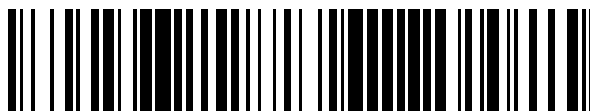


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 687**

51 Int. Cl.:

A61L 27/18	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01)
A61L 31/06	(2006.01)
A61L 31/10	(2006.01)
A61L 17/10	(2006.01)
C12P 7/62	(2006.01)
C08G 63/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2014 PCT/US2014/063305**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15069556**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2014 E 14799622 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3065789**

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

30 Prioridad:

05.11.2013 US 201361900348 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MARTIN, DAVID P. y
WILLIAMS, SIMON F.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 705 687 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

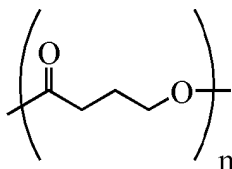
Composiciones y dispositivos de poli-4-hidroxibutirato

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a dispositivos médicos de poli-4-hidroxibutirato, a las composiciones usadas para producir estos dispositivos médicos, y a los procesos usados para producir estas composiciones, como se define en la reivindicaciones adjuntas. Los dispositivos médicos se pueden usar en muchos tipos de aplicaciones de implantes que incluyen manejo de heridas, cirugía general, reparación de hernias, reparación de nervios, ingeniería de tejidos, ortopedia, cirugía craneomaxilofacial, administración de fármacos, cardiovascular, vascular, cardiología, urología, ginecología, dental, formación de imágenes, cirugía de orejas, nariz y garganta, cirugía plástica y estética, y cirugía oral.

15 **Antecedentes de la invención**

El poli-4-hidroxibutirato (P4HB) y sus copolímeros se pueden producir usando métodos de fermentación transgénicos, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.548.569 de Williams *et al.*, y se producen en el mercado, por ejemplo, por Tephra, Inc. (Lexington, MA). El poli-4-hidroxibutirato (P4HB, TephraFLEX® biomaterial) es un poliéster termoplástico, resistente y flexible que, a pesar de su ruta biosintética, tiene una estructura relativamente simple como se muestra a continuación.



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 relativa facilidad de 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 longitud de cadena corta (o scl-PHA) están hechos de monómeros de 3 a 5 átomos de carbono. Los polímeros de PHA de longitud de cadena media (mcl-PHA) contienen de 6 a 14 carbonos en sus unidades monoméricas, y los PHA de longitud de cadena larga (lcl-PHA) tienen monómeros con más de 14 carbonos. Las propiedades de estos polímeros varían notablemente dependiendo de la longitud de su cadena, incluidas sus propiedades de solubilidad, térmicas y mecánicas. P4HB tiene cuatro átomos de carbono en su unidad monomérica y, por lo tanto, se clasifica como un scl-PHA.

Se ha intentado 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., *et al.*, *Polymer* 36:4703-4705 (1995); Houk, KN, *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 elevado peso molecular en condiciones normales (Moore, T., *et al.*, *Biomaterials* 26:3771-3782 (2005)).

Las patentes de Estados Unidos n.º 6.245.537, 6.623.748, 7.244.442 y 8.231.889 describen métodos para fabricar PHA con niveles bajos de endotoxinas. Las patentes de Estados Unidos 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 los PHA para fabricar dispositivos médicos. Los métodos para controlar el peso molecular de los polímeros de PHA se han divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 5.811.272 de Snell *et al.*

Los PHA con degradación controlada y degradación *in vivo* de menos de un año se divulgan en las patentes de Estados Unidos n.º 6.548.569, 6.610.764, 6.828.357, 6.867.248 y 6.878.758 de Williams *et al.* y en el documento WO 99/32536 de Martin *et al.* Las aplicaciones de P4HB se han revisado en Williams, SF, *et al.*, *Polyesters, III*, 4:91-127 (2002), y por Martin, D. *et al.* Medical Applications of Poly-4-hydroxybutyrate: A Strong Flexible Absorbable Biomaterial, *Biochem. Ing. J.* 16: 97-105 (2003). También se han divulgado dispositivos médicos y aplicaciones de P4HB en el documento WO 00/56376 de Williams *et al.* Diversas patentes que incluyen las patentes de Estados Unidos n.º 6.555.123, 6.585.994 y 7.025.980 describen el uso de los PHA en la reparación e ingeniería de tejidos. Las patentes de Estados Unidos n.º 8.034.270, 8.016.883 8.287.909, el documento WO 2011/119742 y el documento WO 2011/159784 divulgan fibras, materiales no tejidos y textiles hechos por extrusión por fusión o hilado en seco de P4HB.

La patente de Alemania n.º DE 3937649A1 de Steinbüchel *et al.* divulga la producción de P4HB por fermentación. El polímero P4HB se identificó mediante metanolisis de la biomasa usando cromatografía de gases. Sin embargo, el polímero P4HB no se purificó a partir de la biomasa.

- 5 Dos solicitudes de patente, WO 99/32536 de Martin y WO 00/56376 de Williams divulgan un método para producir P4HB en *Escherichia coli* K12 recombinante. La biomasa resultante que contenía el polímero P4HB se fluidizó y liofilizó, y el polímero P4HB se extrajo con tetrahydrofurano, se filtró, se precipitó, se disolvió nuevamente en disolvente, se filtró nuevamente, se precipitó, se lavó y se liofilizó. Después de este proceso de purificación, se informó que el polímero P4HB tenía la siguiente composición por análisis elemental: carbono 55,63 %, hidrógeno 7,41 %, oxígeno 37,28 % y nitrógeno 41 ppm.

El polímero P4HB también se ha producido mediante los métodos divulgados en el documento EP 2534141 A1 de Van Walsem, y en el documento WO 2013/023140 de Van Walsem.

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

20 Varias otras patentes han divulgado métodos para purificar otros polímeros de PHA a partir de la 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 fármacos y alimentos de los Estados Unidos (FDA). La patente de Estados Unidos n.º 5.110.980 de Ramsay *et al.* divulga el uso de una solución de hipoclorito para digerir la biomasa con el fin de extraer poli-3-hidroxialcanoatos. La patente de Estados Unidos n.º 5.942.597 de Noda *et al.* divulga la extracción con disolvente de polímeros de PHA con temperaturas de fusión de aproximadamente 80 °C o más a partir de la biomasa. La patente de Estados Unidos n.º 6.043.063 de Kurdikar *et al.* divulga 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.* divulga el uso de presión y altas temperaturas para extraer polímeros de PHA con disolventes. La patente de Estados Unidos n.º 7.070.966 de Schumann *et al.* divulga métodos para reducir la biomasa y descomponerla enzimáticamente. La patente de Estados Unidos n.º 7.098.298 de Kinoshita *et al.* divulga la extracción de polímeros de PHA con un alcohol monohídrico que tiene de 4 a 10 átomos de carbono. La patente de Estados Unidos n.º 7.118.897 de Narasimha *et al.* divulga la extracción de polímeros de PHA con disolventes a altas temperaturas y bajo presión, incluido el uso de etanol para extraer polímeros de PHA. La patente de Estados Unidos n.º 7.226.765 de Narasimha *et al.* divulga la extracción con disolvente de polímeros de PHA a altas temperaturas. La patente de Estados Unidos n.º 7.252.980 de Walsem *et al.* divulga la extracción con disolvente de polímeros de PHA y la recuperación mediante centrifugación. La patente de Estados Unidos n.º 7.393.668 de Yanagita *et al.* divulga un método para extraer polímeros de PHA a partir de biomasa por ruptura física en presencia de álcali, seguido del tratamiento del polímero de PHA separado con una enzima y/o un tensioactivo para eliminar las impurezas que se adhieren al polímero de PHA. La patente de Estados Unidos n.º 7.435.567 de Osakada *et al.* divulga métodos para purificar polímeros de PHA mediante la digestión de ácidos nucleicos con ácido hipocloroso. La patente de Estados Unidos n.º 7.576.173 de Walsem *et al.* divulga la extracción de polímeros de PHA con combinaciones de disolventes. La patente de Estados Unidos n.º 8.357.508 de Mantelatto divulga un método para extraer polímeros de PHA a partir de biomasa inyectando disolventes de PHA en forma líquida y vapor en la biomasa y calentando.

