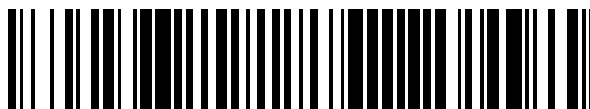


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 077**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/54** (2007.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 38/26** (2006.01)  
**A61K 49/04** (2006.01)  
**A61K 31/727** (2006.01)  
**B82Y 5/00** (2011.01)  
**C07K 14/605** (2006.01)  
**C07K 14/62** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2012** **PCT/KR2012/010265**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014** **WO14084421**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012** **E 12889309 (6)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018** **EP 2925786**

54 Título: **Conjugado de oligómero de ácido biliar para un nuevo transporte vesicular y uso del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2019**

73 Titular/es:

**ST PHARM CO., LTD. (100.0%)**  
**231, Hyeomnyeok-ro, Siheung-si**  
**Gyeonggi-do 429-848, KR**

72 Inventor/es:

**BYUN, YOUNG RO;**  
**AHMED, AL-HILAL TASLIM;**  
**JEON, OK CHEOL;**  
**MOON, HYUN TAE;**  
**YUN, YISUK y**  
**KIM, KYUNGJIN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 701 077 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

Conjugado de oligómero de ácido biliar para un nuevo transporte vesicular y uso del mismo

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para la preparación de un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal, que comprende la conjugación de un oligómero de ácido biliar que se prepara mediante la oligomerización de dos o más monómeros de ácidos biliares con el sitio terminal de una macromolécula, en el que la macromolécula es un polisacárido; un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal en el que el oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de la macromolécula, en el que la macromolécula es un polisacárido; una composición que comprende el conjugado en el que el oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de la macromolécula y un solubilizante; una formulación oral que comprende el conjugado en el que el oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de la macromolécula, un solubilizante, un excipiente, un disgregante, un aglutinante y un lubricante, en el que la macromolécula es un polisacárido; una composición farmacéutica que comprende un conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar en el que el oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de la heparina; y la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento a la prevención del cáncer, de enfermedades inflamatorias y de trombosis.

## 20 Antecedentes de la técnica

Una macromolécula se refiere a una gran molécula formada mediante la polimerización de pequeñas subunidades. Incluye derivados de polisacáridos y polipéptidos tales como la insulina. Algunas de las macromoléculas tales como la insulina, la exenatida y la heparina poseen actividades biológicas y se usan con fines terapéuticos.

La heparina es un mucopolisacárido formado principalmente por unidades repetitivas de D-glucosamina y ácido L-idurónico. Es un componente que se encuentra en la sangre que tiene actividad anticoagulante y que tiene un papel fisiológico tal como antiinflamatorio y de inhibición de la angiogénesis. Debido a sus numerosos grupos sulfato ionizables, la heparina posee una fuerte carga electronegativa. También es un ácido relativamente fuerte que forma con facilidad sales solubles en agua, por ejemplo, la heparina sódica. Se encuentra en los mastocitos y puede ser extraída a partir de muchos órganos corporales, particularmente aquellos con abundantes mastocitos. El hígado y los pulmones son especialmente ricos en heparina. La sangre circulante no contiene heparina excepto tras una profunda alteración de los mastocitos. La heparina tiene muchos papeles fisiológicos, tales como la anticoagulación de la sangre, la inhibición de la proliferación de las células del músculo liso, una actividad inmunosupresora, y así sucesivamente. En particular, la heparina es un fuerte agente anticoagulante que interactúa fuertemente con la antitrombina III para prevenir la formación de coágulos de fibrina. Al tener estas propiedades, la heparina se ha usado en la prevención y el tratamiento de la trombosis venosa profunda y de la embolia pulmonar.

A pesar de su utilidad fisiológica, la aplicación de la heparina ha estado limitada debido a su gran peso molecular y a la carga altamente negativa. Estas características físicas de la heparina impiden su absorción a través de las capas mucosas del tracto gastrointestinal (GI), nasal o bucal. Por lo tanto, la única vía de administración disponible con fines clínicos son las inyecciones intravenosas y subcutáneas.

La insulina es una macromolécula producida por las células beta de Langerhans del páncreas que tiene un papel fisiológico característico, es liberada desde el páncreas cuando el nivel de glucosa sanguínea es elevado en el cuerpo y regula el nivel de glucosa al permitir una mayor absorción de la glucosa en el hígado, el músculo y el tejido graso, donde hay una cantidad en exceso de glucosa almacenada en forma de glicógeno y mediante la inhibición de la lipólisis para la generación de una fuente de energía. Al tener las funciones anteriores, la insulina se ha usado para el tratamiento de diabéticos que requieren la regulación del nivel de glucosa sanguínea, sin embargo, debido a su gran peso molecular, no podía ser usada para una administración oral.

Asimismo, las macromoléculas como la insulina y la heparina, que tienen una bioactividad específica, no podían ser usadas para su administración oral a pesar de su utilidad fisiológica. Por lo tanto, se han realizado muchos estudios para elaborar la formulación apropiada para la administración oral de macromoléculas, en los estudios previos sobre la heparina, se han administrado conjuntamente materiales catiónicos de penetración en células y detergentes hidrófilos o hidrófobos para una mejor absorción de la heparina (Ross & Toth, 2005). En otro estudio, la heparina fue administrada con N-[8-(2-hidroxibenzoil)amino]caprilato (SNAC), pero este método no podía ser usado debido a la toxicidad de un agente de administración (Berkowitz, et al., 1914-1919). Asimismo, los inventores de la presente solicitud han desarrollado previamente un método para la administración oral de heparina mejorando las propiedades mencionadas anteriormente de la heparina a través de la unión de un tipo de ácido biliar tal como un monómero o un dímero del ácido desoxicólico a la heparina de una forma no específica de sitio (documento US 6.656.922 y Byun et al., Journal of Control Release 120 (2007) 4-10). Sin embargo, este método tiene una limitación en la mejora de la absorción interstinal de la heparina debido a que al aumentar el número de fracciones de ácido desoxicólico para mejorar el índice de absorción, se redujo la actividad anticoagulante de la heparina.

## Divulgación de la invención

## Problema técnico

5 En un esfuerzo por desarrollar un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar que pueda mejorar tanto el índice de absorción corporal como la bioactividad, los presentes inventores han conseguido la presente invención mediante la generación de una macromolécula conjugada con un oligómero de ácido biliar en el sitio terminal del mismo, en el que la macromolécula es un polisacárido; utilizando dicho conjugado para una administración oral; y confirmando que el oligómero de ácido biliar conjugado con el sitio terminal del polisacárido induce la absorción intestinal de macromoléculas a través del nuevo mecanismo de transporte vesicular que tiene una elevada eficacia de absorción.

## Solución al problema

15 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para la preparación de un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal, que comprende (a) preparar un oligómero de ácido biliar mediante la oligomerización de dos o más monómeros de ácidos biliares; y (b) conjugar el oligómero de ácido biliar preparado en la etapa (a) con el sitio terminal de una macromolécula; en el que la macromolécula es un polisacárido.

20 Es otro objeto de la invención proporcionar un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar, en el que un oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de una macromolécula; en el que la macromolécula es un polisacárido.

25 Es otro objeto más de la invención proporcionar una composición que comprende el conjugado y un solubilizante, específicamente, una composición para su administración oral.

Es otro objeto más de la invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar.

30 Es otro objeto más de la invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar en el que un oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de la heparina para su uso en el tratamiento de la trombosis.

## Efectos ventajosos de la invención

El conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar de la presente invención tiene la ventaja de un elevado índice de absorción corporal al comprender un oligómero de ácido biliar, y por lo tanto puede ser útil para el desarrollo de una formulación oral de una macromolécula.

## Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra un proceso sintético del ácido bisdesoxicólico (*bisDOCA*) que es producido mediante una reacción del ácido desoxicólico con el diclorhidrato del etil éster de lisina (2 HCl).

45 La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra un proceso sintético del derivado de N-bisdesoxicoliletilenamina (*Etbis-DOCA*) que es producido mediante una reacción del ácido bisdesoxicólico con etilendiamina (EDA) a través del grupo etoxi ( $-\text{OC}_2\text{H}_5$ ) del ácido bisdesoxicólico.

La FIG. 3 es un diagrama esquemático que muestra un proceso sintético del compuesto ( $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_9$ ) en el que un monómero de lisina es unido con tres grupos amino mediante una reacción del metil éster del clorhidrato de Ne-BOC-L-lisina con BOC-lisina(BOC)-OSu.

50 La FIG. 4 es un diagrama esquemático que muestra un proceso sintético del ácido tridesoxicólico (*tri DOCA*) que es producido mediante una reacción del ácido desoxicólico activado con N-hidroxisuccinimida (*aDOCA*) con un monómero desprotegido de lisina.

La FIG. 5 es un diagrama esquemático que muestra un proceso sintético de la N-tridesoxicoliletilenamina (*EttriDOCA*) mediante una reacción del ácido tridesoxicólico (*tri DOCA*) con EDA.

55 La FIG. 6 es un diagrama esquemático que muestra un proceso sintético de un compuesto en el que el monómero de lisina es unido con cuatro grupos amino, para ser usado para la síntesis del ácido tetradesoxicólico (*tetraDOCA*).

La FIG. 7 muestra un proceso para la preparación del ácido tetradesoxicólico (*tetraDOCA*) mediante una reacción del DOCA activado con un monómero desprotegido de lisina.

60 La FIG. 8 muestra un proceso de síntesis de la N-tetradesoxicoliletilenamina (*Ettetra DOCA*) mediante una reacción del ácido tetradesoxicólico (*tetraDOCA*) con EDA.

La FIG. 9 es un diagrama esquemático del proceso sintético de un conjugado de macromolécula representativo de la presente invención, conjugados de heparina, cuyo sitio terminal está unido a un oligómero de un ácido biliar. Para ser más específicos, se hizo reaccionar una unidad reductora de 2,5-anhidromanosa de la heparina

con derivados del DOCA para sintetizar una N-oligodesoxicoliletilamina conjugada con heparina específica de sitio terminal con la adición de cianoborhidruro de sodio ( $\text{NaCNBH}_4$ ) como un agente reductor.

La FIG. 10 muestra un método habitual para la síntesis de derivados de N-oligodesoxicoliletilamina conjugada con heparina no específicos de sitio. Se hicieron reaccionar oligómeros de ácidos biliares tales como *EtbisDOCA*, *EttriDOCA* y *EttetraDOCA* con heparina a través de una activación del grupo carboxilo y la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) de la heparina.

La FIG. 11 muestra la medición de la actividad anti-FXa en el plasma en función del tiempo, cuando se administran por vía oral los conjugados de heparina-oligómero del ácido desoxicólico específicos de sitio terminal (LHe-*oligoDOCA*), que son los conjugados de macromolécula específicos de sitio terminal representativos de la presente invención. Los conjugados se formularon con lbs y P188 (400 mg/kg y 2,16 mg/kg) y se administraron a ratas SD macho. Los resultados muestran la diferencia en el perfil de absorción entre los siguientes conjugados específicos de sitio terminal; (●) LHe-*bisDOCA*, (□) LHe-*triDOCA*, (■) LHe-*tetraDOCA*, (O) HBPM y (▲) LHe-*tetraDOCA*, que son administrados a una dosis de 10 mg/kg cada uno. (▲) Al grupo con LHe-*tetraDOCA* no se le administró otro tratamiento (por ejemplo, solubilización) (n = 4 ratas por grupo). Los resultados se muestran como una media  $\pm$  e.e.m.

La FIG. 12 muestra la diferencia en el perfil de absorción oral de los conjugados no específicos de sitio basada en el análisis de la actividad anti-FXa de los conjugados en el plasma después de una administración oral de (■) LHM-*bisDOCA*, (●) LHM-*triDOCA* y (□) LHM-*tetraDOCA* (n = 4 ratas por grupo). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  e.e.m.

La FIG. 13 muestra la medición de la actividad anti-FXa del LHe-*tetraDOCA*, que es el conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención, cuando se administró a diferentes dosis; (■) 10 mg/kg, (□) 5 mg/kg o (●) 1 mg/kg. El conjugado se formuló con lbs y P188 (400 mg/kg y 2,16 mg/kg) para ser administrado por vía oral a ratas (n = 4 ratas por grupo). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  e.e.m.

La FIG. 14 muestra la medición de la actividad anti-FXa después de la administración oral de LHe-*tetraDOCA*, un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención, en una cápsula de líquido. El símbolo (■) muestra los resultados cuando se administra a una dosis de 5 mg/kg de LHe-*tetraDOCA*, y el símbolo (□) muestra los resultados cuando se administra por vía oral a una dosis de 10 mg/kg de HBPM en una cápsula (n = 4 monos por grupo). Los resultados se muestran como las medias  $\pm$  e.e.m.

La FIG. 15 muestra el resultado del análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) para el LHe-*tetraDOCA*, que es un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención. Después de la inmovilización de la proteína ASBT en un chip sensor BIAcore, se añadió el LHe-*tetraDOCA* para determinar la constante de disociación (Kd), que se muestran en esta figura.

La FIG. 16 muestra el análisis del transporte direccional de un conjugado de 50 ug/ml de HBPM y de 50 ug/ml de HBPM en el que el *oligoDOCA* está unido al sitio terminal de HBPM. Se trataron células Caco-2 con HBPM o con un conjugado HBPM a 37 °C durante 1 h (n = 3) y se analizó el transporte del compuesto en la célula. La FIG. 16A muestra una región apical, y la FIG. 16B muestra una región basolateral.

La FIG. 17 muestra el resultado de la inhibición del transporte desde apical a basolateral de 50 ug/ml de HBPM y de 50 ug/ml del conjugado de HBPM en el que el *oligoDOCA* está unido al sitio terminal de la HBPM mediante la adición de taurocolato de sodio 200  $\mu\text{M}$  (TCA), un inhibidor de la ASBT (n = 3).

La FIG. 18 muestra la diferencia en los índices de absorción de los conjugados de HBPM, en la que el *oligoDOCA* está unido al sitio terminal de la HBPM, dependiendo del tipo de *oligoDOCA* en las células MDCK-ASBT.

La FIG. 19 muestra el resultado del tratamiento con el LHe-*tetraDOCA*, que es un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención, en una célula MDCK que sobreexpresa la ASBT y en una célula MDCK natural. Los resultados demuestran que el LHe-*tetraDOCA* estaba presente en el interior de la célula con la ASBT sobreexpresada (MDCK-ASBT), lo que indica que la absorción oral del LHe-*tetraDOCA* no era derivada por un aumento en la hidrofobicidad del compuesto, sino que más bien está relacionado con un aumento en la afinidad por un transportador de ácido biliar, a saber, la ASBT. El núcleo se tiñó con DAPI (azul). Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ ; mayor aumento, 5  $\mu\text{m}$ .

La FIG. 20 muestra las imágenes confocales de la célula que confirman la absorción del LHe-*tetraDOCA*, que es un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención. Las células Caco-2 se trataron con LHe-*tetraDOCA* marcado con RITC y se analizaron con un microscopio confocal después de 30 minutos. La fusión muestra que el LHe-*tetraDOCA* se encuentra en el citoplasma. Las uniones estrechas de las células fueron detectadas con una tinción de faloidina-FITC (verde). El núcleo se tiñó con DAPI (azul). Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ ; mayor aumento, 5  $\mu\text{m}$ .

La FIG. 21 muestra el análisis por inmunotransferencia western de las células para determinar la distribución espacial de la ASBT desde la membrana celular hacia el citoplasma después del tratamiento de las células MDCK que sobreexpresan la ASBT con el LHe-*tetraDOCA*. Después de la eliminación del compuesto, se observó la expresión de la ASBT de nuevo en la membrana celular. El análisis de inmunotransferencia Western se llevó a cabo mediante el uso de un anticuerpo de cabra anti-ASBT humana que es específico para la ASBT, así como otros anticuerpos específicos para la membrana (cadherina), el citoplasma (calnexina) y el núcleo (YY1). También, los resultados fueron analizados comparando los grupos tratados y no tratados con taurocolato (TCA).

La FIG. 22 muestra el análisis de los cambios en la expresión de la ASBT en las células MDCK-ASBT tratadas con el LHe-*tetraDOCA*, que es un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la

presente invención, mediante el uso de un microscopio confocal. Un agregado de proteínas ASBT (verde) estaba ausente en la membrana apical después del tratamiento con el LHe-*tetraDOCA*, pero reapareció en la membrana después de la eliminación del compuesto. Los anteriores cambios en la expresión de la ASBT no se observaron en un grupo de control que no estaba tratado con el compuesto ni en un grupo que se trató con TCA. Barra de escala, 20 µm.

La FIG. 23 muestra los resultados del análisis de co-inmunoprecipitación (Co-IP) para confirmar la interacción entre el LHe-*tetraDOCA*, que es un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención, y la ASBT en diferentes fracciones celulares. Las células MDCK-ASBT se trataron con LHe-*tetraDOCA* marcado con biotina y se fraccionaron en membrana celular y citoplasma. El LHe-*tetraDOCA*-biotina fue desplegado mediante microesferas de estreptavidina y se inmunotransfirió para confirmar la interacción. Los resultados muestran que la ASBT estaba presente tanto en la membrana celular como en el citoplasma.

<ASBT (panel superior), LHe-*tetraDOCA*-biotina, carga de ASBT (panel inferior)>.

