



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 897**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/54** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06845574 .0**  
96 Fecha de presentación : **15.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1976553**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2008**

54 Título: **Composiciones y métodos para reducción del oxalato.**

30 Prioridad: **16.12.2005 US 750896 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.07.2011**

73 Titular/es: **OXThera, Inc.**  
**13709 Progress Boulevard, Box 17**  
**Alachua, Florida 32615, US**

72 Inventor/es: **Li, Qingshan y**  
**Sidhu, Harmeet**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 362 897 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**

Composiciones y métodos para reducción del oxalato.

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una composición que comprende una o más enzimas degradantes del oxalato para suministrar las enzimas en forma activa al estómago, donde las una o más enzimas degradantes del oxalato ejercen su efecto. Así pues, la presente invención proporciona medios para reducción del oxalato en el estómago. Una composición de la invención comprende partículas que contienen una o más enzimas degradantes del oxalato incrustadas en un primer material polímero, en donde la enzima incrustada retiene al menos dos veces la actividad de la una o más enzimas no incrustadas libres obtenidas del mismo lote después de incubación en el jugo gástrico simulado USP a 37°C durante al menos 60 min en condiciones similares.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La enfermedad de cálculos en el tracto renal/urinario (urolitiasis) es un problema sanitario muy importante en todo el mundo. La mayoría de los cálculos asociados con urolitiasis se componen de oxalato de calcio solo u oxalato de calcio más fosfato de calcio. Otros estados de enfermedad han sido asociados también con exceso de oxalato. Éstos incluyen vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal de etapa terminal, trastornos de conductancia cardíaca, enfermedad de Crohn y otros estados de enfermedad entérica.

El ácido oxálico, y/o su sal, oxalato, se encuentra en una gran diversidad de alimentos, y es por tanto un componente de muchos constituyentes en las dietas humana y animal. La absorción incrementada del oxalato puede ocurrir después de ingerir alimentos que contienen cantidades elevadas de ácido oxálico. Es bien sabido que alimentos tales como las espinacas y el ruibarbo contienen cantidades elevadas de oxalato, pero una multitud de otros alimentos y bebidas contienen también oxalato. Dado que el oxalato se encuentra en una diversidad tan grande de alimentos, dietas que sean bajas en oxalato y que sean también agradables al paladar son difíciles de formular. Adicionalmente, el cumplimiento con una dieta baja en oxalato es a menudo problemático.

El riesgo de formación de cálculos renales gira alrededor de cierto número de factores que no se conocen todavía por completo. La enfermedad de cálculos renales o en el tracto urinario se presenta en una proporción tan alta como 12% de la población en los países occidentales y aproximadamente el 70% de estos cálculos se componen de oxalato de calcio o de oxalato de calcio más fosfato de calcio. Algunos individuos (v.g. pacientes con enfermedad intestinal tal como la enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria o esteatorrea así como los pacientes que han sufrido cirugía de derivación yeyunoileal) absorben una mayor proporción del oxalato de sus dietas que otras personas. Para estos individuos, la incidencia de la urolitiasis por oxalato aumenta acusadamente. El aumento de la incidencia de la enfermedad es debida a los niveles incrementados de oxalato en los riñones y la orina, y éste, el síndrome hiperoxalúrico más común en los humanos, se conoce como hiperoxaluria entérica. El oxalato es también un problema en pacientes con enfermedad renal de etapa terminal y se dispone de pruebas recientes de que el oxalato elevado en la orina está implicado también en la vestibulitis vulvar (vulvodinia).

Composiciones de recubrimiento entérico que comprenden bacterias degradantes del oxalato han sido propuestas para reducir las concentraciones de oxalato. Sin embargo, las composiciones con recubrimiento entérico pasan a través del estómago en forma intacta, es decir el recubrimiento se mantiene intacto y, de acuerdo con ello, no puede degradarse cantidad alguna de oxalato en el estómago. Por consiguiente, existe todavía necesidad de desarrollar composiciones que permitan la degradación del oxalato ya en el estómago a fin de degradar especialmente el oxalato dietético. Además, dichas composiciones son adecuadas para uso en el tratamiento de las hiperoxalurias entéricas y de absorción tales como las hiperoxalurias que causan enfermedad de cálculos recurrente. El objetivo DE dicho tratamiento es que los pacientes exhiban niveles normales de oxalato en la orina.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención comprende composiciones y métodos para tratar y prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato. Las composiciones de la presente invención comprenden enzimas que reducen el oxalato. Los métodos de la presente invención comprenden administrar las composiciones para tratar o prevenir condiciones relacionadas con el oxalato, y métodos para fabricar y utilizar dichas composiciones. Las composiciones de la presente invención reducen el oxalato en condiciones gástricas, tales como pH bajo y en presencia de proteasas. Las composiciones de la presente invención reducen el oxalato en el estómago de humanos y otros animales. Las composiciones reducen el oxalato no sistémico, v.g. oxalato en el tracto gastrointestinal, particularmente en el estómago, y evitan que el oxalato exógeno (v.g. de la comida) entre en la circulación sistémica.

Una composición de acuerdo con la presente invención comprende partículas que contienen una o más enzimas incrustadas en un primer material polímero, en donde las enzimas incrustadas retienen al menos dos veces la actividad de las una o más enzimas no incrustadas del mismo lote, después de incubación de las enzimas tanto incrusta-

das como no incrustadas (libres) en fluidos gástrico simulado (84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH que fluctúa desde 1,0 a 4,0) a 37°C durante al menos 60 minutos. Las composiciones comprenden partículas que pueden recubrirse ulteriormente con un segundo material polímero. Las composiciones comprenden materiales polímeros que están reticulados, y opcionalmente, las reticulaciones pueden reducirse. En realizaciones específicas, el primer material polímero es quitosano, alginato, pectina o ácido hialurónico. Además de las una o más enzimas y el primer material polímero, las composiciones particuladas pueden contener también uno o más aditivos tales como, v.g., agentes de ajuste del pH, agentes tampón, agentes solubilizantes, estabilizadores, conservantes, cofactores para las enzimas o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como, v.g., cargas, diluyentes, vehículos o análogos.

Los métodos de la presente invención comprenden proporcionar composiciones para tratamiento no sistémico, por ejemplo, proporcionar una composición que permita reducir el oxalato en el estómago a fin de evitar la absorción del oxalato del tracto gastrointestinal. La composición protege las enzimas reductoras del oxalato incrustadas en ella contra el ambiente ácido y deteriorante de las enzimas en el estómago, y mantiene la actividad enzimática en dicho ambiente severo. Los métodos de tratamiento y prevención comprenden proporcionar las composiciones expuestas en esta memoria en las cuales una o más enzimas degradantes del oxalato están incrustadas en un primer material polímero, recubrir opcionalmente las partículas obtenidas con un segundo material polímero, reticular opcionalmente el primero y/o segundo material polímero y, opcionalmente, reducir las reticulaciones.

Las composiciones de la presente invención son adecuadas en métodos de tratamiento o prevención de condiciones relacionadas con el oxalato que incluyen, pero sin carácter limitante, hiperoxaluria, hiperoxaluria de absorción, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal de etapa terminal, trastornos de la conductancia cardiaca, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y pacientes que han sido sometidos a cirugía gastrointestinal y cirugía bariátrica (cirugía por obesidad), y/o que han sufrido tratamiento con antibióticos. Un método de tratamiento o prevención comprende administrar por vía oral a un individuo una composición de la presente invención, en una cantidad eficaz, para reducir el oxalato en el estómago del individuo, y reducir así la carga global de oxalato del individuo de una manera eficiente y eficaz. Tales composiciones son farmacéuticamente aceptables para administración oral.

Las enzimas utilizadas en las composiciones y métodos de la presente invención son enzimas reductoras del oxalato, e incluyen, pero sin carácter limitante, oxalato-oxidasa, oxalato-descarboxilasa (abreviada en el presente contexto OxDc), oxalil-CoA-descarboxilasa, o formil-CoA-transferasa, o combinaciones de las mismas. Además, otras enzimas, cofactores y co-enzimas que son sustituyentes de los caminos de degradación del oxalato o están implicadas en los caminos metabólicos del oxalato, particularmente la reducción del oxalato, son relevantes también solas o en combinación con una o más de las enzimas reductoras del oxalato. En la presente invención, no sólo las enzimas (proteínas) están abarcadas por esta definición, sino también secuencias de polinucleótidos que codifican genes y proteínas reductores del oxalato son contempladas por la presente invención. La presente invención contempla también cualesquiera parejas de fijación de estas enzimas e incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se fijan a o interaccionan con las enzimas.

Las enzimas pueden derivarse por aislamiento de organismos, pueden purificarse, pueden fabricarse sintéticamente, semi-sintéticamente o por medios recombinantes, o pueden utilizarse como un lisado de células. Las enzimas utilizadas en las composiciones pueden ser proteína recombinante purificada, pero dado que las enzimas pueden ser producidas también en ciertas bacterias que son seguras, se contempla también utilizar dichas bacterias como células enteras o como lisado.

La enzima degradante del oxalato está presente normalmente en una composición de la invención en una cantidad que es suficiente para degradar sustancialmente todo el oxalato normalmente presente en una comida estándar. Dependiendo de las elecciones alimentarias, una dieta occidental media puede contener 100 a 300 miligramos de oxalato/día. En general, aproximadamente 0,2 g de las partículas que comprenden enzima (igual a 20 mg de OxDc en 1 ml de suspensión de partículas) pueden eliminar 180 mg de oxalato en condiciones gástricas simuladas en el transcurso de 30 min.

Un aspecto de la presente invención comprende una composición que contiene partículas que comprenden una o más enzimas degradantes del oxalato incrustadas en un primer material polímero, en donde la enzima incrustada retiene al menos dos veces la actividad de la una o más enzimas no incrustadas libres, obtenidas del mismo lote, después de incubación en jugo gástrico simulado USP que contiene 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo que fluctúa desde aproximadamente pH 1 a aproximadamente pH 5, tal como, v.g., desde aproximadamente pH 2 a aproximadamente pH 5, desde aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 4,5, desde aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 3,5, tal como aproximadamente pH 3 a 37°C durante al menos 60 minutos.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 Fig. 1 es una gráfica que muestra la estabilidad de OxDc en micropartículas I (preparadas a pH 3,9) y en micropartículas II (preparadas a pH 8) por debajo de pH 3 con pepsina.
- Fig. 2 es una gráfica que muestra los efectos de la concentración de alginato para la formulación de micropartículas de alginato de OxDc recubiertas de quitosano a pH 3 con pepsina.
- 10 Fig. 3 es una gráfica que muestra la distribución de tamaños de partícula de partículas preparadas de acuerdo con el Ejemplo 2 de esta memoria. Fig. 3. Estadísticas de volumen (aritméticas) 17795s3\_07\_01.\$1s. Cálculos desde 0,040 hasta 2000 gm. Volumen: 100%; media: 48,53  $\mu\text{m}$ ; mediana: 29,10  $\mu\text{m}$ ; ratio media/mediana: 1,668; moda: 28,70  $\mu\text{m}$ ; D.S.: 65,43  $\mu\text{m}$ ; C.V. 135%; sesgo: 4,384 sesgada a la derecha; curtosis 26,90 leptocúrtica; d10 8,814  $\mu\text{m}$ ; d50 29,10  $\mu\text{m}$ ; d90 109,9  $\mu\text{m}$ .
- 15 Fig. 4 es una gráfica que muestra los efectos del recubrimiento con alginato o carragenano sobre la estabilidad de OxDc en nanopartículas quitosano/TPP a pH 3 con pepsina.
- Fig. 5 es una gráfica que muestra los efectos de concentraciones de aldehído glutárico para reticulación sobre la estabilidad de OxDc en las micropartículas de OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico a pH 2,4 con pepsina.
- 20 Fig. 6 es una gráfica que ilustra la estabilidad de OxDc en dos clases de micropartículas reticuladas y reducidas a pH 2,2 y 1,85.
- 25 Fig. 7 es una gráfica que muestra la biodisponibilidad del oxalato (parte soluble) después de administración de las composiciones de la invención.
- Fig. 8 es una gráfica que ilustra la evolución temporal del oxalato soluble total en las espinacas eliminado por micropartículas en tres condiciones simuladas diferentes.
- 30 Fig. 9 es una gráfica que muestra los efectos de la reticulación con aldehído glutárico (1-5%) en micropartículas de quitosano a pH 2,4 y en presencia de pepsina.
- 35 Fig. 10 es una gráfica que ilustra la reducción de una base de Schiff en las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico a valores diferentes de pH y en presencia de pepsina.
- Fig. 11A y B son gráficas que muestran el oxalato eliminado por las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico reducidas a pH 3.
- 40 Fig. 12A es una gráfica que muestra la biodisponibilidad del oxalato (parte soluble) después de administración de las composiciones de la invención; fig. 12B es una gráfica que ilustra el porcentaje del oxalato total eliminado.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención comprende composiciones y métodos para tratamiento y prevención de las condiciones relacionadas con el oxalato. Las composiciones de la presente invención comprenden enzimas que reducen el oxalato. Las composiciones de la presente invención están diseñadas de tal manera que las enzimas retienen su actividad incluso si las composiciones se someten a un ambiente gástrico. Los métodos de la presente invención comprenden administrar las composiciones para tratar o prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato, y métodos para fabricar y utilizar dichas composiciones. De modo más específico, la invención se refiere a una composición que está diseñada para permitir la reducción del oxalato en condiciones gástricas, permitiendo con ello una reducción del oxalato ya en el estómago. Una composición de esta clase está diseñada específicamente para reducir el oxalato no sistémico, v.g. el oxalato en el tracto gastrointestinal, particularmente en el estómago, y prevenir la entrada del oxalato exógeno (v.g. de la comida) en la circulación sistémica.