45 El uso de metanol para lavar previamente la biomasa de polímero PHA que contiene 4-hidroxivalerato de *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* antes de la extracción con disolvente ha sido divulgado 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 lavar previamente la biomasa de *Pseudomonas putida* KT2440 que contiene polímeros de PHA de longitud de cadena media también se ha divulgado por Jiang *et al.* "Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440", *J Microbiol. Meth.* 67:212-219 (2006). Sin embargo, las impurezas con absorbancias de UV a 241 y 275 nm del polímero mcl-PHA todavía estaban presentes después del uso de metanol como una etapa de prelavado, y se requerían múltiples etapas adicionales para reducir su presencia. Los autores no identificaron más estos contaminantes, pero comentaron que se sabe que los ácidos nucleicos y los ácidos aromáticos absorben a estas longitudes de onda. Además, el metanol es altamente tóxico para los seres humanos en pequeñas cantidades. *In vivo*, el metanol se metaboliza a través del formaldehído en ácido fórmico, lo que puede causar ceguera permanente por la destrucción del nervio óptico. La ingestión, inhalación o absorción de metanol puede ser fatal. Por estas razones, se debe evitar el uso de metanol en la preparación de productos implantables, y su uso en productos farmacéuticos está restringido y regulado por la FDA como un disolvente de clase 2 (conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH) orientación para la industria, impurezas Q3C: disolventes residuales, 1997).

65 En la fabricación de implantes que usan polímeros, es deseable que los materiales poliméricos tengan los niveles más bajos de impurezas posibles con el fin de evitar o minimizar la reacción del cuerpo a las impurezas. Dichas reacciones indeseables pueden incluir inflamación, citotoxicidad, irritación, pirogenicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad aguda, subcrónica y crónica. Las impurezas se pueden colocar en tres categorías amplias, concretamente, impurezas orgánicas, impurezas inorgánicas y disolventes residuales. La purificación de los polímeros de PHA a un

nivel en el que son adecuados para su uso en implantes es particularmente difícil debido a su producción en sistemas biológicos. Dicha producción requiere que el proceso de purificación elimine 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 obtienen por fermentación. Este último puede incluir extracto de levadura, peptona de soja, agentes antiespumantes, antibióticos, sales, aminoácidos, metales traza, azúcares y tampones. La purificación se complica aún más por la afinidad conocida de los polímeros de PHA por las proteínas, su solubilidad relativamente baja o la falta de solubilidad en la mayoría de los disolventes, y las dificultades para eliminar los disolventes de los polímeros a niveles aceptables. Y todas estas dificultades deben superarse mientras se obtienen 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: lípido, residuos en la ignición, contenido de nitrógeno, metales pesados y disolvente residual.

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

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

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar implantes hechos de composiciones de P4HB con una pureza mejorada.

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

El documento WO2013/142033 se publicó el 26 de septiembre de 2013 y divulga métodos y huéspedes diseñados genéticamente para la producción de poli-4-hidroxibutirato y productos de 4 carbonos.

RA Russel *et al.*, *Physica B. Condensed matter*, 2006, 385-386, 859 a 861 se publicó el 15 de noviembre de 2006 y divulga investigaciones de la morfología de fase de cuerpos de inclusión de polihidroxialcanoato bacterianos mediante variación de contraste dispersión de neutrones de ángulo pequeño. El documento WO 03/068919 se publicó el 21 de agosto de 2003 y divulga métodos para determinar la velocidad de biosíntesis o degradación de moléculas biológicas a partir de derivados metabólicos y productos catabólicos.

Sumario de la invención

Se han desarrollado composiciones de P4HB con alta pureza. Como se define en las reivindicaciones adjuntas, las composiciones se enriquecen para uno o más isótopos de carbono, hidrógeno u oxígeno, y las composiciones se preparan lavando la biomasa de P4HB antes de la extracción con disolvente, luego precipitando el P4HB de la solución.

Se han desarrollado métodos que permiten recuperar P4HB de la biomasa de P4HB con los siguientes beneficios: (i) mayor pureza, en la que el polímero contiene menos de 100 ppm de lípido determinado como palmitato y menos de 40 ppm de nitrógeno; (ii) un buen rendimiento de polímero con una recuperación de más de 75 % del polímero de la biomasa; (iii) pérdida mínima del peso molecular del polímero durante la recuperación, de modo que el polímero no pierda más del 10 % de su peso molecular ponderado medio durante la recuperación; (iv) menos etapas de recuperación; (v) uso reducido de solventes durante la extracción; (vi) un secado más fácil del polímero; (vii) menor costo; y (viii) proceso general más rápido.

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

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B muestran la curva convencional para la determinación de CG-EM de 4HB (1A) en suero y la concentración de 4HB en suero en animales de prueba y de control (1B).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

"Poli-4-hidroxibutirato" como se usa generalmente en el presente documento significa un homopolímero de unidades de 4-hidroxibutirato. Puede denominarse en el presente documento P4HB. El P4HB puede contener carbono, hidrógeno y oxígeno en sus proporciones isotópicas naturales, así como polímeros en los que se enriquecen uno o más isótopos.

"Copolímeros de poli-4-hidroxibutirato" como se usa generalmente en el presente documento significa cualquier

polímero de 4-hidroxibutirato con una o más unidades de hidroxiaácidos diferentes.

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

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

"Mezcla" como se usa generalmente en el presente documento significa una combinación física de diferentes polímeros o componentes, al contrario que un copolímero compuesto por dos o más monómeros diferentes.

15 "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 de combustión.

"P4HB deuterado" se denomina en el presente documento D-P4HB.

20 "Contenido de endotoxina" 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).

"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 de combustión.

25 "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) <231>.

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

30 "Peso molecular" como se usa en el presente documento, a menos que se especifique otra cosa, se refiere al peso molecular ponderado medio (M_p), no el peso molecular promedio en número (M_n), y se mide por CPG en relación con el poliestireno.

35 "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 de análisis de nitrógeno de Kjeldahl, y se expresa en partes por millón (ppm).

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

45 "Residuo en la ignición", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de sustancia residual no volatilizada de una muestra cuando se enciende en presencia de ácido sulfúrico, y según lo determinado por el método de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) <281>.

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

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

II. Composición

60 En el presente documento se proporcionan composiciones que contienen P4HB, recuperadas de una biomasa P4HB. PHA4400 o biomaterial TephafLEX® es un homopolímero de 4-hidroxibutirato fabricado por Tephaf, Inc., Lexington, MA.

65 Las composiciones incluyen isótopos de carbono, hidrógeno u oxígeno que están enriquecidos. Las composiciones de P4HB tienen los siguientes beneficios: (i) mayor pureza; (ii) pérdida mínima del peso molecular del polímero durante la recuperación; y (iii) disolvente residual reducido. No hay restricciones particulares sobre el peso molecular ponderado medio del polímero P4HB. Sin embargo, en una realización preferente, el peso molecular ponderado medio

del polímero P4HB varía 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.

5 El polímero P4HB se extrae después de lavar la biomasa P4HB con etanol para eliminar las impurezas, por ejemplo, las impurezas de lípidos y metales pesados.

10 La estructura de P4HB se muestra anteriormente. Las composiciones divulgadas en el presente documento incluyen polímeros en los que se enriquecen isótopos conocidos de hidrógeno, carbono y/u oxígeno. El hidrógeno tiene tres isótopos de origen natural, que incluyen, ^1H (protio), ^2H (deuterio) y ^3H (tritio), de los cuales el más común es el isótopo ^1H . El contenido isotópico del polímero se puede enriquecer, por ejemplo, de modo que el polímero contenga una proporción más alta que la natural de un isótopo específico. El contenido de carbono y oxígeno del homopolímero o copolímero también se puede enriquecer para contener proporciones más altas que las naturales de isótopos de carbono y oxígeno, incluyendo, pero sin limitación ^{13}C , ^{14}C , ^{17}O o ^{18}O . Un experto en la técnica conoce otros isótopos de carbono, hidrógeno y oxígeno.

15 Un isótopo de hidrógeno preferente enriquecido en P4HB es deuterio, es decir, P4HB deuterado. El porcentaje de deuteración puede ser de hasta al menos 1 % y hasta 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o 85 % o mayor.

