

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 010**

51 Int. Cl.:

A61K 9/20	(2006.01) A01N 25/08	(2006.01)
A61K 31/40	(2006.01) A01P 11/00	(2006.01)
A61K 31/4985	(2006.01)	
A61K 31/505	(2006.01)	
A23K 10/18	(2006.01)	
A23K 10/22	(2006.01)	
A23K 10/30	(2006.01)	
A23K 10/33	(2006.01)	
A23K 20/163	(2006.01)	
A23K 50/50	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2021** **PCT/IB2021/053124**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2021** **WO21220099**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2021** **E 21721188 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 4142698**

54 Título: **Formulación semisólida para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores**

30 Prioridad:
27.04.2020 PT 2020116301

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2024

73 Titular/es:
UNIVERSIDADE DE COIMBRA (50.0%)
Paço das Escolas
3004-531 Coimbra, PT y
INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA (50.0%)

72 Inventor/es:
DOMINGUES VIANA, SOFIA ANDREIA y
FERNANDES REIS, FLÁVIO NELSON

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 979 010 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 semisólida para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores

5 Campo técnico

Esta solicitud se refiere a una formulación para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores.

Antecedentes de la invención

10

15

20

25

30

35

40

La vía oral es el método preferido para la administración de fármacos (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, jarabes) a los seres humanos (Stewart et al. 2016). Durante el desarrollo de fármacos, las principales herramientas preclínicas para el cribado de nuevos agentes farmacológicos antes de las pruebas clínicas suelen implicar la experimentación con animales de laboratorio y se han descrito distintas estrategias para la administración oral de fármacos a roedores. La alimentación por sonda es el método más sencillo para conseguir una dosis precisa de fármacos entéricos en ratones y ratas (Abelson et al. 2012). En pocas palabras, esta metodología consiste en la inserción de un catéter flexible o una aguja rígida con punta esférica a través de la boca hasta el esófago con dirección al estómago. No obstante, la alimentación por sonda comprende una secuencia de procedimientos traumáticos que i) provocan heridas en el esófago o el estómago y complicaciones relacionadas (p. ej. aspiración gastroesofágica y lesión pulmonar; incapacidad para tragar; asfixia debida al impacto de alimentos y material de cama en la orofaringe y, en última instancia, mortalidad); ii) provocan una respuesta de angustia significativa, de forma dependiente del vehículo y de la dosis, derivada de la retirada del animal de su jaula y la posterior sujeción manual, incluso en animales adiestrados; iii) requieren importantes habilidades técnicas (e.p. ej., conocimientos de anatomía orofaríngea) (Brown, Dinger y Levine 2000; Jones, Boyd y Wallace 2016). Además, el traumatismo asociado a la alimentación forzada puede alterar significativamente los parámetros fisiológicos (por ejemplo, la frecuencia cardiaca, la presión sanguínea, los metabolitos plasmáticos de la corticosterona/corticosterona fecal) que son cruciales en una amplia gama de estudios preclínicos de varios agentes farmacológicos (por ejemplo, moduladores bioactivos cardiovasculares, endocrinos y/o del sistema nervioso central), introduciendo un sesgo en los resultados experimentales (Brown, Dinger y Levine 2000; Diogo et al. 2015; Vandenberg et al. 2014; Yardley et al. 2015). En general, la alimentación oral no es una metodología adecuada para los tratamientos a largo plazo/crónicos y repetitivos que a menudo se requieren durante la fase de descubrimiento de fármacos en relación con la naturaleza crónica de la mayoría de las enfermedades (por ejemplo, diabetes, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas), lo que supone un reto para las pruebas de fármacos en ensayos preclínicos (Gonzales et al. 2014). Esta razón lleva a menudo a los investigadores a renunciar a la administración oral de compuestos bioactivos optando por vías de administración alternativas (por ejemplo, intraperitoneal, subcutánea), teniendo en cuenta que estas estrategias pueden limitar los criterios de valoración del plan de trabajo y su posterior traslación al terreno clínico. De ahí que los métodos no invasivos y sin estrés para la alimentación por sonda forzada de compuestos bioactivos orales en roedores hayan sido un área emergente en la comunidad científica y en el campo farmacéutico (Diogo et al. 2015; Gonzales et al. 2014; Küster et al. 2012; Allen et al. 2015). En consecuencia, se han descrito distintas alternativas "menos estresantes" (en comparación con el procedimiento de gavage) para el suministro oral de fármacos a roedores:

Alternativa 1. Suspensión del fármaco en solución de sacarosa (5% - 10%) y alimentación voluntaria con jeringa (Atcha et al. 2010; Schleimer, Johnston, y Henderson 2005);

Alternativa 2. Biofilm oral de disolución rápida que contiene fármaco y alimentación voluntaria con jeringuilla (Allen et al. 2015; Huynh et al. 2016; Yardley et al. 2015);

45

Alternativa 3. Fármaco administrado en la dieta (alimento/agua potable) (Molina-Cimadevila et al. 2014; Küster et al. 2012);

Alternativa 4. Gusanos de la harina inyectados con fármacos (Sobolewski et al. 2016);

Alternativa 5. Fármaco mezclado con sustancias que mejoran la palatabilidad (premezcla de fármaco-pasta de chocolate/pasta de azúcar/mantequilla de cacahuete/miel/masa aromatizada/gelatinas aromatizadas) (Abelson et al. 2012; Gonzales et al. 2014; Huang-Brown y Guhad 2002; Liles et al. 1998; Taylor et al. 2016; Walker et al. 2012; Zhang y Zhang 2011).

50

55

60

65

Sin embargo, estas estrategias siguen asociadas a importantes desventajas que pueden dificultar los resultados experimentales. En cuanto a los enfoques de alimentación con jeringuillas de fármacos (alternativas 1 y 2), no son alternativas "verdaderamente voluntarias" teniendo en cuenta que los animales necesitan ser sujetados por el operario para la administración del fármaco. Se trata de una desventaja evidente, ya que la extracción del animal de su jaula y su posterior sujeción suponen una enorme interferencia humana con el animal de experimentación y una angustia inherente. Las metodologías restantes (alternativas 3-5) son verdaderamente voluntarias debido a la voluntad de los animales de elegir libremente la ingestión de fármacos sin la intervención del operario. Sin embargo, sigue habiendo aspectos críticos que deben mejorarse. El primero está vinculado con el alojamiento de los animales, ya que la mayoría de estos procedimientos requieren un alojamiento individual para garantizar una dosificación correcta y confirmar la ingestión completa de la formulación. Dado que los roedores son animales sociales que suelen vivir en parejas o en grupos, la alteración de su jerarquía social por el alojamiento individual puede ser muy estresante y provocar cambios conductuales/fisiológicos que pueden comprometer su bienestar (limitaciones éticas) y confundir potencialmente los criterios de valoración experimentales. El fármaco administrado en la comida y/o el agua de los animales alojados en grupo (alternativa 3) supera esta limitación social/jerárquica, pero puede producirse una infradosificación o

sobredosificación y no se consigue una dosis precisa del fármaco. En cuanto al protocolo de inyección de fármacos en gusanos de la harina alojados en grupo (alternativa 4), aunque innovador, es en general dudoso desde distintos puntos de vista, ya que: i) es incapaz de garantizar el metabolismo inactivo en caliente y la conservación de fármacos inalterados químicamente para su administración a roedores; ii) es en cierto modo discutible, ya que puede no cumplir las cuestiones de seguridad de las instalaciones para animales de laboratorio; iii) requiere mucho trabajo y tiempo.

Un segundo tema importante se refiere a las sustancias que mejoran la palatabilidad añadidas a los vehículos de fármacos para mejorar la cooperación animal (alternativa 5). Estos compuestos pueden alterar sustancialmente el estado nutricional y perturbar de forma crítica las rutas metabólicas de los animales (por ejemplo, los niveles de glucosa en sangre/el perfil lipídico del suero), sobre todo cuando se requieren regímenes a largo plazo (Diogo et al. 2015). Una metodología interesante que intentó superar este inconveniente es la "píldora de gelatina" modificada con sabor, propuesta por Zhang (2011), que incorporó a la fórmula un edulcorante no calórico (sucralosa) en lugar de sacarosa, lo que la hace adecuada para el suministro crónico de fármacos por vía oral minimizando las alteraciones metabólicas de los animales. En un intento de reproducir este protocolo, nuestro grupo pudo fabricar con éxito la píldora de gelatina de Zhang (Fig. 1). Sin embargo, la aceptación voluntaria (es decir, la forma de dosificación llevada voluntariamente a la boca del animal) de la píldora de gelatina de Zhang fue completamente nula a los 14 días de 24 horas consecutivas de exposición en lotes distintos de ratones C57BL/6 machos y hembras ayunados durante la noche. Los animales mostraron un comportamiento exploratorio empujando la píldora dentro de las jaulas de pared, pero siempre evitaron el contacto directo en los intentos consecutivos de 14 días. Al entrar en contacto físico con la fórmula, los animales mostraron altos índices de comportamiento de acicalamiento, lo que denota graves limitaciones de la formulación que probablemente subsistan al rechazo de los animales a la píldora gelatinosa de Zhang. Los presentes inventores están seguros de que el hecho de que los roedores eviten el contacto sugiere que, a pesar de las atractivas características palatables del vehículo de Zhang, la superficie pegajosa del mismo disuade a los animales de agarrarlo. Así, los inventores reconocen la importancia de la palatabilidad para invitar a un primer acercamiento y el papel crucial de la textura para garantizar el consumo completo voluntario del animal. Por lo general, faltan pruebas sólidas de la aplicación con éxito de la metodología de Zhang y ya se ha informado de fórmulas modificadas, lo que apunta a una falta de reproducibilidad (Vidal-Martínez et al. 2016, Dhawan, S. et al, 2018). Es importante destacar que las modificaciones propuestas por los autores mencionados también presentan inconvenientes, ya que i) incorpora excipientes que pueden alterar el perfil metabólico (por ejemplo, gránulos blandos de tocino) y ii) requiere un alojamiento individual para la administración de las píldoras.

En todo el mundo, siguen estando justificadas las principales preocupaciones técnicas de protocolos alternativos eficaces para el suministro oral de compuestos bioactivos en roedores de laboratorio, en consonancia con esfuerzos similares de formulaciones patentadas optimizadas para la administración de fármacos veterinarios con fines terapéuticos (Allen et al. 2015; Derrieu et al. 2014; Kalbe et al. 2004; Larry et al. 1992; Thombre & Kasraian, 2003; Thombre, A., 2005). También se describen dificultades análogas en el consumo voluntario de tóxicos de los roedores. De hecho, actualmente se preparan formulaciones de rodenticidas (por ejemplo, gránulos, polvo, granos sueltos, pastas) con principios activos como grasas, semillas y potenciadores de la palatabilidad que atraen el consumo voluntario del tóxico. Los cebos acabados que contienen el tóxico deben evitar la timidez y la aversión al cebo, aumentando su consumo voluntario y su eficacia.

Teniendo en cuenta las deficiencias anteriores de la administración oral de compuestos bioactivos a roedores, la presente invención propone un nuevo enfoque que imita el método de administración de pastillas en dosis única ampliamente utilizado en la práctica clínica humana. El objetivo principal se basaba en la optimización de una formulación fácil, segura, consistente, de dosis precisas y eficaz para la administración oral voluntaria de fármacos a roedores. Autores anteriores ya destacaron las numerosas ventajas del método de dosificación en píldoras, a saber: i) permite una dosificación individual precisa (cantidad de fármaco/peso corporal); ii) requiere pequeñas cantidades de fármaco (en comparación con los fármacos mezclados en los alimentos o el agua de bebida); iii) supera los requisitos de hidrofilia/lipofilia del fármaco para la solubilización en vehículos; iv) no provoca respuestas de estrés significativas; v) es eficaz para el suministro repetitivo y a largo plazo de compuestos bioactivos en roedores (Kopf et al. 2010; Walker et al. 2012; Zhang y Zhang 2011). Sin embargo, las fórmulas anteriores de dosificación en pastillas para roedores siguen siendo cuestionables en términos de i) alteración de las rutas metabólicas en el contexto de ensayos preclínicos, ii) reproducibilidad y iii) alojamiento y bienestar de los animales de laboratorio. Además de la falta de reproducibilidad observada con el enfoque de Zhang, la fórmula de la píldora propuesta por Walker y colegas (2012) se basa en una dieta de masa con sabor a tocino con altos niveles de proteínas y grasas y, en consecuencia, con probables resultados a largo plazo en el perfil metabólico animal. Además, la fórmula propuesta recientemente por Dhawan, S. et al (2018) se basa en concentrados de zumo de frutas para potenciar la palatabilidad, independientemente de las muy probables interacciones deletéreas entre los componentes del zumo y los compuestos bioactivos que se pretende administrar. Por ello, los presentes inventores han desarrollado una nueva fórmula de píldora para la aceptación voluntaria de los roedores que supera los inconvenientes anteriores.

