

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 222**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)  
**A61K 31/197** (2006.01)  
**A61K 9/50** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 47/14** (2007.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 9/20** (2006.01)  
**A61K 9/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2013 PCT/EP2013/062398**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186370**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2013 E 13729029 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2861216**

54 Título: **Formulación farmacéutica oral de moléculas BCS de clase III**

30 Prioridad:

**14.06.2012 FR 1255593**

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

**28.11.2019**

73 Titular/es:

**ETHYPHARM (100.0%)  
194 Bureaux de la Colline Bâtiment D  
92210 Saint-Cloud, FR**

72 Inventor/es:

**AILHAS, CAROLINE y  
HERRY, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 733 222 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

Formulación farmacéutica oral de moléculas BCS de clase III.

- 5 La invención se refiere a una formulación farmacéutica oral de molécula BCS de clase III, el baclofeno, que presenta una biodisponibilidad y una permeabilidad mejoradas.

10 La vía oral es la vía prevista en primer lugar cuando tiene lugar la puesta en forma de una nueva entidad debido al cumplimiento del tratamiento que induce. Sin embargo, esta vía se abandona para numerosas moléculas en desarrollo debido a su baja biodisponibilidad oral. Esto puede ser debido a diversos factores que proceden de las mismas propiedades de la molécula, o bien de la fisiología del tracto gastrointestinal (*Fasinu, et al., 2011*). Se han explorado diferentes enfoques estos últimos diez años para mejorar la biodisponibilidad oral de estas moléculas, incluyendo medios físicos o químicos.

15 La clasificación de las moléculas BCS (Biopharmaceutics Classification System) es una herramienta significativa utilizada para el desarrollo de las formas orales en la industria farmacéutica y está adoptada en particular por la FDA, la EMEA y la OMS (*Dahan, et al., 2009*). Se divide en cuatro categorías de moléculas y se basa en los elementos fundamentales que controlan la absorción oral, que son la permeabilidad membranaria intestinal, así como la solubilidad de una molécula en el medio gastrointestinal. Se considera que una molécula es soluble si la dosis máxima de una forma de liberación inmediata es soluble en 250 ml o menos de un medio acuoso cuyo pH está comprendido entre 1,2 y 6,8 y se considera permeable si su absorción a través de la membrana intestinal es superior o igual al 90%. Una molécula de BCS que pertenece a la clase III es muy soluble y poco permeable. Esta última particularidad es el factor que limita la biodisponibilidad oral y puede conducir al abandono del desarrollo de la formulación oral de moléculas que tienen sin embargo un fuerte potencial terapéutico.

25 El baclofeno (figura 1) es una molécula BCS que pertenece a la clase III. Sus características físico-químicas están resumidas en la Tabla 1.

30 Tabla 1: Características físicoquímicas del baclofeno (informe interno)

Masa molar	213.66 g/mol
Punto de fusión	180-191°C
pH de una solución saturada	6,5
pKa	pKa <sub>1</sub> = 3.87
	pKa <sub>2</sub> = 9.62
Solubilidades	• Soluble: HCl 0.1N, NaOH 0.1N
	• Ligeramente soluble: agua (3 mg/ml)
	• Muy ligeramente soluble: Etanol, Metanol
Log P	-1

35 A las dosis terapéuticas habituales, el baclofeno es conocido porque tiene una buena biodisponibilidad oral. Sin embargo, su bajo log P indica una cierta hidrofilia y, por lo tanto, una baja permeabilidad. Esta observación se explica por la presencia de transportadores específicos a nivel del intestino delgado que permiten el paso de la molécula. Éste es de igual importancia en el yeyuno. Por eso, un paso pequeño a nivel del colon supone la presencia de otro mecanismo de paso a través de la barrera intestinal (*Merino, et al., 1989*). Esta zona del sistema digestivo no contiene transportadores, pero como la molécula es hidrófila y de pequeño tamaño, es posible un paso pequeño a través de las uniones estrechas. Por lo tanto, parece que cuando existe una necesidad de una concentración plasmática más importante de baclofeno, la ingesta de una dosis más elevada no es efectiva debido a la saturación de los transportadores. La solución utilizada en clínica es entonces la ingesta de pequeñas dosis a intervalos de tiempo cortos, lo cual puede convertirse rápidamente en una limitación para el paciente.

45 Se ha observado un aumento en la lipofilia del baclofeno y, por lo tanto, de su permeabilidad transcelular gracias a la producción de profármacos de éster de baclofeno (*Leisen, et al., 2003*). Debido a estas propiedades, se encuentra una mayor concentración de profármaco a nivel del tejido diana, el cerebro, gracias a un paso más fácil de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, se debe observar una afinidad más importante para la bomba de eflujos P-gp, así como una hidrólisis parcial del profármaco en baclofeno, lo cual conduce finalmente a una tasa a nivel del sitio de acción más bajo en baclofeno tras una administración del profármaco en comparación con una administración de baclofeno solo.

50 Se ha puesto en evidencia una ventana de absorción del baclofeno a nivel del intestino delgado debido a la presencia de transportadores (*Merino, et al., 1989*). Con el fin de aumentar la biodisponibilidad, esta ventana de absorción podría ser aprovechada así por unas técnicas galénicas que permiten la retención de la forma oral a nivel de la ventana o aguas arriba (*Davis, 2005*). De hecho, un tiempo de residencia más largo a nivel del sitio de absorción debe permitir en teoría un mayor paso de moléculas a través de la barrera intestinal si éstas no son susceptibles de sufrir una degradación presistémica antes de la absorción. Así, unas formas bioadhesivas al moco

intestinal gracias a la utilización de polímeros catiónicos tales como el quitosano, o bien unas formas gastrorretentivas que permiten el hinchamiento y la flotación de la forma a nivel del estómago han aparecido estos últimos años en el desarrollo farmacéutico, pero su eficacia es muy dependiente de la variabilidad intra e inter individual.

5

En unas condiciones fisiológicas normales, el paso paracelular ocupa menos del 0.1% de la superficie total del epitelio intestinal, por lo que no es una vía de paso mayoritaria (*Anilkumar, et al., 2001*). Esto se explica por la presencia de las uniones estrechas entre las células que limitan la absorción de moléculas superiores a 0,1 nm. Así, una acción sobre estas últimas podría permitir un aumento de absorción significativo. Las uniones estrechas desempeñan la función de barrera entre los componentes de los dominios apicales y basolaterales y están compuestas por diversos complejos de proteínas implicados en la regulación de la integridad de las uniones (*Zonula occludens*, actina, claudina-1, etc.) (figuras 2 y 3). Esta integridad se modifica ante diversos agentes fisiológicos y patológicos y, en particular, por unos mensajeros secundarios que proceden de las vías de señalización. Dos factores parecen estar implicados en la acción de los promotores de absorción: la contracción de un anillo de actina-miosina, así como la fosforilación por proteínas quinasas y fosfatasas. *Anilkumar et al.* han listado los promotores de absorción que son objeto de investigación en esta indicación. Entre ellos se encuentran surfactantes, ácidos biliares y derivados, ácidos grasos y derivados, agentes quelantes, el quitosano y sus derivados, así como el conjugado policarbofil-cisteína.

10

15

20

De esta manera, como las uniones estrechas desempeñan una función de barrera y, por lo tanto, de defensa del organismo, es importante que los promotores que actúan en su apertura tengan una acción reversible y no induzcan ninguna toxicidad.

25

La solicitud de patente US 2010/029771 describe una formulación farmacéutica líquida que puede ser integrada en una cápsula para el tratamiento de la gastroparesia y la dispepsia no ulcerosa con unos agonistas de los receptores del ácido gamma-aminobutírico B (GABAB), como el baclofeno, por ejemplo.

30

La solicitud internacional WO 2005/025559 describe una formulación farmacéutica líquida de tipo emulsión que comprende un principio activo tal como el baclofeno en la fase acuosa y unos agentes emulsionantes en la fase oleosa. De manera sorprendente, los inventores han descubierto que la biodisponibilidad, y más particularmente la permeabilidad membranaria intestinal, de las moléculas BCS de clase III puede mejorar considerablemente mediante su formulación en forma de una microemulsión aceite en agua, siendo acuosa la molécula BCS de clase III y estando la fase oleosa constituida por un excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua.

35

En particular, observaron un aumento de la permeabilidad de las células Caco-2 del baclofeno en una formulación microemulsión aceite en agua entre una solución acuosa de baclofeno a 6 mg/ml en 0,01 M de ácido fumárico y el Labrasol. ®.

40

Por consiguiente, el objeto de la invención se refiere a una formulación farmacéutica oral a base de en una microemulsión entre una fase acuosa que comprende por lo menos un principio activo BCS (Biopharmaceutics Classification System) de clase III, siendo dicho principio activo el baclofeno, y una fase oleosa que comprende un excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua.

45

La formulación según la invención tiene las ventajas de una permeabilidad membranaria intestinal mejorada y de no toxicidad.

Se entiende por microemulsión una emulsión de la cual el tamaño de las gotitas es inferior a 200 µm.

50

Se entiende por "un excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua" un excipiente que formará espontáneamente una emulsión aceite en agua con una fase acuosa, es decir, unas gotitas de la fase acuosa rodeadas por una capa lipídica que comprende el excipiente.

55

Con el fin de evaluar el potencial de aumento de la permeabilidad de un promotor de absorción, se pueden realizar las técnicas *in vivo* en la rata o *ex vivo* (en intestino de rata perfundido) (*Koga, et al., 2002*) (*Lin, et al., 2007*) (*Constantinides, et al., 1996*). Unas técnicas *in vitro* se emplean asimismo en membrana intestinal de rata o en cultivos celulares. En un primer enfoque, se emplea muy a menudo la evaluación en la línea celular Caco-2 (*Sha, et al., 2005*).

60

Las células Caco-2 proceden de cultivo de células humanas de origen canceroso capaz de diferenciación en presencia de un medio de cultivo adecuado (*Pontier, 1997-1998*). Sus propiedades dependen del número de cantidad de trasplantes a los que están sometidas. El clon de células obtenido en el paso 198 tiene unas características parecidas a los enterocitos. Las células Caco-2 tienen un tamaño ligeramente inferior al de los enterocitos sanos, pero tienen una monocapa comparable a la del epitelio del intestino delgado. El borde en forma de cepillo está diferenciado y desarrollado y están presentes unas uniones muy estrechas de 10 a 50 Å (más estrechas que las del intestino delgado). Desde un punto de vista bioquímico, las células Caco-2 expresan asimismo las enzimas de los enterocitos. Por otro lado, están presentes muchos transportadores, pero su expresión

65

es inferior a las tasas encontradas *in vivo* y la bomba de eflujos P-gp está sobreexpresada, lo cual puede subestimar una absorción con respecto al *in vivo*

La prueba del MTT es un indicador de la integridad y de la actividad mitocondriales y es comparable a una medición de la viabilidad celular (*Sigentec*). Esta prueba se basa en la actividad de una enzima mitocondrial, la succinato deshidrogenasa. En presencia del sustrato MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), las sales de tetrazolio del sustrato se transforman en cristales insolubles de formazano gracias a la actividad de la succinato deshidrogenasa. Después de la solubilización, se dosifica a continuación la cantidad de sal formazano por espectrofotometría y se compara con un control negativo que tiene una viabilidad celular del 100% (*Buyukozturk, et al., 2010*).

