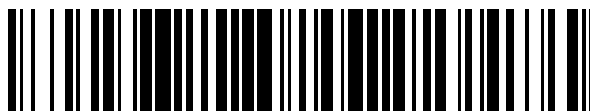


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 195**

51 Int. Cl.:
A61K 9/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06771261 .2**
- 96 Fecha de presentación: **26.05.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1898881**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Matrices de polímero y métodos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:
27.05.2005 US 684974 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.09.2012

73 Titular/es:
**ROYER BIOMEDICAL, INC.
4580F MACK AVENUE
FREDERICK, MD 21703, US**

72 Inventor/es:
ROYER, Garfield, P.

74 Agente/Representante:
Rizzo, Sergio

ES 2 387 195 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).

MATRICES DE POLÍMERO Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN Y USO DE LAS MISMAS

Descripción

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención hace referencia en general a matrices poliméricas biorreabsorbibles y su producción y uso como sistemas de suministro de agentes bioactivos. Los usos principales de las matrices de la presente invención son la liberación sostenida y/o controlada de productos farmacéuticos y otros agentes bioactivos, incluyendo células.

ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INVENCION

10 [0002] Las matrices poliméricas diseñadas para la liberación controlada de compuestos bioactivos pueden ser no reabsorbibles o reabsorbibles. En general, reabsorbible significa degradable de forma biológica en el cuerpo mediante la erosión desde la superficie o la descomposición interna. El mecanismo puede implicar bien una reacción química, como la hidrólisis, o bien una disolución. Los polímeros no
15 reabsorbibles, como el polimetilmetacrilato, han sido usados para la administración de antibióticos. Estos materiales sufren la desventaja de que deben recuperarse, lo que implica una segunda intervención y supone un riesgo de infección (HW Bucholz, et al., (1970) Chiburg, 43, 446).¹

20 ¹Esta publicación así como otras publicaciones citadas a continuación se incorporan expresamente en su totalidad a esta solicitud.

[0003] La preparación de dextrano oxidado se describe en la patente estadounidense nº 5.783.214 de Royer. Se ha usado ácido hialurónico oxidado en reacciones con amino-polisacáridos para formar complejos como se describe en la patente estadounidense nº 6.305.585 de Spiro et al; sin embargo, el método revelado resulta
25 menos conveniente y más caro en comparación con el sistema aquí descrito. Además, las condiciones de enlace cruzado requieren grupos amino no cargados, los cuales eliminan muchos ingredientes activos, puesto que reaccionarían con el polímero. El gel descrito en la patente estadounidense 6.305.585 se prepara a granel mediante la reacción de dos soluciones de polímero a pH alcalino. Lee et al, *Macromolecules*, 33,
30 97-101 (2001), han descrito un biomaterial estructural de poli(guluronato), que implica un polímero oxidado aislado a partir de ácido algínico. El material de partida no se encuentra disponible en el mercado, es caro de producir, y no ha sido aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration: Agencia de Alimentos y Fármacos*) para uso medicinal. La producción de este biomaterial sucede a un pH alto que implicaría la
35 reacción de los grupos amino en las proteínas o de otros compuestos medicinales.

[0004] Otro polisacárido que encuentra una aplicación en la medicina es la carboximetilcelulosa utilizada en la formulación de fármacos y también en la

producción de composiciones anti- adhesión para el tratamiento postquirúrgico que sigue a diversos tipos de procedimientos (Schwartz He y Blackmore JM, patente estadounidense 6017301, 6133325, y 6034140; Miller ME, Cortese, SM, Schwartz, HE, y Oppelt, WG, patente estadounidense 6566345; Liu, LS y Berg, 5 patente estadounidense 6923961; Schwartz, HW, Blackmore, JM, Cortese, SM, y Oppelt, WG, patente estadounidense 6869938). Estas formulaciones implican la agregación no covalente de polisacáridos carboxilados con polietilenglicoles.

[0005] El ácido hialurónico se ha usado como biomaterial en un gran número de aplicaciones. Gertzman y Sunwoo han empleado la sal sódica del ácido hialurónico de 10 alto peso molecular para suministrar matriz ósea desmineralizada (patentes estadounidenses 7.019.192, 6.911.212, 6.458.375, y 6.326.018). El material usado es una solución y no implica enlace cruzado de sustancias químicas como se describe aquí. El enlace cruzado covalente proporciona estabilidad al gel y retrasa la migración del agente bioactivo. Además, el grado de enlace cruzado constituye un elemento de 15 control para el tiempo de permanencia/tiempo de resorción.

[0006] A diferencia de algunos de los polímeros citados en las referencias anteriores, el dextrano empleado en la práctica de la presente invención se encuentra disponible como producto USP (propuesta única de ventas) y ha sido utilizado por vía parenteral durante muchos años. Se han producido derivados de acrilato de dextrano y pueden 20 formar hidrogeles de enlace cruzado (De Groot et al. (2002) Int. J. Cancer, 98, 134-140; Stenekes, et al. (2000) Biomacromolecules, 1, 696-703; Chung, et al. (2005) Int. J. Pharm., 288, 51-61). Los injertos de poliláctido-dextrano puede producirse y emplearse para fabricar una matriz de administración utilizando un sistema microesférico basado en una emulsión (Ouchi, et al. (2004) 4, 458-463).

[0007] La Publicación de Patente Internacional de propiedad común nº WO 25 2004/112713 revela complejos poliméricos de fármacos novedosos, que se forman mediante la mezcla de un polianión como el sodio sulfato de dextrano y un agente bioactivo catiónico. Los geles (geles R) o precipitado reabsorbible resultante constituyen una matriz de administración de fármacos. Sin embargo, como se revela, 30 solo intervienen enlaces iónicos en la formación de tales geles reabsorbibles. Además, la formación de tales geles reabsorbibles requiere que el ingrediente farmacéutico activo esté cargado positivamente. Sin embargo, muchos ingredientes activos son neutros o están cargados de forma negativa a un pH fisiológico. La matriz de carbohidrato de geles reabsorbibles es muy atractiva puesto que es polar y no es 35 susceptible de degradación proteolítica.

[0008] Por lo tanto, sería altamente recomendable que los sistemas de polímero reabsorbible sean capaces de administrar ingredientes activos con carga negativa o

neutra a un pH fisiológico. La presente invención se dirige a proporcionar tales sistemas de polímeros reabsorbibles.