20 A. Biomasa P4HB

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

30 Ejemplos de microorganismos adecuados que pueden usarse como fuentes de biomasa P4HB, incluidos los microorganismos mutados y los microorganismos modificados genéticamente para producir P4HB, incluyen microorganismos pertenecientes al género *Escherichia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Halobacterium*, *Nocardia*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Aquaspirillum*, *Paracoccus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Zoogloea* *Candida*, *Saccharomyces* y *Yarrowia*. Los microorganismos particularmente preferentes para la producción de biomasa P4HB incluyen la cepa MBX1177 de *E. coli*, 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-hidroxibutilil-CoA transferasa de *Clostridium kluyveri*, y la β -lactamasa, como se divulga en el documento WO 99/32536 de Martin y en el documento WO 00/56376 de Williams. Otros microorganismos que pueden usarse para producir biomasa P4HB incluyen la cepa mutante SK2813 derivada de *A. eutrophus* JMP222 como se divulga en la patente alemana n.º DE 3937649A1 de Steinbüchel *et al.*, y la cepa mutante de *E. coli* JM109 deficiente en los genes de la succinato semialdehído deshidrogenasa nativa y que albergan genes para la degradación del succinato de *Clostridium kluyveri* y la PHB sintasa de *Ralstonia eutropha*, junto con genes para la expresión de cuatro proteínas de unión de PHA, según lo divulgado por Zhou *et al.* Alabama. Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.* 11:54 (2012).

50 Los microorganismos adecuados que producen P4HB pueden cultivarse mediante métodos conocidos en la técnica, y se indican como se describe anteriormente (por ejemplo, mediante 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 sus referencias), sin ninguna restricción particular. Preferentemente, el microorganismo y las condiciones de cultivo se seleccionan para producir altos contenidos de P4HB. En una realización particularmente preferente, los microorganismos contienen al menos 50 % en peso de P4HB medido como un porcentaje del peso de células secas.

55 Los polímeros de 4-hidroxibutirato enriquecidos para isótopos específicos de hidrógeno, oxígeno o carbono pueden fabricarse usando el mismo método de fermentación usado para fabricar PHA4400, sin embargo, usando sustratos que incluyen el isótopo de elección. Por ejemplo, el 1,4-butanodiol [$\text{HO}(\text{CD}_2)_4\text{OH}$ o 1,4-butanodiol, 1,1,2,2,3,3,4,4- d_8] deuterado se puede usar como alimentación de 1,4-butanodiol. Durante el proceso de fermentación, el 1,4-butanodiol deuterado se convierte en 4HB deuterado (es decir, [$^2\text{H}_8$]-4HB) y se polimeriza en D-P4HB. El polímero marcado se puede aislar y purificar por el mismo proceso usado para PHA4400.

60

B. Disolventes para soluciones de lavado

65 La biomasa P4HB se suspende en etanol y se lava a temperatura ambiente durante una hora. La proporción de etanol con respecto a biomasa P4HB es preferentemente de aproximadamente 4 kg de etanol por kg de biomasa P4HB. La cantidad óptima de etanol requerida para lavar la biomasa dependerá de la biomasa P4HB, la materia prima usada

para preparar la biomasa, el tiempo y la temperatura de lavado, el contenido de humedad de la biomasa y la cantidad de lípidos y otras impurezas a eliminar en la etapa de lavado. También se pueden usar soluciones acuosas de etanol para lavar la biomasa, aunque el método preferente es el lavado con etanol absoluto. Como alternativa, se puede usar etanol al 95 % (etanol a prueba de 190) u otras concentraciones acuosas de etanol.

5

III. Métodos de extracción de P4HV de mayor pureza

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

10

A. Lavado de biomasa 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 eliminación de lípidos y otras impurezas que pueden contaminar de otro modo el polímero de P4HB extraído. Dado que el etanol es un disolvente pobre (es decir, no disolvente) para el P4HB, pero un buen disolvente para los lípidos, el lavado elimina los lípidos pero no disuelve el P4HB. También se ha descubierto que la biomasa P4HB se puede lavar con etanol sin causar ninguna transesterificación del polímero de P4HB y, por lo tanto, la etapa de lavado se puede realizar sin ninguna pérdida significativa del peso molecular del polímero. Además, se ha descubierto que lavar el polímero P4HB con etanol antes de la extracción elimina las impurezas que pueden causar una decoloración o coloración amarillenta del producto purificado. Conjuntamente, estas mejoras permiten purificar el P4HB sin múltiples etapas de precipitación que se indican comúnmente para la extracción de polímeros de PHA.

20

Una de las principales ventajas de usar etanol para lavar la biomasa P4HB es su clasificación como disolvente de clase 3 (conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH), orientación para la industria, impurezas Q3C: disolventes residuales, 1997). Los disolventes de clase 3 son aquellos disolventes que se consideran que tienen un potencial tóxico bajo para el hombre y no tienen un límite de exposición basado en la salud establecido.

25

En una realización preferente, la biomasa P4HB se suspende en etanol y se lava a temperatura ambiente durante una hora. La proporción de etanol con respecto a biomasa P4HB es preferentemente de aproximadamente 4 kg de etanol por kg de biomasa P4HB. La cantidad óptima de etanol requerida para lavar la biomasa dependerá de la biomasa P4HB, la materia prima usada para preparar la biomasa, el tiempo y la temperatura de lavado, el contenido de humedad de la biomasa y la cantidad de lípidos y otras impurezas a eliminar en la etapa de lavado. También se pueden usar soluciones acuosas de etanol para lavar la biomasa, aunque el método preferente es el lavado con etanol absoluto. Como alternativa, se puede usar etanol al 95 % (etanol a prueba de 190) u otras concentraciones acuosas de etanol.

30

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

35

Después del lavado con etanol, la biomasa se puede separar del lavado con etanol mediante un método de separación sólido-líquido y se puede recolectar por cualquier medio adecuado. En una realización preferente, la biomasa de P4HB se recolecta por filtración o centrifugación. Si se desea, se puede realizar un lavado adicional de la biomasa P4HB recolectada, o la biomasa P4HB se puede enjuagar con etanol o etanol acuoso durante la recolección. Aunque no es necesario secar completamente la biomasa P4HB después de eliminar el lavado con etanol, en una realización preferente, la biomasa P4HB lavada con etanol se seca al aire. En una realización particularmente preferente, la biomasa de P4HB se seca hasta una concentración de etanol residual de entre 1 y 30 % en peso de etanol. Se ha descubierto que la presencia de mayores cantidades de etanol residual en la biomasa P4HB lavada no impactan de forma negativa en el rendimiento de recuperación del polímero o en el peso molecular ponderado medio del producto.

40

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

45

B. Extracción de biomasa P4HB

Después de que la biomasa P4HB se haya lavado con etanol, el polímero P4HB se puede extraer con un disolvente. Idealmente, el polímero P4HB tiene una alta solubilidad en los disolventes usados para extraer el polímero. Los disolventes preferentes para extraer el polímero 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 proporción del disolvente con respecto a la biomasa depende del contenido de polímero de la biomasa y de la naturaleza del disolvente. Si se usa muy poco disolvente, la viscosidad de la solución de polímero extraído puede llegar a ser demasiado alta, lo que dificulta el procesamiento adicional de la solución de polímero. En una realización particularmente preferente, la cantidad de disolvente necesaria se establece de modo que se forma una solución de disolvente de polímero que contiene 2-5 % en peso de polímero P4HB al final de la extracción.

Se ha descubierto que la cantidad de disolvente requerido para extraer el polímero 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 costo de disolvente adicional, el volumen de extracción reducido también disminuye la cantidad de no disolvente para el polímero P4HB que posteriormente se necesita para precipitar el polímero de la solución de disolvente. Aunque se prefiere precipitar el polímero de la solución para proporcionar un polímero con la mayor pureza posible, se reducen los costos de evaporación del disolvente si el polímero simplemente se concentra después de la extracción y no se precipita.

C. Precipitación del polímero P4HB y secado

El polímero P4HB puede recolectarse de soluciones disolventes de P4HB, que se han extraído de biomasa lavada con etanol P4HB, precipitando el polímero con un no disolvente. Esto es preferente a cristalizar el polímero a partir de una solución de disolvente, que puede requerir cantidades muy grandes de disolvente con el fin de producir un producto altamente puro y, por consiguiente, puede ser muy costoso.

El no disolvente usado para precipitar el polímero P4HB de una solución de disolvente de P4HB es preferentemente un alcohol o alcohol acuoso que es un disolvente pobre para el polímero P4HB. Se puede usar agua, etanol, etanol acuoso y metanol para precipitar el P4HB, sin embargo, el metanol no es un no disolvente preferente debido a la potencial toxicidad de los residuos de metanol en el producto purificado. En una realización particularmente preferente, el mismo tipo de disolvente (o una solución acuosa del disolvente) que se usa para lavar la biomasa P4HB también se usa como no disolvente para precipitar el polímero P4HB de la solución de polímero P4HB. Esto es particularmente deseable ya que limita el número de disolventes que se usan en el proceso de extracción y, por lo tanto, limita el número de residuos de disolventes que deben eliminarse y analizarse en el producto purificado final. En una realización particularmente preferente, se usa etanol para lavar la biomasa de P4HB, y se usa etanol o etanol acuoso como un no disolvente para precipitar el polímero de una solución de disolvente de P4HB. En una realización aún más preferente, la biomasa de P4HB se lava con etanol, y el polímero se precipita de una solución de disolvente de P4HB con soluciones acuosas de etanol que contienen 30-80 % en peso de etanol. El P4HB se puede lavar después de la precipitación con etanol o una solución acuosa de etanol.

