



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 770**

51 Int. Cl.:
C08G 63/06 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
A61L 2/18 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61L 31/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98922281 .5**
86 Fecha de presentación : **12.05.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0981381**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2000**

54 Título: **Polihidroxicanoato para aplicaciones *en vivo*.**

30 Prioridad: **12.05.1997 US 46211 P**
31.07.1997 US 54289 P
24.10.1997 US 63501 P
17.11.1997 US 65921 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **METABOLIX, Inc.**
21 Erie Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Williams, Simon, F.;**
Martin, David, P.;
Gerngross, Tillman y
Horowitz, Daniel, M.

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 285 770 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

Polihidroxiálcanoato para aplicaciones *in vivo*.

5 **Aplicaciones relacionadas con referencias cruzadas**

El beneficio se reivindica de la prioridad por la Patente de los EE.UU. serie 60/046,211, denominada “*Biocompatible Polyhydroxyalkanoates*” presentada el 12 de mayo de 1997 por *Simon F. Williams*; serie No. 60/054,289, denominada “*Derivatization de PHAs for Biomedical Application*” presentada el 31 de julio de 1997 por *David Martin*; serie No. 60/063,501, denominada “*Polyhydroxy Alkanoate Stents*” archivada por *Simon F. Williams and David P. Martin* 24 de octubre de 1997; y serie No. 60/065,921 denominado “*Methods for Making Biocompatible Polyhydroxyalkanoates*” archivada 17 de noviembre de 1997, por *Simon F. Williams and David P. Martin*.

15 **Antecedentes de la invención**

La presente solicitud esta dirigida en general a polímeros de polihidroxiálcanoato y los métodos de preparación para eliminar endotoxinas y sus usos en una variedad de aplicaciones biomédicas, que incluye la ingeniería de tejido, apósitos de heridas, entrega y liberación de medicamentos, y en prótesis.

20 Polihidroxiálcanoatos (PHAs) son polímeros con unidades monoméricas de ácido hidroxil repetidas. Los PHAs han sido revisados en algunas publicaciones, que incluyen Byrom “*Miscellaneous Biomaterials*”, en *Biomaterials* (D. Byrom. Ed.) pp. 333-59 (*Macmillan Publishers London, 1991*); *Hocking and Marchessault*, “*Biopolyesters*” en *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers* (G.J.L. Griffin, ed.) pp. 48-96 (*Chapman and Hall London, 1994* de Londres); *Müller and Seebach*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**: 477-502 (**1993**); *Steinbüchel*, “*Polihidroxiálcanoic Acids*”, en *Biomaterials* (D. Byrom, ed.) pp. 123-213 (*Macmillan Publisher, London 1991*); y *Williams and people*, *CHEMTECH*, **26**: 38-44 (**1996**).

30 Polihidroxiábutirato (PHB) y polihidroxiábutirato-hidroxiálerato (PHBV) han sido usados comercialmente como un reemplazo biodegradable para resinas de productos primarios sintéticos, y ha sido investigado exhaustivamente para el uso en aplicaciones biomédicas. Los ejemplos de estas aplicaciones biomédicas incluyen la liberación controlada (*Pouton and Akhtar, Adv. Drug Delivery Rev.*, **18**:133-62 (**1996**)), las formulaciones de pastilla, suturas quirúrgicas, los apósitos de herida, polvos de lubricación, vasos sanguíneos, injertos de tejidos, implantes quirúrgicos para unir partes del cuerpo tubulares, placas de fijación de fractura de hueso y otros usos ortopédicos, (*Hocking and Marchessault*, “*Biopolyesters*” *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*, (G.J.L. Griffin, ed.) pp. 48-96 (Chapman and Hall London, **1994**) y las referidas allí la solicitud de patente europeo A1 de 754 467 (*Bowald, et al.*). Ver también a *Saghir Akhtar*, Ph.D. Tesis para la universidad de Bath, **1990**, “*Physicomechanical Properties of bacterial P. (HB-HV) Poliésteres y sus usos en la entrega de medicamento*”. PHBV ha sido usado para mantener el crecimiento de células y en el papel de reconstrucción de tejidos (ver, e. g., *Rivard, et al., J Appl. Biomater.*, **6**: 65-68 (**1995**)). Sin embargo, PHBs y PHBVs han sido demostrado que inducen la respuesta inflamatoria aguda cuando se implanta *in vivo* (*Akhtar* pp. 50-51, y las referencias citadas allí).

45 Los polímeros biodegradables para uso médico deben ser biocompatible y se degradan en metabolitos no tóxicos. Los dispositivos médicos también deben ser no pirogénicos, es decir, los productos no deben producir reacciones de fiebre cuando se administran a pacientes. La presencia de endotoxinas bacterianas (que es un componente esencial de la superficie exterior celular de bacterias gram negativas), en el producto es por mucho la preocupación mayor de los fabricantes en conseguir la no presencia de pirogenos. (*Harto and Pearson, BioPharm.*, **1**: 22-29 (**1988**)). La Federación de Alimentación y Medicamentos de EE.UU. (FDA), por ejemplo, requiere que el contenido de endotoxinas de los dispositivos médicos no supere las 20 unidades de endotoxinas (EU) por dispositivo según Farmacopeia de los EE.UU., excepto para aquellos dispositivos que hacen contacto con el fluido cerebroespinal, donde el contenido no debe superar 2,15 unidades de endotoxinas por dispositivo (USP). Los niveles de endotoxinas aceptables se necesitan que estén aún más bajo para algunas aplicaciones, donde el polímero se usa para aplicaciones particularmente más sensibles. Por lo tanto, en el desarrollo de polímeros de PHAs para uso en dispositivos médicos, los materiales deben tener los requisitos específicos previstos para el contenido de endotoxinas, particularmente para el PHAs obtenido por la fermentación de bacterias gram negativas, donde los polímeros son expuestos a grandes cantidades de endotoxinas en el cultivo de células.

60 La patente de los EE.UU. 5.334.698 para *Witholt, et al.* revela suturas, películas, injertos de piel, e injertos de hueso preparados de un poliéster ópticamente activo separado de las células de *Pseudomonas oleovorans*. La solicitud PCT WO 96/00263 publicada (*Eggink, et al.*) revela una dispersión acuosa de PHA como el látex, en el que el PHA incluye 3 ácidos grasos de hidroxil saturados o no saturados teniendo un largo de cadena de carbono de 6-14. *Hocking and Marchessault*, “*Biopolyesters*” en *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*, (G.J.L. Griffin, ed.) pp. 48-96 (*Chapman y Hall London, 1994*) también revela poliésteres con cadenas laterales funcionalizadas preparadas por bacterias que modifican la alimentación del sustrato, y su uso para preparar sistemas de entrega de medicamentos. Estos materiales incluirían intrínsecamente endotoxinas, y no hay revelación de ningún método para eliminar endotoxinas o procedimientos para suministrar polímeros depirogenizados adecuados para el uso médico *in vivo*.

65 A pesar de la gran cantidad de literatura que describe la producción, purificación, y desarrollo de aplicaciones de PHAs, actualmente no hay ningún método reportado específicamente sobre despirogenización de polímeros de

PHA. Los PHAs tienen una afinidad relativamente alta para endotoxinas, complicando el uso de los procedimientos rutinarios para la despirogenización. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar métodos para despirogenización de polímeros de PHA, particularmente cuando son producidos por fermentación de bacterias gram negativas.

5 Incluso aparte del asunto de la pirogenicidad, permanece una necesidad de desarrollar polímeros biodegradables adicionales para el uso *in vivo*, particularmente polímeros con las propiedades físicas y químicas alternativas. Estas propiedades incluyen las características relevantes para facilitar el procesamiento, tanto como la disponibilidad para el uso final. Una propiedad física importante para el procesamiento de los polímeros es el punto de fusión o la temperatura de transición de vidrio de estos materiales. Los PHB, PHBV (0-24%V), PGA y PLGA, por ejemplo, se ablandan solamente a temperaturas relativamente altas, por encima de 136°C. Esta alta temperatura puede ser una desventaja en la fabricación si los polímeros que son combinados al fundirse con otros componentes sensibles al calor. Es una ventaja la de tener una clase de PHAs que tiene puntos de fusión a temperaturas de transición del vidrio por debajo de 136°C para el uso en aplicaciones biomédicas. Además, muchos PHAs son solamente solubles en los solventes clorados potencialmente tóxicos. Por tanto, hay una necesidad de desarrollar PHAs de baja fusión que pueden estar fundido y procesados a temperaturas bajas y/o pueden ser disueltos en general en solventes no tóxicos aceptables. Sin embargo, actualmente no hay ninguna fuente comercial para materiales de polihidroxicanoato con estas propiedades.

Otras propiedades tales como las propiedades mecánicas y térmicas, la densidad y la cristalinidad, es también de interés. Estas propiedades pueden ser modificadas mezclando o combinando PHAs con otros materiales, o cambiando la composición de PHA. Los PHAs comercialmente disponibles, PHB y PHBV, solamente tienen usos limitados. Otros PHAs pueden ser usados para aplicaciones muy diferentes. Por ejemplo, la adición para romper PHBV está en un rango aproximadamente de 8 a 42%, mientras que la misma propiedad para el polihidroxiocanoato (PHO), el PHA de baja fusión, es aproximadamente 380% (Gagnon, *et al.*, *Rubber World*, **207**: 32-38 (1992)). De forma similar, el PHBV tiene un Modulus Young's entre 1,000 y 3,500 MPa y una fuerza de tensión entre 20 y 31 MPa, por lo contrario el PHO que tiene Modulus Young's de 8 MPa y una fuerza de tensión de 9 MPa (Gagnon, *et al.*, *Rubber World*, **207**: 32-38 (1992)). Estas propiedades y otras conducen a los PHO que están clasificados como un elastómero termoplástico (Gagnon, *et al.*, *Rubber World*, **207**: 32-38 (1992)). El entrecruzamiento de grupos covalentes no saturados de algunos polihidroxicanoato elastómeros termoplásticos han sido reportados (Gagnon, *et al.*, *Polymer*, **35**: 4358-67 (1994)), aunque el uso de los polímeros para preparar dispositivos médicos no ha sido descubierto. Sería útil desarrollar PHAs biocompatible de baja fusión que contienen grupos que pueden ser modificados covalentemente, o que pueden ser modificados posteriormente para exponer grupos funcionales que puedan ser derivados, para el uso en dispositivos médicos preparados.

35 Por lo tanto, es objeto de esta invención proporcionar polímeros de polihidroxicanoato que tienen la mayoría del pirogeno eliminado, para el uso en aplicaciones biomédicas.

Es otro objeto de esta invención proporcionar tales polímeros de polihidroxicanoato biocompatible con bajo punto de fusión y/o solubilidad en solventes no tóxico, no halogenados.

40 Es otro objeto de esta invención proporcionar tales polihidroxicanoatos que tienen propiedades deseables para el uso en una variedad de aplicaciones biomédicas, como la entrega de medicamento, ingeniería de tejido, imágenes médicas, y la fabricación de prótesis, stents, y capas.

45 Es un objeto adicional de esta invención que proporciona los métodos para hacer dispositivos biomédicos que usan tales polímeros de polihidroxicanoato.

Sumario de la invención

50 Fuera del aspecto de la presente invención se proporciona un conductor biocompatible médico de acuerdo con la reivindicación 1.

Un aspecto adicional es que se provee un método para producir una composición de polihidroxicanoato biocompatible de acuerdo con la reivindicación 2.

55 Un aspecto adicional es que se proporciona un polihidroxicanoato de acuerdo con la reivindicación 33.

Los Polihidroxicanoatos (PHAs) desde los cuales ha sido eliminado el pirogeno se proporcionan para el uso en numerosas aplicaciones biomédicas, incluyendo los PHAs que han sido modificados químicamente y que aumentan las propiedades físicas y/o químicas, para apuntar ó modificar la biodegradabilidad o eliminación por el sistema retículo endotelio (RES). Los métodos para despirogenizar los polímeros PHA preparados por procesos de fermentación bacterianas son también proporcionados, en el que los pirogenos son eliminados de los polímeros sin afectar desfavorablemente las estructuras químicas inherentes y las propiedades físicas de los polímeros. Los PHAs con las características de procesamiento ventajosas, también se describen e incluyen los puntos de fusión bajos y/o solubilidad en solventes no-tóxico. PHAs se suministran apropiadamente para el uso en las aplicaciones *in vivo* como en revestimiento de tejido, stents, suturas, tubos, huesos y otras prótesis, que el hueso o tejido se revisten de cemento, dispositivos de regeneración de tejido, apósitos de herida y de entrega medicamento, para los usos diagnósticos y profilácticos. Las propiedades que son seleccionadas para degradabilidad de la inclusión, la elasticidad, la inclusión

de grupos funcionales o grupos derivatizados, que pueden ser usados por turno para enlazar agentes que centran los blancos, y la bioadhesión.