Breve descripción de la invención

La presente solicitud de patente divulga en la presente una formulación semisólida para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores.

La formulación de píldoras semisólidas divulgada en la presente comprende:

- al menos un agente espesante, en donde dicho agente espesante se selecciona entre gelatina, agar,

carragenano, alginato sódico y pectina;

- un edulcorante digerible, en donde el edulcorante digerible se selecciona entre la sucralosa y la sacarina cálcica;
- un agente diluyente, en donde el agente diluyente es un polvo con una granulometría entre 300 y 800 pm, obtenido a partir de semillas finamente molidas, granos de cereales o dieta a base de granos de cereales para roedores, en una concentración entre 10 y 30% m/v;
- al menos un agente enmascarador del sabor;
- un compuesto bioactivo.

En una realización, las semillas finamente molidas se seleccionan entre al menos una de girasol y alpiste.

En una realización, la dieta para roedores a base de granos de cereales finamente molidos comprende al menos una de harina de soja descascarillada, sémola de trigo, maíz en hojuelas, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero desecado, aceite de soja y levadura seca de cerveza.

En una realización, la formulación comprende además un conservador.

En una realización, el agente espesante es gelatina en una concentración entre 5 y 20% m/v.

En otra realización, el agente espesante es agar en una concentración entre 1 y 5% m/v.

En otra realización, el agente espesante es carragenina en una concentración entre 0,02 y 3% m/v.

En otra realización, el agente espesante es alginato sódico en una concentración entre 0,7 y 2% m/v.

En otra realización, el agente espesante es pectina en una concentración entre 0,5 y 5% m/v.

En una realización, el edulcorante no digerible es sucralosa en una concentración entre 1 y 5% m/v.

En otra realización, el edulcorante no digerible es sacarina cálcica en una concentración entre 0,1 y 0,25% m/v.

En una realización, el agente enmascarador del sabor se selecciona entre vainilla, fresa, arándano y chocolate.

En una realización, la formulación de la presente solicitud de patente es para su uso en la administración oral de fármacos y compuestos bioactivos a roedores.

En otra realización, la formulación de la presente solicitud de patente se utiliza en métodos de cribado toxicológico de roedores.

En otra realización, la formulación de la presente solicitud de patente se utiliza en la producción de cebos tóxicos para roedores.

Divulgación/Descripción detallada

La presente solicitud de patente divulga en la presente una formulación semisólida para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores.

Teniendo en cuenta las deficiencias mencionadas de los enfoques del estado de la técnica descritos anteriormente para la administración oral de compuestos bioactivos a roedores, la presente solicitud de patente divulga un nuevo enfoque que imita el método de administración de pastillas en dosis única ampliamente utilizado en la práctica clínica humana. El objetivo principal se basa en la optimización de una formulación fácil, segura, consistente, de dosis precisa y eficaz para la administración oral voluntaria de fármacos a roedores mediante el método de dosificación en píldora. Es importante destacar las numerosas ventajas que se derivan del uso de la formulación descrita: i) permite una dosificación individual precisa (cantidad de fármaco/peso corporal); ii) requiere pequeñas cantidades de fármaco (en comparación con los fármacos mezclados en los alimentos o el agua de bebida); iii) supera los requisitos de hidrofiliicidad/lipofilia del fármaco para la solubilización del vehículo; iv) no provoca respuestas de estrés significativas; v) es eficaz para el suministro repetitivo y a largo plazo de compuestos bioactivos en roedores. Así, la nueva formulación de píldora semisólida divulgada en la presente está diseñada para i) ser un portador de compuestos bioactivos para roedores; ii) lograr un alto índice de aceptación y un consumo oral voluntario de forma reproducible y iii) preservar el perfil metabólico y el bienestar de los roedores de laboratorio experimentales. En conjunto, la presente invención propone un nuevo enfoque para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores mediante una metodología de píldora de dosis única capaz de lograr la aceptación voluntaria, imitando lo que ocurre con las composiciones farmacéuticas sólidas ampliamente utilizadas en la práctica clínica humana. Esta invención se refiere a una nueva fórmula de píldora semisólida que es un portador adecuado de fármacos, toxinas, biomasa (por ejemplo, de origen vegetal), vacunas y/o adyuvantes y otros compuestos bioactivos, siendo atractiva para los sectores industriales farmacéutico, veterinario y de suministro de alimentos, así como para los institutos biomédicos y las academias de todo el mundo.

Para lograr la aceptación voluntaria de la píldora sin efectos significativos sobre la homeostasis metabólica y las respuestas de angustia, es primordial tener en cuenta los comportamientos innatos de investigación de los roedores, la neofobia y las preferencias alimentarias, es decir, los temas relacionados con i) el sabor, ii) la textura y iii) el tamaño. En general se reconoce, a partir de las fórmulas disponibles de cebos para roedores, que los azúcares, las grasas animales y los cereales son aditivos eficaces para mejorar la aceptación y la palatabilidad. Sin embargo, el suministro crónico de altos contenidos de grasas y azúcares digeribles puede afectar significativamente al metabolismo de los roedores a lo largo del tiempo y, por tanto, interferir con los objetivos de la investigación preclínica. Para sortear estos problemas, la fórmula presentada en la presente incorpora bajos porcentajes de edulcorantes (por ejemplo, sacarina sódica, sucralosa) para potenciar la aceptación voluntaria de los roedores. Dado que los edulcorantes seleccionados en la presente son azúcares no digeribles (lo que evita la introducción de calorías en la fórmula), no estimulan la liberación de insulina/incretina ni alteran los efectos del vaciado gástrico, lo que hace que este vehículo sea adecuado para preservar los parámetros metabólicos animales. Se utilizan concomitantemente cantidades traza de esencias para proporcionar un efecto de enmascaramiento del sabor de los sabores desagradables comunes que surgen de los compuestos bioactivos mezclados. Hay disponibles varios sabores, a saber, vainilla, fresa, arándanos, chocolate, pero sin limitarse a otros olores que puedan incitar el comportamiento alimentario de los roedores. Se ha realizado una prueba con dos frascos para medir la preferencia por las esencias de fresa y chocolate, sin que se hayan registrado diferencias significativas entre ambos sabores.

Un segundo aspecto crítico se basa en la textura y la consistencia de la píldora. Los inventores descubrieron que, a pesar del comportamiento investigador innato de los roedores ante las fórmulas anteriores (por ejemplo, la metodología de Zhang), se garantiza una textura suave y no pegajosa para la aceptación de la píldora y su consumo completo. De ahí que el carácter innovador de la presente invención se base en la optimización de la textura para disminuir la sensación de pegajosidad. La fórmula presentada en la presente incorpora agentes texturizantes comestibles (agentes espesantes y diluyentes) en cantidades óptimas para modificar la textura general del comprimido hacia una menor pegajosidad y una consistencia semisólida óptima, logrando así una experiencia táctil no adherente preferida que mejora la aceptación de los roedores. Los agentes espesantes comestibles (por ejemplo, gelatina, pectina, agar agar) ayudan a modificar las características sensoriales de la píldora en términos de propiedades mecánicas sólidas (textura) y comportamiento de flujo (viscosidad). La fórmula presentada en la presente preconiza el uso de uno de estos agentes en la menor cantidad necesaria para conseguir una matriz semisólida minimizando al mismo tiempo la textura pegajosa del producto final. Además, se eligieron mezclas de semillas/cereales finamente molidos como agentes diluyentes palatables, no sólo para favorecer la incorporación homogénea de los compuestos bioactivos dentro del vehículo, sino sobre todo, porque disminuyen la textura adhesiva de la píldora que disuade la aceptación por parte de los roedores. Estudiamos varios diluyentes palatables (por ejemplo, semillas de girasol, alpiste, grano de cereal y dietas estándar para roedores a base de grano de cereal) y observamos la aceptación voluntaria de los roedores de forma reproducible. Además, establecimos que el tamaño de las partículas entre 300-800µm corresponde a la granulometría óptima para los diluyentes, proporcionando no sólo una textura no pegajosa sino también permitiendo minimizar los residuos de píldoras una vez consumidas. Las mezclas palatables de semillas/cereales incorporadas en la presente fórmula son también elementos clave para evitar el comportamiento neofóbico de los roedores hacia la investigación de las píldoras y su consumo completo. Un tercer problema importante de esta invención tiene que ver con el tamaño de las pastillas. Dado que la aceptación voluntaria de los roedores es la base del consumo de píldoras, el tamaño de éstas debe ajustarse a los hábitos alimentarios habituales de los roedores. Tamaño óptimo de la pastilla preconizado en la presente invención (diámetro $\approx$ 0,6-0,7 cm; altura $\approx$ 0,4-0,6 cm).

Las formulaciones de la presente invención se preparan mezclando un agente diluyente palatable con dos agentes que mejoran la palatabilidad -esencia aromatizante y azúcar no digerible- para obtener una matriz semisólida aromatizada, azucarada y no pegajosa que cumpla el objetivo de aceptación voluntaria por vía oral. Los agentes mejoradores de la palatabilidad utilizados en la presente invención son todos no tóxicos, aceptables desde el punto de vista alimentario, no afectan al compuesto bioactivo con el que están asociados y se utilizan en pequeñas cantidades para minimizar los gastos y maximizar la eficacia de la producción.

Los compuestos bioactivos adecuados para su uso con el vehículo semisólido divulgado en la presente incluyen fármacos, toxinas y/o biomasa o cualquier combinación de los mismos, pero no limitan el alcance de la composición de la invención. La cantidad de agente(s) bioactivo(s) varía y depende de la dosificación necesaria para el tratamiento. La cantidad de vehículo semisólido es la cantidad efectiva de suministro que puede determinarse para cualquier compuesto bioactivo. Los conservantes que pueden emplearse son compuestos utilizados convencionalmente para los preparados farmacéuticos y los productos alimenticios. Ejemplos adecuados, aunque no limitantes, son el ácido benzoico, las sales derivadas (p. ej., de calcio, de sodio) y los ésteres (p. ej., p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de etilo, p-hidroxibenzoato de propilo), el ácido sórbico, el ácido fumárico, el ácido láctico, el ácido cítrico y las sales derivadas (p. Ej. p. ej., citrato de sodio), galato de propilo, ácido cítrico, ácido ascórbico, palmitato de ascorbina, tocoferol, acetato de tocoferol, butilhidroxitolueno y butilhidroxianisol. La fórmula de la píldora semisólida y la composición nutricional se presentan en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Durante el proceso de fabricación, la base de la formulación de las pastillas semisólidas es un agente espesante y una solución de azúcar no digerible, preparada en un matraz Erlenmeyer cónico sumergido en un baño de agua sobre una placa caliente con agitación (Precaución: calentar hasta 35-40°C con la caperuza ligeramente enroscada). Esta solución puede alicuotarse en tubos de plástico desechables de fondo cónico y almacenarse a -20°C durante meses hasta su

reutilización. Los siguientes pasos ilustran el protocolo de fabricación: la esencia aromatizante, el agente diluyente y los conservantes se incorporan a la solución de agente espesante/azúcar no digerible y se agitan para conseguir una mezcla adecuada (Importante: deje el vehículo sumergido en el baño de agua a 35-40°C, con agitación constante, hasta los siguientes pasos) . Para formular un lote de 96 píldoras semisólidas, se utiliza una placa de 96 pocillos de fondo redondo (con tapa) como placa base del molde de píldoras para producir un semisólido de tamaño, forma y peso uniformes, como se muestra en. Cada pozo se llena con un volumen deseado de vehículo, normalmente normalizado según la especie animal y el peso corporal, la placa se cubre con una tapa y se almacena a 4°C. Para el suministro del compuesto bioactivo, se pesa/mede previamente una cantidad precisa del principio activo (normalmente calculada en función de la masa corporal del roedor) y se transfiere a cada pozo. A continuación, se mezcla rápidamente el volumen deseado de vehículo en el pozo con una varilla agitadora de acero inoxidable. Este procedimiento da lugar a la suspensión del principio activo en lugar de a su solubilización, con lo que se eluden los problemas de solubilidad. Alternativamente, el (los) compuesto(s) bioactivo(s) puede(n) mezclarse en el vehículo antes de la transferencia de la base del molde. El volumen considerado debe ser lo suficientemente pequeño como para garantizar el consumo de toda la pieza del comprimido semisólido por parte de los roedores (por ejemplo, $\approx 100\mu\text{l}$ en ratones C57BL/6), pero simultáneamente adecuado para incorporar la cantidad de fármaco requerida. También pueden incorporarse compuestos bioactivos en forma líquida. Las píldoras semisólidas se convierten en semisólidas listas (4°C). Conservan una textura semisólida a temperatura ambiente (RT < 40-50°C) y pueden almacenarse a 4°C o RT en función de los conservantes incluidos, como se ejemplifica en la Fig. 2. Por lo tanto, las píldoras semisólidas portadoras de compuestos bioactivos pueden almacenarse tanto a 4°C como a RT durante meses en función de las propiedades intrínsecas de estabilidad del principio o principios activos y de los conservantes añadidos, de forma similar a lo que ocurre con otros productos farmacéuticos y/o alimenticios de consumo humano disponibles en el mercado. El protocolo presentado en la presente puede ampliarse fácilmente a un entorno industrial.