La FIG. 24 muestra el resultado de un análisis de detección PLA (ensayo de ligación por proximidad) *in situ* para la detección de la interacción entre la ASBT y el LHe-*tetraDOCA* en células MDCK-ASBT. Las interacciones de la proteína se observan como una marca roja. El panel derecho, con un aumento mayor, muestra las interacciones de la proteína tanto con la membrana celular como con el citoplasma. Barra de escala, 20 µm.

La FIG. 25 muestra la observación del transporte intracelular de la ASBT, que forma cuerpos multivesiculares (CMV) bajo el microscopio de transmisión electrónica (TEM). La ASBT se observó por primera vez en la membrana celular de las células MDCK-ASBT, según indica la flecha. Pero el tratamiento de las células con el LHe-*tetraDOCA*, que es un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención, indujo cambios en la estructura de la membrana celular y en la curvatura de la membrana. La ASBT se encontró en la región fagocitada de la membrana celular. A continuación, la ASBT de la membrana celular se reunió y fueron transportadas cerca de los cuerpos multivesiculares (CMV). Los transportadores de proteínas pequeñas, incluyendo la ASBT, estaban fusionados con los CMV. Barra de escala 200 nm.

La FIG. 26 muestra los resultados del PLA *in situ* que muestran la interacción entre la proteína de unión del ácido biliar ileal (IBABP) y el LHe-*tetraDOCA*, que es un conjugado de macromolécula específico de sitio terminal representativo de la presente invención, en las células SK-BR-3. Se observó una marca para la interacción entre la IBABP y el LHe-*tetraDOCA* (rojo) muy cercana a la marca de la ASBT (verde). También, una imagen con un mayor aumento demostró que estas marcas tenían una estructura vesicular. Barra de escala, 10 µm.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Como un aspecto, la presente invención proporciona un método para la preparación de un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal, que comprende (a) preparar un oligómero de ácido biliar mediante la oligomerización de dos o más monómeros de ácidos biliares; y (b) conjugar el oligómero de ácido biliar preparado en la etapa (a) con el sitio terminal de una macromolécula; en el que la macromolécula es un polisacárido.

En la presente invención, se confirmó que si se un oligómero de ácido biliar que se prepara mediante una oligomerización de dos o más monómeros de ácidos biliares está conjugado con el sitio terminal de un polisacárido, esos polisacáridos, que eran difíciles de ser absorbidos en el intestino, pueden ser efectivamente absorbidos en el cuerpo a través del nuevo mecanismo denominado transporte vesicular mediante la unión a la ASBT, que es un transportador de ácido biliar en la membrana celular intestinal. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la preparación de un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal que puede derivar en una absorción efectiva en el cuerpo de varios polisacáridos a través de la conjugación del oligómero de ácido biliar con el sitio terminal de un polisacárido. El método de la presente invención es característico porque no une el ácido biliar a un polisacárido paso a paso, sino que más bien prepara un oligómero de ácido biliar por separado y lo une al sitio terminal del polisacárido, lo que deriva en el transporte vesicular.

Según se usa en el presente documento, el término "conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar" se refiere a un conjugado en el que el oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de un polisacárido. Preferiblemente, el conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar de la presente invención se caracteriza por que el oligómero de ácido biliar está unido al sitio terminal de un polisacárido. Esto es, el conjugado de la presente invención no se forma mediante la conjugación de un oligómero de ácido biliar con un sitio no específico de un polisacárido o mediante la conjugación del mismo con el sitio intermedio de un polisacárido. Más bien, el presente conjugado se prepara mediante una conjugación específica de sitio terminal del oligómero de ácido biliar con el polisacárido. Dado que un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar de la presente invención se forma mediante la conjugación específica de sitio terminal de un oligómero de ácido biliar con el polisacárido, la absorción del polisacárido se mejora a través de la interacción entre oligómero de ácido biliar y la ASBT de las células intestinales. Adicionalmente, esta forma de conjugado no produce impedimentos estéricos en el sitio de un polisacárido que pudiera ser responsable de la bioactividad del mismo. Por lo tanto, el conjugado de la presente invención es ventajoso porque puede mantener o mejorar la bioactividad de un polisacárido, favoreciendo aún una alta absorción intestinal. Por lo tanto, cuando el conjugado de la presente invención, que se prepara mediante la configuración de un oligómero de ácido biliar con el sitio terminal de un polisacárido, se usa junto con un solubilizante en una formulación oral, puede tener un elevado índice de absorción corporal, así como una fuerte bioactividad. Entre los muchos conjugados de la presente invención, el conjugado de heparina-oligómero de ácido

biliar puede formarse mediante la conjugación de un oligómero de ácido biliar específicamente con el sitio terminal de la heparina. Dicha conjugación específica de sitio terminal puede llevarse a cabo haciendo reaccionar una unidad reductora de 2,5-anhidromanosa de la heparina en su sitio terminal con un derivado de un ácido biliar tal como EtnDOCA (n = bis/tri/tetra), seguido de la reacción del compuesto con un agente reductor tal como NaCNBH<sub>4</sub>. Al contrario que el conjugado específico de sitio terminal de la presente invención, el conjugado de heparina-ácido biliar no específico de sitio se prepara mediante la activación de diversos grupos ácido carboxílico de la heparina y haciéndolos reaccionar con los derivados del ácido biliar, conjugando así los ácidos biliares en el sitio intermedio de la heparina de una forma no específica.

Los anteriores conjugados, particularmente un tetrámero conjugado de macromolécula-ácido biliar en el que la macromolécula es un polisacárido, es transportado al interior de las células intestinales en forma de una vesícula a través de la unión con un transportador de ácido biliar apical dependiente de sodio o con un transportador de ácido biliar ileal humano (ASBT). Previamente se han realizado muchos estudios para hallar un mecanismo de transporte de los ácidos biliares, en los que los ácidos biliares pasan a través de la ASBT y difunden en su sitio de destino. En este caso, el tamaño de la molécula que puede pasar a través de la ASBT es limitado, dando como resultado un bajo índice de absorción intestinal del polisacárido. Sin embargo, los inventores de la presente invención han descubierto recientemente, por primera vez, que si un oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de un polisacárido, las ASBT forman vesículas en la membrana intestinal, induciendo el transporte vesicular, que después da lugar a la absorción intestinal de un polisacárido. A través de la identificación de este nuevo mecanismo, se sugirió, por primera vez, que el conjugado de la presente invención puede usarse en una formulación oral que puede permitir una eficiente absorción intestinal de un polisacárido. Dicha formulación vesicular puede ser elaborada mediante el desarrollo de una composición del presente conjugado. El presente mecanismo de transporte vesicular, en el que una macromolécula-oligómero de ácido biliar en el que la macromolécula es un polisacárido se une a la ASBT y es transportada en una forma vesicular, no había sido descubierto nunca anteriormente.

Para los métodos de preparación de la presente invención, la etapa (a) es para la preparación de un oligómero de ácido biliar mediante la oligomerización de más de dos monómeros de ácidos biliares.

Según se usa en el presente documento, el término "ácido biliar" significa derivados naturales y sintéticos de un esteroide. Para el propósito de la presente invención, el tipo de ácido biliar no está limitado, siempre que pueda ser conjugado con una macromolécula en forma de un oligómero y derive en una absorción intestinal eficiente. Algunos ejemplos del ácido biliar comprenden ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursocólico, ácido isoursodesoxicólico, ácido lagodesoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicodesoxicólico, ácido glicoquenodesoxicólico, ácido deshdrocólico, ácido hiocólico o ácido hiodesoxicólico. En una realización de la presente invención se usó el ácido desoxicólico como un ácido biliar representativo.

Según se usa en el presente documento, el término "oligómero de ácido biliar" se refiere a los derivados de un ácido biliar que se preparan mediante la unión de más de dos monómeros de ácidos biliares, preferentemente se refiere a un derivado formado mediante la unión de más de tres monómeros de ácidos biliares y más preferentemente se refiere a un derivado formado mediante la unión de más de cuatro monómeros de ácidos biliares. Preferiblemente, el oligómero de ácido biliar puede comprender entre dos y diez monómeros de ácidos biliares. El oligómero de ácido biliar, que está conjugado con el sitio terminal de un polisacárido de la presente invención, se une a la ASBT de las células intestinales, que puede derivar en un transporte vesicular, dando lugar a una eficiente absorción intestinal de una macromolécula.

El oligómero de ácido biliar puede estar formado por más de un tipo de ácido biliar que se selecciona entre el grupo que consiste en ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursocólico, ácido isoursodesoxicólico, ácido lagodesoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicodesoxicólico, ácido glicoquenodesoxicólico, ácido deshdrocólico, ácido hiocólico y ácido hiodesoxicólico. El oligómero de ácido biliar puede comprender el mismo o diferentes tipos de ácidos biliares.

Además, el oligómero de ácido biliar puede comprender preferentemente un conector que tiene un grupo funcional que puede ser unido al sitio terminal de una macromolécula.

Según se usa en el presente documento, el término "conector" se refiere a un grupo conector que puede acoplarse al oligómero de ácido biliar en el sitio terminal de una macromolécula y puede comprender un grupo funcional que puede ser unido al sitio terminal de una macromolécula. El grupo funcional que puede ser acoplado al sitio terminal de una macromolécula puede variar dependiendo del tipo de grupo funcional ubicado en el sitio terminal de la macromolécula. Por ejemplo, en el caso de la formación de un enlace a través de una aminación reductora con un grupo carbonilo, tal como un grupo aldehído o un grupo cetona de un polisacárido, puede usarse el grupo amino, pero no se limita al mismo (Kalia J et al., Curr Org Chem. Enero de 2010; 14 (2): 138-147; Riin Velleste et al., Cellulose, 2010, 17: 125-138). Algunos ejemplos de conector comprenden, pero no se limitan a, una cadena alquílica, polietilenglicol (PEG), pentaetilenhexamina, 1,5-diamino-2-metilpentano o etilendiamina (EDA) con un peso molecular de entre 300 y 500 Da. En un ejemplo de la presente invención, se acopló EDA al oligómero de ácido desoxicólico sintetizado para formar un conector que comprende un grupo amino. Después, el oligómero de ácido desoxicólico se conjugó con el sitio terminal de la heparina mediante la reacción del grupo amino del conector unido

al oligómero de ácido biliar con un grupo aldehído de una unidad reductora de 2,5-anhidromanosa en el sitio terminal de la heparina.

Los métodos de preparación de la presente invención comprenden una etapa (b) de conjugación del oligómero de ácido biliar de la etapa (a) con el sitio terminal de macromolécula, en el que la macromolécula es un polisacárido.

Según se usa en el presente documento, el término "macromolécula" se refiere a una gran molécula formada mediante la polimerización de pequeñas subunidades. Para el propósito de la presente invención, la macromolécula es un polisacárido. Preferiblemente, las macromoléculas se refieren a polisacáridos con un peso molecular mayor de 1.000 Da.

Según se usa en el presente documento, el término "polisacárido" se refiere a una macromolécula que está formada por más de dos monosacáridos unidos por un enlace glicosídico. Algunos ejemplos de polisacáridos incluyen, pero no se limitan a, heparina, heparina sódica, un polisacárido sulfonatado, celulosa, hidroximetil celulosa o hidroxipropil celulosa. El polisacárido de la presente invención es preferiblemente un polisacárido anticoagulante, más preferentemente una heparina.

Además, el polisacárido puede comprender un grupo carbonilo en su sitio terminal. Los polisacáridos que comprenden un grupo carbonilo en su sitio terminal pueden ser acoplados a un oligómero de ácido biliar a través de una reacción de aminación reductora con un grupo amino de un conector unido al oligómero de ácido biliar. Para ser más específicos, el grupo hidroxilo del sitio terminal de celulosa puede ser oxidado a un grupo carbonilo tal como cetona, que después se hace reaccionar con un grupo amino para el acoplamiento (Riin Velleste et al, Cellulose, 2010, 17: 125-138). También puede acoplarse el grupo aldehído de una unidad reductora de 2,5-anhidromanosa del terminal de la heparina con otro compuesto a través de la reacción con un grupo amino.

Según se usa en el presente documento, el término "heparina" se refiere a un polisacárido ácido que tiene un grupo ácido sulfónico que está compuesto fundamentalmente por unidad de repetitivas de D-glucosamina y ácido L-idurónico. La heparina tiene una actividad anticoagulante. La heparina usada en el presente documento incluye heparina no fraccionada, heparina de alto peso molecular, heparina de bajo peso molecular (HBPM), fragmentos de heparina y heparina recombinada. Para un conjugado representativo del oligómero de heparina-ácido biliar de la presente invención que se forma mediante la conjugación de un oligómero de ácido biliar con el sitio terminal de la heparina, según aumenta el número de fracciones de ácido biliar combinadas con la heparina, mejoran tanto el índice de absorción corporal como la actividad anticoagulante, al contrario que el conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar no específico de sitio, en el que el oligómero de ácido biliar está unido en el sitio intermedio de la heparina.

Según se usa en el presente documento, el término "terminal" se refiere a una parte de la macromolécula en la que puede unirse el oligómero de ácido biliar. Para la incorporación del polisacárido en el conjugado, el terminal puede referirse a un monosacárido ubicado en el sitio terminal del polisacárido, pero no se limita al mismo.

El conjugado de la presente invención preparado mediante el uso del método de la presente invención puede moverse hacia el interior de la célula intestinal a través de la unión con un transportador apical de ácido biliar dependiente de sodio (ASBT), seguido del transporte vesicular.

El conjugado de la presente invención contiene un oligómero de ácido biliar unido al sitio terminal de un polisacárido, que puede unirse a la ASBT y ser transportado al interior de la célula en una forma de transporte vesicular, al contrario que otros conjugados conocidos previamente. El conjugado que comprende el oligómero de ácido biliar que fue transportado al interior de la célula mediante la unión a la ASBT y un transporte vesicular se une a continuación a la IBABP del citoplasma y experimenta una exocitosis a través de una región basolateral, y finalmente es transportado a la circulación sanguínea. El presente mecanismo de transporte vesicular permite la absorción intestinal de un polisacárido, y por lo tanto puede ser aplicado para el desarrollo de una formulación oral.

En una realización de la presente invención, se usó herapina como macromolécula representativa, y se usaron ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido litocólico y ácido ursodesoxicólico como ácido biliar, y los derivados del ácido desoxicólico se sintetizaron en forma de un oligómero (Figuras 1 a 8). Mediante el uso de estos derivados del ácido desoxicólico se preparó el oligómero de heparina-ácido desoxicólico de la presente invención en el que el oligómero de ácido desoxicólico está conjugado con el sitio terminal de la heparina (Figura 9). La composición que comprende el conjugado de la presente invención, en el que el oligómero del ácido desoxicólico está conjugado con sitio terminal de la herapina; y un solubilizante, fueron administrados a ratas y se monitorizó la actividad anticoagulante de la composición. Los resultados muestran que según aumenta el número de fracciones de ácido desoxicólico, también aumenta significativamente la actividad anticoagulante, al contrario que con el grupo comparativo, en el que el ácido desoxicólico esta conjugado sin especificidad de sitio. Además, la actividad anticoagulante era en su mayor parte alta en comparación con el grupo comparativo. Especialmente, cuando se conjugaba más de un trímero del ácido desoxicólico con el conjugado, la actividad anticoagulante era significativamente mayor (Figuras 11 y 12). Se usó heparina-tetraDOCA (LHe-tetraDOCA) como un representante de los conjugados específicos de sitio terminal de la presente invención. Cuando se administró el LHe-tetraDOCA a ratas a diferente concentración, se aumentó la

actividad anticoagulante de la sangre (Figura 13). Asimismo, cuando se administró el LHe-tetraDOCA a monos, se observó un efecto anticoagulante significativamente mayor (Figura 14). Se usó una resonancia de plasmón superficial (SPR) para analizar la interacción entre el LHe-tetraDOCA, que es un conjugado representativo de la presente invención con un elevado índice de absorción corporal, y la ASBT, que es un transportador de ácido biliar ubicado en la superficie de las células intestinales. Los resultados del análisis de SPR mostraron una  $K_D$  de 0,072  $\mu$ M (Figura 15). Además, se usaron células Caco-2 como sistema representativo de administración de fármacos con objeto de determinar el índice de absorción corporal. Como resultado, los conjugados específicos de sitio terminal de la presente invención mostraron que al aumentar el número de fracciones de ácido desoxicólico combinadas con el conjugado, aumentaba el índice de transporte del conjugado desde la región apical (A) hacia la basolateral (B). Especialmente, cuando había unido un tetrámero de ácido desoxicólico al conjugado, el transporte inverso desde la región basolateral hacia la apical se redujo significativamente (Figura 16). Adicionalmente, cuando el transporte desde la región apical hacia la basolateral se inhibe mediante el tratamiento de la célula con ácido taucólico (TCA), la inhibición del transporte a través de la inhibición de la ASBT era más significativa para los conjugados que comprenden un oligómero de ácido desoxicólico, en comparación con los conjugados con un monómero de ácido desoxicólico de la presente invención. Especialmente, cuando había unido un tetrámero de ácido desoxicólico, el transporte del conjugado estaba significativamente inhibido, lo que indica que el transporte a través de la ASBT juega un importante papel en el transporte del conjugado que comprende un oligómero de ácido desoxicólico, especialmente de un tetrámero de ácido desoxicólico (Figura 17). Estos resultados indican que un conjugado representativo de heparina-oligoDOCA de la presente invención tiene un elevado índice de absorción corporal y actividad anticoagulante. Además, la presente invención identificó un mecanismo de transporte para un polisacárido conjugado que comprende un oligómero de ácido biliar en su sitio terminal. Adicionalmente, la presente invención demostró que el conjugado de LHe-tetraDOCA representativo de la presente invención estaba ubicado cerca de la ASBT en las células que sobreexpresan la ASBT (Figuras 19 y 20). Y dependiendo de la presencia del LHe-tetraDOCA en la célula, la ASBT migraba desde membrana celular al citoplasma, o volvía de nuevo a la membrana celular (Figuras 21 y 22). También, se observó la interacción entre la ASBT y el LHe-tetraDOCA (Figuras 23 y 24). Se confirmó que, a través de esta interacción, el LHe-tetraDOCA era transportado al interior de la célula a través de un transporte vesicular (Figura 25). Aquellos LHe-tetraDOCA transportados interactuaban después con la IBABP y experimentaban una exocitosis a través de la región basolateral (Figura 26).