Descripción detallada de la invención

Polihidroxiálcanoatos biocompatibles (PHAs) son proporcionados en el que las endotoxinas, presentes debido al proceso por el que son hechos los PHAs, es eliminado sin el daño para la composición o la estructura del polímero. En una realización preferida, los polímeros tienen puntos de fusión o temperaturas de transición del vidrio menor que 136°C y/o es soluble en los solventes no halogenados no-tóxicos.

I. Polihidroxiálcanoatos

Algunos tipos de polihidroxiálcanoatos son formados en la naturaleza por varios organismos en respuesta al estrés ambiental. Estos PHAs pueden ser divididos en tres grupos en general de acuerdo con la longitud de sus grupos ramificados y sus vías respectivas de biosíntesis. Los grupos ramificados relativamente pequeños son los ácidos hidroxil de C₃₋₅, mientras que los grupos ramificados relativamente largos son ácidos de hidroxil de C₆₋₁₄.

Existen tres tipos principales de PHAs que tiene lugar naturalmente. El primer tipo incluye solamente unidades monoméricas relativamente pequeñas del ácido hidroxil. El segundo tipo incluye ambas unidades monoméricas relativamente pequeñas y relativamente largas del ácido hidroxil. El tercer tipo incluye solamente unidades monoméricas relativamente largas del ácido hidroxil. Aquellos con grupos ramificados pequeños, tales como polihidroxibutirato (PHB), un homopolímero de unidades R-3-ácido hidroxibutírico (R-3HB), son materiales altamente termoplásticos y cristalinos (*Lemoigne and Roukheldman, Annales des fermentations*, **5**: 527-36 (1925)). Los PHAs que contienen las unidades de R-3HB pequeñas aleatoriamente polimerizada con unidades de grupo ramificados más largos del ácido hidroxil fue primeramente reportado a comienzos de los setentas (*Wallen and Rohwedder, Environ. Sci. Technol.*, **8**: 576-79 (1974)). Varios microorganismos que producen específicamente copolímeros R-3HB con estas unidades del ácido hidroxil de grupo ramificado más largo que son bien conocidos y que pertenecen a este segundo grupo (*Steinbüchel and Wiese. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**: 691-97 (1992)). En los comienzos de 1980's, un grupo de investigación en Holanda identificando el tercer grupo de PHAs, que contiene predominantemente grupo ramificado más largo del ácido hidroxil (*De Smet, et al., J. Bacteriol.*, **154**: 870-78 (1983)).

Los PHAs pueden constituir hasta el 90% del peso de células seca de bacterias, y se encuentra como gránulos discretos dentro de las células bacterianas. Estos gránulos de PHA se acumulan en respuesta a la limitación de nutrientes y sirven como fuente de reserva de energía y carbono. Vías distintas son usadas por microorganismos para producir cada grupo de estos polímeros. Una de estas vías es conducida a los polihidroxiálcanoatos de grupo ramificados pequeños (SPGPHAs) que involucran tres enzimas: tiolasa, reductasa, y PHB sintetasa (a veces llamada polimerasa). Usando esta vía, el homopolímero PHB se sintetiza por la condensación de dos moléculas de acetil-Coenzima A para dar acetoacetil-coenzima A, seguida por la reducción del intermediario a R-3-hidroxibutiril coenzima A, y la siguiente polimerización. La última enzima en esta vía, nombrada sintetasa, tiene una especificidad de sustrato que puede acomodar unidades monoméricas de C₃₋₅, incluyendo las unidades R-4-ácido hidroxil y el R-5-ácido hidroxil. Esta vía biosintética se encuentra, por ejemplo, en la bacteria *Zoogloea ramigera* y *Alcaligenes eutrophus*.

La vía biosintética que se usa hace el tercer grupo de PHAs, polihidroxiálcanoatos de grupo ramificado largo (LPGPHAs), todavía en parte es desconocido. Sin embargo, es muy corriente pensar que las unidades monoméricas de hidroxilacil conducidas para los LPGPHAs son obtenidas por el α -oxidación de ácidos grasos y la vía de ácidos grasos. Los sustratos R-3-hidroxilacil-coenzima resultan de estas rutas y son polimerizados por PHA sintetasas (a veces llamada polimerasas) que tienen especificidades de sustrato prefiriendo las unidades monoméricas más grandes en el rango de C₆₋₁₄. LPGPHAs son producidos, por ejemplo, por *Pseudomonads*.

El segundo grupo de PHAs que contiene ambas unidades de monómeros de R-3HB tanto pequeño como grupos ramificados más largos que se creen poder utilizar en ambas vías para proporcionar los monómeros del ácido hidroxil. El último es polimerizado por PHA sintetasa capaz de aceptar estas unidades.

Apenas 100 tipos diferentes de PHAs han sido producidas por métodos de fermentación (*Steinbüchel and Valentin, FEMS Microbiol. Lett.*, **128**: 219-28 (1995)). Un número de éstos PHAs contienen grupos ramificados funcionalizados como ésteres, dobles enlaces, alcoxi, aromáticos, halógenos, y grupos hidroxil. Los sistemas transgénicos para producir PHAs tanto en microorganismo como en plantas, tanto como los métodos enzimáticos para la síntesis de PHA, son revisados por *Williams and Peoples, CHEMTECH*, **26**: 38-44 (1996).

Dos PHAs que pertenecen al primer grupo, polihidroxibutirato (PHB) y polihidroxibutirato co-valerato (PHBV), han sido estudiados exhaustivamente. El PHBV es un copolímero de unidades R-3HB con 5-24% R-3-ácido hidroxilvalerico (R-3HV), y que es conocido comercialmente como Biopol™ (proporcionado por *ICI/Zeneca*). Estos polímeros son materiales termoplásticos naturales que pueden ser revelados usando la tecnología convencional de polímero y que tiene propiedades útiles industrialmente, como biodegradabilidad en ambientes de suelos y marina y buenas propiedades de barrera. Estos son caracterizados por puntos de fusión en el rango de 130 a 180°C, y ampliaciones para romper de 8 a 42% (ver *Zeneca Promotional Literature*, Billingham, UK 1993).

ES 2 285 770 T3

1. Fórmulas de polímeros

Los PHAs descritos aquí pueden ser en forma de homopolímeros, copolímeros de bloque, o copolímeros aleatorios. Los polímeros biocompatibles son definidos como aquellos polímeros que resultan de la reacción mínima del tejido cuando se implanta en tejido vascularizado. Como se usa aquí, los polímeros biocompatibles son aquellos que no se produce una respuesta aguda inflamatoria cuando se implanta dentro del músculo de un animal tal como un ratón.

Los polímeros también son caracterizados por tener bajos niveles de endotoxinas. Preferentemente, los PHAs son materiales muy puros, con pureza que excede el 95%, preferentemente excede más del 98%. Los PHAs pueden ser purificados por extracción con o precipitación desde soluciones acuosas, solventes orgánicos, fluidos supercríticos, o combinaciones de las mismas.

El peso molecular de los polímeros es preferentemente hasta 10^7 , y, más preferentemente, entre 10,000 y 10,000,000 Daltons. Los PHAs contienen entre 100 y 100,000, preferentemente entre 100 y 30,000 unidades de la siguiente fórmula:



en el que n es un entero, por ejemplo, entre 1 y 15, preferentemente entre uno y cuatro; y en el que son seleccionados por separado desde hidrógeno, metil, C_{2-15} lineal, ramificado o alquilo cíclico, alquenilo o grupos alquinilo, grupos alcarilo, grupos aralquilo, grupos heteroalquilo, grupos heteroarilo, grupos hidroxil, grupos tiol, disulfuros, grupos éter, grupos tioléter, grupos éster, grupos ácido carboxílico, grupos amina, grupos amida, halógenos, nitrógeno, radicales sustituidos R_1 , R_2 , R_3 , y R_4 ; y/o radicales sustituidos de oxígeno.

Unidades monoméricas apropiadas incluyen hidroxibutirato, hidroxivalerato, hidroxihexanoato, hidroxihexanoato, hidroxioctanoato, hidroxinonanoato, hidroxidecanoato, hidroxoundecanoato, y unidades hidroxidodecanoato. PHAs incluye monómeros y polímeros y pueden ser usados derivados de 3-hidroxiácidos, 4-hidroxiácidos y 5-hidroxiácidos. PHAs representativos se describen en *Steinbüchel, A y Valentin, H.E., FEMS Microbiol., Letter, 128: 219-28 (1995)*.

PHAs preferidos tienen puntos de fusión o temperaturas de transición de vidrio menor que 136°C . Estos materiales son referidos como "PHAs de baja fusión". Los PHAs de baja fusión excluyen el homopolímero, polihidroxibutirato (PHB), y los copolímeros comerciales del ácido R-3-hidroxibutírico y del ácido hidroxivalerico (PHBV) específicamente con contenido de valerato en el copolímero entre 0 y 24%.

Aunque se describe aquí principalmente con referencia a los polímeros de polihidroxialcanoato, se entiende que estos polímeros pueden ser mezclados con otros polímeros, y/o co-polimeriza con monómeros u otros polímeros para formar copolímeros de polihidroxialcanoato. Los ejemplos de otros polímeros particularmente adecuados para las aplicaciones biomédicas que incluyen polímeros biodegradables como los ácidos polihidroxi preparados del ácido poliláctico, el ácido poliglicólico, y copolímeros de estos, policarbonatos, poliortoésteres, polianhidridos, polifosfanos, ácidos poliamino, las proteínas, y polisacáridos. El término "Polihidroxialcanoato" se refiere a polímeros de polihidroxialcanoato, mezclas, y copolímeros, a menos que se diga lo contrario.

2. Preparaciones de PHAs

Los PHAs pueden estar preparados desde una fuente biológica tales como microorganismos que producen naturalmente los PHAs o que pueden ser producidos PHAs por manipulación de las condiciones de cultivos y materias primas, o microorganismos o un organismo más alto como una planta, la que ha sido manipulada genéticamente con el propósito de producir PHAs.

Los métodos que pueden ser usados para producir polímeros PHA desde microorganismos que producen naturalmente polihidroxialcanoatos se describen en La patente de los EE.UU 4.910.145 para *Holmes, et al.; Byrom, D. "Miscellaneous Biomaterials"*, en *Byrom D. Ed., "Biomaterials"* Macmillan Publishers, London, **1991**, pp. 333-59; *Hocking, P.J. and Marchessault, R.H. "Biopolyesters"*, *G.J.L. Griffin, ed., "Chemistry and Technology of biodegradable Polymers"*, Chapman and Hall, London, 1994, pp. 48-96; *Holmes, P.A., "Biologically Produced (R)-3-hidroxialcanoate Polymers and Copolymers"*, in *D.C. Bassett Ed., "Developments in Crystalline Polymers"*, Elsevier, London, Vol. **2, 1988**, pp. 1-65; *Lafferty et al., "Microbial Production of Poly-b-hydroxybutyric acid"*, *H.J. Rehm and G. Reed, Eds., "Biotechnology"*, Verlagsgesellschaft, Weinheim, vol. **66, 1988**, pp. 135-76; *Müller and Seebach, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32: 477-502 (1993)*.

Los métodos para producir PHAs en organismos naturales o manipulados genéticamente son descritos por *Steinbüchel, A "Polihidroxialcanoic Ácid"*, en *D. Byrom editor, "Biomaterials"*, editores Macmillan, Londres, **1991**, pp. 123-213; *Williams and people, CHEMTECH, 26: 38-44, (1996)*; *Steinbüchel and Wiese, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 691-97 (1992)* La patente de los EE.UU 5.245.023; 5,250,430; 5,480,794; 5,512,669; 5,534,432 para *Pople and Sinskey; Agostini, D.E. et al., Polym. Sci., Parte A-1, 9: 2775-87 (1971)*; *Gross, R.A. et al., Macromolecules, 21: 2657-68 (1988)*; *Dubois, P.I. et al., Macromolecules, 26: 4407-12 (1993)*; *Le Borgne, A y Spassky, N., Polymer, 30: 2312-19 (1989)*; *Tanahashi, N. Y Doi, Y., Macromolecules, 24: 5732-33 (1991)*; *Hori, Y.M. et al., Macromolecules, 26: 4388-90 (1993)*; *Kemnitzner, J.E. et al., Macromolecules, 26: 1221-29 (1993)*; *Hori, Y.M. et al., Macromolecules, 26: 5533-*

ES 2 285 770 T3

34 (1993); Hocking, P.J. y Marchessault, R.H., *Polym. Bull.*, **30**: 163-70 (1993); Xie, W et al., *Macromolecules*, **30**: 6997-98 (1997), y Hubbs, et al La patente de los EE.UU 5.563.239.