La metodología subyacente a la administración oral de fármacos en píldoras semisólidas a roedores de laboratorio se conceptualizó para garantizar el mantenimiento del bienestar animal durante el suministro de compuestos bioactivos. Este protocolo requiere un breve período de adiestramiento (3-5 días de ayuno nocturno/matutino) para eliminar el comportamiento neofóbico normal de los roedores de laboratorio ante un elemento novedoso (por ejemplo, enterrar la píldora con material de cama). Para garantizar que cada animal ingiera completamente la píldora semisólida, se introduce una división en la jaula sólo en el momento de la administración. Las píldoras semisólidas se introducen en cada lado de la jaula en bandejas de plástico desechables (Fig. 3). Tras el consumo total, se retira la división y los animales restablecen el contacto físico. Tras colocar una píldora en una jaula, los roedores la investigan rápidamente y suelen consumirla en menos de un minuto (Fig. 4), el "índice de aceptación voluntaria" preferido (Thombre y Kasraian, 2003). Esta elevada tasa de aceptación se mantuvo, al menos, durante 35 días (equivalente a $\approx 3,3$ años en humanos), compatible con regímenes crónicos de suministro de fármacos (Sengupta P., 2013). Para proporcionar pruebas inequívocas de la ingestión de píldoras semisólidas tras la incorporación de compuestos bioactivos, se probó el consumo voluntario de una batería de antidiabéticos/dislipidémicos/depresores/inflamatorios, así como de una biomasa vegetal. Se comprobó que todas las sustancias probadas alcanzaban el índice óptimo de aceptación voluntaria cuando se administraban en la presente invención, incluida la desagradable organoléptica capsaicina (un repelente de roedores), la molécula responsable del sabor picante en la mayoría de los ingredientes alimentarios (Fig. 5). En general, esta formulación en píldora semisólida minimiza los efectos negativos de las formulaciones anteriores y las metodologías de experimentación preclínica con roedores.

Aparte de la experimentación con roedores, este nuevo vehículo de píldoras semisólidas es compatible con las toxinas más utilizadas para las infestaciones de roedores domésticos, como demuestra claramente la elevada aceptación voluntaria de la warfarina (Lim G., 2017) (Fig. 6). Los roedores mostraron un mal estado de salud y signos evidentes de toxicidad desde el día 4 post-administración y se les aplicó la eutanasia en el día 8 en relación con los signos críticos de enfermedad (por ejemplo, hemorragia), de acuerdo con las directrices de buenas prácticas establecidas por la directiva de la Comunidad Europea (2010/63/UE). En oposición al comportamiento neofóbico de los roedores de laboratorio ante un objeto nuevo, los roedores salvajes muestran una demanda innata de alimento y habilidades de cazador que eluden la fase de preentrenamiento necesaria para la experimentación en laboratorio. Considerando el vehículo semisólido de fácil consumo voluntario por los roedores, esta fórmula es adecuada para cebos tóxicos domésticos.

Dado que el estrés puede afectar a casi todos los mecanismos homeostáticos del organismo, incluido el control del peso corporal y el consumo de agua y alimentos, es necesario vigilar cuidadosamente los signos clínicos de bienestar animal a lo largo de todo el protocolo de experimentación preclínica. Se demuestran en la presente pruebas experimentales sólidas sobre el fenotipo libre de estrés de los roedores tras un régimen crónico de píldoras semisólidas, a saber: i) consumo regular de comida/agua y curva de velocidad de crecimiento normal (Fig 7); ii) fenotipo conductual exploratorio/de locomoción normal en una batería de pruebas conductuales relacionadas con el estrés (Fig 8) y iii) ausencia de lecturas típicas relacionadas con el estrés como pelaje alterado/pelo erizado, marcha o postura anormal o anillos de porfirina alrededor de los ojos. Además, la administración de píldoras semisólidas elude el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona (una hormona relacionada con el estrés) que suele observarse tras el protocolo de alimentación por sonda (Fig. 9), lo que corrobora la naturaleza libre de estrés de la presente invención.

Además, la presente invención permite la conservación de varios parámetros fisiológicos que son primordiales para los ensayos preclínicos dentro del proceso de descubrimiento de fármacos. La administración crónica de píldoras semisólidas mantiene la motilidad normal del íleon (Fig. 10), un aspecto importante para los estudios de farmacocinética de fármacos

orales. Además, preserva el perfil glucémico/lipídico sérico, la histología/función hepática y renal, lo que apunta a una homeostasis metabólica (Fig 11, 12). En conjunto, estas características garantizan la seguridad de la píldora semisólida.

Para seguir valorando la idoneidad de la formulación en píldora semisólida en modelos experimentales de enfermedad, se realizó una administración crónica en píldora semisólida en un entorno de intoxicación por cuprizona (CPZ) (0,2% en agua potable) durante 35 días (5 semanas), un modelo bien validado de desmielinización que imita varias características de la esclerosis múltiple (Norkute et al. 2009; Yamamoto et al. 2014). Este modelo se eligió teniendo en cuenta los déficits cognitivos y motores que podrían comprometer gravemente la fase de aprendizaje previa al entrenamiento, las habilidades motoras y la aceptación a largo plazo (Austen, Strickland y Sanderson 2016). Los datos representados en la figura 13 muestran claramente que los sujetos intoxicados con CPZ (grupo del modelo animal de EM) presentan un "índice de aceptación voluntaria" similar al del grupo de control. Además, la administración crónica de pastillas semisólidas también proporciona un patrón similar de evolución del peso corporal entre los sujetos experimentales sanos y enfermos (Fig 14), lo que refuerza su potencial aplicabilidad en ensayos preclínicos de desarrollo de fármacos.

Para evaluar la eficacia del "índice de aceptación voluntaria" en roedores de este nuevo vehículo portador de un agente farmacológico, se seleccionó el fármaco antidiabético sitagliptina -un inhibidor de la dipeptidil peptidasa (DPP-IV) IV- por sus propiedades anorexigénicas y de inducción de náuseas, que son efectos secundarios desafiantes para el consumo crónico de comprimidos semisólidos (Webb et al. 2017). Se incorporó sitagliptina (50mg/Kg de peso corporal) en comprimidos semisólidos y se administró diariamente a un tercer lote de animales intoxicados con CPZ (n=8). El tiempo dedicado al consumo voluntario fue inferior a 3 minutos (Fig. 13), también dentro del "índice de aceptación voluntaria" preferido (Thomble & Kasraian 2003).

Para aportar pruebas indubitadas de la eficacia de los comprimidos semisólidos en cuanto al suministro/acción del fármaco, se valoró la concentración plasmática de sitagliptina 2 horas después de la dosis (50mg/Kg de peso corporal) y se comparó con el protocolo de alimentación por sonda. Sorprendentemente, se obtuvieron resultados similares cuando se utilizaron ambas metodologías, lo que demuestra la eficacia de esta nueva invención en el suministro de compuestos bioactivos (Fig. 15). Además, esta nueva conformación es inequívocamente eficaz en la administración de compuestos bioactivos en el torrente sanguíneo de los roedores y su posterior efecto farmacológico, teniendo en cuenta los datos de concentración plasmática de sitagliptina y la fuerte disminución ($\approx$ 80-90%) de la actividad DPP-IV (Fig 16).

La metodología de pastillas semisólidas propuesta en la presente es reproducible, con resultados similares obtenidos en 5 lotes adicionales de machos C57BL/6 (n=8/cada uno) y 2 lotes de hembras C57BL/6 (n=8/cada uno), en un total de 56 sujetos experimentales. En dos lotes de machos C57BL/6, la aceptación voluntaria se mantuvo constante hasta el día 50, lo que sugiere que esta formulación puede administrarse durante periodos más largos de tratamientos crónicos con compuestos bioactivos.

Los datos recogidos en los estudios ejemplares presentados en la presente y descritos en los Ejemplos y Figuras indican que la invención puede proporcionar un método valioso para ensayos farmacológicos y toxicológicos preclínicos en roedores de experimentación. Además, la presente invención proporciona una nueva alternativa para los cebos tóxicos domésticos.

Los experimentos realizados en apoyo de esta invención se llevaron a cabo con ratones C57BL/6 y ratas Wistar que se utilizan habitualmente para estudios biomédicos. Por ejemplo, los ratones C57BL/6 muestran una estrecha relación genética con los humanos y su genoma se modifica fácilmente para estudiar enfermedades humanas. De hecho, debido a la disponibilidad de cepas congénitas, la facilidad de cría, la robustez y la reproducibilidad, el ratón C57BL/6 es, con diferencia, el roedor de laboratorio más popular. El alojamiento de los animales y la experimentación se realizaron en el animalario del Instituto Coimbra de Investigación Clínica y Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Coimbra, en condiciones de ambiente controlado [horario de luz/oscuridad de 12 h a temperatura ambiente (23 $\pm$ 1 °C), con comida y agua ad libitum] y en estricta conformidad con la directiva de la Comunidad Europea (2010/63/UE).

Por lo tanto, se divulga en la presente una formulación en píldora semisólida para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores, en la que dicha formulación comprende un edulcorante no digerible, un agente espesante, un agente diluyente, un agente enmascarador del sabor y el compuesto bioactivo que se va a administrar. La formulación puede comprender además conservantes.

En el contexto de la presente solicitud de patente, se entiende por "edulcorante no digerible" o "azúcar no digerible" un edulcorante apto para roedores que no es absorbido por el sistema digestivo del animal, por lo que no afecta a su metabolismo. Ejemplos adecuados de edulcorantes no digeribles son la sacarina cálcica y la sucralosa.

En el contexto de la presente solicitud de patente, se entiende por "agente espesante" o "agente gelificante" una sustancia apta para roedores que aumenta la viscosidad de la formulación sin interactuar ni alterar las propiedades del compuesto bioactivo que se va a administrar. Ejemplos adecuados de agentes espesantes son la gelatina, el agar, la carragenina, el alginato sódico y la pectina.

En el contexto de la presente solicitud de patente, se entiende por "agente diluyente" un polvo inerte y no tóxico, física y químicamente estable por sí mismo o en combinación con compuestos bioactivos, que actúa como relleno mejorando

- 5 tanto la uniformidad/cohesión del contenido del comprimido como la aceptación voluntaria por parte de los roedores debido a sus agradables propiedades organolépticas (por ejemplo, efecto frío no pegajoso, potenciador del sabor). Ejemplos adecuados de agentes diluyentes son polvos con una granulometría entre 300 y 800µm obtenidos a partir de semillas, granos de cereales o dietas estándar para roedores a base de granos de cereales disponibles en el mercado. Las composiciones típicas se basan en soja tostada extraída sin cáscara, aceite de soja, trigo, cebada, harina de trigo, concentrado de proteína de soja, suero de leche en polvo, aminoácidos, vitaminas, microminerales, macrominerales, entre otros.
- 10 En el contexto de la presente solicitud de patente, se entiende por "compuesto bioactivo" una sustancia química (o una mezcla de sustancias químicas), normalmente derivada de i) una fuente natural (organismos vivos como plantas, animales y/o microorganismos), ii) síntesis química o iii) fuentes biotecnológicas, que es farmacológicamente activa [por ejemplo, principios farmacéuticos activos (API), toxinas, biomásas vegetales] cuando se administra por vía oral.

Tabla 1. Fórmula en pastillas semisólidas

FÓRMULA	PORCENTAJE
i) Edulcorante no digerible Ejemplos (uno de los siguientes) : • Sacarina cálcica • Sucralosa	0.1-0.25% m/v 1-5% m/v
ii) Agente espesante Ejemplos (uno de los siguientes): • Gelatina (de origen vegetal o animal) • Agar • Carragenano • Algenato sódico • Pectina	5-20% m/v 1-5% m/v 0.02-3% m/v 0.7-2% m/v 0.5-5%
iii) Agente diluyente Ejemplos (uno de los siguientes) : • Semillas (p. ej., girasol, alpiste) • Dieta estándar a base de cereales para roedores (Granulometría preferida 300-800µm)	15-30% m/v 15-30% m/v
iv) Agente enmascarador del sabor • Esencia aromatizante	(según sea necesario)
v) Conservantes/estabilizantes	(según sea necesario)
vi) Agua	(según sea necesario para el volumen final deseado)
vii) Compuestos bioactivos	(según sea necesario)

15

Tabla 2. Composición nutricional en píldora semisólida (composición del vehículo estándar: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%; composición del vehículo baja en proteínas: Agar 2% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%) .