Como se ha mencionado arriba, el fondo de la presente invención fue la necesidad de poder administrar enzimas degradantes del oxalato al estómago a fin de degradar el oxalato dietético y prevenir la absorción del oxalato del estómago y el tracto intestinal, lo cual previene enfermedades y trastornos relacionados con el oxalato, tales como, v.g., hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), y especialmente la hiperoxaluria de absorción y entérica. Las enzimas administradas están protegidas contra la degradación de las proteínas y/o la degradación dependiente del pH o ácida que tiene lugar en las condiciones gástricas del estómago, es decir pH bajo y en presencia de pepsina.

Así pues, la presente invención se refiere a una composición, en la cual las enzimas están incrustadas en un material polímero que protege las enzimas contra la degradación en condiciones gástricas. Puede contemplarse que esta composición puede comprender cualquier enzima, pero para el propósito de la presente invención, se contempla por la presente invención enzimas degradantes del oxalato, tales como, v.g., oxalato-d Descarboxilasa, oxalato-oxidasa, o una combinación de oxalil-CoA-d Descarboxilasa y formil-CoA-transferasa, o una combinación de cualquiera de éstas.

Una composición de acuerdo con la presente invención comprende partículas que contienen una o más enzimas incrustadas en un primer material polímero, en donde las enzimas incrustadas retienen al menos dos veces la actividad de la una o más enzimas no incrustadas del mismo lote, después de incubación de las enzimas tanto incrustadas como no incrustadas (libres) en fluido gástrico simulado (84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH comprendido entre 1,0 y 4,0) a 37°C durante al menos 60 minutos. Las partículas pueden recubrirse ulteriormente con un segundo material polímero. Como se utiliza en esta memoria, el término "enzimas del mismo lote" significa enzimas que se aíslan o sintetizan en condiciones idénticas, y generalmente se aíslan o sintetizan en el mismo procedimiento de aislamiento o síntesis, haciéndose referencia generalmente a la composición de enzimas resultante como un lote. Por ejemplo, una solución de enzima se divide en dos porciones en las cuales una porción de enzimas se incrusta en una partícula y puede sufrir tratamiento ulterior, y la otra porción de enzimas se trata de modo diferente, y estas enzimas se considera que proceden del mismo lote.

Normalmente, pueden emplearse dos rutas diferentes de tratamiento de la enfermedad relacionada con el oxalato, dependiendo de si la finalidad del tratamiento es sistémica o no sistémica. Los métodos de la presente invención proporcionan una composición para el tratamiento no sistémico, es decir para proporcionar una composición que permite reducir el oxalato en el estómago a fin de evitar la absorción del oxalato del tracto gastrointestinal. Con arreglo al mejor conocimiento de los autores de la invención, dicha composición es nueva y está basada en un nuevo principio de, por una parte, protección de la enzima contra el ambiente ácido y deteriorante de las enzimas en el estómago, y por otra parte, mantenimiento de la actividad enzimática incluso en un ambiente ácido. Esta meta puede cumplirse por incrustación de las una o más enzimas degradantes del oxalato en un primer material polímero, recubrimiento opcional de las partículas obtenidas con un segundo material polímero, reticulación opcional del segundo material polímero y reducción opcional de las partículas recubiertas reticuladas.

En una realización de la invención, se consigue una reducción de la absorción del oxalato proporcionando enzimas degradantes del oxalato al tracto gastrointestinal, particularmente el estómago. Las composiciones de la presente invención comprenden enzimas reductoras del oxalato que incluyen, pero sin carácter limitante, oxalato-oxidasa, oxalato-d Descarboxilasa, oxalil-CoA-d Descarboxilasa, o formil-CoA-transferasa, o combinaciones de las mismas. Estas enzimas utilizan oxalato como sustrato. Los métodos de la presente invención comprenden proporcionar composiciones enzimáticas para degradación del oxalato dietético en el estómago, reduciendo con ello la concentración del oxalato disponible en el estómago para la absorción. Esto reducirá también la cantidad de oxalato que pasa al intestino para absorción en este segmento del tracto gastrointestinal. Además de caminos de absorción, se han identificado recientemente caminos secretores de oxalato en el estómago humano. Las composiciones de la presente invención serían útiles también en la degradación del oxalato secretado en el estómago procedente del sistema circulatorio, y por tanto los métodos de la presente invención contemplan una reducción global de la carga de oxalato en un individuo.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones y métodos para el suministro de una cantidad eficaz de una enzima reductora del oxalato al estómago de un humano o animal, particularmente a aquéllos que se

encuentran en riesgo incrementado de enfermedad relacionada con el oxalato. La actividad enzimática se utiliza para degradar el oxalato en el estómago y reducir la cantidad de oxalato presente en el estómago y el tracto intestinal, reduciendo con ello la cantidad de oxalato disponible para absorción. Niveles más bajos de oxalato en el tracto gastrointestinal pueden conducir también a una excreción incrementada de oxalato de la sangre a los intestinos a través de los caminos secretores del oxalato.

Las composiciones de la presente invención son adecuadas para uso en condiciones relacionadas con el oxalato que incluyen, pero sin carácter limitante, hiperoxaluria, hiperoxaluria de absorción, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal de etapa terminal, trastornos de la conductancia cardiaca, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y pacientes que han sufrido cirugía gastrointestinal y cirugía bariátrica (cirugía para obesidad), y/o que han sufrido tratamiento con antibióticos.

Una característica de una composición de la presente invención es la capacidad de la partícula para proteger las enzimas degradantes del oxalato contra la degradación por condiciones tales como las encontradas en el ambiente gástrico incluyendo, pero sin carácter limitante, la degradación por una proteasa tal como pepsina o degradación debida al ambiente ácido.

El término "enzima degradante del oxalato", tal como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto designar cualquier enzima que sea capaz de reducir el oxalato. La misma puede reducir el oxalato per se y/o puede funcionar en un camino de reducción del oxalato. La presente invención contempla el uso de cualesquiera enzimas reductoras o degradantes del oxalato conocidas, y dichos términos "reductor del oxalato" y "degradante del oxalato" se utilizan de modo intercambiable en esta memoria.

Las enzimas utilizadas en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, oxalato-oxidasa, oxalato-descarboxilasa (abreviada en el presente contexto OxDc), oxalil-CoA-descarboxilasa, o formil-CoA-transferasa, o combinaciones de las mismas. Además, otras enzimas, cofactores y co-enzimas que son sustituyentes de los caminos de degradación del oxalato o están implicadas en los caminos metabólicos del oxalato, particularmente la reducción del oxalato, son también importantes solas o en combinación con una o más de las enzimas arriba mencionadas. En el presente contexto, están abarcadas por esta definición no sólo las enzimas, sino que también son contempladas por la presente invención secuencias de polinucleótidos que codifican genes y proteínas reductores del oxalato. La presente invención contempla también cualesquiera parejas de fijación de estas enzimas e incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se fijan a o interaccionan con las enzimas.

Las enzimas pueden derivarse por aislamiento a partir de organismos, pueden estar purificadas, pueden producirse sintéticamente, semi-sintéticamente o por medios recombinantes, o pueden utilizarse como un lisado de células. Normalmente, las enzimas se emplearán como proteína recombinante purificada pero, dado que las enzimas pueden producirse también en ciertas bacterias que son seguras, se contempla también la utilización de dichas bacterias como células enteras o como lisado. Debido al uso médico de una composición de la invención, se prefiere que las una o más enzimas utilizadas estén bien definidas con respecto a pureza y actividad. El lisado de células, si se utiliza, puede producirse a partir de cualquier microorganismo que tenga funciones reductoras del oxalato, v.g., *O. formigenes*.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender también uno o más factores adicionales que pueden mejorar la actividad enzimática. Estos factores adicionales pueden ser, v.g., oxalil-CoA, MgCl<sub>2</sub>, y/o tiamina-difosfato (una forma activa de vitamina B1).

En realizaciones específicas, se emplean una o más enzimas de las tres clases principales de enzimas degradantes del oxalato.

Las tres clases principales de enzimas degradantes del oxalato incluyen las siguientes. La primera, oxalato-oxidasa, se expresa en las plantas superiores y cataliza la oxidación del oxalato dependiente de oxígeno a CO<sub>2</sub> con formación concomitante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta reacción constituye la base de los ensayos actuales para la detección de niveles de oxalato en la orina. Un procedimiento rápido de purificación en tres pasos ha sido desarrollado para obtener oxalato-oxidasa a partir de raíces de cebada. Esta enzima está presente también en el tallo y la remolacha, las hojas del amaranto, el sorgo y muchos otros cereales.

La oxalato-descarboxilasa (EC 4.1.1.2), la segunda clase de enzimas metabolizantes del oxalato, está presente principalmente en diversos hongos. La misma se ha consignado y caracterizado en varios hongos tales como *Myrothecium verrucaria*, ciertas cepas de *Aspergillus niger*, hongo de la pudrición blanca, *Coriolus versicolor* y *Collybia velutipes*. Esta enzima convierte el oxalato en formiato y dióxido de carbono en una reacción dependiente del oxígeno. Se han utilizado también oxalato-descarboxilasas en el ensayo clínico del oxalato en sangre y orina y pueden utilizarse para reducir los niveles de oxalato en la comida y el ambiente. La primera oxalato-descarboxilasa bacteriana ha sido descrita recientemente como el producto del gen YvrK que se expresa como una proteína citosólica en

Bacillus subtilis. La proteína YvrK (la oxalato-d Descarboxilasa de B. subtilis) ha sido expresada como una proteína funcional recombinante en E. coli, purificada hasta homogeneidad y caracterizada totalmente.

5 La tercera clase es la enzima bacteriana, oxalil-CoA-d Descarboxilasa, que es activa sobre el sustrato activado de CoA y convierte el mismo en formil-CoA. Una formil-CoA-transferasa actúa luego para intercambiar formiato y oxalato sobre CoA. Estas enzimas han sido estudiadas en la bacteria degradante del oxalato, Pseudomonas oxalaticus encontrada comúnmente en el suelo y en Oxalobacter formigenes, residente en el tracto GI de vertebrados y humanos.

10 Las enzimas han sido revisadas detalladamente en "The enzymes of oxalate metabolism: Unexpected structures and metabolism", Svedruzik D. et al., Arch Biochem Biophys, 1 de enero de 2005; 433 (1): 176-92, que se incorpora por la presente en su totalidad. Las enzimas, tanto si son enzimas nativas como proteínas aisladas o las producidas por técnicas recombinantes, pueden modificarse por medios recombinantes o químicos y pueden contener grupos secundarios u otras moléculas unidas como apéndice. Por ejemplo, las enzimas pueden modificarse de modo que  
15 tengan moléculas enlazadoras para fijación a otras moléculas o compuestos químicos.

En una realización específica de la invención, se consigue una reducción en los niveles de oxalato por el uso de enzimas degradantes del oxalato producidas por un medio recombinante, tales como, v.g., Escherichia coli, u otros organismos que han sido transformados para expresar enzimas degradantes del oxalato.  
20

Ejemplos de enzimas recombinantes de relevancia en el presente contexto son:

- i). Oxalil-CoA-d Descarboxilasa, v.g. que tiene una de las secuencias siguientes:

25 <http://www.expasy.org/uniprot/P40149>

**UniProtKB/TrEMBL número de Acceso de entrada P40149**

**SEQ.ID 1**

**1 msnddnvelt dgfhvlidal kmndidtnyg vvgipitnla rmwqddgqrf ysfreqhag  
61 yaasiagyie gkpgvcltvs apgfingvts lahattncfp millsgsser eivdlqqgdy  
121 eemdqmvar phckasfrin sikdipigia ravrtavsgp pggvyvdipa klfgqtisve**

181 eankllfkpi dpapaqipae daiaraadli knakrpviml gkgaayaqcd deiralveet  
 241 gipflpmgma kglldpnhpq saaatrafal aqcdvcvlig arlnwlmqhg kgktwgdelk  
 301 kyvqidiqan emdsnqpiiaa pvvgdiksav slrkalkga pkadaewtga lkakvdgnka  
 361 klagkmtaet psgmmnysns lgvvrdfmla npdislvneg analdntrmi vdmkprkrl  
 421 dsgtwgvngi gmgycvaaaa vtgkpvave gdsafgfgsm eleticrynl pvtviimnng  
 481 giykgneadp qpvisctrl trgrydmmme afggkgyvan tpaelkaale eavasgkpc1  
 541 inamidpdag vesgriksln vsvkvgkk