Los PHAs preparados usando otros métodos de sistemas bacterianos que normalmente no contienen pirógenos, y necesitan ser despirógenizados, por consiguiente consecuencia. Los pirógenos presentes en los sistemas de fermentación bacterianos son generalmente endotoxinas, aunque otras toxinas pueden estar también presentes particularmente en sistemas bacterianos gram positivos y también pueden estar presentes en sistemas de producción alternativos.

Los PHAs también pueden estar preparados usando síntesis química, por ejemplo, polimerización de monómeros de β -lactona vía la apertura del anillo usando varios catalizadores o iniciadores como aluminóxanos, distanóxanos, compuestos alcoxi-zinc o alcoxi aluminio (ver Agostini, et al., *Polym. Sci.*, Parte 1-A, **9**: 2775-87 (1971); Gross, et al., *Macromolecules*, **21**: 2657-68 (1988); y Dubois, et al., *Macromolecules*, **26**: 4407-12 (1993)); o vía condensación de polimerización de ésteres (ver Hubbs, et al, por ejemplo La patente de los EE.UU 5.563.239, y referencias aquí). Los investigadores también han desarrollado métodos químico-enzimáticos para preparar PHAs. Para el ejemplo, Xie, et al., *Macromolecules*, **30**: 6997-98 (1997) reporta sobre una polimerización de apertura del anillo β -butirolactona por lipasas termofílicas para producir PHB.

3. Modificación de PHAs

Los polímeros PHA pueden contener o estar modificados por incluir otras moléculas, tales como compuestos bioactivos y detectables, agentes de superficie activo, otros polímeros degradables o no degradables, y materiales usados para modificar las propiedades mecánicas de los PHAs, como plastificantes, rellenos, y atador. Las modificaciones pueden involucrar adherencia de moléculas de PHAs covalente o no covalente. Las modificaciones también podrían incluir el tratamiento químico o físico de los PHAs, que pueden estar seguidas por adheridos de moléculas covalente o no covalente. La modificación covalente de los PHAs puede aumentar su utilidad para aplicaciones biomédicas. Los grupos funcionales nuevos introducidos pueden servir como sitios de adherencia covalente, por ejemplo, para medicamentos, péptidos adheridos a células y factores de crecimiento.

Los PHAs funcionalizados son polihidroxialcanoatos que contienen grupos funcionales reactivos. Los grupos funcionales reactivos, como grupos carboxílico y amino, dan nuevas propiedades al polímero y suministran sitios para su derivación covalente. Estos grupos pueden ser introducidos en los PHAs de varias maneras. Por ejemplo monómeros funcionalizados (o funcionales) puede ser incluidos en los PHAs durante la producción del polímero. Las condiciones de fermentación controladas han sido usadas para producir los PHAs con una variedad de grupos funcionales en la cadena lateral como alquenos, halógenos, ésteres y grupos alquil ramificados. Después del aislamiento tratamientos químicos pueden convertir estos grupos funcionales en una variedad de otros, como grupos carboxílico, amino, y carbonilos. Recientemente Tillman ha preparado cantidades de gramos de bromo PHAs y alqueno funcionales.

Otro enfoque para funcionalizar PHAs es modificar químicamente o físicamente el polímero progenitor aislado (funcionalizado). La modificación del PHA después de la producción, la purificación, y el aislamiento es particularmente atractiva por varias razones. Los sistemas de fermentación para la producción de PHAs no funcionalizados son normalmente más fácil, más barato, y más lucrativos, es por esto obvio la necesidad para monómeros funcionalizados costosos. La purificación del polímero no funcionalizado no es complicada por la presencia de grupos funcionales. El grado de la modificación del polímero puede ser controlado en un procedimiento de derivatización después de que el polímero es aislado y purificado.

La espina dorsal del poliéster de un PHA es el sitio potencial para la modificación a través de aminólisis o de reacciones de transesterificación. Estas reacciones pueden ser llevadas a cabo sobre el polímero en grandes cantidades, o dirigida de forma selectiva a la superficie de un relleno de PHA. La modificación de la superficie tiene la ventaja significativa en que solamente la superficie del material es modificada, mientras que la gran modificación del polímero resulta en un material modificado uniformemente. Las modificaciones que parten del núcleo central de poliéster son esperadas que produzcan división aleatoria de la cadena, y deben resultar en una reducción importante del peso molecular (MW) del polímero, dependiendo del nivel de la modificación del polímero. Como un ejemplo de este enfoque, las películas de PHO han sido modificadas con moléculas bioactivas, como biotina, para producir superficies en la que unan conjugados estreptavidina-HRP (ver el Ejemplo 17 que sigue).

El grupo lateral ramificado es también un sitio potencial para la modificación de PHAs. Los tratamientos químicos o físicos que generan especies reactivas, como radicales libres, modificarán la cadena lateral ramificado. Mientras el ataque al nodo central del polímero también puede ocurrir, las condiciones para la modificación selectiva de la cadena lateral ramificada deben ser alcanzables. El tratamiento de gas plasma es un ejemplo de este tipo de modificación. Dependiendo del tipo de gas usado para generar el plasma, este tipo de tratamiento puede presentar una variedad de nuevos grupos funcionales.

El gas plasma es un gas ionizado, que esta relacionado normalmente con temperaturas sumamente altas. El gas plasma caliente, por ejemplo, es formado sobre el sol como resultado de la fusión nuclear. Sin embargo gas plasma frío puede ser formado a temperaturas bajas que usan condiciones de poca presión y correcto tipo de energía. Las lámparas fluorescentes son un ejemplo. Este tipo de gas plasma es útil para la modificación de los PHAs. La energía usada para crear el plasma, como la potencia de frecuencia de radio o descarga eléctrica, quita electrones del gas, produciendo electrones libres, iones de gas, y moléculas excitadas. Cuando los electrones se recombinan con los iones

y las moléculas excitadas, un “Plasma” caliente es producido. Aunque los iones y las moléculas excitadas pueden tener un grado muy alto de la energía cinética (y por lo tanto, alta temperatura), la temperatura del gas granel es relativamente baja (cercana a la temperatura ambiente). Estos iones “Excitados” y moléculas afectan la superficie, fragmentan su estructura molecular. Los eventos de recombinación modifican la superficie a nivel molecular, forma nuevos enlaces químicos así y presenta nuevos grupos funcionales. El tipo de grupo funcional (por ej. amino, carboxil, carbonil, sulfonado, fluoruro, o hidroxil) que los resultados dependen de la naturaleza del gas plasma y las condiciones del tratamiento.

Los PHAs pueden ser tratados con un reactivo químico para partir las conexiones de éster en el nodo central del polímero. Esto resulta en la formación de grupos hidroxil libres y de ácido carboxílico que cambian la carga del polímero tanto como que proporcionan grupos funcionales reactivos para la modificación siguiente y el adherencia de moléculas. El tratamiento también puede promocionar o reducir la adherencia celular del polímero por crecimiento celular o de tejido. Los reactivos que pueden ser usados para partir el nodo central del polímero que incluye el agua, bases, ácidos, nucleófilos, electrofilos, el plasma, y los iones de metal. Hidrólisis de los ésteres también puede ser llevado a cabo enzimáticamente usando ésterasas. Los polímeros también pueden ser partidos por irradiación y/o aplicación del calor.

Estas modificaciones pueden ser llevado a cabo homogéneamente en solución. Sin embargo, si el polímero está en una forma sólida (por ej. partículas o una película), entonces tales modificaciones pueden estar limitadas principalmente a la superficie del polímero. Este método permite que las propiedades de superficie sean modificadas sin modificar las propiedades mecánicas en conjunto del polímero adyacente, por lo tanto, los dispositivos se formaron de los polímeros.

Ciertos PHAs con grupos funcionales ramificados también pueden ser modificados por medios químicos y físicos. Tales modificaciones pueden cambiar las propiedades de polímero, por ejemplo, o admitir la adherencia siguiente de otras moléculas o células. Las modificaciones exactas que pueden ser hechas varían de acuerdo con la naturaleza del grupo funcional y serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, grupos funcionales ramificados como ésteres pueden ser cambiados por ácidos, y los grupos no saturados pueden ser oxidados a dioles, a alcoholes, a aldehídos, y ácidos. Los reactivos para modificar grupos funcionales ramificados pueden ser seleccionados fácilmente por aquellos expertos en la técnica.

Especies bioactivas también pueden ser fijadas a los extremos de los polímeros, covalentemente o iónicamente, o mezclando las especies bioactivas con el material polimérico. El apareamiento químico involucra los grupos terminales hidroxil y carboxil u otros grupos reactivos que pueden estar presentes sobre las moléculas que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los PHAs también pueden ser modificados no covalentemente. Por ejemplo, los PHAs incluyen un grupo de ácido carboxílico, que puede formar un enlace iónico con grupos de amina presentes sobre los materiales como proteínas y péptidos, polilisina, y otros materiales catiónicos. Tales modificaciones pueden cambiar las propiedades de superficie por ejemplo la hidrofobicidad y la carga de la superficie de los polímeros, Ejemplos de moléculas que pueden modificar no covalente los PHAs son agentes de tensoactivos y lípidos.

4. *Modificación de superficie de PHAs*

Las modificaciones de la superficie, en que se introducen nuevos grupos funcionales, permiten fijar selectivamente agentes bioactivos específicos. Después de la producción, aislamiento, y purificación del PHA, el tratamiento de la superficie química o de las condiciones del tratamiento de gas plasma pueden ser controladas para cambiar el nivel de la modificación. Es también posible preparar gradientes de modificación de las superficies, que tienen en cuenta las preparaciones de gradientes de concentración de compuestos de concentración bioactiva sobre una superficie. Esto puede ser útil para controlar la regeneración de tejidos o los otros procesos que son afectados por la concentración de agentes específicos.

Una ventaja significativa de un tratamiento de plasma frío es que afecta todas las superficies expuestas, como se opone “línea del visor” a tratamientos de plasma o tratamiento químico de superficie. Adicionalmente, el tratamiento de plasma evita los problemas, como “estar mojado” y residuos, relacionados con los tratamientos químicos. Los objetos por lo tanto, tridimensionales pueden ser tratados después de que son formados o fabricados por lo demás, minimizando los problemas que pueden surgir durante el procesamiento de PHAs funcionalizado. Una limitación del gas plasma es que no es práctico para los materiales finos, o suspensiones líquidas, debido a las condiciones de poca presión del tratamiento.

Aplicaciones típicas para gas plasma involucran la limpieza de superficie, la modificación de la superficie, y la deposición del polímero. Estos procesos usan el mismo tipo de plasma, pero difieren en el efecto sobre la superficie. Los procesos de limpieza son diseñados para retirar todo material orgánico de un material inorgánico para producir una superficie “Atómicamente limpia”. La modificación de superficie del “Grabado” se usa para modificar las propiedades de superficie de un relleno de forma selectiva mientras se afecta la mayor parte del material. La deposición del polímero es llevada a cabo para introducir una capa de superficie uniforme en un objetivo sacando a la luz una superficie plasma activada por el reactivo de polímeroizable. Los procedimientos de modificación de superficie se esperan que sean más útiles para la derivatización de PHAs.

Gas Plasma de amoníaco y oxígeno pueden ser empleados para introducir nuevos grupos carboxílico o amino, respectivamente, en el polímero. Se cree que el plasma de oxígeno funciona como un oxidante. Estos grupos funcionales pueden ser utilizados como sitios para la adherencia covalente del agente bioactivo. Las películas de PHO han sido activadas usando un tratamiento de gas plasma, y fueron posteriormente derivatizado por adherencia covalente del agente bioactivo (ver el Ejemplo 18 que sigue).

En el campo biomédico los tratamientos de gas plasma fríos son usados para incrementar la biocompatibilidad, aumentar la adherencia de la célula, inmovilizar medicamentos, reducir la reacción alérgica, despirogenizar y esterilizar materiales o dispositivos. Los tratamientos pueden ser adaptados para las necesidades específicas de la aplicación.

5. Métodos para eliminar pirógenos de los PHAs

Los polímeros son purificados para reducir niveles de pirógeno menores que 20 unidades de endotoxinas por gramo antes o después de la fabricación de los polímeros en las diferentes formas físicas, aunque es preferible purificar los materiales antes de la fabricación. En la forma de látex, el polímero puede ser sometido a dos o a más tratamientos diseñados para reducir niveles de pirógeno. Si es necesario, la forma sólida seca puede ser reconstituido como un látex usando los procedimientos que describen, por ejemplo, *Koosha, F. Ph.D. Dissertation, 1989*, Univ. Nottingham, UK, *Diss. Abstr. Int. B 51:1206 (1990)*. Esto puede ser preferido, particularmente cuando es deseable obtener un PHA con muy bajo niveles de endotoxinas para una aplicación de ingeniería de tejido. El látex de PHA podría estar liofilizado si se desea para producir una forma sólida. Los dispositivos preparados de los PHAs tienen menos de 20 unidades de endotoxinas.