	Píldora semisólida	g/Píldora semisólida	Kcal/Píldora semisólida
FÓRMULA ESTÁNDAR	Proteína	0,0202	0,0807
	Grasa	0,0004	0,0041
	Carbohidratos	0,0080	0,0320
	Calorías totales	-	0,1169
FÓRMULA BAJA EN PROTEÍNAS	Proteína	0,0029	0,0116
	Grasa	0,0004	0,0040
	Carbohidratos	0,0095	0,0381
	Calorías totales	-	0,0538

EJEMPLOS

La invención se ilustrará ahora en los siguientes ejemplos no limitativos que son ilustrativos de la invención pero que no pretenden limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1

Una mezcla de agar (1,5% m/v), gelatina de origen vegetal (5% m/v) y solución de sacarina cálcica (0,15% m/v) se sumergen en un baño de agua (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de manzana (1% v/v), pipas de girasol (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato sódico (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita 5 minutos para que se mezcle bien. Rosuvastatina 5mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. La placa se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C.

Ejemplo 2

Se sumerge una mezcla de agar (2% m/v) y solución de sucralosa (1% m/v) en un baño de agua (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (1% v/v), dieta estándar a base de granos de cereales para roedores (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato de sodio (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita durante 5 minutos para una mezcla adecuada. Atorvastatina 5mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. El plato se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 10 minutos a 4°C. En la que la dieta estándar para roedores a base de cereales comprende harina de soja descascarillada, harina de trigo, maíz en copos, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero de leche deshidratado, aceite de soja y levadura de cerveza deshidratada.

Ejemplo 3

Se sumerge una mezcla de pectina (1% m/v), agar (1% m/v) y solución de sucralosa (1,5% m/v) en un baño de agua (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de arándano (1% v/v), alpiste (30% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato sódico (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita 5 minutos para que se mezcle bien. La bromadiolona (0,5 mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. La placa se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C.

Ejemplo 4

Se sumerge en un baño de agua (35-40°C) una mezcla de gelatina de piel porcina (7,5% m/v), pectina (1% m/v) y una solución de sucralosa (2% m/v). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (8% v/v), dieta estándar a base de granos de cereales para roedores (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato de sodio (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita durante 5 minutos para una mezcla adecuada. La sitagliptina (50mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. El plato se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C. En la que la dieta estándar para roedores a base de cereales comprende harina de soja descascarillada, harina de trigo, maíz en copos, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero de leche deshidratado, aceite de soja y levadura de cerveza deshidratada.

Ejemplo 5

Una mezcla de gelatina de origen vegetal (20% m/v) y una solución de sucralosa (1% m/v) se sumergen en un baño de agua (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (1% v/v), dieta estándar a base de granos de cereales para roedores (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato de sodio (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita durante 5 minutos para una mezcla adecuada. Fluoxetina 2,6 mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. El plato se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C. En la que la dieta estándar para roedores a base de cereales comprende harina de soja descascarillada, harina de trigo, maíz en copos, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero de leche deshidratado, aceite de soja y levadura de cerveza deshidratada.

Ejemplo 6

Se sumerge en un baño de agua (35-40°C) una mezcla de gelatina de piel bovina (10% m/v), agar (1% m/v) y una solución de sucralosa (1% m/v). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de arándano (1% v/v), semillas de girasol (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato sódico (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita 5 minutos para mezclar bien. Prednisolona 10mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. La placa se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C.

Ejemplo 7

Una mezcla de solución de carragenina (0,1% m/v) y sacarina cálcica (0,15% m/v) se sumerge en un baño de agua (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (1% v/v), dieta estándar a base de granos de cereales para roedores (30% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato de sodio (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita durante 5 minutos para una mezcla adecuada. La biomasa de hojas de arándano (1,6 g/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. El plato se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C. En la que la dieta estándar para roedores a base de cereales comprende harina de soja descascarillada, harina de trigo, maíz en copos, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero de leche deshidratado, aceite de soja y levadura de cerveza deshidratada.

Ejemplo 8

Se sumerge una mezcla de solución de alginato de sodio (1% m/v) y sucralosa (1,5% m/v) en un baño de agua (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (8% v/v), dieta estándar a base de granos de cereales para roedores (30% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato de sodio (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita durante 5 minutos para una mezcla adecuada. La sertralina (5 mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. El plato se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C. En la que la dieta estándar para roedores a base de cereales comprende harina de soja descascarillada, harina de trigo, maíz en copos, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero de leche deshidratado, aceite de soja y levadura de cerveza deshidratada.

Ejemplo 9

Una mezcla de gelatina de piel bovina (10% m/v), alginato de sodio (1% m/v) y una solución de sucralosa (1% m/v) se sumergen en un baño de agua (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (1% v/v), semillas de girasol (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato sódico (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita 5 minutos para mezclar bien. La warfarina (80mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. La placa se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C.

Ejemplo 10

Una mezcla de gelatina de piel de bovino (20% m/v) y una solución de sucralosa (1% m/v) se sumergen en un baño maría (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (1% v/v), alpiste (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato sódico (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita 5 minutos para que se mezcle bien. Metformina 100mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. La placa se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C.

Ejemplo 11

Una mezcla de gelatina de piel de bovino (20% m/v) y una solución de sucralosa (1% m/v) se sumergen en un baño maría (35-40°C). Se añaden a la mezcla esencia aromatizante de vainilla (1% v/v), dieta estándar a base de granos de cereales para roedores (20% m/v), ácido fumárico (2,5% m/v), citrato de sodio (1,2% m/v) y metil/propilparabeno (2:1, 0,05% v/v) y se agita durante 5 minutos para una mezcla adecuada. Capsaicina 0,1mg/Kg de peso corporal) se transfiere a cada pozo de una placa de 24/96 pocillos de fondo redondo (con tapa) y se mezcla con el volumen deseado de vehículo. El plato se cubre con una tapa y la píldora semisólida adquiere la textura semisólida en 30 minutos a 4°C. En la que la dieta estándar para roedores a base de cereales comprende harina de soja descascarillada, harina de trigo, maíz en copos, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero de leche deshidratado, aceite de soja y levadura de cerveza deshidratada.

A continuación se describen varias características que pueden utilizarse independientemente unas de otras o con cualquier combinación de las demás. Sin embargo, cualquier característica individual podría no abordar ninguno de los problemas discutidos anteriormente o podría abordar sólo uno de los problemas discutidos anteriormente. Es posible que algunos de los problemas comentados anteriormente no se aborden en su totalidad con ninguna de las características descritas en la presente. Aunque se proporcionan encabezamientos, la información relacionada con un encabezamiento concreto, pero que no se encuentra en la sección que tiene ese encabezamiento, también puede encontrarse en otras partes de la especificación.

Breve descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de la presente solicitud, en el anexo se adjuntan figuras que representan las formas de realización preferidas que, no obstante, no pretenden limitar la técnica divulgada en la presente.

La figura 1 muestra el índice de aceptación voluntaria de la fórmula del arte previo (Zhang et al.) frente a la fórmula de la presente invención (composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 6-8 grupo experimental).

La figura 2 muestra la turbidez de los vehículos semisólidos a lo largo del tiempo. La luz transmitida, valorada mediante espectrofotometría, se utilizó como lectura de la estabilidad química bajo almacenamiento a temperatura ambiente o a 4°C. Composición del vehículo estándar: gelatina de piel porcina 20% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar a base de cereales para roedores 15% y conservantes [ácido tartárico (E334) y citrato de sodio (E331) añadidos según las recomendaciones de dosificación de la EMA].

La figura 3 ilustra el montaje para la administración de píldoras semisólidas.

La figura 4 muestra la aceptación del vehículo para píldoras semisólidas a lo largo del tiempo en roedores sanos (A: Ratones C57BL/6, B: Ratas Wistar). Composición del vehículo estándar: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%; Composición del vehículo baja en proteínas: Agar 2% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 6-8 grupo experimental).

La figura 5 muestra la aceptación del vehículo en forma de píldora semisólida portadora de compuestos bioactivos a lo largo del tiempo en ratones C57BL/6 sanos (Composición del vehículo: descrita en Ejemplos, sección 3.3). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 6-8 grupo experimental).

La figura 6 muestra la aceptación del vehículo de la píldora semisólida portadora de Warfarina (80mg/Kg de peso corporal), un rodenticida en ratones C57BL/6 sanos (Composición del vehículo: descrita en Ejemplos, sección 3.3). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 6-8 grupo experimental).

La figura 7 muestra la evolución del peso corporal tras la administración crónica de una píldora semisólida con vehículo (composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 6-8 grupo experimental).

La figura 8 muestra las pruebas de comportamiento para determinar los parámetros relacionados con el estrés tras la administración crónica de la píldora semisólida con vehículo (35 días consecutivos). Campo abierto para los hábitos de exploración, Laberinto Elevado Plus para los parámetros de ansiedad, Laberinto Y para la disposición a explorar nuevos entornos y Prueba Splash para el autocuidado y la motivación. (Composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar a base de cereales para roedores 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 11-12 grupo experimental).

La figura 9 muestra la concentración plasmática de corticosterona 30 minutos después de una única administración de vehículo por sonda forzada frente al consumo voluntario de vehículo semisólido (composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 5-7 grupo experimental. ANOVA de una vía, ** $P < 0,01$ frente a control, ## $P < 0,01$ frente a vehículo).

La figura 10 muestra la contractilidad del ileon tras la administración crónica de la píldora semisólida con vehículo (35 días consecutivos. Composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar a base de cereales para roedores 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 6-8 grupo experimental).

La figura 11 ilustra la tinción con hematoxilina y eosina (aumento de 10x) de secciones de hígado y riñón tras la administración crónica de píldoras semisólidas con vehículo ((35 días consecutivos. Composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar a base de cereales para roedores 15%).

La figura 12 muestra el perfil metabólico y los marcadores bioquímicos de la función hepática y renal tras la administración crónica del vehículo (35 días consecutivos). HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato transaminasa. (Composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar a base de cereales para roedores 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 6-8 grupo experimental).

La figura 13 muestra la aceptación del vehículo para píldoras semisólidas a lo largo del tiempo en un modelo experimental de ratón de esclerosis múltiple (composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (ANOVA unidireccional, *** $P < 0,001$ frente al control, n= 6-8 grupo experimental).

La figura 14 muestra la evolución del peso corporal tras la administración crónica de pastillas semisólidas en un modelo experimental de ratón de esclerosis múltiple (composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M.

La figura 15 ilustra la concentración plasmática de sitagliptina (HPLC/UV) tras la administración de sitagliptina (50mg/Kg, una vez) por sonda o consumo voluntario de vehículo semisólido. Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (n= 5-6 grupo experimental). (Composición del vehículo: gelatina de piel porcina 10% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar a base de cereales para roedores 15%).

La figura 16 muestra la eficacia *in vivo* del fármaco tras la administración de sitagliptina (50mg/Kg, una vez) por sonda o mediante píldora semisólida. Se midió la actividad DPPIV plasmática para valorar la acción farmacológica de la sitagliptina (Composición del vehículo: gelatina de piel porcina 2% m/v, sucralosa 2%, esencia aromatizante de fresa 8% v/v, dieta estándar para roedores a base de cereales 15%). Los datos se presentan como media $\pm$ E.S.M. (ANOVA unidireccional, **** P<0,0001 frente al control, n= 6-8 grupo experimental).

Descripción de las realizaciones

A continuación, se describirán en detalle las realizaciones preferidas de la presente solicitud. Sin embargo, no pretenden limitar el alcance de esta solicitud.

Se divulga en la presente una formulación en píldora semisólida para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores, en la que dicha formulación comprende:

- al menos un agente espesante, en donde dicho agente espesante se selecciona entre gelatina, agar, carragenano, alginato sódico y pectina;
- un edulcorante digerible, en donde el edulcorante digerible se selecciona entre la sucralosa y la sacarina cálcica;
- un agente diluyente, en donde el agente diluyente es un polvo con una granulometría entre 300 y 800 μ m, obtenido a partir de semillas finamente molidas, granos de cereales o dieta a base de granos de cereales para roedores, en una concentración entre 10 y 30% m/v;
- al menos un agente enmascarador del sabor;
- un compuesto bioactivo.

En una realización, las semillas finamente molidas se seleccionan entre al menos una de girasol y alpiste.

En una realización, la dieta para roedores a base de granos de cereales finamente molidos comprende al menos una de harina de soja descascarillada, sémola de trigo, maíz en hojuelas, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero desecado, aceite de soja y levadura seca de cerveza.

En una realización, la formulación comprende además un conservador.

En una realización, el agente espesante es gelatina en una concentración entre 5 y 20% m/v.

En otra realización, el agente espesante es agar en una concentración entre 1 y 5% m/v.

En otra realización, el agente espesante es carragenina en una concentración entre 0,02 y 3% m/v.

En otra realización, el agente espesante es alginato sódico en una concentración entre 0,7 y 2% m/v.

En otra realización, el agente espesante es pectina en una concentración entre 0,5 y 5% m/v.

En una realización, el edulcorante no digerible es sucralosa en una concentración entre 1 y 5% m/v.

En otra realización, el edulcorante no digerible es sacarina cálcica en una concentración entre 0,1 y 0,25% m/v.

