

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 785**

51 Int. Cl.:

**C08G 63/08** (2006.01)

**C08G 63/90** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014** **E 17158763 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** **EP 3205683**

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

30 Prioridad:

**13.03.2013 US 201313801393**

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

**15.02.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 805 785 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 generalmente a dispositivos médicos de poli-4-hidroxibutirato, las composiciones usadas para producir estos dispositivos médicos y los procesos usados para producir estas composiciones. Los dispositivos médicos se pueden usar en muchos tipos de aplicaciones de implantes incluyendo el tratamiento de las  
10 heridas, cirugía general, reparación de hernias, reparación de nervios, ingeniería de tejidos, ortopedia, cirugía craneomaxilofacial, administración de fármacos, cirugía cardiovascular, cirugía vascular, cardiología, urología, ginecología, cirugía dental, obtención de imágenes, cirugía otorrinolaringológica, cirugía plástica y cosmética, y cirugía oral.

15 **Antecedentes de la invención**

Se pueden producir poli-4-hidroxibutirato (P4HB) y copolímeros del mismo usando métodos de fermentación transgénicos, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.548.569 de Williams et al., y se producen comercialmente, por ejemplo, por Tephra, Inc. (Lexington, MA). Poli-4-hidroxibutirato (P4HB, biomaterial TephraFLEX®  
20 ) es un poliéster fuerte, flexible, termoplástico que, a pesar de su ruta biosintética, tiene una estructura relativamente simple como se muestra en la Figura 1.

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

Los polímeros de PHA se han dividido en tres clases basándose en el número de átomos de carbono en sus subunidades. Los polímeros de PHA de longitud de cadena corta (o scl-PHA) se preparan a partir 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 átomos de carbono en sus unidades monoméricas, y los PHA de longitud de cadena larga (lcl-PHA) tienen monómeros con más de 14 átomos de carbono. Las propiedades de estos polímeros varían drásticamente dependiendo de su longitud  
30 de cadena, incluyendo sus solubilidades, propiedades térmicas y mecánicas. P4HB tiene cuatro átomos de carbono en su unidad monomérica, y se clasifica por tanto como 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, K.N., et al., J. Erg. 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 peso molecular elevado en condiciones normales (Moore, T., et al., Biomaterials 26:3771-3782 (2005)).  
40

Las patentes de Estados Unidos números 6.245.537, 6.623.748, 7.244.442 y 8.231.889 describen métodos para fabricar PHA con niveles bajos endotoxinas. Las patentes estadounidenses números 6.548.569, 6.838.493, 6.867.247, 7.268.205, 7.179.883, 7.268.205, 7.553.923, 7.618.448 y 7.641.825 y el documento WO 2012/064526 describen el uso de PHA para fabricar dispositivos médicos. En la patente de Estados Unidos n.º 5.811.272 de Snell et al. se han desvelado métodos de control del peso molecular de los polímeros de PHA.  
45

Los PHA con degradación controlada y degradación *in vivo* de menos de un año se desvelan en las patentes de Estados Unidos números 6.548.569, 6.610.764, 6.828.357, 6.867.248 y 6.878.758 de Williams, et al. y el documento WO 99/32536 de Martin, et al. Las aplicaciones de P4HB se han revisado en Williams, S.F., 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. Eng. J. 16:97-105 (2003). En el documento WO 00/56376 también se han desvelado dispositivos médicos y aplicaciones de P4HB. Varias patentes, incluyendo las patentes de Estados Unidos números 6.555.123, 6.585.994 y 7.025.980 de Williams, et al. se describe el uso de PHA en la reparación e ingeniería de tejidos. Las patentes de Estados Unidos números 8.034.270, 8.016.883, 8.287.909, WO 2011/119742 y WO 2011/159784 divulgan fibras, telas no tejidas, y productos textiles preparados mediante extrusión en fundido o hilatura en seco de P4HB.  
50

La patente alemana n.º DE 3937649A1 de Steinbüchel et al., divulga la producción de P4HB mediante fermentación. El polímero P4HB se identificó mediante metanolisis de la biomasa usando cromatografía de gases. El polímero P4HB no se purificó sin embargo a partir de la biomasa.  
60

Dos aplicaciones 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 tetrahidrofurano filtrado, se precipitó, se redisolvió en disolvente, se filtró de  
65

nuevo, se precipitó, se lavó, y se liofilizó. Tras este proceso de purificación, se notificó que el polímero P4HB tiene la siguiente composición mediante análisis elemental: carbono 55,63 %, hidrógeno 7,41 %, oxígeno 37,28 %, y nitrógeno 41 ppm.

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

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

15 Algunas 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 aprobados u homologados por la US Food and Drug Administration (FDA). La patente de Estados Unidos n.º 5.110.980 de Ramsay et al. divulga utilizar solución de hipoclorito para digerir la biomasa a 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 la 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 con disolvente los polímeros de PHA. La patente de Estados Unidos n.º 7.070.966 de Schumann et al. divulga métodos para reducir la biomasa y descomponer enzimáticamente la misma. 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, incluyendo el uso de etanol para extraer los 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 usando la centrifugación. La patente de Estados Unidos n.º 7.393.668 de Yanagita et al. divulga un método para extraer polímeros de PHA de la biomasa mediante alteración física en presencia de álcali seguido por 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 digiriendo los 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 la biomasa inyectando disolventes de PHA en forma líquida y de vapor en la biomasa y calentando.

40 El uso de metanol para prelavado la biomasa del polímero de 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 prelavado la biomasa de *Pseudomonas putida* KT2440 que contiene los polímeros de PHA de longitud de cadena media ha sido divulgado también 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 del UV a 241 y 275 nm procedentes del polímero mcl-PHA seguían presentes tras el uso de metanol como una etapa de prelavado, y se requirieron múltiples etapas adicionales para reducir su presencia. Los autores no identifican adicionalmente estos contaminantes, pero comentaron que los ácidos nucleicos y los ácidos aromáticos son conocidos por absorber a estas longitudes de onda. Además, el metanol es muy tóxico para los seres humanos en cantidades pequeñas. *In vivo*, el metanol se metaboliza mediante formaldehído a ácido fórmico, que puede producir ceguera permanente debido a la destrucción del nervio óptico. La ingestión, inhalación, o absorción de metanol puede ser fatal. Por estas razones, debe evitarse el uso de metanol en la preparación de productos implantables, y su uso en productos farmacéuticos está restringido y regulado por la FDA como disolvente de Clase 2 ((International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidance for industry Q3C Impurities: Residual Solvents, 1997).