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=M77128&d>

optcmdl=GenBank

GenBank número de Acceso M77128

SEQ ID 2

1 gagcaagatg agatgcctt cctctgtggc aatcaggaat atattgacgg cacgtgttt  
 61 ccctacttcc ggtgtgccag acatctcaa agatctcatg tggtttga atccatttt  
 121 gccggtatcc cggctattcc ttactttcc aaattgggtg taatgcaatg aatctatggt  
 181 ttttaatgct gtagggcaa tttccggca gtgaaatgt cagatgcatt tcattgtat  
 241 tcaggcggat ttgttaaa tgacctgaat caatattgcc ggattgatc aggtcaatga  
 301 agtcaaattg acttatgca atggtgccaa atgacctag gtcaacggga ttttaaagg  
 361 gtatcgggca tactcggaa tgactgtaa caactttat caaaaccaac caaagaaagg  
 421 tattactcat gagtaacgac gacaatgtag agtgactga tggcttcat gtttgatc  
 481 atgccctgaa aatgaatgac atcgatacca tgtatggtg tgcggcatt cctatcacga  
 541 acctggctcg tatgtggcaa gatgacggc agcgtttta cagcttccg cacgaacaac  
 601 acgcaggta tgcagctct atcggcgtt acatcgaagg aaaacctggc gtttgctga  
 661 ccgttccgc cctggcttc ctgaacggcg tgaactcct ggctcatgca accaccaact  
 721 gcttccaat gatcctgtg agcgggtcca gtgaactga aatcgtgat tgcaacagg  
 781 gcgattacga agaaatggat cagatgaatg ttgcactcc aactgcaaa gcttctcc  
 841 gtatcaacag catcaaacg attccaatc gtagcctcg tgcagttcg accgctgat  
 901 ccggacgtcc aggtggtgt tacgtgact tgccagcaa actgtcggg cagaccatt  
 961 ctgtagaaga agtaacaaa ctgctctca aaccaatcga tccagctcc gcacagatt  
 1021 ctgctgaaga cgctatcgt cgcgtcgtg acctgatcaa gaacgcaaa cgtccagta  
 1081 tcatgctggg taaaggcgt gcatacgac aatgcgacga cgaatccgc gactggtg  
 1141 aagaaaccgg catcccattc ctgccaatg gtatggctaa aggcctcgt cctgacaacc  
 1201 atccacaatc cgctgctgca acccgtgct tgcactggc acagtgtgac gttgctgac  
 1261 tgatcggcgc tctctgaac tggctgatg agcacggtaa aggcaaaacc tggggcgacg  
 1321 aactgaagaa atacgtcag atcgacatcc aggctaacga aatggacagc aaccagccta  
 1381 tctgctcacc agttgtggt gacatcaagt ccgctgttc cctgctccgc aaagcactga  
 1441 aaggcgtcc aaaagctgac gctgaatgga ccggcgtct gaaagccaaa gttgacggca  
 1501 acaaagccaa actggctggc aagatgact ccgaaacccc atccggaatg atgaactact  
 1561 ccaatccct gggcgtgtt cgtgactca tctggcaaa tccggatatt tccctggtta  
 1621 acgaaggcgc taatgactc gacaacactc gtatgattg tgacatgctg aaaccacgca  
 1681 aacgtctga ctccgttacc tggggtgta tgggtattg tatgggctac tgcgttctg  
 1741 cagctcgtg taccggcaaa ccggttatc ctgtgaagg cgatagcga ttcggttct  
 1801 ccggtatgga actggaaacc atctgccgtt acaacctgcc agttaccgt atcatcatga  
 1861 acaatggtgg tatctataaa ggtaacgaag cagatccaca accaggcgtt atctcctgta  
 1921 cccgtctgac ccgtgctgt tacgacatga tgatggaagc attggcggg aaaggttatg  
 1981 ttccaatac tccagcagaa ctgaaagctg ctctggaaga agctgttct tccggcaaac  
 2041 catgcctgat caacgcgat atcgatccag acgctggtg cgaatctggc cgtatcaaga  
 2101 gcctgaacgt tgaagtaaa gttggcaaga aataattagc ccaacttga tgaccggta

2161 cgaccggtca cataaagtgt tcgaatgcc ttcaagtta ctgaagggc attttttac  
 2221 cttgcagtt ataacagga aaaattgaag tattcagagc ggaaaagcag atttaagcca  
 2281 cgagaaacat tctttttat tgaaaattgc cataaacaca ttttaaacg ttgcttttt

ii). Formil-CoA-transferasa, v.g. que tiene la secuencia siguiente:

<http://www.expasy.org/uniprot/O06644>

UniProtKB/TrEMBL número de Acceso de entrada O06644

SEQ ID 3

1 mtkpldginv ldthvqagp actqmmgflg anvikierrg sgdmtgrwlq dkpnvdslyf  
 61 tmfncnrksi eldmktpegk elleqmikka dvmvenfgpg aldrmgftwe yiqelnprvi  
 121 lasvkgyaeg hanehlkvyve nvaqcsggaa atgfwdgpp tvsgaalgs nsgmhlmigi  
 181 laalemrhkt grgqkvavam qdavnlnvri kldqqrler tgilaeyppa qpnfadrdr  
 241 nplsfdnits vprgnaggg gqpgwmlkck gwetdadsyv yftiaanmwp qicdmidkpe  
 301 wkddpayntf egrvdklmdi fsfietkfad kdkfevtewa aqyigpcgpv msmkelahdp  
 361 slqkvgtvve vvdeirgnhl tvgapfkfsg fqpeitrapl lgehtdevlk elglldakik  
 421 elhakqv

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=U82167&doptcmdl=GenBank>

GenBank número de Acceso U82167

SEQ ID 4

1 aagcttgctt catttgaga tgttatgca agtgtagca acccaagta gtacctcag  
 61 ccctttgggc gaagttttc tttcttgca gttccttcg gggaaacagc cacagagaa  
 121 aaaaacaaa agttgacca acgacaagga aatgagaaat tatgactaaa ccattagatg  
 181 gaattaatgt cttgacttt acccagctc aggcaggtcc tgctgtaca cagatgatgg  
 241 gtttctggg cgcaaacgic atcaagattg aaagacgtgg ttccggagat atgactcgtg  
 301 gatggctgca ggacaaacca aatgttgatt ccctgtattt cagatgttc aactgtaaca  
 361 aacgttcgat tgaactggac atgaaaacc cggaaaggcaa agagctctg gaacagatga  
 421 tcaagaaaagc cgacgtcatg gtcgaaaact tcggaccagg cgactggac cgtatgggct  
 481 ttacttggga atacattcag gaactgaatc cacgcgtcat tctggcttc gttaaaggct  
 541 atgcagaagg ccacgccaac gaacaccta aagtattga aaacgttgca cagtgttccg  
 601 gcggtgctgc agctaccacc ggttctggg atggtcctcc aaccgttcc ggcgctgctc  
 661 tgggtgactc caactccggt atgcaccta tgcacggtat tctggccgct ctggaatgc  
 721 gtcacaaaaac cggccgtgtg cagaaagttg ccgtcgtat gcaggacgct gttctgaatc  
 781 tggctcgtat caaactgctg gaccagcaac gtctggaaag aaccggcatt ctggctgaat  
 841 acccacaggg tcagcctaac tttccttcg acagagacgg taaccactg tcctcgaca  
 901 acatcacttc cgtccacgt ggtgtaacg caggtggcgg cggccagcca ggctggatgc  
 961 tgaatgtaa aggttgggaa accgatgagg actcctacgt ttacttacc atcgctgcaa  
 1021 acatgtggcc acagatcgc gacatgatc acaagccaga atggaagac gaccagcct  
 1081 acaacacatt cgaaggtcgt gttgacaagc tgatggacat ctctccttc atcgaacca  
 1141 agttcgtga caaggacaaa ttcgaagta ccgaatgggc tgcccagtac ggcattcctt  
 1201 gcggtccggt catgtccatg aaagaactgg ctacgatcc ttccctgcag aaagttgta  
 1261 ccgtcgttga agttgctgac gaaattcgtg gtaaccact gaccgttggc gcaccgttca  
 1321 aattctcggg attccagccg gaaattacc gtgctccgct gttggcgaa cataccgacg  
 1381 aagttctgaa agaactgggt cttgacgatg ccaagatcaa ggaactgcat gcaaacagg

1441 tagttgatc cgtcagactt tctgggcaaa acggcactct ccggagtgcc gttttttgt  
 1501 cacacgaac cctaatacaaa caagcacgtg caatgattcc acatcattgc ggccacattc  
 1561 atccttcggg tcattactg

iii). Oxalato-d Descarboxilasa, v.g. que tiene la secuencia siguiente:

<http://www.expasy.org/uniprot/O34714>

UniProtKB/TrEMBL número de Acceso de entrada O34714

SEQ ID 5

1 mkkqndipqp irgdkgatvk ipnierdrq npdmlvppet dhgtvsnmkf sfsdthnrle  
 61 kgyarevtv relpisenla svnmrlkpga irelhwhkea ewaymiygsa rvtivdekgr  
 121 sfiddvgegd lwyfpglph siqaleegae flvfdgsf senstfqltd wlahtpkevi  
 181 aanfgvtkee isnlpgkeky ifenqlpgsl kddivgpng evpypftyrl leqepieseg  
 241 gkvyiadstn fkvsktiasa lvtvepgamr elhwhpnthe wqyyisgkar mtvfasdgha  
 301 rfnfyqagdv gyvpfamghy venigdeplv fleifkddhy advslnqlwa mlpetfvqah  
 361 ldlgkdfdiv lskehppvkv kcksk

<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/dbfetch?db=emblcds&id=CAA11727>

Número de Acceso de Secuencia Codificante AJ223978

SEQ ID 6

1 atgaaaaaac aaaatgacat tccgcagcca attagaggag acaaaggagc aacggtaaaa  
 61 atcccgcga atattgaaag agaccggcaa aaccctgata tgctcgtcc gcctgaaacc  
 121 gatcatggca ccgtcagcaa tatgaagttt tcattctctg atactcataa ccgattagaa  
 181 aaaggcggat atgcccggga agtgacagta cgtgaattgc cgatttcaga aaaccttgca  
 241 tccgtaaata tgcggctgaa gccaggcgcg atcgcgagc ttcactggca taaagaagct  
 301 gaatgggctt atatgattta cggaagtgca agagtcacaa ttgtagatga aaaagggcgc  
 361 agcittattg acgatgtagg tgaaggagac ctttggtact tcccgtcagg cctgccgcac  
 421 tccatccaag cgctggagga gggagctgag ttctgctcg tgittgacga tggatcattc  
 481 tctgaaaaca gcacgtcca gctgacagat tgctggccc aactccaaa agaagtcatt  
 541 gctgcgaact tcggcgtgac aaaagaagag attccaatt tcctggcaa agaaaaatat  
 601 atattgaaa accaacttcc tggcagtta aaagatgata ttgtggaagg gccgaatggc  
 661 gaagtgcctt atccatttac ttaccgctt ctgaacaag agccgatcga atctgagga  
 721 ggaaaagtat acattgcaga ttcgacaaac tcaaaagtgt ctaaaacat cgcacagcg  
 781 ctgtaacag tagaaccgg cgccatgaga gaactgact ggcacccgaa taccacgaa  
 841 tggcaatact acatctccgg taaagctaga atgaccgtt ttgcatctga cggccatgcc  
 901 agaacgttta attaccaagc cggatggtc ggatgtgac catttgcaat gggcattac  
 961 gttgaaaaca tcggggatga accgctgtc ttttagaaa tcttcaaaga cgaccattat  
 1021 gctgatgat cttaaacca atggcttgc atgctcctg aaacattgt tcaagcgac  
 1081 cttgacttgg gcaaagact tactgatgtg cttcaaaaag aaaagcacc agtagtgaaa  
 1141 aagaaatgca gtaaataa

y/o

iv) Oxalato-oxidasa v.g. que tiene la secuencia siguiente

<http://www.expasy.org/uniprot/O24004>

UniProtKB/TrEMBL número de Acceso de entrada O24004

SEQ ID 7

1 mgysknlgag iftmllapa imatdpdplq dfcvadldgk avsvnghtck pmseagddfl  
 61 fsskltkagn tstpngsavt eldvaewpqt ntlgvsmnrv dfapggtnpp hihprateig  
 121 mvmkgellvg ilgsfdsgnk lysrvvrage tfviprglmh fqfnvgktea ymvvsfnsqn  
 181 pgiwfvpltl fgsnppiptp vltkalrvea gvvellkskf aggs

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=Y14203&ptcmdl=GenBank>

GenBank número de Acceso Y14203

SEQ ID 8

1 agcttagcag caaccaccag tagtgctca aaggctcctg atcaacaac tctagctcat  
 61 cagtggtagc taagcttgc acatagcaag caatgggta ctctaaaaac ctaggggctg  
 121 gcctgttcac catgctgctc ctgctccgg ccatcatggc taccgaccct gaccctctac  
 181 aggacttctg cgtcgcggac ctgatggca aggcggtctc ggtgaacggg catacgtgta  
 241 agcccatgct ggaggccggc gacgacttc tcttctcgtc caagctgacc aaggccggca  
 301 acacgtccac cccgaacggc tggccgtga cggagctega cgtggccgag tggcccggta  
 361 cgaacacgct gggcgtgccc atgaaccgtg tggacttgc gccgggccc accaaccgac  
 421 cgcacatcca cccgctgca accgagatgc gcatggtgat gaaaggtgag ctctcgttg  
 481 gaatcctcgg cagctttgac tccggaaca agcttactc cagggtggtg cgtgccggag  
 541 agactttcgt catcccgcgc ggcctcatgc acttccagt caacgttgg aagacggaag  
 601 cctacatggt tgtgtcttc aacagccaga accctggcat cgtcttcgtg ccgctcacac  
 661 tcttcggtc caaccgccc atccccacac cgggtctcac caaggctctt cgggtggagg  
 721 ccggggctgt ggaactctc aagtccaagt tggccggtgg gtcttaact ccatgagccc  
 781 caaatgatca atatgaatat gtaattctat atatccatgt atgctgcgaa ttaatagta  
 841 ctcgacagga gatgatattc aagcttctgg ataagctgc atttcatagt aataagattg  
 901 aataagttat ctagcgggt cagcctcag aaccaatgag aggacttaa atgtattgct  
 961 tcttattatt

Secuencias de DNA que codifican enzimas degradantes del oxalato son conocidas por los expertos en la técnica y se describen en, v.g. WO 98/16632, que se incorpora por la presente su totalidad.

5 Adicionalmente, una composición de acuerdo con la presente invención puede comprender enzimas que comprenden modificaciones o mutaciones, que incluyen, pero sin carácter limitante, quimeras formadas utilizando dominios que comprenden el sitio activo degradante del oxalato de una enzima reductora del oxalato, o fragmentos peptídicos, particularmente aquéllos que comprenden o están constituidos por los sitios activos; modificaciones o mutaciones, que incluyen, pero sin carácter limitante, deleciones, inserciones, reemplazamientos, reversiones, mutaciones para actividad incrementada, sustitución de aminoácidos existentes naturalmente con aminoácidos no naturales, u otras modificaciones conocidas por los expertos en la técnica. Tales enzimas modificadas pueden tener más, menos, o la misma actividad que las enzimas nativas, o pueden tener características que son iguales o diferentes de las enzimas nativas o no modificadas. La presente invención contempla métodos y composiciones que comprenden 10 enzimas enteras, fragmentos, péptidos, regiones de fijación, sitios activos u otras regiones funcionales, segmentos, 15 secuencias y secuencias promotoras y de control de enzimas reductoras del oxalato.