Como otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal, en el que un oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de una macromolécula, en el que la macromolécula es un polisacárido.

La macromolécula, el ácido biliar, el oligómero de ácido biliar y el conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar son los mismos que los descritos anteriormente.

Como otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el conjugado y un solubilizante, más específicamente una composición o una formulación para su administración oral.

El conjugado es el mismo que el descrito anteriormente.

Según se usa en el presente documento, el término "solubilizante" se refiere a un aditivo para prevenir la autoagregación del conjugado de la presente invención. El solubilizante posee moléculas tanto hidrófilas como hidrófobas, previniendo así la autoagregación del conjugado de la presente invención. Específicamente, la parte hidrófila del solubilizante interactúa con una macromolécula tal como la heparina, mientras que la parte hidrófoba interactúa con la fracción de ácido biliar, y por lo tanto puede reducir la tensión superficial. A través de esta acción del solubilizante, el oligómero de ácido biliar del presente conjugado puede ser expuesto a, e interactuar con, un transportador de ácido biliar, que da lugar a un mayor índice de absorción del conjugado. Para el propósito de la presente invención, el tipo de solubilizante no está limitado siempre que facilite una absorción intestinal efectiva del conjugado de la presente invención. Algunos ejemplos del solubilizante incluyen, pero no se limitan a, óxido de polietileno, hidroxialquil celulosa, hidroxipropilalquil celulosa, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, copovidona, carboximetil celulosa de sodio, carbopol, alginato de sodio, goma xántica, goma de algarrobo, glicofurol, poloxámero, ciclodextrina o detergente.

Los detergentes de la presente invención pueden ser detergentes aniónicos, detergentes no iónicos, detergentes bipolares y mezclas de los mismos. Algunos ejemplos de los detergentes incluyen, pero no se limitan a, alquilalil-poli (oxietilén) éteres, poli (oxietilén) éteres condensados con alquilalil formaldehído, copolímeros en bloque que comprenden poli (oxietileno) como su parte lipófila, poli (oxietilén) éteres de ésteres de glicerina, poli (oxietilén) éteres de ésteres de sorbitano, poli (oxietilén) ésteres de ácidos grasos de sorbitano, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, ésteres de glicerina, ésteres de sorbitano, ésteres de propilenglicol, ésteres de azúcares, alcanol amidas de ácidos grasos, poli (oxietilén) amidas de ácidos grasos, poli (oxietilén) alquil aminas, glicéridos poliglicolados, poli (oxietilén) aceites de ricino, poli (oxietilén) aceites de ricino hidrogenados, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, monoglicéridos de ácidos grasos, diglicéridos de ácidos grasos, triglicéridos de ácidos grasos, de ácidos grasos de azúcares, sales biliares, micelas mixtas de sales biliares y lecitina, ésteres de glucosa y vitamina E TPGS (succinato de D- $\alpha$ -tocopheril polietilenglicol 1000), además, algunos ejemplos de los detergentes de la presente invención incluyen Solutrol HS 15 (Macrogol-15-hidroxiestearato); Cremophor RH 40 (Polioxil 40 aceite



de ricino hidrogenado); Cremophor A6 (Macrogol (6) cetostearyl éter); Cremophor A25 (Macrogol (25) cetostearyl éter); Labrasol (glicéridos de caprilcaproil macrogol (polioxiglicéridos)); Transcutol (dietilenglicol monoetil éter); Tweens (Polisorbato 20, 21, 40, 61, 65, 80, 81, 85, 120); Poloxámeros 124, 188, 237, 338, 407 (copolímero en bloque de polioxietileno polioxipropileno); Nikkol HCO-4O (aceite de ricino polioxietilenglicolado natural o hidrogenado); Myrj 45 (estearato de polioxietileno (8)); Tagat L (monolaurato de polioxietileno (30)); Marlosol 1820 (estearato de polioxietileno (20)); Marlosol OL 15 (oleato de polioxietileno (15)); Brij 52 (alcohol polioxietilén (2) cetílico); Brij 96 (Polioxietilén (10) oleíl éter); Brij 700 (alcohol polioxietilén (100) estearílico); Volpo 015 (Polioxietilén (15) oleíl éter); Marlowet OA3O (Polioxietilén (30) oleíl éter); Marlowet LMA2O (Polioxietilén (20) oleíl éter); Syperonic PE L44 (copolímero de polioxietileno-polioxipropileno); Syperonic F127 (copolímero de polioxietileno-polioxipropileno); Labrafil M1994CS (oleíl macroglicéridos (polioxiglicéridos)); Labrafil M2125CS (linoleíl macroglicéridos (polioxiglicéridos)); Labrafac PG (dicaprilcaprato de propilenglicol); Imbitor (mono- y di- glicérido de ácido caprílico / ácido cáprico); mono estearato de sorbitano; triestearato de sorbitano; monooleato de sorbitano; monooleato de polietilenglicol; Mlglyol 840 (dicaprilato de propilenglicol); Gelucire 44/14 (glicéridos de lauroíl macrogol (polioxiglicéridos)); Gelucire 50/13 (estearoil macrogoliglicéridos (polioxiglicéridos)); Plurol oleico CC 497 (oleato de poliglicerilo); Lauroglicol FCC (laurato de propilenglicol); Capryol PGM (caprilato de propilenglicol); Lauroglicol 90 (monolaurato de propilenglicol); Capryol 90 (monocaprilato de propilenglicol); sales de ácidos grasos; a-sulfonil ésteres de ácidos grasos; sales lineales de un ácido alquil bencén sulfónico; sales del éster de un ácido alquil sulfónico; sales del éster de un ácido alquil éter sulfónico; sales de un ácido alfa olefin sulfónico; sales de un ácido alquil sulfónico; lauril sulfato de sodio; sales de alquil amino ácidos grasos; alquil betaínas; lecitinas; lauril di-metil betaínas; y mezclas de los mismos.

Adicionalmente, si la composición anterior se va a usar como una composición farmacéutica, la composición puede comprender adicionalmente un portador, un excipiente (agentes de relleno) o un diluyente adecuado para las formulaciones farmacéuticas. Algunos tipos de formulaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos y cápsulas. Y estas formulaciones sólidas se preparan mediante la mezcla de al menos uno o más excipientes con más de un compuesto. Algunos ejemplos de dicho excipiente incluyen un sacárido tal como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; un almidón tal como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata; una celulosa tal como celulosa, metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio e hidroxipropil metil celulosa; y un agente de relleno tal como gelatina y polivinilpirrolidona. En algunos casos, puede añadirse polivinilpirrolidona reticulada, goma de agar, ácido algínico o alginato de sodio como disgregante. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un lubricante, un humectante, un aromático, un emulsionante y un conservante tal como anticoagulantes, estearato de magnesio, talco. Algunos tipos de formulación líquida para administración oral incluyen un concentrado en suspensión, una solución, una emulsión y un jarabe. Y estas formulaciones líquidas pueden comprender un diluyente simple tal como agua y parafina líquida, así como varios excipientes tales como un humectante, un sabor, un aromático y un conservante.

Adicionalmente, si la composición de la presente invención es una composición farmacéutica, puede ser administrada en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

Según se usa en el presente documento, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para la prevención o el tratamiento de enfermedades, que es proporcional con una relación de riesgo/beneficio razonable aplicable para un tratamiento médico. Una dosis eficaz de la presente composición puede determinarse dependiendo del sujeto, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, del género, del tipo de enfermedad, de la actividad del fármaco, de la sensibilidad al fármaco, del tiempo de administración, de la vía de administración, de los índices de excreción, de la duración del tratamiento, del uso simultáneo de fármacos y de otros factores conocidos en medicina. La composición de la presente invención puede ser administrada como un medicamento individual, o administrarse conjuntamente con otros medicamentos tanto sucesivamente como simultáneamente. Y puede ser administrada en forma de una única dosis o de múltiples dosis. Teniendo en consideración los factores anteriores, es importante administrar una cantidad mínima que pueda producir el efecto máximo sin efectos secundarios, lo que puede ser fácilmente determinado por los expertos en la materia.

En un ejemplo de la presente invención, se confirmó que la composición que comprende el conjugado de heparina-oligo-DOCA de la presente invención y un solubilizante mostró una mayor actividad anticoagulante en comparación con la composición que comprende el conjugado no específico de sitio de heparina-oligoDOCA y un solubilizante (Tablas 2 y 3). La diferencia en las actividades anticoagulantes entre los conjugados se hizo más evidente según aumentaba el número de fracciones de ácido desoxicólico en el conjugado, y especialmente el conjugado de heparina-tetraDOCA, que tiene un tetrámero de ácido desoxicólico, mostró un índice de absorción oral y una actividad anticoagulante significativamente mayores.

Como otro aspecto, la presente invención proporciona una formulación para la administración oral de una macromolécula, que comprende el conjugado; el solubilizante; el excipiente; el disgregante; el aglutinante; y el lubricante, en la que la macromolécula es un polisacárido.

La presente formulación para la administración oral de un polisacárido comprende el conjugado de la presente invención y permite así una absorción intestinal más fácil cuando se administra por vía oral. También, dado que la

formulación comprende el oligómero de ácido biliar en el sitio terminal del polisacárido, la actividad fisiológica del polisacárido aún puede mantenerse o aumentarse.

5 Como otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar.

Dicho conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar es el mismo que se ha descrito anteriormente. También, la composición farmacéutica puede comprender un solubilizante, que puede mejorar la absorción oral del conjugado.

10 La composición farmacéutica comprende el conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar y por lo tanto puede usarse para el tratamiento de enfermedades humanas que pueden ser tratadas con la heparina, por ejemplo, el cáncer, una enfermedad inflamatoria tal como la artritis, o la trombosis.

15 Según se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a un cáncer que puede ser tratado mediante la composición. Algunos ejemplos de dicho cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer oral, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer óseo, cáncer de tejido conectivo, cáncer cutáneo, cáncer cerebral, cáncer de tiroides, leucemia aguda, leucemia crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma o mieloma múltiple. Dado que se sabe que la heparina induce la muerte de las células cancerosas (Robert J Linhardt et al., Chem Biol. Abril de 2004; 11 (4): 420-2.), el conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar de la presente invención puede usarse efectivamente para la prevención o el tratamiento del cáncer con un índice de absorción corporal y una bioactividad activa de la heparina mejorados.

25 Según se usa en el presente documento, el término "enfermedad inflamatoria" se refiere a una enfermedad causada por una inflamación. Para el propósito de la presente invención, puede referirse a una enfermedad inflamatoria que puede ser tratada con la heparina. Algunos ejemplos de la enfermedad inflamatoria incluyen artritis, artritis reumatoide, alergia, plasmacitosis, hiperinmunoglobulinemia, anemia, nefritis, caquexia, enfermedad destacada en ganaderos, nefritis proliferativa de los vasos sanguíneos, esclerosis múltiple, uveítis, tiroiditis crónica, hipersensibilidad retardada crónica, dermatitis de contacto, eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, psoriasis, kraurosis idiopática juvenil, diabético o enfermedad de Alzheimer, pero no se limitan a las mismas.

35 Según se usa en el presente documento, el término "trombosis" se refiere a una enfermedad causada por la coagulación de la sangre en un vaso sanguíneo. La trombosis puede dar lugar al desarrollo de un infarto cardíaco agudo, de una apoplejía, de una embolia pulmonar, de una oclusión arterial periférica aguda, de una trombosis venosa profunda, de una trombosis venosa portal, de una oclusión aguda en una vena renal, de una trombosis de los senos venosos cerebrales o de una oclusión de una vena central de la retina.

40 Según se usa en el presente documento, el término "prevención" se refiere a todas las acciones en las que los síntomas de la trombosis están restringidos, o se retrasa la aparición de la trombosis mediante la administración de la composición, y el término "tratamiento" se refiere a todas las acciones en las que los síntomas de la trombosis son aliviados mediante la administración de la composición.

45 Además, la composición puede ser administrada en una cantidad farmacéuticamente eficaz, que es la misma que la que se ha descrito anteriormente.

50 Como otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar en el que un oligómero de ácido biliar está conjugado con un sitio terminal de la heparina para su uso en el tratamiento de la trombosis.

Dicho conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar, la composición y la trombosis son los mismos que se han descrito anteriormente.

55 Para el propósito de la presente invención, la composición puede administrarse preferentemente por vía oral, y la dosis apropiada varía dependiendo del estado y el peso del sujeto, de la gravedad de la enfermedad, del tipo de fármaco, de la vía de administración y de la duración. La dosis apropiada puede ser determinada apropiadamente por los expertos en la materia.

Modo para la invención

60 La presente invención se describe con más detalle mediante la proporción de los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos pretenden ser meramente ilustrativos, pero en modo alguno limitan la invención reivindicada.

Ejemplo 1: síntesis de un oligómero de ácido biliar

## Ejemplo 1-1: síntesis de un dímero de DOCA

- 5 Se sintetizó un dímero del ácido desoxicólico (bisDOCA) mediante el uso de etil éster de L-lisina.

Para ser más específicos, se disolvieron 6,6 g (16,85 mmol) de ácido desoxicólico en 300 ml de THF, la solución se purgó con nitrógeno y se incubó en un baño de hielo durante 30 min, seguido de una reacción con 4-metilmorfolina y cloroformato de etilo a la temperatura ambiente durante 4 horas. La finalización de la reacción se confirmó mediante una cromatografía en capa fina (TLC). Y se añadieron 2,08 g (8,43 mmol) de diclorhidrato de etil éster de L-lisina a la reacción, que después se puso a reflujo durante una noche a una temperatura en el intervalo de entre 70 y 80 °C. Después de estar a reflujo durante una noche, el precipitado se recogió mediante una filtración y se secó adicionalmente dejando evaporar el disolvente. El precipitado en bruto se redisolvió en cloroformo y se lavó mediante el uso de HCl al 5 %, de NaOH al 10 % y de agua destilada, sucesivamente. A la capa orgánica se añadió sulfato de sodio, se eliminó la solución acuosa y se filtró del sulfato de sodio y después se concentró mediante la evaporación del disolvente. El concentrado se purificó haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía usando gel de sílice de 0,04-0,06 mm y un eluyente de metanol al 10 % en diclorometano. Las fracciones recogidas del producto final se combinaron, se purificaron y se recrystalizaron en una solución fría de éter. El proceso global de la reacción se muestra en forma de un diagrama esquemático en la Figura 1.

Como una etapa posterior, el dímero de DOCA obtenido (14,4 mmol) se disolvió en 108,54 ml de etanol anhidro (108,54 ml) y se añadió gota a gota a 96,06 ml (1,44 mol) de etilendiamina (EDA) en un vaso de precipitados enfriado. A continuación, la mezcla de reacción del vaso de precipitados se purgó con nitrógeno y se dejó en la oscuridad durante 3 días. El resto del disolvente y la cantidad en exceso de etilendiamina se evaporaron a través de un vacío y el compuesto se precipitó en agua fría. El producto final se purificó haciéndolo pasar a través de una cromatografía de adsorción usando gel de sílice de 0,04-0,063 mm y una solución de cloroformo, metanol e hidróxido de amonio mezclados en una proporción de entre 7,75:3:0,25 y 5:5,75:0,25 como eluyente. Las características del producto final se analizaron mediante una RMN <sup>1</sup>H, un análisis elemental, una IR, una MALDI-TOF y una CL / EM (Agilent 1100 series). Para el análisis de CL / EM se usó el espectro de masas de ESI junto con una columna Xterra fenilo (de 150 x 2,1, 3,5 µm). El proceso global de la reacción se muestra en forma de un diagrama esquemático en la Figura 2.

## Ejemplo 1-2: síntesis de un trímero de DOCA

35 Se preparó un monómero de lisina BOC-CH<sub>3</sub>O-lys (lys(boc)<sub>2</sub>) que contiene tres grupos amino mediante un método de síntesis peptídica. El primer reactivo H-lysBOC-CH<sub>3</sub>O · HCl [GL Biochem, China] (1,9 g, 6,4 mmol) se disolvió en 11,67 ml de DMF con ultrasonidos. A continuación, a la solución se añadieron 2,82 ml (25,6 mmol) de 4-metil morfolina gota a gota, seguido de la adición de 2,5 ml de metanol (de calidad HPLC). La solución mezclada se agitó durante 60 minutos con objeto de eliminar la sal de HCl. Mientras tanto, el segundo reactivo BOC-lysBOC-OSu [Sigma] (2,897 g, 6,4 mmol) se disolvió en 10,99 ml de DMF y se enfrió. La solución se purgó con nitrógeno gaseoso y se dejó en la oscuridad durante una noche. Después de reaccionar durante una noche, el disolvente se eliminó completamente a través de una evaporación a vacío. El producto en bruto se redisolvió en 60 ml de cloroformo y se lavó mediante el uso de 20 ml de HCl al 5 % y de 20 ml de agua destilada, sucesivamente. Después de la evaporación del disolvente, el producto en bruto se disolvió en metanol y se precipitó en agua destilada fría. El precipitado se aisló mediante una centrifugación y se liofilizó para retirar el agua del compuesto. El proceso global de la reacción se muestra en forma de un diagrama esquemático en la Figura 3.