[0009] En líneas generales, la presente invención aquí revelada conlleva el uso de polisacáridos modificados químicamente en la preparación de matrices de administración de moléculas de fármacos, que no son utilizables con los geles reabsorbibles convencionales. Se encuentran incluidos ingredientes activos neutros y con carga negativa. En modos de realización especialmente preferidos, la matriz implica el enlace cruzado de polímeros aldehídicos con dihidrazidas en presencia de un ingrediente activo. El reactivo de enlace cruzado, la dihidrazida, reacciona para formar una hidrazona. El producto de la reacción es una película, microperlas, o un sólido gomoso.

[0010] Según un aspecto de esta invención, se proporcionan composiciones bioerosionables para la administración de un agente bioactivo, las cuales son los productos de reacción de una mezcla de reacción compuesta por una solución de dextrano oxidado, y una mezcla de sólidos compuesta por una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior. Preferiblemente, el pH de la mezcla de reacción será 6 o inferior independientemente del uso de agente regulador del pH. Sin embargo, si se utilizan, los agentes reguladores del pH preferidos son ácidos sólidos, como fosfato de sodio, ácido cítrico, ácido succínico y/o ácido fumárico.

[0011] Las composiciones de la presente invención pueden comprender también un agente de liberación para controlar la liberación del agente bioactivo a partir la composición. Una forma preferida de agente de liberación es un polímero complejante que se une al agente bioactivo. De forma alternativa o adicional, el agente de liberación puede comprender un polímero matriz no reactivo para proporcionar una estabilidad estructural y resistencia difusional al agente bioactivo. En algunos modos de realización preferidos de la invención, el agente de liberación comprenderá un ácido alifático o aromático que forma sales con antibióticos aminoglucósidos, vancomicina, tetraciclinas o clindamicina.

[0012] Se puede utilizar prácticamente cualquier agente bioactivo de forma satisfactoria en la presente invención. En este sentido, los agentes bioactivos preferidos comprenden agentes osteoinductivos, antibióticos, anestésicos, factores de crecimiento, células, agentes antitumorales, agentes antiinflamatorios, antiparasitarios, antígenos, adyuvantes y citokinas. Un agente bioactivo particularmente preferido es un agente osteoinductivo, como una matriz ósea desmineralizada (DBM, en inglés).

[0013] Las composiciones de la invención se proporcionan en forma de un gel, microesfera, película, espuma, o fibra.

[0014] Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan kits para formar una composición bioerosionable adaptada para la administración de un agente bioactivo. Los kits de la invención comprenderán una primera parte alícuota de una mezcla de reacción compuesta por una solución de dextrano oxidado, y una segunda parte alícuota de una mezcla de reacción compuesta por una mezcla de sólidos que incluye una hidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior. Cuando se mezclan, la primera y la segunda parte alícuota de la mezcla de reacción reaccionan para formar una composición bioerosionable solidificada para la administración del agente bioactivo contenido en la misma. Por lo tanto, el agente de liberación, se si emplea, puede incorporarse a una de las partes alícuotas, la primera o la segunda, de la mezcla de reacción.

[0015] Los kits de la invención pueden contar, de forma ventajosa, con una jeringa doble que tiene un primer y un segundo cilindro de jeringa que contienen respectivamente la primera y la segunda parte alícuota de la mezcla de reacción.

[0016] Según otro aspecto más de la invención, se proporcionan los métodos para producir una composición bioerosionable solidificada para la liberación de un agente bioactivo. Los métodos preferidos comprenden formar una mezcla de reacción compuesta por una solución de dextrano oxidado, y una mezcla de sólidos compuesta por una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior, y permitir que la mezcla de reacción reaccione para formar una composición de administración de fármacos bioerosionable solidificada.

[0017] Se pueden emplear diversos sistemas para preparar la matriz polimérica reabsorbible según la invención para su administración. Por ejemplo, es posible conectar dos jeringas físicamente la una a la otra y llevar a cabo la mezcla de los componentes de reacción mediante la acción recíproca de manera que se transfiera la mezcla repetidamente de un cilindro de jeringa al otro. El pH se mantiene a 6 o inferior para evitar la reacción de los grupos amino en el ingrediente activo. El agente bioactivo, dihidrazida, y ácido sólido (todos polvos secos) son contenidos en la primera jeringa y la solución de dextrano oxidado en la segunda jeringa. Hay muchas ventajas para este formato, incluyendo la estabilidad del agente bioactivo, el mantenimiento de la esterilidad, y la conveniencia.

[0018] En otro aspecto más, la presente invención se pone en práctica en un dispositivo médico implantable que comprende un recubrimiento de la composición bioerosionable solidificada. Los dispositivos médicos pueden encontrarse, de manera ventajosa, en forma de catéter, un stent o un dispositivo ortopédico. Los dispositivos

ortopédicos recubiertos especialmente preferidos según la presente invención incluyen pernos, tornillos, barras, clavos, alambres, aumentos, copas, e implantes de articulación.

5 [0019] Según otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan composiciones para su uso en métodos de administración de un agente bioactivo en un lugar del cuerpo que necesita el mismo. Los métodos comprenden proporcionar una primera parte alícuota de una mezcla de reacción que comprende una solución de dextrano oxidado, y una segunda parte alícuota de una mezcla de reacción que comprende una mezcla de sólidos compuesta por una dihidrazida, un agente bioactivo, 10 y opcionalmente una agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior. La primera y la segunda parte alícuotas pueden mezclarse para formar una mezcla de reacción, de manera que, posteriormente, la mezcla de reacción pueda instalarse en el lugar del cuerpo y se permita que forme así una composición de administración de fármaco bioerosionable solidificada *in situ*. Puede proporcionarse una jeringa doble que tenga un primer y un segundo cilindro de jeringa que contengan respectivamente la primera y la segunda parte alícuota de la mezcla de reacción. Por tanto, la fase de expulsar la primera y la segunda parte alícuotas de las mezclas de reacción puede llevarse a cabo mediante la transferencia repetida de la primera y la segunda parte alícuotas de las mezclas de 15 reacción entre el primer y el segundo cilindro de jeringa para que se mezcle la misma.