En un ejemplo, se modificó una oxalato-descarboxilasa. En total, se crearon 7 genes de la secuencia original del gen yvrk (el yvrk de tipo salvaje). El gen original era de *Bacillus subtilis*, y la secuencia génica se optimizó para expresión 20 en *E. coli* utilizando un algoritmo de GenScript Corporation, Piscataway, NJ. El gen se optimizó con respecto a uso de codones, equilibrio del contenido GC, eliminación de elementos repetitivos, y aseguramiento de la ausencia de sitios internos de restricción para la clonación. El gen optimizado en codones dio como resultado una proteína con la secuencia de aminoácidos idéntica que el yvrk de tipo salvaje.

25 Se hicieron luego modificaciones para el codón simple cisteína tanto del gen yvrk de tipo salvaje como del gen yvrk optimizado, dando como resultado 6 secuencias singulares adicionales del gen. Los codones de cisteína se modificaron a codones de serina, arginina, o alanina. Las modificaciones se realizaron para los propósitos de eliminación de los enlaces disulfuro, y modificación de la estructura secundaria y terciaria de la enzima.

30 La secuencia génica del gen yvrk de tipo salvaje puede optimizarse para sistemas de expresión adicionales tales como *Pichia* o *Saccharomyces* utilizando los mismos métodos. Adicionalmente, la expresión en un sistema de expresión de *Bacillus* puede mejorarse por optimización del gen para uso óptimo de codones y contenido de GC, y eliminación de elementos repetitivos. La optimización de codones puede utilizarse también para modificación de la estructura secundaria de la proteína en posiciones distintas del codón de cisteína ya modificado, o adicionalmente a

la modificación de cisteína, por ejemplo, con un método para mejorar la pegilación, la fijación de microesferas o la encapsulación, como método para mejorar la estabilidad al pH para valores de pH bajos, o como método para mejorar la actividad de la proteína.

5 SEQ. ID 9

Secuencia original yvrk con el codón cisteína marcado en negrilla.

**AAAAAACAAAATGACATTCCGCAGCCAATTAGAGGAGACAAAGGAGCAACGGTAAAAATC**  
**CCGCGCAATATTGAAAGAGACCGGCAAAACCCTGATATGCTCGTTCCGCCTGAAACCGAT**  
**CATGGCACCGTCAGCAATATGAAGTTTTATTCTCTGATACTCATAACCGATTAGAAAAA**  
**GGCGGATATGCCCGGGAAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATTCAGAAAACTTGCATCC**  
**GTAATATGCGGCTGAAGCCAGGCGGATTTCGCGAGCTTCACTGGCATAAAGAAGCTGAA**  
**TGGGCTTATATGATTTACGGAAGTGCAAGAGTCACAATTGTAGATGAAAAAGGGCGCAGC**  
**TTTATTGACGATGTAGGTGAAGGAGACCTTTGGTACTTCCCGTCAGGCCTGCCGCACTCC**  
**ATCCAAGCGCTGGAGGAGGAGCTGAGTTCCTGCTCGTGTGTTGACGATGGATCATTCTCT**  
**GAAAACAGCACGTTCCAGCTGACAGATTGGCTGGCCACACTCCAAAAGAAGTCATTGCT**  
**GCGAACTTCGGCGTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCTGGCAAAGAAAAATATATA**  
**TTTGAAAACCAACTTCCTGGCAGTTTAAAAGATGATATTGTGGAAGGGCCGAATGGCGAA**  
**GTGCCTTATCCATTACTTACCGCCTTCTTGAACAAGAGCCGATCGAATCTGAGGGAGGA**  
**AAAGTATACATTGCAGATTCGACAAACTTCAAAGTGTCTAAAACCATCGCATCAGCGCTC**  
**GTAACAGTAGAACCCGGCGCCATGAGAGAAGTACTGGCAGCCGAATACCCACGAATGG**

10

15

CAATACTACATCTCCGGTAAAGCTAGAATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGCCAGA  
 ACGTTTAATTACCAAGCCGGTGATGTCGGATATGTACCATTTGCAATGGGTCATTACGTT  
 GAAAACATCGGGGATGAACCGCTTGCTTTTTAGAAATCTTCAAAGACGACCATTATGCT  
 GATGTATCTTTAAACCAATGGCTTGCCATGCTTCCTGAAACATTTGTTCAAGCGCACCTT  
 GACTTGGGCAAAGACTTTACTGATGTGCTTTCAAAGAAAAGCACCCAGTAGTAAAAAAG  
 AAATGCAGTAAA

Secuencia del gen Yvrk optimizada para E.coli, con sitios de restricción en los extremos 5' y 3' (subrayados), y el codón de cisteína marcado en negrilla.

#### SEQ ID 10

CATATGAAAAAACAGAAATGACATTCCACAGCCGATTTCGCGGCGATAAAGGCGCGACCGTC  
 AAAATTCCCTCGCAATATCGAACGCGACCGCCAGAATCCGGATATGCTGGTGCCGCCGGAG  
 ACGGACCATGGCACGGTGTCTAACATGAAATCTCTTTTAGCGATACCCACAACCGCCTG  
 GAAAAAGGTGGCTACGCGCGGAGGTTACCGTCCGTGAACTGCCAATTAGCGAAAATCTG  
 GCTTCGGTTAACATGCGTCTGAAACCAGGTGCTATCCGTGAGCTGCACTGGCACAAGGAA  
 GCGGAATGGGCGTATATGATTTACGGTTCAGCACGTGTTACCATCGTAGACGAGAAAGGT  
 CGTAGCTTTATCGATGATGTTGGCGAAGGTGATCTGTGGTATTTCCCATCTGGCCTGCCG  
 CATTTCGATTCAGGCGCTGGAAGAAGGCGCTGAATTTCTGCTGGTGTTCGATGATGGTTCC  
 TTTTCTGAAAACAGCACGTTCCAGCTGACGGATTGGCTGGCGCACACGCCGAAAGAAGTC  
 ATTGCGGCCAATTTTGGGGTAACCAAAGAAGAAATTTCCAACCTGCCGGGCAAAGAAAAG  
 TATATTTTTGAGAATCAGCTGCCGGGCTCTCTGAAGGACGATATTGTAGAAGGCCCTAAC  
 GGTGAGGTGCCGTATCCGTTACCTATCGTCTGCTGGAGCAGGAACCGATTGAAAGCGAA  
 GGCGGTAAAGTTTATATCGCAGATTCCACTAACTTTAAAGTCTCCAAGACCATTGCCAGC  
 GCCCTGGTCACCGTGGAACCGGGAGCGATGCGCGAGCTGCACTGGCATCCGAACACGCAC  
 GAATGGCAGTATTATATTTCCGGCAAAGCACGCATGACCGTTTTTGCCTCAGATGGACAC  
 GCTCGCACGTTTAATTATCAAGCGGGTGATGTTGGCTACGTTCTTTTCGCCATGGGCCAT  
 TATGTAGAAAATATCGGCGATGAACCACTGGTGTCTGGAGATCTTTAAAGATGACCAC  
 TATGCCGATGTTTCACTGAATCAGTGGCTGGCCATGCTGCCGAAACTTTTGTTCAGGCG  
 CATCTGGACCTGGGTAAAGACTTTACGGATGTGCTGAGCAAAGAAAACACCCGGTAGTC  
AAGAAGAAATGCAGTAAAGGATCC

La enzima degradante del oxalato está presente normalmente en una composición de la invención en una cantidad que es suficiente para degradar sustancialmente todo el oxalato normalmente presente en una comida estándar. Dependiendo de las elecciones alimentarias, una dieta occidental media puede contener 100 a 300 mg de oxalato/día. En general, aproximadamente 0,2 g de las partículas que comprenden la enzima (igual a 20 mg de OxDc en 1 ml de suspensión de partículas) pueden eliminar 180 mg de oxalato en condiciones gástricas simuladas en el transcurso de 30 min.

- 5
- 10 Una cantidad específica comprende una cantidad de unidades de actividad de la actividad de la enzima reductora del oxalato que reducirá una porción del oxalato presente, o un nivel de unidades de actividad de la actividad de la enzima reductora del oxalato que iniciará una reducción en la cantidad de oxalato o mantendrá una cantidad reducida de oxalato en el individuo, comparada con la cantidad de oxalato presente antes de la administración de la composición. El número de unidades de actividad de la actividad de la enzima reductora del oxalato que pueden utilizarse en una composición de dosis simple puede variar desde aproximadamente 0,0001 unidad a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 5 unidades a 100 unidades, desde 0,05 a 50 unidades, a 0,5 hasta 500, desde aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 50 unidades, desde aproximadamente 0,01 unida-

des a aproximadamente 5 unidades, desde aproximadamente 1 unidad a aproximadamente 100 unidades, desde aproximadamente 25 unidades a aproximadamente 50 unidades, desde aproximadamente 30 unidades a aproximadamente 100 unidades, desde aproximadamente 40 unidades a aproximadamente 120 unidades, desde aproximadamente 60 unidades a aproximadamente 15, desde aproximadamente 50 unidades a aproximadamente 100 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 500 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 300 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 400 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 1000 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 2500 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 0,001 unidad a aproximadamente 2000 unidades y todos los intervalos comprendidos entre ellos. 1 unidad de la enzima es la cantidad de enzima que degradará 1 micromol de oxalato por minuto a 37°C.

Una composición de la presente invención comprende una partícula que contiene una enzima degradante del oxalato incrustada en un primer material polímero. En los ejemplos no limitantes de esta memoria se describen métodos concernientes al modo de incrustación de la enzima en el primer material polímero. Una persona experta en la técnica puede encontrar otros métodos adecuados para uso a fin de preparar una composición de acuerdo con la presente invención. Por incorporación de la enzima en el primer material polímero, la enzima obtiene una cierta protección contra condiciones similares al fluido gástrico con respecto a pH y pepsina. La composición de enzima incrustada resultante se encuentra en forma de partículas, es decir unidades discretas de tamaño micrométrico o nanométrico. De acuerdo con ello, los términos "partículas", "micropartículas" y "nanopartículas" se utilizan en esta memoria para describir composiciones que contienen una o más clases de una enzima reductora del oxalato incrustada en un primer polímero o en un primer y un segundo polímeros. En general, el término "partículas" se utiliza como el término más amplio, es decir sin atribución específica alguna de tamaño o forma, mientras que el término "micropartículas" se utiliza cuando las partículas obtenidas tienen tamaños medios de partícula comprendidos en el intervalo de 1 µm a 1000 µm. Análogamente, el término "nanopartículas" se utiliza en esta memoria cuando las partículas obtenidas tienen tamaños medios de partícula comprendidos entre 1 nm y 1000 nm. Como se utiliza en esta memoria, el singular del término "una enzima" hace referencia a copias múltiples de la molécula enzimática, como se entiende comúnmente con referencia a las moléculas de proteínas. Como se utiliza en esta memoria, el término "una o más enzimas" significa que puede estar presente un solo tipo de enzima, tal como se entiende la formil-CoA-transferasa, o que están presentes en la composición más de un tipo de enzima, tal como una composición que comprende, por ejemplo, oxalil-CoA-d Descarboxilasa y formil-CoA-transferasa; oxalato-d Descarboxilasa y oxalato-oxidasa, o una combinación de enzima de tipo salvaje y enzima mutante.

Normalmente, las partículas de una composición de la invención tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 50 nm a aproximadamente 1 mm, tal como, v.g., desde aproximadamente 500 nm a aproximadamente 500 µm, desde aproximadamente 1 µm a aproximadamente 500 µm, desde aproximadamente 2 µm a aproximadamente 100 µm, desde aproximadamente 4 µm a aproximadamente 80 µm, desde aproximadamente 6 µm a aproximadamente 60 µm, desde aproximadamente 8 µm a aproximadamente 40 µm, desde aproximadamente 10 µm a aproximadamente 20 µm.

Debe entenderse que el término "incrustado" tal como se utiliza en esta memoria, denota que la enzima se mezcla o se pone en contacto con el primer material polímero de tal manera que

- i) el primer material polímero envuelve sustancialmente la enzima, es decir la partícula puede considerarse como un núcleo que contiene enzima rodeado por el primer material polímero; el núcleo puede contener otras sustancias distintas de las enzimas tales como, v.g., una parte del material polímero asimismo, o
- ii) las enzimas se incorporan en el primer material polímero de tal manera que la mayor parte de la superficie de las partículas está compuesta por el primer material polímero, pero una parte menor de la enzima puede aparecer también en la superficie de las partículas. En general, se contempla que al menos 50% de la superficie externa de las partículas está compuesto por el primer material polímero y como máximo aproximadamente 20% en peso de la enzima presente en las partículas puede estar presente en la superficie externa de las partículas, y/o
- iii) la enzima está distribuida de modo sustancialmente homogéneo en el primer material polímero.