La depirógenización involucra el tratamiento con un agente oxidante con el calor. El agente oxidante debe ser seleccionado de forma tal que no degrade significativamente o modifique la naturaleza física o química del PHA de forma adversa. Preferentemente, el agente oxidante tiene buena solubilidad en las soluciones acuosas. Un agente oxidante preferido es el peróxido de hidrógeno. El látex podría contener partículas de cualquier tamaño, aunque las partículas son preferentemente nanopartículas y/o micropartículas. Las partículas de látex podrían ser cristalinas o amorfas, pero son preferentemente amorfas.

Las formas sólidas de los PHAs, como polvos, películas, y pastillas, pueden ser despirogenizadas disolviendo el PHA en un solvente orgánico apropiado y luego se llevar a cabo un paso de depirógenización apropiado. La disolución de PHA da como resultado despirogenizar con un agente oxidante y calor. Preferentemente, el agente oxidante tiene buena solubilidad en el solvente orgánico usado para disolver el PHA, y no se degrada significativamente o modifica la naturaleza física o química del PHA de forma adversa. Un agente oxidante preferido es un peróxido orgánico. Particularmente los agentes oxidantes preferidos para el uso en solventes orgánicos son peróxidos aromáticos como peróxido de benzoilo. Los solventes preferidos tienen buena solubilidad para el PHA específico, y la buena estabilidad para el agente oxidante.

Si es necesario, los polímeros pueden ser despirogenizados usando combinaciones de los tratamientos de oxidación acuosas y sustancia orgánica basadas en un látex de PHA, por ejemplo, puede ser tratado con peróxido de hidrógeno, y luego sometido a un segundo tratamiento en una solución orgánica con un peróxido orgánico más adelante para reducir niveles de endotoxinas.

Mientras en general es preferido que un PHA se despirogenice antes de la fabricación de un injerto de ingeniería de tejidos o un stent, los métodos descritos también pueden ser aplicados completos o parcialmente para despirogenizar un injerto de ingeniería de tejidos de PHA fabricado o un stent.

Tratamientos físicos, como el calor y la radiación pueden causar la degradación del polímero; los otros tratamientos químicos, como Hidrólisis y alquilación, pueden modificar la estructura de polímero; y, filtración y técnicas de afinidad son inadecuadas para lo depirógenización de materiales de látex, o deben superar la alta afinidad del PHA por endotoxinas.

II. Métodos para fabricación de dispositivos médicos

Los polímeros son útiles para preparar una variedad de dispositivos médicos, que incluyen implantes biodegradables. Los polímeros biodegradables presentan una biodegradación relativamente lenta, por ejemplo, teniendo una vida media *in vivo* entre tres y seis meses preferentemente. Los polímeros tienen un punto de fusión relativamente bajo a la temperatura de transición del vidrio preferentemente, por ejemplo, menor que 136°C, y/o es soluble en solventes no-tóxico, no-halogenados, para la facilidad de procesamiento.

Cuando los PHAs despirogenizados se implanta en el cuerpo, estos materiales muestran muy poca, alguna reacción inflamatoria aguda o cualquier reacción de tejidos adversa. No hay reacción inflamatoria importante o formación de cicatriz del tejido. El reclutamiento de células inflamatorias es mínimo. El examen Histológico de los dispositivos implantados demuestra que los materiales son esencialmente inertes. Por lo tanto, dispositivos construidos con PHAs pueden ser implantados con una mínima reacción adversa sobre el tejido circundante. La liberación de productos de degradación del ácido hidroxí de los materiales implantados es lenta y normalmente bien tolerada por el cuerpo. Por lo tanto, se espera que los PHAs mantengan sus propiedades materiales por cuestión de meses y se degradarán al final a materiales no tóxicos.

Dispositivos preparados de PHAs pueden ser usados para una amplia cantidad de aplicaciones médicas diferentes. Los ejemplos de tales aplicaciones incluyen liberación controlada de la entrega de medicamento, injertos de ingeniería de tejido, la encapsulación de células, entrega de dianas, recubrimientos biocompatibles; implantes biocompatibles; regeneración controlada de tejido, apósitos de herida, dispositivos ortopédicos, prótesis y cemento óseo (incluyendo adhesivos y/o artículos de relleno estructurales), y en los diagnósticos.

Los PHAs se pueden encapsular, mezclar con, o estar acoplado iónicamente o covalentemente a una variedad de agentes terapéuticos y profilácticos o de diagnósticos. Una gran variedad de materiales biológicamente activos pueden ser encapsulados o incorporados, para la entrega a un sitio por el polihidroxialcanoato, o para dar las propiedades al polímero, como bioadhesión, adherencia de la células, aumento del crecimiento de células, inhibición del crecimiento bacteriano, y prevención de la formación de coágulo.

Los ejemplos de agentes terapéuticos y profilácticos apropiados incluyen compuestos inorgánicos y orgánicos sintéticos, proteínas y péptidos, polisacáridos y otros azúcares, lípidos, y ADN y secuencias de ácido nucleico de ARN que tienen actividades terapéuticas y profilácticas o de diagnóstico. Las secuencias de ácido nucleico incluyen genes, moléculas de detección que se unen a ADN complementario para impedir la transcripción, y ribozimas. Los compuestos con un amplio rango de peso molecular pueden ser encapsulados, por ejemplo, entre 100 y 500,000 gramos o más por moles. Los ejemplos de materiales apropiados incluyen proteínas como anticuerpos, ligandos de receptor, enzimas, péptidos como péptidos para adhesión, sacáridos y polisacáridos drogas orgánicas o inorgánicas sintéticas, y ácidos nucleicos. Ejemplos de materiales que pueden ser encapsulados incluyen las enzimas, factores que coagulan la sangre, inhibidores o agentes coagulantes que disuelven el coágulo como estreptoquinasa y el activador de plasminógeno de tejido; antígenos para la inmunización; hormonas y factores de crecimiento; polisacáridos como heparina; oligonucleótidos como oligonucleótidos de detección y ribozimas y vectores retrovirales para el uso en la terapia génica. El polímero también puede ser usado para encapsular células y tejidos. Los agentes de diagnósticos representativos son agentes de detección junto a rayo X, fluorescencia, formación de imágenes por resonancia magnética, la radiactividad, ultrasonido, tomografía computarizada (CT) y la emisión de positrón tomografía (PET). Los agentes de diagnóstico ultrasonido son normalmente un gas como aire, oxígeno o perfluorocarbono.

En el caso de liberación controlada, un amplio rango de diferentes compuestos bioactivos puede ser incluido en un dispositivo de lanzamiento controlado. Éstos incluyen macromoléculas de alto peso molecular como proteínas hidrofóbicas, hidrofílicas. Estos compuestos bioactivos tampoco pueden ser incorporados covalentemente o no-covalentemente. El perfil de liberación puede ser ajustado modificando uno o más de los siguientes parámetros: la naturaleza del PHA; las propiedades del compuesto bioactivo; la naturaleza física del medicamento; y la naturaleza del dispositivo. La frase "naturaleza del PHA" se usa aquí para representar, por ejemplo, la composición, la estructura, y el peso molecular del polímero o la mezcla de polímeros, incluyendo el entrecruzamiento y la cristalinidad. La frase "propiedades del compuesto" se usa aquí para representar, por ejemplo, el peso molecular, la hidrofobicidad y la hidrofílicidad. La frase "naturaleza física del compuesto" se usa aquí para representar, por ejemplo, el tamaño de la partícula y la carga del compuesto. El compuesto bioactivo puede ser incorporado en los PHAs en un por ciento que carga entre 0,1% y 70% por peso, preferentemente entre 5% y 50% por peso. La frase "naturaleza del dispositivo" se refiere a la forma física del dispositivo, al espesor, y la forma, que pueden ser controlados por la técnica de fabricación.

Los PHAs pueden degradarse sobre un período de tiempo tanto como cinco años. La degradabilidad está en función de las propiedades del polihidroxialcanoato, como la cristalinidad y la hidrofobicidad del polímero, y la sustitución del polímero con grupos que pueden promocionar la Hidrólisis (como la copolimerización con el ácido poliláctico, que puede considerablemente reducir la degradación en varias veces), también como la forma del dispositivo. Los PHAs pueden estar en casi cualquier forma física, como un polvo, película, relleno moldeado, partículas, esferas, látex, y materiales cristalinos o amorfos. Pueden ser combinados con materiales no adicionales de PHA, por ejemplo, otros polímeros. Son apropiados para el uso en aplicaciones que requieren degradaciones lentas, biocompatibles, materiales moldeables por ejemplo, dispositivos médicos. Los ejemplos de dispositivos médicos que pueden ser preparados de los polímeros incluyen varillas, tornillos de hueso, alfileres, suturas quirúrgicas, stents, dispositivos de ingeniería de tejido, y dispositivos de entrega de medicamento y apósitos de heridas.

Los implantes degradables fabricados con los PHAs pueden ser usados en un amplio rango de aplicaciones ortopédicas y vasculares, la ingeniería de tejidos la regeneración de tejidos controlada, y aplicaciones actuales que sirven para otros elastómeros termoplásticos (*McMillin, Rubber Chem Technol.*, **67**: 417-46 (1994)). Los implantes pueden incluir otros factores para estimular la reparación y la curación. Los dispositivos preferidos son tubos apropiados para el paso de fluidos corporales. Estos dispositivos pueden ser modificados con los factores de adherencia de células, los factores de crecimiento, los péptidos, los anticuerpos y sus fragmentos.

1. Métodos generales de preparar dispositivos médicos

Los métodos preferidos de fabricación de dispositivos médicos incluyen el vaciado del solvente, proceso de ablandamiento, extrusión, inyección y moldeado por compresión, y secado. Las partículas son preferentemente preparadas directamente de un proceso de fermentación que esta basado en una técnica de evaporación del solvente, técnica de emulsión doble, o por microfluidización, usando métodos disponibles en la técnica. (*Koosha, F. Ph.D. Dissertation, 1989, Univ. Nottingham, UK., Diss. Abstr. Int. B 51:1206 (1990); Bruhn, B.W and Mueller, B.W. Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 18:668-69 (1991); Conti, B. et al., J. Microencapsulation, 9:153-166 (1992); Oga-*

wa, Y. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**:1095-103 (1988); Mathiowitz, E. and Langer, R. "Polyanhydride microspheres as drug delivery systems," M. Donbrow Ed., in "Microcapsules Nanopart. Med. Pharm." CRC, Boca Raton, Florida, 1992, Ch. 5, pp. 99-123.)

5 2. Métodos para fabricar dispositivos para curación de heridas

Los PHAs pueden ser fabricados en dispositivos apropiados para la curación de herida. Por ejemplo, materiales tejidos no fibrosos para este propósito que pueden estar preparado de polímeros que primero producen fibras de polímero, presionando los polímeros a través de una salida perforada, usando procedimientos conocidos por aquellos expertos de la técnica. Las fibras pueden ser fabricadas en una membrana porosa (material) difundiendo en un soporte sólido y sometido luego esta a un moldeado por compresión. El espesor del dispositivo es preferentemente menor que 500 μm . El dispositivo de curación de herida también puede estar preparado perforando una película o membrana usando un láser que consiga porosidad, o usar una técnica de lixiviar para preparar un material poroso. Los tamaños de poros deben ser ideales y lo suficientemente pequeños para cerrar la salida de las células y otro material de tejido. Los dispositivos de curación de herida pueden ser colocados *in vivo* para separar tejidos y estimular la regeneración de tejido.

3. Métodos de preparación de membranas porosas

Las membranas porosas incluyen los PHAs que pueden ser preparados por una variedad de métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden ser preparados fundiendo el solvente de las soluciones de polímero que contienen materiales lixiviados, y luego se lixivian a inclusiones solubles de los polímeros. Los materiales lixiviados apropiados son sales simples no tóxicas que se disuelven fácilmente en medios acuosos. La porosidad de las membranas puede ser controlada seleccionando algunos materiales lixiviados con tamaños de partículas diferentes. Después de lavar, y opcionalmente esterilizar da como resultado las membranas porosas, las membranas pueden ser incubadas en medios de cultivos de células y sembradas en células. Tales materiales pueden ser usados en la reconstrucción de tejidos.

4. Preparaciones de nano o Micropartículas

En una realización, nano o micropartículas son preparadas en que se encapsulan una o más agentes que serán entregados. Las partículas pueden ser usadas para entregar localmente o sistémicamente una variedad de agentes terapéuticos en animales que pueden ser usados para propósitos de diagnósticos. Las partículas fabricadas de PHAs y de antígenos encapsulados pueden ser usados para inmunización. Las partículas preferidas tienen tamaños de partículas de 50 μm , preferentemente partículas menores de 10 μm y son tomadas para los parches Peyer cuando se administra de forma oral, y más pequeñas si es para inyección. Los PHAs preferidos para esta solicitud son aquellos que pueden ser fabricados en dispositivos de vacunas sin reducir significativamente la inmunogenicidad del antígeno. Preferentemente, estos dispositivos incrementan la inmunogenicidad del antígeno.