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

No hay limitaciones particulares en cuanto a la temperatura que debe usarse para precipitar el polímero P4HB de la solución de disolvente, sin embargo, la temperatura debe ser más baja que el punto de ebullición de la solución de disolvente y más alta que su temperatura de congelación. En una realización preferente, la temperatura de la etapa de precipitación debe ser inferior a 50 °C y superior a 0 °C, y más preferentemente a una temperatura de menos de 25 °C.

El polímero P4HB precipitado puede recolectarse por cualquier medio adecuado para separar sólidos y líquidos, incluido el uso de filtración y centrifugación. El polímero P4HB recolectado puede lavarse adicionalmente con un no disolvente para P4HB. En una realización preferente, el polímero P4HB recolectado se puede lavar con etanol o etanol acuoso. También se puede usar un lavado adicional con etanol para desplazar el agua del polímero recolectado con el fin de facilitar el secado del polímero P4HB.

Una ventaja importante del método divulgado en el presente documento es que se puede obtener un polímero P4HB altamente puro con una sola etapa de precipitación. Se pueden realizar etapas de precipitación adicionales volviendo a disolver el polímero P4HB en un disolvente y repitiendo el procedimiento de precipitación. Sin embargo, en la realización preferente, el polímero P4HB se purifica con solo una única etapa de precipitación, lo que elimina el requisito de usar grandes cantidades de disolvente para la purificación de P4HB.

Después de recolectar el polímero precipitado, el P4HB puede desolventizarse y secarse por cualquier medio adecuado. Los métodos adecuados para eliminar el disolvente residual y secar el polímero incluyen secado al aire y

secado al vacío. También se pueden usar desecantes para secar el polímero, y se pueden usar temperaturas elevadas para acortar el tiempo requerido para eliminar el disolvente residual y secar el polímero.

D. Comparación de métodos de purificación

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

A diferencia, los nuevos métodos desarrollados y divulgados en el presente documento, permiten que el polímero P4HB se purifique 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 P4HB y filtrar la materia insoluble, y (c) una etapa para precipitar el polímero P4HB del disolvente con un sistema no disolvente de alcohol acuoso, lavar el polímero P4HB con etanol o etanol acuoso, y desolventizar y secar el polímero P4HB. El nuevo proceso no solo tiene muchas menos etapas, sino que también produce un polímero P4HB de mayor pureza. La tabla a continuación muestra una comparación lado a lado de las etapas de extracción de P4HB divulgadas en el documento WO 99/32536 y el método de extracción descrito en esta solicitud

Documento WO 99/32536	Método divulgado
fluidizar y liofilizar	Lavar la biomasa con etanol
Extraer PHA con THF	Extraer con disolvente el P4HB y filtrar la materia insoluble
Precipitar P4HB en agua	-
Redisolver P4HB en THF y eliminar impurezas	
Precipitar P4HB en el disolvente, lavar y liofilizar el polímero	Precipitar el P4HB del disolvente en el no disolvente, lavar, desolventizar y secar

En una realización preferente, la pureza del polímero P4HB purificado de acuerdo con los métodos descritos en las secciones IIA, IIB y IIC cumple con la siguiente especificación: (i) contenido de carbono de 55,81 % ± 0,5 %; (ii) contenido de hidrógeno de 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-hidroxitirato de 99,7 % ± 2 % en peso; (vi) residuo en la ignición de <0,2 %; (vii) un contenido de metales pesados de <20 ppm; y un contenido de azufre de <50 ppm. Como se muestra en el Ejemplo 2, el nuevo proceso también produce un polímero P4HB con un contenido de nitrógeno de menos de 40 ppm.

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

Los implantes hechos con polímero P4HB de alta pureza tienen propiedades sustancialmente mejoradas para muchas aplicaciones médicas. En particular, estos implantes tienen bajos niveles de impurezas orgánicas, impurezas inorgánicas y disolventes residuales que pueden reaccionar con el cuerpo después de la implantación. Los bajos niveles de estas impurezas reducirán o minimizarán las reacciones indeseables, como inflamación, citotoxicidad, irritación, pirogenidad, subcrónica y crónica. Los dispositivos hechos de o que incluyen P4HB de alta pureza se pueden preparar con contenidos de endotoxinas de menos de 20 unidades de endotoxinas por dispositivo.

Los implantes hechos o que incluyen el polímero P4HB de alta pureza y las mezclas que contienen P4HB, se pueden usar para la reparación, regeneración y reemplazo de tejidos blandos y duros. Estos implantes se pueden usar en dispositivos médicos, incluyendo, pero sin limitación: sutura, sutura barbada, sutura trenzada, sutura de monofilamento, sutura híbrida de monofilamento y fibras de multifilamento, trenzas, ligaduras, mallas tricotadas o tejidas, tubos tricotados, catéteres, mallas de monofilamento, mallas de multifilamento, parches, dispositivo de cicatrización, vendaje, vendaje para heridas, vendaje para quemaduras, vendaje para úlceras, sustitutivo de la piel, hemostato, dispositivo de reconstrucción traqueal, dispositivo de recuperación de órganos, sustitutivo de la duramadre, parche dural, guía para nervios, dispositivo de regeneración o reparación de nervios, dispositivo de reparación de hernias, malla de hernia, tapón de hernia, dispositivo para la cicatrización temporal o soporte para tejidos, armazón para ingeniería tisular, dispositivo de regeneración/reparación guiada de tejidos, membrana anti-adhesión, barrera de adhesión, membrana de separación de tejidos, membrana de retención, dispositivos de suspensión, dispositivos de reconstrucción del suelo pélvico, dispositivos de suspensión de la uretra, dispositivos para el tratamiento de la incontinencia urinaria, dispositivos para el tratamiento del reflujo vesicoureteral, dispositivo de reparación de vejigas, dispositivo de reparación del músculo del esfínter, partículas inyectables, microesferas inyectables, dispositivos de carga o formadores de volumen, armazón para médula ósea, clip, abrazadera, tornillo, pin, clavo, clavo de la cavidad

medular, placa ósea, tornillo de interferencia, tachuela, pieza de sujeción, remache, grapa, dispositivo de fijación para un implante, sustitutivo de injerto óseo, carga de hueso óseo, anclajes para sutura, anclaje de hueso, dispositivo de reparación de ligamentos, dispositivo de aumento de ligamentos, injertos de ligamentos, dispositivo de reparación del ligamento anterior cruzado, dispositivo de reparación de tendones, injerto de tendones, dispositivo de aumento de tendones, 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, que incluye, cardiovascular, periférica, uretérica, uretral, urología, gastroenterología, nasal, ocular o endoprótesis vasculares neurológicas y recubrimientos de endoprótesis vasculares, injerto de endoprótesis vascular, parche cardiovascular, globo para catéter, dispositivo de cierre vascular, dispositivo de reparación de defectos en el tabique intracardíaco, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de reparación del tabique auricular y dispositivos de cierre de PFO (orificio oval patente), dispositivo de cierre de apéndice auricular izquierdo (LAA), parche pericardíaco, válvula para venas, válvula cardíaca, injerto vascular, dispositivo de regeneración del miocardio, malla periodontal, membrana de regeneración guiada de tejidos para el tejido periodontal, implante de células oculares, dispositivo de formación de imágenes, implante coclear, dispositivo de embolización, dispositivo de anastomosis, dispositivo de sembrado de células, dispositivo de encapsulación de células, dispositivo de liberación controlada, dispositivo de administración de fármacos, dispositivo de cirugía plástica, dispositivo de elevación de senos, dispositivo de mastopexia, dispositivo de reconstrucción de mamas, dispositivo de aumento de mamas (incluidos los dispositivos de uso con implantes mamarios), dispositivo de reducción de mamas (incluidos los dispositivos para la eliminación, remodelación y reorientación del tejido mamario), dispositivos para la reconstrucción de las mamas después de la mastectomía con o sin implantes mamarios, dispositivo de reconstrucción facial, dispositivo de elevación de frente, dispositivo de elevación de cejas, dispositivo de elevación de párpados, dispositivo de elevación facial, dispositivo de ritidectomía, dispositivo de elevación con hilos (para elevar y soportar las zonas flácidas de la cara, ceja y cuello), dispositivo de rinoplastia, dispositivo para aumento de pómulos, dispositivo de otoplastia, dispositivo de elevación de cuello, dispositivo de mentoplastia, dispositivo de reparación cosmética y dispositivo para la revisión de cicatrices faciales.

