y se elimina finalmente del mismo en 5 años.
- 40 "Biocompatible", tal y como se usa generalmente en la presente memoria, significa la respuesta biológica al material o dispositivo apropiada para el dispositivo destinado a aplicación in vivo. Cualquier metabolito de estos materiales también debe ser biocompatible.

I. Composición

- 45 Se han desarrollado métodos para producir composiciones de peso molecular bajo (Mw) de P4HB y copolímeros de las mismas con rendimiento elevado. Estos métodos se pueden usar para preparar P4HB y copolímeros de los mismos con pesos moleculares medios expresados en peso (Mw) que varían de 1 a 250 kDa, y más preferentemente con Mw que varían de 5 a 100 kDa. Estos métodos también dan lugar P4HB y copolímeros con polidispersidad estrecha (PDI), menor de 3,0 y preferentemente un PDI menor de 2,5. El P4HB y los copolímeros del mismo se preparan por medio de hidrólisis con ácidos acuosos, y preferentemente con ácido acético. Una ventaja principal del método que los microgránulos de los polímeros se pueden suspender en un ácido, y se pueden hidrolizar mientras se encuentran en suspensión para dar lugar a polímeros de peso molecular medio expresado en peso predecible y polidispersidad estrecha. Además, la purificación es directa, las reacciones secundarias se encuentran esencialmente ausentes, y los rendimientos son muy elevados.
- 50
- 55

A. Polímeros

- Los procesos descritos en la presente memoria se pueden usar normalmente con poli-4-hidroxibutirato (P4HB) y un copolímero del mismo. Los copolímeros incluyen P4HB con otro hidroxíácido, tal como 3-hidroxibutirato, y P4HB con ácido glicólico o monómero de ácido láctico. P4HB y los copolímeros del mismo se pueden obtener en Tephaf, Inc. of Lexington, MA.
- 60

- En una realización preferida, el homopolímero de P4HB de partida y los copolímeros del mismo se someten a extrusión para dar lugar a microgránulos. Se puede usar un extrusor para este fin. Los microgránulos se suspenden posteriormente en ácido para hidrólisis. Esto facilita el aislamiento del producto, y proporciona un rendimiento elevado de producto de bajo peso molecular.
- 65

B. Hidrólisis

P4HB y los copolímeros del mismo, cuando están presentes en un dispositivo médico de acuerdo con la Reivindicación 1, se preparan con un peso molecular medio expresado en eso menor de 100.000. Se ha descubierto que los polímeros de peso molecular bajo (M_w) y los copolímeros de P4HB se pueden producir con rendimientos inesperadamente elevados, sin disolvente, y con elevada pureza con esencialmente ausencia de reacciones secundarias. Notablemente, la hidrólisis se puede controlar de manera que los polímeros de bajo peso molecular (M_w) y los copolímeros se puedan producir de forma predecible con elevada pureza, elevado rendimiento y polidispersidad estrecha.

Los polímeros se pueden hidrolizar por medio de suspensión del polímero en un ácido o una solución de ácido. Por lo tanto, en una realización, el ácido o la solución de ácido es una en la que el microgránulo del polímero es insoluble o parcialmente insoluble. El ácido puede ser un ácido orgánico o un ácido inorgánico. Para esas realizaciones en las que el ácido es un ácido orgánico, el ácido puede ser un ácido monocarboxílico o un poli(ácido carboxílico), tal como ácido di- o tricarboxílico. Los ácidos orgánicos apropiados incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido acético halogenado, tales como mono-, di-, ácido acético trihalogenado, ácido láctico, ácido glicólico, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido benzoico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico y ácido pirúvico. Los ácidos inorgánicos apropiados incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico.