55 En la fabricación de implantes que utilizan polímeros, es deseable que los materiales poliméricos tengan los niveles de impurezas más bajos posibles a 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 pueden clasificarse en tres amplias categorías, concretamente, impurezas orgánicas, impurezas inorgánicas y disolventes residuales. La purificación de polímeros de PHA hasta un nivel donde sean adecuados para su uso en implantes es particularmente difícil debido a su producción en sistemas biológicos. Dicha producción requiere que el proceso de purificación elimine una amplia gama de impurezas, incluyendo, por ejemplo, lípidos, proteínas, péptidos, metales pesados, endotoxinas, polisacáridos, ácidos nucleicos, aminoácidos, componentes de paredes celulares, depósitos de alimentos residuales, y componentes de medios residuales en los polímeros de PHA se derivan mediante fermentación. Esto último puede incluir extracto de levadura, peptona de soja, agentes antiespumantes, antibióticos, sales, aminoácidos, metales traza, azúcares, y tampones. La purificación se complica además por la afinidad conocida de los polímeros de PHA por las proteínas, su solubilidad relativamente baja o ausencia de solubilidad en la mayoría de disolventes, y las dificultades de eliminar disolventes de

polímeros a niveles aceptables. y estas dificultades deben superarse sin dejar de producir polímeros de PHA con buenos rendimientos.

5 Para mejorar la pureza y la biocompatibilidad de P4HB, es deseable identificar nuevos métodos de purificación que proporcionen P4HB con niveles reducidos de: lípidos, residuos tras ignición, contenido de nitrógeno, metales pesados y disolventes residuales.

Es por tanto un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones de P4HB con pureza mejorada.

10 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar métodos para producir P4HB con pureza mejorada.

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

15 Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar métodos para el uso humano o animal de implantes de P4HB con pureza mejorada.

### Sumario de la invención

20 Se han desarrollado composiciones de P4HB con alta pureza. Las composiciones se preparan lavando la biomasa de P4HB antes de la extracción con disolvente, precipitando a continuación el P4HB de la solución.

25 Se han desarrollado métodos para dejar que el P4HB se recupere de la biomasa de P4HB con las siguientes ventajas: (i) mayor pureza, en donde el polímero contiene menos de 100 ppm del lípido evaluado como palmitato y menos de 40 ppm de nitrógeno; (ii) un buen rendimiento del polímero con una recuperación de más del 75 % del polímero de la biomasa; (iii) pérdida mínima de peso molecular polimérico durante la recuperación de tal manera que el polímero no pierde más del 10 % de su peso molecular promedio en peso durante la recuperación; (iv) pocas etapas de recuperación; (v) utilización reducida del disolvente durante la extracción; (vi) secado más fácil del polímero; (vii) coste más bajo; y (viii) proceso global más rápido. Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden polímeros de poli-4-hidroxitirato (P4HB), en donde las composiciones se producen mediante un proceso que comprende: 30 añadir una cantidad eficaz de etanol a una biomasa de P4HB para extraer lípidos en el etanol; separar la biomasa de P4HB del etanol mediante separación sólido-líquido; recoger la biomasa lavada con etanol; y extraer el polímero de P4HB en un disolvente, teniendo las composiciones al menos una propiedad seleccionada entre el grupo que consiste en: (i) un contenido de nitrógeno de 40 ppm o menos; (ii) un contenido de hidrógeno de 7,02 %±0,3 % como se determina mediante el análisis de combustión elemental, y (iii) un contenido de lípidos de menos de 100 ppm. 35

Las composiciones de P4HB muy puras son adecuadas para preparar implantes. Los implantes se pueden usar para la reparación de tejidos blandos y duros.

### 40 Breve descripción de los dibujos

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

### Descripción detallada de la invención

45

#### I. Definiciones

"Poli-4-hidroxitirato" tal como se usa generalmente en el presente documento significa un homopolímero que contiene unidades de 4-hidroxitirato. Puede hacerse referencia en la presente memoria a P4HB o un biomaterial TephafLEX® (fabricado por Tezpa, Inc., Lexington, MA). 50

"Copolímeros de poli-4-hidroxitirato" tal como se usa generalmente en el presente documento hace referencia a cualquier polímero de 4-hidroxitirato con una o más unidades de hidroxí ácido diferentes.

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

60 "Biocompatible", tal como se usa generalmente en el presente documento, significa la respuesta biológica al material o dispositivo apropiada para el dispositivo destinado a aplicación *in vivo*. Cualquier metabolito de estos materiales también debe ser biocompatible.

"Mezcla" tal como se usa generalmente en el presente documento significa una combinación física de distintos polímeros o componentes, al contrario que un copolímero comprendido por dos o más monómeros diferentes. 65

"Contenido de carbono" Tal y como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de masa de carbono

elemental en una muestra, y se determina mediante el análisis de la combustión.

"Contenido de endotoxina" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de endotoxina presente en una muestra, y se determina mediante el ensayo del lisado de amebocitos de limulus (LAL).

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

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

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

20 "Peso molecular" tal como se usa en el presente documento, salvo que se especifique otra cosa, se refiere al peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ), no al peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) y se mide mediante CPG en relación con el poliestireno.

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

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

30 "Residuo tras ignición" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de sustancia residual no volatilizada de una muestra cuando entra en ignición en presencia de ácido sulfúrico, y como se determina mediante el método de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) <281>.

35 "Reabsorbible" tal como se usa generalmente en el presente documento significa que el material se descompone en el cuerpo y se elimina finalmente del mismo. Los términos "reabsorbible", "degradable", "erosionable" y "absorbible" se usan de manera indistinta en la bibliografía del campo, con o sin el prefijo "bio". En el presente documento, estos términos se usarán indistintamente para describir el material descompuesto y absorbido o eliminado gradualmente por el cuerpo, tanto si la degradación se debe principalmente a la hidrólisis o está mediada por procesos metabólicos.

40 "Contenido de azufre" tal como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de masa del azufre elemental en una muestra, se mide mediante la espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente y se expresa en ppm.

## II. Composición

45 Se proporcionan en el presente documento composiciones que contienen P4HB, recuperadas de una biomasa de P4HB con las siguientes ventajas: (i) mayor pureza; (ii) pérdida mínima de peso molecular del polímero durante la recuperación; y (iii) disolvente residual reducido. No existen restricciones concretas sobre el peso molecular promedio en peso del polímero de P4HB. Sin embargo, en una realización preferida, el peso molecular promedio en peso del polímero de P4HB varía de 20 kDa a 1.200 kDa, más preferentemente de 50 kDa a 800 kDa, e incluso más preferentemente de 200 kDa a 600 kDa.