En una realización, el agente enmascarador del sabor se selecciona entre vainilla, fresa, arándano y chocolate.

En una realización, la formulación de la presente solicitud de patente es para su uso en la administración oral de fármacos y compuestos bioactivos a roedores.

En otra realización, la formulación de la presente solicitud de patente se utiliza en métodos de cribado toxicológico de roedores.

En otra realización, la formulación de la presente solicitud de patente se utiliza en la producción de cebos tóxicos para roedores.

Referencias

- Abelson, Klas S P, Kirsten R. Jacobsen, Renée Sundbom, Otto Kalliokoski, y Jann Hau. 2012. "Voluntary Ingestion of Nut Paste for Administration of Buprenorphine in Rats and Mice." *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1258/la.2012.012028>.
- 5 Atcha, Zeenat, Claire Rourke, Aveline Hp Neo, Catherine Wh Goh, Jean Sk Lim, Chiu-Cheong Aw, Edward R Browne, y Darrel J Pemberton. 2010. "Alternative Method of Oral Dosing for Rats." *J Am Assoc Lab Anim Sci*.
- Austen, Joseph M., Jasmin A. Strickland, y David J. Sanderson. 2016. "Memory-Dependent Effects on Palatability in Mice." *Physiology and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.001>.
- 10 Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Freret T. 2009 "The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice". *Nat Protoc*. 2009;4(10):1560-4. doi: 10.1038/nprot.2009.125.
- Brown, A P, N Dinger, y B S Levine. 2000. "stress Produced by Gavage Administration in the Rat." *Contemporary Topics American Association Fo Laboratory Animal Science*. <https://doi.org/10.1136/ejhp-2015-000639.216>.
- Chattopadhyay, Sanchari, Utpal Raychaudhuri, y Runu Chakraborty. 2014. "Artificial Sweeteners - A Review." *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0571-1>.
- 15 Dhawan, Sandeep S., Xia Shuang, Tait, David S., Bundgaard, Christoffer, Bowman Ellen y Brown Verity J. 2018. "Oral dosing of rodents using a palatable tablet" *Psychopharmacology (Berl)* doi: 10.1007/s00213-018-4863-2.
- Diogo, Lucilia N, Inês V Faustino, Ricardo A Afonso, Sofia A Pereira, Emilia C Monteiro, y Ana I Santos. 2015. "Voluntary Oral Administration of Losartan in Rats." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*. <https://doi.org/10.14288/1.0076108>.
- 20 Fontaine, Danielle A., y Dawn Belt Davis. 2016. "Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium." *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db15-0982>.
- Gonzales, C., M. M. Zaleska, D. R. Riddell, K. P. Atchison, A. Robshaw, H. Zhou, y S. J. Sukoff Rizzo. 2014. "Alternative Method of Oral Administration by Peanut Butter Pellet Formulation Results in Target Engagement of BACE1 and Attenuation of Gavage-Induced Stress Responses in Mice." *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.010>.
- 25 Huang-Brown, K M, y F A Guhad. 2002. "Chocolate, an Effective Means of Oral Drug Delivery in Rats." *Lab Anim (NY)*. <https://doi.org/10.1038/5000197>.
- Huynh, Nhat, Natalie Arabian, Dustin Lieu, Liana Asatryan, y Daryl L Davies. 2016. "Utilizing an Orally Dissolving Strip for Pharmacological and Toxicological Studies: A Simple and Humane Alternative to Oral Gavage for Animals." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. <https://doi.org/10.3791/53770>.
- 30 Jones, Carissa P, Kelli L Boyd, y Jeanne M Wallace. 2016. "Evaluation of Mice Undergoing Serial Oral Gavage While Awake or Anesthetized." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*.
- Kopf, Phillip G., Jason A. Scott, Larry N. Agbor, Jason R. Boberg, Khalid M. Elased, Janice K. Huwe, y Mary K. Walker. 2010. "Cytochrome P4501A1 Is Required for Vascular Dysfunction and Hypertension Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin." *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq218>.
- 35 Küster, Tatiana, Beatrice Zumkehr, Corina Hermann, Regula Theurillat, Wolfgang Thormann, Bruno Gottstein, y Andrew Hemphill. 2012. "Voluntary Ingestion of Antiparasitic Drugs Emulsified in Honey Represents an Alternative to Gavage in Mice." *J Am Assoc Lab Anim Sci*.
- Liles, J. H., P. A. Flecknell, J. Roughan, y I. Cruz-Madorran. 1998. "Influence of Oral Buprenorphine, Oral Naltrexone or Morphine on the Effects of Laparotomy in the Rat." *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1258/002367798780600025>.
- 40 Lim GB. 2017 "Milestone 2: Warfarin: from rat poison to clinical use." *Nat Rev Cardiol*. doi: 10.1038/nrcardio.2017.172. PubMed PMID: 23930179
- Lund, M. 1988: Selection of baits and their distribution. Pp. 261-268 in Prakash, I. (Ed.) : *Rodent pest management*. CRC Press, Boca Raton, Florida, US ISBN:9781351093354
- 45 Molina-Cimadevila, Maria Jesus, S. Segura, C. Merino, N. Ruiz-Reig, B. Andrés, y E. De Madaria. 2014. "Oral Self-Administration of Buprenorphine in the Diet for Analgesia in Mice." *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1177/0023677214532454>.
- Norkute, Akvile, Andrea Hieble, Alena Braun, Sonja Johann, Tim Clarner, Werner Baumgartner, Cordian Beyer, y Markus Kipp. 2009. "Cuprizone Treatment Induces Demyelination and Astrocytosis in the Mouse Hippocampus." *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.21946>.
- 50 Rivera, Juan, y Lino Tessarollo. 2008. "Genetic Background and the Dilemma of Translating Mouse Studies to Humans." *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.12.008>.
- Schleimer, Sonja B., Graham A.R. Johnston, y Jasmine M. Henderson. 2005. "Novel Oral Drug Administration in an Animal Model of Neuroleptic Therapy." *Journal of Neuroscience Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.02.004>.
- 55 Sengupta P. 2013 "The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's." *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6):624-30.; PubMed Central PMCID: PMC3733029.
- Sobolewski, Marissa, Joshua L. Allen, Keith Morris-Schaffer, Carolyn Klocke, Katherine Conrad, y Deborah A. Cory-Slechta. 2016. "A Novel, Ecologically Relevant, Highly Preferred, and Non-Invasive Means of Oral Substance Administration for Rodents." *Neurotoxicology and Teratology*. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.04.002>.
- 60 Stewart, Katie D., Joseph A. Johnston, Louis S. Matza, Sarah E. Curtis, Henry A. Havel, Stephanie A. Sweetana, y Heather L. Gelhorn. 2016. "Preference for Pharmaceutical Formulation and Treatment Process Attributes." *Patient Preference and Adherence*. <https://doi.org/10.2147/PPA.S101821>.
- Taylor, Bryan F, Harvey E Ramirez, August H Battles, Karl A Andrutis, y John K Neubert. 2016. "Analgesic Activity of Tramadol and Buprenorphine after Voluntary Ingestion by Rats (*Rattus Norvegicus*)." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*.
- 65 Tordoff, Michael G., y Alexander A. Bachmanov. 2003. "Mouse Taste Preference Tests: Why Only Two Bottles?" *Chemical Senses*. <https://doi.org/10.1093/chemse/28.4.315>.

- Turner, P. V., T. Brabb, C. Pekow, y M. A. Vasbinder. 2011. "Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider." *J Am Assoc Lab Anim Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.05.099>.
- Vandenberg, Laura N., Wade V. Welshons, Frederick S. Vom Saal, Pierre Louis Toutain, y John Peterson Myers. 2014. "Should Oral Gavage Be Abandoned in Toxicity Testing of Endocrine Disruptors?" *Environmental Health: A Global Access Science Source*. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-46>.
- 5 Viana, Sofia D., Inês R. Pita, Cristina Lemos, Daniel Rial, Patricia Couceiro, Paulo Rodrigues-Santos, Francisco Caramelo, et al. 2017. "The Effects of Physical Exercise on Nonmotor Symptoms and on Neuroimmune RAGE Network in Experimental Parkinsonism." *Journal of Applied Physiology*. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01120.2016>.
- 10 Vidal-Martinez, Guadalupe, Javier Vargas-Medrano, Carolina Gil-Tommee, David Medina, Nathan T. Garza, Barbara Yang, Ismael Segura-Ulate, Samantha J. Dominguez, y Ruth G. Perez. 2016. "FTY720/Fingolimod Reduces Synucleinopathy and Improves Gut Motility in A53T Mice: Contributions of pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor (PRO-BDNF) and Mature BDNF." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744029>.
- Walker, Mary K., Jason R. Boberg, Mary T. Walsh, Valerie Wolf, Alisha Trujillo, Melissa Skelton Duke, Rupert Palme, y Linda A. Felton. 2012. "A Less Stressful Alternative to Oral Gavage for Pharmacological and Toxicological Studies in Mice." *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.025>.
- 15 Webb, Dominic Luc, Niclas Abrahamsson, Magnus Sundbom, y Per M. Hellström. 2017. "Bariatric Surgery-time to Replace with GLP-1?" *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1293154>.
- Yamamoto, Shinji, Mari Gotoh, Yuuki Kawamura, Kota Yamashina, Sosuke Yagishita, Takeo Awaji, Motomu Tanaka, Kei Maruyama, Kimiko Murakami-Murofushi, y Keisuke Yoshikawa. 2014. "Cyclic Phosphatidic Acid Treatment Suppress Cuprizone-Induced Demyelination and Motor Dysfunction in Mice." *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.040>.
- 20 Yardley, Megan M., Nhat Huynh, Kathleen E. Rodgers, Ronald L. Alkana, y Daryl L. Davies. 2015. "Oral Delivery of Ivermectin Using a Fast Dissolving Oral Film: Implications for Repurposing Ivermectin as a Pharmacotherapy for Alcohol Use Disorder." *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.03.006>.
- 25 Zhang, Lei, y Lei Zhang. 2011. "Voluntary Oral Administration of Drugs in Mice." *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2011.236>.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación en píldora semisólida para la administración oral voluntaria de compuestos bioactivos a roedores que comprende:
5
 - al menos un agente espesante, en donde dicho agente espesante se selecciona entre gelatina, agar, carragenano, alginato sódico y pectina;
 - un edulcorante digerible, en donde el edulcorante digerible se selecciona entre la sucralosa y la sacarina cálcica;
 - un agente diluyente, en el que el agente diluyente es un polvo con una granulometría entre 300 y 800µm en una
10 concentración entre 10 y 30% m/v, en el que el polvo se selecciona entre semillas finamente molidas, granos de cereales o dieta para roedores a base de granos de cereales finamente molidos
 - al menos un agente enmascarador del sabor;
 - un compuesto bioactivo.
- 15 2. La formulación en píldora semisólida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las semillas finamente molidas se seleccionan entre al menos una de las semillas de girasol y las semillas de alpiste.
3. La formulación en píldora semisólida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la dieta para roedores a base de grano de cereal finamente molido comprende al menos una de las siguientes harinas: harina de soja descascarillada, harina de trigo, maíz en copos, maíz molido, harina de pescado, melaza de caña, trigo molido, suero de
20 leche deshidratado, aceite de soja y levadura de cerveza deshidratada.
4. La formulación en comprimidos semisólidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la formulación en comprimidos semisólidos comprende además un conservante.
- 25 5. La formulación de comprimidos semisólidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el agente espesante es gelatina en una concentración entre 5 y 20% m/v.
6. La formulación de comprimidos semisólidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el agente
30 espesante es agar en una concentración entre 1 y 5% m/v.
7. La formulación de comprimidos semisólidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el agente espesante es carragenano en una concentración entre 0,02 y 3% m/v.
- 35 8. La formulación de comprimidos semisólidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el agente espesante es alginato sódico en una concentración entre 0,7 y 2% m/v.
9. La formulación de píldoras semisólidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el agente
40 espesante es pectina en una concentración entre 0,5 y 5% m/v.
10. La formulación de comprimidos semisólidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el edulcorante no digerible es sucralosa en una concentración entre 1 y 5% m/v.
11. La formulación de comprimidos semisólidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el
45 edulcorante no digerible es sacarina cálcica en una concentración entre 0,1 y 0,25% m/v.
12. La formulación de píldoras semisólidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el agente enmascarador del sabor se selecciona entre vainilla, fresa, arándano y chocolate.
- 50 13. La formulación de píldoras semisólidas descrita en las reivindicaciones 1-12, para su uso en la administración oral de fármacos y compuestos bioactivos a roedores.
14. La formulación en píldora semisólida descrita en las reivindicaciones 1-12, para su uso en métodos de cribado
55 toxicológico de roedores.
15. La formulación en píldora semisólida descrita en las reivindicaciones 1-12, para su uso en la producción de cebos tóxicos para roedores.