40 5. Encapsulación celular

Los PHAs pueden ser usados para encapsular células. Usando procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica, las células primero pueden ser pre-recubiertos. Maysinger, *Reviews in the Neurosciences*, **6**: 15-33 (1995). Usando un procedimiento de encapsulación de partícula tal como la técnica de emulsión doble, las células pueden ser luego encapsuladas por PHAs. Ogawa, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**: 1095-103 (1988). Las células encapsuladas pueden ser implantadas *in vivo*.

6. La fabricación de injertos de PHA ingeniería de tejido

Los PHAs pueden ser fabricados en injertos de ingeniería de tejidos que se usan en un amplio rango de técnicas de procesamiento de polímero. Los métodos preferidos de fabricación de injertos de ingeniería de tejidos de PHA que incluyen la entrega de solvente, el proceso de fundir, el procesamiento de fibra, hilar/tejer, la extrusión, la inyección y la moldura de compresión, la laminación, y se lixivian el solvente y se derrite el solvente. Tales métodos son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Un método preferido de fabricar un injerto de ingeniería de tejidos de PHA supone que se usa una extrusora, como una extrusora de Brabender. Por ejemplo, esta técnica puede ser usada para preparar tubos extrudidos apropiados para la implantación en un rango de largos y tamaños.

Otro método preferido involucra la preparación de un injerto PHA no tejido de fibras. Las fibras pueden ser fabricadas desde el derretido o la solución, y procesadas en no tejido usando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Las propiedades del no tejido pueden ser adaptados por variaciones, por ejemplo, el material PHA, las dimensiones de fibra, la densidad de fibra, el espesor del material, la orientación de la fibra, y el método de procesamiento de la fibra.

Otro método preferido de preparar un injerto de ingeniería de tejidos de PHA que involucra el uso de una técnica de lixiviar partículas para la preparación de una membrana altamente porosa. La técnica supone dispersar partículas en una solución del polímero PHA, fundir la mezcla de PHA en un molde apropiado, evaporar el solvente, y disolver

ES 2 285 770 T3

las partículas afuera de la membrana. Las propiedades y las características de la membrana podrían ser variadas considerablemente modificando, por ejemplo, la naturaleza y el tamaño de las partículas, aplicando y usando tratamientos físicos y químicos diferentes durante la fabricación, y cambiar el tipo de PHA y el solvente que usaron. Las partículas apropiadas incluyen cristales de sal, proteínas como gelatina y agarosa, almidones, polisacáridos como alginatos y otros polímeros. Los diámetros de las partículas pueden estar adecuadamente entre los nanómetros y hasta 500 micras. Las membranas porosas pueden, si se desea, ser procesadas adicionalmente. Por ejemplo, estas membranas pueden ser formadas en fibra hueca.

Como una diferencia sobre la técnica de lixiviar partículas, los injertos de PHA pueden ser mezclados con partículas, y fundidos en un molde apropiado. Las partículas pueden ser luego lixiviadas para producir injertos de ingeniería de tejidos apropiados.

Otro método preferido involucra fundir o procesar un solvente y un PHA apropiado en un molde apropiado y perforando el material usando un láser y otros medios para seleccionar la porosidad deseada. También son preferidos métodos que incluyen enrollar una hoja de PHA moldeada por compresión en un lazo y sellada por calor. La hoja de PHA opcionalmente puede ser enrollada con otro material, como un segundo polímero biodegradable. Por ejemplo, el último material podría ser un no tejido del ácido poliglicólico, el ácido de poliláctico, o un copolímero de ácidos glicólicos y lácticos. Tal procedimiento debe proporcionar un tubo laminado apropiado para el uso en la ingeniería de nuevos vasos, conductos y tubos.

Los PHAs también pueden ser usados para cubrir otros injertos de ingeniería de tejido. Tales materiales podrían ser obtenidos de otros polímeros degradables. El recubrimiento puede ser llevado a cabo, por ejemplo, con una solución basada en solvente, o por la técnica de fundir, o usar un látex de PHA.

El injerto de ingeniería de tejidos también podría contener otros materiales de PHAs. Estos materiales pueden modificar las propiedades, por ejemplo, físicas y químicas. Tales materiales podrían incluir plastificantes, agentes que crean núcleos, y otros polímeros. Además, los injertos pueden ser fabricados para contener compuestos bioactivos, compuestos detectables y excipientes.

El injerto de ingeniería de tejidos también podría contener otros materiales de PHAs. Estos materiales pueden modificar las propiedades, por ejemplo, físicas y químicas. Tales materiales podrían incluir plastificantes, agentes para formar núcleos, y otros polímeros. Además, los injertos pueden ser fabricados para contener compuestos bioactivos, compuestos detectables y excipientes. Ejemplo de compuestos que pueden ser incorporados en injertos de ingeniería de tejidos de PHA que incluyen agentes antiplaquetas tales como aspirina, dipiridamol, triclopídina, anticuerpo monoclonal c7E3, integrelina™, MK-852, MK-383, RO-44-9883; agentes antitrombóticos tales como heparina, heparina bajo peso molecular, R-hirudina, hiruloga, argatroban, efegatran, péptido anticoagulante Tick, y Ppack; agentes antiproliferativos tales como angiopéptina, ciprostenol, bloqueadores de calcio, colchicina, ciclosporina, citarabina, proteínas de fusión, Iloprost, quetaserina, prednisona, y trapidil; agentes inmunosupresivos; factores inhibidores del crecimiento de tejido fibroso; factores inhibidores de crecimiento canceroso; oligonucleótidos tales como genes, y secuencias antisense; compuestos radioactivos; factores de crecimiento; sustancias que inducen tejidos; proteínas; péptidos; anticuerpos y fragmentos de anticuerpos; biofarmacéuticos; y otros agentes activos designados para promover, asistir, y sustentar crecimiento de tejido.

Los dispositivos de ingeniería de tejidos descritos aquí pueden estar sembrados con las células antes de la implantación o después de la implantación. Las células pueden ser cosechadas de una sección sana del tejido del donante, expandidas *in vitro* usando una técnica de cultivo de células, y luego sembradas en un injerto (o matriz) antes ó después de la implantación. Por otra parte, las células pueden ser obtenidas del tejido de otro donante o de líneas de células existentes.

Ejemplos de células que pueden estar sembradas en los injertos de ingeniería de tejidos se incluyen hepatocitos, células pancreáticas, células intestinales, células de uroendotelio, células epitelial, células de piel (células epidérmis), células de músculo, células de nervios, células de mesencímal, miocitos, condrocitos, adipocitos, fibromioblastos, células ectodérmicas, y células de hueso. Las células podrían estar manipuladas genéticamente. Las células elegidas son preferentemente disociadas, viables, y en suspensión antes de la aplicación al injerto. En el caso de los injertos sembrados antes de la implantación, las células deben ser suministradas con el tiempo suficiente para adherirse al polímero del injerto antes de ser implantado. Por otra parte, el dispositivo de ingeniería de tejidos de PHA puede ser implantado, prevascularizado, y luego sembrado con células, por ejemplo, la inyección.

Los PHAs pueden ser usado en aplicaciones de ingeniería de tejidos para casi cada tejido, incluyendo hígado, cartílago, riñón, pulmón, piel, corazón, vejiga, páncreas, hueso, uroepitelio, estructura suave del músculo (especialmente uréter y uretras), epitelio, tráquea, tendón, pecho, arterias, venas, válvulas de corazón, tubos gastrointestinales, trompas de Falopio, conducto de bilis, esófago, y bronquio.

Pueden ser también deseable usar los materiales de ingeniería de tejidos conjuntamente con otras terapias como la terapia de genes, la radioterapia, y las terapias que requieren localización o entrega de un agente activo. La ingeniería de tejidos puede ser usada para entregar factores expresados por células, por ejemplo, que pueden estar manipulados genéticamente, si se desea para el tratamiento de las enfermedades.

ES 2 285 770 T3

7. *Uso de PHAs para recubrir dispositivos*

Los PHAs pueden ser usados para recubrir otros dispositivos y materiales. Tales recubrimientos pueden mejorar sus propiedades para la aplicación médica, por ejemplo, mejorar su biocompatibilidad, las propiedades mecánicas, y adaptando su degradación y perfiles de liberación controlada. Los PHAs pueden ser recubiertos en otros dispositivos que se usan en la fabricación por los procedimientos descritos arriba. El espesor de la capa puede ser ajustado a las necesidades de la aplicación específica cambiando el peso de la capa o la concentración aplicada.

8. *Fabricación de Stents de PHA*

Los PHAs pueden ser fabricados en stents usando un amplio rango de las técnicas de procesamiento de polímero. Los métodos preferidos para fabricar stents de PHA incluyen la entrega de solvente, procesamiento de fundición, proceso de tejidos de la fibra, moldura por extrusión, inyección, y la moldura por compresión. Tales métodos son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Un método preferido de fabricar un tronco involucra el extrudir tubos pequeños usando, por ejemplo, una extrusora de BrabenderTM. Los tubos pueden ser hechos en un largo de longitud y tamaños. Preferentemente los tubos deben tener superficies suaves para suministrar la buena compatibilidad y quedar bien contra las paredes del vaso. Si se desea los tubos pueden ser perforados, por ejemplo, usando un rayo láser o por otros medios.

Otro método preferido involucra el enrollar una hoja de PHA moldeada por compresión en un lazo y termosellada. La hoja de PHA puede ser enrollada con otro material, opcionalmente como un segundo polímero biodegradable. El último podría ser una malla de ácido poliláctico, por ejemplo. Tal procedimiento suministra un stent laminado.

Los PHAs también pueden ser usados para recubrir materiales de stent existentes. Tales materiales podrían ser polímeros metálicos y no-degradable, o otros polímeros degradables no-PHA. Recubrimiento puede ser llevado a cabo, por ejemplo, con una solución solvente basada en, o por otra técnica de fundición, o usando un látex de PHA.

El stent también podría contener materiales aparte de PHAs. Estos materiales pueden modificar las propiedades, por ejemplo, físicas y químicas. Tales materiales podrían incluir plastificantes, agentes para formar núcleos, y otros polímeros. Además, los injertos pueden ser fabricados para contener compuestos bioactivos, compuestos detectables y excipientes. Ejemplo de compuestos que pueden ser incluidos en stent de PHA son agentes antiplaquetas tales como aspirina, dipiridamol, triclopídina, anticuerpo monoclonal c7E3, integrelinaTM, MK-852, MK-383, RO-44-9883; agentes antitrombóticos tales como heparina, heparina bajo peso molecular, R-hirudina, hirulogan, argatroban, efegatrana, péptido anticoagulante Tick, y Ppack; agentes antiproliferativo tales como angiopeptina, ciprosteno, bloqueadores de calcio, colcicina, ciclosporina, citarabin, proteínas de fusión, Iloprost, quetaserina, prednisona, y trapidil; compuestos radioactivos, oligonucleótidos tales como genes, y secuencias antisense. Además el stents de PHA también puede contener células, particularmente células manipuladas genéticamente, virus, y otros componentes terapéuticamente beneficiosos.

9. *Convertir en blancos las partículas y dispositivos de PHA*

Los PHAs pueden ser modificados para convertirse pasivamente en blancos después de la fabricación como dispositivos o partículas. Opcionalmente, las partículas podrían contener compuestos bioactivos o sustancias detectables. Los tamaños de partículas preferidos son menores que 100 μm , preferentemente menos que 15 μm . Las partículas pueden ser modificadas para mejorar el blanco y prevenir la remoción de la circulación por incorporación covalente o no covalente de moléculas adicionales. Ejemplos de moléculas que pueden ser incluidas para mejorar el blanco y prevenir la remoción de la circulación son los agentes activos de superficies, moléculas cargadas, y PEG.

Además para centrar pasivamente, los PHAs puede ser activamente centrado a un órgano en especial, a un grupo de células dentro de un órgano, o a un sitio dentro de una célula activamente. Por otra parte, un dispositivo de implante preparado de PHAs de baja fusión podría atraer activamente sustancias bioactivas, incluyendo las células. Usando los procedimientos descritos para la modificación covalente de PHAs de baja fusión y sus derivados, y esos procedimientos descritos para la fabricación de dispositivos de PHA, moléculas blancos pueden ser enlazadas a a los polímeros. Por ejemplo, secuencias blancos como péptidos y proteínas, como anticuerpos y sus fragmentos, pueden ser juntadas con ácidos carboxílicos liberados por la Hidrólisis parcial del nodo central del polímero o presente en los grupos ramificado del polímero. Otro acoplamiento químico, conocido por aquellos expertos en la técnica, puede ser usado enlazando covalentemente estas secuencias blancos y otros grupos funcionales diferentes sobre los PHAs.