Así, en una composición de la invención, la enzima degradante del oxalato está protegida contra el ambiente (gástrico). Adicionalmente, la composición de la invención no libera sustancialmente la enzima al ambiente (gástrico). Dicho de otro modo, la enzima se mantiene en la composición después de administración oral durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el oxalato en el estómago se degrade. En una composición, un primer material polímero puede funcionar como un vehículo protector para la enzima y al mismo tiempo puede permitir que el sustrato, es decir el oxalato, se difunda o sea transportado de otro modo a la composición a fin de hacer posible una degradación del oxalato in situ. Una característica de una composición de la presente invención es la capacidad de la composición para retener la actividad enzimática durante un periodo de tiempo más largo que el observado para una enzima que no está incrustada en una matriz polímera, especialmente en condiciones ácidas. De acuerdo con ello, un aspecto de la presente invención comprende una composición que contiene partículas que contienen una o más enzimas degradantes del oxalato incrustadas en un primer material polímero, en donde la enzima incrustada retiene

al menos dos veces la actividad de las una o más enzimas no incrustadas libres, obtenidas del mismo lote, después de incubación en jugo gástrico simulado USP que contiene 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH de aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, tal como, v.g., desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5 tal como pH aproximadamente 3 a 37°C durante al menos 60 minutos. Es importante que las condiciones de test para la composición de acuerdo con la invención y las enzimas libres sean las mismas, por ejemplo, con respecto a la naturaleza y pureza de la enzima, la concentración inicial de la enzima, el volumen de test, la composición del medio de incubación (v.g. jugo o fluido gástrico simulado), la temperatura, etc.

Normalmente, la enzima incrustada retiene al menos tres veces la actividad, al menos 4 veces la actividad, o al menos cinco veces la actividad de las una o más enzimas no incrustadas libres obtenidas del mismo lote después de incubación en jugo gástrico simulado USP que contiene 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 60 minutos, al menos 75 minutos, al menos 90 minutos, al menos 105 minutos, o al menos 120 minutos.

En una realización específica, las una o más enzimas degradantes del oxalato incrustadas en una composición de la invención retienen al menos dos veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces, la actividad de la una o más enzimas no incrustadas libres, obtenidas del mismo lote, después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos.

El jugo gástrico simulado (fluido gástrico) a que se hace referencia arriba se describe en USP (United States Pharmacopoeia) y contiene pepsina y tiene una ratio específica de HCl concentrado. (El jugo gástrico simulado USP contiene 2 g de NaCl, 3,2 g de pepsina y 7 ml de HCl concentrado en un volumen de 1 litro. El pH de esta solución está comprendido usualmente entre 1,2 y 1,5, dependiendo de la concentración del HCl utilizado. En algunos ejemplos de esta memoria, el pH se ajustó a un valor superior a 2. Este puede ser el caso cuando se emplean micropartículas sin recubrimiento alguno. Para el presente propósito, el pH debe estar comprendido en el campo ácido, es decir como máximo aproximadamente 7, como máximo 6 y el intervalo de pH debería ser por regla general desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5, desde aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En la sección experimental de esta memoria se dan más detalles con relación al test arriba mencionado y a la determinación de la actividad enzimática.

El tiempo de residencia en el estómago de un humano es como promedio aproximadamente 120 min. Se contempla que la actividad enzimática de las composiciones de la presente invención se retiene en un nivel suficiente, un nivel eficaz, durante 120 min o más. Por los ejemplos de esta memoria se ve que es posible retener al menos 50% de la actividad enzimática para una composición de acuerdo con la invención después de 120 min de exposición a un ambiente ácido. Si la enzima que se utiliza no está incrustada en un polímero, v.g., una enzima no incrustada, la disminución de actividad es muy rápida, y no queda actividad alguna después de 60 min en ambiente ácido.

Normalmente, la actividad de una o más enzimas degradantes del oxalato en una composición de acuerdo con la invención disminuye como máximo a aproximadamente 30%, disminuye como máximo a 40% tal como una disminución de como máximo a aproximadamente 50%, disminuyendo como máximo a aproximadamente 60% o disminuyendo como máximo a aproximadamente 70%, cuando se incuba en una solución tampón acuosa que tiene un pH comprendido en el intervalo que va desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5, en un intervalo desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,5, desde aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5, desde aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0 o desde aproximadamente 2,2 a aproximadamente 4,0, durante aproximadamente 60 minutos, durante aproximadamente 90 minutos, durante aproximadamente 105 o durante aproximadamente 120 minutos, ajustándose la actividad inicial a 100%.

En una realización específica, la actividad de la enzima degradante del oxalato en una composición de la presente invención disminuye como máximo a 80%, ajustándose la actividad inicial a 100%, cuando se testa a un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0 durante un periodo de tiempo de 60 minutos.

En una realización específica adicional, la actividad de una o más enzimas degradantes del oxalato en una composición de la presente invención disminuye como máximo a aproximadamente 20% cuando se incuba en una solución tampón acuosa que tiene un pH comprendido en el intervalo que va desde aproximadamente 2 a aproximadamente 4,5 durante 2 horas, y ajustándose la actividad inicial a 100%. Particularmente, la actividad disminuye como máximo a 30%, ajustándose la actividad inicial a 100%.

Sustancias tampón adecuadas para proporcionar una solución tampón que tenga un pH específico son conocidas por las personas expertas en la técnica. Ejemplos son tampones de glicina (pH 2-3), tampones de acetato, tampones

nes de fosfato, tampones de borato y análogos. La solución tampón puede contener ingredientes adicionales tales como v.g. sal inorgánica a fin de ajustar la fuerza iónica de la solución tampón, o una o más proteasas como v.g. pepsina a fin de asegurar que las condiciones en las soluciones tampón se desafían si la enzima incrustada puede resistir condiciones tan severas. En el supuesto de que se incluyan una o más proteasas, la concentración de las mismas se encuentra normalmente al mismo nivel que la utilizada en el jugo gástrico simulado USP.

Como se menciona anteriormente en esta memoria, las enzimas degradantes del oxalato pueden ser de diversos tipos, clases, identidad y naturaleza. En un aspecto preferido, una composición de la presente invención comprende una o más enzimas degradantes del oxalato con inclusión de oxalato-descarboxilasa, oxalato-oxidasa, o una combinación de oxalil-CoA-descarboxilasa y formil-CoA-transferasa, o combinaciones de las mismas.

Materiales polímeros adecuados para uso como primer material polímero en una composición de la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, polímeros artificiales o naturales, con inclusión, pero sin carácter limitante de:

i) un polisacárido: alginato con inclusión de ácido algínico, alginato, v.g. alginato de sodio, alginato de potasio, alginato de amonio, alginato de calcio, alginato de propano-1.2-diol, goma arábiga, carragenano, quitosano y sus derivados, sulfato de condroitina, derivados de dextrano, heparina, ácido hialurónico, inulina, una celulosa o un derivado de celulosa con inclusión de metilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilmetilcelulosa, o análogas o combinaciones de las mismas; ii) un mucopolisacárido, iii) una goma con inclusión de goma de algarrobillas, goma guar, tragacanto, agar, goma arábiga, goma de xantano, goma karaya, goma tara, goma de gelano, o análogas o combinaciones de las mismas; iv) un agente gelificante o agente de hinchamiento con inclusión de hidrocoloideos y agentes hidrogelificantes tales como agar, carragenano, gelatina, polivinilpirrolidona, o análogos, o combinaciones de los mismos; v) otros como v.g. proteína y poliamida: colágeno, albúmina, protamina, espermina, polímeros sintéticos, poli(ácido acrílico), poliaminoácidos (polilisina, etc), ácido polifosfórico, tripolifosfato, poli(ácido L-láctico), poli(alcohol vinílico), poli(ácido DL-láctico-co-ácido glicólico), o mixturas y combinaciones de los mismos.

En realizaciones específicas, el primer material polímero es quitosano, alginato, pectina o ácido hialurónico. En realizaciones más específicas, el primer material polímero es quitosano o alginato.

Otros materiales polímeros pueden ser biopolímeros o polímeros sintéticos. Ejemplos de biopolímeros incluyen, pero sin carácter limitante, proteínas, polisacáridos, mucopolisacáridos, heparina, sulfato de heparina, heparinoides, sulfato de dermatano, polisulfato de pentosano, sulfato de condroitina, celulosa, agarosa, quitina, carragenina, ácido linoleico y alantoína, colágeno reticulado, fibronectina, laminina, elastina, elastina reticulada, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, alginato de quitosano, dextrano, metilcelulosa, polilisina, y caucho natural. En las composiciones de la presente invención en las que se forman matrices polímeras, estas matrices son porosas de tal modo que moléculas hidrosolubles pequeñas pueden entrar en y salir de la matriz polímera, incluyendo, pero sin carácter limitante, moléculas tales como oxalato, ácido fórmico, formiato, dióxido de carbono, oxígeno, u oxalil-CoA. Una concentración del primer material polímero en una composición de la invención está comprendida normalmente entre 20% y 70% de los materiales secos totales.

Además de las una o más enzimas y el primer material polímero, las partículas pueden contener también uno o más aditivos tales como, v.g. agentes de ajuste del pH, agentes tampón, agentes solubilizantes, estabilizadores, conservantes, cofactores para las enzimas o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables tales como, v.g. cargas, diluyentes, vehículos o análogos.

Además, puede ser ventajoso crear un entorno de pH ácido localizado alrededor de una proteína cuando las condiciones fisiológicas dan como resultado un pH muy superior al intervalo de trabajo razonable de la enzima. Por ejemplo, en una situación de pH más alto, una proteína degradante del oxalato con actividad máxima a pH 3, se beneficiaría de un vehículo de suministro capaz de reducir el pH local en las proximidades situadas alrededor de la enzima a aproximadamente 3.

Un método para reducir el pH local consiste en incorporar un polímero que puede sufrir degradación hidrolítica en condiciones fisiológicas a fin de producir productos ácidos que reduzcan el pH local. Por ejemplo, alfa-poliésteres tales como PLA, PGA, y PLGA se biodegradan hidrolíticamente in vivo para formar ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido glicólico) que pueden hacer bajar el pH local hasta dejarlo en un intervalo funcionalmente deseable para la enzima. La poli(dl-lactida) (DLPLA) es un polímero amorfo que exhibe una distribución aleatoria de ambas formas isómeras del ácido láctico que pueden degradarse rápidamente.

Adicionalmente, puede ser deseable incluir un tampón en el vehículo de suministro en forma de una base, material que contenga base o material que genere base que opera en conjunción con el pH in vivo, o el pH local, o una combinación de ambos para optimizar/controlar el pH local alrededor de la enzima. Estos tampones pueden incluir sales de compuestos orgánicos o inorgánicos o cierto número de otros tampones. Debe entenderse que el valor pKa de los ácidos conjugados a los cuales se asocian o de los cuales se derivan los materiales tampón puede utilizarse en la selección apropiada de los materiales tampón.

Las partículas pueden someterse a un procedimiento de reticulación. Dicho procedimiento de reticulación puede reforzar las propiedades de las partículas a fin de evitar la pérdida de actividad enzimática por el impacto negativo del pH o la pepsina de los alrededores durante el almacenamiento o después de administración oral, o reducir el desprendimiento de la enzima de las partículas, o reducir o prevenir la migración de la enzima hacia la superficie de las partículas. Los procedimientos de reticulación y material adecuado para uso en dicho procedimiento se describen en esta memoria.

Las partículas de la invención pueden estar construidas de polímeros que están reticulados por reticulación física o química. La reticulación física puede comprender polímeros con carga opuesta reticulados unos con otros por enlaces salinos (por ejemplo: el quitosano, que está cargado positivamente, se reticula con tripolifosfato o heparina, que son polímeros cargados negativamente), los polímeros cargados se reticulan con iones de carga opuesta (por ejemplo: alginato con  $\text{Ca}^{2+}$ , carboximetil-celulosa con  $\text{Al}^{3+}$ ). El término "reticulación física" utilizado en el presente contexto incluye también enlaces y/o interacciones no covalentes.

La reticulación química comprende generalmente reticulación por reticuladores con dos grupos funcionales reactivos tales como polímeros que llevan grupos amina tales como proteínas, poliamida, quitosano y sus derivados, que pueden ser reticulados por aldehído glutárico o genipina. Puede utilizarse irradiación UV para inducir polímeros que llevan grupos fotosensibles a fin de formar reticulaciones covalentes.

Métodos para preparación de nano- y micro-partículas son conocidos en la técnica e incluyen emulsión, coacervación/precipitación, técnicas de secado por pulverización y otros. Las propiedades de las nanopartículas o micropartículas (por ejemplo: capacidad de tampón micro-ambiental, resistencia mecánica, tamaño de partícula, tasa de difusión del oxalato, interacciones con enzimas) dependen en gran parte del polímero o polímeros seleccionados, la composición y ratio de los polímeros, el método de reticulación y el procedimiento de preparación. Puede utilizarse más de un tipo de reticulación en las micropartículas de la invención (v.g. reticulación química y reticulación física, véanse los ejemplos de esta memoria).

En una realización específica, el primer material polímero se reticula consigo mismo y/o con las una o más enzimas incrustadas en el primer material polímero.

En una composición de la invención, tal como una composición en la cual el primer material polímero está reticulado consigo mismo y/o con las enzimas incrustadas en él, el nivel de actividad enzimática retenida después de incubación en 84 nM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a  $\text{pH} > 1$ , v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5 para pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 30 minutos, durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos, o durante al menos 240 minutos, se incrementa por un factor de al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 50 o al menos 100 en comparación con composiciones de enzimas del mismo lote incrustadas en el polímero pero sin que el polímero se reticule o las enzimas y el polímero se reticulen; o en comparación con el mismo lote de enzimas libres.

Las partículas, opcionalmente las partículas en las cuales al menos una parte del primer material polímero está reticulada, pueden estar provistas también de un recubrimiento. Dicho recubrimiento tiene generalmente la misma función que el primer polímero, es decir evitar una disminución sustancial en la actividad enzimática de la enzima incrustada en el primer polímero durante el almacenamiento y/o después de administración oral.