Los dispositivos pueden incluir un agente terapéutico, profiláctico o de diagnóstico. Estos incluyen, por ejemplo, compuestos para el tratamiento, prevención, diagnóstico, cura o mitigación de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, sustancias que afectan 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. Estas incluyen sustancias biológica, fisiológica o farmacológicamente activas que actúa local o sistémicamente en el cuerpo humano o animal. Ejemplos pueden incluir, pero sin limitación, fármacos de molécula pequeña, proteínas, péptidos, azúcares y polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y combinaciones de los mismos, que pueden funcionar como agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, moléculas que afectan la migración celular, moléculas que afectan la división celular, moléculas que afectan la proliferación y diferenciación celular, moléculas que estimulan la modificación fenotípica de las células, moléculas que afectan la angiogénesis, moléculas que afectan la vascularización, moléculas que afectan la disposición de la matriz extracelular, ligandos de señalización, anticuerpos, factores de crecimiento, integrinas, antibióticos, esteroides, hidroxiapatita, partículas de plata, vitaminas y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos. Los materiales también pueden incluir materiales de matriz extracelular como fibronectina, laminina, vitronectina, quitosán y derivados del mismo, alginato y derivados del mismo, colágeno y ácido hialurónico y derivados del mismo. Los ácidos nucleicos incluyen moléculas antisentido, aptámeros, ARNs, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos.

La presente invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

45 **Ejemplo 1: Lavado de la biomasa P4HB con etanol**

Una biomasa que contiene P4HB (M_p de 468 kDa, por cromatografía de permeación en gel (CPG) en relación con patrones de poliestireno), preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO 99/32536 de Martin, se suspendió en etanol a temperatura ambiente. Después de una hora, la biomasa P4HB se eliminó por filtración y el lavado con etanol se concentró para producir un alquitrán negro. El análisis del alquitrán por RMN 1H demostró que el extracto de etanol de la biomasa P4HB estaba compuesto casi totalmente por lípidos saturados e insaturados.

55 También se determinó que el contenido de nitrógeno del alquitrán era del 0,65 % en peso.

60 **Ejemplo 2: Purificación de la biomasa P4HB lavada con etanol**

La biomasa P4HB lavada con etanol procedente del Ejemplo 1 se centrifugó en una centrifuga de cesta para eliminar la mayor parte de la solución de lavado con etanol. El polímero P4HB se extrajo en un disolvente orgánico, se precipitó en etanol acuoso (30 %) y se recolectó para análisis. Se encontró que el contenido de nitrógeno del polímero P4HB extraído de la biomasa P4HB lavada con etanol era de 37 ppm según lo determinado por el método Kjeldahl (Bradstreet, *Anal. Chem.*, 26 (1):185-187 (1954)). Las fracciones en masa de carbono e hidrógeno del polímero P4HB purificado se determinaron mediante análisis de combustión elemental usando un instrumento LECO CHN 2000 (siguiendo las instrucciones del fabricante), y se encontró que eran 55,89 % y 7,05 %, respectivamente. Estos valores se acercan a los valores teóricos para el poli-4-hidroxibutirato: carbono 55,81 % e hidrógeno 7,02 %. No se observó una pérdida significativa de peso molecular del polímero P4HB. El peso molecular ponderado medio del polímero

P4HB purificado se determinó por CPG en relación con el poliestireno, y se encontró que era de 449 kDa (frente a 468 kDa antes de la purificación), lo que indica que la etapa de lavado con etanol no causó una pérdida de peso molecular por transesterificación de P4HB con etanol. La pureza del polímero P4HB se determinó mediante análisis CG (cromatografía de gases) (como se describe en el Ejemplo 3), y se encontró que era de 99,5 %. El análisis de RMN con protón del polímero 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 P4HB purificado fue de 0,22 unidades de endotoxinas (UE)/g, que es lo suficientemente bajo como para permitir la fabricación de implantes usando P4HB con un contenido de endotoxinas de menos de 20 unidades de endotoxinas por dispositivo.

10 Ejemplo 3: Análisis de la pureza de P4HB por CG

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

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

La reacción de butanolisis se realiza añadiendo 3 ml del reactivo de butanolisis (preparado como se describe anteriormente) a una masa conocida de una muestra de P4HB (aproximadamente 25 mg) en un vial. El vial se sella y se calienta a 90-92 °C durante 16-20 horas. (Se puede generar una curva convencional mediante butanolisis de cantidades conocidas de gamma-butirolactona de alta pureza (GBL).) Tras el calentamiento, los viales se dejan enfriar, se añaden 3 ml de agua y el contenido del vial se mezcla completamente, y luego se deja separar. El contenido de 4HB en la muestra puede determinarse luego por análisis de CG de la capa orgánica separada en el vial, usando las muestras convencionales de GBL para crear una curva convencional.

El análisis de CG se realiza inyectando 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 muestreador automático, 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 usado como gas portador a 2 ml/min. La temperatura de entrada se establece en 225 °C y la relación de división es de 50:1. El programa de temperatura del horno se establece en 80 °C durante 2 minutos, aumentando de 10 °C por minuto a 280 °C, y se mantiene a 280 °C durante 2 minutos. En el detector, la temperatura se establece en 290 °C, el caudal de hidrógeno es de 40 ml/min, el gas de reposición de helio se establece en 45 ml/min y el caudal de aire del detector se establece en 450 ml/min.

La masa de 4HB en el polímero P4HB se determina a partir de la integración del pico agudo de 4-clorobutirato de butilo en el cromatógrafo CG. La masa de 4HB en la muestra se puede determinar a partir de la curva convencional de GBL (representada como una masa frente al área integral del pico de 4-clorobutirato de butilo). La pureza de la muestra se determina como el porcentaje de masa de 4HB en relación con la masa del polímero multiplicado por 100 %. La pureza de P4HB purificado por los métodos descritos en el presente documento es de 99,7 +/- 2 % en peso.

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

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

La biomasa P4HB seca se suspende en etanol absoluto en una proporción de 1 kg de biomasa a 4 kg de etanol y 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 eliminar el disolvente de lavado. Durante la centrifugación, se realiza un lavado adicional con etanol para desplazar más el disolvente de lavado. La centrifugación se realiza 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 en busca de volátiles residuales y se recolecta para la extracción de polímeros.

La biomasa lavada recolectada 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 como cloroformo, diclorometano, dimetilformamida, tetrahidrofuran, acetona, dioxano y mezclas de estos. Una vez completada la extracción, el extracto se filtra para eliminar los restos celulares e insolubles, y el polímero se precipita bombeando el filtrado en un no disolvente para P4HB. Se usa una solución de etanol y agua (entre 30-80 % de etanol en peso) como no disolvente. Cuando el filtrado se bombea en esta solución acuosa de etanol, el P4HB precipita en forma de un sólido, y se recolecta y se lava adicionalmente con etanol.

Después del lavado, el polímero P4HB recolectado se transfiere a un horno de secado al vacío y se seca a 45 °C al vacío.

5 **Ejemplo 5: Análisis del contenido de ácido graso (lípidos) de P4HB mediante CG**

El análisis de ácidos grasos en una muestra de P4HB se lleva a cabo de manera similar al análisis de pureza de butanolisis por CG según el Ejemplo 3, excepto que 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 butanolisis 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 un CG como en el Ejemplo 3. El ácido palmítico, el lípido más frecuente en animales, plantas y microorganismos, se usa como un lípido o ácido graso representativo para evaluar la pureza y el contenido de lípidos de una muestra, incluso aunque otros ácidos grasos o lípidos también pueden estar presentes en la muestra. Una curva convencional para el área máxima de palmitato de butilo frente a su masa se genera y se usa para determinar el contenido de ácidos grasos de la muestra de P4HB. La concentración de ácido graso se indica como ppm de ácido graso de palmitato.

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

Siete muestras de polímero de P4HB purificadas de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO 99/32536 de Martin se analizaron por triplicado para el contenido de lípidos como en el Ejemplo 5. Se encontró que la cantidad de lípido en las muestras varió de 304 a 2.207 ppm y el promedio fue de 873 ppm, con una desviación estándar de 629 ppm. En comparación, se encontró que el contenido residual de lípidos encontrado en muestras de P4HB purificadas mediante el método del Ejemplo 2 era inferior a 100 ppm.