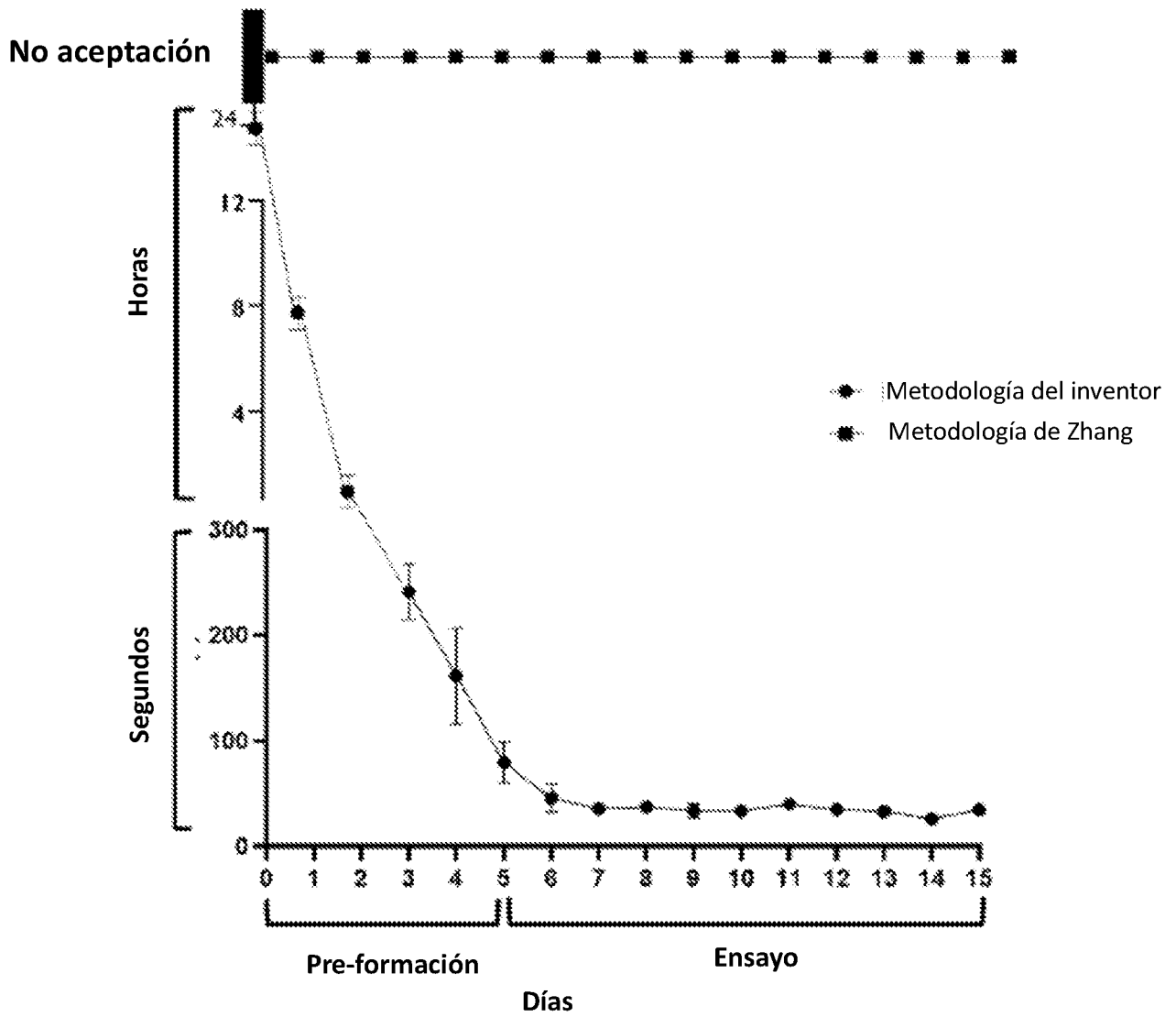


Figura 1

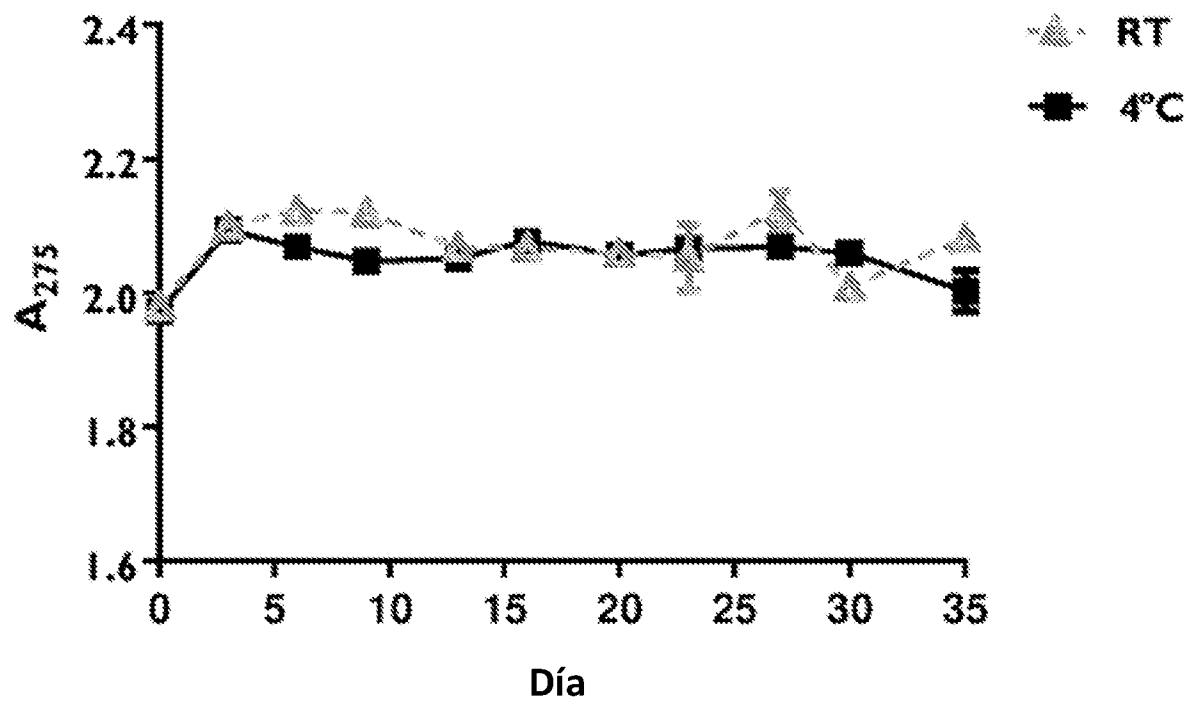


Figura 2

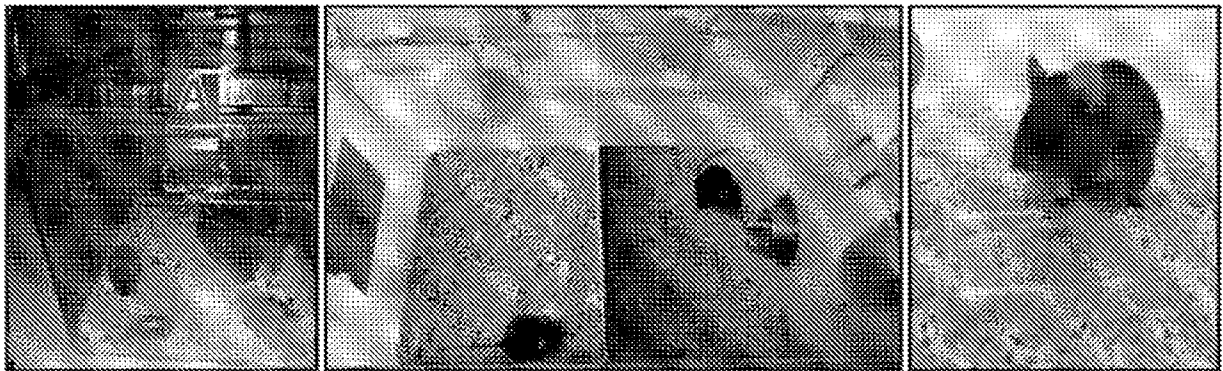
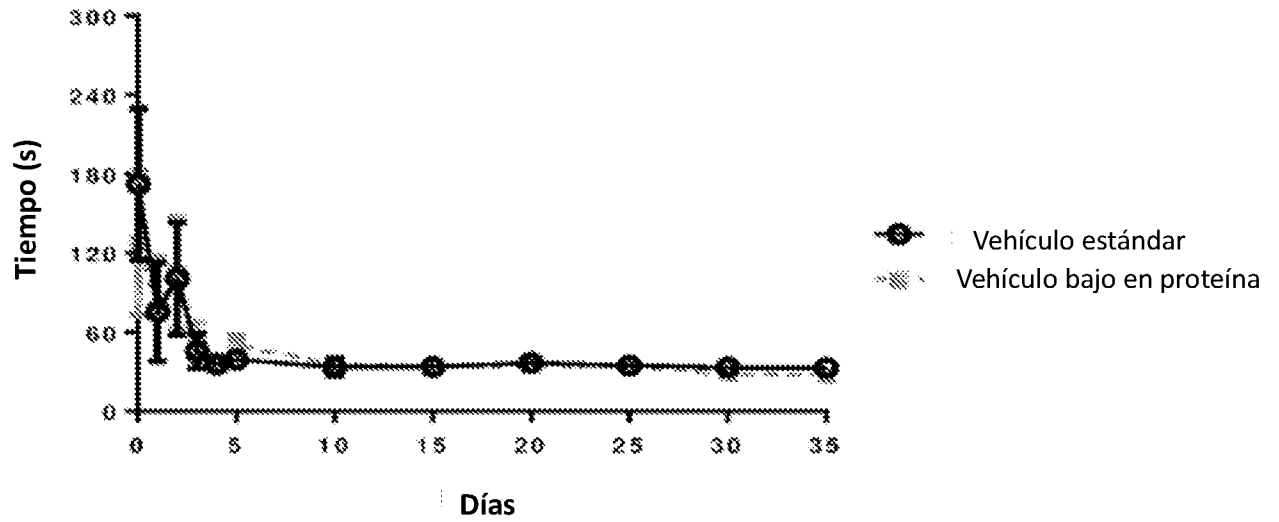