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

### A. Biomasa de P4HB

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

65 Los ejemplos de microorganismos adecuados que se pueden usar como fuentes de biomasa de P4HB, que incluyen microorganismos mutados y microorganismos genéticamente modificados para producir P4HB, incluyen microorganismos que pertenecen al género *Escherichia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*,

*Halobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Aguaspirillum*, *Paracoccus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Zoogloea Candida*, *Saccharomyces*, y *Yarrowia*. Los microorganismos particularmente preferidos para la producción de biomasa de P4HB incluyen *E. coli* cepa MBX1177, un derivado de la cepa DH5 $\alpha$  seleccionada por su capacidad para crecer con ácido 4-hidroxitubúrico como la única fuente de carbono, transformada con pFS30, un plásmido que contiene los genes que codifican la PHA sintasa de *Ralstonia eutropha*, 4-hidroxitubúril-CoA transferasa de *Clostridium kluyveri*, y  $\beta$ -lactamasa, tal como se divulga en el documento WO 99/32536 de Martin y en el documento WO 00/56376 de Williams. Otros microorganismos que se pueden usar para producir la biomasa de P4HB incluyen la cepa mutante SK2813 derivada de *A. eutrophus* JMP222 tal 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 y que hospedan 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 a PHA, tal como se divulga por Zhou et al. Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant Escherichia coli, Microb. Cell Fact. 11:54 (2012).

Los microorganismos productores de P4HB adecuados pueden cultivarse mediante métodos conocidos en la técnica, y se notifican como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en los documentos WO 99/32536 de Martin, WO 00/56376 de Williams, EP 2534141 A1 de Van Walsem, WO 2013/023140 de Van Walsem, y referencias de los anteriores), sin ninguna restricción concreta. Preferentemente, el microorganismo y las condiciones de cultivo se seleccionan para proporcionar altos contenidos de P4HB. En una realización particularmente preferida, los microorganismos contienen al menos 50 % en peso de P4HB medido como porcentaje de peso celular seco.

#### B. Disolventes de soluciones de lavado

La biomasa de P4HB preferentemente se suspende en etanol y se lava a temperatura ambiente durante una hora. La relación de etanol a biomasa de P4HB es preferentemente de aproximadamente 4 kg de etanol por kg de biomasa de P4HB. La cantidad óptima de etanol requerida para lavar la biomasa dependerá de la biomasa de P4HB, la materia prima usada para preparar la biomasa, el tiempo de lavado y la temperatura, el contenido de humedad de la biomasa, y la cantidad de lípidos y otras impurezas que se van a eliminar en la etapa de lavado. Se pueden usar también soluciones acuosas de etanol para lavar la biomasa aunque el lavado con etanol absoluto es el método preferido. Alternativamente, se puede usar etanol al 95 % (etanol 190 proof) u otras concentraciones acuosas de etanol.

#### III. Métodos para extraer P4HB de pureza superior

Se han desarrollado métodos para dejar que el P4HB se recupere de la biomasa de P4HB con las siguientes ventajas: (i) mayor pureza; (ii) un buen rendimiento del polímero; (iii) pérdida mínima de peso molecular polimérico durante la recuperación; (iv) pocas etapas de recuperación; (v) utilización reducida del disolvente durante la extracción; (vi) secado más fácil del polímero; (vii) coste más bajo; y (viii) proceso global más rápido.

#### A. Lavado de la biomasa de P4HB

Se ha descubierto que lavar 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 otra vez el polímero de P4HB extraído. Como el etanol es un mal disolvente (es decir, no disolvente) de P4HB, sino un buen disolvente de lípidos, lavar elimina los lípidos, pero no disuelve el P4HB. Se ha descubierto también, que la biomasa de P4HB se puede lavar con etanol sin producir ninguna transesterificación del polímero P4HB y, por tanto, la etapa de lavado puede llevarse a cabo sin ninguna pérdida significativa de peso molecular del polímero. Adicionalmente, se ha descubierto que lavar el polímero de P4HB con etanol antes de la extracción elimina impurezas que pueden producir una decoloración, o un amarilleo, del producto purificado. Conjuntamente, estas mejoras permiten purificar P4HB sin múltiples etapas de precipitación que se notifican comúnmente para la extracción de polímeros de PHA.

Una ventaja principal de usar etanol para lavar la biomasa de P4HB es su clasificación como disolvente de Clase 3 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidance for industry Q3C Impurities: Residual Solvents, 1997). Los disolventes de clase 3 son aquellos disolventes considerados con bajo potencial tóxico para el hombre y que no tienen un límite de exposición establecido basado en la salud.

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

En una realización particularmente preferida, La biomasa de P4HB derivada de *E. coli* K12 recombinante se lavó con

etanol para eliminar impurezas. Se ha descubierto que es muy eficaz el uso de etanol para extraer impurezas de la biomasa de P4HB de *E. coli* K12. Durante la etapa de lavado, el etanol quedará normalmente decolorado con un aspecto amarilla a medida que se extraen las impurezas en el etanol. Estas impurezas se han identificado principalmente como ácidos grasos saturados e insaturados mediante el análisis de CG, siendo más prevalentes los ácidos grasos C16:0 y C18:1 y los oleatos. Al final de la etapa de lavado, el extracto de etanol concentrado (que tiene el aspecto de un alquitrán de color negro) tiene un contenido de nitrógeno elevado que puede ser normalmente de alrededor de 0,65 % en peso. Por tanto, se ha comprobado que el lavado con etanol elimina los contaminantes que contienen nitrógeno así como los lípidos y los contaminantes coloreados.

Tras lavar con etanol, la biomasa puede separarse del lavado con etanol por un método de separación sólido-líquido, y recogerse mediante cualquier medio adecuado. En una realización preferida, la biomasa de P4HB se recoge mediante filtración o centrifugación. Si se desea, se puede llevar a cabo el lavado adicional de la biomasa de P4HB recogida, o se puede enjuagar la biomasa de P4HB con etanol o una solución acuosa de etanol durante la recogida. Aunque no es necesario secar completamente la biomasa de P4HB tras eliminar el lavado con etanol, en una realización preferida, la biomasa de P4HB lavada con etanol se seca al aire. En una realización particularmente preferida, la biomasa de P4HB se seca 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 de P4HB lavada no altera de forma adversa el rendimiento de recuperación del polímero o el peso molecular promedio en peso del producto.