La medición de la resistencia eléctrica transepitelial (o TEER) (en ohm/cm<sup>2</sup>) permite evaluar la integridad celular (*Pontier, 1997-1998*). Esto permite evaluar la toxicidad del producto probado. La medición se realiza antes y después del ensayo y la pérdida de resistencia no debe superar el 30% para concluir en una no toxicidad (*Oroxcell, 2011*).

El lucifer yellow (LY) es un marcador de paso paracelular (*Buyukozturk, et al., 2010*). Su dosificación en el compartimento receptor durante el ensayo de permeabilidad permite observar una apertura de las uniones estrechas. La prueba se puede realizar asimismo después del ensayo para evaluar la integridad celular (*Nollevaux, et al., 2006*). La permeabilidad aparente de la lucifer yellow en condiciones normales es 3.10<sup>7</sup> cm/s (*Oroxcell, 2011*).

Preferentemente, la proporción entre principio activo BCS de clase III/ de excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua en peso está comprendida entre 1/10 y 1/100, de manera particularmente preferida entre 1/40 y 1/80.

Preferentemente, la fase oleosa representa de 1 a 50% de la microemulsión, de manera más preferida de 2 a 30%, de manera particularmente preferida de 5 a 25%, o incluso de 15 a 20%.

Preferentemente, la fase acuosa de la microemulsión de la formulación de la invención es una solución en la que el principio activo BCS de clase III está solubilizado.

Preferentemente, la microemulsión de la formulación de la invención es una microemulsión aceite en agua constituida por una fase acuosa que comprende por lo menos un principio activo BCS (Biopharmaceutics Classification System) de clase III que es el baclofeno y un excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua.

El principio activo de la formulación según la invención es el baclofeno.

Según un modo de realización preferido, se solubiliza en la fase acuosa, preferentemente en ácido fumárico 0,01M.

Preferentemente, un excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua apropiado presenta un índice HLB (Hydrophilic-Lypophilic Balance) superior a 12, de manera particularmente preferida de 13 o 14, por ejemplo se trata del Labrasol® (*Gattefossé*) compuesto por caprilocaproilmacroglglicéridos o de la Gélucire® 50/13 semisólida compuesta por lauroilmacroglglicéridos (*Gattefossé*).

De una manera particularmente preferida, un excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua apropiado se selecciona de entre el grupo constituido:

- por los ácidos grasos de C8-C10, pegilados o no, como el caprato de sodio o uno de sus derivados,
- por los triglicéridos de C8-C10, como los triglicéridos de ácido cáprico (C10) y caprílico (C8), por ejemplo *Miglyol* y *Captex*® (*Sasol Germany GmbH, 2012*),
- por las mezclas de mono-, bi- y triglicéridos, por ejemplo *Capmul*® (*Abitec, 2012*),
- por las mezclas de mono-, bi- y triglicéridos de ácidos grasos esterificados de propilenglicol, por ejemplo de los ácidos cáprico y caprílico, como los caprilocaproilmacroglglicéridos o una mezcla de mono-, bi- y triglicéridos de ácidos grasos esterificados PEG-8 a a razón de 50 a 80% de ácido caprílico y 20 a 50% de ácido cáprico, por ejemplo el *Labrasol*®.

Los *Miglyol*® (*Sasol*) así como los *Captex*® (*Abitec*) son unos triglicéridos de ácido cáprico (C10) y caprílico (C8). El *Capmul*®MCM (*Abitec*) está compuesto por mono- y di-glicéridos de ácido cáprico y caprílico (Tabla 2).

El *Labrasol*® (*Gattefossé*) está compuesto por caprilocaproilmacroglglicéridos, que consiste en una mezcla de mono-, bi- y triglicéridos, así como de ácidos grasos esterificados de propilenglicol (*Gattefossé*). Sus características

(Tabla 2), y en particular su miscibilidad en el agua, resultan particularmente interesantes desde un punto de vista de la formulación.

5 La Gélucire® 50/13 (Tabla 2) es un excipiente semisólido que tiene un HLB elevado de 13 compuestos de lauroilmacroglglicéridos (Gattefossé). El ácido palmítico y el ácido esteárico son los ácidos grasos que componen la Gélucire®.

10 De manera particularmente preferida, el excipiente oleoso autoemulsionable de la microemulsión de la formulación de la invención es el Labrasol®, es decir una mezcla de caprilcaproilmacroglglicéridos que consiste en una mezcla de mono-, bi- y triglicéridos de ácidos grasos esterificados de propilenglicol-8, con una proporción de 50 a 80% de ácido caprílico y 20 a 50% de ácido cáprico. Otro objeto de la invención se refiere a una formulación según la invención para su utilización en el tratamiento del alcoholismo o del mantenimiento de la abstinencia de los alcohólicos.

15 Otro objeto de la invención se refiere la utilización de una microemulsión entre una fase acuosa que comprende por lo menos un principio activo BCS (Biopharmaceutics Classification System) de clase III que es el baclofeno y una fase oleosa que comprende un excipiente oleoso que es autoemulsionable en contacto con el agua para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del alcoholismo o del mantenimiento de la abstinencia de los alcohólicos.

20

Tabla 2: características de los derivados de ácidos grasos comercializados (ABITEC, 2012) (GATTEFOSSÉ) (Sasol Germany GmbH, 2012) N/C = no conocido

	Miglyol® 810	Miglyol® 812	Miglyol® 829	Captex® 300 EP/NF	Captex® 355 EP/NF	Captex® 200P	Capmul® MCM, EP	Labrasol®	Gélucire® 50 /13
Composición	Triglicéridos de: 65-80% ácido caprílico (C8:0)/20-35% ácido cáprico (C10:0)	Triglicéridos de: 50-65% ácido caprílico/30-45% ácido cáprico	Triglicéridos: 45-65% ácido caprílico/30-45% ácido cáprico/15-20% ácido succínico	Triglicéridos de: 50-80% ácido caprílico/20-50% ácido cáprico	Triglicéridos de: 50-80% ácido caprílico/20-50% ácido cáprico	Propilenglicol de: 50-80% ácido caprílico/20-50% ácido cáprico	50-90% ácido caprílico/10-50% ácido cáprico/45-75% mono; 20-50% di; 10% triacilgliceroles	Triglicéridos y mono/di PEG-8 ésteres de: 50-80% ácido caprílico/20-50% ácido cáprico	40-50% ácido palmítico (C16)/48-58% ácido esteárico (C18)
Estado físico a Tamb	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido	Semisólido	Líquido	Semisólido T <sub>F</sub> = 50°C
Solubilidades	Hexano, toluendietiléter, etilacetato, acetona, isopropanol, etanol al 96%.	Hexano, toluendietiléter, etilacetato, acetona, isopropanol, etanol al 96%.	Hexano, toluendietiléter, etilacetato, acetona, isopropanol, etanol al 96%.	Disolventes orgánicos incluyendo etanol al 95%	Disolventes orgánicos incluyendo etanol al 95%	N/C	N/C	Etanol 96°: Muy soluble Cloroformo, cloruro de metileno: Muy soluble Agua: Soluble (HLB = 14) Aceites minerales: Insoluble	Etanol 96°: Insoluble Cloroformo: Fácilmente soluble Cloruro de metileno: Fácilmente soluble Agua: Dispersable (HLB = 13) Aceites minerales: Insoluble
Índice de refracción	1,448-1,451	1,449-1,451	1,456-1,459	1,440-1,452	1,440-1,452	N/C	N/C	1,450-1,470	N/C
Densidad a 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	0,94-0,95	0,94-0,95	1,00-1,02	0,93-0,96	0,93-0,96	N/C	N/C	1,060-1,070	N/C
Viscosidad a 20°C (mPa.s)	27-33	27-33	230-270	25-33	25-33	N/C	N/C	80-110	N/C
Estatus reglamentario	EP, USP, BP, GRAS	EP, USP, BP, GRAS	DMF, GRAS	EP/NF, DMF	EP/NF, DMF	EP/NF, USP, DMF	EP, DMF, GRAS	EP, USP/NF	EP, USP/NF

La formulación farmacéutica de la invención puede ser cualquier formulación farmacéutica galénica oral conocida por el experto en la materia, tanto líquida como sólida.

5 Las formulaciones líquidas apropiadas son cualquier formulación galénica líquida en la que la microemulsión entre una fase acuosa que comprende por lo menos un principio activo BCS (Biopharmaceutics Classification) de clase III y una fase oleosa que comprende un excipiente oleoso autoemulsionable en contacto con el agua permanecerá estable.

10 Las microemulsiones, una vez formadas, pueden ser introducidas directamente en unas cápsulas para una administración oral, flexibles o rígidas, por ejemplo, de gelatina.

Existen numerosas técnicas para formular una forma sólida a partir de una fórmula líquida (*Jannin, et al., 2008*). La pulverización en cámara fría permite, por ejemplo, congelar gotitas que se recristalizan en forma de partículas esféricas sólidas.

15 La fase acuosa de una emulsión también se puede secar por pulverización en lecho de aire fluidizado para formar una "emulsión seca".

20 Ésta también se puede pulverizar sobre esferas de neutros, que tienen eventualmente unas capacidades de adsorción, como unas esferas de celulosa microcristalina. Después del secado, se pueden usar estas esferas para formular unos comprimidos con unos excipientes de compresión.

La utilización de excipientes sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos en caliente permite la utilización de la técnica de termogranulación o de extrusión-esferonización.

25 Por último, la adsorción sobre soporte sólido, tal como la celulosa microcristalina o la sílice, en un mezclador granulador permite la adsorción de una gran cantidad de excipiente líquido manteniendo al mismo tiempo buenas propiedades de flujo. Después del secado, se puede usar el soporte impregnado con la emulsión para formular unos comprimidos con unos excipientes de compresión.

30 La formulación según la invención puede comprender cualquier excipiente adicional habitual de formulación.

La formulación de según la invención comprende de 10 a 80 mg de principio activo por unidad de dosis, preferentemente de 20 a 60.

## 35 Ejemplos

### Ejemplo 1: Materiales y Métodos

#### 40 a. Materias primas

##### i. Principio activo

45 El baclofeno procede de la compañía PCAS.

##### ii. Promotores de adsorción

50 El Labrasol® y la Gélucire® 50/13 proceden de Gattefossé®, el Miglyol® 810 de Sasol® Germany GmbH y el Capmul® MCM y el Captex® 355 de la compañía Abitec®.

##### iii. Otros excipientes

55 Los excipientes utilizados durante los diferentes ensayos son los siguientes: ácido fumárico (Merck), Avicel® PH102 (celulosa microcristalina, FMC Biopolymer), Neusilin® (aluminometasilicato de magnesio, FujiChemicalIndustry), HPMC 603 (hidroxipropilmetilcelulosa, Shin Etsu), Tween® 80 (polisorbato 80, Sigma).