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

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

45 **Ejemplo 8: Preparación de implantes P4HB (D-P4HB) deuterados y procedimiento de implantación**

Se realizaron experimentos para cuantificar la liberación de ácido 4-hidroxitúterico (4HB) durante la degradación y absorción de un implante PHA4400 (TephaFLEX). Durante este estudio, se monitorizó la concentración en sangre de 4HB marcado con deuterio (D-4HB) en conejos que se habían implantado con PHA4400 marcado con deuterio (D-PHA4400). La concentración en sangre del 4HB nativo (es decir, sin marcar) también se monitorizó para determinar si el D-4HB liberado de un implante D-PHA4400 afectó los niveles nativos de 4HB. Además, la sangre de los conejos se analizó para los parámetros clínicos de sangre tradicionales.

Un implante PHA4400 se degradará en el cuerpo principalmente por hidrólisis para producir 4HB. Este monómero es un componente normal del suero sanguíneo de los mamíferos y se encuentra dentro de diversos tejidos, incluyendo el cerebro, el corazón, el riñón, el hígado, el pulmón, el músculo y la grasa parda (Nelson, *et al.*, *J. Neurochem.*, 37: 1345-1348 (1981)). La concentración de 4HB en estos tejidos varía de 2,3 a 37,4 nmoles/g de tejido (o de 0,24 a 3,8 miligramos por kg de tejido, basado en un peso de fórmula de 104 g/mol). El cuerpo metaboliza rápidamente 4HB, y su semivida es de aproximadamente 27 minutos (Nelson, *et al.*, *J. Neurochem.*, 37: 1345-1348 (1981); Sendelbeck, *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* 13: 291 (1985)). 4HB se elimina del cuerpo principalmente por el metabolismo (a través del ciclo de Krebs) y, en segundo lugar, por la oxidación beta, en última instancia, a dióxido de carbono y agua.

D-P4HB se realizó usando el mismo método de fermentación divulgado en el presente documento. Sin embargo, el 1,4-butanodiol [HO(CD₂)₄OH o 1,4-butanodiol,*l,l*,*2,2*,*3,3*,*4,4*-d₈] deuterado se usó como alimentación en lugar de 1,4-butanodiol. Durante el proceso de fermentación, el 1,4-butanodiol deuterado se convirtió en 4HB deuterado (es decir, [²H₆]-4HB) y se polimeriza en D-P4HB. El polímero marcado se aisló y se purificó por el mismo proceso usado para P4HB. Los espectros de RMN para el D-P4HB (n.º de lote DM21.87) mostraron que el espectro de RMN ¹³C del polímero marcado es un poco más complicado que el polímero no marcado, ya que cada carbono unido al deuterio se divide en un multiplete. El carbonilo (sin unión D) aparece como un singlete. El espectro de RMN ¹H del polímero

marcado no muestra el deuterio, sino que muestra protones residuales en sus cambios químicos esperados.

El análisis elemental del polímero mostró que el nivel de carbono era de 52,08 %, que está dentro de los límites aceptables del valor esperado de 52,20 % ($\pm 0,5$ %) para la fórmula de repetición de $C_4D_6O_2$ calculada para el isótopo pesado. El porcentaje en peso de deuterio no se calculó. El polímero se sometió a una ronda adicional de purificación para producir un nuevo lote (n.º de lote 225-030). Se determinó que el Mp de este nuevo lote era 525 K. El análisis CG para el n.º de lote 225-030 pasó el ensayo de pureza (98,3 % de pureza).

Método de implantación

Ocho conejos fueron usados para el estudio. Se implantaron por vía subcutánea seis (6) discos de material D-PHA4400 (M6) en la parte posterior de cada uno de los seis conejos, por lo que cada animal se implantó con aproximadamente 341 mg de D-PHA4400. Los otros dos conejos fueron implantados con 6 discos de polietileno de alta densidad (HDPE) como controles. Para facilitar la recuperación posterior de los implantes, se tatuaron las áreas de peri-incisión.

Después de la cirugía, se encontró que un conejo en el estudio (conejo 8) tenía una masa dura en el abdomen unos días después de la implantación. El tratamiento con antibióticos no fue exitoso y el animal fue sacrificado en el día 28.

Debido a su ubicación en el músculo abdominal, es muy probable que esta masa no esté relacionada con el implante, pero se cree que es anterior a los implantes. Para reemplazar este animal, se añadió un animal adicional (conejo 9) al estudio al mes. La recuperación de los otros animales (1-7, 9) en el estudio transcurrió sin incidentes.

Los conejos se mantuvieron durante un período de 1 año y se extrajo sangre de cada conejo mensualmente para el análisis de las concentraciones de $[^2H_6]$ -4HB y 4HB en el suero. Las muestras de sangre se recolectaron mediante anticoagulación con fluoruro, se centrifugaron y las muestras de suero se almacenaron congeladas a -20 °C para el análisis de lotes a los 3 y 6 meses y 1 año. Los parámetros clínicos de química sanguínea se determinaron en el preimplante, 3 meses, 6 meses y 1 año (Nota: se realizaron pruebas clínicas adicionales a los 4 y 5 meses). Al final del estudio, se sacrificaron los animales y se recogió cualquier material residual de implante para el análisis de pérdida de masa y Mp. Las muestras de tejido tomadas de los sitios de implantación de cada animal se procesaron para el análisis histológico.

Metodología del análisis de sangre

Para analizar la presencia de 4HB en la sangre, se añadieron muestras de suero (0,5 ml) con 8,6 nmol de 5-hidroxipentanoato (es decir, valerolactona) como patrón interno, se desproteinizaron con ácido sulfosalicílico, se centrifugaron y se extrajeron con éter (3 veces). Los extractos agrupados se secaron sobre sulfato de sodio, se concentraron y se hidrolizaron con NaOH (1 ml, 10 mM). Después de la evaporación, el residuo se convirtió en el derivado trimetilsililo. La cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas (CG-EM) se realizó usando un motor Hewlett-Packard MS en el modo de ionización química positiva de amoníaco. Los iones se monitorizaron para 4HB no marcado a m/z 249, $[^2H_6]$ 4HB a m/z 255 y el patrón interno valerolactoma a m/z 263, como los derivados de trimetilsililo. Un patrón de referencia de $[^2H_6]$ 4HB se preparó por hidrólisis del D-PHA4400. La condiciones del ensayo se optimizaron mediante la preparación de curvas convencionales usando muestras de repuesto de plasma de conejo. El perfil de temperatura de la columna CG se optimizó de modo que los 3 compuestos se eluyeran sin interferencias de compuestos desconocidos y esto se verificó por la identidad de las distribuciones de isotopómeros en masa de los 3 compuestos en soluciones acuosas puras y en extractos de plasma. La curva convencional era lineal en el intervalo de 0 a 15 nmol y se muestra en la Figura 1A.

Resultados

Las muestras de suero fueron analizadas durante los 6 meses del estudio. Se encontró que la concentración sérica basal media de 4HB (es decir, antes de la implantación del D-PHA4400 y los discos de control) era de $10,6 \pm 2,9$ nmol/ml. Durante el período de observación de 6 meses, no hubo diferencia significativa en la concentración sérica de 4HB entre el control y los animales implantados con D-PHA4400. Durante el período de observación de 6 meses, la concentración sérica de 4HB disminuyó a aproximadamente 4 nmol/ml tanto en el control como en los animales implantados con D-PHA4400, como se muestra en la Figura 1B y la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración en sangre de 4HB después del implante de discos PHA4400 o HDPE marcados con deuterio por vía subcutánea en un modelo de conejo.

Tiempo, meses	Conc. sanguínea de 4HB con implante D-PHA4400 (nmol/ml)	Conc. sanguínea 4HB de control con implante HDPE (nmol/ml)
0	10,60 \pm 2,89	10,60 \pm 2,89
1	11,65 \pm 2,58	13,82 \pm 2,83
2	10,88 \pm 2,11	10,87 \pm 3,34
3	8,35 \pm 1,84	8,90 \pm 0,41

4	5,30 ±2,35	3,29 ±2,43
5	4,22 ±1,78	3,22 ±0,76
6	4,79 ±1,56	4,66 ±2,38

Después de la cirugía de implantación, la concentración de [²H₆]-4HB en el suero sanguíneo de todos los animales de prueba excepto de uno estuvo por debajo del límite de detección del ensayo (aproximadamente 1 nmol/ml). En un animal (conejo 6), se encontró que la concentración de [²H₆]-4HB en el suero sanguíneo era de 2,52 y 1,88 nmol/ml al mes y 2 meses después de la implantación, respectivamente. Estas concentraciones representan el 18-24 % del nivel basal del metabolito natural GHB en el tiempo cero. Esta cantidad de [²H₆]-4HB es menor que la desviación estándar observada en el nivel basal de GHB y no causa un cambio significativo en la concentración sérica total de GHB en sangre (marcado y sin marcar) ya que la concentración basal de GHB varió entre 6,95 y 15,79 nmol/ml (10,8 ± 2,89 nmol/ml). A los 3 a 6 meses después de la cirugía, ninguno de los animales tenía niveles detectables de [²H₆]-4HB en su suero sanguíneo.