[0020] Estos y otros aspectos y ventajas serán más evidentes tras la atención prestada a la siguiente descripción detallada de los modos de realización ejemplares preferidos de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 [0021] Los componentes necesariamente requeridos para producir los complejos poliméricos de la presente invención incluyen un agente bioactivo, un polímero aldehídico, y una hidrazida multifuncional. La mezcla de los componentes anteriores resulta en una matriz sólida como consecuencia de la reacción de la dihidrazida con los grupos aldehídos en las cadenas poliméricas con enlace cruzado tridimensional. La 30 reacción se produce a pH ácido (p.ej., entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0) para acelerar la formación de gel y evitar la reacción de los grupos amino del ingrediente activo. De este modo, el ingrediente activo queda atrapado en la matriz polimérica resultante. Poco después de mezclar los componentes, se inyecta/instala la solución/suspensión en un paciente humano o animal. La matriz solidifica *in situ* en 35 unos minutos (p.ej., normalmente en unos 5 minutos). La matriz polimérica hidratada se degrada *in vivo* y, por tanto, es reabsorbible por el cuerpo. A diferencia de los poliésteres, no se produce ácido como resultado de la resorción.

[0022] Se pueden incluir polímeros no reactivos para alterar la resistencia difusional o para complejar el agente bioactivo.

[0023] En general, la matriz de administración de fármacos ideal presenta las siguientes características:

- 5 1. No tóxica
2. Reabsorbible
3. Versátil en cuanto al tamaño molecular y la naturaleza química del agente bioactivo
4. Sin necesidad de componentes exóticos que sean caros y difíciles de obtener
- 10 5. Tasa de liberación controlable
6. Producible según las buenas prácticas de fabricación (*Good Manufacturing Practice*) a un coste razonable
7. Esterilizable

[0024] Se revelan aquí matrices de administración de fármacos polisacáridos y la metodología para producir y utilizar los mismos. Más específicamente, las matrices de administración de fármacos polisacáridos de la presente invención pueden derivarse de dihidrazidas y dextrano oxidado por periodato. La reacción de enlace cruzado se lleva a cabo a pH ácido, que permite el aprisionamiento de las sustancias bioactivas con grupos amino libres. La protonación de los grupos aminos en el pH del intervalo de

15 4-6 deja a tales grupos relativamente no reactivos en comparación con las dihidrazidas. Por consiguiente, el agente bioactivo permanece intacto y no consume lugares de enlace cruzado aldehídico.

[0025] Es importante mantener el pH de la mezcla de reacción entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0. En algunos casos, puede ser necesario añadir un agente,

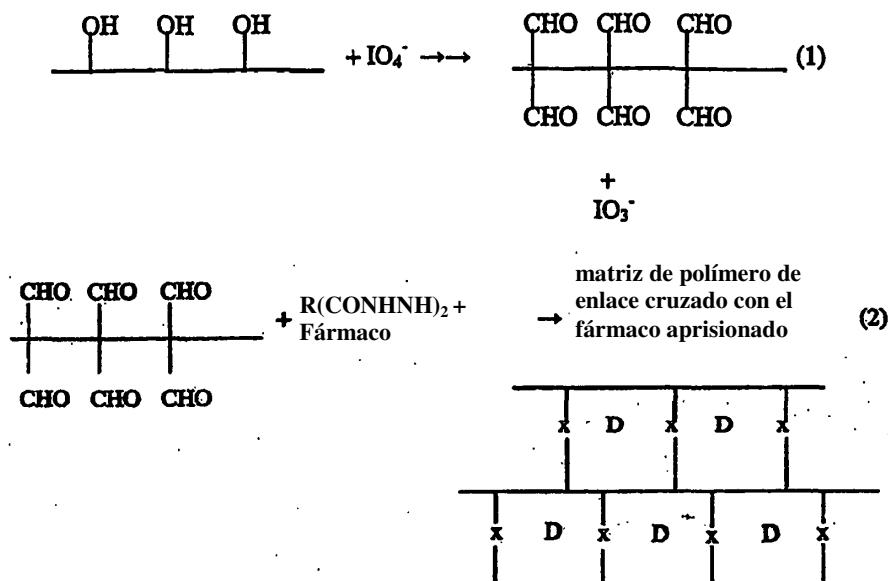
25 como fosfato de sodio o un ácido orgánico (p.ej., ácido cítrico o fumárico), para ajustar el pH dentro del rango deseado. En los casos en los que los ingredientes activos se encuentran presentes como sales, la adición de fosfato de sodio o un ácido orgánico para ajustar el pH no resulta siempre necesaria. Por tanto, en general cuando el ingrediente activo contribuye a la acidez, puede no resultar necesario añadir un agente

30 ácido para ajustar el pH.

[0026] Los dioles vecinales reaccionan con metaperiodato de sodio para producir aldehídos. Los poliglucanos, mananos, levanos, y similares, reaccionan sin problemas en soluciones acuosas a temperatura ambiente. Cuando un polímero como el dextrano reacciona con periodato, el resultado es yodato y una cadena de polímero que

35 contiene agrupaciones de dialdehído intermitentes. Estos dialdehídos sirven como sitios de reacción con dihidrazida adípica, lo que resulta en la formación de un gel hidrofílico de enlace cruzado covalente.

[0027] La reacción para formar los complejos de polímero según la presente invención puede representarse esquemáticamente como sigue:



5 en el que X representa el enlace cruzado de dihidrazona y D representa el ingrediente activo. Se debe enfatizar que sólo está reaccionada una fracción de los dioles vecinales en el polisacárido. Desde el punto de vista molar del residuo, el grado de oxidación se encuentra en el rango del 5-20%. El esquema de reacción anterior no pretende representar la estequiometría de la reacción.

10 [0028] La velocidad de liberación y el control del perfil de liberación son consideraciones importantes de los sistemas de administración de fármacos.

[0029] La ley de Fick de la difusión afirma que:

$$\text{Tasa} = DA(\partial c/\partial x)$$

15 donde D es el coeficiente de difusión; A es el área de superficie y $(\partial c/\partial x)$ es el gradiente de concentración en el límite de la matriz.