Una realización particularmente preferida utiliza ácido acético acuoso para hidrolizar polímeros y copolímeros de P4HB. Más preferentemente, los polímeros y copolímeros en primer lugar se someten a extrusión para dar lugar a microgránulos, y posteriormente se suspenden en ácido acuoso. Se ha descubierto que los microgránulos permanecen suspendidos en el ácido (con agitación) durante la hidrólisis a medida que disminuyen los pesos moleculares de los polímeros de manera predecible. Aun cuando los polímeros y copolímeros permanecen suspendidos, y el polímero no se disuelve, la polidispersidad del producto de peso molecular bajo (M_w) permanece estrecha. Debido a que los microgránulos no se disuelven en el ácido, el producto se puede aislar más fácilmente al final de la hidrólisis, por ejemplo, por medio de decantación, lavado con agua, y secado. No es necesario evaporar el ácido o disolvente, o usar un proceso de extracción con disolvente para recuperar los polímeros de bajo peso molecular.

Los gránulos u otras formas no sometidas a formación de microgránulos del polímero o copolímeros se pueden hidrolizar con el método, sin embargo, es más probable que estas formas se vuelvan pegajosas durante la hidrólisis, haciendo que el aislamiento del producto resulte más difícil.

En un método preferido, los microgránulos de polímero o copolímero se suspenden en ácido acético acuoso, y se agitan. La hidrólisis se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o temperatura elevada. Preferentemente, la hidrólisis se lleva a cabo a temperatura constante dentro del intervalo de 37 a 50 °C.

La fuerza del ácido se puede ajustar para acelerar o ralentizar la velocidad de la hidrólisis de los polímeros y copolímeros. En un método preferido, se usa ácido acético con una concentración dentro del intervalo de 5M a 12M. Sin embargo, se pueden usar concentraciones más bajas para ralentizar la velocidad de hidrólisis, y se pueden usar concentraciones elevadas para acelerar la velocidad de hidrólisis.

La duración de la reacción de hidrólisis se puede determinar por medio del peso molecular (M_w) deseado, forma del polímero o copolímero, temperatura de la reacción, tipo de ácido y concentración del ácido. Por ejemplo, los microgránulos de P4HB ($M_w = 346\text{kDa}$) suspendidos en ácido acético acuoso a 37 °C durante 4 horas tendrán un $M_w = 224\text{kDa}$ si la concentración del ácido es de 10M, y $M_w = 115\text{kDa}$ si la concentración del ácido es de 12M. En las mismas condiciones, a 27,5 horas, los pesos moleculares (M_w) del polímero con 10M y 12M de ácido acético son 85 kDa y 40 kDa, respectivamente.

C. Usos de P4HB de Bajo Peso Molecular y Copolímeros de P4HB

Los polímeros y copolímeros de bajo peso molecular de P4HB tienen propiedades que son sustancialmente mejoradas para muchas aplicaciones médicas con respecto a versiones de peso molecular elevado. Estos materiales tienen viscosidades en masa fundida bajas, y solubilidades elevadas en disolventes que pueden facilitar el procesado. El polímero de P4HB de peso molecular bajo y los copolímeros del mismo pueden también proporcionar perfiles de liberación controlada más deseables para la administración de agentes terapéuticos, profilácticos o diagnósticos u otro agente bioactivo, tal como un fármaco de molécula pequeña, péptido, proteína, anticuerpo, azúcar, polisacárido, nucleótido, oligonucleótido, aptámero, ARNs, ácido nucleico y combinaciones de los mismos. El P4HB de peso molecular bajo también se puede usar para preparar dispositivos médicos, tal como, pero sin limitación, suturas, endoprótesis vasculares, injertos de endoprótesis vascular, revestimientos de endoprótesis vascular, dispositivos para la cicatrización temporal o soporte para tejidos, dispositivos para la reparación de tejidos duros o blandos, parches de reparación, armazones para ingeniería tisular, membranas de retención, membranas anti-adhesión y membranas de separación tisular, dispositivos para reparación de hernias, revestimientos de dispositivos, parches cardiovasculares, globos para catéter, dispositivos de cierre vascular,

dispositivos de suspensión, revestimientos biocompatibles, dispositivos de reparación de manguito de rotador, dispositivos de reparación de menisco, barreras de adhesión, reparación guiada de tejidos/dispositivos de regeneración, dispositivos de reparación de cartílago articular, guías para nervios, dispositivos de reparación de tendones, dispositivos de reparación de defectos del tabique intracardíaco, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de reparación del tabique auricular y dispositivos de cierre de PFO (orificio oval patente), dispositivos de cierre del apéndice auricular izquierdo (LAA), parches pericardíacos, agentes de relleno y que confieren volumen, dispositivos quirúrgicos plásticos (incluyendo dispositivos para reconstrucción y cosmética facial y mamaria), válvulas para venas, válvulas cardíacas, armazones de médula ósea, dispositivos de regeneración de menisco, injertos para tendones y ligamentos, implantes para células oculares, dispositivos de fusión espinal, dispositivos de formación de imágenes, sustitutivos cutáneos, sustitutivos de la duramadre, sustitutivos de injertos óseos, vendajes para heridas y hemostáticos.