#### b. Ensayos de solubilidad del baclofeno.

60 Ante todo, es importante determinar las solubilidades del principio activo en los excipientes que se desea evaluar. En efecto, de cara a los ensayos sobre células, es importante que el principio activo se presente en forma molecular con el fin de obtener su paso membranario. Las solubilidades se determinan mediante un método visual, mediante la introducción de cantidades pesadas exactamente de baclofeno en el excipiente seleccionado, después de la agitación durante 24 horas. En un primer momento, se evalúan las solubilidades, a temperatura ambiente, del baclofeno en el Labrasol®, el Miglyol® 810 y el Captex® 355. La solubilidad del baclofeno en la Gélucire® 50/13 se determina después de fundir el excipiente a una temperatura superior a 50°C y después colocado en una estufa termostata a 60°C. En un segundo tiempo, con el fin de aumentar la solubilidad del baclofeno en medio acuoso,

se evalúa ésta en una solución acidificada de ácido fumárico 0,01 M. El ácido fumárico no induce ningún problema de estabilidad con el baclofeno según un informe interno de compatibilidades binarias.

### c. Formulaciones lipídicas

5

#### i. Microemulsiones

El Miglyol® 810, el Capmul® MCM y el Captex® 355 son unos excipientes no miscibles en agua. Al ser el baclofeno una molécula hidrófila, se selecciona formular unas microemulsiones a partir de estos excipientes mediante la utilización de diagramas pseudoternarios. Es decir, teniendo una proporción surfactante-cosurfactante de composición fija pero haciendo variar la proporción de esta mezcla con las fases oleosa y acuosa. El objetivo es formular una microemulsión aceite en agua (O/W) y una microemulsión agua en aceite (W/O).

Se realizaron seis ensayos para la obtención de una microemulsión O/W utilizando una mezcla surfactante-cosurfactante Tween®80-Labrasol® en una proporción de 2:1 y el Miglyol®810 para la fase oleosa (figura 4).

Se realizaron cuatro ensayos para la obtención de una microemulsión W/O utilizando una mezcla de surfactante-cosurfactante Tween®80-Capmul®MCM en una proporción de 1:2 y el Captex®355 para la fase oleosa (figura 5).

La fase acuosa, compuesta por agua purificada, es añadida por último bajo agitación. Las microemulsiones se forman entonces instantáneamente. Después, una vez que se ha seleccionado la composición de las mezclas, se realizaron unos ensayos con una solución acuosa de ácido fumárico 0,01 M a 6 mg/ml de baclofeno.

#### ii. Mezclas binarias

25

El Labrasol® y la Gélucire® 50/13 son unos excipientes que se autoemulsionan en presencia de agua. Se prueban varias proporciones agua/Labrasol® o agua/Gélucire® 50/13. Las mezclas agua/Gélucire® 50/13 se realizan a una temperatura superior a 50°C, mientras que las mezclas agua/Labrasol® se realizan a temperatura ambiente.

#### iii. Caracterización

30

##### 1. Viscosidades

La viscosidad de las emulsiones se determina utilizando un viscosímetro rotativo Brookfield DV-II + y del móvil SC4-18 utilizando una geometría de Couette cilíndrica.

35

##### 2. Granulometrías

La granulometría de las emulsiones se mide por dispersión casi elástica de la luz en un granulómetro Coulter® N4 plus. Las mediciones se realizan con un ángulo de 90° directamente sobre las emulsiones, teniendo en cuenta las características del medio dispersante (viscosidad, índice de refracción) y después, tras de la dilución en el agua. El factor de dilución depende de la intensidad medida a 90°, que debe estar comprendida entre  $5 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^6$  golpes/seg para la validez de la medición. Cada medición se realiza por triplicado.

40

##### 3. Estabilidades

45

La estabilidad de las emulsiones se determina visualmente durante dos meses mediante la observación de la aparición o no de un cambio de fase y mediante la medición granulométrica. Se comparan las mediciones obtenidas en un tiempo  $t = 14$  días y  $t = 45$  días.

50

### d. Selección de las fórmulas: Ensayos de permeabilidad en células Caco-2

#### i. Cultivo celular

Se cultivaron y se diferenciaron las células Caco-2 durante 21 a 30 días. Han sufrido un número de trasplantes inferior a 110. El medio de cultivo es un medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera inactivado, con un 1% de aminoácidos no esenciales y de antibióticos.

55

#### ii. Prueba de permeabilidad

60

Las células Caco-2 permitieron la evaluación del potencial de ocho fórmulas, presentadas en las Tablas 5a, 5b, 5c y 5d, en la mejora de la permeabilidad aparente del baclofeno. Las diluciones realizadas son elección del encargado en función de la concentración en baclofeno medible por la técnica de dosificación y en función de la concentración más baja no tóxica dada por unos estudios de toxicidad preliminares. Las composiciones de los medios apicales y basolaterales se proporcionan en la Tabla 3 siguiente.

65

Tabla 3: Composición de los medios apicales y basolaterales de los ensayos en células Caco-2

Medio apical	Medio basolateral
HBSS	HBSS
10 mM HEPES	10 MM HEPES
0,1% BSA	0,1% BSA
200 µM Lucifer Yellow	-
pH 6,8	pH 7,4

Se realizaron unas extracciones tras la introducción de la muestra en el medio apical: a T5 minutos y T125 minutos en el compartimento donante y a T65 minutos y T125 minutos en el compartimento receptor. La dosificación de baclofeno se realiza mediante un método de análisis LC/MS/MS. La permeabilidad aparente del baclofeno y la relación de recubrimiento se calculan entonces de la siguiente manera:

- $P_{app} = [\Delta Q / (\Delta t \times A)] / C_0$  en la que  $P_{app}$  = permeabilidad aparente ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$\Delta Q$  = la diferencia de la cantidad de baclofeno medida entre las dos extracciones

$\Delta t$  = el intervalo de tiempo entre las dos extracciones

A = el área de exposición ( $\text{cm}^2$ )

$C_0$  = La concentración inicial depositada en el compartimento donante.

El resultado se interpreta de la siguiente manera:

Tabla 4: Interpretación de los resultados de permeabilidad aparente.

permeabilidad	Baja	Intermedia	Alta
$P_{app} \times 10^{-6} \text{cm/s}$	< 0,5	0,5 a 5	> 5

Tabla 5a: Composición centesimal microemulsión aceite en agua

Ingredientes	Porcentaje
Captex 355	60
Capmul MCM	20
Tween 80	10
Solución acuosa de baclofeno	10
<b>Total</b>	<b>100</b>

Tabla 5b: Composición centesimal de la emulsión de aceite en agua

Ingredientes	Porcentaje
Miglyol 810	20
Labrasol	20
Tween 80	40
Solución acuosa de baclofeno	20
<b>total</b>	<b>100</b>

Tabla 5c: Composición centesimal de la emulsión de la solución agua-Labrasol

Ingredientes	Porcentaje (solución al 25% de Labrasol)	Porcentaje (solución al 10% de Labrasol)	Porcentaje (solución al 5% de Labrasol)	Porcentaje (solución al 1% de Labrasol)
Labrasol	25	10	5	1
Solución acuosa de baclofeno	75	90	95	99
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Tabla 5d: la emulsión de la solución agua-Gélucire.

Ingredientes	Porcentaje (solución al 5% de Gélucire)	Porcentaje (solución de 1% de Gélucire)
Gélucire 50 /13	5	1
Solución acuosa de baclofeno	95	99
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

- Recubrimiento =

$$\left[ \begin{array}{l} \text{Cantidad residual} \\ \text{en el} \\ \text{compartimento} \\ \text{donante a T125} \end{array} + \begin{array}{l} \text{Cantidad acumulada} \\ \text{en el compartimento} \\ \text{receptor entre T5 y} \\ \text{T125} \end{array} \right] / \begin{array}{l} \text{Cantidad a T5} \\ \text{en el} \\ \text{compartimento} \\ \text{donante} \end{array}$$

5

El resultado debe estar comprendido entre 75 y 125%.

Cada ensayo se realiza tres veces. Para la validez del ensayo, la permeabilidad de un compuesto de referencia también se mide como control positivo. Se trata del metoprolol a 20 µM, una molécula que toma prestado un transporte activo transcelular. El baclofeno solo también se utiliza como control negativo.

10

### iii. Evaluación de la integridad celular

#### 1. Medición de la resistencia transepitelial

15

Antes de cada ensayo, se realiza una medición de la resistencia transepitelial. Ésta debe ser superior a 1500Ω. Se realiza una segunda medición tras la prueba. Si la pérdida de resistencia es superior al 30%, se concluye en una alteración de la monocapa.

#### 2. Prueba de Lucifer Yellow

20

Durante los ensayos, se evalúa asimismo el paso del compartimento apical hacia el basolateral de Lucifer Yellow, un marcador de paso paracelular. Se incuban 200 µM de Lucifer Yellow con el compuesto de prueba y se evalúa su permeabilidad de la misma manera que para este último. Las concentraciones se miden por fluorescencia en los dos compartimentos al principio y al final del ensayo.

25

#### 3. Prueba MTS-PMS

La prueba MTS-PMS es un derivado de la prueba MTT, esta prueba permite verificar la viabilidad de las células. Las células vivas transforman el MTS en formazano soluble en el medio de cultivo. La cantidad de formazano producido se evalúa mediante la medición de la absorbancia a 490 nm. Esta cantidad está directamente relacionada con la proporción de células vivas en el medio.

30

#### e. Puesta en forma sólida: Técnica de adsorción/granulación

35

Tras los resultados de los ensayos en células, el Labrasol® es el excipiente seleccionado para la formulación de una forma sólida. Los ensayos de adsorción/granulación se realizan en un mezclador/granulador Diosna PVAC 10. Se utilizan una cuba de 2 l y una boquilla de pulverización de 0,8 mm.

#### i. Ensayos de granulación

40

Se realizan unos ensayos de granulación en celulosa microcristalina (Avicel® PH102) según la Tabla 6. La velocidad de rotación de la pala de fondo es de 200 rpm y la del desmenuzador de 1500 rpm. El caudal de pulverización es de 30 g/min. Es necesario un tiempo de secado de una hora a 50°C al vacío para la obtención de un grano que contenga una humedad residual inferior al 5% (thermobalanceMettler). El grano se tamiza a continuación sobre mallas de 0,5 mm.

45

Tabla 6: Composición del ensayo de granulación

<b>Carga seca</b>	<b>Funcionalidad de los excipientes</b>	<b>Fórmula (%)</b>	<b>Cantidad (g) CSP 300 g</b>
Avicel® pH 102	Adsorbente	95	285
HPMC 603	Aglutinante	5	15
<b>Solución humectante</b>	-	<b>Fórmula (%)</b>	<b>Cantidad (g) CSP 300 g</b>
Agua purificada	Agente de granulación	50	150
Labrasol®	Promotor de absorción	50	150

50

Se mide la granulometría mediante el granulómetro láser Malvern® y se procesan los datos con la ayuda del programa Mastersizer 2000. Las aptitudes del grano para la compresibilidad y para el flujo se evalúa midiendo el volumen aparente bajo compactación (volumenómetro STAV 2003) y calculando el índice de Carr, así como midiendo el tiempo de flujo en 100 g de polvo a través de un embudo normalizado. Estos ensayos se realizan según la Farmacopea Europea vigente. (Pharmacopée Européenne 7ª edición, 2012).