[0030] Parafraseando la ecuación de Stokes-Einstein, D puede expresarse como:

$$D = kS/M_wV$$

20 en la que k es una constante, S es la solubilidad del ingrediente activo, M_w es el peso molecular y V es la viscosidad del medio. El complejamiento puede reducir la solubilidad efectiva y la adición de polímeros no reactivos puede aumentar la “viscosidad” o resistencia difusional. El nivel de oxidación puede variarse desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 20%. La concentración de polímero puede encontrarse en el intervalo de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 250 mg/ml dependiendo del sistema utilizado para preparar la formulación. Los ingredientes activos puede convertirse en sales hidrofóbicas. Por 25 ejemplo, las aminas pueden convertirse con C6 o ácidos caboxílicos mayores. Pueden

emplearse estas sales para extender el perfil de liberación bien sólo o en combinación con sales inorgánicas altamente solubles.

[0031] Los polímeros a oxidar deben ser biocompatibles y reabsorbibles. Se puede usar cualquier polímero que cumpla estos criterios. Se prefieren el dextrano (producido por fermentación microbiana) y derivados del mismo; se pueden utilizar dextrans de otras fuentes siempre que sean biocompatibles y tengan propiedades similares al dextrano USP. El peso molecular preferido del polímero es 40.000 o superior. En general, el tiempo de reacción necesario para la gelación es mayor cuando se emplea dextrano oxidado de bajo peso molecular.

10 **[0032]** Las hidrazidas de enlace cruzado que son útiles incluyen las siguientes:

Nº Carbono	Nombre
C4	<u>Dihidrazida de ácido succínico</u>
C5	<u>Dihidrazida de ácido glutárico</u>
C6	<u>Dihidrazida de ácido adípico</u>
C7	<u>Dihidrazida de ácido pimélico</u>
C8	<u>Dihidrazida de ácido subérico</u>
C9	<u>Dihidrazida de ácido azeláico</u>
C10	<u>Dihidrazida de ácido sebácico</u>
C11	<u>Dihidrazida de ácido undecanodioico</u>
C12	<u>Dihidrazida de ácido dodecanodioico</u>
C13	<u>Dihidrazida de ácido brasílico</u>
C14	<u>Dihidrazida de ácido tetradecanodioico</u>
C15	<u>Dihidrazida de ácido pentadecanodioico</u>
C16	<u>Dihidrazida de ácido tápsico</u>
C18	<u>Dihidrazida de ácido octadecanodioico</u>

[0033] Pueden utilizarse mezclas de agua-solvente orgánico para acelerar la velocidad de disolución y reacción cuando se usan hidrazidas de mayor peso molecular.

[0034] Las matrices aquí descritas se emplean de forma útil para suministrar agentes bioactivos incluyendo, por ejemplo, fármacos, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, células, y similares. Un modo de uso es la inyección directa para la administración local o sistémica del fármaco. Otros incluyen los recubrimientos para implantes, sellante de heridas, apósitos para heridas de uso tópico, instalación local de forma perioperativa para el control de la infección o del dolor (anestésico local).

20 **[0035]** Un modo de realización de la presente invención incluye la matriz ósea desmineralizada (DBM, en inglés) que se fabrica mediante el tratamiento del hueso del

donante con ácido para eliminar los componentes inorgánicos (Urist, Mr, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1984) 81, 372-375; Peterson, et al., JBJS (2004) 86, 2243-2250). Tras la esterilización, la matriz ósea desmineralizada puede mezclarse con un portador y situarse en una deficiencia ortopédica. La osteoinducción da como resultado la formación de nuevo hueso.

[0036] La matriz ósea desmineralizada puede suministrarse a una deficiencia ortopédica utilizando la matriz aquí descrita de al menos dos formas. Primero, el sólido seco de matriz ósea desmineralizada puede mezclarse con le dihidrazida y posteriormente tratarse con solución de dextrano oxidado. La suspensión líquida resultante es recogida en una jeringa e instalada por el cirujano. Con la mayoría de formas de matrices óseas desmineralizadas, se puede emplear el sistema de jeringa doble.

[0037] En segundo lugar, se deja solidificar la mezcla que contiene matriz polimérica y matriz ósea desmineralizada. Cuando está seca, este material se hace bastante duro y soportará peso. El compuesto seco es entonces moldeado para adoptar la forma deseada. Se pueden incluir en la formulación astillas de hueso esponjoso, hidroxiapatita, u otros materiales inorgánicos antes de la instalación.

[0038] Por supuesto, aquellos con experiencia en la técnica reconocerán que es posible combinar otros agentes bioactivos con la matriz ósea desmineralizada osteoinductiva. Por tanto, puede ser útil una matriz de antibiótico/matriz ósea desmineralizada para el tratamiento de infecciones del hueso o articulaciones.

[0039] Además, una matriz de bupivacaína/matriz ósea desmineralizada puede ser útil para tratar el dolor en el lugar de obtención del injerto de hueso, como la cresta ilíaca, que es una fuente común de hueso de aloinjerto para su uso en la artrodesis de columna.

[0040] En varias aplicaciones ortopédicas, la aspiración de médula ósea es otro aditivo lógico para usar con matriz ósea desmineralizada osteoinductiva con la matriz aquí descrita.

[0041] Se pueden suministrar células madre mesenquimales y otras células progenitoras con sustancias bioquímicas reguladoras. Se pueden suministrar condrocitas para la reparación de cartílago articular.

[0042] Un uso beneficioso adicional de las matrices según la presente invención es la prevención de adhesiones post-quirúrgicas. En concreto, tras la cirugía (como cirugía abdominal, ginecológica, o pélvica) la instalación de una matriz según la presente invención puede contribuir a la reducción significativa de adhesiones. Se pueden emplear diversos adyuvantes incluyendo agentes fibrinolíticos, anticoagulantes, agentes antiinflamatorios, y antibióticos. En esta aplicación, se incluye de forma

ventajosa un polímero adicional como polietilenglicol (8000) en la solución de dextrano oxidado.

5 **[0043]** Se puede usar una configuración de jeringa doble en la preparación de las matrices poliméricas reabsorbibles según la presente invención. Por ejemplo, dentro del cilindro de una jeringa puede contenerse una solución de un polímero aldehídico, como dextrano oxidado, mientras que el cilindro de la otra jeringa contiene una mezcla de fármaco sólido y dihidrazida sólida. Se puede incluir fosfato de monosodio para controlar el pH, que es mantenido de forma ventajosa en el intervalo entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0. Las jeringas se encuentran conectadas
10 entre sí, de forma que los contenidos puedan mezclarse transfiriendo alternativamente la mezcla de un cilindro de jeringa al otro durante aproximadamente 30 ciclos. La solidificación se produce en el plazo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos dependiendo de las concentraciones relativas de los componentes. La solución de dextrano oxidado es estable durante al menos un año y los componentes
15 sólidos son estables al menos durante ese tiempo, y en algunos casos de forma indefinida. El mantenimiento de la esterilidad, amplia aplicabilidad, estabilidad del agente bioactivo y facilidad de uso son los atributos de este sistema de doble jeringa.