Como una etapa posterior, los grupos BOC se eliminaron mediante un método de desprotección de BOC usado habitualmente.

50 En primer lugar, se mezclaron 8,16 ml (115,52 mmol) de cloruro de acetilo y 114,48 ml de metanol mediante una agitación durante 60 minutos, y la anterior solución mezclada se enfrió. Entonces se añadieron 3,4 g (5,775 mmol) de BOC-CH<sub>3</sub>O-lys (lys(boc)<sub>2</sub>) a la solución anterior y se agitó durante 12 h en un baño de hielo. Después de eliminar todo el disolvente, el compuesto se redisolvió en agua destilada. El compuesto disuelto en agua se lavó con cloroformo. Después de una extracción de líquidos, se eliminó el cloroformo produciendo la capa acuosa en el matraz, que después se liofilizó para obtener el producto final. El proceso de la reacción se muestra en forma de un diagrama esquemático en la Figura 4.

60 El monómero de lisina sintetizado anteriormente (500 mg, 1,257 mmol) se disolvió en 15 ml de DMF usando ultrasonidos, con objeto de eliminar la sal de HCl, se añadió lentamente 4-metil morfolina (1,243 ml, 11,3 mmol). Después de entre 40 y 50 minutos de agitación, la solución se enfrió colocándola en un baño de hielo. A esta solución fría se añadió gota a gota ácido desoxicólico activado con N-hidroxisuccinimida (2,68 g, 5,658 mmol) disuelto en 12,55 ml de DMF. La solución mezclada se purgó con nitrógeno durante 24 horas y se agitó en la oscuridad. El disolvente se eliminó el día siguiente y el compuesto resultante se precipitó en agua destilada fría. El precipitado se filtró y se liofilizó para obtener el producto final. El producto final se purificó adicionalmente y se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo 1-1.

## Ejemplo 1-3: síntesis de un tetramero de DOCA

Se preparó un monómero de lisina BOC-CH<sub>3</sub>O-lys (lys(boc)<sub>2</sub>) mediante el método descrito en el Ejemplo 1-2 y después se convirtió en BOC-lys(lys(boc)<sub>2</sub>)-COONa mediante una saponificación a 70 °C durante 6 horas usando hidróxido de sodio. Después, el compuesto resultante se acidificó mediante la adición de HCl 1 N y se transformó en BOC-COOH-lys (lys(boc)<sub>2</sub>). Después, el monómero de lisina acidificado se disolvió en DMF mezclada con DCC y N-hidroxisuccinimida en un baño de hielo y se agitó a 4 °C durante 30 minutos. La DCU precipitada se eliminó mediante una filtración y finalmente se obtuvo el compuesto A.

Como una etapa posterior, se mezcló el H-lysBOC-CH<sub>3</sub>O · HCl con 4-metil morfolina y se agitó durante 1 hora produciendo el compuesto B. El compuesto A se añadió lentamente al compuesto B y se agitó durante 24 horas para preparar el dímero de lisina BOC-CH<sub>3</sub>O-lys (lys(boc)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. La DCU precipitada se eliminó mediante una filtración. El disolvente se eliminó mediante una evaporación a vacío y el compuesto se precipitó en agua destilada fría. El producto en bruto se redisolvió en metanol y se precipitó. Después, el producto purificado BOC-CH<sub>3</sub>Olys (lys(boc)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> se liofilizó para eliminar las moléculas de agua restantes. Según se describe en el Ejemplo 1-2, se usó el mismo método de desprotección de BOC para eliminar el grupo BOC del BOC-CH<sub>3</sub>Olys (lys(boc)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Después se sintetizó un dímero de lisina que contiene cuatro grupos amino.

El dímero de lisina sintetizado se hizo reaccionar con ácido desoxicólico activado con N-hidroxisuccinimida (aDOCA) para sintetizar el tetramero de ácido desoxicólico (DOCA) mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 1-2 excepto por la proporción molar de los reactivos. El tetramero de DOCA sintetizado se purificó adicionalmente y se analizó mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 1-2.

## Ejemplo 1-4: síntesis de un oligómero de ácido cólico

Se prepararon un dímero, un trímero y un tetramero de ácido cólico usando una fracción de ácido cólico mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1 hasta 1-3.

## Ejemplo 1-5: síntesis de un oligómero de ácido ursodesoxicólico

Se prepararon un dímero, un trímero y un tetramero de ácido ursodesoxicólico usando una fracción de ácido ursodesoxicólico mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1 hasta 1-3.

## Ejemplo 1-6: síntesis de un oligómero de ácido litocólico

Se prepararon un dímero, un trímero y un tetramero de ácido litocólico usando una fracción de ácido litocólico mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1 hasta 1-3.

Ejemplo 2: síntesis de conjugados de heparina-oligoDOCA específicos de sitio terminal

La Figura 9 muestra un proceso esquemático de la síntesis del conjugado de la presente invención que se formó mediante la conjugación de un oligómero de ácido desoxicólico en el sitio terminal de la heparina. Los detalles del proceso se describen a continuación.

## Ejemplo 2-1: síntesis de un conjugado de heparina-bisDOCA (LHe-bisDOCA) específico de sitio terminal

Los 35 mg (7 µM) de heparina se disolvieron en una mezcla de formamida y DMF (1,5:1,0 v/v) con poco calentamiento y se añadió cianoborhidruro de sodio (77,65 µM). Después se añadió bisDOCA a la heparina disuelta en la solución de FA/DMF en una proporción de 1:12, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 21 horas. El enlace de imina formado después de la reacción anterior se redujo mediante la adición de cianoborhidruro de sodio. El producto sintetizado se precipitó y se purificó mediante la adición de etanol frío a la mezcla de reacción tres veces. Después del último proceso de purificación, el disolvente se evaporó completamente, después el resto del compuesto se liofilizó para obtener el producto final LHe-bisDOCA en forma de un polvo. El conjugado sintetizado se confirmó mediante el método de análisis descrito en el Ejemplo 1.

## Ejemplo 2-2: síntesis de un conjugado de heparina-triDOCA (LHe-triDOCA) específico de sitio terminal

Se sintetizó heparina-triDOCA específica de sitio terminal y se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo 2-1 usando el trímero de ácido desoxicólico (EttriDOCA) del Ejemplo 1-2.

## Ejemplo 2-3: síntesis de un conjugado de heparina-tetraDOCA (LHe-tetraDOCA) específico de sitio terminal

Se sintetizó heparina-tetraDOCA específica de sitio terminal y se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo 2-1 usando el tetramero de ácido desoxicólico (EttetraDOCA) del Ejemplo 1-3.

Ejemplos comparativos: síntesis de un conjugado de heparina-oligoDOCA no específico de sitio

La Figura 10 muestra un esquema para la preparación del conjugado que se formó mediante la conjugación del oligómero de ácido desoxicólico con heparina de una forma no específica de sitio. El proceso sintético detallado se describe a continuación.

Ejemplo comparativo 1: síntesis de un conjugado de heparina-bisDOCA (LHm-bisDOCA) no específico de sitio

Los conjugados no específicos de sitio de heparina-bisDOCA se prepararon mediante la conjugación de la heparina con N-bisdesoxicoliletil amina (EtbisDOCA) en una proporción no equivalente molar.

Para ser más específicos, se disolvieron 100 mg de heparina de bajo peso molecular (HBPM) en 3,125 ml de una solución de formamida con poco calentamiento. El grupo ácido carboxílico de la heparina fue activado mediante la adición de EDAC. Después, la heparina activada se hizo reaccionar con EtbisDOCA en una proporción molar que varía entre 1:1,2 y 1:12 a 4 °C durante 12 horas. El compuesto resultante se precipitó en etanol frío, se purificó mediante una filtración y se liofilizó. El conjugado de heparina se disolvió de nuevo en agua destilada y se liofilizó para que estuviera en forma de polvo.

La Tabla 1 define la forma del conjugado de HBPM-bisDOCA, a saber, LHm-bisDOCA, según el índice de acoplamiento del bisDOCA. El índice de acoplamiento del dímero de DOCA (bisDOCA) con HBPM se determinó mediante un método gasométrico que fue calibrado con ácido sulfúrico [A. Fini et al Journal of Pharmaceutical Sciences 81 (1992) 726-730]. La actividad anticoagulante de los conjugados de LH-bisDOCA no específicos de sitio se determinó mediante el uso del kit de ensayo anti-FXa Chomagenic basado en la actividad anti-FXa de la heparina.

Ejemplo comparativo 2: síntesis de un conjugado de heparina-triDOCA no específico de sitio (LHm-triDOCA)

Los conjugados de heparina-triDOCA no específicos de sitio (LHm-triDOCA) se prepararon mediante la conjugación de la heparina con N-tridesoxicoliletilenamina en una proporción molar no equivalente mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1. El índice de acoplamiento y la actividad anticoagulante de los conjugados de heparina-triDOCA (LHm-triDOCA) se determinaron mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1.

Ejemplo comparativo 3: síntesis de un conjugado de heparina-tetraDOCA no específico de sitio (LHm-tetraD)

Los conjugados de heparina-tetraDOCA no específicos de sitio (LHm-tetraD) se prepararon mediante la conjugación de la heparina con N-tetradexoxicoliletilenamina en una proporción molar no equivalente mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1.

Ejemplo experimental 1: análisis de las características de los conjugados de heparina-oligoDOCA (LH-oligoDOCA)

Los conjugados de heparina-oligoDOCA se analizaron mediante una espectroscopía de radiación infrarroja (IR) y una resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H). La espectroscopía para confirmar la presencia de un enlace amida específico y los picos de los ácidos biliares. Además, los conjugados de heparina-oligoDOCA específicos de sitio terminal se analizaron usando una COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H y una RMN <sup>13</sup>C. La actividad anticoagulante de los conjugados de heparina sintetizados se analizó basándose en la reactividad del compuesto con respecto al FXa mediante la medición de la absorción a 405 nm usando el kit de ensayo Anti-FXa Chomagenic.

La agregación de los conjugados anteriores se monitorizó a 633 nm y a 25 ± 1 °C mediante una dispersión electroforética de la luz (ELS-800). Los conjugados sintetizados se mezclaron con labrasol y P188 para una completa disolución. Normalmente, la autoagregación se detectó a una concentración de 1 mg/ml. La solubilidad de cada conjugado se determinó como la concentración que ya no provoca agregación después de llevar a cabo una dilución sucesiva de la muestra.

Tabla 1

[Tabla 1]

| Conjugados de HBPM-oligo desoxicólico                   | Derivados sintéticos | Actividad relativa * (UI/mg) | Proporción de conjugación * | Coefficiente de partición (o/a) * | Solubilidad (mg/ml) |
|---------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| HBPM                                                    | Fraxiparina          | 100                          | ---                         | 0,01 ± 0,01                       | ---                 |
| Derivados del conjugado no específicos de la superficie | LHbisD               | 83,0 ± 2,1                   | 0,8 ± 0,0                   | 0,22 ± 0,01                       | 0,75                |
|                                                         | LHtriD               | 74,9 ± 1,2                   | 1,0 ± 0,1                   | 0,27 ± 0,03                       | 0,25                |
|                                                         | LHtetraD             | 46,3 ± 3,2                   | 1,0 ± 0,1                   | 0,35 ± 0,05                       | 0,125               |

| Conjugados de HBPM-oligo desoxicólico                  | Derivados sintéticos | Actividad relativa * (UI/mg) | Proporción de conjugación * | Coefficiente de partición (o/a) * | Solubilidad (mg/ml) |
|--------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Derivados del conjugado específicos del sitio terminal | EHbisD               | 93,1 ± 1,9                   | 1,4 ± 0,1                   | 0,19 ± 0,01                       | 0,156               |
|                                                        | EHtriD               | 98,6 ± 2,1                   | 0,9 ± 0,0                   | 0,26 ± 0,01                       | 0,0625              |
|                                                        | EHtetraD             | 96,5 ± 1,2                   | 0,8 ± 0,0                   | 0,33 ± 0,01                       | 0,0625              |

#### Ejemplo experimental 2: estudio *in vivo* de la absorción oral de los conjugados de heparina-oligoDOCA

5 Con objeto de determinar el índice de absorción de la formulación que contiene el conjugado de heparina-oligoDOCA específico de sitio terminal a través del intestino delgado, en el que se localizan los transportadores de ácidos biliares, se midió la actividad anticoagulante del conjugado de heparina basándose en la actividad anti-FXa de la heparina.

10 Para el conjugado de heparina-oligoDOCA específico de sitio terminal, el conjugado se formuló con los solubilizantes 1bs (400 mg/kg) y P188 (2,16 mg/kg) y se administró a una dosis de 10 mg/kg a ratas macho.

15 Como resultado, en comparación con la muestra de control, según aumentaba el número de fracciones de ácido desoxicólico combinado, también aumentaba la actividad anticoagulante del conjugado. Especialmente, el conjugado de heparina que contiene el tetrámero de ácido desoxicólico mostró una actividad anticoagulante significativamente mayor en comparación con los que contenían el dímero o el trímero de ácido desoxicólico (Figura 11). Por otro lado, para los conjugados no específicos de sitio, aquellos que contenían el dímero de ácido desoxicólico mostraron la actividad anticoagulante más alta (Figura 12).

20 Estos resultados demuestran que los conjugados de heparina-oligoDOCA específicos de sitio terminal tienen un mayor índice de absorción y actividad anticoagulante, en comparación con los conjugados no específicos de sitio.

25 Además, se administró por vía oral el LHe-tetraDOCA a varias dosis a ratas SD (Figura 13). Las muestras del LHe-tetraDOCA a diferentes dosis se formularon con Poloxámero 188 y con Labrasol. Según se muestra en la Figura 13, el LHe-tetraDOCA tenía una actividad anticoagulante dependiente de la concentración.

30 También se prepararon diferentes formulaciones mediante la combinación de conjugados con diferentes solubilizantes, y se administraron por vía oral a ratas SD. Después se midió farmacodinámicamente la concentración de la muestra administrada.

35 Las composiciones de cada formulación usada están recogidas en la Tabla 2. Y se preparó un volumen total de 400 µl para cada formulación para ser administrada por vía oral.

Tabla 2

[Tabla 2]

|                           | Material                         | Cantidad (mg por kg de peso corporal) |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Formulación comparativa 1 | HBPM                             | 10                                    |
| Formulación comparativa 2 | LHbisD                           | 10                                    |
| Formulación 3             | LHbisD + lauril sulfato de sodio | 10 + 0,036                            |
| Formulación 4             | LHbisD + Labrasol                | 10 + 200                              |
| Formulación 5             | LHbisD + ácido palmítico         | 10 + 1                                |
| Formulación 6             | LHbisD + ácido mirístico         | 10 + 1                                |
| Formulación 7             | LHbisD + P407                    | 10 + 1                                |
| Formulación 8             | LHbisD + P188                    | 10 + 1                                |
| Formulación comparativa 9 | HBPM + P188 + Labrasol           | 10 + 2 + 200                          |
| Formulación 10            | LHbisD + P188 + Labrasol         | 10 + 2 + 200                          |
| Formulación 11            | LHtriD + P188 + Labrasol         | 10 + 2 + 200                          |
| Formulación 12            | LHtetraD + P188 + Labrasol       | 10 + 2 + 200                          |
| Formulación 13            | EHbD + P188 + Labrasol           | 10 + 2 + 200                          |
| Formulación 14            | EHtriD + P188 + Labrasol         | 10 + 2 + 200                          |
| Formulación 15            | EHtetraD + P188 + Labrasol       | 10 + 2 + 200                          |

|                            | Material                   | Cantidad (mg por kg de peso corporal) |
|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Formulación comparativa 16 | EHtetraD                   | 10                                    |
| Formulación comparativa 17 | EHtetraD + P188 + Labrasol | 5 + 2 + 200                           |
| Formulación comparativa 18 | EHtetraD + P188 + Labrasol | 1 + 2 + 200                           |

Adicionalmente, después de la administración oral de las formulaciones indicadas en la Tabla 2, su concentración plasmática se analizó farmacodinámicamente y los resultados se muestran en la Tabla 3.