55

ii. Ensayos de adsorción

Se realizaron asimismo unos ensayos de adsorción simples en un mezclador introduciendo Labrasol® en el Avicel® PH102 o el Neusilin® (aluminometasilicato de mangesio) bajo agitación de las palas, respectivamente, a 150 y 300 rpm. El caudal es de 20 g/min y los ensayos se realizan en caliente a 40°C al vacío con el fin de fluidificar el excipiente oleoso Labrasol. Se probaron asimismo los adsorbentes siguientes: Fujicalin®, Hubersorb®, 600 y Syloid®244FP.

10 **Ejemplo 2: Resultados**a. Solubilidades del baclofeno

Las solubilidades indicadas en la Tabla 7 siguiente se determinan en función de la observación visual de las partículas en los medios.

Tabla 7: Resultados de solubilidad del baclofeno en diversos medios

Producto	Temperatura	Solubilidades del baclofeno
Miglyol®810	Ambiente	<0,1 mg/ml
Captex® 355	Ambiente	<0,1 mg/ml
Labrasol®	Ambiente	0,2-0,4 mg/ml
Gélucire® 50/13	60° C	0,5-1 mg/ml
Medio acuoso ácido fumárico 0,01M	Ambiente	6-7 mg/ml

El baclofeno aparece soluble en medio acuoso y prácticamente insoluble en excipientes oleosos.

b. Formulaciones lipídicasi. Microemulsiones

En función de las composiciones realizadas, se pueden efectuar diferentes observaciones. Con respecto a las microemulsiones a base de Miglyol® 810 y de Labrasol® (figuras 4 y 5), las composiciones 1, 2 y 3 permiten la obtención de medios lípidos y la composición 10 produce un medio lechoso. Las composiciones 8 y 9 son opacas y se obtiene un cambio de fase después de 24 horas.

Las cuatro composiciones realizadas a base de Captex® 355 y Capmul® MCM proporcionan unas microemulsiones claras.

Las microemulsiones realizadas con principio activo no tienen ninguna diferencia visual en comparación con aquellas sin principio activo.

ii. Mezclas binarias

El Labrasol® es miscible en cualquier proporción en agua. Sin embargo, aparece una mezcla clara y homogénea para unas concentraciones en Labrasol superiores al 1% en agua. Para unas concentraciones inferiores al 1%, el medio es turbio y las partículas visibles a simple vista se sedimentan.

La Gélucire® también es miscible en el agua pero solo unas mezclas agua/Gélucire® a unas concentraciones inferiores al 5% permanecen en forma líquida a temperatura ambiente.

iii. Caracterización

En función de los criterios discutidos en la continuación de la descripción, se consideran y se caracterizan en este caso algunas composiciones para ensayos de permeabilidades en células.

1. Viscosidades

Las viscosidades de las microemulsiones se proporcionan en la Tabla 8 siguiente. El valor del par proporciona una indicación de la fiabilidad de la medición.

Tabla 8: Viscosidad de las microemulsiones a temperatura ambiente.

Muestra	Velocidad de rotación del móvil (rpm).	Valor de par (%)	Viscosidad medida (cP)
---------	--	------------------	------------------------

Microemulsión Miglyol®/Labrasol®	6	85	423
Microemulsión Capmul®/Captex®	30	60	59

Las viscosidades de las mezclas binarias son parecidas a las del agua.

2. Granulometrías

5 Las granulometrías se miden 14 días después de la preparación de los sistemas, antes y después de la dilución para las microemulsiones, así como para las mezclas binarias Agua/Labrasol®. Los resultados se indican en las Tablas 9 y 10.

10 Para las microemulsiones, la dilución provoca una desestabilización y la aparición de un medio opaco cuya intensidad a 90° es demasiado elevada para la medición de tamaños de las partículas. Por lo tanto, es necesaria una dilución para obtener una intensidad comprendida en el intervalo recomendado por el fabricante del granulómetro. Las características y, en particular, la viscosidad de la emulsión Miglyol®/Labrasol® no diluida no permiten ninguna medición en el granulómetro Coulter.

15 Para las mezclas Agua/Labrasol®, la dilución realizada es idéntica a la de los ensayos en células Caco-2.

3. Estabilidades de microemulsiones a T = 45 días

20 También se realizan unas mediciones granulométricas, indicadas en la Tabla 9, y se comparan con las obtenidas a los 14 días. No aparece ningún cambio de fase para las microemulsiones colocadas a temperatura ambiente después de 45 días.

c. Ensayos de permeabilidad en Caco-2 y en integridades membranas

25 La medición de la resistencia transepitelial (Figura 6) antes y después del ensayo de permeabilidad informa sobre el potencial tóxico de las ocho fórmulas, así como de los diferentes controles. Solo las microemulsiones inducen una variación de resistencia superior al 30% entre las mediciones iniciales y finales, que indica una pérdida de integridad membrana. Las otras 6 fórmulas, así como los controles, provocan una variación inferior al 30%, que indica una recuperación de la resistencia de las células después del ensayo. La integridad membrana, por lo tanto, no se ve afectada por estas fórmulas.

35 Con respecto a una acción de las fórmulas en las uniones estrechas del manto celular, se sigue la permeabilidad aparente de la Lucifer Yellow para cada ensayo (figura 7). Se observa una acción fuerte de las microemulsiones y de las fórmulas de Labrasol al 10 y al 25% en el paso paracelular entre 4 y 7.10<sup>-6</sup> cm/s. Sin embargo, para las microemulsiones, este resultado puede estar relacionado con la desestabilización membrana. Las fórmulas de Labrasol® al 1% y al 5% así como las de Gélucire® al 5% provocan asimismo un paso de la Lucifer Yellow superior a 3.10<sup>-7</sup> cm/s. Pero sigue siendo bajo ya que es inferior a 0,5.10<sup>-6</sup> cm/s (tabla 4). Los testigos, por su parte, no provocan ninguna apertura de las uniones estrechas.

40 La prueba MTS-PMS muestra que las presentes fórmulas no generan ninguna toxicidad celular.

TABLA 9: GRANULOMETRÍAS DE LAS MICROEMULSIONES A 20°C A T=14D Y T=45D

Mediciones a T = 14 días.					
		Dilución	Medio dispersante	Proporción (%)	Tamaño (nm)
Emulsiones placebo no diluida	Emulsión Miglyol®/Labrasol®	N/A	Viscosidad = 423 cP, Índice de refracción = 1,45	Ausencia de resultados	
	Emulsión Captex®/Capmul®	N/A	Viscosidad = 59 cP, Índice de refracción = 1,45	100	21,3
Emulsiones con Activo no diluidas	Emulsión Miglyol®/Labrasol®	N/A	Viscosidad = 423 cP, Índice de refracción = 1,45	Ausencia de resultados	
	Emulsión Captex®/Capmul®	N/A	Viscosidad = 59 cP, Índice de refracción = 1,45	100	24,2
Emulsiones placebo después de la dilución	Emulsión Miglyol®/Labrasol®	1/5000	Agua	12-17	1
				10-20	50-70
				25-80	130-195
				50-60	218-285

Mediciones a T = 14 días.					
		Dilución	Medio dispersante	Proporción (%)	Tamaño (nm)
	Emulsión Captex®/ Capmul®	1/10000	Agua	1-2	1-3
				98-99	230-500
Emulsiones con activo después de dilución	Emulsión Captex®/ Capmul®	1/10000	Agua	5	17
				11-12	75-77
	88	1000			
	Emulsión Miglyol®/ Labrasol®	1/5000	Agua	100	180-390
Mediciones a T = 45 días.					
Emulsiones con activos no diluidas	Emulsión Miglyol®/ Labrasol®	N/A	Viscosidad = 423 cP, Índice de refracción = 1,45	Sin resultados	
	Emulsión Captex®/ Capmul®	N/A	Viscosidad = 59 cP, Índice de refracción = 1,45	100	27,2
Emulsiones con activo después de dilución	Emulsión Miglyol®/ Labrasol®	1/5000	Agua	12-13	1
				14-20	70-74
				65-87	190-200
	Emulsión Captex®/ Capmul®	1/10000	Agua	1	4-5
			99	530-630	

TABLA 10: GRANULOMETRÍA DE LAS MEZCLAS AGUA/LABRASOL A 20°C A T=D

Labrasol® 25%	Labrasol® 10%	Labrasol® 5%	Labrasol® 5% Placebo	Labrasol® al 1%
50% a 1 nm	50% a 1 nm	30% a 1 nm	20% a 1 nm	> 2 µm
50% a 15 nm	50% a 12 nm	40-50% a 10 nm	80% a 13.5 nm	
	Labrasol® 10% - 1 /200	20-30% a 400 nm		
	525,7 nm +/- 105,6; IP = 0,044	Labrasol® 5% - 1 /100		
		657,5 nm +/- 170; IP = - 0,091		

5 Los resultados de permeabilidad aparente del baclofeno en función de las diferentes fórmulas se proporcionan en la figura 8.

10 Los ensayos en células confirman la baja permeabilidad del baclofeno con una permeabilidad aparente inferior a  $3 \cdot 10^{-7}$  cm/s. Esta permeabilidad aumenta a  $3 \cdot 10^{-6}$  cm/s en el caso de la emulsión Miglyol®/Labrasol®. Se vuelve muy elevada para las fórmulas Captex®/Capmul®/Labrasol® al 25 y al 10%, que van de 5 a  $7 \cdot 10^{-6}$  cm/s. Sin embargo, al igual que para los resultados referentes a la Lucifer Yellow, las permeabilidades asociadas a las microemulsiones se deben ciertamente a la pérdida de integridad membranaria observada. Las fórmulas de Labrasol® al 1 y al 5%, así como las fórmulas que contienen la Gélucire®, no permiten ningún aumento de la permeabilidad aparente del baclofeno. La permeabilidad aparente del metoprolol es muy elevada, ya que es superior a  $6 \cdot 10^{-6}$  cm/s, como se esperaba. Éste es un testigo del paso transcelular y su ausencia de efecto, en la apertura de las uniones estrechas demostrada anteriormente, valida las condiciones experimentales. Las fórmulas más prometedoras para el aumento del paso membranario del baclofeno son así las fórmulas a base de Labrasol®, más particularmente aquellas al 10% y al 25% que permiten respectivamente unos aumentos de 20 y 28 veces la permeabilidad aparente del baclofeno no formulado. Por otro lado, las tasas de recubrimiento calculadas durante los ensayos son de aproximadamente el 100%, lo cual confirma la ausencia de degradación del producto durante el ensayo. No se observa ninguna pérdida.

d. Paso en forma sólida.

25 i. Granulación

Se obtiene un grano que contiene 33% de Labrasol®. Es de color amarillo y grasiento al tacto.

Los resultados de granulometría se muestran en la Figura 9.