En comparación con los procedimientos de extracción basados en medio acuoso, se ha descubierto que lavar la biomasa con etanol da como resultado que la biomasa de P4HB sea más fácil de secar. Cuando se requiere una biomasa de P4HB seca, lavar con etanol no solo elimina impurezas, también desplaza agua de la biomasa, lo que facilita significativamente el secado. Como resultado, lavar con etanol puede ahorrar costes de secado, y acelerar y simplificar el proceso de recuperación.

#### **B. Extracción de la biomasa de P4HB**

Después que la biomasa de P4HB se ha lavado con etanol, el polímero de P4HB se puede extraer con un disolvente. De manera ideal, el polímero de P4HB tiene una elevada solubilidad en los disolventes usados para extraer el polímero. Los disolventes preferidos para extraer el polímero de P4HB de la biomasa lavada con etanol incluyen cloruro de metileno, cloroformo, dicloroetano, tetracloroetano, tricloroetano, dibromometano, bromoformo, tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida, y 1,4-dioxano. La relación de disolvente a biomasa depende del contenido de polímero de la biomasa, y de la naturaleza del disolvente. Si se usa muy poco disolvente, la viscosidad de la solución polimérica extraída puede llegar a ser demasiado alta haciendo que el procesamiento de la solución de polímero sea difícil. En una realización particularmente preferida, la cantidad de disolvente necesaria se ajusta de tal manera que se forma una solución de disolvente polimérico que contiene 2-5 % en peso de P4HB al final de la extracción.

Se ha descubierto que la cantidad de disolvente requerida para extraer el polímero de P4HB con un buen rendimiento se reduce significativamente cuando se usa etanol para lavar la biomasa antes de la extracción del polímero. Además de ahorrar los costes del disolvente adicional, el reducido volumen de extracción disminuye también la cantidad de no disolvente del polímero de P4HB que se necesita posteriormente para precipitar el polímero de la solución de disolvente. Aunque se prefiere precipitar el polímero de la solución para proporcionar un polímero con la más elevada pureza posible, los costes reducidos de la evaporación del disolvente se consiguen si el polímero se concentra simplemente tras la extracción y no precipitan.

#### **C. Precipitación y secado del polímero de P4HB**

El polímero de P4HB puede recogerse a partir de soluciones de disolventes de P4HB, que se han extraído a partir de la biomasa de P4HB lavada con etanol, precipitando el polímero con un no disolvente. Esto es preferible para cristalizar el polímero a partir de una solución de disolvente, que puede requerir cantidades muy grandes de disolvente para proporcionar un producto muy puro y por consiguiente ser muy caro.

El no disolvente utilizado para precipitar el polímero de P4HB a partir de una solución de disolvente de P4HB es preferentemente un alcohol o solución acuosa de alcohol que sea un mal disolvente del polímero de P4HB. Se pueden usar agua, etanol, solución acuosa de etanol y metanol para precipitar el P4HB, sin embargo, metanol no es un no disolvente preferido debido a la toxicidad potencial de los residuos de metanol en el producto purificado. En una realización particularmente preferida, el mismo tipo de disolvente (o una solución acuosa del disolvente) que se usa para lavar la biomasa de P4HB se utiliza también como el no disolvente para precipitar el polímero de P4HB a partir de la solución del polímero de P4HB. Esto es particularmente deseable ya que limita el número de disolventes que se usan en el proceso de extracción y, por tanto, limita el número de residuos de disolvente que deben eliminarse y evaluarse en el producto final purificado. En una realización particularmente preferida, se usó etanol para lavar la biomasa de P4HB, y se usó tanto etanol como una solución acuosa de etanol como un no disolvente para precipitar el polímero a partir de la solución del disolvente de P4HB. En una realización aún más preferida, la biomasa de P4HB se lavó con etanol, y el polímero se precipitó a partir de una solución de disolvente de P4HB con soluciones acuosas de etanol que contenían 30-80 % en peso de etanol. El P4HB puede lavarse tras la precipitación con etanol o una solución acuosa de etanol.

La relación de no disolvente a la solución de disolvente de P4HB necesaria para precipitar el polímero de P4HB dependerá del no disolvente, el disolvente del P4HB, la temperatura, el peso molecular del P4HB y el rendimiento de recuperación deseados. En un procedimiento típico, la relación del no disolvente de P4HB al disolvente de P4HB varía de 1:2 a 4:1 y está cercana más preferentemente a 1:1.

No existen limitaciones concretas sobre la temperatura que debe usarse para precipitar el polímero de P4HB a partir de la solución de disolvente, sin embargo, la temperatura debe ser más baja que el punto de ebullición del disolvente y mayor que su temperatura de congelación. En una realización preferida, la temperatura de la etapa de precipitación debe ser menor que 50 °C y mayor que 0 °C, y más preferentemente a una temperatura de menos de 25 °C.

El polímero de P4HB precipitado puede recogerse mediante cualquier medio adecuado para separar sólidos y líquidos incluyendo el uso de la filtración y la centrifugación. El polímero de P4HB recogido puede lavarse adicionalmente con un no disolvente de P4HB. En una realización preferida, el polímero de P4HB recogido puede lavarse con etanol o una solución acuosa de etanol. Tras el lavado con etanol se puede usar también desplazar el agua desde el polímero recogido a fin de hacer más fácil el secado del polímero de P4HB.

Una ventaja principal del método divulgado en el presente documento es que se puede obtener un polímero de P4HB muy puro con una única etapa de precipitación. Se pueden llevar a cabo etapas de precipitación adicionales redisolviendo el polímero de P4HB en un disolvente y repitiendo el procedimiento de precipitación. Sin embargo, en la realización preferida, el polímero de P4HB se purifica con solo una única etapa de precipitación, que elimina el requisito de usar grandes cantidades de disolvente para la purificación de P4HB.

