

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 964**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2003** **E 11193920 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019** **EP 2431475**

54 Título: **Polímero bioabsorbible que contiene monómeros de 2-hidroxiácido**

30 Prioridad:

**10.05.2002 US 37958302 P**

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

**12.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 741 964 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Polímero bioabsorbible que contiene monómeros de 2-hidroxiácido

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención está generalmente en el campo de los métodos para fabricar monómeros de 2-hidroxiácido y los polímeros de polihidroxialcanoato resultantes.

10 Numerosos microorganismos tienen la capacidad de acumular reservas intracelulares de polímeros de poli[(R)-3-hidroxialcanoatos] ("PHA"). Los PHA son materiales termoplásticos biodegradables, producidos a partir de recursos renovables, con una amplia variedad de aplicaciones biomédicas e industriales (Williams y Peoples, 1996, CHEMTECH 26, 38-44). Aproximadamente 100 monómeros distintos se han incorporado en polímeros PHA, como se informa en la bibliografía (Steinbüchel y Valentin, 1995, FEMS Microbiol. Lett. 128; 219-228) y recientemente se ha  
15 revisado la biología y genética de su metabolismo (Huisman y Madison, 1998, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 21-53).

Se han desarrollado procesos de fermentación y recuperación para un abanico de tipos de PHA usando una diversidad de bacterias incluyendo *Azotobacter*, *Alcaligenes latus*, *Comamonas testosteroni* y *E. coli* y *Klebsiella* diseñadas por  
20 ingeniería genética, como recientemente se revisó por Brauneegg et al., 1998, Journal of Biotechnology 65: 127-161; Choi y Lee, 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 13-21. Se han examinado también enfoques más tradicionales de síntesis de polímeros, incluyendo la condensación directa y polimerización por apertura de anillo de las lactonas correspondientes (Jesudason y Marchessault, 1994, Macromolecules 27: 2595-2602).

25 Se ha descrito la síntesis de polímeros de PHA que contienen el monómero 4-hidroxibutirato (PHB4HB, Doi, Y. 1995, Macromol. Symp. 98, 585-599) o poliésteres de PHA que contienen 4-hidroxivalerato y 4-hidroxihexanoato (Valentin et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 507-514 y Valentin et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 710-716). Los copolímeros PHB4HB pueden producirse con una diversidad de composiciones de monómeros que proporcionan un abanico de propiedades poliméricas (Saito, Y, Nakamura, S., Hiramitsu, M. y Doi, Y., 1996, Polym. Int. 39: 169).

30 El documento WO 99/32536 desvela homo-y co-polímeros de PHA biocompatibles, basados en ácido 4-hidroxibutírico, que tienen velocidades de degradación controladas. Estas composiciones pueden usarse en aplicaciones médicas, tales como ingeniería de tejidos, administración de fármacos y técnicas de formación de imágenes. El homopolímero de poli(4-hidroxibutirato), o P4HB, se ha sintetizado en *E. coli* recombinante (Hein et al., 1997, FEMS  
35 Microbiol. Lett. 153:411-418) usando PHA sintasa de *Ralstonia eutropha* procedente de plásmido (*phaC*) y los genes de 4HB-CoA transferasa de *Clostridium kluyveri* (*orfZ*).

Se han descrito también copolímeros PHA de 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxipropionato (Shimamura et al., 1994, Macromolecules 27: 4429-4435; Cao et al., 1997, Macromol. Chem. Phys. 198: 3539-3557). El nivel más alto de 3-  
40 hidroxipropionato incorporado en estos copolímeros es el 88 % en moles (Shimamura et al., 1994, 27: 4429-4435 Macromoléculas).

El documento WO 02/08428A2 de Metabolix Inc. describe bacterias diseñadas por ingeniería genética para la  
45 producción de copolímeros de PHA a partir de materias primas de poli(ol). Aunque se han incorporado más de 100 monómeros diferentes en PHA en organismos, nunca se ha informado de la presencia de ácido glicólico en un PHA biosintético. El ácido glicólico es el más sencillo de los hidroxiácidos, y previamente se han sintetizado químicamente polímeros que contienen ácido glicólico. Por ejemplo, los polímeros de ácido glicólico de alto peso molecular se preparan de forma preferencial por polimerización por apertura de anillo a partir del dímero cíclico, glicólido. Los polímeros que contienen ácido glicólico se usan en suturas absorbibles, dispositivos de fijación interna, andamiajes  
50 de ingeniería de tejidos, matrices de liberación de fármacos, etc. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 3.867.190; la patente de EE.UU. N.º 3.736.646; Fukuzaki, et al., "A new biodegradable copolymer of glycolic acid and lactones with relatively low-molecular weight prepared by direct copolycondensation in the absence of catalysts" en J. Biomed. Mater. Res. 25(3):315-28 (1991). Se han usado polímeros sintéticos que contienen ácido glicólico para dispositivos médicos absorbibles desde los años 70. Véase, por ejemplo, Chujo, et al., "Ring-opening polymerization of glycolide" en Makromol. Chem. 100:262-6 (1967); Fukuzaki, et al., "Direct copolymerization of glycolic acid with  
55 lactones in the absence of catalysts" en Eur. Polym. J. 26(4):457-61 (1990); Kricheldorf, et al., "Poly(lactones, 2. Copolymerization of glycolide with  $\beta$ -propiolactone,  $\gamma$ -butyrolactone or  $\delta$ -valerolactone" en Makromol. Chem. 186(5):955-76 (1985); Kricheldorf, et al., "Poly(lactones, 3. Copolymerization of glycolide with L,L-lactide and other lactones" en Makromol. Chem. 12 (Polym. Specific Prop.):955-76 (1985); Nakayama, et al., "Synthesis and  
60 biodegradability of novel copolyesters containing  $\gamma$ -butyrolactone units" en Polymer 39(5):1213- 1222 (1998); Nakayama, et al., "Syntheses of biodegradable polyesters and effect of chemical structure on biodegradation" en Nippon Kagaku Kaishi 1:1-10 (2001). Sin embargo, los copolímeros formados a partir de ácido glicólico y diversas lactonas por síntesis química tienen pesos moleculares relativamente bajos. Además, es difícil controlar la estereoconfiguración de las unidades de lactona en los copolímeros formados por síntesis química.

65 Sería útil ser capaces de incorporar ácido glicólico en polímeros de PHA en los sistemas de producción de bacterias.

5 Esto expandiría más el abanico de propiedades físicas disponibles de la familia de polímeros de PHA y la presencia de los monómeros de ácido glicólico proporcionaría un medio para controlar la velocidad de degradación de los PHA para usos biomédicos e industriales. En concreto, la incorporación de ácido glicólico en PHA proporcionaría un medio para controlar la velocidad de degradación *in vivo* de dispositivos biomédicos de PHA que usan un monómero que ya tienen antecedentes de uso seguro en implantes médicos.

Es por tanto un objetivo de la presente invención proporcionar un método para la biosíntesis de PHA que contienen ácido glicólico.