De acuerdo con ello, en una realización específica, las partículas se recubren con un segundo material polímero. Materiales de recubrimiento adecuados son materiales de esta clase que permiten que una composición acuosa que contiene oxalato se difunda en, o entre de cualquier otro modo en la partícula de la invención. Como se ha mencionado arriba, el sustrato (es decir el medio que contiene oxalato) entra en la composición de la partícula de la invención de tal manera que puede producirse reparación enzimática del oxalato. De acuerdo con ello, pueden aplicarse materiales de recubrimiento que dan como resultado recubrimiento de difusión o recubrimientos permeables de cualquier otro modo (v.g. recubrimientos que contengan sustancias formadoras de poros que son sustancialmente solubles en agua).

Ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, los materiales contemplados como primeros materiales polímeros. Puede seleccionarse un material de recubrimiento que sea diferente del utilizado como primer material polímero, pero el primer material polímero y el material de recubrimiento pueden ser también el mismo. Ejemplos específicos de materiales de recubrimiento son agentes formadores de película tales como, v.g. polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polidextrosa, maltodextrina, u otros polisacáridos con la inclusión de quitosano, alginatos y ácido hialurónico. En realizacio-

nes específicas, el material de recubrimiento, si está presente, es uno que puede someterse a reticulación tal como, v.g., quitosano y alginato.

5 En una realización específica, el primer y/o segundo material polímero es un polisacárido tal como quitosano, alginato, pectina o ácido hialurónico. El primer y el segundo materiales polímeros pueden ser iguales o diferentes.

Normalmente, el porcentaje de polímero del primer y, en caso de estar presente, el segundo material polímero es de aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, desde aproximadamente 60% a aproximadamente 80% del material seco total de una partícula.

10 Si está presente, el material de recubrimiento se aplica normalmente en tal cantidad que el aumento de peso de las partículas es como máximo aproximadamente 40%. Como se ve por los ejemplos de esta memoria, la concentración del material de recubrimiento en una composición de partículas es normalmente como máximo 25% p/p tal como máximo aproximadamente 20% p/p, como máximo aproximadamente 15% p/p o como máximo aproximadamente 10%. Una partícula que tiene un recubrimiento se designa en esta memoria como una composición recubierta.

15 En una composición de la invención, tal como en una composición recubierta de la invención, el nivel de actividad enzimática retenida después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos, o durante al menos 240 minutos se incrementa por un factor de al menos 2, al menos 10, al menos 50 o al menos 100 en comparación con composiciones del mismo lote de enzimas incrustadas en partículas que carecen de un recubrimiento, o en comparación con el mismo lote de enzimas libres.

20 Como se ha mencionado arriba y como se muestra en los ejemplos de esta memoria, la estabilidad de la actividad enzimática de la enzima degradante del oxalato en una composición de la invención puede mejorarse ulteriormente por empleo de partículas recubiertas en las cuales el recubrimiento se ha sometido a reticulación. La reticulación de un material polímero es bien conocida en la técnica y puede realizarse por reticulación física o por el uso de un agente de reticulación químico.

25 Agentes de reticulación químicos adecuados para uso en este contexto incluyen, pero sin carácter limitante, dialdehído, 1-etil-3[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), suberato de disuccinimidilo (DSS) o (N-[p-maleimidofenil]-isocianato (PMP)). En una realización específica, el agente de reticulación es un dialdehído, particularmente aldehído glutárico o glicoxal. En una realización, el agente de reticulación es aldehído glutárico. La reticulación se lleva a cabo normalmente en aldehído glutárico al 1-5% en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,5 a 37°C, y sacudiendo durante 1-2 horas.

30 Como se ha mencionado arriba, una característica de una composición de la invención es que el primero y, si está presente, el segundo material polímero es permeable para moléculas pequeñas a fin de permitir que los sustratos para y los productos de la reacción catalizados por las una o más enzimas se difundan a través de dichos materiales polímeros. Además, el primer y/o segundo materiales polímeros se mantienen sustancialmente intactos después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos o durante al menos 240 minutos.

35 En otra realización, el primer y/o el segundo materiales polímeros se reticulan consigo mismos y/o uno con otro y/o con las una o más enzimas.

40 En una composición de la invención, tal como en una composición de recubrimiento de la invención recubierta o recubierta y reticulada, el nivel de actividad enzimática retenido después de la incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos, o durante al menos 240 minutos, se incrementa por un factor de al menos 2, al menos 10, al menos 50 o al menos 100 en comparación con composiciones de enzimas del mismo lote incrustadas en partículas pero en las cuales las partículas carecen de una segunda capa de material polímero (un recubrimiento), o una segunda capa que está reticulada, o en comparación con el mismo lote de enzimas libres.

Como se ve en los ejemplos de esta memoria, una composición de la invención en la cual los enlaces entre el agente de reticulación químico y las una o más enzimas y/o el primer material polímero y/o el segundo material polímero han sido reducidos con un agente reductor, puede conducir a mejoras adicionales con respecto a la retención de la actividad enzimática de la composición. Un agente reductor de esta clase puede ser uno bien conocido en la técnica tal como v.g., un agente reductor tal como NaBH<sub>4</sub> o NaCNBH<sub>3</sub>.

En una composición de la invención, particularmente en una composición de la invención recubierta, con recubrimiento reticulado, y con reticulaciones reducidas, en la cual el primer y/o el segundo material polímero pueden estar reticulados, y dicho material reticulado puede estar reducido o no, el nivel de actividad enzimática retenido después de incubación en 84 mM de HCl y 0,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH de aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos, o durante al menos 240 minutos se incrementa por un factor de al menos 2, al menos 10, al menos 50 o al menos 100 en comparación con composiciones del mismo lote de enzimas en una partícula que no ha sido sometida a un agente reductor; o comparado con el mismo lote de enzimas libres.

En una realización específica de la invención, las una o más enzimas incrustadas retienen al menos 2 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces, la actividad de las una o más enzimas no incrustadas libres obtenidas del mismo lote de enzimas después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos, o durante al menos 240 minutos.

En otra realización específica de la invención, las una o más enzimas incrustadas retienen al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% de la actividad inicial de las enzimas incrustadas después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos, o durante al menos 240 minutos.

En una realización específica adicional de la invención, las una o más enzimas retienen desde aproximadamente 95% a aproximadamente 100% de la actividad inicial de las enzimas incrustadas<sup>1</sup> después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1, v.g. en un intervalo de pH aproximadamente 1 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2 a pH aproximadamente 5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 4,5, desde pH aproximadamente 2,5 a pH aproximadamente 3,5, tal como pH aproximadamente 3, a 37°C durante al menos 60 minutos, durante al menos 80 minutos, durante al menos 100 minutos, durante al menos 120 minutos, durante al menos 140 minutos, durante al menos 160 minutos, durante al menos 180 minutos, durante al menos 200 minutos, durante al menos 220 minutos, o durante al menos 240 minutos.

La enzima incrustada en una partícula de la invención es capaz de reducir el contenido de oxalato de la comida. Como se demuestra en los ejemplos de esta memoria, una composición de la invención que comprende 20 mg de una o más enzimas degradantes del oxalato degrada al menos 40%, tal como, v.g. al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 95%, o al menos 99% del oxalato presente en 200 g de espinacas en el transcurso de una hora a pH 2,5.

Las composiciones de la invención pueden prepararse utilizando diversos materiales polímeros. En los ejemplos de esta memoria se utiliza la notación siguiente:

Nanopartículas OxDc XX, tales como nanopartículas de quitosano, denotan nanopartículas en las cuales se emplea quitosano como el primer material polímero en el cual se incrusta OxDc.

<sup>1</sup> ¿Qué se pretende aquí? - ¿una comparación entre la actividad de las enzimas (¿aunque éstas se encuentren en forma de partícula?) y la actividad de la enzima libre? Una comparación de la estabilidad entre la enzima incrustada y la enzima libre.

Micropartículas OxDc XX recubiertas de YY, tales como nanopartículas OxDc-quitosano recubiertas de alginato, denotan nanopartículas en las cuales se emplea quitosano como el primer material polímero en el cual se incrusta OxDc y las nanopartículas se recubren de alginato.

5 Micropartículas OxDc XX recubiertas de YY reticuladas con ZZ, tales como micropartículas OxDc-quitosano recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico, denotan micropartículas en las cuales se emplea quitosano como el primer material polímero en el cual se incrusta OxDc, y las nanopartículas se recubren de alginato para formar micropartículas, y las micropartículas se reticulan subsiguientemente con aldehído glutárico.

10 Micropartículas OxDc XX recubiertas de YY reticuladas con ZZ y reducidas, tales como micropartículas OxDc-quitosano recubiertas de alginato, reticuladas con aldehído glutárico reducidas, denotan micropartículas en las cuales se emplea quitosano como el primer material polímero en el cual se incrusta OxDc y las nanopartículas que se forman se recubren de alginato, formándose micropartículas, y las micropartículas se reticulan subsiguientemente con aldehído glutárico y se someten a reducción.

15 De acuerdo con ello,

las nanopartículas OxDc-quitosano/TPP son nanopartículas constituidas por quitosano que contienen TPP y tienen OxDc incrustada en ellas.

20 Micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato son micropartículas basadas en las nanopartículas formadas a partir de quitosano y TPP y OxDc incrustada, estando recubiertas las nanopartículas con alginato para formar micropartículas.

25 Micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico corresponden a las micropartículas arriba mencionadas, pero las micropartículas se han sometido a tratamiento con aldehído glutárico para establecer la reticulación.

30 Micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico reducidas corresponde a las micropartículas arriba mencionadas que se someten ulteriormente a un proceso de reducción.

35 Una composición de la invención es adecuada para uso destinado a administración oral a un individuo. Se proporciona una composición como formulación farmacéutica oral, que puede suministrarse a la cavidad oral, la boca, un parche bucal, al estómago, fijarse a la mucosa estomacal, en un líquido de liberación lenta, en una tableta de liberación rápida en la boca o el estómago, recubrimiento del esófago, en una forma líquida o sólida que acompaña a la comida, antes de ingerir la comida, o inmediatamente después de ingerir la comida.

40 La composición administrada se encuentra normalmente en forma sólida, v.g. en la forma de partículas o en una forma de dosificación sólida, v.g. en forma de bolsitas, cápsulas o tabletas (v.g. las partículas se procesan ulteriormente en una forma de dosificación adecuada por métodos bien conocidos por las personas expertas en la técnica). A este fin, pueden añadirse excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tales como, v.g., cargas, aglomerantes, desintegrantes, colorantes, saborizantes, agentes de ajuste del pH, estabilizadores, etc. Además, puede añadirse una o más sustancias adicionales terapéuticamente y/o profilácticamente y/u otras enzimas, cofactores, sustratos, coenzimas, minerales y otros agentes que son útiles en la reducción del oxalato.

45 Ejemplos de excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen: dextrinas, maltodextrinas, dextrosa, fructosa, glucosa, lactosa, derivados de celulosa con inclusión de carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), celulosa microcristalina (v.g., diversos grados de Avicel®), almidones o almidones modificados (v.g. almidón de patata, almidón de maíz, almidón de arroz, almidón pregelatinizado), acetato de polivinilo, polivinilpirrolidona, agar, alginato de sodio, croscarmelosa sódica, hidrogenofosfato de calcio, fosfato de calcio (v.g., fosfato de calcio básico, hidrogenofosfato de calcio), sulfato de calcio, carboxialquilcelulosa, dextratos, fosfato de calcio dibásico, gelatina, goma arábiga, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, polietilenglicol, óxido de polietileno, y como lubricantes: talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, aceites vegetales hidrogenados y análogos.

55 Los métodos de la presente invención comprenden tratar o prevenir condiciones relacionadas con oxalato en humanos y animales por la administración de una cantidad eficaz de composiciones reductoras del oxalato que comprenden uno o más microorganismos reductores del oxalato, una o más enzimas reductoras del oxalato o combinación y mixturas de las mismas en las composiciones particuladas expuestas en esta memoria. Los métodos comprenden proporcionar composiciones que comprenden las partículas incrustadas con enzima expuestas en esta memoria a un individuo, humano o animal, y reducir el oxalato presente en el individuo, tratar o prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato, y/o reducir una porción del oxalato ingerido. Los métodos para reducción del oxalato en un humano o animal comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una o más enzimas reductoras del oxalato o fragmentos que tienen actividad reductora del oxalato en las composiciones particuladas de enzima incrustada de la presente invención a un individuo, humano o animal, y reducir el oxalato presente.

65

La reducción puede tener lugar en cualquier ambiente de tejido o fluido corporal del individuo. Los fluidos corporales incluyen secreciones del cuerpo tales como secreciones nasales o gástricas, saliva, sangre, suero, orina, quimo o materia digestiva, fluido tisular, y otros materiales fluidos o semisólidos producidos por humanos o animales. Por ejemplo, las composiciones particuladas de enzima incrustada pueden administrarse por vía oral a un humano o animal y la actividad enzimática reductora del oxalato reduce el oxalato presente en el estómago del humano o animal. Las composiciones particuladas de enzima incrustada de la presente invención pueden mezclarse en líquidos, comida u otros materiales dietéticos y proporcionarse a un humano o animal de tal modo que la actividad de la enzima reductora del oxalato de las partículas sea eficaz en el ambiente del estómago. Las composiciones particuladas de enzima incrustada de la presente invención pueden mezclarse también con alimentos u otros materiales en los cuales se encuentra oxalato y la actividad de la enzima reductora del oxalato de las partículas reduce el oxalato presente en el alimento u otros materiales.