[0044] Pueden producirse varias formas físicas de la invención. En este sentido, se prefiere especialmente que las matrices de polímero de la invención se encuentren en
20 la forma de un líquido inyectable, que solidifique dentro del cuerpo. El líquido inyectable producido con el sistema de doble jeringa puede aplicarse también a heridas/incisiones quirúrgicas o las heridas resultantes de lesiones. La formulación solidifica y sirve como un sellante de la herida. Se pueden usar antibióticos y factores de crecimiento para evitar infecciones y potenciar la curación.

25 **[0045]** Otra alternativa es dejar que la forma de administración se endurezca (solidifique) *ex vivo* antes de ser administrada. Tras el secado y molienda, el polvo resultante puede usarse por vía tópica. De forma alternativa o adicional, el polvo puede ser suspendido o usado por vía parenteral.

[0046] La forma de administración sólida de la invención solidificada *ex vivo* puede
30 usarse como un polvo antiinfeccioso tópico para el tratamiento de heridas. El aprisionamiento de clindamicina y amicacina dentro de una matriz polimérica reabsorbible produce un polvo antibiótico de larga duración y amplio espectro. Otros tipos de antibióticos, como fluoroquinolonas, glicopéptidos, macrólidos, betalactámicos y otros, pueden usarse también bien solos o combinados, según se desee.

35 **[0047]** Las fibras de las matrices poliméricas reabsorbibles según la presente invención pueden prepararse mediante hilatura por inyección de la mezcla de reacción en isopropanol.

[0048] Estas fibras pueden adaptarse cambiando la cantidad relativa de reactivo de enlace cruzado y/o el uso de polímeros no reactivos. Las fibras que contienen antibiótico pueden entretejerse en un vendaje o usarse como tales para tratar una infección, como una úlcera en el pie diabético séptico.

5 [0049] Las microperlas se preparan fácilmente utilizando dextrano oxidado y dihidrazidas. Tras la mezcla utilizando la jeringa doble, se inyecta la formulación en un aceite mineral removido rápidamente que contiene tensioactivo. Las microperlas resultantes se lavan con disolvente orgánico, se secan y se envasan. Las microperlas pueden suspenderse en agua y pueden inyectarse por una aguja de calibre 23.

10 [0050] La utilidad de la invención se ilustra en mayor medida por las entradas no limitativas mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Aplicaciones ilustrativas de la invención.

Indicación	Forma de administración	Agente bioactivo
Defectos ortopédicos	Gel inyectable o sólido implantable	Matriz ósea desmineralizada u otro agente osteoinductivo
Infecciones localizadas	Gel inyectable, película, microesferas, fibras	Tobramicina clindamicina
Control del dolor	Gel inyectable o microesferas	Bupivacaína
Bloqueos nerviosos regionales	Gel inyectable o microesferas	Bupivacaína
Cáncer	Gel inyectable o microesferas	Carboplatino paclitaxel
Vacuna	Gel inyectable o microesferas	Antígeno, adyuvante

15 [0051] La presente invención se comprenderá mejor tras llevar a cabo un examen cuidadoso de los siguientes ejemplos no limitativos de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1- Preparación de dextrano oxidado

20 [0052] Se disuelve dextrano (4g; Mw 500.000) en 20 ml de agua destilada. Se añadió a esta solución 535 mg de NaIO₄ finamente triturado con agitación rápida. Se agitó la mezcla en la oscuridad durante 1 hora y después se dializó contra tres cambios de agua destilada (1L cada uno). La solución de dextrano oxidado (aproximadamente 70 mg/ml) se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad. Se concentró la solución con un evaporador rotatorio a 40 °C hasta aproximadamente 200 mg/ml.

Ejemplo 2- matriz ciprofloxacina/clindamicina

25 [0053] La solución de dextrano oxidado, preparada como se describe en el Ejemplo 1 (1 ml, 93mg/ml), se cargó en una jeringa de 3 ml. Se cargó un polvo finamente

triturado que contenía 21 mg de dihidrazida adípica, 20 mg de ácido cítrico, y 150 mg de ciprofloxacina en una segunda jeringa de 3 ml. La jeringa, que contenía aproximadamente 0,5 ml de aire junto con la mezcla de polvo se cerró con un tapón macho.

- 5 **[0054]** Justo antes del uso, las dos jeringas se acoplaron utilizando un conector de doble extremo. Se mezclaron los contenidos de las jeringas durante aproximadamente 30 oscilaciones. La instalación de la mezcla en una herida puede llevarse a cabo mediante una aguja o cánula conectada a la jeringa que contiene la mezcla. El tiempo de fraguado de esta formulación es de 8-10 minutos.
- 10 **[0055]** La sustitución de una mezcla de ciprofloxacina y clindamicina (75 mg de cada uno) por ciprofloxacina proporciona una formulación de amplio espectro que cubre los anaerobios así como los aerobios.

Ejemplo 3- Preparación de matriz de bupivacaína FB/CMC

- 15 **[0056]** Se colocó la bupivacaína (100mg) en un mortero y se trituró con 100 mg de carboximetilcelulosa de sodio (CMC) (M_w 70.000). Se mezcló dextrano oxidado (M_w , 500.000; 66 mg/ml; 1ml) con la mezcla de bupivacaína/CMC a temperatura ambiente. Tras obtener una suspensión homogénea, se añadió dihidrazida de ácido adípico (7,8mg). Se traspasó una muestra (200mg) del gel resultante a un tubo de centrifugación de 2 ml para el experimento de liberación en tampón fosfato salino
- 20 (PBS). El perfil de liberación de la formulación aparece en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Día	% Liberación/Día
1	10
2	10
3	10
4	9
5	5
6	5
7	5
8	3

- 25 **Ejemplo 4-** Preparación de matriz de bupivacaína FB/sulfato de dextrano sódico (DSS)