10 Es otro objetivo de esta invención proporcionar métodos para la biosíntesis de PHA que contienen ácido glicólico y al menos un monómero distinto tales como ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido 3-hidroxi-valérico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico, ácido 3-hidroxi-decanoico, ácido 4-hidroxi-butírico o ácido 4-hidroxi-valérico. Los PHA que contienen ácido glicólico específicos de interés incluyen ácido poli-3-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico y ácido poli-4-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico.

15 Es además un objetivo de la presente invención proporcionar PHA que contienen 2-hidroxiácidos por biosíntesis para aplicaciones médicas e industriales.

### 20 Sumario de la Invención

Se ha desarrollado una clase de copolímeros PHA que contienen ácido glicólico y un método de fabricación y uso de los mismos. Los copolímeros que contienen ácido glicólico pueden sintetizarse a través de biosíntesis por la acción de una PHA polimerasa en una célula viva. Al cambiar el fondo genético de las células uno puede controlar rutas metabólicas específicas que producen el tioéster de Coenzima A de ácido glicólico que puede incorporarse en polímeros PHA por una enzima PHB o PHA sintasa.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de un polímero de polihidroxi-alcanoato que contiene ácido glicólico, de acuerdo con la reivindicación 1.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un organismo, seleccionado del grupo que consiste en levaduras, bacterias, hongos y plantas, para convertir un sustrato en glicolil-CoA y de esta manera producir un polímero de polihidroxi-alcanoato que contiene ácido glicólico de acuerdo con la reivindicación 2.

35 El método y el uso descritos en el presente documento producen polímero que contiene ácido glicólico expresando en un organismo genes que codifican polihidroxi-alcanoato sintasa (PHA sintasa) y enzimas para la formación de glicolil-CoA. La PHA sintasa puede ser una PHB o PHA sintasa. Las enzimas para la formación de glicolil-CoA incluyen, por ejemplo, aldehído deshidrogenasa, diol oxidoreductasa y/o acil-CoA transferasa. Pueden usarse también genes adicionales que codifican acetoacetil-CoA reductasa y beta-cetoacil-CoA tiolasa para proporcionar otros precursores de comonómero de PHA tal como 3-hidroxi-butiril-CoA. En una realización preferida, los PHA resultantes contienen ácido glicólico y al menos un monómero diferente tales como ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido 3-hidroxi-valérico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico, ácido 3-hidroxi-decanoico, ácido 4-hidroxi-butírico o ácido 4-hidroxi-valérico. Los PHA que contienen ácido glicólico específicos de interés incluyen ácido poli-3-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico y ácido poli-4-hidroxi-butírico-co-ácido glicólico.

45 El organismo puede ser una planta transgénica, hongo, levadura o bacteria. Preferentemente, el organismo es una bacteria. Más preferentemente, el organismo es *E. coli*. En una realización más preferida, la *E. coli* tiene mutaciones que expresan constitutivamente rutas de oxidación de ácidos grasos.

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

55 Los polímeros de PHA que contienen ácido glicólico pueden usarse para formar fibras, películas, espumas o artículos moldeados usando técnicas industriales convencionales de extrusión en estado fundido que incluyen hilado por fusión, soplado por fusión, moldeo por inyección, película colada de moldeo por soplado o moldeo por soplado según sea apropiado. Las fibras hechas de PHA que contienen ácido glicólico pueden usarse para fabricar artículos no tejidos o tejidos útiles para ropa, toallitas desechables y/o artículos sanitarios tales como pañales o artículos de higiene femenina. Los polímeros que contienen ácido glicólico pueden combinarse con otros materiales incluyendo polímeros biodegradables tales como ácido poliláctico, almidón o almidones químicamente modificados o poliésteres sintéticos que contienen ácido tereftálico, ácido succínico, 1,4-butanodiol o ácido adipico tales como bloques de construcción y que pueden ser biodegradables. Los polímeros que contienen ácido glicólico pueden formularse con diversos adyuvantes de proceso incluyendo nucleantes, plastificantes, agentes reticulantes, estabilizantes térmicos, colorantes, 65 cargas y agentes anti-bloqueo.

**Breve descripción de los dibujos**

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

La Figura 2 es la ruta para producir poli(4-hidroxi butirato) en MG1655/pFS73.

5 La Figura 3 ilustra la ruta para producir poli(4-hidroxi butirato) a partir de 1,4-butanodiol.

La Figura 4 ilustra la ruta para oxidación de 4-hidroxi butiril-CoA por medio de los sistemas *fad* y *ato*.

La Figura 5 muestra la ruta para producción de poli(4-hidroxi butirato-co-glicolato).

**Descripción Detallada de la Invención**

10

**I. Definiciones**

El término P4HB como se usa en el presente documento se refiere a un polihidroxi alcanoato formado a partir de un monómero que tiene cuatro átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 4 del hidroxiácido, que es poli(4-hidroxi butirato) (P4HB). El término P4HBGA se refiere a un copolímero de polihidroxi alcanoato formado por un monómero que tiene cuatro átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 4 del hidroxiácido, que es ácido 4-hidroxi butírico, y un monómero que tiene dos átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 2 del hidroxiácido, que es ácido glicólico. Por lo tanto, el término P4HBGA se refiere a poli(4-hidroxi butirato-co-glicolato) (P4HBGA) (Figura 1).

15

El término "MG1655/pFS73" como se usa en el presente documento se refiere a una cepa de *E. coli* que utiliza ácido 4-hidroxi butírico (4HB) como un suministro para producir 4-hidroxi butiril-CoA que puede polimerizarse por una PHB o PHA sintasa y se describe en el documento WO/0208428 A2.

20

**25 II. Las composiciones de copolímero de poli(hidroxi alcanoato-co-ácido glicólico)**

(1) Composiciones de Polímero

30 Como se usa en el presente documento, los "materiales de PHA" contienen entre 10 y 100.000 y preferentemente entre 100 y 30.000 unidades, de la siguiente fórmula I:



35

y entre 1 y 100.000 y preferentemente entre 10 y 30.000 unidades, de la siguiente fórmula II:



40

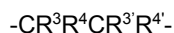
en donde n es un número entero entre 1 y 15 y en una realización preferida, entre 1 y 4; y en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno o radicales de hidrocarburo que incluyen radicales de hidrocarburo de cadena larga; radicales sustituidos con halo e hidroxilo; radicales hidroxilo; radicales halógeno; radicales sustituidos con nitrógeno; y/o radicales sustituidos con oxígeno.

45 Como se usa en el presente documento, la fórmula -(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)<sub>n</sub>- se define incluyendo las siguientes fórmulas:



(en donde n=1);

50



(en donde n=2); y

55



(en donde n=3);

en donde R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>3'</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>3''</sup> y R<sup>4''</sup> pueden ser independientemente radicales de hidrocarburo que incluyen radicales de hidrocarburo de cadena larga; radicales sustituidos con halo e hidroxilo; radicales hidroxilo; radicales halógeno; radicales sustituidos con nitrógeno; radicales sustituidos con oxígeno; y/o átomos de hidrógeno. Así, la fórmula I incluye unidades derivadas de 3-hidroxiácidos (n=1), 4-hidroxiácidos (n=2) y 5-hidroxiácidos (n=3).