Tabla 2. Concentración sérica de [²H₆]-4HB después de la implantación por vía subcutánea de discos de polímero D-PHA4400 o HDPE en un modelo de conejo

ID de conejo	Material de implante	Basal (preimplante)	Concentración de [² H ₆]-4HB (nmol/ml) Mes						
			1	2	3	4	5	6	
2	D-PHA4400	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	D-PHA4400	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	D-PHA4400	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	D-PHA4400	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	D-PHA4400	ND	2,52	1,88	ND	ND	ND	ND	ND
9	D-PHA4400	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	HDPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	HDPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND :No detectado.
Nota: El conejo 8 se sacrificó el día 28. El conejo 9 se implantó 1 mes después de los conejos 1-8.

15 Química clínica

Además del análisis de suero sanguíneo para 4HB y D-4HB, las muestras de suero se analizaron para los parámetros clínicos convencionales (bicarbonato, BUN, Creat, glucosa, AST, ALT, alkphos, alb, TB, Db y proteína total). Estos valores no fueron notables, excepto para el conejo 6, que mostró un nivel de bicarbonato reducido (16 meq/l) en el preimplante y un BUN elevado (40 mg/dl) a los 3 meses después del implante (Tabla 3). Estos valores se atribuyeron a una leve deficiencia renal en este animal y se juzgaron clínicamente irrelevantes. De forma destacable, este animal (conejo 6) fue el único conejo que mostró una cantidad medible de D-4HB en su suero sanguíneo, aunque el nivel de D-4HB medido fue muy bajo y cercano al límite de detección.

Tabla 3. Parámetros sanguíneos clínicos del suero después de la implantación de D-PHA4400 o HDPE (control) medidos a un tiempo 0 y a los 3 meses.

	HC03 22-26 meq/l	BUN 8-25 mg/dl	Creat 0,6-1,5 mg/dl	Glu mg/dl	AST 9-40 U/l	ALT 7-55 U/l	alkphos <200 U/l	alb 3,1-4,3 g/dl	TB Bilirrubina 0-1 mg/dl	Db Bilirrubina 0-0,4 mg/dl	Proteína total 6-8 g/dl
CONTROLES											
19 de julio	24	17	0,9	99	22	37	44	1,6	<0,1	<0,1	5,2
19 de julio	23	11	0,8	126	9	28	158	1,5	0,1	0,1	4,8
PROMEDIO	23,5	14	0,85	112,5	15,5	32,5	101	1,55	0,1	0,1	5
CONTROLES											
25 de octubre	22	22		108	22	51	20	1,6	0,1	<0,1	4,9
25 de octubre	25	21		118	9	37	53	1,9	0,2	0,1	5,5
PROMEDIO	23,5	21,5		113	15,5	44	36,5	1,75	0,15	0,1	5,2
Conejos implantados con poli-GHB											
20 de julio	22	21	0,9	122	10	23	59	1,7	0,1	<0,1	5,1
25 de octubre	21	21		119	13	31	49	1,8	0,1	<0,1	5,3
20 de julio	19	17		122	20	34	301	1,9	<0,1	<0,1	5,7
25 de octubre	21	22	0,9	113	19	27	113	1,8	0,1	<0,1	5,4
19 de julio	20	17	0,7	103	20	34	97	1,6	<0,1	<0,1	4,8
25 de octubre	21	17	0,8	100	10	32	51	1,6	<0,1	0,1	4,8
19 de julio	22	16		106	9	41	51	1,6	0,1	0,1	4,7
25 de octubre	27	20		118	4	31	34	1,8	0,1	0,1	5,3
19 de julio	14	17	1,2	108	20	17	69	1,5	0,2	0,1	5,1
25 de octubre	23	41	1,4	109	6	21	18	1,9	0,1	0,1	5,6
repetición del 19 de julio	16	19	1,3	108	13	17	86	1,7	0,3	0,1	5,6
repetición del 25 de octubre	21	40	1,4	103	8	20	23	1,8	0,2	0,1	5,7
19 de agosto	24	18		108	15	42	79	1,6	<0,1	0,1	5
25 de octubre	24	21		119	6	28	56	1,7	0,1	0,1	5,2
Promedio de julio	20,2	17,7	1,0	111,5	15,7	31,8	109,3	1,7	0,1	0,1	5,1
Desv. estándar de julio	3,2	1,6	0,1	7,6	4,7	9,1	87,0	0,1	0,0	0,0	0,3
Promedio de octubre	22,8	23,7	1,0	113,0	9,7	28,3	53,5	1,8	0,1	0,1	5,3
Desv. estándar de octubre	2,2	7,9	0,2	6,9	5,1	3,7	29,5	0,1	0,0	0,0	0,2

Conclusión del estudio de biodisponibilidad

5 El análisis del suero sanguíneo de conejos implantados con D-PHA4400 no mostró cambios significativos en la concentración en sangre de 4HB nativo en comparación con los conejos de control implantados con HDPE. Además, la concentración de D-4HB en el suero sanguíneo se mantuvo por debajo del límite de detección (aproximadamente 1 nmol/ml) en todos los animales excepto en uno. Un animal (conejo 6) mostró un nivel detectable de D-4HB en su suero sanguíneo a los 1 y 2 meses posteriores a la implantación, sin embargo, la concentración estaba por debajo del límite de detección a los 3 a 6 meses en este animal y, de otro modo, en todos los demás animales. Como tal, la liberación de 4HB de un implante PHA4400 no afecta el nivel de 4HB nativo en la sangre, ni se acumula en la sangre.

10 La química sanguínea de los animales implantados con PHA4400 se mantuvo normal durante el período de observación de 6 meses. Un animal (conejo 6) mostró un nivel ligeramente reducido de bicarbonato y un ligero implante de BUN elevado y a los 3 meses, respectivamente. Estos valores no se consideraron clínicamente relevantes, ya que los parámetros sanguíneos clínicos del animal volvieron a la normalidad a los 4 meses y el animal estaba, por lo demás, sano. En conclusión, la liberación de 4HB de un implante PHA4400 no afecta negativamente a los parámetros clínicos convencionales de sangre medidos en este estudio.

15 Dado que 4HB no es tóxico, se libera lentamente de un implante y se puede metabolizar fácilmente, se espera que la cantidad de 4HB liberada de un implante PHA4400 durante su degradación en el cuerpo sea segura y bien tolerada por el cuerpo.

20 La cantidad de D-PHA4400 implantada en cada conejo en este estudio fue de aproximadamente 341 mg. Dado que el peso medio de un conejo es de aproximadamente 3 a 3,5 kg, la cantidad de D-PHA4400 implantada es de aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal. Sobre una base de masa, esto sería similar a implantar más de 6 g de PHA4400 en una persona, suponiendo que la persona pesaba, por ejemplo, 60 kg. Se espera que muchos dispositivos médicos fabricados con PHA4400 pesen menos de 6 g, por lo que la cantidad de PHA4400 usada en este estudio en conejos es representativa de un dispositivo médico bastante masivo fabricado de PHA4400.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende polímero de poli-4-hidroxitbutirato (P4HB), en donde:

- 5 (a) la composición tiene un contenido de ácido palmítico de menos de 100 ppm según lo determinado por el análisis de cromatografía de gases después de la butanolisis, o
 (b) la composición se produce mediante un proceso que comprende: añadir una cantidad efectiva de etanol a una biomasa que contiene P4HB para extraer los lípidos en el etanol; separar la biomasa de P4HB del etanol mediante separación sólido-líquido; recolectar la biomasa lavada con etanol; y extraer el polímero P4HB en un disolvente; y

10 en donde el polímero tiene una o más propiedades seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (i) la abundancia de deuterio en el polímero excede el 0,0115 % de todo el hidrógeno elemental presente en el polímero, y/o el polímero contiene tritio; (ii) la abundancia de carbono-13 en el polímero excede el 1,07 % de todo el carbono elemental presente en el polímero y/o el polímero contiene carbono-14; y (iii) la abundancia de oxígeno-17 en el polímero excede el 0,038 % de todo el oxígeno elemental presente en el polímero, y/o la abundancia de oxígeno-18 en el polímero excede el 0,205 %.