Los grupos funcionales preferidos para enlazar moléculas blancos a PHAs son ácidos carboxílico, aminas, tioles, grupos alcoholes no saturados, y halógenos. Las moléculas blancos preferidas son los factores de enlace de células, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpo, y los factores de crecimiento. Los dispositivos preparados de PHAs de baja fusión que contiene las moléculas blancos activas pueden ser inyectados, implantados o entregados de forma oral, y usados, por ejemplo, en aplicaciones de curación de herida como la regeneración de tejidos controlada, y la quimioterapia.

10. Esterilización

Antes de la implantación, un relleno polimérico bioreabsorbido debe ser esterilizado para prevenir la enfermedad e infección del receptor. La esterilización es llevada a cabo antes de sembrar un dispositivo polimérico con células. La esterilización por calor de PHA que contiene rellenos es a menudo poco práctica debido a que el tratamiento por calor podría deformar el relleno, especialmente si el PHA tiene una temperatura de fusión por debajo que la requerida por el tratamiento de esterilización por calor. Este problema puede ser superado usando gas de óxido de etileno frío como agente de esterilización. La exposición de un relleno que contiene el PHA por vapores de óxido de etileno antes de la implantación se esteriliza el relleno y lo hace apropiado para la implantación. Durante la esterilización con gas de óxido de etileno frío, el relleno que contiene el PHA mantiene su forma. Este tipo de tratamiento satisface idealmente la esterilización de moldeado, o rellenos pre-moldeados donde la forma del relleno tiene un papel importante en su correcto funcionamiento.

Los vapores de óxido de etileno también deben ayudar en la desintoxicación de contaminantes de pirógeno de un relleno que contiene el PHA. Cuando un agente alquilante fuerte, óxido de etileno puede desintoxicar pirógenos a través de un mecanismo de alquilación. Este mecanismo de desintoxicación es similar al de acilación por un anhídrido o anhídrido mezclado. Por ejemplo, el tratamiento de pirógenos o endotoxinas con anhídrido acético o anhídrido succínico es un método conocido para desintoxicación y despirogenización. El mecanismo de acción para la desintoxicación de pirógenos por estos anhídridos se cree que es la conversión de los pirógenos para un derivado no-tóxico vía acilación. El óxido de etileno se comportará en una manera similar vía alquilación de los pirógenos.

III. Los métodos de usar rellenos de fabricación

Los dispositivos descritos aquí pueden ser administrados sistemáticamente o a nivel local, o usados *in vitro*, particularmente para cultivo de células. Los métodos preferidos de administrar los dispositivos sistemáticamente son por inyección, la inhalación, la administración oral y la implantación. Los otros métodos apropiados para administrar dispositivos incluyen administrar los dispositivos tópicamente, como una loción, ungüento, parche, o apósitos. Los polímeros también pueden ser incluidos en gomas de mascar, una técnica conocida por aquellos expertos en la técnica. Rassing, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **13**: 89-121 (1994). Los dispositivos de el PHAs preparados de acuerdo con los procedimientos más arriba pueden ser usados para a un amplio rango de aplicaciones médicas diferentes.

Las composiciones y métodos descritos aquí serán comprendidos posteriormente con las referencias y no limitados a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Despirogenización de un copolímero de látex de ácido R-3-hidroxiocetanoico y el ácido R-3-hidroxihexanoico con peróxido de hidrógeno

Un copolímero del ácido R-3-hidroxiocetanoico y el ácido R-3-hidroxihexanoico, obtenido por fermentación, conteniendo más de un millón de unidades de endotoxinas por gramo (EU/gramo), como medida con el copolímero en una forma de látex, fue despirogenizado.

El látex fue preparado disolviendo hexano extraído de el PHA en acetona (1% peso/volumen, 2,5 mL) y añadiendo por la vía flameando la llama 5 mL de agua libre de pirógeno a 80°C. Después de 30 minutos a esta temperatura, la muestra fue dividida en dos partes iguales: el control y la tratada. A la muestra tratada se adiciona 25 microlitros de 50% de peróxido de hidrógeno y la muestra fue hervida por una hora. Tanto el control como las muestras tratadas fueron ensayadas para endotoxinas por la prueba de *Limulus ameobocyte lysate* (LAL) (*Associates of Cape Cod, MA*).

El contenido de endotoxinas del polímero después del tratamiento del polímero era menor de 6 EU/gramo.

Ejemplo 2

(Ilustra principio pero no dentro de las reivindicaciones)

Despirogenización de un copolímero sólido del ácido R-3-hidroxiocetanoico y el ácido R-3-hidroxihexanoico con el peróxido de hidrógeno

Un copolímero del ácido R-3-hidroxiocetanoico y el ácido R-3-hidroxihexanoico, obtenido por la fermentación, conteniendo sobre un millón UE/gramo, medido por la prueba de LAL, fue despirogenizado tratando el polímero en grandes cantidades con peróxido de hidrógeno acuoso a 80°C en una reacción bifásica.

El contenido de endotoxinas del polímero después del tratamiento del polímero es de 100 EU/gramo, medido como un látex que usando la prueba del LAL.

65

ES 2 285 770 T3

Ejemplo 3

(Ilustra principio pero no dentro de las reivindicaciones)

5 *Despirogenización de células enteras incluyendo un copolímero del ácido de R-3-hidroxi octanoico y el ácido R-3-hidroxi hexanoico con peróxido de hidrógeno*

10 Una suspensión de células enteras incluyendo un copolímero del ácido R-3-hidroxi octanoico y el ácido de R-3-hidroxi hexanoico, obtenido por la fermentación, conteniendo sobre un millón EU/gramo medido por la prueba del LAL, fue despirogenizado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno acuoso (2% peróxido, 0,6% tensoactivo, 10% sólidos, pH de 7, 80°C) durante 3,5 horas.

15 Después del tratamiento, la composición fue enfriada, centrifugada, lavado con una solución de agente tensoactivo acuoso, el agua, precipitada, peleteada por centrifugación, y liofilizada. El contenido de endotoxinas del polímero tratado era de 50 EU/gramo, medido como un látex por la prueba de LAL.

Ejemplo 4

20 *Despirogenización de células enteras incluyendo ácido poli-R-3-hidroxi butírico con peróxido de hidrógeno*

Una suspensión de células enteras incluyendo ácido poli-R-3-hidroxi butírico (PHB), obtenido por la fermentación, fue despirogenizado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno acuoso (2% peróxido, 0,6% tensoactivo, EDTA, 10%, sólidos, pH de 7, 80°C) durante 3,5 horas. Después del tratamiento, la composición fue enfriada, centrifugada, lavada con una solución de agente tensoactivo acuoso, el agua, precipitado, peleteado por la centrifugación, y liofilizado.

25 El contenido de endotoxinas del polímero tratado fue menor que 0,12 EU/gramo, medido como un polvo usando la prueba de LAL. En comparación el contenido de endotoxinas de una muestra comercial de PHB fue más mayor que 120 EU/gramo medido como un polvo.

30 Ejemplo 5 de referencia

35 *Método para preparar polihidroxi alcanoato de alta pureza con un punto de fusión por debajo de 136°C usando extracción de cloroformo*

Un copolímero del ácido de R-3-hidroxi octanoico y el ácido R-3-hidroxi hexanoico con un punto de fusión de 61°C, obtenido por la fermentación de *Pseudomonas putida* KT2442, fue extraído desde células liofilizadas con cloroformo. La solución de cloroformo fue filtrada a través de un filtro de microfibras de vidrio (2,7 µm) para eliminar partículas. La solución fue concentrada, y el polímero se precipitó vía la adición lenta de un exceso de diez veces de metanol. El polímero fue disuelto luego en cloroformo y cubierto como una película. El cloroformo fue permitido evaporarse completamente, producir una película polimérica.

Ejemplo 6 de referencia

45 *Método para preparar polihidroxi alcanoato de alta pureza con un punto de fusión por debajo de 136°C usando extracción de hexano*

Un copolímero del ácido de R-3-hidroxi octanoico y el ácido R-3-hidroxi hexanoico con un punto de fusión de 61°C, obtenido por la fermentación de *Pseudomonas putida* KT2442, fue extraído de células liofilizadas con hexano. La solución de hexano fue filtrada a través de un filtro de microfibras de vidrio (2,7 µm) para eliminar partículas. El hexano fue eliminado por destilación. El polímero fue disuelto en acetona, y el polímero se precipitó junto a la adición de un exceso diez veces de metanol. El polímero fue colectado, disuelto en acetona, y fundido como una película. La acetona fue permitida evaporarse para producir una película totalmente polimérica.

55 Ejemplo 7 de referencia

Método para preparar polihidroxi alcanoato de alta pureza alto con un punto de fusión por debajo de 136°C usando extracción de acetona

60 Un copolímero del ácido de R-3-hidroxi octanoico y el ácido R-3-hidroxi hexanoico con un punto de fusión de 61°C, obtenido por la fermentación de *Pseudomonas putida* KT2442, fue extraído de células liofilizadas con acetona. La solución de acetona fue filtrada a través de un filtro de microfibras de vidrio (2,7 µm) para retirar partículas. La acetona fue retirada por destilación. El polímero fue disuelto en acetona, y el polímero se precipitó junto a la adición del agua. El polímero fue colectado usando centrifugación para ayudar en la separación de las fases, se disolvió en acetona, y se funde como una película. La acetona fue permitida evaporarse para producir una película totalmente polimérica.

ES 2 285 770 T3

Ejemplo 8 de referencia

Método para preparar partículas de látex de polihidroxicanoato de alta pureza con un punto de fusión por debajo de 136°C

5

Células enteras que contenían un copolímero del ácido R-3-hidroxiocetanoico y el ácido R-3-hidroxihexanoico con un punto de fusión de 61°C, obtenido por la fermentación de *Pseudomonas putida* KT2442, fue tratado con 2% de peróxido de hidrógeno acuoso, SDS (0,6%), pH 7, 80°C, durante 3,5 horas. El látex fue enfriado, centrifugado y lavado tres veces con una solución de 0,4%, SDS y luego lavado dos veces con el agua.

10

Ejemplo 9 de referencia

Biocompatibilidad de una composición de polímero de polihidroxicanoato con un punto de fusión por debajo de 136°C

15

Un copolímero del ácido R-3-hidroxiocetanoico y el ácido R-3-hidroxihexanoico con un punto de fusión de 61°C, obtenido por la fermentación, fue fabricado en dispositivos y implantado subcutáneamente en ratones de sexo femenino adultos. Los implantes fueron eliminados a las 2, las 4, las 8, las 12 y 40 semanas post-implantación y se prepararon para el examen histológico. La biocompatibilidad de los implantes fue valorado determinando el título de la reacción de fibrótica circundante a las muestras de tejidos y a la presencia de células inflamatorias.

20

El análisis histológico mostró la reacción de tejidos mínima sin macrófagos o presencia de histocitos, sugiriendo que no había señal de inflamación crónica o respuesta de cuerpo foránea para el polihidroxicanoato.

Ejemplo 10 de referencia

Degradación in vivo de una composición de polímero de polihidroxicanoato con un punto de fusión por debajo de 136°C

30

El peso molecular del copolímero del Ejemplo 5 fue determinado antes de la implantación, y después de ser implantado durante 40 semanas. Una muestra de un control no implantado fue verificada después de 40 semanas. El peso molecular fue determinado por GPC.

35

El peso de la masa molar promedio, Mw, del polímero antes de la implantación era 137,000. Después de 40 semanas, aunque no había ninguna señal visible de la degradación o la pérdida de propiedades mecánicas, el Mw del polímero fue alrededor de 65,000. El número de la masa molar promedio, Mn, del polímero antes de la implantación era 58,000 comparado con 31,000 después de 40 semanas de implantación. Muestras adicionales fueron tomadas de implantes para comparar los pesos moleculares en la superficie versus el interior de los implantes. Ninguna diferencia importante fue observada, indicando una descomposición hidrolítico homogénea lenta del polímero *in vivo*.