60

Los polímeros normalmente tienen un peso molecular por encima de 300, por ejemplo entre 300 y 10<sup>8</sup>, y en una realización preferida de 10.000 a 10.000.000 Dalton.

65 En una realización preferida, el copolímero es un copolímero que contiene monómeros de 3-hidroxiácido o 4-hidroxiácido y monómeros de glicolato. En una realización específicamente preferida, el copolímero es poli-4-

hidroxibutirato-co-glicolato (P4HBGA).

### III. Método para la biosíntesis de PHA que contienen monómero de 2-hidroxiácido

#### 5 (1) Síntesis de polihidroxialcanoato

10 Durante mediados los años 80, varios grupos de investigación estuvieron activamente identificando y aislando los genes y productos génicos responsables de síntesis de PHA. Estos esfuerzos llevaron al desarrollo de sistemas transgénicos para la producción de PHA tanto e microorganismos como en plantas, así como métodos enzimáticos para la síntesis de PHA. Dichas rutas podrían aumentar más los tipos de PHA disponibles. Estos avances se han revisado en Williams & Peoples, CHEMTECH, 26:38-44 (1996) y Williams & Peoples, Chem. Br. 33:29-32 (1997).

15 Los métodos que pueden usarse para producir polímeros de PHA adecuados para la modificación posterior para alterar sus velocidades de degradación se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 4.910.145 de Holmes, et al.; Byrom, "Miscellaneous Biomaterials" en Biomaterials (Byrom, Ed.), pp. 333-59 (MacMillan Publishers, Londres 1991); Hocking & Marchessault, "Biopolyesters" en Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers (Griffin, Ed.), pp.48-96 (Chapman y Hall, Londres 1994); Holmes, "Biologically Produced (R)-3-hydroxyalkanoate Polymers and Copolymers" en Developments in Crystalline Polymers (Bassett Ed.), vol. 2, pp. 1-65 (Elsevier, Londres 1988); Lafferty et al., "Microbial Production of Poly-b-hydroxybutyric acid" en Biotechnology (Rehm & Reed, Eds.) vol. 66, pp. 135-76 (Verlagsgesellschaft, Weinheim 1988); Müller & Seebach, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:477-502 (1993); Steinbüchel, "Polyhydroxyalkanoic Acids" en Biomaterials (Byrom, Ed.), pp. 123-213 (MacMillan Publishers, Londres 1991); Williams & Peoples, CHEMTECH, 26:38-44, (1996); Steinbüchel & Wiese, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:691-697 (1992); Patentes de EE.UU. N.º 5.245.023; 5.250.430; 5.480.794; 5.512.669; y 5.534.432; Agostini, et al., Polym. Sci., Part A-1, 9:2775-87 (1971); Gross, et al., Macromolecules, 21:2657-68 (1988); Dubois, et al., Macromolecules, 26:4407-12 (1993); Le Borgne & Spassky, Polymer, 30:2312-19 (1989); Tanahashi & Doi, Macromolecules, 24:5732-33 (1991); Hori, et al., Macromolecules, 26:4388-90 (1993); Kemnitzer, et al., Macromolecules, 26:1221-29 (1993); Hori, et al., Macromolecules, 26:5533-34 (1993); Hocking, et al., Polym. Bull., 30:163-70 (1993); Xie, et al, Macromolecules, 30:6997-98 (1997); Patente de EE.UU. N.º 5.563.239 de Hubbs; Patentes de EE.UU. N.º 5.489.470 y 5.520.116 de Noda, et al. Los PHA derivados de estos métodos pueden estar en cualquier forma, incluyendo en forma de látex o sólida.

35 La identificación, clonación y expresión de los genes implicados en la biosíntesis de PHA de varios microorganismos dentro de organismos recombinantes permiten la producción de PHA dentro de organismos que no son productores de PHA nativos. Un ejemplo preferido es *E. coli*, que es un hospedador bien reconocido para la producción de productos biofarmacéuticos y PHA para aplicaciones médicas. Dichos organismos recombinantes proporcionan a los investigadores un mayor grado de control del proceso de producción de PHA porque están libres de actividades enzimáticas de fondo para la biosíntesis de precursores de PHA indeseados o degradación del PHA. Adicionalmente, la selección adecuada de un organismo recombinante puede facilitar la purificación de, o permitir la biocompatibilidad aumentada, del PHA producido.

40 Los requisitos mínimos para la síntesis de PHA en un organismo recombinante son una fuente de hidroxialcanoil-CoA y una PHA sintasa apropiada (Gerngross & Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. 92:6279-83(1995)). Los productores de PHA recombinante requieren de esta manera una ruta biosintética para un monómero de hidroxialcanoil-CoA y una PHA sintasa adecuada. La producción de un homopolímero requiere que el organismo produzca solamente un sustrato adecuado para la PHA sintasa, ya que la producción de múltiples sustratos da como resultado la formación de un copolímero de PHA. Por ejemplo, los organismos recombinantes que contienen un transgén que codifica una PHA sintasa son suficientes para la producción de P4HB.

50 En una realización, la ruta que da lugar a la producción de poli-4-hidroxibutirato (P4HB) en la cepa MG1655/pFS73 de *E. coli* genéticamente diseñada que utiliza ácido 4-hidroxibutírico (4HB) como alimento se describe en el documento WO/0208428 A2 (Figura 2). Cuando se usa 4HB como alimento, el P4HB se acumula en las células por una ruta que implica la activación del 4HB a 4HB-CoA por una reacción de transesterificación con acetil-CoA catalizada por una acil-CoA transferasa codificada por el gen *orfZ* y la posterior polimerización de 4HB-CoA por la PHA sintasa (*phaC*) (Figura 2). Tal como muestra la Figura 3, esta ruta puede modificarse para permitir la producción de P4HB a partir de 1,4-butanodiol. Esta ruta modificada implica que los productos de dos genes adicionales (*dhaT* y *aldH*) oxiden el 1,4-butanodiol *in situ* a 4HB. La formación de P4HB avanza como en MG1655 a través de *orfZ* y *phaC*.

#### 60 (2) Síntesis de PHA que contienen monómero de 2-hidroxiácido

Las rutas que dan lugar a la síntesis de PHA pueden modificarse para incorporar glicolato para formar copolímeros que contengan unidades de 2-hidroxiácido. Por ejemplo, bajo ciertas condiciones de fermentación, las cepas de *E. Coli* diseñadas genéticamente construidas previamente para la producción de P4HB y poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) (PHB4HB) (documento WO 0208428A2) pueden producir una nueva composición de PHA, poli-4-hidroxibutirato-co-glicolato (P4HBGA) (Figura 1).