Figura 3

A



B

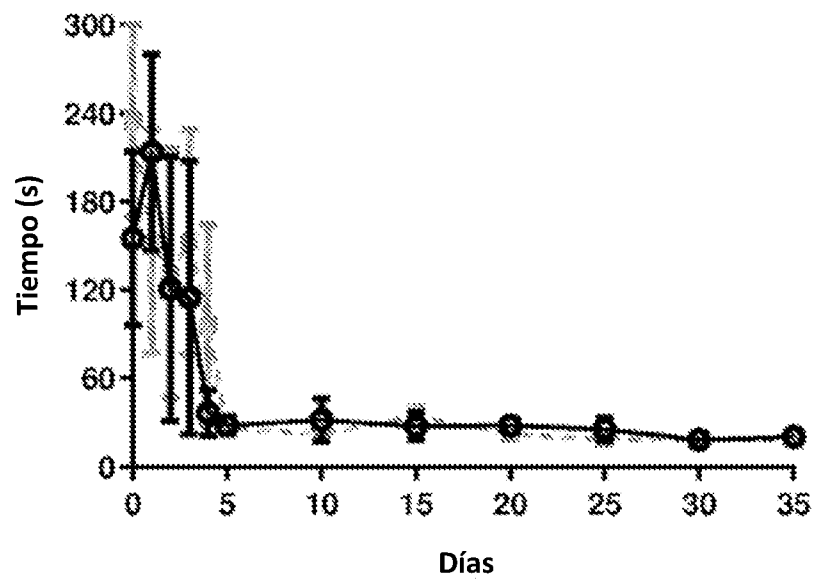


Figura 4

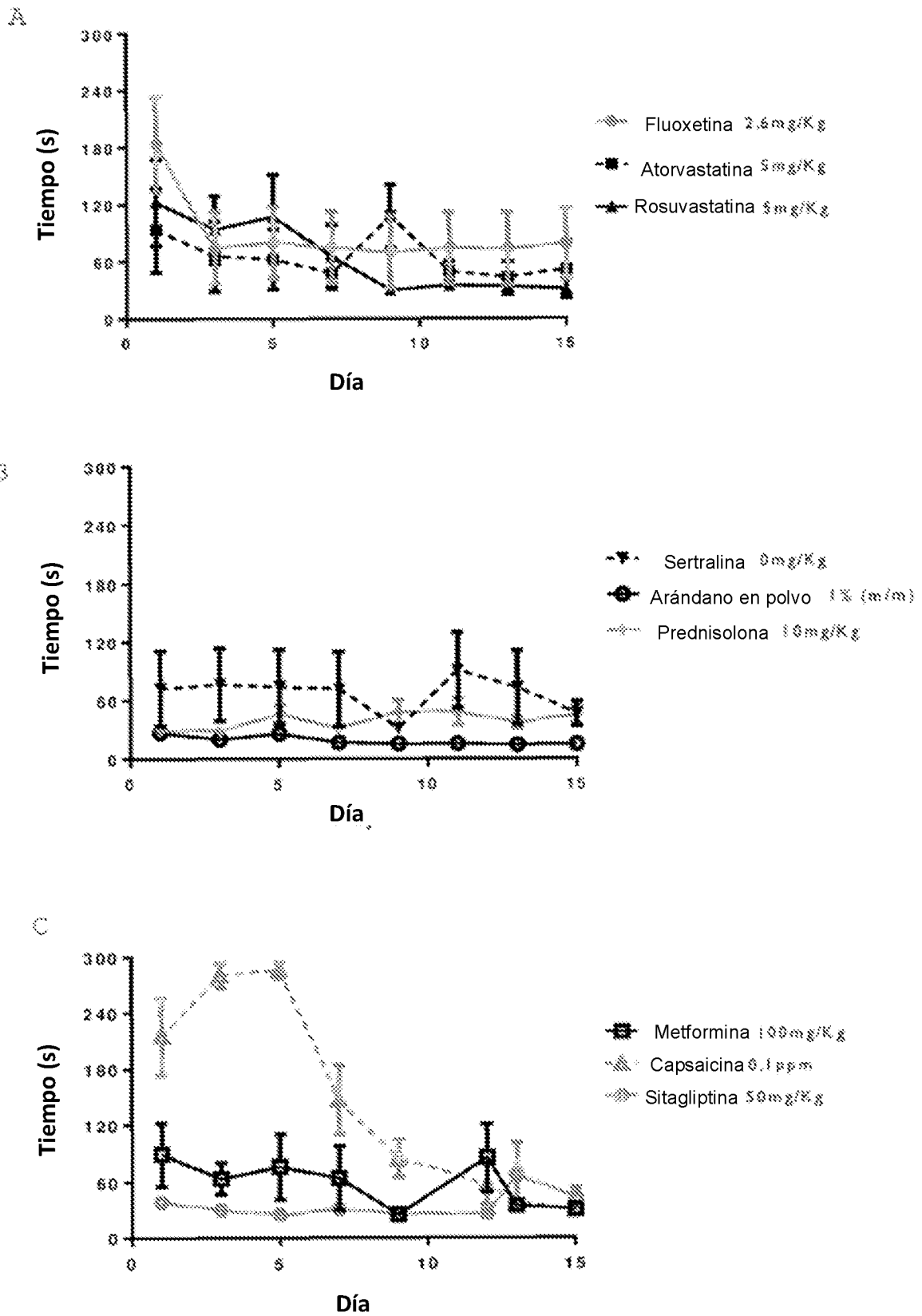


Figura 5

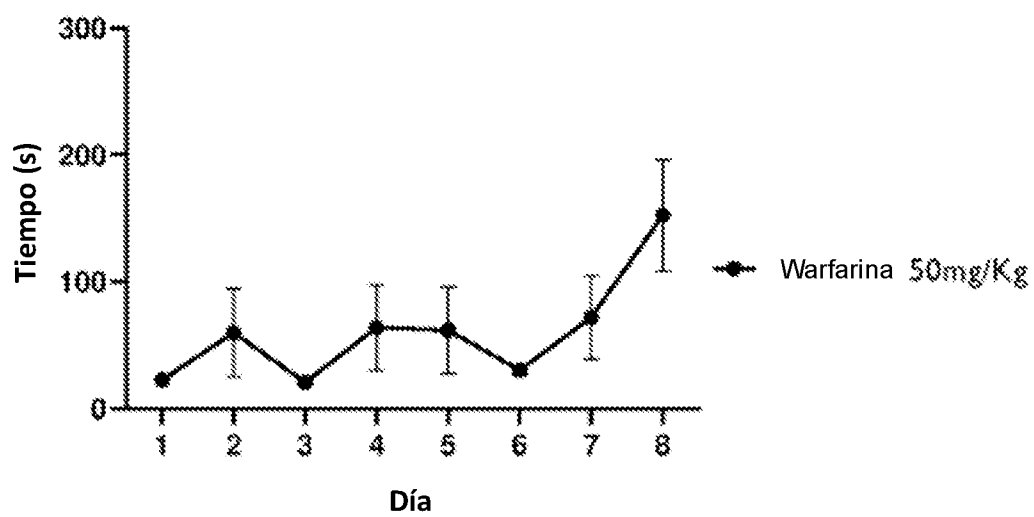


Figura 6

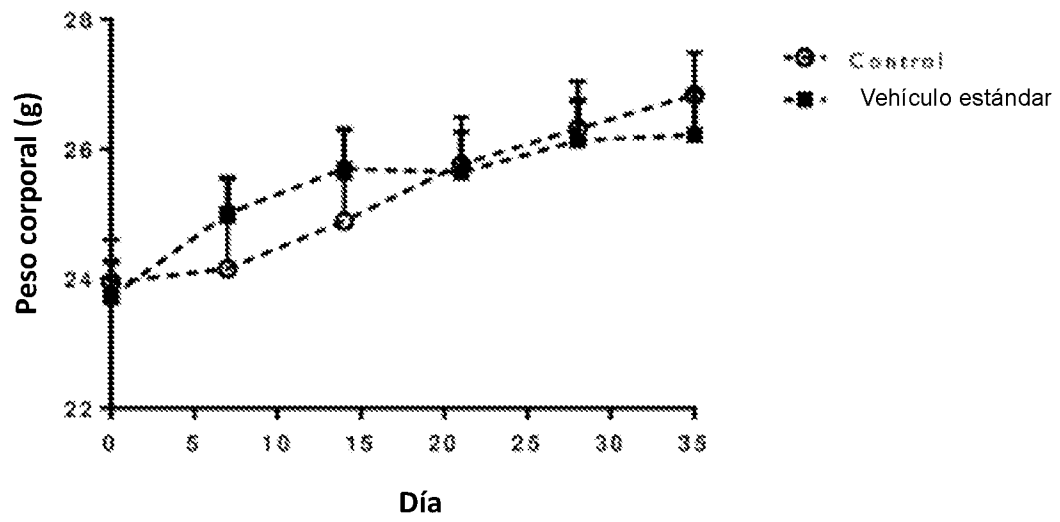


Figura 7

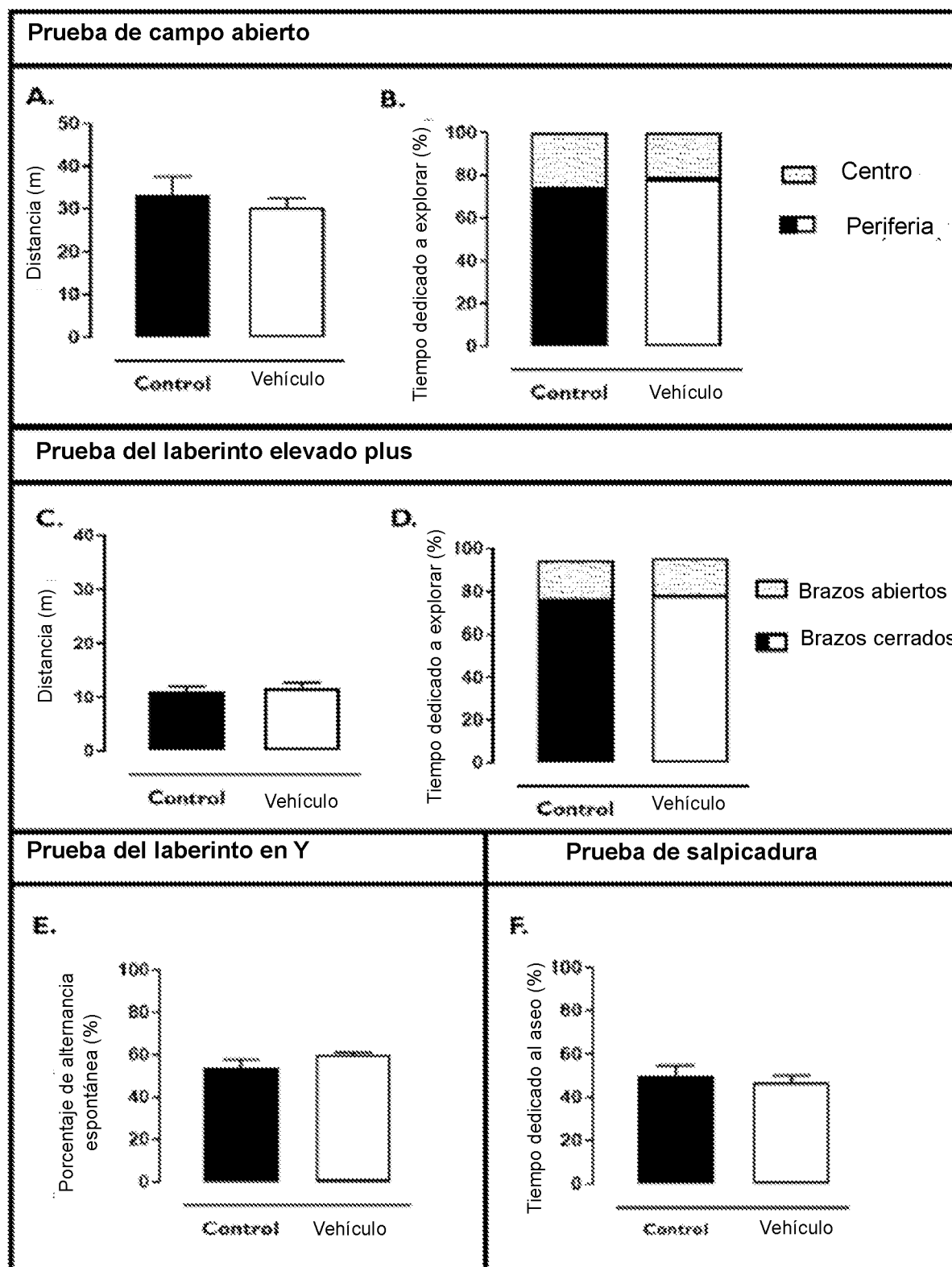


Figura 8

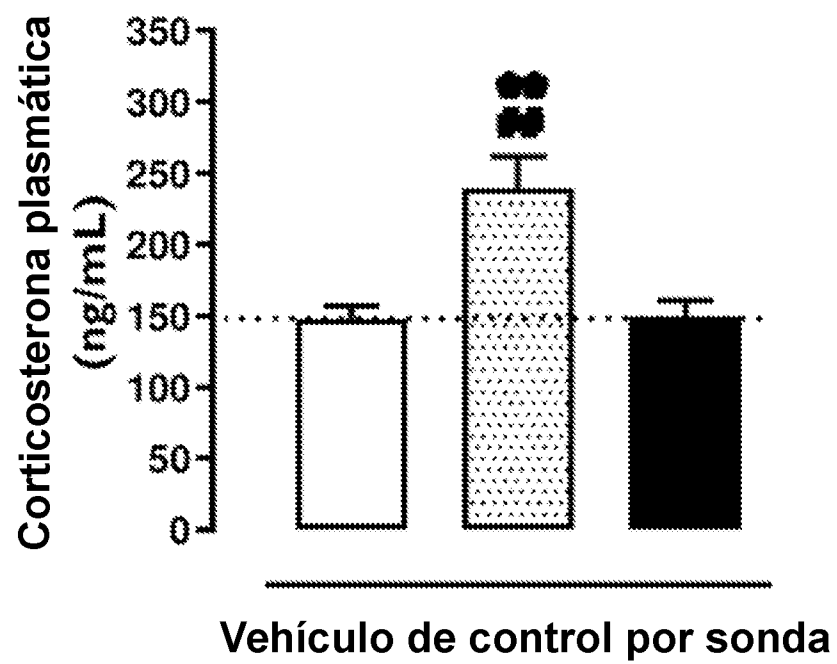


Figura 9