40

Ejemplo 11 de referencia

Liberación controlada de un dispositivo preparado de PHAs de baja fusión

45

Dispositivos de liberación controlada fueron fabricados de un copolímero del ácido R-3-hidroxiocetanoico y el ácido R-3-hidroxihexanoico con un punto de fusión de 61°C. Un medicamento modelo y el polímero se disuelven en una concentración 20% cloroformo peso/volumen y se funden en placas Petri pequeñas. Después de estar en aire por varios días, las películas de polímero son obtenida que contienen el medicamento en la forma dispersa. Discos fueron cortados de cada muestra de película que usaba un tapón borer de 7/16". Los dispositivos que contenían tres compuestos diferentes, que eran (por orden de incrementar lipofilia) β -hidroxiteofilina, prednisolona-21-hemisuccinato, y lidocaina. Cada medicamento fue evaluado en tres cargas diferentes (peso/peso 4, 10, y 25%). Cada dispositivo, pesando alrededor de 85 mg normalmente, fue depositado en un tubo de vidrio taponado y sumergido en tampón que comprende 100 mM fosfato de sodio, 0,02% azida de sodio (filtrada estéril), pH = 7,4, en 2 ml y mantenida en 37°C. Un dispositivo de control que contenía el polímero a solas fue incluido en los estudios para monitorear la degradación del polímero y la liberación de impurezas. A intervalos regulares, una muestra fue retirada y reemplazada con un igual volumen de tampón fresco. La liberación del compuesto fue monitoreado por espectroscopia de UV a las longitudes de onda adecuadas (β -hidroxiteofilina [$\lambda = 272$ nm], prednisolona-21-hemisuccinato, $\lambda = 252$ nm], y lidocaina [$\lambda = 262$ nm]), y los valores de liberación fueron normalizados contra la cantidad total de medicamento liberado durante el período de estudio. Para todos los dispositivos una cantidad importante del compuesto fue liberado en el primer punto a las 24 horas. Después de esto para ambas β -hidroxiteofilina como lidocaina, el por ciento de liberación del medicamento todos los días era inversamente proporcional a los porcentajes de la carga de medicamento.

60

Ejemplo 12 de referencia

65 *Modificación química de la película de PHO*

Una película de PHO estaba cubierta con soluciones de DMSO de 5-(Biotinamido)-pentilamina (*Pierce Chemical Col. Producto # 212345*) en una variedad de solventes orgánicos: isopropanol, acetónitrilo, metanol, etanol, y carbo-

ES 2 285 770 T3

nato de propileno. El reactivo de biotina contiene un grupo de amino principal fijado a un conector penta-metileno. Este grupo de amino puede causar las reacciones de aminólisis con la cadena central de poliéster del PHA, resultando en escisión de la cadena del polímero y enlace covalente de la biotina. Después de biotilación, el reactivo en exceso se lleva y la cantidad de la biotilación fue cuantificada usando ELISA (ensayo inmunoenzimático) la técnica con un sistema de peroxidasa/quimiluminiscencia de estreptavidina. La fuerza de la señal, es proporcional a la cantidad de biotina, es derivado sobre el solvente usado e incrementa en la serie: isopropanol mayor que acetonitrilo que es mayor que metanol, mayor etanol que el carbonato de propileno. Controles de solventes fueron llevados a cabo para demostrar la dependencia de la señal sobre el reactivo de biotina.

10 Ejemplo 13 de referencia

Modificación de gas plasma de película de PHO

15 Películas de PHO eran gas plasmtratado en dos plasmas diferentes, amoníaco y oxígeno. Estos plasmas se esperan que presenten grupos funcionales nuevos amino y carboxil, respectivamente. Estos grupos funcionales pueden actuar como sitios para la unión covalente de agentes bio-activos, como una proteína. El tratamiento de superficie se encontró que incrementa la permeabilidad al agua de la película de PHO comparado con la de PHO sin tratar. Este resultado es una señal poderosa de la modificación de superficie. Proteína (IgG de conejo) fue acoplado a las películas que usaban una solución acuosa de la proteína y el EDC de reactivo de apareamiento covalentemente. La cantidad de proteína acoplada fue cuantificada usando un anticuerpo de conejo en cabra, el sistema de peroxidasa/quimiluminiscencia. La fuerza de la señal se encontró que es proporcional a la cantidad de IgG de conejo dada a la superficie. Controles (EDC, IgG de conejo) fueron llevados a cabo para demostrar la dependencia de la señal sobre estos dos componentes.

25 Ejemplo 14 de referencia

Dispositivos de ingeniería de tejidos tubulares

30 Dispositivos tubulares de ingeniería de tejidos pueden desempeñar una variedad de funciones para la sustitución de tejidos tubulares, biológicos, como injertos vasculares, válvulas de corazón, uretra, intestinos, tubos de crecimiento del nervio, conductos, músculos de esfínter, envainas de piel, etc. Cuando los PHAs son materiales semi-cristalinos, termoplásticos, un dispositivo de PHA tubular puede ser constituido en una variedad de maneras, como extrusión, moldura, compresión, y dar forma desde una solución usando solución que produce las técnicas de fundición. Después de formar el PHA en la forma deseada y permitir que el PHA se cristalice, un relleno de PHA mantendrá su forma para usar como un relleno de ingeniería de tejido.

35 El PHO fue compresionado en una película fina entre dos cortinas de Mylar™. Una prensa Carver en una temperatura de platina de 60°C fue usado para proporcionar 1 tonelada de presión durante 20 segundos. Los separadores del espesor apropiado son usados para controlar el espesor de película. La película presionada fue colocada en un refrigerador a 4°C toda la noche para permitir que el PHO se cristalice. La película de PHO fue retirada del Mylar™ apoyando las láminas y llegó a una forma de tubo cilíndrico, el soporte Teflon™. El diámetro de soporte fue elegido para que produjera un tubo de un tamaño y el diámetro deseado. Los bordes de la película en la costura fueron cerrados usando compresión, sin embargo, las costuras también pueden ser cerradas vía soldadura, se funde, o disuelven los bordes parcialmente juntos. El tubo fue permitido solidificarse antes del retiro del soporte.

45 Ejemplo 15 de referencia

Dispositivos de ingeniería de tejidos porosos

50 Es deseable utilizar un material poroso para muchas aplicaciones de ingeniería de tejido. Hay algunas ventajas para usar un material poroso como la mejor difusión de fluidos y nutrientes al área de superficie que aumenta la adherencia celular y aumenta la degradación más rápida, y mayor contacto del tejido. Para muchas aplicaciones de ingeniería de tejido, se desea utilizar poros que son aproximadamente 50 a 200 μm en el diámetro (para siembra de células, los espaciados intersticiales preferidos en el orden de 100 a 300 micras no son anormales), sin embargo, la porosidad óptima, tamaño de poro y densidad de un material poroso variará dependiendo de su aplicación prevista. Los poros pueden ser introducidos en un material polimérico que usa una variedad de técnica como agentes espumantes, el procesamiento de fibras dentro de estructuras tejidas o no tejidas, la separación de fase se deslavan. Las estrategias de deslavado involucra el dispersar un material macizo (como sal) dentro del polímero. El material sólido se selecciona de forma tal que sea mal soluble en el polímero y se elimina fácilmente por deslavado. El sólido puede ser una material inorgánico u orgánico, por ejemplo, una sal, azúcar, proteína, o polímero. Después de dispersar el sólido en el polímero, la mezcla puede ser constituida en la forma deseada. Después de formular una estrategia de la mezcla de polímero-sólido, el sólido es disuelto de forma selectiva usando un solvente en que el sólido es soluble pero en que el polímero es mal soluble. Las partículas sólidas se disuelven para dejar poros vacíos. El tamaño, la distribución, y el por ciento de peso de las partículas puede ser elegidos para que producir materiales con un rango de porosidades.

65 Un tubo de PHA poroso fue hecho. El PHO estaba fundido y mezclado con partículas de sal cernidas en una proporción de peso de 1 a 2 para producir una mezcla homogénea. Las partículas de sal usadas habían sido cernidas entre 80 y 180 μm , sin embargo el tamaño de partícula, la distribución y el peso por ciento podría ser variado dependiendo del tamaño de poro deseado y la densidad. La mezcla de PHO/sal fue presionada en una película fina entre dos cortinas

ES 2 285 770 T3

de Mylar™. Una prensa Carver a una temperatura de platina de 60°C fue usada para proporcionar 1 tonelada de presión durante 20 segundos. Separadores del espesor apropiados fueron usados para controlar el espesor de la película. La película comprimida fue colocada en un refrigerador a 4°C toda la noche para permitir que el PHO se cristalice. La película de PHO/sal fue retirada del Mylar™ apoyando láminas y llegó a una forma de tubo sobre uno cilíndrico, el soporte de Teflon™. El diámetro de soporte fue elegido para que produjera un tubo de un tamaño y el diámetro deseado. Los bordes de película en la costura fueron cerrados usando compresión, sin embargo, las costuras también pueden ser cerradas vía soldadura, se funden o disuelven los bordes parcialmente juntos. El tubo fue permitido solidificarse y lo fue remojar en un baño de agua con los cambios frecuentes del agua para disolver a la sal. Después de exhaustivo lixiviando de la sal, un tubo poroso del PHO quedaba. El tubo poroso tenía propiedades que lo hacen apropiado para usar como un injerto vascular.

Ejemplo 16 de referencia

Construcción de una válvula de corazón de PHA

Dispositivos de ingeniería de tejidos de PHA pueden desempeñar una variedad de funciones para la sustitución de tejidos biológicos complejos, que incluyen válvulas, órganos, y tejidos esqueléticos. Como los PHAs son materiales semi-cristalinos, termoplásticos, un dispositivo de PHA puede estar constituido de una variedad de maneras como extrusión, moldura, presión, y da forma o desde una solución que usa solución de técnicas de fusión. Después de formar el PHA en la forma deseada y permitir que el PHA se cristalice, una partícula de PHA mantendrá su forma para usar como un dispositivo para ingeniería de tejido.

Una válvula de corazón de PHA porosa fue hecha. El PHO estaba fundido y se mezcló con partículas de sal en una proporción de 1 a 2 pesos para producir una mezcla homogénea. Las partículas de sal habían sido cernidas entre 80 y 180 μm , sin embargo, el tamaño de partícula, la distribución y el peso por ciento podría ser variado dependiendo del tamaño del poro deseado y de la densidad. La mezcla de PHO/sal fue compresionada en una película fina entre dos hojas de Mylar™. Una prensa Carver a una temperatura de platina de 60°C se usa para suministrar 1 tonelada de presión durante 20 segundos. Los separadores de espesor apropiado fueron usados para controlar el espesor de película. La película compresionada de PHO fue colocada en un refrigerador a 4°C toda la noche para permitir que el PHO se cristalice. La película PHO/sal fue removida del Mylar™ apoyando las láminas. Una película de sal/PHO de aproximadamente 250 μm de espesor se usa para formar cada una de las tres laminillas de la válvula. Las laminillas fueron cortadas en la forma deseada, que se aproximaba a una laminilla biológica. Las laminillas fueron soldadas sobre otra película de sal/PHO que sirve de conducto cilíndrico. La película de conducto tiene 1 mm de espesor y se hace la mezcla de la misma composición como las laminillas de sal/PHO. La soldadura fue llevada a cabo usando un electrodo calentado a 50°C para fundir el PHO junto en las costuras. Las laminillas fueron colocadas usando una válvula de corazón natural como modelo. El conducto fue soldado en la forma de un tubo para completar la construcción de la válvula. La válvula fue permitida solidificarse a 4°C toda la noche. Después del exhaustivo deslavado de la sal en un baño de agua, quedaba una válvula de corazón de PHO porosa. Las laminillas de válvula tienen muy buena flexibilidad y la válvula tiene muy buena manipulabilidad.

Ejemplo 17 de referencia

Siembra de células de materiales de PHA

Antes de la implantación los materiales de ingeniería de tejidos pueden ser sembrados con células para aumentar su biocompatibilidad y/o promover el crecimiento de un tejido deseado. Las células usadas son seleccionadas del tipo de tejidos apropiado y son preferencialmente cosechadas de los pacientes para minimizar el rechazo de tejido, sin embargo, las células pueden venir desde un banco de células. Adicionalmente, compuestos bioactivos que están directo en el crecimiento de un tejido deseado, como proteínas adheridas a las células, pueden ser incorporados dentro o sobre antes de sembrar e implantar células en un material de ingeniería de tejido. Por lo tanto el material de ingeniería de tejidos sirve de un soporte sólido, para organizar las células para el crecimiento correcto. Después de sembradas las células, las células pueden ser crecidas *in vitro* sobre la construcción del tejido hasta llegar a la densidad de células deseada.

Una muestra de PHO porosa fue esterilizada en gas de óxido de etileno. El polímero fue sembrado con células de endotelio bovinas en suero bovino fetal y luego incubadas *in vitro* a 37°C con 5% dióxido de carbono. Después de 24 horas, las células fueron fijadas a la muestra. El examen microscópico de la muestra demostraba buen apego celular y biocompatibilidad.