Tras recoger el polímero precipitado, el P4HB puede desolvatarse y secarse por cualquier medio adecuado. Los métodos adecuados para eliminar el disolvente residual y secar el polímero incluyen el secado al aire y el secado al vacío. Se pueden usar también 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

En los procedimientos anteriormente divulgados por los documentos WO 99/32536 de Martin y WO 00/56376 de Williams, se usó un proceso en cinco etapas para purificar P4HB. Las etapas incluyen: (a) una etapa para fluidificar y liofilizar la biomasa de P4HB, (b) una etapa para extraer el polímero de P4HB con tetrahidrofurano (THF) a 60 °C, y filtrar la materia insoluble, (c) una etapa para precipitar el polímero de P4HB en agua, (d) una etapa para redissolver el polímero de P4HB en disolvente y filtrar este de nuevo para eliminar la materia insoluble, y (e) una etapa para precipitar el polímero, lavar el polímero, y liofilizar el polímero. Este proceso proporciona un polímero de P4HB con las siguientes especificaciones: (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 de P4HB no se divulga en los documentos WO 99/32536 de Martin y WO 00/56376 de Williams, sin embargo, por comparación, se determinó como se describe en el Ejemplo 5 y se encontró que tenía aproximadamente 900 ppm de palmitato de ácido graso (véase el Ejemplo 6).

En cambio, los nuevos métodos desarrollados y divulgados en el presente documento, permiten que el polímero de P4HB se purifique esencialmente en tres etapas: (a) una etapa para lavar la biomasa que contiene P4HB con etanol, (b) una etapa para extraer el disolvente de la biomasa de P4HB y filtrar la materia insoluble, y (c) una etapa para precipitar el polímero de P4HB del disolvente con un sistema no disolvente de una solución acuosa de alcohol, lavar el polímero de P4HB con etanol o una solución acuosa de etanol, y desolvatar y secar el polímero de P4HB. No solo el proceso tiene significativamente menos etapas, también proporciona un polímero de P4HB de mayor pureza. La siguiente Tabla muestra una comparación paralela 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 biomasa con etanol
Extraer PHA con THF	Extraer el disolvente de P4HB y filtrar la materia insoluble
Precipitar P4HB en agua	-
Redissolver P4HB en THF y eliminar impurezas	-
Precipitar P4HB en disolvente, lavar y liofilizar el polímero	Precipitar P4HB a partir del disolvente en un no disolvente, lavar, desolvatar y secar

En una realización preferida, la pureza del polímero P4HB purificado de acuerdo con los métodos descritos en las secciones IIA, IIB y IIC cumple 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 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 proporciona un polímero de P4HB con un contenido de nitrógeno de menos de 40 ppm.

5

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

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

10

15

Los implantes fabricados a partir de o incluyendo un polímero de P4HB de alta pureza, y las mezclas que contienen P4HB, pueden usarse para la reparación, regeneración, y la sustitución de tejidos blandos y duros. Estos implantes pueden usarse en dispositivos médicos, incluyendo, aunque no de forma limitativa: sutura, sutura de púas, sutura trenzada, sutura monofilamento, sutura híbrida de fibras monofilamento y multifilamento, trenzas, ligaduras, mallas tricotadas o tejidas, tubos tricotados, catéteres, mallas monofilamento, mallas multifilamento, parches, dispositivo de curación de heridas, vendaje, apósito para heridas, apósito para quemaduras, apósito para úlceras, sustitutivo cutáneo, hemostático, dispositivo de reconstrucción traqueal, dispositivo de rescate de órganos, sustitutivo de la duramadre, parche de la duramadre, guía para nervios, dispositivo de reparación o regeneración nerviosa, dispositivos de reparación de hernias, malla de hernia, tapón de hernia, dispositivo para soporte temporal para heridas o tejidos, armazón para ingeniería tisular, dispositivo de regeneración/reparación guiada de tejidos, membranas antiadhesión, barrera de adhesión, membrana de separación de tejidos, membrana de retención, cabestrillo, dispositivo para la reconstrucción del suelo pélvico, dispositivo de suspensión uretral, dispositivo para el tratamiento de la incontinencia urinaria, dispositivo para el tratamiento del reflujo vesicoureteral, dispositivo de reparación de vejiga, dispositivo de reparación del músculo del esfínter, partículas inyectables, microesferas inyectables, dispositivo de carga o llenado, armazón para médula ósea, abrazadera, pinza, tornillo, perno, clavo, clavo de cavidad medular, placa ósea, tornillo de interferencia, tachuela, sujetador, remache, grapa, dispositivo de fijación para un implante, sustitutivo de injerto óseo, relleno de huecos óseos, anclaje para sutura, anclaje óseo, dispositivo de reparación de ligamentos, dispositivo de aumento de ligamentos, injerto de ligamento, dispositivo de reparación del ligamento cruzado anterior, dispositivo de reparación de tendones, injerto tendinoso, dispositivo de aumento de tendones, dispositivo de reparación del manguito rotador, dispositivo de reparación de menisco, dispositivo de regeneración de menisco, dispositivo de reparación de cartilago articular, dispositivo de reparación osteocondral, dispositivo de fusión espinal, dispositivo para el tratamiento de la artrosis, viscosuplemento, endoprótesis vasculares, incluidas coronaria, cardiovascular, periférica, uretérica, uretral, urológica, gastroenterológica, nasal, endoprótesis neurológicas y revestimientos de endoprótesis, injerto de endoprótesis, parche cardiovascular, globo para catéter, dispositivo de cierre vascular, dispositivo de reparación de defectos en el tabique intracardiaco, incluyendo pero sin limitarse a dispositivos de reparación de defectos del tabique auricular y dispositivos de cierre de PFO (foramen oval patente), dispositivo de cierre de apéndice auricular izquierdo (LAA), parche pericardiaco, válvula para venas, válvula cardíaca, injerto vascular, dispositivo de regeneración miocárdica, malla periodontal, membrana de regeneración de tejido guiada para 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 celular, dispositivo de liberación controlada, dispositivo de administración de fármaco, dispositivo de cirugía plástica, dispositivo de levantamiento de senos, dispositivo de mastopexia, dispositivo de reconstrucción mamaria, dispositivo de aumento mamario (incluidos los dispositivos para usar con implantes mamarios), dispositivo de reducción mamaria (incluidos dispositivos para extraer, remodelar y reorientar el tejido mamario), dispositivos para la reconstrucción mamaria después de una mastectomía con o sin implantes mamarios, dispositivo reconstructivo facial, dispositivo de levantamiento de la frente, dispositivo de levantamiento de las cejas, dispositivo de levantamiento de los párpados, dispositivo de levantamiento facial, dispositivo de ritidectomía, dispositivo de levantamiento de sutura (para levantar y soportar zonas flácidas de la cara, de las cejas y del cuello), dispositivo de rinoplastia, dispositivo para aumento malar, dispositivo de otoplastia, dispositivo de elevación del cuello, dispositivo de mentoplastia, dispositivo de reparación cosmética y dispositivo para revisión de cicatrices faciales.