65 La incorporación de monómeros de ácido glicólico puede lograrse co-expresando, por ejemplo, una PHA sintasa y

enzimas dando lugar a la formación de glicolil-CoA en un organismo tal como *E. coli*. Adicionalmente, controlando el fondo genético de las cepas del organismo, uno puede controlar la capacidad de las células para incorporar unidades de glicolato dentro del PHA. Por lo tanto, cambiando el contexto genético de las células, uno puede controlar rutas metabólicas específicas para controlar el nivel del co-monómero de glicolato en el polímero de PHA.

5 Las rutas que dan lugar a la producción de PHA que contienen monómeros de ácido glicólico pueden expresarse en un organismo tales como levadura, bacterias, hongos y plantas, preferentemente bacterias, lo más preferentemente *E. coli*. Por ejemplo, las cepas de producción de *E. coli* pueden diseñarse por ingeniería basándose en una cepa parental con gen o genes adicionales para incorporar monómeros de ácido glicólico. Las rutas también pueden  
10 construirse para generar Glicolil-CoA, *in situ*. Por ejemplo, Glicolil-CoA, el monómero de glicolato en la biosíntesis de PHA que contienen unidades de glicolato, puede formarse co-expresando enzimas que catalizan la oxidación de butanodiol. Pueden construirse otras rutas para la producción de PHA para incorporar genes mediante la expresión de enzimas, por ejemplo, acil transferasas, que catalizan la formación de glicolil-CoA a través de suministro externo, por ejemplo, suministro de ácido glicólico.

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

20 Además de usar rutas biológicas para la síntesis de copolímeros de PHA que contienen unidades de 2-hidroxiácido, también pueden derivarse copolímeros de PHA por síntesis química. Un enfoque ampliamente usado implica la polimerización por apertura de anillo de monómeros de lactona con o sin diversos catalizadores o iniciadores (véase, por ejemplo, Chujo, et al., "Ring-opening polymerization of glycolide" en Makromol. Chem. 100:262-6 (1967); Fukuzaki, et al., "Direct copolymerization of glycolic acid with lactones in the absence of catalysts" en Eur. Polym. J. 26(4):457-61 (1990); Kricheldorf, et al., "Polylactones, 2. Copolymerization of glycolide with  $\beta$ -propiolactone,  $\gamma$ -butyrolactone or  $\delta$ -valerolactone" en Makromol. Chem. 186(5): 955-76 (1985); Kricheldorf, et al., "Polylactones, 3. Copolymerization of glycolide with L,L-lactide and other lactones" en Makromol. Chem. 12(Polym. Specific Prop.):955-76 (1985); Nakayama, et al., "Synthesis and biodegradability of novel copolyesters containing  $\gamma$ -butyrolactone units" en Polymer 39(5):1213-1222 (1998); Nakayama, et al., "Syntheses of biodegradable polyesters and effect of chemical structure on biodegradation" en Nippon Kagaku Kaishi 1:1-10 (2001)). Un segundo enfoque implica la polimerización por condensación de ésteres y se describe en la Patente de EE.UU. N.º 5.563.239 de Hubbs, et al. Los investigadores también han desarrollado métodos quimioenzimáticos para preparar PHA. Por ejemplo, Xie et al., Macromolecules, 30:6997-98 (1997) desvelan una polimerización por apertura de anillo de beta-butirolactona por lipasas termófilas para producir PHB.

#### IV. Composiciones de copolímero de PHA y el uso de las mismas como dispositivos médicos

40 Los polímeros descritos en el presente documento pueden formar diversas composiciones de polímero, que son útiles para preparar diversos dispositivos médicos biodegradables. Los dispositivos preparados a partir de los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden usarse para un amplio abanico de diferentes aplicaciones médicas. Algunos ejemplos de tales aplicaciones incluyen la liberación controlada de agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico; administración de fármacos, andamiajes en ingeniería de tejidos; encapsulación de células; administración dirigida, revestimientos biocompatibles; implantes biocompatibles; regeneración guiada de  
45 tejidos; apósitos para heridas; dispositivos ortopédicos; prótesis y cementos óseos (incluyendo adhesivos y/o relleno estructural; y diagnósticos.

50 Los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden usarse para encapsular, mezclarse con, o acoplarse iónica o covalentemente con cualquiera de diversos agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. Una amplia diversidad de materiales biológicamente activos puede encapsularse o incorporarse, bien para suministro a un lugar por el polihidroxialcanoato, o para impartir propiedades al polímero, tales como bioadhesión, adherencia celular, aumento del crecimiento celular, inhibición del crecimiento bacteriano y prevención de formación de coágulos.

55 Algunos ejemplos de agentes terapéuticos y profilácticos adecuados incluyen compuestos inorgánicos y orgánicos sintéticos, proteínas y péptidos, polisacáridos y otros azúcares, lípidos y secuencias de ácidos nucleicos ADN y ARN que tienen actividades terapéuticas profilácticas o de diagnóstico. Las secuencias de ácido nucleico incluyen genes, moléculas antisentido que se unen a ADN complementario para inhibir la transcripción, y ribozimas. Los compuestos con un amplio intervalo de peso molecular pueden encapsularse, por ejemplo, entre 100 y 500.000 gramos o más por mol. Algunos ejemplos de materiales adecuados incluyen proteínas tales como anticuerpos, ligandos de receptores y  
60 enzimas, péptidos tales como péptidos de adhesión, sacáridos y polisacáridos, fármacos orgánicos o inorgánicos sintéticos y ácidos nucleicos. Algunos ejemplos de materiales que pueden encapsularse incluyen enzimas, factores de coagulación sanguínea, inhibidores o agentes de disolución de coágulos tales como estreptoquinasa y activador del plasminógeno de tejido; antígenos para inmunización; hormonas y factores de crecimiento; polisacáridos tales como heparina; oligonucleótidos tales como oligonucleótidos antisentido y ribozimas y vectores retrovíricos para su  
65 uso en terapia génica. El polímero también puede usarse para encapsular células y tejidos. Algunos agentes de diagnóstico representativos son agentes detectables por rayos x, fluorescencia, formación de imágenes por resonancia

magnética, radioactividad, ultrasonido, tomografía computarizada (CT) y tomografía por emisión de positrones (PET). Algunos agentes de diagnóstico de ultrasonidos son normalmente un gas tales como aire, oxígeno o perfluorocarbonos.