Ejemplo 18 de referencia

Modificación de superficie de una película de PHA

Las propiedades de superficie de un dispositivo de ingeniería de tejidos son muy importantes, ya que la superficie es la interface entre el tejido viviente del hospedero y el dispositivo implantado. La modificación de la superficie puede presentar una nueva funcionalidad a la superficie de polímero sin modificar significativamente las propiedades en grandes cantidades del polímero. Algunas propiedades de la superficie que pueden ser modificadas incluyen hidrofobicidad, hidrofílicidad, mojabilidad, adhesión celular para un dispositivo y la carga de la superficie. Es pre-

ES 2 285 770 T3

5 ferido ajustar que las propiedades de superficie de un dispositivo convengan a su aplicación prevista. Por ejemplo, a menudo es preferido maximizar la adhesión celular a un dispositivo. En tal caso, la superficie del dispositivo podría estar cubierta con un compuesto bioactivo o péptido que promueve la adhesión celular, como fibronectina, laminina o gelatina. Estos compuestos bioactivos podrían ser covalentemente o no-covalentemente a la superficie, dependiendo de la aplicación.

10 El tratamiento de gas plasma fue usado para modificar la superficie de una película de PHA fijada. Para prevenir el derretido de la muestra durante el tratamiento, las condiciones fueron diseñadas para mantener el calentamiento en un mínimo. Una película de PHO fue tratada con un gas plasma de amoníaco, a 250 micrones con un flujo de 350 SCCM a 220 watts de potencia durante 10 minutos. Normalmente, el tratamiento de plasma covalentemente modifica la superficie del material. Después del tratamiento, la modificación de la superficie fue confirmada por el análisis ESCA. La incorporación estable de aproximadamente 8% de nitrógeno fue alcanzada. Después del tratamiento, las muestras fueron guardadas a 4°C y RT. Mojabilidad de la superficie fue determinada por las mediciones del ángulo de contacto de agua. El PHO sin tratar tiene un ángulo de contacto alto (aproximadamente 95°). Después del tratamiento el ángulo de contacto disminuyó dramáticamente a aproximadamente 20 a 30°, demostrando un aumento en mojabilidad. Los ángulos de contacto de las muestras tratadas y sin tratar fueron al menos 30 días estables, demostrando la estabilidad de la modificación de la superficie. El análisis ESCA fue repetido después de la estabilidad de treinta días y confirmada la modificación de la superficie.

20 Ejemplo 19 de referencia

Adherencia de materiales Bioactivos para PHA

25 Un dispositivo usado para ingeniería de tejidos puede incluir un compuesto bioactivo(s) dentro o sobre su superficie. Los compuestos representativos que se incluyen son los factores de crecimiento para estimular el crecimiento de tejido, proteínas celulares adheridas para promover tejido adherido, o anti-coagulantes que previenen la trombogénesis. Adicionalmente, los compuestos que pueden ser incluidos para reducir la respuesta inmune, identifican el material para la posterior recuperación, aumenta la biocompatibilidad, entrega del mismo medicamento.

30 Un compuesto bioactivo fue fijado a una superficie de PHA, de la siguiente manera. Una película de PHO fue modificada con un compuesto biológicamente activo, biotina, después del tratamiento de gas plasma de amoníaco. Una solución acuosa que contenía una forma activada de biotina fue aplicada a la película de PHO tratada. El derivado de biotina contenía un grupo funcional N-éster de hidroxisuccinimida que lo activa por la acilación. Después del tratamiento con NHS-biotina, la superficie de la película fue lavada con agua, extinguiendo con glicina y bloqueando con 0,1% gelatina. La detección con un conjugado de streptavidina y peroxidasa picante de una solución de detección quimiluciente de HRP demuestra la modificación de biotina de la superficie. Una película de PHO sin el tratamiento de gas plasma de amoníaco fue usada como un control y no demuestra ninguna modificación de biotina bajo condiciones idénticas.

40 Ejemplo 20 de referencia

Prueba de un látex Hipoalergénico

45 Una muestra de 60 cm² de PHO fue ensayada para sensibilización de la piel de acuerdo al método estandar ASTM F720. La muestra, 3 mm en espesor, fue extraída con salino a 50°C durante 72 horas (20 mL). Cobayos, previamente sometidos a dos pasos de inducción (21 días) fueron expuestos sobre su piel parches remojados con un extracto salino, puro salino, o una solución de control positivo (5% oxazolona en acetona). Después de 24 horas, los parches fueron retirados, y las cobayas fueron examinadas en busca de una reacción de la piel después de 1, 24 y 48 horas. No había la formación de escara, eritema discernible con el extracto de PHO o el puro salino, todos los controles positivos indicaban bien definida la formación de una escara y eritema grave dentro de una hora.

55

60

65

ES 2 285 770 T3

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo médico biocompatible que consta de una composición de un polímero polihidroxicanoato, en el que:

el polihidroxicanoato incluye entre 100 y 100,000 unidades de la fórmula



en el que n es un número entero entre 1 y 15, y

R¹, R², R³, y R⁴ son seleccionados independientemente de los grupos que consisten de hidrógeno, metil, alquilo C₂₋₁₅ lineal, ramificado ó cíclico, grupos alquenoilo ó alquinoilo, grupos alcarilo, grupos aralquilo, grupos heteroalquilo, grupos heteroarilo, grupos hidroxil, grupos tiol, disulfuros, grupos éter, grupos tioléter, grupos éster, grupos ácidos carboxílicos, grupos amino, grupos amido, halógenos, radicales nitrógeno-sustituidos; y radicales oxígeno-sustituidos; el polihidroxicanoato contiene al menos 20 unidades de endotoxinas/gramo; y los niveles de pirógenos son al menos de 20 unidades de endotoxinas (EU) por dispositivo.

2. Un método para producir una composición de polímero polihidroxicanoato biocompatible que consiste en:

seleccionar una composición de polihidroxicanoato en la que el pirógeno esta presente debido al proceso por el cual se hace el polihidroxicanoato, el polihidroxicanoato incluye entre 100 y 100,000 unidades de la fórmula



en la que n es un número entero entre 1 y 15, y

R¹, R², R³, y R⁴ son seleccionados independientemente de los grupos que consisten en hidrógeno, metilo, alquilo C₂₋₁₅ lineal, ramificado ó cíclico, grupos alquenoilo ó alquinoilo, grupos alcarilo, grupos aralquilo, grupos heteroalquilo, grupos heteroarilo, grupos hidroxil, grupos tiol, disulfuros, grupos éter, grupos tioléter, grupos éster, grupos ácidos carboxílicos, grupos amino, grupos amido, halógenos, radicales nitrógeno-sustituidos; y radicales oxígeno-sustituidos; y

se elimina pirógeno del polihidroxicanoato por exposición del polihidroxicanoato al calor y a un agente oxidante, el agente oxidante no se degrada significativamente o altera la naturaleza físico química del polihidroxicanoato, el polihidroxicanoato contiene al menos 20 unidades de endotoxinas/gramo.

3. El dispositivo de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2 en el que el polihidroxicanoato es preparado por fermentación bacteriana.

4. El dispositivo o el método de la reivindicación 3, en el que la bacteria es una bacteria Gram negativa.

5. El dispositivo o el método de una cualquiera de una de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente oxidante es un peróxido.

6. El dispositivo o el método de una cualquiera de una de las reivindicaciones precedentes, en el que el polihidroxicanoato es químicamente modificado u obtenido.

7. El dispositivo o el método de la reivindicación 6 en el que una molécula blanco o adherida se acopla al polihidroxicanoato covalentemente.

8. El dispositivo de la reivindicación 1 en el que el polímero es una mezcla de polihidroxicanoato o copolímero.

9. El dispositivo de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2 en el que el polihidroxicanoato tiene un punto de fusión o una temperatura de transición vítrea menor que 136°C.

10. El dispositivo de la reivindicación 1 como una formulación de látex acuosa, o el método de la reivindicación 2 en el que la composición es una formulación de látex acuosa.

11. Un método de formación de un dispositivo médico biocompatible que consta de:

(a) producir una composición de polihidroxicanoato biocompatible por un método que comprende:

(i) selección de la composición de un polihidroxicanoato en el que el pirógeno esta presente debido al proceso por el cual el polihidroxicanoato se hace, el polihidroxicanoato incluye entre 100 y 100,000 unidades de la fórmula

ES 2 285 770 T3



en el que n es un número entero entre 1 y 15, y

R¹, R², R³, y R⁴ son seleccionados independientemente de los grupos que consisten de hidrógeno, metilo, alquilo C₂₋₁₅ lineal, ramificado ó cíclico, grupos alquenilo ó alquinilo, grupos alcarilo, grupos aralquilo, grupos heteroalquilo, grupos heteroarilo, grupos hidroxilo, grupos tiol, disulfuros, grupos éter, grupos tioléter, grupos éster, grupos ácidos carboxílicos, grupos amino, grupos amido, halógenos, radicales nitrógeno-sustituídos; y radicales oxígeno-sustituídos,

(ii) eliminación de pirógeno del polihidroxi-alcanoato por exposición del polihidroxi-alcanoato al calor y a un agente oxidante, en el que el agente oxidante no degrada significativamente o altera la naturaleza físico-química del polihidroxi-alcanoato, el polihidroxi-alcanoato contiene al menos 20 unidades de endotoxinas/gramo; y

(b) formación del dispositivo, en el que el nivel de pirógeno es menor que 20 unidades de endotoxinas (EU) por dispositivo.

12. El método de la reivindicación 11 en el que el polímero ha sido químicamente modificado.

13. El método de la reivindicación 11, en el que el dispositivo está en una forma seleccionada entre el grupo que consta de stents, recubrimientos sobre dispositivos protésicos, suturas, grapas, y tubería.

14. El método de la reivindicación 11, en el que el dispositivo está en una forma seleccionada entre el grupo que consta de dispositivos de regeneración de tejido, dispositivos de cultivos de células, apósitos de heridas, y recubrimiento de células o tejidos.

15. El método de la reivindicación 11, en el que el dispositivo es una membrana porosa.

16. El método de la reivindicación 11, en el que el dispositivo está en forma de micropartículas o nanopartículas.

17. El método de la reivindicación 11, en el que el dispositivo comprende un material seleccionado entre el grupo que comprende agentes terapéuticos, profilácticos y de diagnósticos.

18. El método de la reivindicación 17, en el que el agente terapéutico está seleccionado entre el grupo que comprende péptidos y proteínas, ácidos nucleicos, sacáridos y polisacáridos, lípidos, moléculas de medicamentos sintéticas, y agentes de obtención de imágenes.

19. El método de la reivindicación 17, en el que el dispositivo se formula para la administración a una superficie de mucosa.

20. El método de la reivindicación 11, en el que el polihidroxi-alcanoato es una mezcla de polímeros o un copolímero.

21. El método de la reivindicación 20, en el que el polímero está mezclado o copolimerizado con un polímero biodegradable.

22. El método de la reivindicación 21, en el que el segundo polímero no es un polihidroxi-alcanoato.

23. El método de la reivindicación 11, en el que las moléculas están enlazadas al polímero, y las moléculas son seleccionadas del grupo que comprende las moléculas que son bioactivas, moléculas que pueden ser detectadas, moléculas que pueden ser blancos, y moléculas que afectan la carga, lipofilia o hidrofilia de la partícula.

24. El método de la reivindicación 23 en donde las moléculas blancas son seleccionadas entre los grupos que consisten en compuestos específicamente reactivos con un componente de la superficie de las células, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

25. El método de la reivindicación 11, en el que el polímero es modificado para reducir el consumo por el sistema retículo endotelial.

26. El método de la reivindicación 11, en el que el dispositivo es para ingeniería de tejidos que consta además de una siembra de células sobre, o dentro del dispositivo.

27. El método de la reivindicación 11, en el que comprende el uso del dispositivo además en rellenos de fabricación de un medicamento para tratar un ser humano o animal con necesidad de un dispositivo médico biocompatible.

ES 2 285 770 T3

28. El método de la reivindicación 27, en el que el medicamento es para implantar el dispositivo sobre tejidos para formar piel equivalente.

29. El método de la reivindicación 11, en el que el dispositivo se forma en una prótesis de hueso.

30. El método de la reivindicación 29, en el que los materiales de relleno son mezclados con el polímero en una cantidad efectiva para aumentar la fortaleza de la prótesis de hueso.

31. El método de la reivindicación 11, el que comprende el mezclado además con el polímero estructural y materiales adhesivos para formar un revestimiento de hueso.

32. El método de la reivindicación 11, en el que el polihidroxialcanoato tiene un punto de fusión o una temperatura de transición vítrea menor que 136°C.

33. Un polihidroxialcanoato como el definido en la reivindicación 1 para uso en las preparaciones de un dispositivo médico biocompatible.

34. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el dispositivo está en una forma seleccionada del grupo que comprende dispositivos de entrega de medicamentos, diagnósticos o profilácticos.

35. El dispositivo de la reivindicación 1 en forma de un corazón protésico seleccionado entre el grupo que comprende válvulas de corazón, laminillas y anillos de corazón.

36. El dispositivo de la reivindicación 1 en forma de un injerto periodontal.

37. El dispositivo de la reivindicación 1 en forma de un parche pericárdico.