20

25

30

35

40

45

50

55

Un agente biológicamente activo es una sustancia usada, por ejemplo, para el tratamiento, prevención, diagnóstico, cura o mitigación de una enfermedad o trastorno, una sustancia que altera la estructura o función del cuerpo, o profármacos, que se vuelven biológicamente activos o más activos una vez que se han introducido en un entorno fisiológico predeterminado. Los agentes bioactivos incluyen sustancias, biológica, fisiológica o farmacológicamente activas que actúan local o sistémicamente en el cuerpo humano o animal. Los ejemplos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, fármacos de molécula pequeña, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, moléculas que alteran la migración celular, moléculas que alteran la división celular, moléculas que alteran la proliferación y la diferenciación celulares, moléculas que estimulan la modificación fenotípica de las células, moléculas que alteran la angiogénesis, moléculas que alteran la vascularización, moléculas que alteran la disposición de la matriz extracelular, ligandos de señalización, polímeros plasmáticos ricos en plaquetas, péptidos, proteínas, anticuerpos, factores de

60

65

crecimiento, fibronectina, laminina, vitronectina, integrinas, antibióticos, esteroides, hidroxiapatita, partículas de plata, vitaminas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, quitosanos y derivados de los mismos, alginatos y derivados de los mismos, colágeno, azúcares, polisacáridos, nucleótidos, oligonucleótidos, lípidos, ácido hialurónico y sus derivados, moléculas de sentido contrario, aptámeros, ARNip, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos.

5 "Agente bioactivo" incluye uno de dichos agentes individuales y también pretende incluir una pluralidad.

La presente invención se entenderá en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

### 10 Ejemplo 1: Lavado de la biomasa de P4HB con etanol

Una biomasa que contiene P4HB ( $M_w$  de 468 kDa, mediante cromatografía de exclusión molecular (CPG) con respecto a patrones de polietileno), 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 de P4HB se retiró mediante filtración, y el etanol se concentró para proporcionar un alquitrán de color negro. El análisis del alquitrán mediante  $^1\text{H}$ -RMN

15 demostró que el extracto etanólico de la biomasa de P4HB estaba compuesto casi completamente de lípidos saturados y no saturados. Se determinó también el contenido del alquitrán, y se encontró que era el 0,65 % en peso.

### 20 Ejemplo 2: Purificación de biomasa de P4HB lavada con etanol

La biomasa de P4HB lavada con etanol obtenida del Ejemplo 1 se centrifugó en una centrifuga de cesta para eliminar el volumen de la solución lavada con etanol. El polímero de P4HB se extrajo en un disolvente orgánico, se precipitó en una solución acuosa de etanol (30 %), y se recogió para su análisis. Se encontró que el contenido de nitrógeno del polímero de P4HB extraído de la biomasa de P4HB lavada con etanol era de 37 ppm como se determina mediante el método Kjeldahl (Bradstreet, Anal. Chem., 26(1):185-187 (1954). Se determinaron las fracciones másicas del carbono

25 y el hidrógeno del polímero de P4HB purificado mediante el análisis de combustión elemental utilizando un instrumento LECO CHN 2000 (siguiendo las instrucciones del fabricante) y se encontró que eran el 55,89 % y el 7,05 %, respectivamente. Estos valores son cercanos a los valores teóricos del poli-4-hidroxibutirato: carbono 55,81 %, e hidrógeno 7,02 %. No se observó pérdida significativa de peso molecular del polímero de P4HB. Se determinó el peso molecular promedio en peso del polímero de P4HB purificado mediante CPG con respecto al poliestireno y se encontró que era de 449 kDa (frente a 468 kDa antes de la purificación) indicando que la etapa de lavado con etanol no produjo pérdida de peso molecular mediante transesterificación de P4HB con etanol. Se determinó la pureza del polímero de P4HB mediante el análisis de CG (cromatografía de gases) (como se describe en el Ejemplo 3), y se encontró que era del 99,5 %. El análisis de RMN de protón del polímero de P4HB purificado demostró que el polímero tenía alta pureza con pocas evidencias de lípidos contaminantes a 1,2 ppm en el espectro de RMN. El contenido de endotoxina del polímero de P4HB purificado era de 0,22 unidades de endotoxina (UE)/g, que es suficientemente bajo para permitir la fabricación de implantes usando P4HB con un contenido de endotoxina de menos de 20 unidades de endotoxina por dispositivo.

### 40 Ejemplo 3: Análisis de pureza de P4HB mediante CG

La pureza de un polímero de P4HB en una muestra desconocida se puede medir mediante cromatografía de gases tras derivatización del polímero utilizando 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 de P4HB en dos derivados principales, butil-4-hidroxibutirato y butil-4-clorobutirato. 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 4 M (HCl) en 1,4-dioxano para proporcionar una solución de HCl 2 M 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.

50

La reacción de butanolisis se lleva a cabo añadiendo 3 ml del reactivo de butanolisis (preparado como se ha descrito anteriormente) a una masa conocida de una muestra de P4HB (aproximadamente 25 mg) en un vial. El vial se cierra herméticamente y se calienta a 90-92 °C durante 16-20 horas. (Se puede generar una curva patrón mediante la butanolisis de cantidades conocidas de gamma-butilolactona de alta pureza (GBL).) Después del calentamiento, Los viales se dejaron enfriar, se añadieron 3 ml de agua, y el contenido del vial se mezcló vigorosamente, y a continuación se dejaron separar. A continuación se puede determinar el contenido de 4HB en la muestra mediante el análisis por CG de la capa orgánica separada en el vial, utilizando las muestras patrón de GBL para crear una curva patrón.

Se llevó a cabo el análisis de CG inyectando 1  $\mu\text{l}$  de la fase orgánica que contenía los ésteres de butilo volátiles en un cromatógrafo de gases adecuado. Un montaje de CG adecuado puede ser un CG Agilent 6890 (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) provisto de un automuestreador, un detector de ionización de llama, y una columna capilar SPB-35 de Supelco, Inc. (PA, EE.UU.) (30 m x 0,25 mm x 0,25 micrómetros) con helio usado como gas portador a 2 ml/min. La temperatura de entrada se ajusta a 225 °C, y la relación de división es 50:1. El programa de temperatura del horno se ajusta a 80 °C durante 2 min, aumentando 10 °C por minuto a 280 °C, y manteniendo a 280 °C durante 2 minutos. En el detector, la temperatura se ajusta a 290 °C, el caudal de hidrógeno es 40 ml/min, el gas de compensación de helio

60

65

se ajusta a 45 ml/min y el caudal de aire del detector se ajusta a 450 ml/min.