30 Los datos obtenidos por el volumenómetro y el tiempo de flujo se indican en la Tabla 11 siguiente.

Tabla 11: Volúmenes tras compactación, densidades, Índice de Carr y tiempo de flujo del grano que contiene 33% de Labrasol®

	Pesaje (g)	V0 (ml)	V10 (ml)	V500 (ml)	V1250 (ml)	$\rho_0$ (g/ml)	$\rho$ compactado (g/ml)	V10-V500 (ml)	Índice de Carr (100x (V10-V1250)/V10)	Tiempo de flujo (s)
Grano 33% Labrasol®	100,14	184	172	158	158	0,54	0,63	14	8,14	

5 ii. Adsorción

Los ensayos de adsorción en celulosa microcristalina a la misma concentración que la obtenida en granulación proporcionan un polvo amarillo, de aspecto graso "arena húmeda" y que forman una masa.

10 Los ensayos de adsorción en Neusilin® permiten la obtención de un polvo que contiene el 60% de *Labrasol*. Esta mezcla es blanca, de aspecto seco y muy volátil.

El objetivo de esta etapa es seleccionar un excipiente con vistas a futuros ensayos de compresión, los excipientes cargados se caracterizan en flujo por la medida del caudal y del índice de Carr ( $I_c$ ) (Tabla 12).

15 TABLA 12: CARACTERIZACIÓN DEL FLUJO DE LOS EXCIPIENTES CARGADOS Y NO CARGADOS CON LABRASOL®

	Caudal de flujo (g/s)	Densidad (g/ml)	$I_c$ (%)	Colabilidad según $I_c$
Avicel® PH102	0	0,34	15,1	Buena
Avicel® PH102 + Labrasol®	0	0,34	16,4	Bastante buena
Fujicalin®	20,2	0,47	6,9	Excelente
Fujicalin® + Labrasol®	19,3	0,65	9,5	Excelente
Neusilin® US2	2,9	0,15	8,9	Excelente
Neusilin® US2 + Labrasol®	23	0,48	6,0	Excelente
Neusilin® UFL2	0	0,11	25,0	Pasable
Neusilin® UFL2 + Labrasol®	0	0,21	29,5	Mala
Hubersorb® 600	0	0,08	25,0	Pasable
Hubersorb® 600 + Labrasol®	0	0,17	32,9	Muy mala
Syloid® 244FP	0	0,07	14,8	Buena
Syloid® 244FP + Labrasol®	0	0,30	12,5	Buena

20 De esta manera, no se consideran los polvos adsorbidos sin flujo (Hubersorb® 600, Avicel® PH102, Neusilin® US2, Syloid® 244FP). El Neusilin® US2 y Fujicalin® adsorbidos tienen por su parte un flujo muy bueno y, por lo tanto, podrán ser utilizados.

25 I. Discusión

Elección de las fórmulas para ensayos de permeabilidad y estabilidad

30 Como se esperaba, la solubilidad del principio activo en los promotores de absorción líquida resultó muy baja ya que es inferior a 1 mg/ml. En efecto, el baclofeno es un PA hidrófilo, como lo indica su log P de -0,96 (*Benet, et al., 2011*), mientras que los promotores de absorción son unos aceites.

35 Sin embargo, los productos tales como el Labrasol® y la Gélucire® 50/13 tienen la particularidad de presentar un alto HLB del orden de 13-14 (Gattefossé) que permite su miscibilidad con el agua. Se ha decidido así realizar unas mezclas binarias de Labrasol® o de Gélucire® con una solución acuosa que contiene el baclofeno previamente solubilizado. Las proporciones Labrasol®/agua se eligen con el fin de evaluar un impacto eventual de la concentración de Labrasol® en las células. Con respecto a la Gélucire®, se ha intentado que la mezcla permanezca en forma líquida a temperatura ambiente, lo cual limita el intervalo de las concentraciones inferiores al 5%. Se observa que a bajas concentraciones (inferiores al 5% para la Gélucire® e inferior al 1% para el Labrasol®), las mezclas de Labrasol y de Gélucire presentan un problema. La medición granulométrica indica que las partículas de la mezcla de Labrasol® son muy superiores a las observadas para las concentraciones más elevadas (2  $\mu\text{m}$  versus 13 nm). Los tamaños obtenidos para las soluciones más concentradas pueden explicar la sedimentación observada. Por último, se prepararon cuatro fórmulas de Labrasol® al 1, 5, 10 y 25%, así como dos fórmulas de Gélucire® al 1 y 5%, y se enviaron al encargado.

En cuanto a las microemulsiones compuestas de Miglyol®/Labrasol®, se proporcionan tres composiciones claras y estables visualmente (Tabla 13).

TABLA 13: MICROEMULSIONES MIGLYOL®/LABRASOL® ESTABLES

Microemulsión	Miglyol®	Labrasol®	Tween® 80	Fase acuosa
1	10 %	27 %	53 %	10 %
2	10 %	23 %	47 %	20 %
3	20 %	20 %	40 %	20 %

Para el ensayo en células, se considera la composición 3 debido a diversos criterios. Por un lado, el Tween® 80 utilizado como surfactante es conocido por sus problemas de toxicidad, la fórmula que menos contiene parece por lo tanto más segura. Además, la proporción en agua es mayor y permite por lo tanto la introducción de más ingrediente activo. Por último, la cantidad de Miglyol® importante desde el punto de vista de la promoción de absorción también es más importante.

Las cuatro microemulsiones preparadas con Captex®/Capmul® producen unas fórmulas claras y estables (Tabla 14).

TABLA 14: MICROEMULSIONES CAPTEX®/CAPMUL® ESTABLES

Microemulsión	Captex®	Capmul®	Tween® 80	Fase acuosa
1	60 %	20 %	10 %	10 %
2	64 %	22 %	11 %	3 %
3	55 %	28 %	14 %	3 %
4	56 %	26 %	13 %	5 %

Debido a los mismos criterios que anteriormente, la composición 1 se selecciona para el ensayo en células.

De esta manera, se mide la permeabilidad del baclofeno incorporado en dos microemulsiones de composiciones diferentes.

El mecanismo de paso del baclofeno. (Merino, et al., 1989) consiste en un paso activo gracias a unos transportadores, pero éstos están saturados en altas dosis. Al no conocer la composición de las células Caco-2 en transportadores, se busca una concentración elevada de baclofeno en las fórmulas de manera que los transportadores presentes estén saturados. De esta forma, solo se evaluará el aumento del paso paracelular. La concentración con saturación de baclofeno en el agua es de 3 mg/ml. (Informe interno de preformulación). Sin embargo, su solubilidad depende en gran medida del pH como las funciones carboxílicas presentes en la molécula. La adición de ácido fumárico a 0,01 M, demostrada como compatible con el baclofeno por la relación interna de preformulación, permite así duplicar la solubilidad de baclofeno a 6 mg/ml. El pH es entonces de 3,88.

Según Constantinides et al (1996), el pH de una microemulsión no influye en su estabilidad ni en su tamaño de partículas si los surfactantes utilizados no están ionizados o no son ionizables. La sustitución de la fase acuosa de las microemulsiones por ácido fumárico 0,01 M a 6 mg/ml de baclofeno no provoca así ninguna desestabilización visual de las microemulsiones.

La estabilidad de los sistemas se controla también mediante mediciones granulométricas 14 y 45 días después de la realización de las microemulsiones.

Con respecto a la emulsión Captex®/Capmul®, se obtiene una medición de 21,3 nm a los 14 días para la fórmula de placebo, lo cual confirma la presencia de una microemulsión. Se obtiene una medición a 24,2 nm para la fórmula con principio activo que indica que el principio activo no influye en el tamaño de las partículas como lo sugiere el estudio de (Prajapati, et al., 2012). Sin embargo, los estudios de Buyukozturk et al (2010) y Gundogdu et al (2011) muestran una influencia del ingrediente activo en el tamaño de los glóbulos. Después de 45 días, la medición es de 27,2 nm, lo cual confirma la estabilidad del sistema. Con el fin de estudiar la influencia de la dilución en la presente muestra, se realizaron diferentes diluciones. Durante este estudio, los sistemas se vuelven opacos, lo cual indica una desestabilización de las fórmulas y una posible inversión de fase, tal como lo explica. Prajapati et al. La inversión de fase se confirma mediante las mediciones en la emulsión Captex®/Capmul®, ya que las mediciones de tamaño parecen muy superiores, del orden de 230 a 500 nm. La presencia del activo tampoco parece en este caso tener incidencia en estas mediciones.

La medición de granulometría de la emulsión Miglyol®/Labrasol® no se pudo realizar debido a la viscosidad elevada del medio medida a 423 cP. Para evaluar la estabilidad de la emulsión Miglyol®/Labrasol®, se diluye el sistema pensando que la dilución no afecta al tamaño de las partículas de la emulsión, efecto respaldado por Prajapati et al. Para la emulsión Miglyol®/Labrasol®, las mediciones con activo a los 14 días parecen superiores a

las obtenidas con placebo. Sin embargo, las mediciones activas a los 45 días son del mismo orden de magnitud que las de la emulsión de placebo. Por lo tanto, parece difícil concluir en este caso sobre la estabilidad granulométrica de la emulsión Captex®/Capmul®. Se puede observar sin embargo visualmente la ausencia de cambio de fase durante los dos meses de observación, lo cual permite concluir sobre la estabilidad macroscópica de los sistemas.

a. Interpretación de los resultados de permeabilidad relacionados con la caracterización de las fórmulas

La observación de una permeabilidad muy baja del baclofeno no formulado, inferior a  $0,5 \cdot 10^{-6}$  cm/s, permite suponer que la concentración aplicada (30 µg/ml) está cerca de la saturación de los transportadores. Este valor puede ser comparado con los de los ensayos Labrasol® al 25%, al 10% y Gélucire® al 1% diluidos de la misma manera 200 veces. La Gélucire® al 1% no permite ningún aumento de la permeabilidad aparente mientras que los ensayos con el Labrasol® permiten un gran aumento de esta permeabilidad 20 y 28 veces.

En lo que se refiere a las fórmulas diluidas 100 veces (Labrasol® al 5%, Labrasol® al 1% y Gélucire® al 5%), los valores de permeabilidad son muy bajos, a veces incluso inferiores a los del baclofeno no formulado. Ahora bien, las concentraciones de baclofeno depositado en células para estos ensayos son dos veces más altas que las del control negativo. Se puede pensar por lo tanto que la concentración del control no está completamente en la saturación completa de los transportadores. Las permeabilidades no pueden ser así comparadas totalmente entre ellas, ya que dependen de la concentración de principio activo que resulta diferente de una fórmula a otra. Los ensayos de Gélucire® ilustran bien este propósito. En efecto, la concentración de Gélucire® es más importante para la Gélucire® al 5% que para la Gélucire® al 1%, incluso después de la dilución. Esto podría explicar los resultados de permeabilidad de Lucifer Yellow, que son más importantes en el primer caso y sugerir un ligero efecto de la Gélucire® en el paso paracelular. Sin embargo, la permeabilidad del baclofeno es más importante para la Gélucire® al 1%, ciertamente debido a la menor concentración de baclofeno que permite un paso facilitado de la molécula.