Los polímeros y copolímeros de P4HB de bajo peso molecular y los copolímeros del mismo también se pueden usar para modular los niveles endógenos de 4-hidroxibutirato como se divulga en la patente de Estados Unidos N°. 6.623.730 de Williams y Martin.

Los polímeros y copolímeros de P4HB de bajo peso molecular y los copolímeros del mismo también se pueden usar en aplicaciones implantables que requieran una velocidad más rápida de degradación o absorción que los polímeros de M_w elevado. Preferentemente, el dispositivo implantado se degrada y el polímero de M_w se absorbe en seis meses

Los polímeros de P4HB y los copolímeros con pesos moleculares bajos también se pueden usar en mezclas con otros materiales para mejorar las propiedades. Los polímeros de bajo peso molecular también se pueden usar en la síntesis de otros materiales, por ejemplo, en polimerización reactiva.

II. Métodos de Fabricación de P4HB de Bajo Peso Molecular y Copolímeros.

A. Método de Preparación de Polímero de P4HB de Bajo Peso Molecular

En un método preferido, se puede preparar un polímero de P4HB o copolímero de bajo peso molecular (M_w) como se muestra a continuación. Se suspenden los microgránulos de un polímero de P4HB en ácido acético acuoso, y se colocan en un incubador con agitación. Se puede variar un número de parámetros para controlar la hidrólisis del polímero o copolímero que incluyen, pero sin limitación, la concentración del ácido, el tipo de ácido, la temperatura de reacción, la velocidad (rpm) del agitador (o velocidad del agitador) y el tiempo de reacción.

Cuando se desee lograr un peso molecular deseado (M_w), la reacción se inactiva por medio de decantación del ácido, y aclarando el polímero o copolímero con agua. Se puede retirar el ácido residual y el agua por medio de secado a vacío.

La presente invención se comprenderá haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Hidrólisis de P4HB con Ácido Acético Acuoso 12M

Materiales y Métodos

Se suspenden 30 gramos de microgránulos de P4HB (Tepha, Inc., Lexington, MA) (M_w 367 kDa) en 100 ml de ácido acético acuoso 12 M (AcOH), y se incubó a 37 °C a 50 rpm en un incubador con agitación. Transcurridas 4 y 27,5 horas, el M_w de las muestras poliméricas extraídas de la reacción fue de 115 y 40 kDa, respectivamente.

Resultados

Transcurridas 4 horas, los microgránulos de P4HB se volvieron pegajosos y la solución de AcOH se volvió turbia. Después de 30 horas, toda la mezcla de reacción tuvo un aspecto lechoso, y cuando se enfrió, dio lugar a la formación de un gel en un semi-sólido. Por tanto, se determinó que AcOH 12 M es demasiado fuerte para su uso como medio de hidrólisis para los microgránulos de P4HB ya que esta concentración puede disolver parcialmente el polímero. Como resultado, la recogida de los productos de hidrólisis sería menos práctica y la condiciones de reacción serían menos homogéneas, teniendo lugar cierta hidrólisis en la disolución en parte de la fase sólida (es decir, dentro de los microgránulos).

Ejemplo 2: Hidrólisis de P4HB con Ácido Acético Acuoso 10 M

Materiales y Métodos

Se suspenden 30 gramos de microgránulos de P4HB (Tepha, Inc., Lexington, MA) (M_w 367 kDa) en 100 ml de ácido acético acuoso 10 M, y se incubó a 37 °C a 50 rpm en un incubador con agitación. Se retiró la muestra tras 4 horas, y se determinó que el peso molecular medio expresado en peso del polímero por medio de GPC (con respecto a

poliestireno) fue de 224 kDa. Después de 27,5 horas, se inactiva la reacción por medio de decantación del ácido y aclarando el polímero con agua destilada.