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

#### **Ejemplo 4: Ejemplo adicional de purificación de P4HB a partir de la biomasa de P4HB**

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

La biomasa de P4HB seca se suspendió en etanol absoluto en una relación de 1 kg de biomasa a 4 kg de etanol, y se agitó agresivamente durante una hora a temperatura ambiente. La suspensión de biomasa resultante se transfirió a una centrifuga de cesta, y la suspensión se centrifugó para eliminar el disolvente de lavado. Durante la centrifugación, se realizó un lavado adicional con etanol para desplazar adicionalmente el disolvente de lavado. Se realizó la centrifugación para reducir el contenido de disolvente residual de la biomasa a menos del 15 % en peso. Después del lavado, la biomasa se eliminó de la centrifuga, se analizó para determinar los extractos volátiles residuales y se recogió para la extracción del polímero.

La biomasa lavada recogida se transfirió a un recipiente de extracción y se extrajo en un disolvente adecuado a temperatura elevada durante 4 horas. Los disolventes de extracción adecuados incluyen: disolventes orgánicos polares tales como cloroformo, diclorometano, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetona, dioxano, y mezclas de estos. Después de completarse la extracción, se filtró el extracto para eliminar los residuos celulares y los residuos insolubles, y se precipitó el polímero bombeando el filtrado a un no disolvente de P4HB. Se usó una solución de etanol y agua (entre 30-80 % de etanol en peso) como el no disolvente. Cuando el filtrado se bombeó a la solución acuosa de etanol, el P4HB precipitó como un sólido, y se recogió y lavó adicionalmente con etanol. Después del lavado, el polímero de P4HB recogido se transfirió a un horno de secado al vacío y se secó a 45 °C al vacío.

#### **Ejemplo 5: Análisis del contenido de ácidos grasos (Lípidos) de PP4HB mediante CG**

Se llevó a cabo el análisis de ácidos grasos en una muestra de P4HB de una manera similar al análisis de pureza de la butanolisis mediante GC según el Ejemplo 3, excepto que se usa un ácido graso como un patrón cuantitativo, en lugar de GBL. El palmitato de ácido graso, o su éster metílico, es un patrón adecuado. La reacción de butanolisis convierte ácidos grasos, o ésteres de ácidos grasos, en los ésteres butílicos de ácidos grasos correspondientes. Estos ésteres volátiles se analizaron mediante inyección en un CG como en el Ejemplo 3. El ácido palmítico, el lípido más prevalente en animales, plantas y microorganismos, se usa como lípido o ácido graso representativo para evaluar la pureza y el contenido de lípidos de una muestra, incluso aunque otros ácidos grasos o lípidos puedan estar también presentes en la muestra. Se generó una curva patrón para el área del pico de palmitato de butilo frente a su masa y se usó para determinar el contenido de ácido graso de la muestra de P4HB. Se notificó la concentración de ácido graso de la muestra como ppm de palmitato de ácido graso.

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

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

En comparación, se descubrió que el contenido de lípido residual en las muestras de P4HB purificado según el método del Ejemplo 2 era menor de 100 ppm.

#### **Ejemplo 7: Determinación del contenido de metales pesados, residuos tras ignición, disolvente residual y contenido de azufre del polímero de P4HB de alta pureza**

El polímero de P4HB purificado de acuerdo con el método descrito en el presente documento se analizó para determinar el contenido de metales pesados, residuos tras ignición, la presencia de disolvente residual y el contenido de azufre. El contenido de metales pesados del polímero se determinó mediante el USP <231> (un procedimiento colorimétrico basado en la precipitación de sulfuros de metales insolubles) y se encontró que era <20 ppm. El residuo tras ignición del polímero purificado se determinó mediante el USP <281> y se encontró que era <0.1 %. Se midió la cantidad de disolvente residual en el polímero mediante CG-EM de espacio superior usando un CG HP 5890 II provisto de un detector EM 5972 y una columna capilar ZB-5 (60m x 0,32 mm de 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 de P4HB era <5 ppm. Se determinó el contenido de azufre del polímero de P4HB purificado mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente y se encontró que era <50 ppm.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende polímero de poli-4-hidroxibutirato (P4HB), en donde la composición se produce mediante un proceso que comprende:
- 5           añadir una cantidad eficaz de etanol a una biomasa de P4HB para extraer lípidos en el etanol; separar la biomasa de P4HB del etanol mediante separación sólido-líquido;  
               recoger la biomasa lavada con etanol; y  
               extraer el polímero de P4HB en un disolvente;
- 10           teniendo dicha composición al menos una propiedad seleccionada entre el grupo que consiste en: (i) un contenido de nitrógeno de 40 ppm o menos; (ii) un contenido de hidrógeno del 7,02 %±0,3 % como se determina mediante análisis de combustión elemental, y (iii) un contenido de lípidos de menos de 100 ppm como se determina mediante análisis de cromatografía de gases después de butanolisis.
- 15           2. La composición de la reivindicación 1 en donde la composición tiene un contenido de metales pesados de menos de 20 ppm tal como se determina mediante el método del USP <231>.
- 20           3. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 en donde la composición tiene: (a) un contenido de disolvente residual de menos de 5 ppm, tal como se determina mediante cromatografía de gases de espacio superior-espectrometría de masas (CG-EM); (b) un residuo tras ignición de menos del 0,2 % tal como se determina mediante el método de la Farmacopea de Estados Unidos (USP)<281>; (c) un contenido de 4-hidroxibutirato en el poli-4-hidroxibutirato del 99,7 %±2 % en peso tal como se determina mediante cromatografía de gases; y/o (d) un contenido de azufre residual de menos de 50 ppm tal como se determina mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma.
- 25           4. La composición de la reivindicación 1 en donde la biomasa se lava con al menos 4 gramos de etanol por gramo de biomasa.
- 30           5. La composición de la reivindicación 1 en donde la biomasa se obtiene de un microorganismo, opcionalmente, en donde el microorganismo es *Escherichia Coli* K12.
6. La composición de la reivindicación 1 en donde la relación en p/p de etanol a biomasa de P4HB es 4:1.
- 35           7. La composición de la reivindicación 1 en donde el polímero se precipita a partir del disolvente con un no disolvente del polímero, se recoge y se seca.
- 40           8. La composición de la reivindicación 7, en donde el disolvente se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, dioxano, acetato de etilo, carbonato de dimetileno, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metil etil cetona, acetato de butilo, propionato de butilo y carbonato de dietilo.
- 45           9. La composición de la reivindicación 7 en donde el no disolvente del polímero es un alcohol, una solución acuosa de alcohol, o agua.
- 50           10. La composición de la reivindicación 9 en donde el no disolvente del polímero es una solución acuosa de etanol; opcionalmente en donde el no disolvente del polímero comprende etanol entre el 30 y el 80 % en peso, y el etanol se usa para lavar la biomasa.
- 55           11. La composición de la reivindicación 8, en donde la relación del no disolvente de P4HB al disolvente de P4HB varía de 1:2 a 4:1 y es más preferentemente 1:1.
12. La composición de la reivindicación 8, en donde la temperatura de la etapa de precipitación es menor de 50 °C y mayor de 0 °C, opcionalmente en donde la temperatura de la etapa de precipitación es menor de 25 °C.
13. Un dispositivo médico que comprende la composición de la reivindicación 1, en donde el dispositivo se esteriliza con gas de óxido de etileno frío, irradiación gamma, o irradiación de haz de electrones en donde el dispositivo médico tiene un nivel de pirógenos de menos de 20 unidades de endotoxina por dispositivo.
- 60           14. El dispositivo médico de la reivindicación 13 en donde el dispositivo se selecciona del grupo: sutura, sutura de púas, sutura trenzada, sutura monofilamento, sutura híbrida de fibras monofilamento y multifilamento, trenzas, ligaduras, mallas tricotadas o tejidas, tubos tricotados, catéteres, mallas monofilamento, mallas multifilamento, parches, dispositivo de curación de heridas, vendaje, apósito para heridas, apósito para quemaduras, apósito para úlceras, sustitutivo cutáneo, hemostático, dispositivo de reconstrucción traqueal, dispositivo de rescate de órganos, sustitutivo de la duramadre, parche de la duramadre, guía para nervios, dispositivo de reparación o regeneración nerviosa, dispositivos de reparación de hernias, malla de hernia, tapón de hernia, dispositivo para soporte temporal para heridas o tejidos, armazón para ingeniería tisular, dispositivo de regeneración/reparación guiada de tejidos, membranas antiadhesión, barrera de adhesión, membrana de separación de tejidos, membrana de retención,
- 65