A pesar del efecto de la concentración de baclofeno, se puede observar sin embargo una gran diferencia en la permeabilidad entre las fórmulas Labrasol® al 10% y al 25% y las fórmulas Labrasol® al 1% y al 5%. En un primer momento, la investigación de diferencias en la estructura de las mezclas se busca en particular mediante la medición granulométrica de las partículas. En efecto, *Koga et al.* han demostrado la importancia de la concentración de Labrasol® en el tamaño de las partículas que aumentaría con la concentración. El Baclofeno estaría mejor rodeado por el Labrasol®, lo cual permitiría aumentar su permeabilidad ya que el principio activo y el componente lipídico que permiten la apertura de las uniones estrechas llegarían en el mismo momento a nivel de la membrana. Se realizaron unas primeras mediciones en las fórmulas no diluidas. Para las fórmulas 1 al 5, 10 y 25%, las mediciones obtenidas son del mismo orden de magnitud que las medidas por *Koga et al.* pero no se ha identificado claramente ninguna relación entre la concentración de Labrasol® y el tamaño de las partículas. Se observa incluso la aparición de una población a 400 nm para la fórmula al 5% que desaparece en la fórmula de placebo y sugiere una influencia del principio activo en el tamaño de las partículas. Sin embargo, las mediciones realizadas en fórmulas después de la dilución anulan la hipótesis de una influencia del diámetro de las partículas, ya que desaparecen las diferencias observadas. Por otro lado, se observa un aumento importante de tamaño de las partículas con la dilución.

Se debe observar que teniendo en cuenta las diluciones efectuadas en células, se probaron dos concentraciones idénticas de Labrasol® (Tabla 15) y no proporcionaron los mismos resultados de permeabilidad. Este punto es un argumento a favor de la importancia de la concentración inicial de principio activo en el aumento del paso membranario. La relación principio activo/Labrasol® resulta importante por lo tanto en los resultados observados. La Tabla 15 recuerda los factores de aumento observados según las relaciones principio activo/Labrasol® utilizadas.

Tabla 15: Aumento de la permeabilidad del baclofeno en función de la relación principio activo/Labrasol® y de la concentración de Labrasol®

Relación PA/Labrasol®	Factor de aumento de Papp	Concentración Labrasol®
1/1,7	0	0,01 %
1/8,8	0	0,05 %
1/13,4	7	0,03 %
1/18,5	<b>20</b>	0,05 %
1/55,5	<b>28</b>	0,125 %

Parece así que el aumento de la permeabilidad aparente del baclofeno ocurre solo a partir de un cierto umbral de Labrasol® con respecto a la concentración de baclofeno.

Se obtiene asimismo un aumento de permeabilidad aparente para las microemulsiones. Sin embargo, a pesar de esta observación, éstas no se consideran debido a la toxicidad demostrada en el manto celular por la pérdida de

la integridad membranaria.

Finalmente, a la vista del aumento importante de permeabilidad obtenido con el Labrasol®, el resto del estudio se orienta principalmente hacia este excipiente, en particular para los ensayos galénicos.

5

b. Ensayos de adsorción/Granulación.

Los ensayos de paso en forma sólida por granulación realizados con la celulosa microcristalina no permiten la introducción de una cantidad superior al 33% de Labrasol®. Por comparación visual con el ensayo de adsorción, el grano de Labrasol® parece presentar mejores propiedades debido a un efecto menos "húmedo", y a la obtención de grano que permite en teoría un mejor flujo en particular con vistas a futuros ensayos de compresión. El índice de Carr calculado de 8,14 permite suponer buenas propiedades de flujo, pero bajas propiedades de compresibilidad. Sin embargo, se observa una ausencia de flujo en embudo normalizado.

10

Se realizaron entonces otros ensayos de adsorción con Neusilin®, un silicato que tiene una capacidad de adsorción tres veces superior a la de la celulosa microcristalina. (*Neusilin application data, www.Neusilin.com*). Se prefiere la técnica de adsorción ya que permite la introducción de mayores cantidades de líquido con respecto a la granulación. De hecho, esta última técnica también necesita la adsorción de una cierta cantidad de agua que reduce el volumen disponible para el aceite. Se obtiene una mezcla seca que contiene 60% de Labrasol®, lo cual es alentador y puede permitir la introducción de este polvo en una forma oral farmacéutica.

15

20

**Lista de las abreviaturas**

Ac	Ácido
ATP	Trifosfato de adenosina
BCS	Biopharmaceutical Classification System
BP	British Pharmacopoeia
BSA	Albúmina de suero bovino
C10, C8	Ácido graso compuesto por 10 u 8 átomos de carbono.
cP	centiPoise
d <sub>10d50d90</sub>	Deciles 10,50 y 90%.
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
DMF	Drug Master Files
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E/H	Agua en aceite
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EP	Pharmacopée Européenne
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
O/W	Aceite en agua
HBSS	Hank'sBalanced Salt Solution
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico
HLB	Equilibrio hidrófilo/lipófilo
IP	Índice de polidispersidad
IP3	Trifosfato de inositol
JS	Uniones estrechas
LC/MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas en tándem
LY	Lucifer yellow
ME	Microemulsión
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
N/C	No conocido
NF	Norma francesa
OMS	Organización mundial de la salud
PA	Principio activo
P <sub>aplicación</sub>	Permeabilidad aparente
P-gp	P-glicoproteína
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PLC	Fosfolipasa c
rpm	Rotor por minuto (= revoluciones por minuto)
todo	Tiempo
T5, T65, T125	Tiempo a los 5, 65 o 125 minutos.
T <sub>amb</sub>	Temperatura ambiente
TEER	Resistencia transepitelial
T <sub>F</sub>	Temperatura de fusión
USP	United States Pharmacopoeia

V0	Volumen a granel
V10, V500, V1250	Volumen aparente después de 10, 500 o 1250 asentamientos.
ZO	<i>Zonula occludens</i>
$\rho$	Masa volúmica

## Referencias

- 5 **Abitec** Fiches techniques // Capmul MCM EP; Captex 355 EP/NF; Captex 300 EP/NF; Captex 200P. - 2012.
- Anilkumar P [et al.] A rationalized description on study of intestinal barrier, drug permeability and permeation enhancers [Revisión] // Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences vol 2, n° 4. - 2001. - pp. 431-449.
- 10 Boonme P [et al.] Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/brij 97:1-butanol [Artículo] // AAPS PharmSciTech, vol 6, n°2, artículo 45. - 2006.
- Brochette Pascal Emulsification-Elaboration et études des émulsions, J 2150 [En línea] // Techniques de l'ingénieur. - 2012. - 22 marzo 2012.
- 15 Buyukozturk F, Benneya J, C y Carrier R, L Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics [Artículo] // Journal of Controlled Release, vol 142. - 2010. - pp. 22-30.
- 20 Cho S-W, Lee J, S y Choi S-H Enhanced oral bioavailability of poorly absorbed drug. I. Screening absorption carrier for the ceftriaxone complex [Revisión] // Journal of Pharmaceutical Sciences, vol 96, n°3. - 2004. - pp. 612-620.
- Choi S-H, Lee J-S y Keith D** Compositions and methods to improve the oral absorption of antimicrobial agents [Patente]: EP 1 294 361 B1 - WO 2001/097851. - International, 2011.
- 25 Constantinides P, P [et al.] Water-in-oil microemulsions containing medium-chain fatty acids/sats: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation [Revisión] // Pharmaceutical Research, vol 13, n°2. - 1996. - pp. 210-215.
- 30 Constantinides P, P y Scalart J-P Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides, [Revisión] // International Journal of Pharmaceutics, vol 158. - 1997. - pp. 57-68.
- 35 Constantinides P, P Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: Physical and biopharmaceutical aspects [Revisión] // Pharmaceutical Research, vol 12, n°11. - 1995. - pp. 1561-1572.
- Dahan A, Miller J, M y Amidon G, L Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS Classification of the world's top oral drug [Revisión] // The AAPS Journal, vol 11, n°4. - 2009. - pp. 740-746.
- 40 Davis S, S Formulation strategies for absorption windows [Revisión] // Drug Discovery today, vol 10, n°4. - 2005.
- DeLuca T, Kaszuba M y Mattison K Optimizing silicone emulsion stability using zeta potential [Artículo] // American Laboratory News. - Julio 2006.
- 45 Fan Y [et al.] Improved intestinal delivery of salmon calcitonin by water-in-oil microemulsions [Revisión] // International Journal of Pharmaceutics, vol 416. - 2011. - pp. 323-330.
- Fasinu P [et al.] Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability [Revisión] // Biopharmaceutics and drug disposition, vol 32. - 2011. - pp. 185-209.
- 50 FDA Code of federal regulations title 21, parte 172 y 184 [En línea] // U.S Food and Drug Administration. - 1 abril 2011. - 9 mayo 2012. - <http://www.accessdata.fda.gov>.
- Gattefossé** Lipid excipients for oral bioavailability enhancement.
- 55 Gundogdu E, Gonzales Alvarez I y Karasulu E Improvement of effect of water-in-oil microemulsion as an oral delivery system for fexofenadine: in vitro and in vivo studies [Artículo] // International Journal of Nanomedicine, vol 6. - 2011. - pp. 1631-1640.
- 60 ICI Americas Inc The HLB system: a time-saving guide to emulsifier selection [Libro]. - Wilmington: Chemmunique, 1976.
- Jannin V, Musakhanian J y Marchaud D Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based