Resultados

- 5 Los microgránulos no formaron grumos o agregados durante el tiempo de reacción, como se apreció para la reacción similar llevada a cabo en ácido acético 12 M. Los microgránulos poliméricos se secaron a vacío para retirar el ácido acético residual y el agua.
- 10 El peso molecular medio expresado en peso del polímero se determinó que era 85 kDa tras 27,5 horas, y se registró el polímero con elevado rendimiento y sin pérdida de material.

Ejemplo 3: Hidrólisis de P4HB con Ácido Acético Acuoso 8M

Materiales y Métodos

- 15 Se suspendió una muestra de 20 g de microgránulos de P4HB (Tepha, Inc., Lexington, MA) (M_w 347 kDa) en 200 ml de ácido acético acuoso 8 M, y se incubó a 37 °C a 50 rpm en un incubador con agitación. Se retiraron las muestras de forma periódica, y se determinó el peso molecular medio expresado en peso del polímero y la polidispersidad por
- 20 medio de GPC (con respecto a poliestireno).

Resultados

- 25 Los resultados se tabulan a continuación (tiempo en horas).

TABLA 1: Peso Molecular y PDI de P4HB con el Tiempo

	8M, 40 °C, baño de aceite, Microgránulos	
	M_w (kDa)	PDI
0	347	2,13
1	335	2,15
2	315	2,10
4	284	2,17
6	263	2,08
8	255	2,05
24	161	1,97
96	68	1,90
120	60	1,94

Ejemplo 4: Hidrólisis de P4HB con Ácido Acético Acuoso 5M

Materiales y Métodos

- 30 Se suspendieron 20 gramos de muestra de gránulos de P4HB (Tepha, Inc., Lexington, MA) (M_w 347 kDa) en 200 ml de ácido acético acuoso 5 M y se agitó a 45 °C. Se retiraron las muestras periódicamente y se determinó el peso molecular medio expresado en peso del polímero por medio de GPC (con respecto a poliestireno).

Resultados

Los resultados (media de tres operaciones) se recogen en la Tabla 2.

40 TABLA 2: Peso Molecular y PDI de P4HB con el Tiempo

	5M, 45°C, Gránulos	
Tiempo (horas)	M_w (kDa)	PD
0	347	2,13
4	280	2,12

22	168	2,03
29	137	1,98
96	60	2,01

Ejemplo 5: Análisis de RMN-H de P4HB en Producto de Hidrólisis de Ácido Acético

La Figura 2 muestra el espectro de RMN ^1H del producto de hidrólisis del Ejemplo 2 trascurridas 27,5 horas. Como se esperaba, este producto de hidrólisis de bajo Mw muestra un pico de ^1H pequeño del grupo terminal polimérico -CH₂OH a un desplazamiento químico de aproximadamente 3,69 ppm. El área de integración de este pico es 0,50 en comparación con el área de integración de aproximadamente 100 para el grupo metileno polimérico a un desplazamiento químico de aproximadamente 4,12 ppm. Como tal, la relación del grupo terminal de esta muestra es de 0,5/100 o 0,005, lo que sugeriría que el producto es 200 mer (es decir, aproximadamente Mn 17 kDa). Este valor de Mn procedente del análisis del grupo terminal es razonable considerando el GPC del polímero M_w de 85 kDa y M_n de 44 kDa. (Nota: Los valores de GPC relativos a PS son aproximadamente el doble de los valores absolutos del polímero de LLS).

La hidrólisis de los microgránulos de P4HB o gránulos suspendidos en solución acuosa de ácido acético se ha llevado a cabo de forma satisfactoria en condiciones suaves con tiempos de reacción razonables. El producto de hidrólisis, P4HB de bajo Mw, se preparó con elevado rendimiento, próximo a un 100 %, y su Mw también se pudo predecir basado en el Mw frente a la curva de tiempo de reacción en condiciones de reacción fijas, es decir, temperatura y concentración de AcOH. Sorprendentemente para una reacción bifásica, la polidispersidad de los productos de hidrólisis es baja y similar a la del polímero de partida, aproximadamente 2, lo que muestra que la reacción de hidrólisis tiene lugar de manera uniforme en todo el volumen del material, en lugar de localizarse en la superficie, aunque los microgránulos/gránulos queden sin disolver y suspendidos en la solución de ácido acético.