5 Tabla 3

[Tabla 3]

|                            | EAUC <sub>0-8h</sub> (UI*h/ml) | E <sub>máx</sub> (UI/ml) | T <sub>máx</sub> (h) |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Formulación comparativa 1  | 0,26 ± 0,05                    | 0,07 ± 0,01              | 0,62 ± 0,25          |
| Formulación comparativa 2  | 0,79 ± 0,19                    | 0,25 ± 0,1               | 1,0 ± 0,7            |
| Formulación 3              | 0,84 ± 0,4                     | 0,21 ± 0,07              | 0,87 ± 0,25          |
| Formulación 4              | 2,03 ± 0,07                    | 0,65 ± 0,23              | 0,75 ± 0,35          |
| Formulación 5              | 0,63 ± 0,05                    | 0,21 ± 0,01              | 1,25 ± 1,06          |
| Formulación 6              | 0,62 ± 0,08                    | 0,25 ± 0,06              | 0,75 ± 0,35          |
| Formulación 7              | 2,34 ± 0,61                    | 0,64 ± 0,29              | 1,5 ± 0,57           |
| Formulación 8              | 2,55 ± 0,37                    | 0,68 ± 0,07              | 1,12 ± 0,63          |
| Formulación comparativa 9  | 0,68 ± 0,2                     | 0,34 ± 0,16              | 1,33 ± 0,58          |
| Formulación 10             | 2,2 ± 0,32                     | 0,61 ± 0,11              | 0,87 ± 0,06          |
| Formulación 11             | 0,92 ± 0,31                    | 0,24 ± 0,1               | 0,5 ± 0,0            |
| Formulación 12             | 1,47 ± 0,16                    | 0,36 ± 0,02              | 0,5 ± 0,0            |
| Formulación 13             | 2,22 ± 1,4                     | 0,62 ± 0,3               | 2,25 ± 0,5           |
| Formulación 14             | 2,01 ± 0,38                    | 0,57 ± 0,03              | 0,67 ± 0,29          |
| Formulación 15             | 2,81 ± 0,37                    | 1,04 ± 0,07              | 0,5 ± 0,0            |
| Formulación comparativa 16 | 1,02 ± 0,22                    | 0,21 ± 0,04              | 2 ± 1                |
| Formulación comparativa 17 | 1,54 ± 0,23                    | 0,44 ± 0,19              | 0,33 ± 0,14          |
| Formulación comparativa 18 | 0,56 ± 0,15                    | 0,22 ± 0,05              | 0,44 ± 0,1           |

10 En la Tabla 3, el EAUC indica el área bajo la gráfica de la concentración frente al tiempo desde el punto temporal 0 hasta el de 8 horas. La E<sub>máx</sub> indica la concentración que causa el efecto máximo, y el T<sub>máx</sub> indica el tiempo necesario hasta alcanzar la concentración que causa el efecto máximo.

15 Según se muestra en la Tabla 3, la Formulación comparativa 2, que contenía el conjugado de heparina-bisDOCA (LH-bisDOCA) sin solubilizante, tenía un mayor índice de absorción cuando se administraba por vía oral, en comparación con la Formulación comparativa 1, que contenía el HBPM-bisDOCA. Cuando se añadió el solubilizante Labrasol, el Poloxámero 188 o el Poloxámero 407 al HBPM-bisDOCA (Formulaciones 4, 7, 8 respectivamente), el índice de absorción aumentó incluso más.

20 También, entre las formulaciones que contenían ambos solubilizantes (P188 y Labrasol) y el conjugado de heparina-oligoDOCA, las formulaciones con un conjugado de heparina-oligoDOCA específico de sitio, especialmente aquellas con un trímero o un tetrámero de ácido desoxicólico (E<sub>tri</sub>/DOCA o E<sub>tetra</sub>DOCA), mostraron un mayor índice de absorción oral y actividad anticoagulante en comparación con las formulaciones que contenían un conjugado de heparina-oligoDOCA no específico de sitio (Formulaciones 10 a 12). Al contrario de los conjugados no específicos de sitio, los que son específicos de sitio mostraron un aumento en el índice de absorción oral según aumentaba la fracción del ácido desoxicólico. Especialmente, cuando se combinó un tetrámero del ácido desoxicólico con la heparina, la actividad anticoagulante era incluso mayor.

30 Globalmente, estos resultados demuestran que el conjugado de heparina con oligómero de ácido biliar específico de sitio, especialmente aquellos con más de un trímero de ácidos biliares; y aquellos formulados para una administración oral con un solubilizante, tienen un mayor índice de absorción y actividad anticoagulante en comparación con el conjugado de heparina con un oligómero de ácido biliar no específico de sitio.

Ejemplo experimental 3: estudio *in vivo* de la administración oral a monos cinomólogos del conjugado de heparina-tetraDOCA (LHe- tetraDOCA) específico de sitio terminal formulado en forma líquida en una cápsula

Con objeto de determinar el efecto terapéutico de los conjugados de heparina-oligoDOCA específicos de sitio terminal, se eligió un conjugado de heparina con un tetrámero de ácido desoxicólico para ser administrado. Dicho conjugado formulado en una forma líquida en una cápsula fue administrado por vía oral a una dosis de 5 mg/kg a monos cinomólogos. Se midió la actividad anti-FXa del conjugado de LHe-tetraDOCA administrado. Como control se administró una cápsula que contiene HBPM a una dosis de 10 mg.kg (n = 4 ratas por grupo). Los resultados se muestran en la Figura 14.

El conjugado de heparina-tetraDOCA específico de sitio terminal mostró una actividad anticoagulante significativamente mayor en comparación con la muestra de control. Este resultado indica que la formulación oral que contiene el conjugado de la presente invención puede usarse eficazmente para la para administración oral de macromoléculas tales como la heparina.

Ejemplo experimental 4: confirmación del transporte del conjugado de heparina-oligoDOCA (LH-oligoDOCA) en la línea celular Caco-2

Ejemplo experimental 4-1: confirmación del transporte del conjugado de heparina-oligoDOCA en la línea celular Caco-2

Con objeto de determinar el índice de absorción intestinal del conjugado de heparina-oligoDOCA, se usaron células Caco-2. Para este experimento se colocaron las células Caco-2 en placas transwell de 12 pocillos (Corning, life sciences, NY) y se cultivaron en un medio (DMEM con una elevada cantidad de glucosa complementado con un 10 % de FBS, antibióticos, NEAA) a 37 °C durante 4 semanas hasta que la población de células alcanzó un valor estándar de TEER de  $411 \pm 10 \Omega\text{cm}^2$ .

Los 50 µg/ml del medicamento se añadieron a ambos grupos de células Caco-2, las tratadas con TCA (taurocolato de sodio) y las no tratadas, y después las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después se midió la cantidad de medicamento transportado desde el área apical (A) a la basolateral (B) o en la dirección inversa (de B a A) a través de un ensayo cromagénico anti-FXa.

Los resultados del ensayo demuestran que los conjugados de heparina-oligoDOCA específicos de sitio terminal fueron transportados con un mayor índice desde A hasta B según aumentaba el número de fracciones de ácido desoxicólico en el conjugado. Especialmente, el conjugado de heparina con un tetrámero de ácido desoxicólico mostró un índice de transporte significativamente menor en una dirección inversa (de B a A), en comparación con otras formas del conjugado. Esto indica que el conjugado de heparina con un tetrámero de ácido desoxicólico tiene una elevada eficiencia de transporte en comparación con los otros.

Adicionalmente, se trataron las células con TCA 200 µM, que es un inhibidor de transportador apical de sales biliares dependiente de sodio (ASBT). Después se añadieron 50 µg/ml de los conjugados de HBPM y de HBPM-oligoDOCA a las células. Se monitorizó la inhibición del transporte del conjugado desde A hasta B y los resultados se muestran en la Figura 17.

Según se muestra en la Figura 17, cuando se trataron las células con el inhibidor del ASBT, el TCA, se inhibió el transporte de los conjugados de heparina-oligoDOCA desde apical hasta basolateral. Especialmente, la inhibición del transporte era más evidente en el transporte de conjugado de heparina con un tetrámero de ácido desoxicólico, lo que indica que el papel del ASBT es significativo en el transporte del conjugado, especialmente aquel con un tetrámero de ácido desoxicólico.

Para la identificación del mecanismo de transporte, se añadió LHe-tetraDOCA marcado con RITC (0,05 y 0,5 mg/ml) a las células cultivadas, que después se incubaron durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con faloidina-RITC (Sigma, MO) que detecta específicamente las uniones estrechas de la célula. Las células teñidas se trataron adicionalmente con Vectashield (Vector Laboratories, CA) que contiene DAPI, y se visualizaron con una microscopía láser confocal (CLSM; Leica DM IRB/E, Leica Co, Alemania). La imagen confocal de las células se muestran en la Figura 20.

Según se muestra en la Figura 20, los LHe-tetraDOCA se localizaban en el citoplasma de la célula.

Ejemplo experimental 4-2: confirmación de la absorción del conjugado de heparina-oligoDOCA específico de sitio terminal en células MDCK que sobreexpresan el ASBT

El índice de absorción relativo del conjugado de heparina-oligoDOCA específico de sitio terminal fue monitorizado entre los conjugados con diferentes números de fracciones de DOCA en células MDCK que sobreexpresan el ASBT. Estas células se cultivaron con un medio (DMEM con una elevada cantidad de glucosa complementado con un 10 % de FBS, antibióticos, NEAA) en una placa transwell de 12 pocillos (corning, life sciences, NY) durante 1 semana



hasta que el valor de TEER alcanza  $411 \pm 10 \Omega\text{cm}^2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Después del tratamiento del conjugado, se midió la cantidad de conjugado transportado en función del tiempo a  $37^\circ\text{C}$  mediante un ensayo cromagénico anti-FXa. Tomando como base esta medición, se determinó el índice de absorción del conjugado.

5 Según los resultados, en las células MDCK que sobreexpresaban el ASBT, los conjugados de heparina-oligoDOCA específicos de sitio terminal mostraron un índice de absorción significativamente aumentado en comparación con el monómero del conjugado con ácido desoxicólico. Y el índice de absorción era incluso mayor para los conjugados de heparina con un tetramero de ácido desoxicólico (Figura 18).

10 Los resultados anteriores indican que los conjugados de heparina-oligoDOCA específicos de sitio terminal de la presente invención tienen una elevada eficacia de absorción.

Ejemplo experimental 5: interacción entre el conjugado de heparina-oligoDOCA específico de sitio terminal y el ASBT y captación a través del ASBT

15 Para monitorizar la interacción entre el ASBT humano y el LHe-tetraDOCA, se añadió el LHe-tetraDOCA, que es un conjugado representativo de la presente invención, a las células MDCK que sobreexpresaban el ASBT y se incubaron durante 5 minutos. Después del tratamiento de las células se determinó el nivel de expresión del ASBT (slc10a2) en las diferentes fracciones celulares mediante una inmunotransferencia.

20 Después se determinó la captación del conjugado de heparina-tetraDOCA específico de sitio terminal (LHe-tetraDOCA) de la presente invención mediante el siguiente método.

25 En primer lugar, el LHe-tetraDOCA marcado con RITC se disolvió en solución salina equilibrada de Hanks (FIBSS, Sigma, cultivo celular probado) complementada con NaCl 137 mM (Sigma, cultivo celular probado), después, el LHe-tetraDOCA disuelto se añadió a las células, que se incubaron durante 30 minutos. Después, las células se trataron con Vectashield que contiene DAPI y se visualizaron mediante una microscopía láser de barrido confocal (CSLM) para confirmar la captación de los conjugados. Mientras tanto, las células MDCK no transfectadas fueron incluidas como control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 19.

30 Según se muestra en la Figura 19, los conjugados estaban localizados en el ASBT, que es un transportador de ácido biliar. A través de la visualización de la interacción entre el conjugado de la presente invención y el transportador, se demostró que el aumento en el índice de absorción del conjugado no era debido simplemente a un aumento en la hidrofobicidad, sino más bien debido al aumento en la afinidad del conjugado de heparina por el transportador de ácido biliar.

35 Además de los resultados anteriores, se determinó la distribución de los transportadores ASBT en la célula. Para esto, se añadieron los conjugados de LHe-tetraDOCA a células MDCK con el ASBT sobreexpresado. Después las células tratadas se fraccionaron en las fracciones de membrana celular, citoplasma y núcleo. Cada fracción celular se analizó mediante una inmunotransferencia western. Se usaron la cadherina, la calnexina y la YY1 para la detección de la membrana celular, del citoplasma y del núcleo, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 21.

40 Los resultados anteriores demuestran que cuando se eliminó el LHe-tetraDOCA después del tratamiento, las proteínas del ASBT se movieron desde el citoplasma de nuevo hacia la membrana celular (Figura 21).

45 Además, la expresión del ASBT fue monitorizada bajo microscopía de fluorescencia en las células MDCK-ASBT tratadas con el conjugado de LHe-tetraDOCA de la presente invención. Cuando las células se trataron con el LHe-tetraDOCA, los agregados de proteínas ASBT (verde) estaban ausentes en la membrana celular de la región apical. Pero una vez eliminado el conjugado, se observaron las proteínas ASBT en la región de la membrana celular. Los resultados se muestran en la Figura 22. Estos resultados no se observaron en un grupo tratado con TCA o en un grupo que no estaba tratado con el conjugado (Figura 22).

50 La interacción entre el LHe-tetraDOCA y el ASBT se confirmó mediante un método de co-inmunoprecipitación (Co-IP). Para este análisis, se marcó el LHe-tetraDOCA con biotina y los inmunoprecipitados se recogieron usando microesferas de estreptavidina. Antes de analizar las muestras en la SDS-PAGE, la mezcla de microesferas se calentó a  $70^\circ\text{C}$  durante 3 minutos para disociar la biotina de las microesferas de estreptavidina.

55 Después de analizar las muestras en la SDS-PAGE, se sondearon las membranas frente al ASBT usando un anticuerpo de cabra anti-ASBT humano. Y se usó un anticuerpo de ratón anti-biotina (Abeam) para detectar el co-inmunoprecipitado de LHe-tetraDOCA-biotina. La pureza de cada fracción celular (membrana, citoplasma, núcleo) se confirmó mediante marcadores específicos. Se usaron la cadherina, la calnexina y la YY1 para la detección de la fracción de la membrana celular, del citoplasma y del núcleo respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 23.

65

Según se muestra en la Figura 23, se observó una interacción entre el ASBT y el conjugado de LHe-tetraDOCA de la presente invención, tanto en la membrana celular como en el citoplasma. Este resultado indica que la interacción entre el ASBT y el LHe-tetraDOCA juega un papel en el transporte del LHe-tetraDOCA.

Para el ensayo de ligación por proximidad (PLA), las células MDCK-ASBT se cultivaron y se fijaron en un portaobjetos usando PFA al 4 % en el baño de hielo durante 20 minutos. Después, las células fijadas se trataron adicionalmente para un PLA *in situ* usando el kit de detección Duolink (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia) haciendo referencia al protocolo del fabricante. Para ser más específicos, después de fijar las células en el portaobjetos, las células se sondearon frente al ASBT y la biotina. Después, esas células se incubaron con la sonda del PLA, que está formada por la combinación de un oligonucleótido específico y un anticuerpo secundario (anti-conejo para el ASBT y anti-ratón para la biotina). La ligación del anterior oligonucleótido se llevó a cabo mediante una amplificación génica. Los resultados fueron visualizados mediante el tratamiento de las muestras con una sonda fluorescente que es complementaria del oligonucleótido de la sonda del PLA. Los portaobjetos se montaron usando Vectashield y las muestras se visualizaron con un microscopio confocal. Los resultados se muestran en la Figura 24.

Según se muestra en la Figura 24, la interacción entre el ASBT y el LHe-tetraDOCA se detectó en forma de unos puntos rojos. Y esta interacción se observó tanto en la membrana celular como en el citoplasma.

#### Ejemplo experimental 6: detección de la formación de un cuerpo multivesicular (CMV) del ASBT usando un microscopio de transmisión electrónica (TEM)

El conjugado de LHe-tetraDOCA se añadió a las células MDCK que sobreexpresaban el ASBT (células MDCK-ASBT), que después se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Las células se fijaron en el portaobjetos con PFA al 4 % y se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-ASBT humano, que se une al N-terminal del ASBT. Después, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anticonejo conjugado con oro coloidal 20 nm. El ASBT marcado con oro se monitorizó mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión (TEM). Los resultados se muestran en la Figura 25.

Según se muestra en la Figura 25, en las células MDCK-ASBT que se trataron con LHe-tetraDOCA, que es un conjugado representativo de la presente invención, las proteínas del ASBT, que normalmente se localizan en la membrana celular, se encontraron en la región fagocitada de la membrana y formaban un CMV.

Estos resultados indican que los conjugados de LHe-tetraDOCA de la presente invención son transportados mediante su unión al transportador de membrana ASBT y la formación de vesículas. Esto es diferente del mecanismo de transporte previamente conocido de los conjugados de heparina-DOCA, que se creía que eran transportados mediante difusión.

#### Ejemplo experimental 7: exocitosis de los conjugados de LHe-oligoDOCA en la parte basolateral de las células intestinales a través de su unión con la IBABP

Con objeto de determinar el mecanismo de transporte del presente conjugado hasta la circulación sanguínea después del transporte vesicular, se analizó la interacción entre el LHe-tetraDOCA y la IBABP usando un PLA.

Para ser más específicos, se añadió el LHe-tetraDOCA marcado con biotina a células SK-BR3 que expresaban de forma endógena el ASBT y la IBABP, y las células se incubaron durante 30 minutos. Después, las células se trataron con anticuerpos específicos contra la IBABP y la biotina. A continuación, se añadieron las sondas secundarias del PLA (anti-conejo y anti-ratón) para detectar la IBABP y la biotina, respectivamente. Después se añadió adicionalmente una sonda fluorescente para amplificar la señal. El PLA y el ASBT se tiñeron mediante el método descrito en el Ejemplo experimental 6.