- formulations [Artículo] // *Advanced drug delivery reviews*, vol 60. - 2008. - pp. 734-746.
- 5 Koga K, Kawashima S y Murakami M In vitro and in situ evidence for the contribution of labrasol and Gélucire 44/14 on transport of cephalexine and cefoperazone by rat intestine [Revisión] // *European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol 54. - 2002. - pp. 311-318.
- 10 Leisen C, C [et al.] Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependant efflux pump P-glycoprotein: relevance for their permeation across the blood-brain barrier? [Revisión] // *Pharmaceutical Research*, vol 20, n°5. - 2003. - pp. 772-778.
- 15 Lin Y [et al.] Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamin123, a P-Glycoprotein substrate, in rats [Revisión] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol 30, n°7. - 2007. - pp. 1301-1307.
- 20 Maher S [et al.] Safety and efficacy of sodium caprate in promoting oral drug absorption: from in vitro to the clinic [Revisión] // *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol 31. - 2009. - pp. 1427-1449.
- Merino M [et al.] Evidence of a specialized transport mechanism for the intestinal absorption of baclofen [Revisión] // *Biopharmaceutics and Drug disposition*, vol 10. - 1989. - pp. 279-297.
- 25 Motlekar N [et al.] Oral delivery of low-molecular-weight heparin using sodium caprate as absorption enhancer reaches therapeutic levels [Revisión] // *Journal of drug targeting*, vol 13, n°10. - 2005. - pp. 573-583.
- NatafS Le tissu épithélial [En línea] // *Histologie*. -11 mayo 2012. - <http://histoblog.viabloga.com>.
- 30 Nekkanti V [et al.] Solid self-microemulsifying formulation for candesartan cilexetil [Revisión] // *AAPS PharmSciTech*, vol 11, n°1. - 2010. - pp. 9-17.
- Nollevaux G [et al.] Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21) [Artículo] // *BMC cell Biology*, vol 7, n°20. - 2006. - pp. 1471-2121.
- Oroxcell Protocole d'essais sur cellules Caco-2. - Romainville: [s.n.], 15 diciembre 2011.
- 35 Pontier Catherine Coculture de cellules Caco-2/TC7 HT29-MTX: comparaison avec les modèles Caco-2/TC7 et HT 29-MTX [Informe]. - [s.l.]: Université de Paris XI, centre d'études pharmaceutiques, 1997-1998.
- 40 Prajapati H, N, Dalrymple D, M y Serajuddin A, T, M A comparative evaluation of Mono- Di- and Triglyceride of médium chaon fatty acids by lipid/surfactant/water phase diagram, solubility détermination and dispersion testing for application in oharmaceutical dosage form development [Artículo] // *Pharmaceutical research*, vol 29. - 2012. - pp. 285-305.
- pubchem Sodium Caprate [En línea] // *pubchem*. - 10 abril 2012. - <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- 45 Redzic Z Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences [Artículo] // *Fluids and barriers of the CNS*, vol 8, n° 3. - 2011.
- 50 Sachs-Barrable S [et al.]Lipid excipients peceol and Gélucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of rhodamine 123 partially due to modifying P-glycoprotein protein expression within Caco-2 cells [Revisión] // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol 10, n°3. - 2007. - pp. 319-331.
- Sasol Germany GmbH Product information 09.04 // Miglyol 812, 812, 818, 829, 840 neutral oils for pharmaceutical and cosmetics. - 2012.
- 55 Sha X [et al.] Effect of self-microemulsifyinf drug delivey systems containing labrasol on tight junctions in Caco-2 cells [Revisión] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 24. - 2005. - pp. 477-486.
- Sigentec Tests de cytotoxicité [En línea] // *site Web Sigentec*. - 7 mayo 2012. - <http://www.sigentec.com/html/fr/tests/cytotoxicite.html>.
- 60 Benet L, Z, Broccatelli F y Oprea T, I BDDCS applied to ver 900 drugs [Artículo] // *The AAPS Journal*. - 2011.
- Kochak G, M [et al.] The pharmacokinetics of baclofen deribed from intestinal infusion [Artículo] // *Clin Pharmacol Ther*. -1985. - Vol. 38: pp 251-257.
- 65 KMerino M [et al.] Evidence of a specialized transport mechanism for the intestinal absorption of baclofen [Revisión] // *Biopharmaceutics and Drug disposition*, vol 10. - 1989. - pp. 279-297.

Neusilin Application data [En línea] // Neusilin.com. - [http://www.neusilin.com/library/application\\_data](http://www.neusilin.com/library/application_data). - 05 06 2012.

- 5 Pharmacopée Européenne 7<sup>a</sup> edición // Capítulos 2.09.34-Masse volumique vrac et masse volumique après tassement y 2.09.36-Aptitude à l'écoulement des poudres. - 2012. - Vol. 7.4.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Formulaci3n farmac3utica oral a base de una microemulsi3n entre una soluci3n acuosa que comprende por lo menos un principio activo BCS (Biopharmaceutics Classification System) de clase III, siendo dicho principio activo el baclofeno, y una fase oleosa que comprende un excipiente oleoso autoemulsionante en contacto con el agua, siendo dicho excipiente oleoso autoemulsionante en contacto con el agua una mezcla de mono-, bi- y triglic3ridos y de 3cidos grasos esterificados PEG-8 a raz3n de 50 a 80% de 3cido capr3lico y de 20 a 50% de 3cido c3prico.
- 10 2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, presentando dicho excipiente oleoso autoemulsionante en contacto con el agua un 3ndice HLB superior a 12.
3. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha fase oleosa representa de 1 a 50% de la microemulsi3n, preferentemente de 2 a 30%, de manera particularmente preferida de 5 a 25%.
- 15 4. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha microemulsi3n es una microemulsi3n aceite en agua constituida por dicha fase acuosa y por dicho excipiente oleoso autoemulsionante en contacto con el agua.
- 20 5. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando dicho excipiente oleoso autoemulsionante en contacto con el agua presente en una relaci3n de 1/10 a 1/100 en peso con respecto al principio activo.
- 25 6. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma l3quida que comprende dicha microemulsi3n.
7. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en forma s3lida.
- 30 8. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 7, en forma de c3psula blanda flexible o r3gida que comprende dicha microemulsi3n en el interior de la c3psula blanda.
9. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 7, en forma de comprimido que comprende un soporte neutro recubierto o impregnado con dicha microemulsi3n, secado y despu3s comprimido con unos excipientes de compresi3n.
- 35 10. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilizaci3n en el tratamiento del alcoholismo o del mantenimiento de la abstinencia de los alcoh3licos.

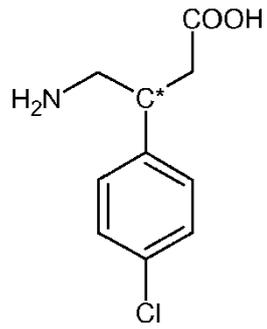


FIGURA 1

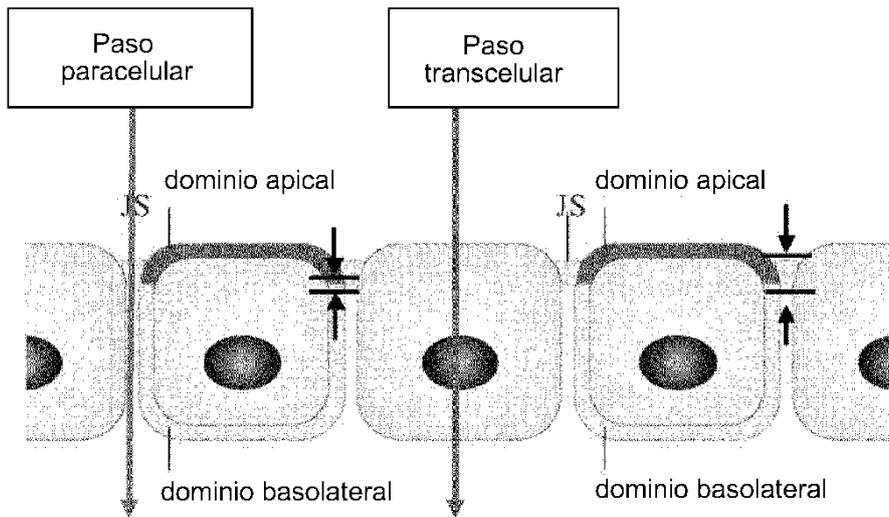


FIGURA 2

*JS = Uniones estrechas*

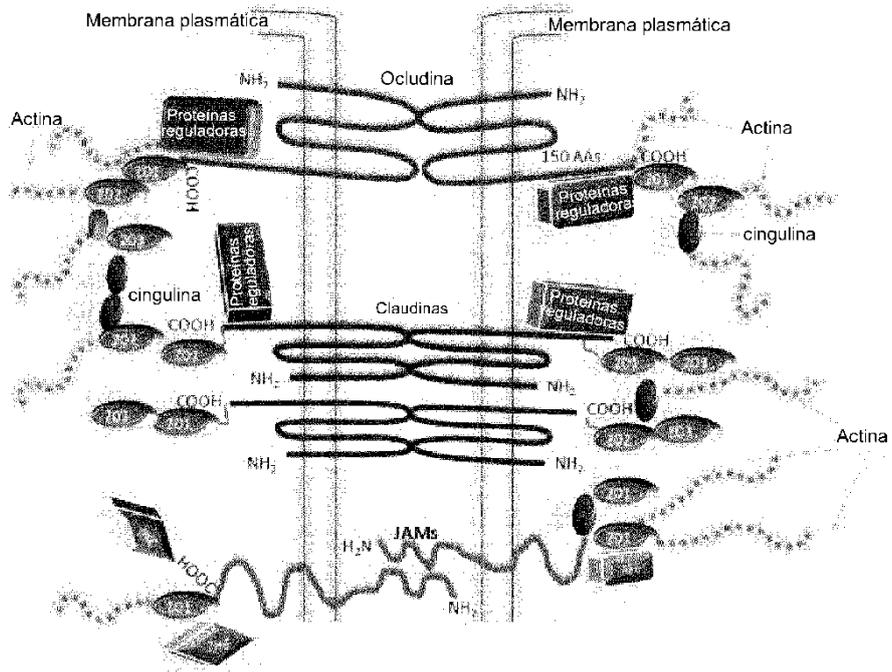
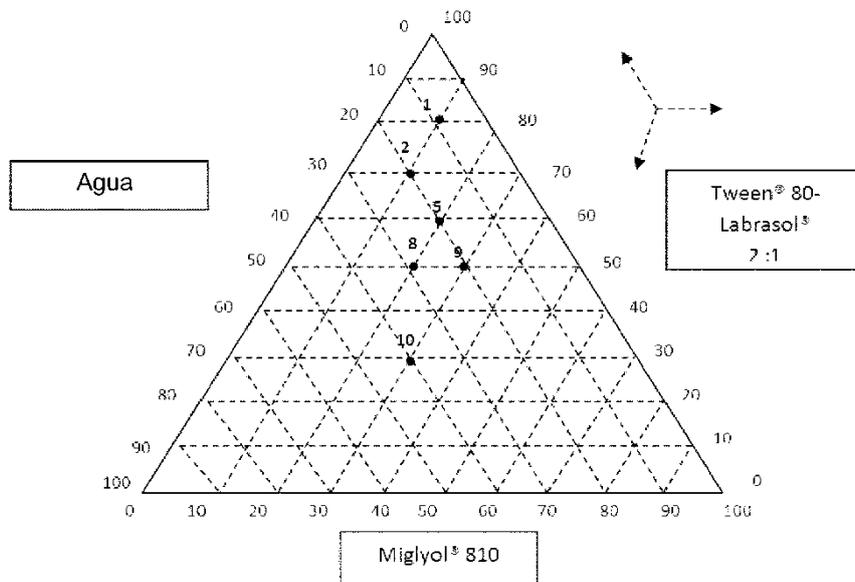
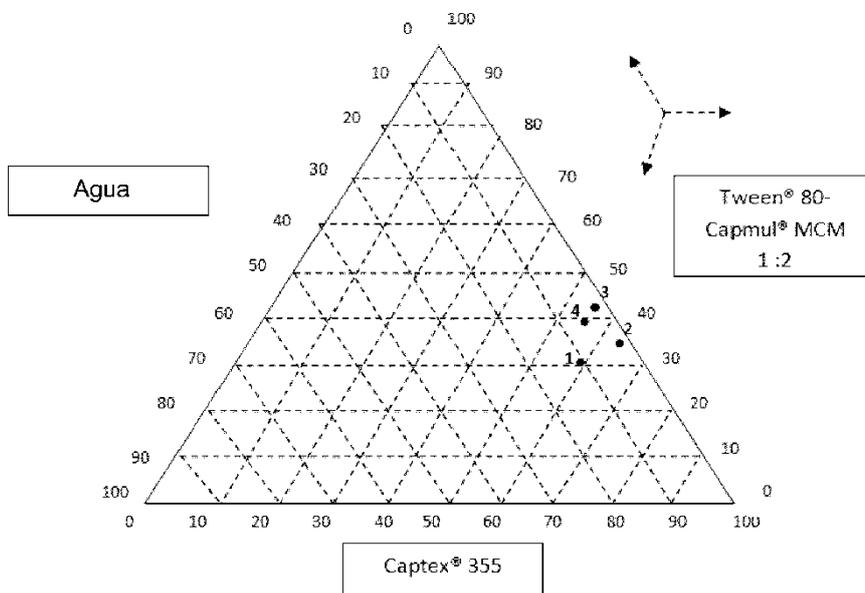