A partir del análisis de RMN, parece que los grupos terminales son grupos hidroxilo como el polímero de partida. Esto muestra que no se han añadido grupos funcionales nuevos (es decir, grupos acetato) al polímero y confirma la reacción como hidrólisis verdadera sin derivatización de los grupos del extremo terminal.

La cinética de la reacción de hidrólisis podrían verse afectadas por un par de factores tales como la temperatura de reacción (temperatura ambiente hasta 50 °C) y la concentración de la solución de AcOH (5 ~ 10 M). Debido a que los gránulos/microgránulos de P4HB estaban simplemente suspendidos en la solución de AcOH a temperaturas relativamente bajas en lugar de formar una solución homogénea y la relación de P4HB/AcOH podría ser de 3 g/10 ml, la reacción de hidrólisis descrita en la presente memoria debería ser apta para escalado para la producción de un oligómero de P4HB con peso molecular controlado.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo médico que comprende un polímero o un copolímero de poli-4-hidroxibutirato, en el que el polímero o el copolímero proceden de hidrólisis ácida de un polímero o un copolímero de poli-4-hidroxibutirato de peso molecular elevado, en donde el polímero o el copolímero tienen un peso molecular medio expresado en peso de 1.000 a 100.000 Da, tal y como se mide por medio de cromatografía de permeabilidad de gel con respecto a poliestireno, en donde el polímero o el copolímero tienen una polidispersidad entre 3 y 1, y en donde el polímero o el copolímero de poli-4-hidroxibutirato de peso molecular elevado se producen por medio de microorganismos.
2. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde el dispositivo médico comprende un homopolímero, un polímero o un copolímero de poli-4-hidroxibutirato obtenido por medio de hidrólisis ácida de una suspensión de un polímero o un copolímero de poli-4-hidroxibutirato de peso molecular elevado en una solución acuosa del ácido y aislar el polímero o el copolímero, en donde el polímero o el copolímero tienen un peso molecular medio expresado en peso entre 1.000 y 100.000 Da, tal y como se mide por medio de cromatografía de permeabilidad de gel con respecto a poliestireno y una polidispersidad entre 3 y 1, en donde el peso molecular elevado del polímero o del copolímero de poli-4-hidroxibutirato se producen por medio de microorganismos.
3. El dispositivo de la reivindicación 2 seleccionado entre el grupo que consiste en una sutura, endoprótesis vascular, injerto de endoprótesis vascular, revestimiento de endoprótesis vascular, dispositivo de administración de fármaco, dispositivo para la cicatrización temporal o soporte para tejidos, dispositivo para la reparación de tejidos blandos o duros, parche de reparación, almacén para ingeniería tisular, membrana de retención, membrana anti-adhesión, membrana de separación de tejidos, dispositivos de reparación de hernias, revestimiento para dispositivos, parche cardiovascular, globo para catéter, dispositivo de cierre vascular, dispositivos de suspensión, revestimiento biocompatible, dispositivo de reparación del manguito rotador, dispositivo de reparación de menisco, barrera de adhesión, dispositivo de regeneración/reparación guiada de tejidos, dispositivo de reparación de cartílago articular, guía para nervios, dispositivo de reparación de tendones, dispositivo de reparación de defectos en el tabique intracardíaco, incluyendo pero sin limitarse a dispositivos de reparación de defectos del tabique auricular y dispositivos de cierre PFO (orificio oval patente), dispositivo de cierre de apéndice auricular izquierdo (LAA), parche pericardíaco, agente de relleno y que confiere volumen, dispositivos quirúrgicos plásticos (incluyendo dispositivos para reconstrucción y cosmética facial y mamaria), válvula para venas, válvula cardíaca, almacén para médula ósea, dispositivo de regeneración de menisco, injerto para tendones y ligamentos, implante de células oculares, dispositivo de fusión espinal, dispositivo de formación de imágenes, sustitutivo cutáneo, sustitutivo de duramadre, sustitutivo de injerto óseo, vendajes para heridas y hemostáticos.
4. El dispositivo de la reivindicación 3 en donde el dispositivo es apropiado para su uso para liberación controlada de un agente bioactivo.
5. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que el agente bioactivo es un agente terapéutico, profiláctico y/o diagnóstico.
6. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que el agente bioactivo es un fármaco de molécula pequeña, péptido, proteína, anticuerpo, azúcar, polisacárido, nucleótido, oligonucleótido, aptámero, ARNsi, ácido nucleico y combinaciones de los mismos.
7. El dispositivo de la reivindicación 2, en donde el dispositivo es apropiado para su uso para elevar los niveles endógenos de 4-hidroxibutirato en un paciente.
8. El dispositivo de la reivindicación 2, para su uso en medicina mediante administración o implante en un individuo que lo precisa.
9. El dispositivo de cualquier reivindicación anterior, en el que el copolímero es un copolímero de 4HB y otro hidroxí ácido.
10. El dispositivo de la reivindicación 9, en el que el hidroxí ácido está seleccionado entre el grupo que consiste en 3-hidroxibutirato, ácido glicólico y ácido láctico.
11. El dispositivo de cualquier reivindicación anterior, en el que el polímero o el copolímero tienen un peso molecular medio expresado en peso de 5.000 a 100.000 Da, tal y como se mide por medio de cromatografía de permeabilidad de gel con respecto a poliestireno.
12. Un método de preparación de un poli-4-hidroxibutirato de peso molecular bajo o un copolímero del mismo, comprendiendo el método suspender un polímero o un copolímero de peso molecular elevado en una solución acuosa de ácido para hidrolizar el polímero para formar un polímero o un copolímero de peso molecular bajo y aislar el polímero.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el polímero se hidroliza a una temperatura de aproximadamente 37