20 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la abundancia de deuterio en el polímero excede el 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 % del hidrógeno elemental presente en el polímero.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero se extrae de la biomasa lavada con etanol con un disolvente, se precipita con un no disolvente para el polímero, se recoge y se seca.

25 4. La composición de la reivindicación 3, en la que el disolvente se selecciona de entre el grupo que consiste en cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, dioxano, acetato de etilo, carbonato de dimetilo, dimetilsulfóxido, dimetil formamida, metiletilcetona, acetato de butilo, propionato de butilo y carbonato de dietilo, y el no disolvente se selecciona de entre el grupo que consiste en etanol o etanol acuoso.

30 5. La composición de la reivindicación 1, en la que el peso molecular ponderado medio del polímero es de 50.000 a 1,2 millones de Da.

6. La composición de la reivindicación 1 en la que la composición comprende además un agente terapéutico, de diagnóstico o profiláctico.

35 7. La composición de la reivindicación 1 esterilizada con gas de óxido de etileno frío, irradiación gamma o irradiación con haz de electrones.

8. La composición de la reivindicación 1 para su uso en la reparación, la regeneración o el reemplazo de tejidos blandos o duros, o usada como recubrimiento en un dispositivo médico.

40 9. La composición de la reivindicación 1 en donde la composición forma una fibra en donde la fibra tiene una resistencia a la tracción de más de 126 MPa, opcionalmente en donde la composición se usa para formar un hilo en donde la tenacidad del hilo es mayor de 0,5 gramos por denier.

45 10. La composición de la reivindicación 9, en donde la composición se usa para formar un hilo en donde la tenacidad del hilo es mayor de 0,5 gramos por denier y la composición está conformada en una sutura o un textil.

50 11. Un método para fabricar una composición que comprende polímero de poli-4-hidroxitbutirato (P4HB), en el que se han enriquecido los isótopos de hidrógeno, carbono y/u oxígeno en el polímero, que comprende:

- añadir una cantidad efectiva de etanol a una biomasa que contiene P4HB para extraer los lípidos en el etanol; separar la biomasa de P4HB del etanol mediante separación sólido-líquido; recolectar la biomasa lavada con etanol; y extraer el polímero P4HB en un disolvente; comprendiendo el método alimentar el 1,4-butanodiol que se ha enriquecido en un isótopo de hidrógeno, carbono y/u oxígeno a un microorganismo que contiene una PHA sintasa para obtener la biomasa de P4HB.

12. El método de la reivindicación 11 en el que el 1,4-butanodiol está total o parcialmente deuterado.

60 13. Un método para monitorizar la degradación del polímero de poli-4-hidroxitbutirato *in vivo*, en el que se han enriquecido los isótopos de hidrógeno, carbono y/u oxígeno en el polímero, y en el que un metabolito enriquecido con isótopos del polímero se detecta en una muestra de sangre u orina, en donde:

- (a) el polímero tiene un contenido de ácido palmítico de menos de 100 ppm según lo determinado por el análisis de cromatografía de gases después de la butanolisis, o
 65 (b) el polímero se produce mediante un proceso que comprende: añadir una cantidad efectiva de etanol a una biomasa que contiene P4HB para extraer los lípidos en el etanol; separar la biomasa de P4HB del etanol mediante

separación sólido-líquido; recolectar la biomasa lavada con etanol; y extraer el polímero P4HB en un disolvente.

14. El método de la reivindicación 13, en el que el metabolito es 4-hidroxibutirato enriquecido con isótopos de hidrógeno, carbono y/u oxígeno.

5 15. El método de la reivindicación 13, en el que el metabolito enriquecido con isótopos se detecta usando espectroscopía de masas en presencia del metabolito natural 4-hidroxibutirato.

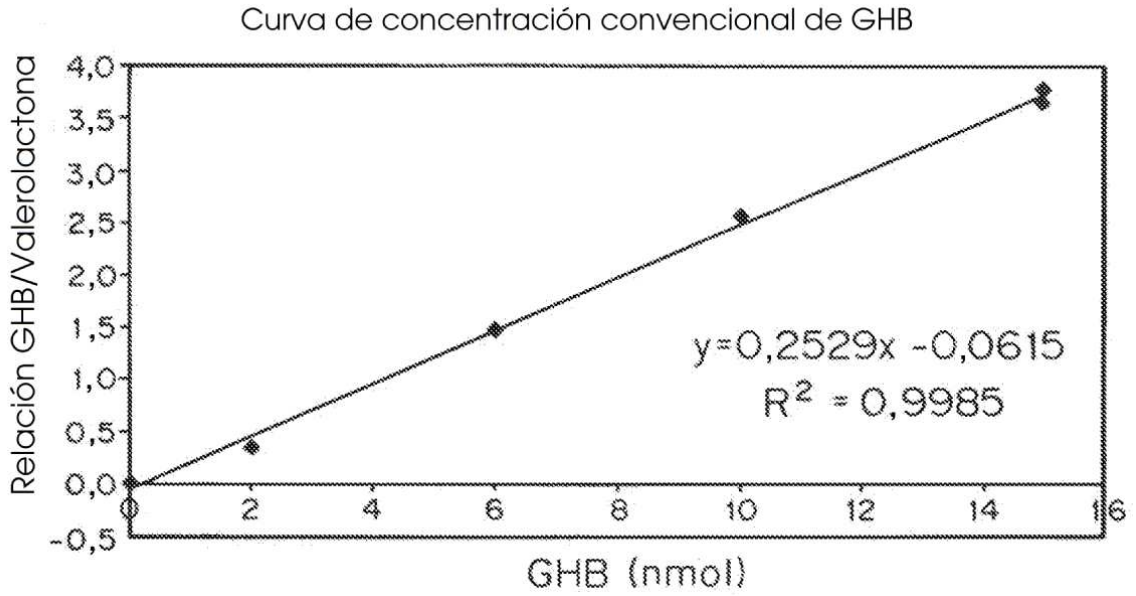


FIG. 1A

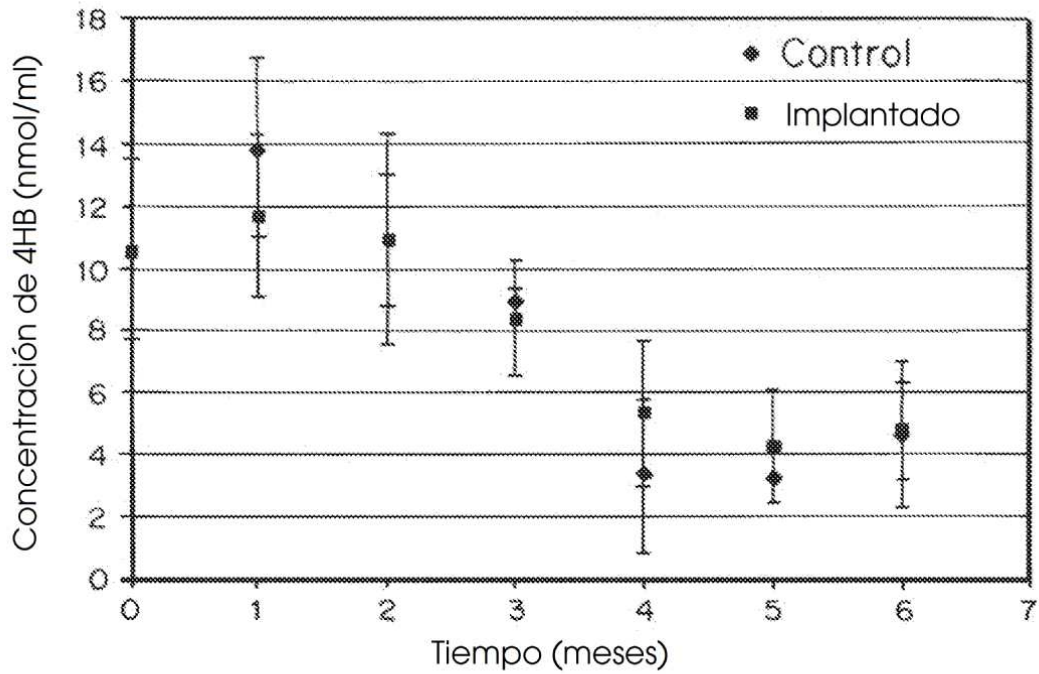


FIG. 1B