5 En el caso de la liberación controlada, puede incorporarse un amplio abanico de diferentes compuestos bioactivos en un dispositivo de liberación controlada. Estos incluyen macromoléculas hidrófobas, hidrófilas y de alto peso molecular  
 10 tales como proteínas. El compuesto bioactivo puede incorporarse dentro de los PHA en una carga en porcentaje de entre el 0,1 % y el 70 % en peso, más preferentemente entre el 5 % y el 50 % en peso. Los PHA pueden estar casi en cualquier forma física, tales como polvo, película, artículo moldeado, partículas, esferas, látex y materiales cristalinos  
 o amorfos. Pueden combinarse con materiales adicionales distintos de PHA, por ejemplo, otros polímeros. Son adecuados para su uso en aplicaciones que requieren materiales de lenta degradación, biocompatibles, moldeables,  
 por ejemplo, dispositivos médicos. Algunos ejemplos de dispositivos médicos que puede prepararse a partir de los polímeros incluyen varillas, tornillos óseos, grapas, suturas quirúrgicas, endoprótesis vasculares, dispositivos de  
 ingeniería de tejidos, apósitos de heridas y parches tales como parches para hernias y parches pericárdicos.

15 Algunos implantes degradables fabricados con los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden usarse en un amplio intervalo de aplicaciones ortopédicas y vasculares, ingeniería de tejidos, regeneración guiada de tejidos y aplicaciones actualmente ofrecidas por otros elastómeros termoplásticos (McMillin, Rubber Chem. Technol.,  
 20 67:417-46 (1994)). Los implantes pueden incluir otros factores para estimular la reparación y la curación. Algunos dispositivos preferidos son tubos adecuados para el paso de fluidos corporales. Estos dispositivos pueden modificarse con factores de adherencia celular, factores de crecimiento, péptidos y anticuerpos y sus fragmentos.

Los métodos preferidos de fabricación de dispositivos médicos incluyen la colada de disolventes, procesamiento en estado fundido, moldeo por extrusión, por inyección y por compresión y secado por pulverización. Las partículas  
 25 preferentemente se preparan directamente a partir de un proceso basado en fermentación, o por una técnica de evaporación de disolventes, técnica de doble emulsión o por microfluidización, usando métodos disponibles en la técnica (Koosha, F. Ph.D. Dissertation, 1989, Univ. Nottingham, Reino Unido, Diss. Abstr. Int. B 51:1206 (1990); Bruhn, B.W. y Müller, B.W. Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 18:668-69 (1991); Conti, B. et al., J  
 30 Microencapsulation, 9:153-166 (1992); Ogawa, Y. et al., Chem. Pharm. Bull., 36:1095-103 (1988); Mathiowitz, E. y Langer, R. "Polyanhydride microspheres as drug delivery systems" M. Donbrow Ed., en "Microcapsules Nanopart. Med. Pharm." CRC, Boca Raton, Florida, 1992, Cap. 5, pp. 99-123.)

Los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden fabricarse en dispositivos adecuados para la curación de heridas. Por ejemplo, pueden prepararse materiales de fibra no tejidos para este fin a partir de polímeros  
 35 produciendo primero fibras de polímero, presionando los polímeros a través de una salida perforada, utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las fibras pueden fabricarse después en una membrana porosa (paño) extendiéndolas después sobre un soporte sólido y sometiendo a moldeo por compresión. El espesor del dispositivo es preferentemente menos de 500 µm. El dispositivo de curación de heridas puede prepararse también  
 40 perforando una película o membrana usando un láser para lograr porosidad, o usando una técnica de lixiviado para preparar un material poroso. El tamaño de los poros idealmente debería ser lo suficientemente pequeño para bloquear células y otra materia de tejido. Los dispositivos de curación de heridas pueden colocarse *in vivo* para separar tejidos y estimular la regeneración de tejidos.

Los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden usarse para encapsular células. Usando procesos conocidos por los expertos en la materia, las células pueden pre-revestirse en primer lugar. Maysinger,  
 45 Reviews in the Neurosciences, 6:15-33 (1995). Usando un procedimiento de encapsulación de partículas tales como la técnica de doble emulsión, las células pueden encapsularse después por PHA. Ogawa, et al., Chem. Pharm. Bull., 36:1095-103 (1988). Las células encapsuladas pueden después implantarse *in vivo*.

Los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden fabricarse a partir de andamiajes de ingeniería de tejidos usando un amplio abanico de técnicas de procesado de polímeros. Algunos métodos preferidos de  
 50 fabricación de andamiajes de ingeniería de tejidos de PHA incluyen colada de disolventes, procesamiento en estado fundido, procesamiento/hilado/tejido de fibras, moldeo por extrusión, por inyección y por compresión, y lixiviado/colada con disolventes. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia.

Un método preferido para la fabricación de un andamiaje de ingeniería de tejidos de copolímeros de PHA descritos en el presente documento implica la utilización de una extrusora, tales como una extrusora Brabender. Por ejemplo, esta  
 55 técnica puede usarse para preparar tubos extruidos adecuados para implantación en un intervalo de longitudes y tamaños.

Otro método preferido implica preparar un andamiaje de PHA no tejido a partir de fibras. Las fibras pueden producirse a partir del fundido o de la solución, y procesarse en productos no tejidos usando métodos conocidos por los expertos  
 60 en la materia. Las propiedades de los productos no tejidos pueden ajustarse variando, por ejemplo, el material de PHA, las dimensiones de las fibras, la densidad de las fibras, el espesor del material, la orientación de las fibras y el método del tratamiento de las fibras. Las membranas porosas pueden, si se desea, procesarse adicionalmente. Por ejemplo, estas membranas pueden darse forma de tubos huecos.

Otro método preferido implica procesar en estado fundido o con disolvente un PHA adecuado en un molde apropiado y perforar el material usando un láser u otro medio para lograr la porosidad deseada. También se prefieren métodos que incluyen enrollar una lámina de PHA moldeada por compresión en un bucle y sellar térmicamente. La lámina de PHA puede opcionalmente enrollarse con otro material, tales como un segundo polímero biodegradable. Por ejemplo, el último material podría ser un producto no tejido de ácido poliglicólico, ácido poliláctico, o un copolímero de ácidos glicólico y láctico. Dicho procedimiento debería proporcionar un tubo laminado adecuado para su uso en el diseño de nuevos vasos, conductos y tubos. Los PHA también pueden usarse para revestir otros andamiajes de ingeniería de tejidos. Dichos materiales podrían derivar de otros polímeros degradables. El revestimiento puede realizarse, por ejemplo, con una solución de base disolvente, o por técnicas de fusión, o utilizando un látex de PHA.

Los dispositivos de ingeniería de tejidos descritos en el presente documento pueden sembrarse con células antes de la implantación o después de la implantación. Las células pueden cosecharse de una sección saludable de tejido del donante, expandirse *in vitro* usando técnicas de cultivo de células y sembrarse después en un andamiaje (o matriz) bien antes o después de la implantación. Alternativamente, las células pueden obtenerse de tejido de otro donante o de líneas celulares existentes.

Los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden usarse para revestir otros dispositivos y materiales. Dichos revestimientos pueden mejorar sus propiedades para la aplicación médica, por ejemplo, mejorar su biocompatibilidad y propiedades mecánicas, y personalizar su degradación y perfiles de liberación controlada. Los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden revestirse sobre otros dispositivos usando los procedimientos de fabricación descritos anteriormente. El espesor del revestimiento puede ajustarse a las necesidades de la aplicación específica cambiando el peso del revestimiento o la concentración aplicada, y/o por sobre-revestimiento.