cabestrillo, dispositivo para la reconstrucción del suelo pélvico, dispositivo de suspensión uretral, dispositivo para el tratamiento de la incontinencia urinaria, dispositivo para el tratamiento del reflujo vesicoureteral, dispositivo de reparación de vejiga, dispositivo de reparación del músculo del esfínter, partículas inyectables, microesferas inyectables, dispositivo de carga o llenado, armazón para médula ósea, abrazadera, pinza, tornillo, perno, clavo, clavo de cavidad medular, placa ósea, tornillo de interferencia, tachuela, sujetador, remache, grapa, dispositivo de fijación para un implante, sustitutivo de injerto óseo, relleno de huecos óseos, anclaje para sutura, anclaje óseo, dispositivo de reparación de ligamentos, dispositivo de aumento de ligamentos, injerto de ligamento, dispositivo de reparación del ligamento cruzado anterior, dispositivo de reparación de tendones, injerto tendinoso, dispositivo de aumento de tendones, dispositivo de reparación del manguito rotador, dispositivo de reparación de menisco, dispositivo de regeneración de menisco, dispositivo de reparación de cartílago articular, dispositivo de reparación osteocondral, dispositivo de fusión espinal, dispositivo para el tratamiento de la artrosis, viscosuplemento, endoprótesis vasculares, incluidas coronaria, cardiovascular, periférica, uretéica, uretral, urológica, gastroenterológica, nasal, endoprótesis neurológicas y revestimientos de endoprótesis, injerto de endoprótesis, parche cardiovascular, globo para catéter, dispositivo de cierre vascular, dispositivo de reparación de defectos en el tabique intracardiaco, incluyendo pero sin limitarse a dispositivos de reparación de defectos del tabique auricular y dispositivos de cierre de PFO (foramen oval patente), dispositivo de cierre de apéndice auricular izquierdo (LAA), parche pericardiaco, válvula para venas, válvula cardíaca, injerto vascular, dispositivo de regeneración miocárdica, malla periodontal, membrana de regeneración de tejido guiada para 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 celular, dispositivo de liberación controlada, dispositivo de administración de fármaco, dispositivo de cirugía plástica, dispositivo de levantamiento de senos, dispositivo de mastopexia, dispositivo de reconstrucción mamaria, dispositivo de aumento mamario (incluidos los dispositivos para usar con implantes mamarios), dispositivo de reducción mamaria (incluidos dispositivos para extraer, remodelar y reorientar el tejido mamario), dispositivos para la reconstrucción mamaria después de una mastectomía con o sin implantes mamarios, dispositivo reconstructivo facial, dispositivo de levantamiento de la frente, dispositivo de levantamiento de las cejas, dispositivo de levantamiento de los párpados, dispositivo de levantamiento facial, dispositivo de ritidectomía, dispositivo de levantamiento de sutura (para levantar y soportar zonas flácidas de la cara, de las cejas y del cuello), dispositivo de rinoplastia, dispositivo para aumento malar, dispositivo de otoplastia, dispositivo de elevación del cuello, dispositivo de mentoplastia, dispositivo de reparación cosmética y dispositivo para revisión de cicatrices faciales.

30 15. Una composición como se define en la Reivindicación 1 para su uso en medicina, en donde la composición se proporciona en la forma de un implante.

35 16. Una composición tal como se define en la Reivindicación 1 o un dispositivo formado a partir de una composición tal como se define en la Reivindicación 1, para su uso en la implantación en el cuerpo.

40 17. Una composición tal como se define en la Reivindicación 1 o un dispositivo formado a partir de una composición tal como se define en la Reivindicación 1, para su uso en la reparación, la regeneración o la sustitución de los tejidos blando o duro.

Estructura química de P4HB

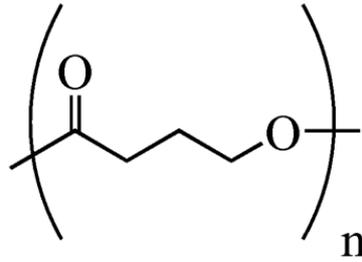


FIGURA 1