[0057] Se trituró finamente bupivacaína FB (100mg) con 50mg de DSS (M_w , 500.000). Se añadió solución de dextrano oxidada (M_w , 500.000; 66 mg/ml; 1ml) al polvo de bupivacaína-DSS y se mezcló a temperatura ambiente. Se añadió a la suspensión homogénea resultante dihidrazida de ácido adípico (7,8 mg) y ácido succínico (10 mg). Se traspasó una muestra (200 mg) de la mezcla de reacción a un tubo de centrifugación de 2 ml para el experimento de liberación en tampón fosfato salino (PBS). El perfil de liberación de la matriz aparece mostrado en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Día	% Liberación/Día
1	11
2	10
3	9
4	7
5	7
6	7
7	6
8	4

10

Ejemplo 5- Preparación de matriz de piperacilina

[0058] Se colocó piperacilina (sal sódica, 50 mg) en un vaso de 5 ml. Se añadió solución de dextrano oxidada (M_w , 500.000; 85 mg/ml; 1ml) a la piperacilina y se mezcló minuciosamente a temperatura ambiente. Tras crearse una suspensión homogénea, se añadió dihidrazida de ácido adípico (10 mg) y se mezcló minuciosamente. Se traspasó una muestra (200mg) de la formulación resultante a un tubo centrífugo de 2 ml para el experimento de liberación en tampón fosfato salino (PBS). El perfil de liberación de la matriz aparece mostrado en la Tabla 3 a continuación:

15

Tabla 3

Día	% Liberación/Día
1	42

20

Día	% Liberación/Día
2	28
3	21
4	8

Ejemplo 6- Preparación de matriz de ceftiofur

[0059] Se situó ceftiofur-HCl (50 mg) y dihidrazida de ácido adípico (10 mg) en una jeringa de 1 ml. Se conectó la jeringa a una segunda jeringa que contenía 1 ml de dextrano oxidado (Mw, 500.000; 85 mg/ml; 1 ml). Se mezclaron los contenidos de las dos jeringas mediante la realización de 20 oscilaciones. Se traspasó una muestra (200µl) de la mezcla de reacción a un tubo de centrifugación de 2 ml para el experimento de liberación en tampón fosfato salino (PBS). El perfil de liberación de la matriz aparece mostrado en la Tabla 4 a continuación:

10

Tabla 4:

Día	% Liberación/Día
1	2,5
2	2,5
3	2,9
4	3,0
5	3,2
6	3,5
7	4,0

Ejemplo 7- Preparación de matriz de azoalbúmina

[0060] Se disolvió fosfato de sodio (40 mg) en 1 ml de solución de dextrano oxidado (M_w, 500.000; 66 mg/ml). Se añadió azoalbúmina (30 mg) y se mezcló minuciosamente a temperatura ambiente. Tras crearse la suspensión homogénea, se añadió dihidrazida de ácido adípico (8 mg). Después de aproximadamente una hora, se traspasaron 200 mg del compuesto resultante a un tubo de centrifugación para el experimento de liberación en tampón fosfato salino (PBS). El perfil de liberación de la matriz aparece mostrado en la Tabla 5 a continuación:

20

Tabla 5:

Día	% Liberación/Día
1	25
2	14
3	13
4	10
5	8
6	7
7	6
8	5
9	4
10	3
11	3
12	3

Ejemplo 8- Formulación de matriz ósea desmineralizada (DBM)/amicacina

- 5 **[0061]** Se colocó sulfato de amicacina (100 mg), DBM (200 mg), y 8 mg de dihidrazida de ácido adípico en un vaso y se mezcló minuciosamente. Se añadió solución de dextrano oxidado (M_w , 500.000; 66 mg/ml; 1ml) a la mezcla. Se puede usar tobramicina-sulfato o tobramicina-sulfato/clindamicina-HCL (1/1) en lugar de amicacina-sulfato.

Ejemplo 9- Preparación de matriz de paclitaxel

- 10 **[0062]** Se trituró finamente paclitaxel (30 mg) con 40 mg de fosfato monosódico y 30 mg de dihidrazida adípica. Se traspasó el polvo resultante a una jeringa de 3 ml equipada con un tapón Luer. Se conectó la jeringa a una segunda jeringa que contenía 3 ml de dextrano oxidado (M_w , 500.000; 85 mg/ml). Después de aproximadamente treinta oscilaciones de los émbolos de las jeringas, el gel estaba listo para inyectar.
- 15 Por tanto, la mezcla líquida puede instalarse en la cavidad libre mediante lumpectomía en la que gelifica *in situ*. El paclitaxel puede matar las células del cáncer en los márgenes de la cavidad y también sirve como un sensibilizante a la radiación durante la radiación adyuvante.

Ejemplo 10- Preparación de matriz de vancomicina

[0063] Se trituró finamente vancomicina (100 mg) con 30 mg de DSS (M_w , 500.000) y 8 mg de dihidrazida adípica. Se cargó la mezcla en una jeringa de 3 ml equipada con un tapón Luer. Se cargó una solución de dextrano oxidado (1 ml, M_w de 500.000; 66 mg/ml) en una segunda jeringa. Se formó una formulación inyectable tras conectar las jeringas y llevar a cabo 30 oscilaciones de los émbolos de las jeringas.

Ejemplo 11- Preparación de matriz de doxiciclina

[0064] Se trituró finamente doxiciclina-HCl (100mg) con 90 mg de DSS (M_w , 500.000) y 8 mg de dihidrazida adípica. Se cargó la mezcla en una jeringa de 3 ml equipada con tapón Luer. Se cargó solución de dextrano oxidado (1 ml, M_w de 500.000; 66 mg/ml) en una segunda jeringa. Se formó una formulación inyectable tras conectar las jeringas y llevar a cabo 30 oscilaciones de los émbolos de las jeringas.

Ejemplo 12- Preparación de espuma antibiótica

[0065] Una jeringa contiene un dextrano en solución oxidado polimérico (70.000 M_w , 10% oxidación, 160 mg/ml) y carboximetilcelulosa (viscosidad media, 16 mg/ml). La segunda jeringa contiene 15 mg de dihidrazida adípica, 50 mg de cirpofloxacina, y 30 mg de una mezcla efervescente, que estaba compuesta por 1,2 g de bicarbonato de sodio y 1 g de ácido cítrico. Se conectaron las jeringas y se mezclaron los contenidos mediante 20 oscilaciones. Esta espuma antibiótica se utiliza de forma ventajosa en el tratamiento de heridas que están infectadas o que son propensas a infectarse.