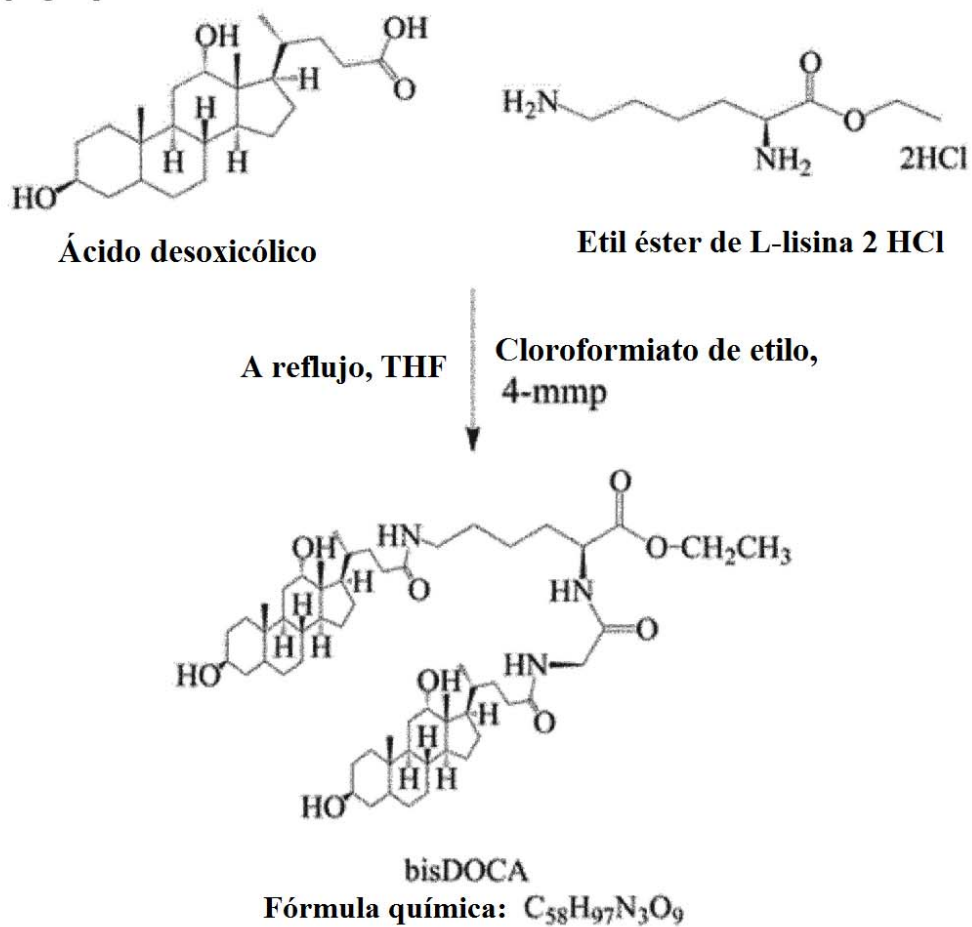
La Figura 26 muestra que el conjugado de LHe-oligoDOCA de la presente invención interactúa con la IBABP en las células SK-BR3. En la Figura 26, la interacción entre la IBABP y el LHe-tetraDOCA se marcó en rojo, y estas marcas se encontraron cerca de las marcas verdes que indican el ASBT. Con un mayor aumento se observó la estructura vesicular.

Estos resultados indican que el LHe-tetraDOCA, que era transportado al interior de la célula a través del ASBT, interactúa con la IBABP para ser transportado hasta la circulación sanguínea.

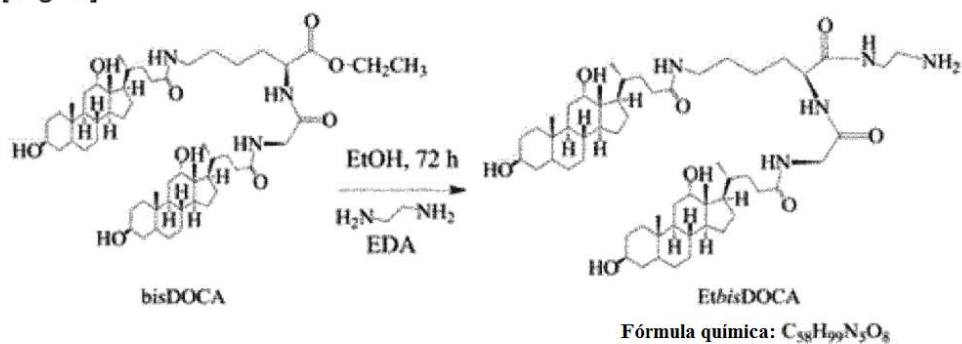
## REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal, que comprende: (a) preparar un oligómero de ácido biliar mediante la oligomerización de dos o más monómeros de ácidos biliares; y (b) conjugar el oligómero de ácido biliar preparado en la etapa (a) con el sitio terminal de una macromolécula; en el que la macromolécula es un polisacárido.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el oligómero de ácido biliar de la etapa (a) está unido a un conector que comprende un grupo funcional seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo yodoacetamida, un grupo disulfuro y un grupo amino.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende el acoplamiento de un grupo amino del conector unido al oligómero de ácido biliar a un grupo carbonilo en el sitio terminal del polisacárido.
4. El método según la reivindicación 1, en el que el polisacárido se selecciona entre el grupo que consiste en heparina, heparina sódica, polisacárido sulfonatado, celulosa, hidroximetil celulosa e hidroxipropil celulosa.
5. El método según la reivindicación 4, en el que la etapa (b) comprende el acoplamiento de un grupo amino del conector unido al oligómero de ácido biliar a un grupo aldehído de una unidad reductora de 2,5-anhidromanosa en el sitio terminal de la heparina.
6. El método según la reivindicación 1, en el que el oligómero de ácido biliar está formado por uno o más ácidos biliares seleccionados entre el grupo que consiste en ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursocólico, ácido isoursodesoxicólico, ácido lagodesoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicodesoxicólico, ácido glicoquenodesoxicólico, ácido deshídrocólico, ácido hiocólico y ácido hiodesoxicólico.
7. El método según la reivindicación 1, en el que el oligómero de ácido biliar comprende entre 2 y 10 monómeros de ácidos biliares.
8. Un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal en el que un oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de una macromolécula; en el que la macromolécula es un polisacárido.
9. El conjugado según la reivindicación 8, en el que el polisacárido es heparina.
10. El conjugado según la reivindicación 8, que es transportado al citoplasma de las células intestinales a través de un transporte vesicular mediante la unión al transportador apical de ácido biliar de sodio (ASBT) en las células intestinales.
11. Una composición para su administración oral, que comprende el conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal según la reivindicación 8, en el que el oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de la macromolécula; y un solubilizante.
12. La composición según la reivindicación 11, en la que el solubilizante se selecciona entre el grupo que consiste en óxido de polietileno, hidroxialquil celulosa, hidroxipropilalquil celulosa, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, copovidona, carboximetil celulosa de sodio, carbopol, alginato de sodio, goma xántica, goma de algarrobo, glicofurol, poloxámero, ciclodextrina y detergente.
13. Una formulación para su administración oral, que comprende un conjugado de macromolécula-oligómero de ácido biliar específico de sitio terminal en la que el oligómero de ácido biliar está conjugado con el sitio terminal de la macromolécula; un solubilizante; un excipiente; un disgregante; un aglutinante; y un lubricante; y en la que la macromolécula es un polisacárido.
14. La formulación según la reivindicación 13, en la que el conjugado es un conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar.
15. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de heparina-oligómero de ácido biliar en la que un oligómero de ácido biliar está conjugado con un sitio terminal de la heparina.
16. La composición según la reivindicación 15, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad inflamatoria y una trombosis.
17. La composición para su uso según la reivindicación 16, en la que la enfermedad es una trombosis.

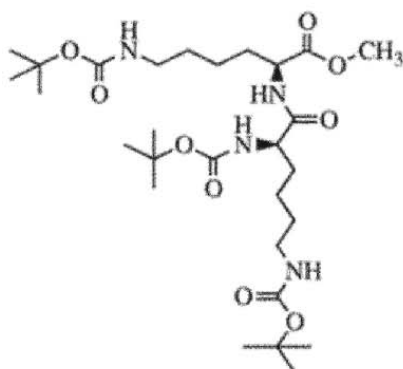
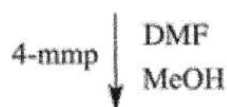
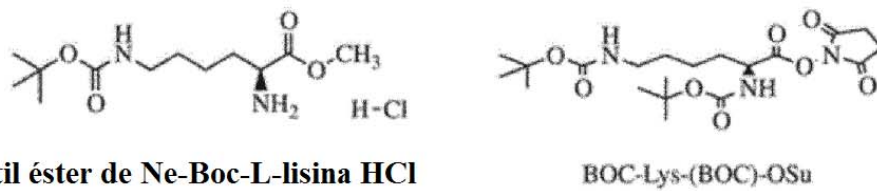
[Fig. 1]



[Fig. 2]

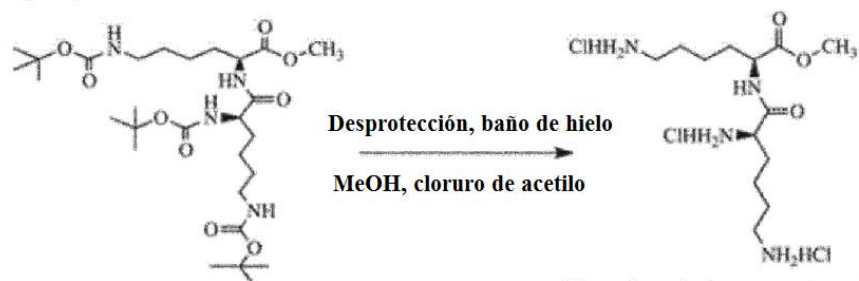


[Fig. 3]

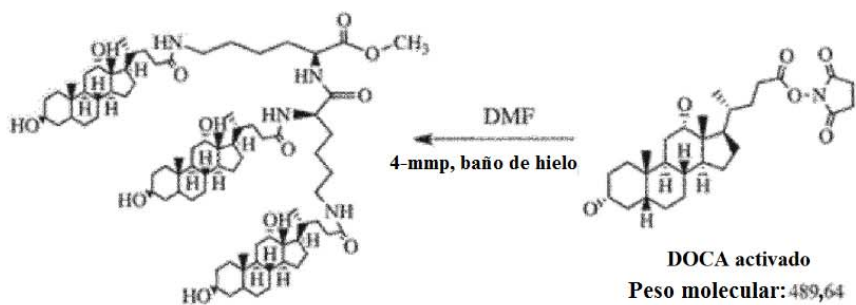


Fórmula química:  $C_{28}H_{52}N_4O_9$   
Peso molecular: 588,73

[Fig. 4]

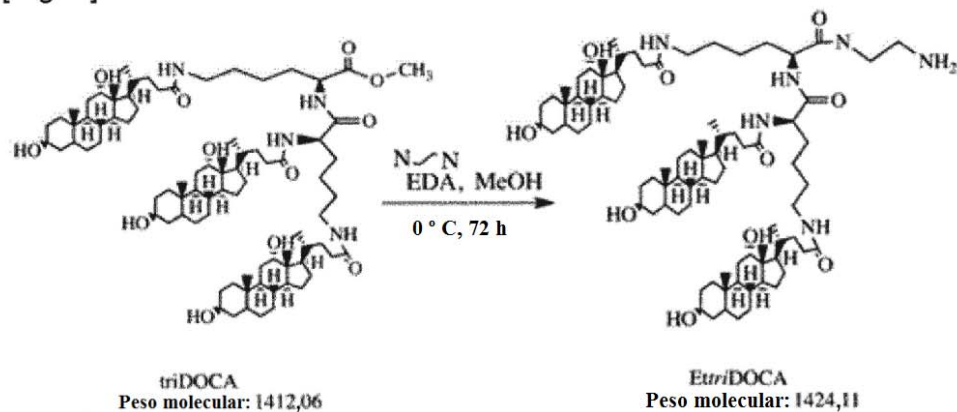


Fórmula química:  $C_{13}H_{31}Cl_3N_4O_3$   
Peso molecular: 397,77

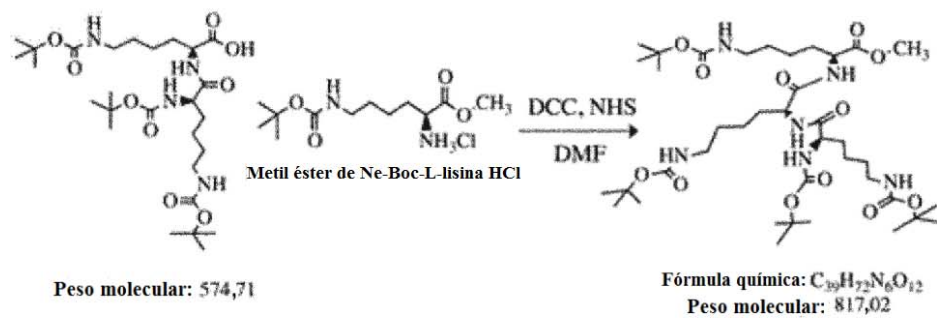
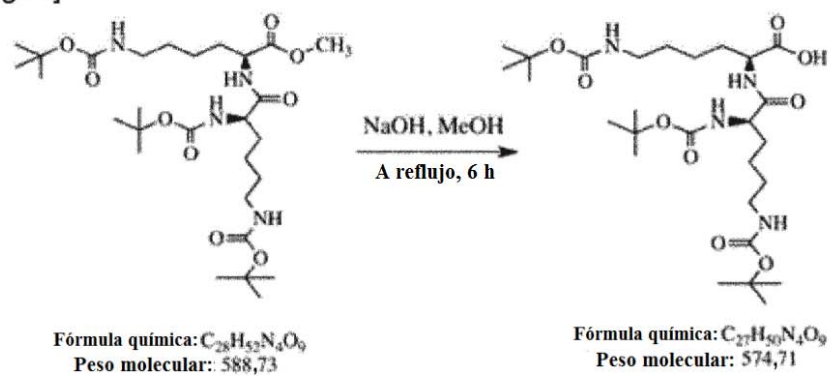


triDOCA  
Fórmula química:  $C_{85}H_{142}N_4O_{12}$   
Peso molecular: 1412,06

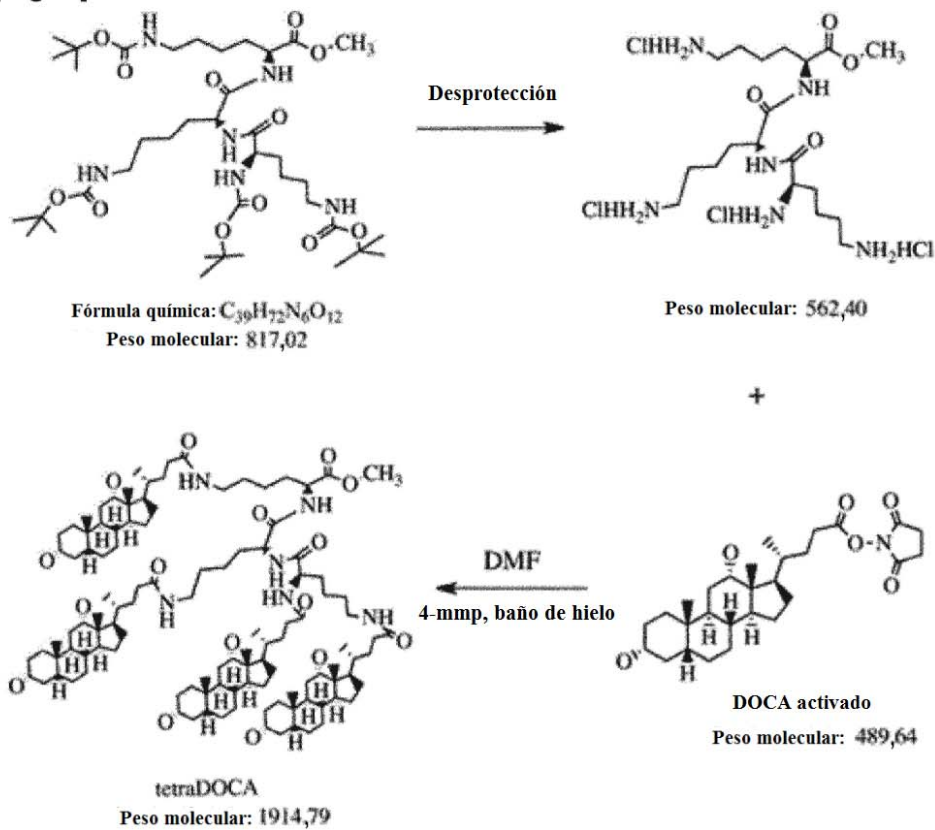
[Fig. 5]



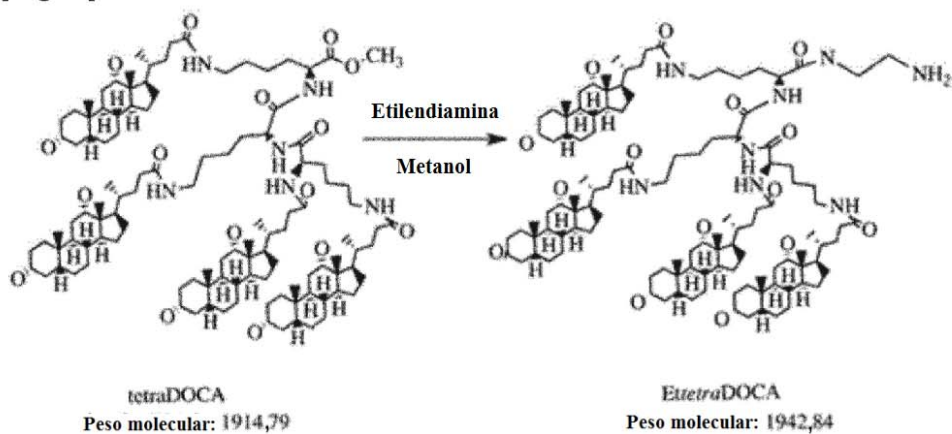
[Fig. 6]