Los copolímeros de PHA descritos en el presente documento pueden fabricarse en endoprótesis vasculares usando un amplio abanico de técnicas de procesamiento de polímeros. Los métodos preferidos de fabricación de endoprótesis vasculares de PHA incluyen colada de disolvente, procesamiento en estado fundido, procesamiento/hilado de fibras, extrusión, moldeo por inyección y moldeo por compresión. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia.

Previo a la implantación, un artículo polimérico biorreabsorbible debe esterilizarse para prevenir la enfermedad y la infección del receptor. La esterilización se realiza antes de sembrar un dispositivo polimérico con células. La esterilización térmica de artículos que contienen PHA es a menudo poco práctica puesto que el tratamiento térmico podría deformar el artículo, especialmente si el PHA tiene una temperatura de fusión por debajo de la requerida para el tratamiento de esterilización térmica. Este problema puede resolverse utilizando gas de óxido de etileno frío como agente de esterilización. La exposición de un artículo que contiene PHA a vapores de óxido de etileno antes de la implantación esteriliza el artículo haciéndolo adecuado para la implantación. Durante la esterilización con gas de óxido de etileno frío, el artículo que contiene PHA mantiene su forma. Este tipo de tratamiento es adecuado idealmente para esterilización de artículos moldeados o preformados donde la forma del artículo juega un papel importante en su correcto funcionamiento.

Los dispositivos descritos en el presente documento pueden administrarse sistémica o localmente, o incluso usarse *in vitro*, particularmente para cultivo celular. Los métodos preferidos para administrar sistémicamente los dispositivos son por inyección, inhalación, administración oral e implantación. Otros métodos adecuados para administrar los dispositivos incluyen administrar los dispositivos tópicamente, como una loción, pomada, parche, o apósito.

Los polímeros PHA descritos en el presente documento son ampliamente útiles como sustitutos de los polímeros petroquímicos tradicionales en un abanico de aplicaciones con particular utilidad cuando es ventajosa la biodegradabilidad o producción a partir de recursos renovables.

Los siguientes ejemplos ilustran además los métodos desvelados en el presente documento y los copolímeros formados a partir de los mismos.

## 55 Ejemplos

### Ejemplo 1. Producción de P4HB en MBX1928

#### 60 Descripción de las Cepas MBX1628 y MBX1928

65 MBX1928 se basa en la cepa MG1655 (CGSC#6300) de *Escherichia coli* de tipo silvestre y expresa cuatro genes insertados: *aldH* (aldehído deshidrogenasa) de *E. coli*, *dhaT* (diol oxidoreductasa) de *Klebsiella pneumoniae* (Johnson y Lin, 1987, J. Bacteriol. 169:2050-2054), *orfZ* (acil-CoA transferasa) de *Clostridium kluyveri* (Söhling y Gottschalk, 1996, J. Bacteriol. 178:871-880) y *phaC* (PHA sintasa) de *Ralstonia eutropha*. Los genes *aldH* y *dhaT* se insertan en el cromosoma (junto con el gen marcador de resistencia a la tetraciclina del transposón Tn10) y los genes *orfZ* y *phaC* están presentes en un plásmido, junto con el marcador de resistencia a la kanamicina del plásmido pACYC177.



5 MBX1628 tiene los mismos genes insertados que MBX1928, excepto que se basa en la cepa LS5218 (CGSC#6966) de *Escherichia coli*. LS5218 y MG1655 están estrechamente relacionadas con la excepción destacada de que LS5218 contiene dos mutaciones, *fadR601* y *atoCcon*. Como resultado de estas mutaciones, el gen represor *fadR* para el sistema *fad* no está activo, y el sistema *fad* no está reprimido, mientras que el inductor para el sistema *ato* (*atoC*) se expresa constitutivamente, de modo que el sistema *ato* es constitutivo.

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

10 Las cepas anteriormente descritas se resumen en la Tabla 1. Los genes insertados permiten que estas cepas produzcan PHA cuando se les suministra una materia prima apropiada, tales como 1,4-butanodiol.

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

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

15 La clonación y el aislamiento de diversos genes necesarios para la construcción de las construcciones génicas desveladas en el presente documento están bien documentados (véase, por ejemplo, Skraly et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:98-105 (1998); Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996); Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). La construcción de las diversas construcciones génicas descritas en el presente documento está también dentro del conocimiento en la técnica (Herrero et al., J. Bacteriol. 172:6557-67 (1990)). Las técnicas de conjugación de los genes *aldH*, *dhaT*, y *tetA* en el cromosoma bacteriano, es decir, de *E. coli*, y transformación se describen, por ejemplo, en Herrero et al., ibid; Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972; Sambrook et al., *supra*.

#### 25 **Identificación de P4HB2GA**

Diversas pruebas analíticas confirman la presencia de ácido glicólico en el polímero. Después de la extracción del polímero de la biomasa y purificación por precipitación selectiva, el polímero se analizó por resonancia magnética nuclear (RMN). En el espectro de RMN, la presencia del comonomero de ácido glicólico se indica por un pico único a 4,6 ppm y dos tripletes adicionales a 4,2 y 2,5 ppm con picos sospechados bajo el multiplete a 1,9 ppm. El pico singlete procede de ácido glicólico mientras que los picos adicionales surgen de diferentes pares de 4HB-GA y GA-4HB.

35 Las muestras de polímero con un alto contenido de comonomero estaban disponibles de experimentos de velocidad de suministro baja con la cepa MBX1870. Estas muestras fueron útiles para identificar el pico de comonomero por GC. El pico de ácido glicólico tiene un tiempo de retención relativamente corto de unos 4,0 minutos y una forma de pico parecida a otros derivados de éster butílico de hidroxácido. Los patrones de glicólido y el rápido aumento de la muestra de copolímero confirmaron este pico como glicolato de butilo.

#### 40 **Descripción general de butanólisis GC**

La biomasa de PHA seca (5-20 mg) se digirió a 110 °C durante 2 horas en 3 ml de reactivo de butanólisis (9 partes de butanol, 1 parte de ácido clorhídrico concentrado, que contiene 2 mg/ml de difenilmetano). Tras enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se lavó con 3 ml de agua y la capa orgánica superior se retiró para el análisis de GC. El análisis de GC se realizó en un HP6890 GC equipado con una columna SPB-1 y un detector FID. Las condiciones de GC fueron como sigue: 80 °C 2 minutos, 10 °C/min hasta 250 °C, 250 °C 2 minutos; gas vehículo, helio, 2 ml/min; relación de división aproximada 1:50; volumen de inyección 1 µl. Se realizaron determinaciones cuantitativas mediante comparaciones de zonas de pico frente a los patrones gamma-butirolactona y glicólido (el dímero cíclico de ácido glicólico), para los ácidos 4-hidroxibutírico y glicólico, respectivamente.