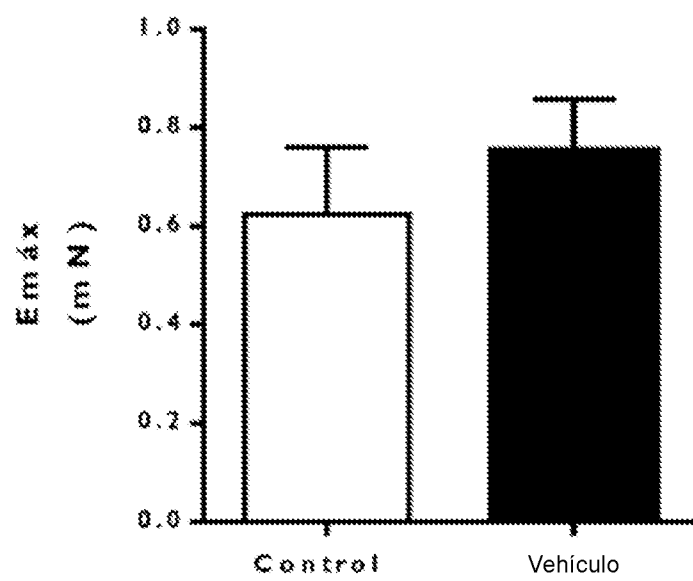


Figura 10

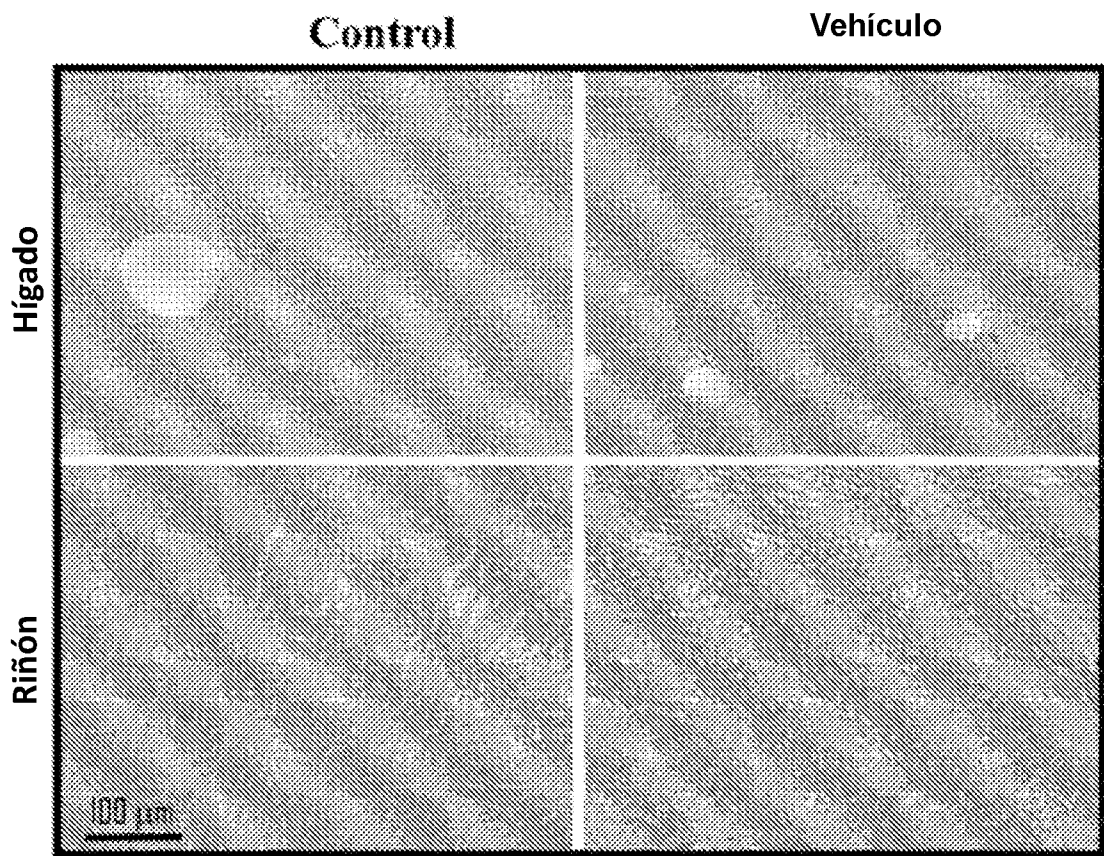


Figura 11

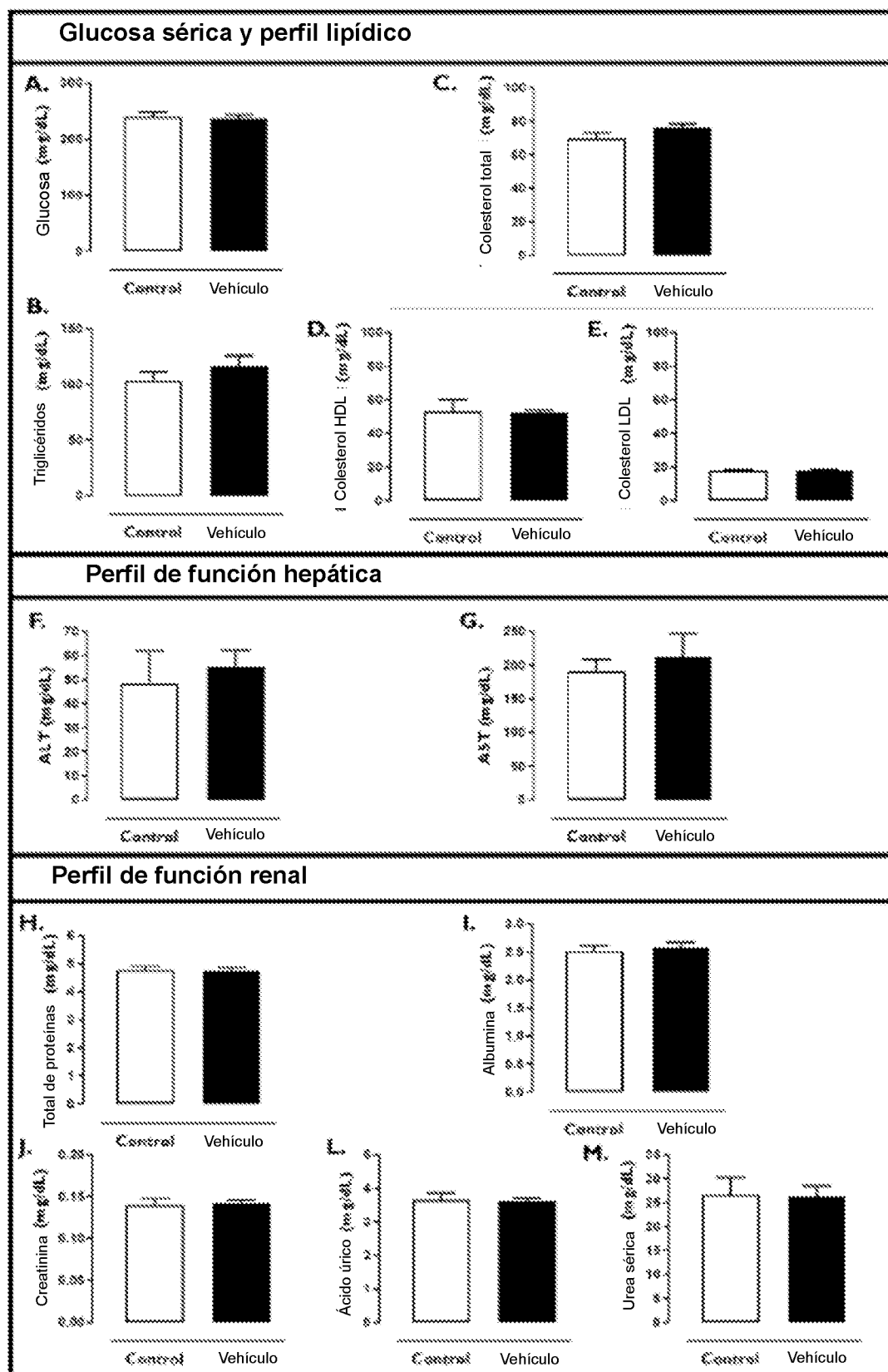


Figura 12

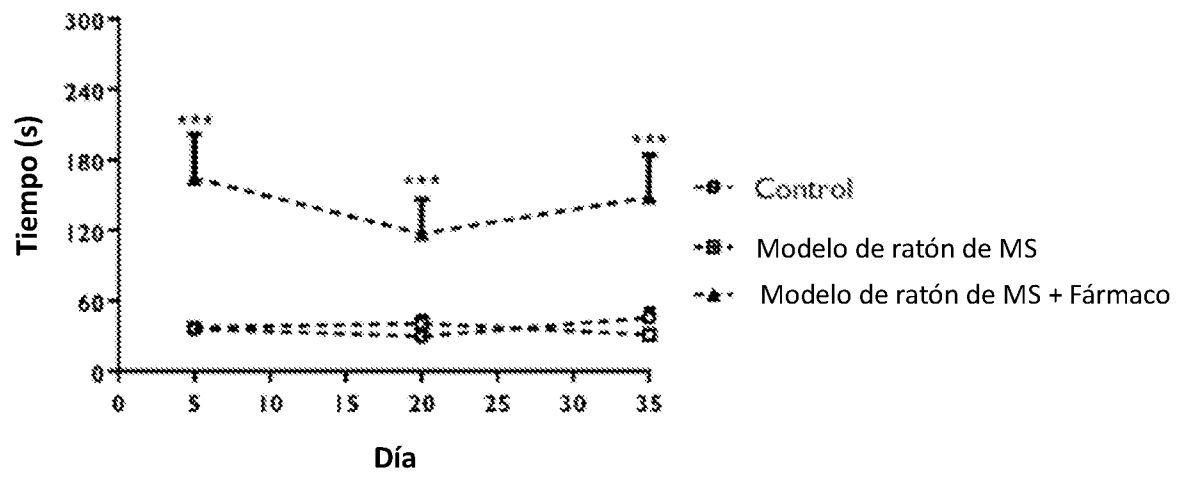


Figura 13

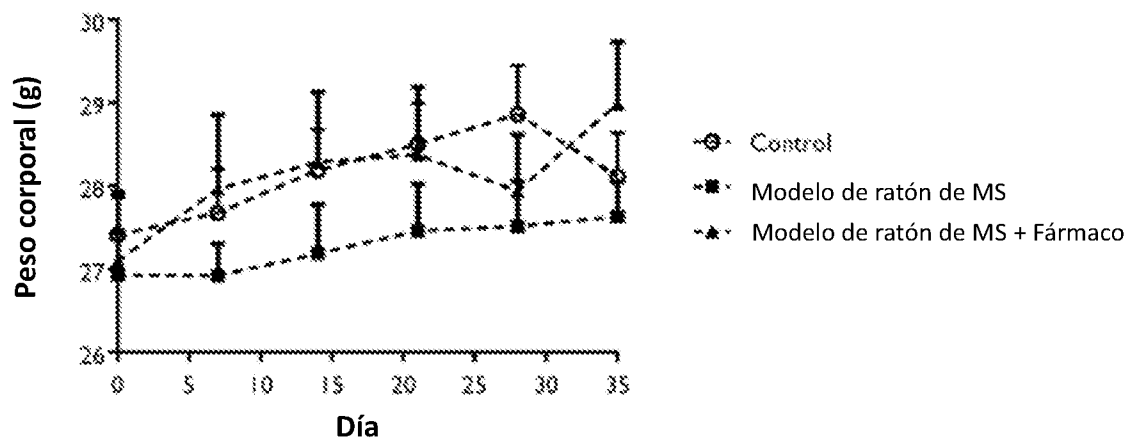


Figura 14

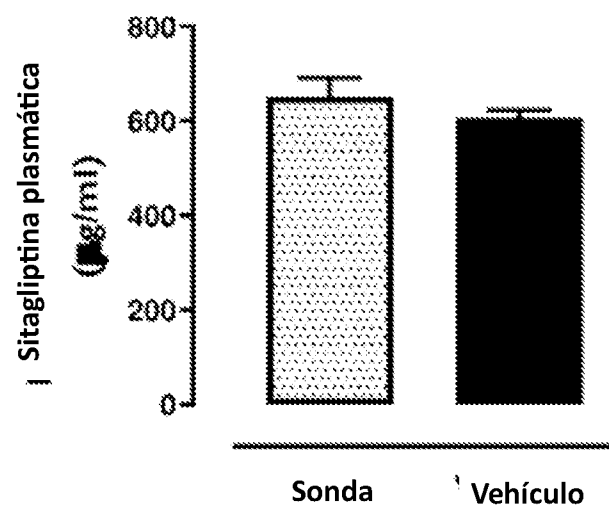


Figura 15

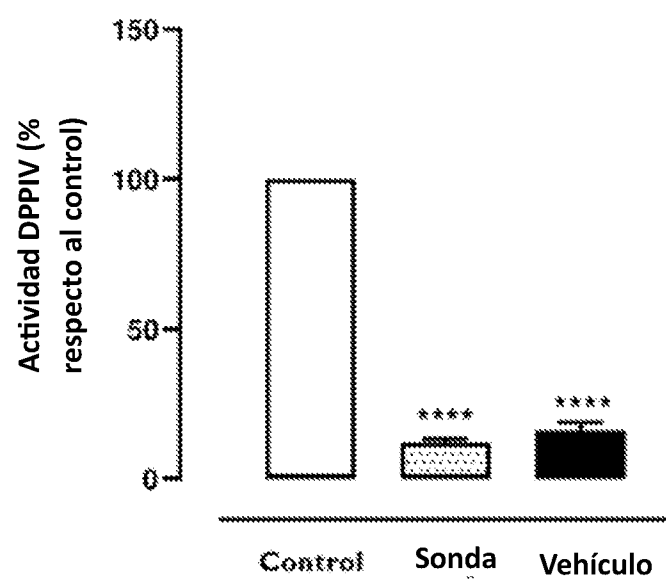


Figura 16