FIGURA 3

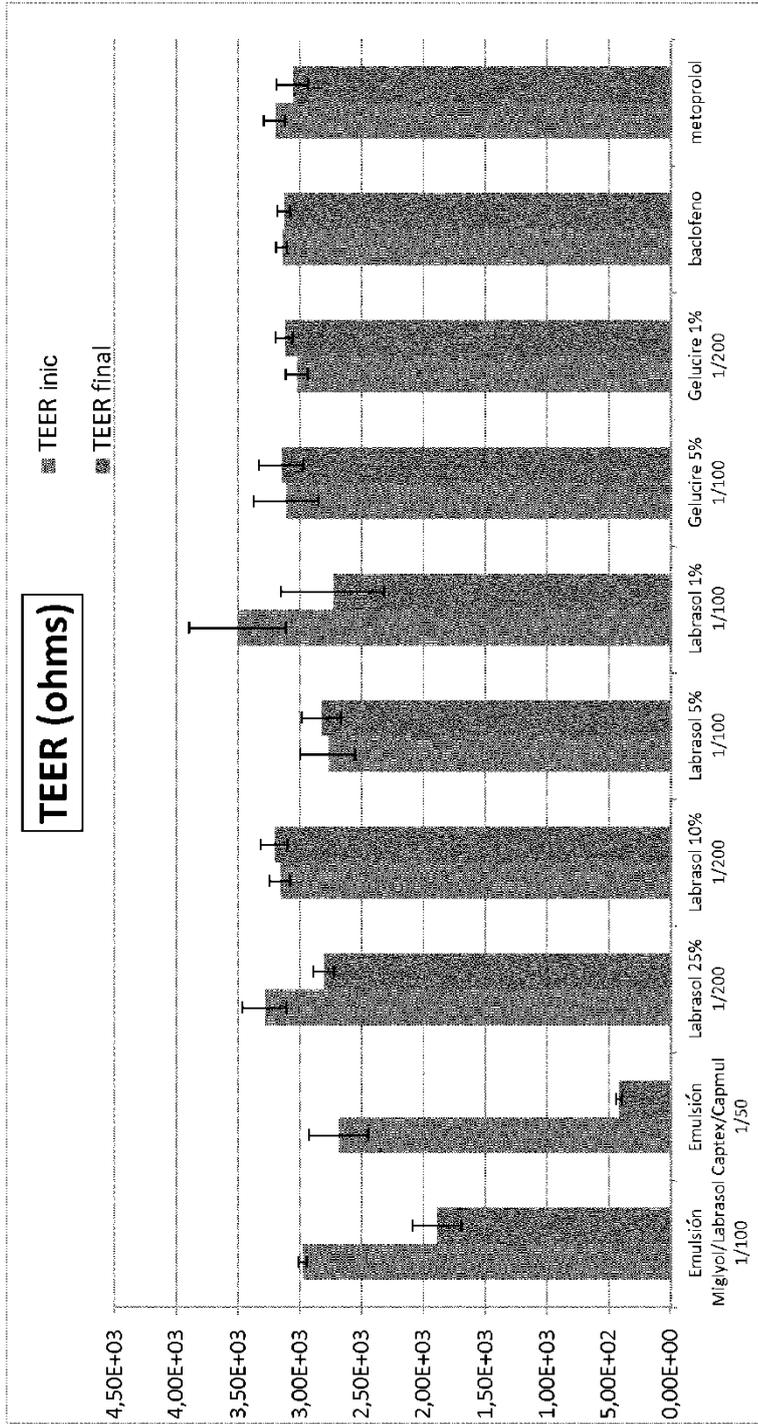
ZO = ZONULA OCCLUDENS



**FIGURA 4: COMPOSICIÓN DE LAS MICROEMULSIONES ACEITE EN AGUA REALIZADAS A PARTIR DE MIGLYOL<sup>®</sup> Y DE LABRASOL<sup>®</sup>**



**FIGURA 5: COMPOSICIÓN DE LAS MICROEMULSIONES AGUA EN ACEITE REALIZADAS A PARTIR DE CAPTEX<sup>®</sup>/CAPMUL<sup>®</sup>**



**FIGURA 6: MEDICIONES INICIALES Y FINALES DE RESISTENCIA TRANSEPITELIAL EN FUNCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN CÉLULAS**



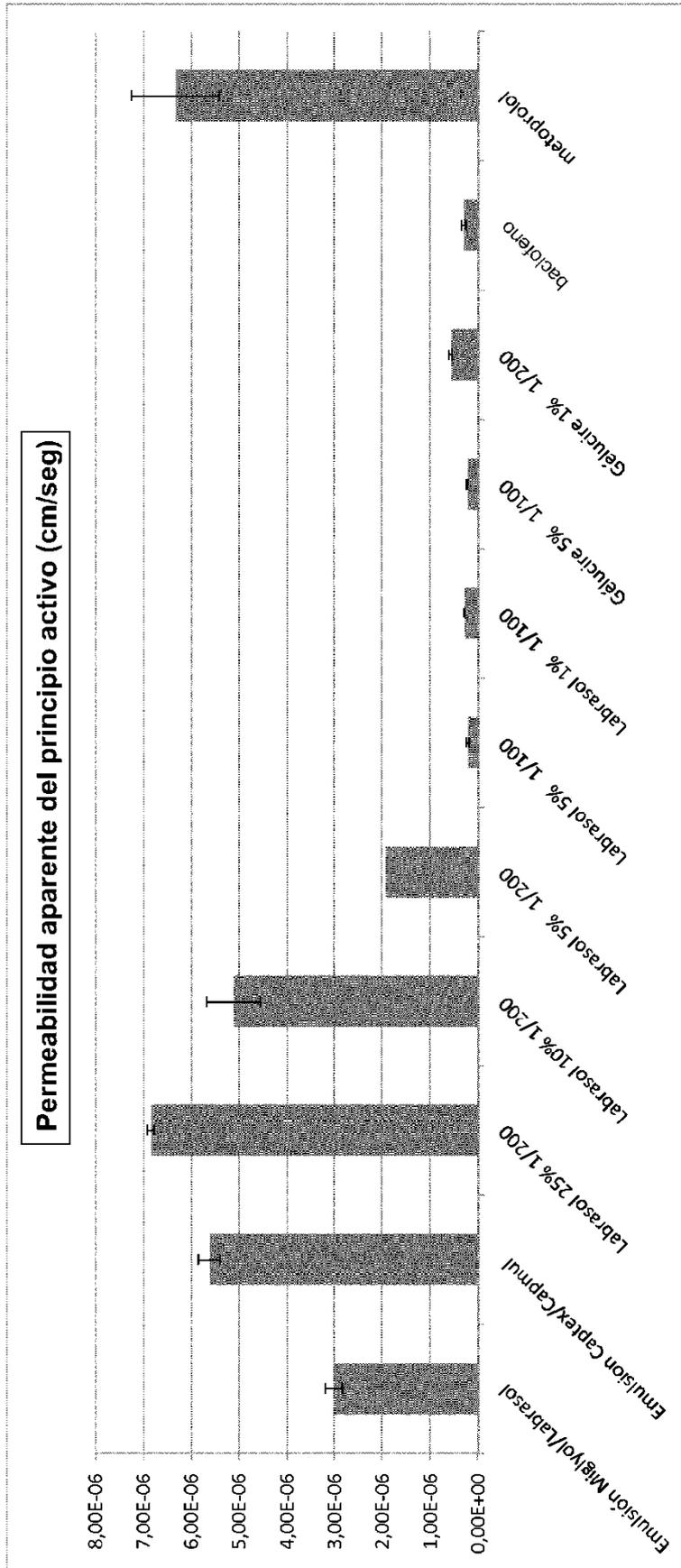


FIGURA 8: PERMEABILIDAD APARENTE DEL PRINCIPIO ACTIVO (BACLOFENO O METOPROLOL) EN FUNCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN CÉLULAS

d(0.1): 140.228  $\mu\text{m}$       d(0.5): 248.981  $\mu\text{m}$       d(0.9): 414.010  $\mu\text{m}$

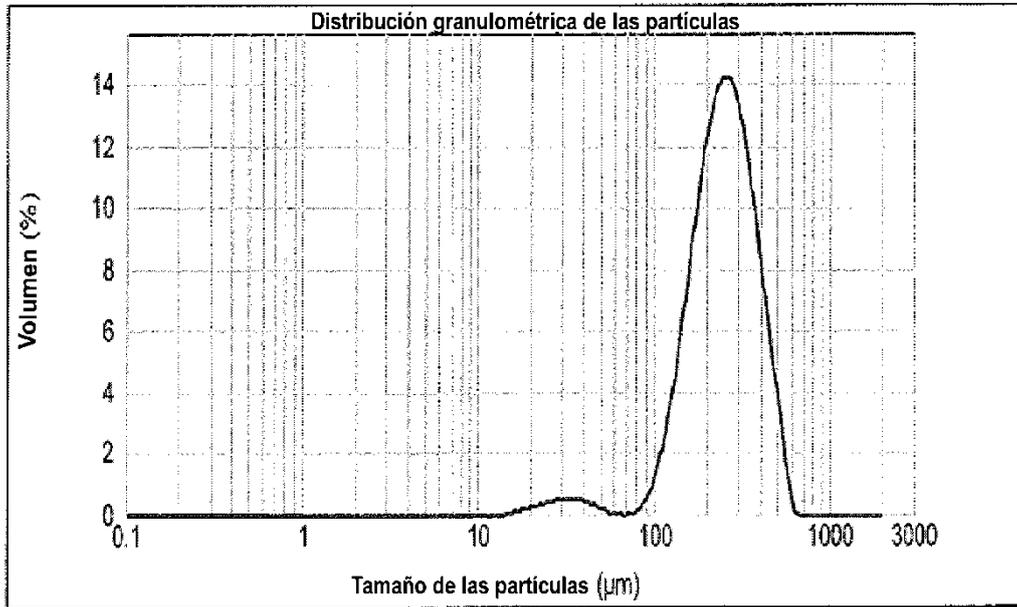


FIGURA 9: DISTRIBUCIÓN GRANULOMÉTRICA EN VOLUMEN DE LA SEMILLA COMPUESTA POR 33% DE LABRASOL®