#### 50 **Descripción general del análisis GPC**

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

#### 60 **Procesos de fermentación**

Se cultivaron inóculos de fermentación en 200 ml de medio LB estéril (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl) suplementado con 50 mg/l de sulfato de kanamicina y 15 mg/l de clorhidrato de tetraciclina. Cada inóculo se incubó a 30 °C en un agitador giratorio agitado a aproximadamente 200 rpm durante 16 a 18 horas, después se usó para inocular un fermentador de 2 o 5 l. El medio de fermentador inicial contenía, por litro: glucosa, 5 g; extracto de levadura, 20 g; peptona de soja, 20 g; Na (NH<sub>4</sub>)HPO<sub>4</sub>, 3,5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 7,5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,7 g; MgSO<sub>4</sub>, 0,602 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5,56 mg; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5,62 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,58 mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 3,96 mg; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3,34 mg; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,34 mg; clorhidrato de tiamina, 10 mg; antiespumante MAZU DF-204 o Breox FMT-30, 0,2 ml; sulfato de kanamicina, 50 mg; clorhidrato de tetraciclina, 15 mg. Las soluciones de suministro de glucosa y 1,4-butanodiol estaban cada una a una concentración de 500 g/l.

### Condiciones de fermentación

La fermentación se condujo a 30 °C. El pH se controló a 7,0 (± 0,2) por adición de NH<sub>4</sub>OH diluido (15 %) o ácido sulfúrico diluido (3 %). El flujo de aire se ajustó a un caudal constante (1 vvm). El oxígeno disuelto se controló al 25 % de saturación variando la velocidad del agitador. Las mediciones en línea de pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y agitación (rpm) se hicieron por adquisición continua de datos. La concentración de glucosa y la DO<sub>600</sub> se midieron fuera de línea.

Tras la inoculación del fermentador, las células se cultivaron a una DO<sub>600</sub> de 50 (aproximadamente 4-5 horas). La producción de PHA se inició por la adición por lotes de 1,4-butanodiol de 1 a 5 g/l (dependiendo de la velocidad de suministro deseada de 1,4-butanodiol). En lo sucesivo el fermentador se suplementó con los suministros de glucosa y 1,4-butanodiol. La velocidad de suministro de 1,4-butanodiol se mantuvo a 1 a 5 g/l/h. El suministro de glucosa se mantuvo a aproximadamente 5 g/l/h. Se midió la concentración de glucosa fuera de línea inicialmente cada hora y la velocidad de suministro se ajustó para mantener la concentración de glucosa <1 g/l (preferentemente cerca de 0,1 g/l). La fermentación se condujo durante aproximadamente un total de 48 horas. Se recogieron células por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos y se lavaron con agua. Los gránulos de células se secaron por liofilización para posterior extracción del polímero en cloroformo y análisis. La composición y concentración del polímero en la biomasa se analizó por butanólisis de GC. El peso molecular del PHA se determinó por análisis GPC de las muestras de polímero purificadas. Los resultados para las distintas cepas a diferentes velocidades de suministro se muestran en la Tabla 2 a continuación.

**Tabla 2. Análisis de composición, rendimiento y peso molecular del PHA producido en *E. coli* diseñada por ingeniería a diversas velocidades de suministro de 1,4-butanodiol.**

| Cepa     | Velocidad de suministro de 1,4-butanodiol (g/l-h) | Glicolato en PHA (% en peso) | Rendimiento de PHA (g/l) | P <sub>m</sub> de PHA (g/mol) |
|----------|---|------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| MBX1628* | 5   | 3                            | 57                       | 581.000                       |
| MBX1628* | 3   | 2                            | 71                       | 330.000                       |
| MBX1870  | 3   | 0                            | 18                       | N.D.**                        |
| MBX1870  | 2   | 2                            | 25                       | N.D.**                        |
| MBX1870  | 1   | 12                           | 15                       | N.D.**                        |
| MBX1928  | 5   | 0                            | 31                       | 455.000                       |
| MBX1928* | 3   | 0                            | 66                       | 529.000                       |
| MBX1928  | 2   | 0                            | 42                       | 669.000                       |

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

Las cepas con rutas constitutivas de degradación de ácidos grasos (MBX1628 y MBX1870) incorporaron ácido glicólico en el producto de polímero cuando se suministró 1,4-butanodiol, mientras que la cepa con rutas de tipo silvestre (y por lo tanto no inducidas) de degradación de ácidos grasos (MBX1928) no incorporaron ácido glicólico en las mismas condiciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico en un organismo seleccionado del grupo que consiste en levadura, bacterias, hongos y plantas, comprendiendo el método:
- 5 suministrar un sustrato al organismo, en donde el organismo expresa una polihidroxialcanoato (PHA) sintasa; al menos una enzima seleccionada de aldehído deshidrogenasa, diol oxidorreductasa y/o acil-CoA transferasa; y la ruta para la degradación de ácidos grasos está activa en el organismo, en donde el sustrato puede convertirlo *in situ*, a través de la ruta para la degradación de ácidos grasos y opcionalmente en donde la ruta comprende además aldehído deshidrogenasa, diol oxidorreductasa y/o acil-CoA transferasa, en glicoil-CoA el organismo para producir de esta
- 10 manera el polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico y en donde el polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico contiene entre 10 y 100.000 unidades de fórmula I:  $-\text{OCR}^1\text{R}^2(\text{CR}^3\text{R}^4)_n\text{CO}-$ ; y entre 1 y 100.000 unidades de fórmula II:  $-\text{OCR}^1\text{R}^2\text{CO}-$ ; en donde n es un número entero entre 1 y 15 y en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno o radicales de hidrocarburo, incluyendo radicales de hidrocarburo de cadena larga; radicales sustituidos con halo e hidroxilo; radicales hidroxilo; radicales halógeno; radicales sustituidos con nitrógeno; y/o radicales sustituidos con oxígeno.
- 15
2. Uso de un organismo, seleccionado del grupo que consiste en levadura, bacterias, hongos y plantas para convertir un sustrato en glicoil-CoA y de esta manera producir un polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico, en donde el organismo expresa una polihidroxialcanoato (PHA) sintasa; al menos una enzima seleccionada de
- 20 aldehído deshidrogenasa, diol oxidorreductasa y/o acil-CoA transferasa; y la ruta para la degradación de ácidos grasos está activa en el organismo, en donde el sustrato lo convierte *in situ*, a través de la ruta para la degradación de ácidos grasos y opcionalmente en donde la ruta comprende además aldehído deshidrogenasa, diol oxidorreductasa y/o acil-CoA transferasa, en glicoil-CoA el organismo para producir de esta manera el polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico y en donde el polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico contiene entre 10
- 25 y 100.000 unidades de fórmula I:  $-\text{OCR}^1\text{R}^2(\text{CR}^3\text{R}^4)_n\text{CO}-$ ; y entre 1 y 100.000 unidades de fórmula II:  $-\text{OCR}^1\text{R}^2\text{CO}-$ ; en donde n es un número entero entre 1 y 15 y en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno o radicales de hidrocarburo, incluyendo radicales de hidrocarburo de cadena larga; radicales sustituidos con halo e hidroxilo; radicales hidroxilo; radicales halógeno; radicales sustituidos con nitrógeno; y/o radicales sustituidos con oxígeno.
- 30
3. El método de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la PHA sintasa es una sintasa de poli(3-hidroxialcanoato) o poli(4-hidroxialcanoato).
- 35
4. El método de las reivindicaciones 1 o 3, o el uso de las reivindicaciones 2 o 3, en donde el organismo expresa una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en acetoacetil-CoA reductasas y beta-cetoacil-CoA tiolasas.
- 40
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 4, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la PHA sintasa es poli(3-hidroxialcanoato) sintasa, una poli(4-hidroxialcanoato) sintasa o una poli(4-hidroxibutirato) sintasa.
- 45
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el organismo es una bacteria, preferentemente *E. coli*, más preferentemente *E. coli* que tiene mutaciones seleccionadas de mutaciones constitutivas fadR601 y atoC.
- 50
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la aldehído deshidrogenasa es de *E. coli*, en donde la diol oxidorreductasa es de *Klebsiella pneumoniae* y en donde la acil-CoA transferasa es de *Clostridium kluyveri*.
- 55
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico comprende ácido glicólico y al menos un monómero distinto seleccionado del grupo que consiste en ácido 3-hidroxibutírico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido 3-hidroxivalérico, ácido 3-hidroxihexanoico, ácido 3-hidroxi octanoico, ácido 3-hidroxidecanoico, ácido 4-hidroxibutírico y ácido 4-hidroxivalérico.
- 60
9. El método o el uso de la reivindicación 8 en donde el polímero de polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico se selecciona del grupo que consiste en ácido poli-3-hidroxibutírico-co-ácido glicólico y ácido poli-4-hidroxibutírico-co-ácido glicólico
- 65
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9, en donde el polihidroxialcanoato que contiene ácido glicólico se forma en un dispositivo médico, por ejemplo un dispositivo médico seleccionado del grupo que consiste en dispositivos para la administración de agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico, andamiajes o matrices en ingeniería de tejidos, dispositivos para encapsulación de células, dispositivos para la administración dirigida de agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico, revestimientos biocompatibles; implantes biocompatibles; apósitos para heridas; dispositivos ortopédicos; prótesis y cementos óseos.