°C a aproximadamente 50 °C.

14. El método de la reivindicación 12 en el que el ácido es ácido acético.

- 5 15. El método de la reivindicación 14, en el que la concentración del ácido es la solución acuosa de ácido es de 5 a 10 M.

Las enzimas de mecanismo son:

1. Succínico semialdehído deshidrogenasa,
2. 4-hidroxibutirato deshidrogenasa,
3. Diol oxidoreductasa,
4. Aldehído deshidrogenasa,
5. Coenzima A transferasa
6. PHA sintetasa

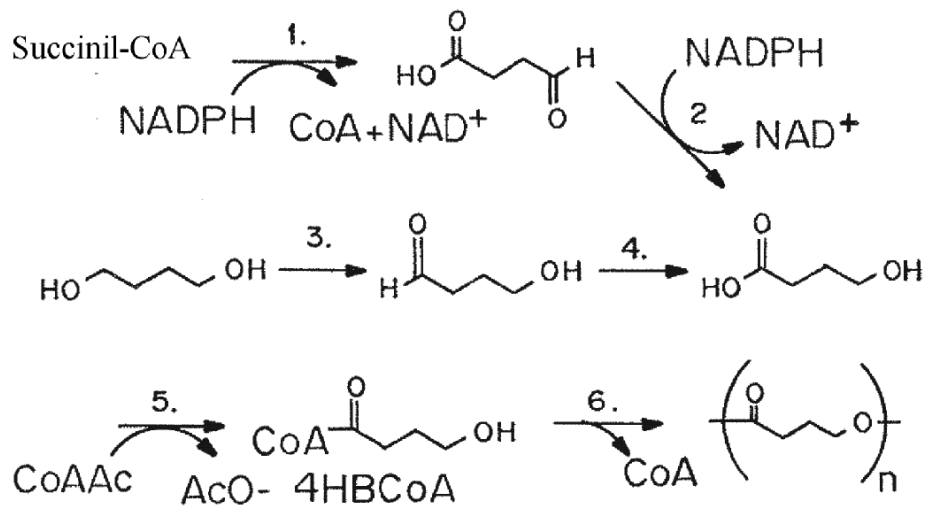


FIG. 1