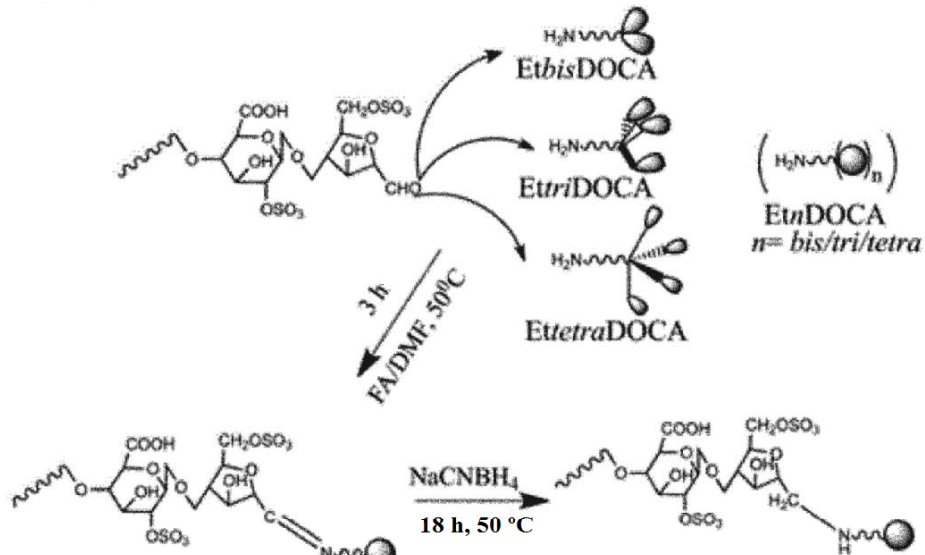
[Fig. 7]



[Fig. 8]

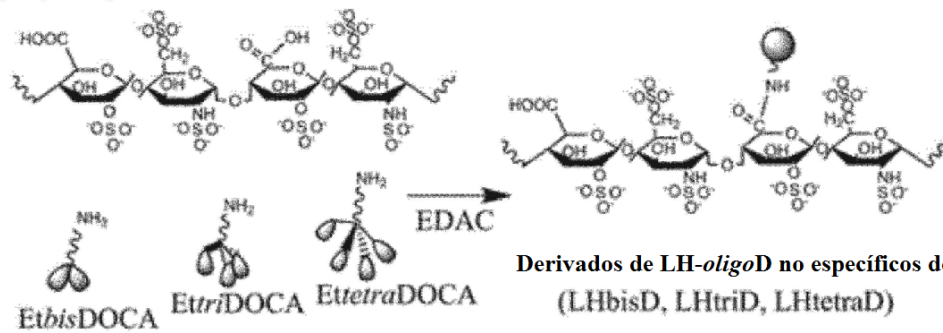


[Fig. 9]



Derivados de LH-oligoD específicos de sitio terminal  
(EHbisD, EHtriD, EHtetraD)

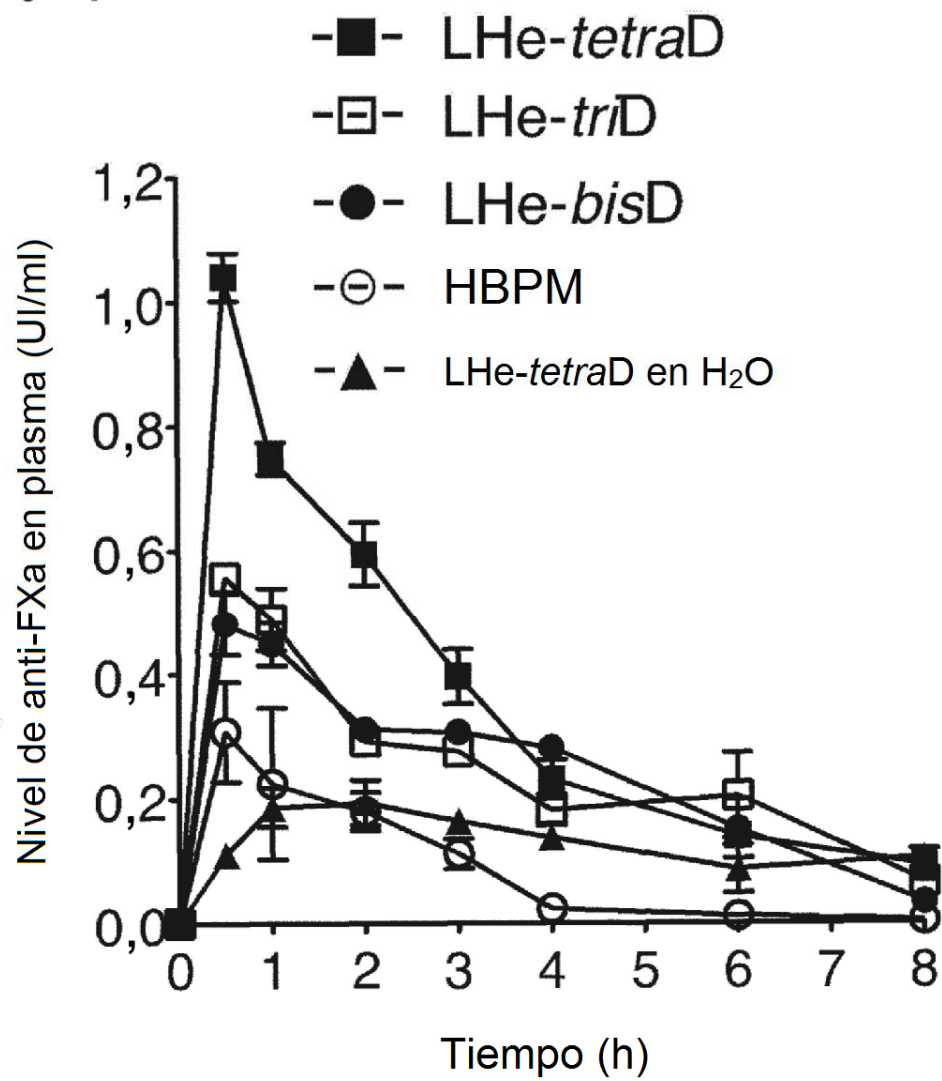
[Fig. 10]



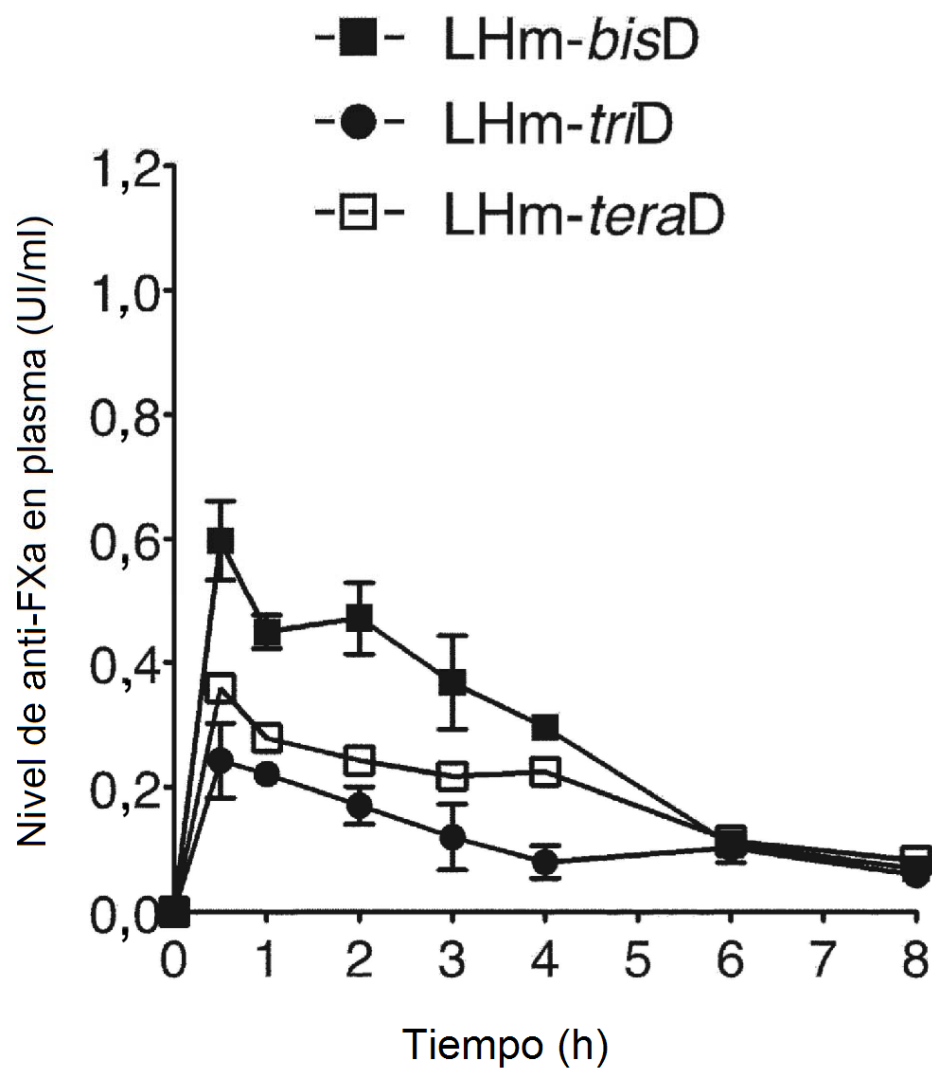
Derivados de LH-oligoD no específicos de sitio  
(LHbisD, LHtriD, LHtetraD)



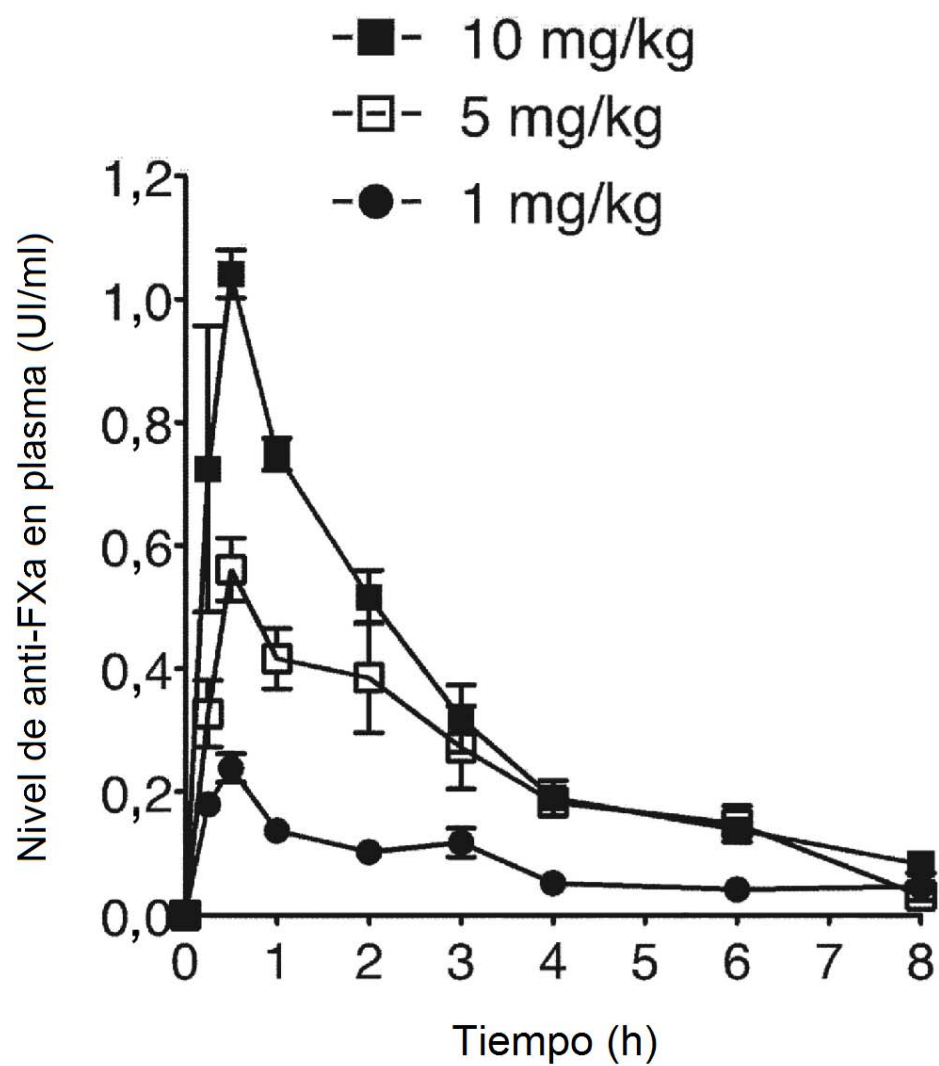
[Fig. 11]



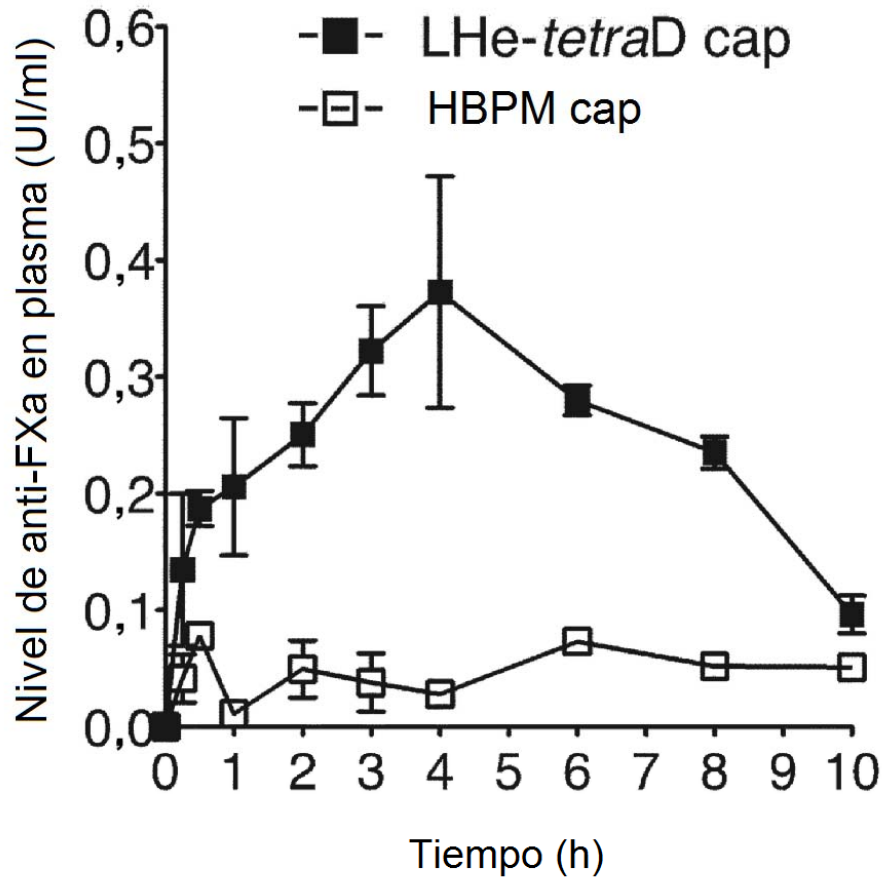
[Fig. 12]



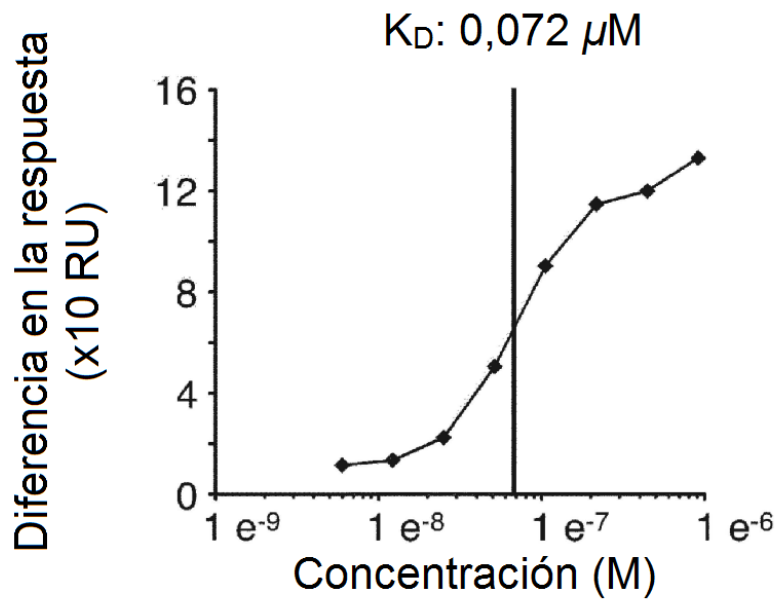
[Fig. 13]