Los métodos para el tratamiento y prevención de las condiciones relacionadas con oxalato comprenden administrar una composición que comprende partículas que contienen una cantidad eficaz de enzimas reductoras del oxalato. Una cantidad eficaz comprende una cantidad de unidades de actividad de la actividad de enzima reductora del oxalato que reducirá una porción del oxalato presente, o un nivel de unidades de actividad de la actividad enzimática reductora del oxalato que iniciará una reducción en la cantidad de oxalato o mantendrá una cantidad disminuida de oxalato en el individuo comparada con la cantidad de oxalato presente antes de la administración de la composición. El número de unidades de actividad de la actividad enzimática reductora del oxalato que puede utilizarse en una composición de dosis simple puede variar desde aproximadamente 0,0001 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 5 unidades a 100 unidades, desde 0,05 a 50 unidades, hasta 0,5 a 500, desde aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 50 unidades, desde aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 5 unidades, desde aproximadamente 1 unidad a aproximadamente 100 unidades, desde aproximadamente 25 unidades a aproximadamente 50 unidades, desde aproximadamente 30 unidades a aproximadamente 100 unidades, desde aproximadamente 40 unidades a aproximadamente 120 unidades, desde aproximadamente 60 unidades a aproximadamente 15, desde aproximadamente 50 unidades a aproximadamente 100 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 500 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 300 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 400 unidades, desde aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 1000 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 2500 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 0,001 unidad a aproximadamente 2000 unidades y todos los intervalos abarcados entre ellos. Las composiciones pueden incluir adicionalmente otras enzimas, cofactores, sustratos, coenzimas, minerales y otros agentes que son útiles en la reducción del oxalato. 1 unidad de la enzima es la cantidad de enzima que degradará un micromol de oxalato por minuto a 37°C.

En un medio de tratamiento, una cantidad eficaz de una composición particulada como se expone en esta memoria se administra por vía oral para ser ingerida por un individuo al menos una vez al día, al menos dos veces al día, al menos tres veces al día, al menos cuatro veces al día, o más en caso necesario, y dicha administración puede realizarse durante un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, o una semana, dos semanas, tres semanas, o un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, más de seis meses, un año, dos años, o durante años, o continuamente a lo largo de la vida del paciente. Dicho tratamiento puede continuarse para mantener los niveles de oxalato deseados en un individuo.

Debe indicarse que, como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" o "la" incluyen los referentes plurales a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

Todas las patentes, solicitudes de patente y referencias incluidas en esta memoria se incorporan específicamente por referencia en sus totalidades.

Debe entenderse, por supuesto, que lo que antecede se refiere únicamente a realizaciones ilustrativas de la presente invención y que pueden hacerse numerosas modificaciones o alteraciones en ella sin apartarse del espíritu y alcance de la invención como se expone en esta descripción.

Aunque en esta memoria se proporcionan las realizaciones ilustrativas de la presente invención, la presente invención no se limita a estas realizaciones. Existen numerosas modificaciones o alteraciones que puede idear por sí mismo un experto en la técnica.

La presente invención se ilustra adicionalmente por vía de los ejemplos contenidos en esta memoria, que se proporcionan para claridad de comprensión. Las realizaciones ilustrativas no deben interpretarse en modo alguno como imposición de limitaciones en cuanto al alcance de la invención. Por el contrario, debe entenderse claramente que se puede recurrir a diversas otras realizaciones, modificaciones, y equivalentes de las mismas que, después de la lectura de la presente descripción, puede idear por sí mismo un experto en la técnica sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**EJEMPLOS**

## Métodos

## 5 Ensayo de actividad enzimática

Las muestras se diluyen adecuadamente con tampón Tris (típicamente 5 ó 10 veces) hasta 0,5-1 mg/ml, del cual se distribuyen partes alícuotas de 10 µl en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se añaden a cada tubo 390 µl de tampón sustrato templado (usualmente oxalato 20 mM en tampón de citrato 20 mM, pH 4) y se pone inmediatamente en un termomezclador durante exactamente 10 minutos, pasado cuyo tiempo se añaden 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. El formiato total producido se mide directamente por HPLC. Utilizando una columna de intercambio iónico (Aminex HPX-87H, BioRad) y un gradiente isocrático de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, se detecta el formiato por UV a 210 nm con picos que se eluyen típicamente al cabo de 14,3 minutos.

## 15 Test de estabilidad

Incubación en tampón a un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 3

Después de incubación de la enzima OxDc libre o la composición en cuestión que contiene la enzima OxDc incrustada en un material polímero en tampón de glicina 100 mM a un pH comprendido entre 2 y 3 durante cierto periodo, se analizó la actividad remanente de OxDc.

Incubación en fluido gástrico simulado

25 Una composición de partículas que contenía desde aproximadamente 2 mg de OxDc a aproximadamente 20 mg de OxDc se puso en un recipiente que contenía 100 ml de fluido gástrico simulado preparado de acuerdo con USP, es decir por disolución de 2 g de NaCl, 3,2 g de pepsina, y 7 ml de HCl concentrado en un volumen final de 1 litro. A intervalos de tiempo adecuados, se extrajo una muestra y se ensayó respecto a actividad de OxDc como se ha descrito arriba.

30 Incubación en tampón

El procedimiento fue el mismo que se ha descrito arriba (para fluido gástrico simulado). Sin embargo, se emplearon diversas soluciones tampón dependiendo del valor de pH de interés. Tampones adecuados incluyen tampones de glicina (pH 2-3), tampones de acetato (pH 3-6), tampones de fosfato (pH 5-8), tampones de borato (pH 8-9) y análogos. Puede añadirse una proteasa tal como, v.g., pepsina en una concentración normalmente correspondiente a la concentración encontrada en el fluido gástrico simulado USP.

## 40 Ejemplo 1

Preparación de micropartículas OxDc-alginato e influencia de diversos parámetros del proceso sobre la estabilidad

Este ejemplo ilustra la preparación y estabilidad de micropartículas de OxDc-alginato y, adicionalmente, ilustra la influencia de diversos parámetros del proceso sobre la estabilidad de la OxDc incrustada en las micropartículas.

45 Preparación de micropartículas OxDc-alginato

Micropartículas I – Emulsificación 1:

50 11 ml de la mezcla de alginato (1,8%, p/v) y OxDc (10:1, v/v; OxDc, 20 mg/ml, en Tris HCl 10 mM, pH 3,9) en tampón de citrato 50 mM, pH 3,9, se mezclaron con 20 ml de aceite mineral que contenía 0,5% de Triton X-100 por agitación magnética a 600 rpm durante 10 minutos hasta alcanzar un estado de emulsión estable; se añadieron luego 4 ml de emulsión de CaCl<sub>2</sub> en aceite mineral (2 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M + 2 ml de aceite mineral) y se continuó agitando durante 30 min. Se añadieron después 8 ml de emulsión de quitosano en aceite mineral (4 ml de quitosano al 0,8% y 4 ml de aceite mineral) y se agitó durante 30 minutos más. Se recogieron las micropartículas por centrifugación. En lo que sigue, estas micropartículas se designan como Micropartículas I.

Micropartículas II - Emulsificación 2:

60 Todo igual que en la "Emulsificación 1", excepto que la mezcla de alginato y OxDc se realizó en tampón Tris HCl 10 mM, de pH 8. En lo que sigue, estas micropartículas se designan como Micropartículas II.

Micropartículas OxDc-Alginato recubiertas de quitosano - gelificación del alginato a concentraciones diferentes (emulsificación) y recubrimiento ulterior de las micropartículas con quitosano:

65

Se mezclaron 8 ml de alginato (1,2% o 3%, p/v) con 0,5 ml de OxDc (16 mg/ml) en tampón Tris HCl 50 mM, de pH 9, y se mezclaron luego con 15 ml de aceite mineral que contenía 0,8% de Triton X-100 por agitación magnética a 600 rpm durante 10 min hasta alcanzar un estado de emulsión estable; se añadieron luego 8 ml de emulsión de CaCl<sub>2</sub> en aceite mineral (4 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 mM + 4 ml de aceite mineral) y se continuó agitando durante 30 minutos, añadiendo luego 50 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M con agitación. Las micropartículas se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua. Todas las micropartículas (aproximadamente 4 ml) se combinaron en la mixtura de 36 ml de quitosano al 0,4%, pH 5,45 y 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 4 M, y se sacudieron a 200 rpm durante una hora. En lo que sigue, estas micropartículas se designan como micropartículas OxDc-alginato recubiertas de quitosano.

10 Todas las micropartículas obtenidas en este ejemplo tenían una distribución de tamaños de partícula que se estimaba comprendida en un intervalo de aproximadamente 1-100 µm.

15 Las micropartículas obtenidas se ensayaron respecto a actividad enzimática como se ha descrito arriba. La actividad enzimática total es la actividad enzimática de las enzimas antes de la incrustación de las enzimas en la matriz de polímero, y esta cantidad se ajusta al 100%. Se obtuvieron los resultados siguientes:

20 Se encontró aproximadamente 40% y 48% de la actividad enzimática total en las micropartículas preparadas a pH 3,9 (Micropartículas I) y a pH 8 (Micropartículas II), respectivamente. La estabilidad de las dos clases de micropartículas se testó a pH 3 con 3,2 mg/ml de pepsina. Se encontró aproximadamente 42% y 60% de la actividad enzimática total en las micropartículas OxDc-alginato recubiertas de quitosano preparadas con 1,2% y 3% de alginato, respectivamente. La estabilidad de las dos clases de micropartículas OxDc-alginato recubiertas de quitosano se testó a pH 3 con 3,2 mg/ml de pepsina (Fig. 2).

25 Fig. 1 es una gráfica de la estabilidad de OxDc en las Micropartículas I (preparadas a pH 3,9) y en las Micropartículas II (preparadas a pH 8) a pH 3 con pepsina. Los cuadrados son Micropartículas I, los triángulos son Micropartículas II. Fig. 2 es una gráfica que muestra los efectos de la concentración de alginato para la formulación de micropartículas de alginato sobre la estabilidad de OxDc en las micropartículas OxDc-alginato recubiertas de quitosano a pH 3 con pepsina. Los cuadrados son micropartículas formadas con 3% de alginato, y los círculos son micropartículas formadas con 1,2% de alginato.

30 De acuerdo con ello, el pH presente durante la preparación de las micropartículas parece influir en la estabilidad de OxDc durante la incubación, es decir que un aumento en pH favorece una mejor estabilidad y un aumento en la concentración de alginato parece tener también un impacto positivo sobre la estabilidad.

35 Ejemplo 2

Preparación de nanopartículas de OxDc y recubrimiento de las mismas

Este ejemplo ilustra la preparación de nanopartículas que contienen OxDc y diversos recubrimientos de las mismas.

40 Nanopartículas OxDc-quitosano/tripolifosfato:

45 40 ml de tripolifosfato (TPP) al 0,15% (p/v) que contenían 0,5 mg/ml de OxDc, pH 8,1 (ajustado por HCl antes de la adición de OxDc) se vertieron gota a gota en 120 ml de quitosano al 0,18% (p/v) en ácido acético al 0,13% (p/v), pH 3,92. Las nanopartículas se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua. Este proceso produjo aproximadamente 4 ml de suspensión de nanopartículas.

Nanopartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato:

50 Se diluyeron 0,8 ml de la suspensión de nanopartículas en 10 ml de agua con agitación, y se añadieron luego gota a gota 5 ml de solución de alginato al 1,2% (en tampón Tris HCl 25 mM, pH 8,6). La mixtura se mantuvo en agitación durante 5 minutos. El tamaño de las nanopartículas recubiertas aumentó hasta 2-400 µm, siendo la mayoría de las partículas de aproximadamente 30 µm (véase Fig. 3), debido a la agregación de las nanopartículas y la reticulación con alginato. Las micropartículas se recogieron por centrifugación a 3000 g durante 3 minutos. Las micropartículas se lavaron dos veces con agua y se resuspendieron. En Fig. 3 se muestran las estadísticas de volumen (aritméticas) 17795s3\_07\_01.\$1s. Cálculos desde 0,040 µm hasta 2009 µm. Volumen: 100%; media: 48,53 µm; mediana: 29,10 µm; ratio media/mediana: 1,668; moda: 28,70 µm; D.S.: 65,43 µm; C.V.: 135%; sesgo: 4,384 sesgada a la derecha; curtosis 26,90 leptocúrtica; d10 8,814 µm; d50 29,10 µm; d90 109,9 µm.

60 Nanopartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de carragenano:

Se diluyeron 0,8 ml de la suspensión de nanopartículas en 10 ml de agua con agitación, y se añadieron luego gota a gota 5 ml de solución de carragenano al 0,5% (natural, pH 8,9). La mixtura se mantuvo en agitación durante 5 min. Las nanopartículas recubiertas deberían formar micropartículas y tener una distribución similar a las recubiertas de

alginate (véase arriba). Las micropartículas se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua, después de lo cual se resuspendieron.

5 Las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato o carragenano se reticularon con aldehído glutárico a diferentes concentraciones de aldehído glutárico:

Se diluyeron 0,2 ml de la suspensión de micropartículas en 0,8 ml de agua con agitación, se añadieron luego 2 ml de solución de aldehído glutárico al 0,15-7,5% (en KPB 50 mM, pH 7,5) y se mezcló el todo. La mixtura se mantuvo en agitación durante 15-40 min y las micropartículas se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua.

10 Reducción de las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico:

Se prepararon dos clases diferentes de micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico: una se reticuló sin adición de CaCl<sub>2</sub> y la otra con adición de CaCl<sub>2</sub> 1,2 M 10 minutos después de iniciarse la reacción de reticulación (1% de aldehído glutárico). Después que tuvo lugar la reacción de reticulación durante una hora, se recogieron las micropartículas por centrifugación y se lavaron dos veces con agua. Las dos clases de micropartículas se suspendieron ulteriormente en 100 mM de KPB, pH 7,5. Se añadió cierta cantidad de polvo de NaBH<sub>4</sub> a las soluciones de suspensión para obtener una concentración final de NaBH<sub>4</sub> 20 mM que se mantuvo en la oscuridad con sacudidas durante 14 h.