Figura 1.

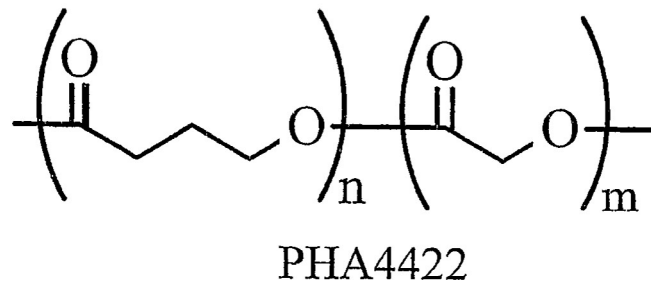


Figura 2.

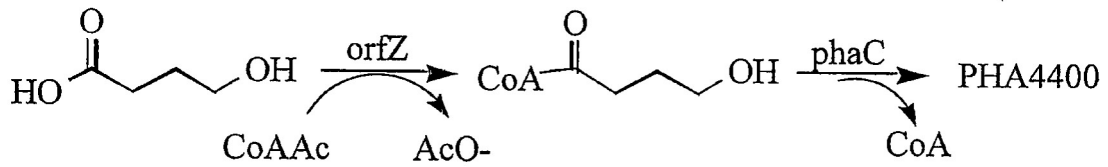


Figura 3.

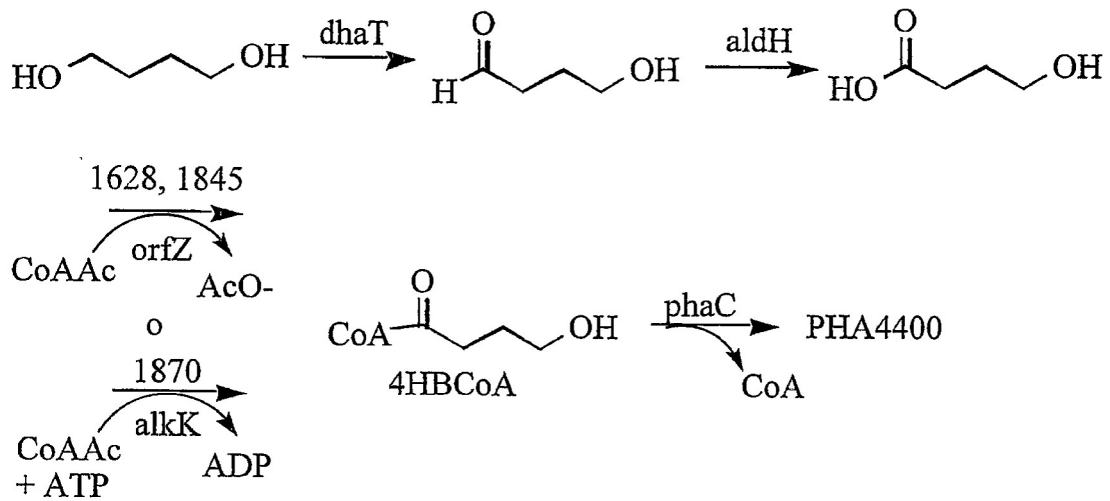


Figura 4.

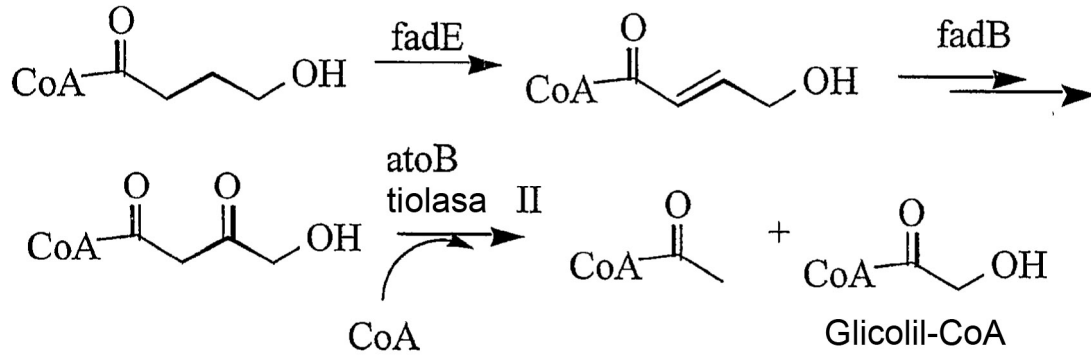


Figura 5.