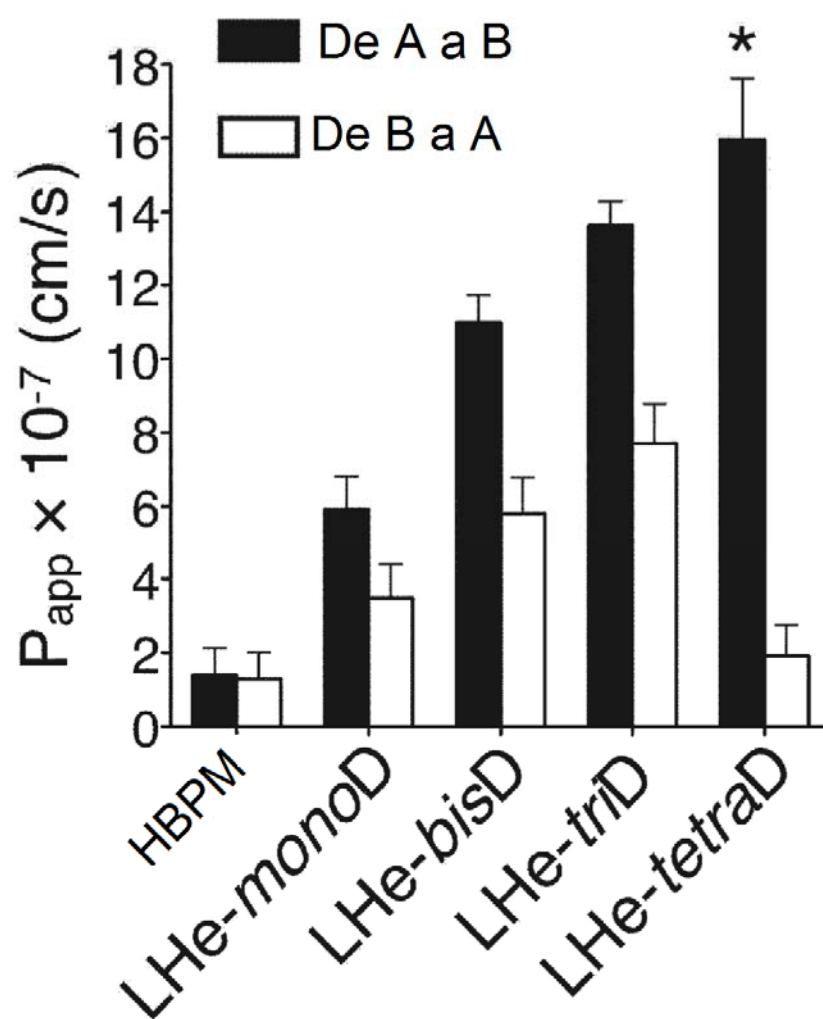
[Fig. 14]



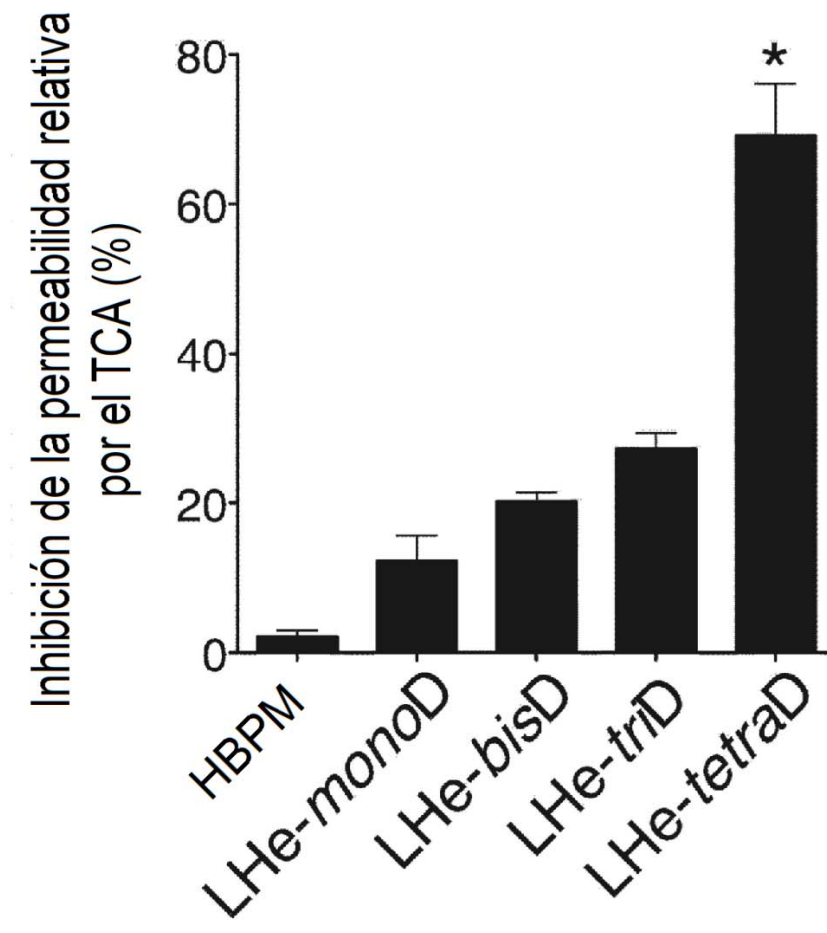
[Fig. 15]



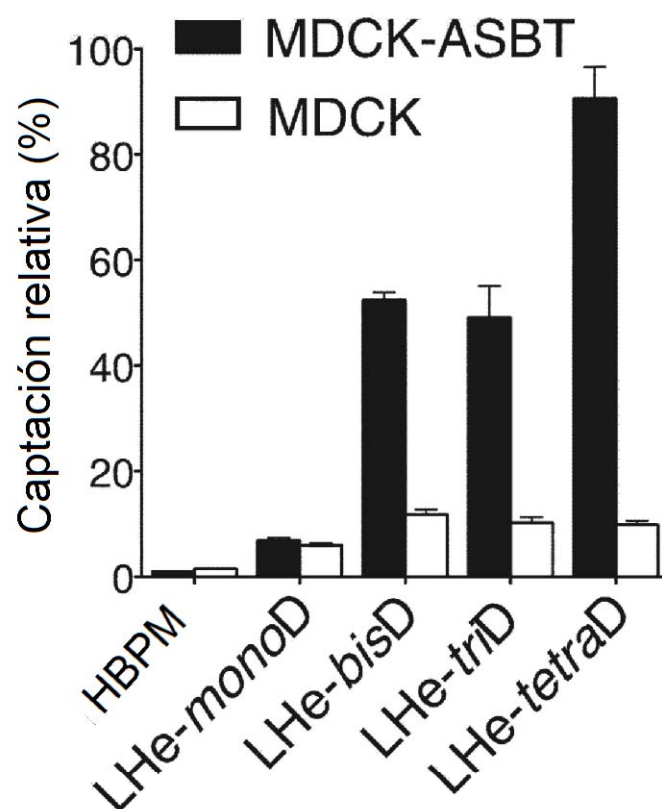
[Fig. 16]



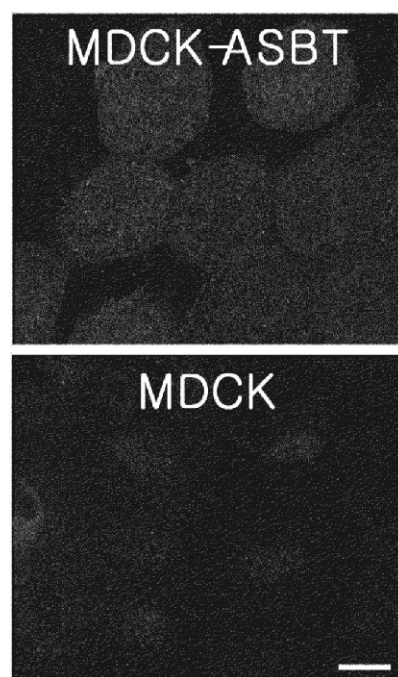
[Fig. 17]



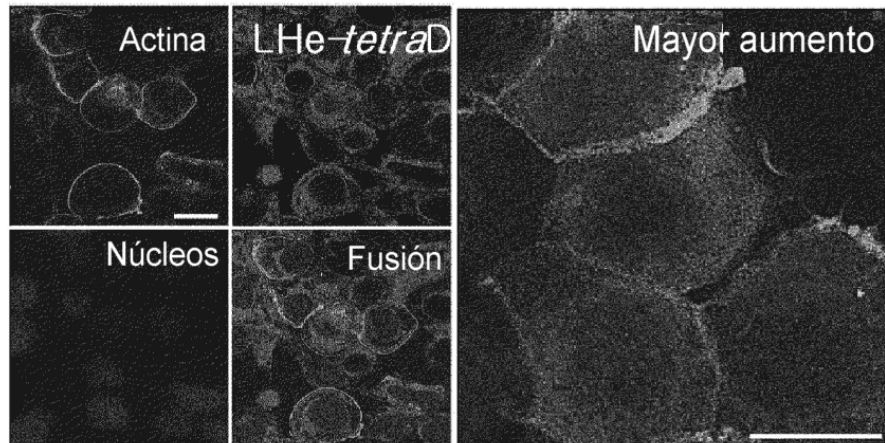
[Fig. 18]



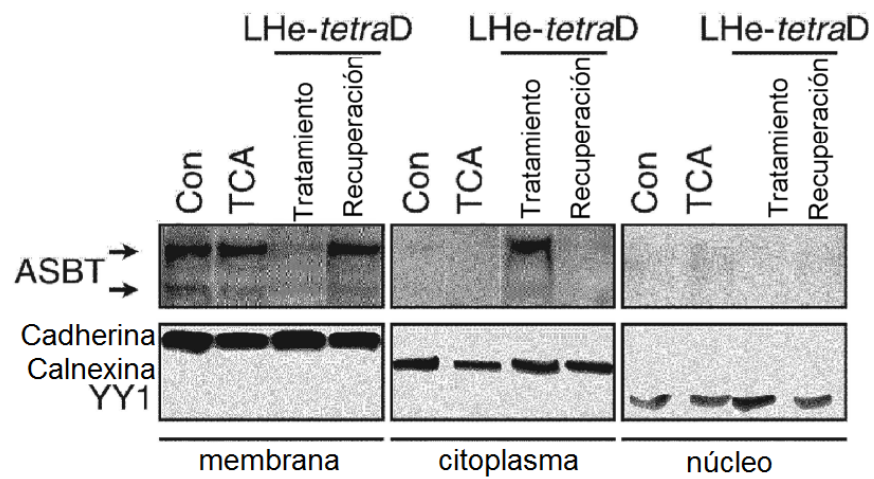
[Fig. 19]



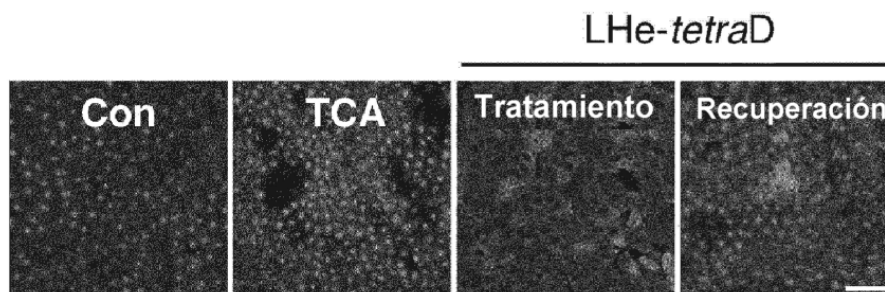
[Fig. 20]



[Fig. 21]

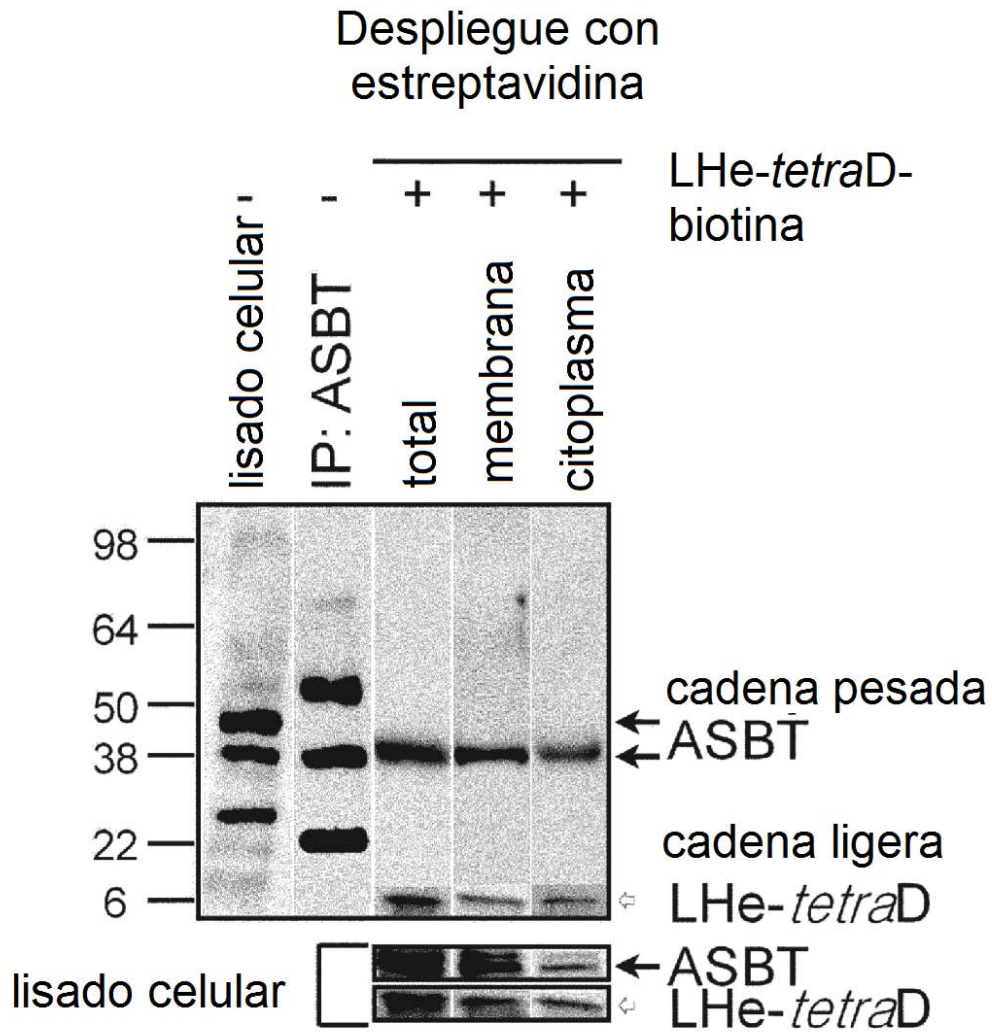


[Fig. 22]

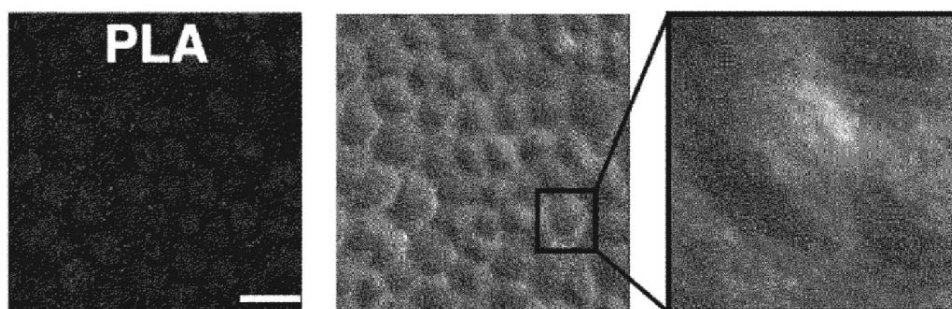
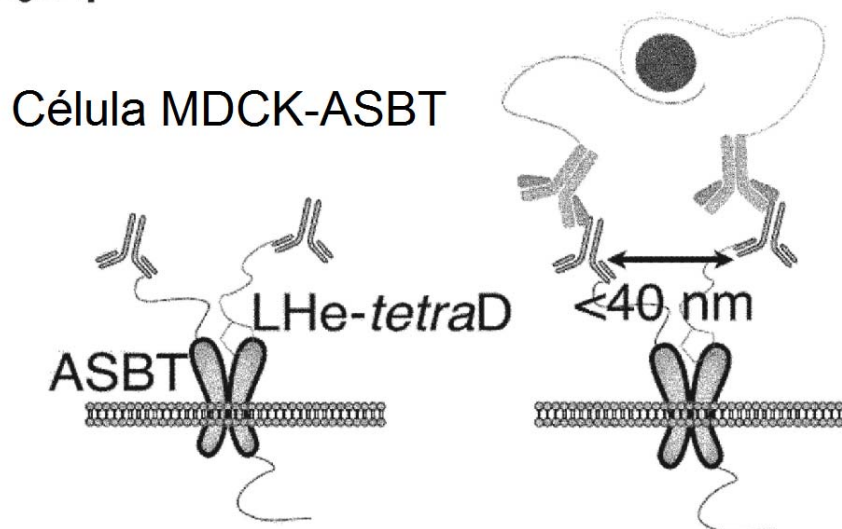




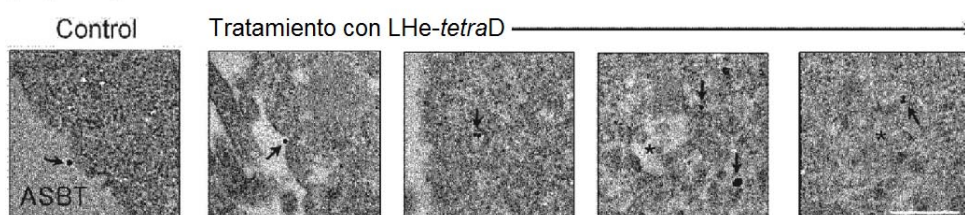
[Fig. 23]



[Fig. 24]



[Fig. 25]



[Fig. 26]