Ejemplo 13- Preparación de geles y películas moldeables

[0066] Una jeringa contiene dextrano oxidado (70.000 M_w , 160 mg/ml, y 10% oxidación) y carboximetilcelulosa (viscosidad media, sal sódica, 16 mg/ml). La segunda jeringa contiene dihidrazida adípica (15 mg) y 50 mg de cirpofloxacina. Se conectaron las jeringas y se mezclaron los contenidos y se extrajeron tras 20 oscilaciones. El glicolato de almidón (sal sódica, 30 mg) puede sustituirse por carboximetilcelulosa. Estas formulaciones pueden extenderse rápidamente para dar forma a una película. La alternativa es moldearlas tras lograr una plasticidad aceptable antes de su instalación en un defecto o aplicación en una herida.

Ejemplo 14- Preparación de sales de ácido carboxílico de antibióticos aminoglucósidos

[0067] Se suspendió amicacina (586 mg) en 10 ml de metanol 80%. Se añadió ácido octanóico (700 μ l) con agitación. La mezcla fue agitada durante 3 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente y se trituró el residuo con hexano. El resultado fue un sólido con un punto de fusión de 105-110 °C. Mediante el uso de una estequiometría de 4 ácidos a 1 amicacina se pueden obtener otras sales utilizando este procedimiento. Los ejemplos incluyen hexanoato y laurato. Del mismo modo, se

ha preparado hexanoato, octanoato, y sales de laurato de tobramicina, y gentamicina según los procedimientos del Ejemplo 13.

Ejemplo 15- Preparación de sales de ácidos carboxílicos de clindamicina

5 **[0068]** Se disolvió clindamicina (460 mg) en 5 ml de metanol 80%. Se añadió ácido láurico (200 mg) con agitación. La mezcla fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente y después fue concentrada con un evaporador rotatorio. La trituración con 10 ml de hexano dio un sólido. Tras el secado al vacío durante la noche, el punto de fusión era 103-105°C. Otras sales útiles incluyen hexanoato y octanoato. Se pueden preparar sales de lincomicina de forma similar.

10 **Ejemplo 16-** Preparación de sales de ácidos carboxílicos de bupivacaína

[0069] Se disolvió bupivacaína (576 mg) en 7 ml de metanol 80%. A esta solución agitada se añadieron 316 µl de ácido caprílico. Tras dos horas a temperatura ambiente, la mezcla se concentró usando un evaporador giratorio. El sólido resultante tenía un intervalo de fusión de 90-96 °C. Se puede preparar hexanoato y sales de laurato de forma similar.

Ejemplo 17- Preparación de matriz de doxiciclina

20 **[0070]** Se trituró finamente doxiciclina (100 mg) y se mezcló con 6 mg de hidrazida adípica. Se cargó esta mezcla en una jeringa de 3 ml equipada con un tapón Luer. Se cargó solución de dextrano oxidado (1 ml, Mw de 500.000; 110 mg/ml) en una segunda jeringa. Se formó la formulación inyectable tras conectar las jeringas y realizar 30 oscilaciones de los émbolos de las jeringas.

Ejemplo 18- Preparación de implantes recubiertos de antibiótico

25 **[0071]** Se trituró caprilato de tobramicina (50 mg) junto con caprilato de clindamicina (50mg). Se cargó esta mezcla sólida en una jeringa A (3 ml) con 10 mg de dihidrazida adípica. Se cargó una solución de dextrano oxidado (1 ml; Mw 70.000; 10% oxidación; 100 mg/ml) en una jeringa B (3 ml). Se precalentó un vástago femoral a 60 °C. Se conectaron las jeringas A y B y se mezclaron los contenidos con 20 oscilaciones de los émbolos de las jeringas. Utilizando un cepillo y una de las jeringas equipada con una cánula de punta roma, se recubrió el implante con una capa homogénea de material. Tras secarse durante la noche, el implante recubierto se sumergió en un tubo que contenía tampón fosfato salino (PBS) a 37°. El eluido mostró actividad antibacteriana durante más de una semana.

30 **[0072]** Aunque la invención se ha descrito en relación con los modos de realización que se consideran actualmente más prácticos y preferidos, se debe entender que la invención no debe limitarse al modo de realización descrito, sino que, por el contrario, pretende abarcar diversas modificaciones y configuraciones equivalentes incluidas dentro del alcance y el espíritu de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

1. Una composición bioerosionable para liberar un agente bioactivo, comprendiendo la composición un producto de reacción de una mezcla de reacción compuesta por una solución de dextrano oxidado, una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior.
2. Una composición según la reivindicación 1, que además comprende un agente de liberación para controlar la liberación del agente bioactivo a partir de la composición.
3. Una composición según la reivindicación 2, en la que el agente de liberación comprende un polímero compejante que se une al agente bioactivo.
4. Una composición según la reivindicación 2, en la que el agente de liberación comprende un polímero matriz no reactivo para proporcionar estabilidad estructural y resistencia difusional al agente bioactivo.
5. Una composición según la reivindicación 2, en la que el agente de liberación comprende un ácido alifático o aromático que forma sales con antibióticos aminoglucósidos, vancomicina, tetraciclinas o clindamicina.
6. Una composición según la reivindicación 1, en la que el agente bioactivo comprende al menos uno elegido entre agentes osteoinductivos, antibióticos, anestésicos, factores de crecimiento, células, agentes antitumorales, agentes antiinflamatorios, antiparasitarios, antígenos, adyuvantes y citoquinas.
7. Una composición según la reivindicación 1, en la que el agente bioactivo es un agente osteoinductivo que comprende matriz ósea desmineralizada (DBM).
8. Una composición según la reivindicación 1, en la que la composición se encuentra en forma de un gel, microesfera, película, espuma o fibra.
9. Una composición según la reivindicación 1, en la que el agente regulador del pH incluye fosfato de sodio, ácido cítrico, ácido succínico y/o ácido fumárico.
10. Un kit para la formación de una composición bioerosionable adaptada para la liberación de un agente bioactivo, comprendiendo el kit una primera parte alícuota de una mezcla de reacción compuesta por una solución de dextrano oxidado, y una segunda parte alícuota de una mezcla de reacción compuesta por una mezcla de sólidos que incluye una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior, en el que al mezclar la primera y la segunda parte alícuota de la mezcla de reacción reaccionan para formar una composición bioerosionable solidificada para la liberación del agente bioactivo contenido en la misma.

11. Un kit según la reivindicación 10, en el que una de la primera y segunda parte alícuota comprende además un agente de liberación para controlar la liberación del agente bioactivo a partir de la composición.
- 5 12. Un kit según la reivindicación 11, en el que el agente de liberación comprende un polímero complejante que se une al agente bioactivo.
13. Un kit según la reivindicación 11, en el que el agente de liberación comprende un polímero matriz no reactivo para proporcionar estabilidad estructural y resistencia difusional al agente bioactivo.
- 10 14. Un kit según la reivindicación 11, en el que el agente de liberación comprende un ácido alifático o aromático que forma sales con antibióticos aminoglucósidos, vancomicina, tetraciclinas o clindamicina.
- 15 15. Un kit según la reivindicación 10, en el que el agente bioactivo comprende al menos uno elegido entre agentes osteoinductivos, antibióticos, anestésicos, factores de crecimiento, células, agentes antitumorales, agentes antiinflamatorios, antiparasitarios, antígenos, adyuvantes y citoquinas.
16. Un kit según la reivindicación 10, en el que el agente bioactivo es un agente osteoinductivo que comprende matriz ósea desmineralizada (DBM).
- 20 17. Un kit según la reivindicación 10, que además comprende una jeringa doble que tiene un primer y un segundo cilindro de jeringa que contienen respectivamente una primera y una segunda parte alícuota de la mezcla de reacción.
- 25 18. Un método para fabricar, *ex vivo*, una composición bioerosionable solidificada para liberar un agente bioactivo, comprendiendo el método formar una mezcla de reacción compuesta por una solución de dextrano oxidado, una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior, y permitir que la mezcla de reacción reaccione para formar un composición de liberación de fármaco bioerosionable solidificada.
- 30 19. Un método según la reivindicación 18, que además comprende un agente de liberación para controlar la liberación del agente bioactivo a partir de la composición.
20. Un método según la reivindicación 19, en el que el agente de liberación comprende un polímero complejante que se une al agente bioactivo.
- 35 21. Un método según la reivindicación 19, en el que el agente de liberación comprende un polímero matriz no reactivo para proporcionar estabilidad estructural y resistencia difusional al agente bioactivo.

22. Un método según la reivindicación 19, en el que el agente de liberación comprende un ácido alifático o aromático que forma sales con antibióticos aminoglucósidos, vancomicina, tetraciclinas o clindamicina.
- 5 23. El método según la reivindicación 18, en el que el agente bioactivo comprende al menos uno elegido entre agentes osteoinductivos, antibióticos, anestésicos, factores de crecimiento, células, agentes antitumorales, agentes antiinflamatorios, antiparasitarios, antígenos, adyuvantes y citoquinas.
24. Un método según la reivindicación 18, en el que el agente bioactivo es un agente osteoinductivo que comprende matriz ósea desmineralizada (DBM).
- 10 25. Un método según la reivindicación 18, que comprende permitir que la composición de liberación de fármaco bioerosionable solidificada se forme en un gel, microesfera, película, o fibra.
26. Un método de fabricación de fibra bioerosionable para la liberación de un agente bioactivo que comprende poner en contacto una mezcla de reacción
15 compuesta por una solución de dextrano oxidado, una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior con un alcohol para formar un precursor de fibra del mismo, y dejar que el precursor de fibra solidifique para formar una fibra bioerosionable.
- 20 27. Un método para formar una película bioerosionable para la liberación de un agente bioactivo que comprende moldear una mezcla de reacción compuesta por una solución de dextrano oxidado, una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior, en una película, y permitir
25 que la mezcla de reacción solidifique y forme una película de liberación de fármaco bioerosionable.
28. Un dispositivo médico implantable que comprende un recubrimiento de la composición según la reivindicación 1.
29. Un dispositivo médico según la reivindicación 28, en forma de catéter, stent o
30 dispositivo ortopédico.
30. Un dispositivo médico según la reivindicación 29, en forma de un dispositivo ortopédico elegido entre pernos, tornillos, barras, clavos, alambres, aumentos, copas, e implantes de articulación.
31. Un método para preparar un agente bioactivo adecuado para su liberación en
35 un lugar del cuerpo que necesite el mismo, que comprende las etapas de:
- (i). proporcionar una primera parte alícuota de una mezcla de reacción que comprende una solución de dextrano oxidado, y una segunda parte

alícuota de una mezcla de reacción que comprende una mezcla de sólidos compuestos por una dihidrazida, un agente bioactivo, y opcionalmente un agente regulador del pH en una cantidad suficiente para lograr un pH de la mezcla de reacción de 6 o inferior; y

5 (ii). mezclar la primera y la segunda parte alícuota para formar una mezcla de reacción de las mismas;

siendo la mezcla de reacción adecuada para su instalación en un lugar del cuerpo y adaptada para permitir que se forme de ese modo una composición de liberación de fármaco bioerosionable solidificada *in situ*.

10 32. Un método según la reivindicación 31, en el que la fase (i) incluye proporcionar una jeringa doble con un primer y un segundo cilindro de jeringa que contienen respectivamente la primera y la segunda parte alícuota de la mezcla de reacción.

15 33. Un método según la reivindicación 32, en el que la fase (ii) incluye expulsar la primera y la segunda parte alícuota de las mezclas de reacción del primer y el segundo cilindro de jeringa, respectivamente.

34. Un método según la reivindicación 33, en el que la fase (ii) incluye transferir repetidamente la primera y la segunda parte alícuota de la mezcla de reacción entre el primer y el segundo cilindro de jeringa para mezclar la misma.

20 35. Un método según la reivindicación 31, en el que el agente bioactivo comprende al menos uno elegido entre agentes osteoinductivos, antibióticos, anestésicos, factores de crecimiento, células, agentes antitumorales, agentes antiinflamatorios, antiparasitarios, antígenos, adyuvantes y citoquinas.

25 36. Un método según la reivindicación 31, en el que el agente bioactivo es un agente osteoinductivo que comprende matriz ósea desmineralizada (DBM).

37. Un método según la reivindicación 31, en el que la composición se encuentra en forma de un gel, microesfera, película, espuma, o fibra.