20 Se obtuvieron los resultados siguientes:

Nanopartículas OxDc-quitosano/TPP:

25 Las nanopartículas eran demasiado pequeñas para poderse observar visualmente bajo el microscopio óptico. La OxDc estaba atrapada prácticamente en un 100% por las nanopartículas en las condiciones presentes. En estas condiciones, la OxDc se disolvió con TPP a pH alto (8,6) y se vertió luego gota a gota en una solución de quitosano de pH bajo (3,92). La gran preferencia de la enzima disuelta a pH alto sobre la disuelta a pH bajo es un factor para el mantenimiento de la enzima en el interior de las nanopartículas durante el periodo de formación de las nanopartículas. La estabilidad de OxDc a pH 3,0 en las nanopartículas OxDc-quitosano/TPP estaba comprendida entre las de la Micropartícula I y la Micropartícula II del Ejemplo 1 y Fig. 1.

Micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato:

35 La estabilidad de OxDc a pH 3,0 aumentó adicionalmente cuando se aplicó un recubrimiento de alginato, en comparación con las nanopartículas sin recubrimiento. Véase Fig. 4, donde los cuadrados son nanopartículas sin recubrimiento alguno, los círculos son micropartículas con recubrimiento de alginato, y los triángulos son micropartículas con recubrimiento de carragenano.

40 Micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de carragenano:

La estabilidad de OxDc a pH 3,0 aumentó adicionalmente cuando se aplicó un recubrimiento de carragenano (comparada con las nanopartículas sin recubrimiento), Fig. 4.

45 Micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato en las que la partícula entera está reticulada con aldehído glutárico a diferentes concentraciones de aldehído glutárico:

50 (Aunque no se desea quedar ligados por teoría alguna, se cree que la reticulación con aldehído glutárico ocurre principalmente en el interior de la molécula de quitosano, ligando las moléculas de quitosano consigo mismas y unas con otras, y entre las moléculas de quitosano y las moléculas de enzima).

Las micropartículas recubiertas de alginato más reticulación exhibían mayor estabilidad a pH bajo que las nanopartículas sin recubrimiento de alginato. El alto nivel de reticulación mejoraba la estabilidad de OxDc en el interior de las micropartículas recubiertas de alginato a pH bajo (Fig. 5). Las micropartículas más estables pueden sumergirse en una solución a pH 2,6 con pepsina durante 4 h sin pérdida de actividad. La actividad era aproximadamente 30% después de 3,5 horas de incubación a pH 2,4 con pepsina. Véase Fig. 5, que muestra los efectos de la concentración de aldehído glutárico durante la reticulación sobre la estabilidad de OxDc en las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico a pH 2,4 con pepsina. Los cuadrados son aldehído glutárico al 1% sin recubrimiento alguno de alginato, los círculos son aldehído glutárico al 0,5%, los triángulos que apuntan hacia arriba son aldehído glutárico al 1%, y los triángulos que apuntan hacia abajo son aldehído glutárico al 2%, y los rombos son aldehído glutárico al 5%.

Reducción de las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico:

La estabilidad de las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico a pH bajo después de la reducción de los dobles enlaces de Schiff aumentaba significativamente. Las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico con adición de CaCl<sub>2</sub> durante la reticulación perdían 80% de la actividad de OxDc después de 120 minutos, en tanto que las micropartículas sin adición de CaCl<sub>2</sub> a pH aproximado de 2,0 perdían 80% de actividad en un tiempo muy breve. Para detalles, véase Fig. 6, que es una gráfica que muestra la estabilidad de OxDc en dos clases de micropartículas reticuladas y reducidas a pH 2,2 y 1,85, donde los cuadrados son pH 2,2 sin adición alguna de Ca<sup>+2</sup>, los círculos son pH 2,2 con la adición de Ca<sup>+2</sup>, los triángulos que apuntan hacia arriba son pH 1,85 sin cantidad alguna de Ca<sup>+2</sup>, y los triángulos que apuntan hacia abajo son pH 1,85 con Ca<sup>+2</sup>.

A partir de la serie de experimentos anteriores, se seleccionó la formulación de micropartículas de OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato reticuladas con aldehído glutárico y reducidas para desarrollo ulterior.

### Ejemplo 3

Experimentos para testado in vitro de la eliminación del oxalato de la comida en condiciones estomacales simuladas

Testado in vitro de micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato reticuladas con aldehído glutárico y reducidas.

Se mezclaron 10, 20 y 40 g de espinacas con 12 ml de jugo gástrico simulado (fluido gástrico) (84 mm de HCl con 3,2 mg/ml de pepsina), respectivamente. Se añadió luego agua hasta alcanzar los volúmenes finales de 40, 80 y 160 ml, respectivamente. Después de la homogeneización de las espinacas, el fluido gástrico simulado y agua, se añadieron a las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato, reticuladas con aldehído glutárico y reducidas para degradar el oxalato liberado por las espinacas. La ratio (dosis) de espinacas/micropartículas es 200 (200 g de espinacas mezclados con 1 g de micropartículas) para el total de las tres condiciones. Se seleccionaron para este experimento espinacas debido a que contienen una elevada cantidad de oxalato (aproximadamente 200 mM de oxalato en la hoja de espinaca congelada).

Resultados y exposición:

La cantidad de oxalato soluble se ve influida significativamente por el pH. Los valores de pH eran 2,5, 3,5 y 4,2 para las condiciones de 10, 20 y 40 g de espinacas, respectivamente. Las concentraciones iniciales de oxalato soluble eran 30,0, 22,8 y 14,7 mM, para las condiciones de 10, 20 y 40 g de espinacas, respectivamente (Figura 7). Si todo el oxalato fuese soluble, su concentración debería ser alrededor de 48 mM. Así pues, había oxalato insoluble presente en las tres condiciones. La Figura 7 indica que el oxalato soluble inicial se eliminaba prácticamente por completo en pocos minutos. El oxalato soluble remanente no descendía hasta 0, pero se mantenía en un nivel bajo durante cierto periodo, debido a que el oxalato insoluble comenzaba a disolverse a medida que se eliminaba más oxalato soluble. La Figura 7 muestra que la biodisponibilidad del oxalato (porción soluble) se reducía rápidamente en las tres condiciones. Los cuadrados son 10 g de espinacas con 0,05 g de micropartículas lavadas, los rombos son 20 g de espinacas con 0,1 g de micropartículas lavadas, y los triángulos que apuntan hacia arriba son 40 g de espinacas con 0,2 g de micropartículas.

Las micropartículas de OxDc seguían eliminando cada vez más oxalato soluble (Fig. 8). Al cabo de una hora, prácticamente todo el oxalato contenido en las espinacas en la primera condición (cuadrados) y aproximadamente el 90% en la segunda condición (rombos), se había eliminado. Para la tercera condición (triángulos), se eliminaba únicamente el 50% del oxalato, pero la parte soluble estaba próxima a 0. Por tanto, en las tres condiciones, la absorción del oxalato puede ser limitada eficazmente en el tracto GI, dado que la concentración del oxalato soluble era muy baja y se había reducido gran parte del oxalato. La Figura 8 es una gráfica de la evolución temporal del oxalato soluble total en las espinacas eliminado por las micropartículas en tres condiciones simuladas diferentes. La concentración total de oxalato en cada una de las muestras de espinacas era aproximadamente 50 mM. Los cuadrados son 10 g de espinacas con 0,05 g de micropartículas, los rombos son 20 g de espinacas con 0,1 g de micropartículas, y los triángulos que apuntan hacia arriba son 40 g de espinacas con 0,2 g de micropartículas.

Utilizando estos resultados para simular un tratamiento in vivo, supongamos que una persona cuyo estómago contiene 120 ml de fluido gástrico comienza a ingerir un total de 400 g de espinacas. Después de la ingesta de 100 g de espinacas, se toman 4 g de micropartículas. Prácticamente la totalidad del oxalato soluble se eliminará en el transcurso de 2 min. Aunque la ingesta de las espinacas continúa hasta que se ingieren 400 g, el oxalato soluble se mantiene por debajo de 3 mM durante toda la comida y se reduce rápidamente a 0 después de la comida.

### Ejemplo 4

OxDc formulada de acuerdo con la invención

I. Preparación de OxDc (micropartículas) formulada y testado de su estabilidad a pH bajo

Se producen como sigue micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato reticuladas con aldehído glutárico y reducidas:

1. Formación de micropartículas OxDc-quitosano/TPP por vertido gota a gota de solución de tripolifosfato (TPP) en una mixtura de quitosano y OxDc.
2. Recubrimiento de las micropartículas anteriores con alginato por adición de la solución de alginato a la suspensión anterior. Las micropartículas se transforman en micropartículas debido a la agregación de las micropartículas, y durante este proceso se produce reticulación física por el alginato.
3. Reticulación de las micropartículas anteriores por el aldehído glutárico.
4. Reducción de la base de Schiff por NaBH<sub>4</sub>.

La preparación se hizo de acuerdo con la descripción del ejemplo 2.

Testado de la estabilidad de OxDc libre o formulada a pH bajo:

Después de la incubación de OxDc como enzima libre o en esta micropartícula en tampón de glicina 100 mM a un intervalo de pH de 2 a 3 durante cierto periodo, se analizó la actividad remanente de OxDc. Fig. 9 es una gráfica que demuestra que la reticulación con aldehído glutárico (0,5-5%) mejoraba la estabilidad de OxDc en las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato a pH 2,4 y en presencia de pepsina. Los cuadrados son 0% de aldehído glutárico, los círculos son 0,5% de aldehído glutárico, los triángulos que apuntan hacia arriba son 1% de aldehído glutárico y los rombos son 5% de aldehído glutárico.

Como se muestra en Fig. 9, la actividad de las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato sin reticulación (control) representadas por los puntos cuadrados se destruye completamente en menos de 15 minutos a pH 2,4. En contraste, la reticulación con 0,5-5% de aldehído glutárico estabiliza la actividad enzimática de las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato durante hasta 2 horas. Es sabido que la OxDc natural (no formulada, libre, no incrustada) se desactiva irreversiblemente a pH < 3,0. La estabilidad de las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico aumentaba adicionalmente después de la base de Schiff en estas micropartículas (Fig. 10).

Fig. 10 es una gráfica que demuestra que la reducción por la base de Schiff aumentaba la estabilidad de OxDc en las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato y reticuladas con aldehído glutárico a pH 2,2 y en presencia de pepsina (puntos cuadrados). Las micropartículas se desactivan rápidamente a pH < 2,0 (puntos triangulares).

Las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato reticuladas con aldehído glutárico y reducidas retienen su estabilidad a pH tan bajo como 2,2. Esto constituye una mejora importante, dado que la enzima no formulada (libre, no incrustada) se desactiva irreversiblemente a pH < 3,0.

## II. Estudios sobre la degradación del oxalato por las micropartículas de OxDc

A. Degradación del oxalato (como oxalato de sodio) en el intervalo bajo de concentración:

Micropartículas de OxDc (preparadas como se describe en I, Ejemplo 4 anterior) que contenían 2 ó 20 mg de OxDc se mezclaron con 100 ml de solución de oxalato con concentración desde 0,05 a 2 mM a pH 3 a 37°C. El formiato generado se midió durante cierto periodo de tiempo.

Como se muestra en Fig. 11 A y B, las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato reticuladas con aldehído glutárico y reducidas pueden degradar el oxalato al menos en las concentraciones comprendidas desde 0,05 mM hasta 2,0 mM.

Una concentración 0,05 mM a 2 mM de oxalato en el estómago humano corresponde a una ingesta dietética de 5 mg a 180 mg de oxalato y un volumen de estómago supuesto de 1 litro. Se ha consignado que la ingesta media diaria de oxalato en la dieta occidental es 100-500 mg/día en todas las comidas. La ingesta puede ser mucho mayor si se ingieren ciertos alimentos ricos en oxalato como las espinacas. La degradación del oxalato en el intervalo de 15 a 30 mM de espinacas ha sido investigada también y se describe a continuación.

Fig. 11 A y B son gráficas que muestran el oxalato eliminado por las micropartículas OxDc-quitosano/TPP recubiertas de alginato reticuladas con aldehído glutárico y reducidas a pH 3. A, micropartículas correspondientes a 20 mg de OxDc en 100 ml de solución de oxalato; B, micropartículas correspondientes a 2 mg OxDc en 100 ml de solución de oxalato. Los cuadrados son concentración 0,05 mM de oxalato, los círculos son concentración 0,2 mM de oxala-

to, los triángulos que apuntan hacia arriba son concentración 1,0 mM de oxalato, y los triángulos que apuntan hacia abajo son concentración 2,0 mM de oxalato.

5 20 mg de OxDc (cantidad estimada de proteína enzimática en 1,0 ml de la formulación de micropartículas) degradaban prácticamente por completo 0,05 mM a 2 mM de oxalato en 2 minutos.

Degradación del oxalato de las espinacas en condiciones gástricas simuladas:

10 Mezcladura de espinacas con fluido gástrico simulado: 10, 20 y 40 g de espinacas se mezclaron con 12 ml de jugo estomacal simulado (84 mM de HCl con 3,2 mg/ml de pepsina) y se añadió luego agua hasta alcanzar los volúmenes finales de 40, 80 y 160 ml respectivamente.

15 Eliminación del oxalato por OxDc: Después de homogeneización de las suspensiones de espinacas, fluido gástrico y agua, se añadieron micropartículas de OxDc para degradar el oxalato liberado por las espinacas. La ratio (dosis) de espinacas/OxDc es aproximadamente 2000 (2000 g de espinacas mezclados con micropartículas que tenían la actividad de 1 g de OxDc) para las tres condiciones.

20 El oxalato total calculado en todas las preparaciones anteriores era 50 mM (se ha consignado que las espinacas contienen 18 g de oxalato total/kg). Debido a los diferentes niveles de tamponamiento del fluido gástrico por la presencia de las espinacas, el pH final de 3 suspensiones de espinacas era 2,5, 3,5 y 4,2, respectivamente. Se sabe que el pH del medio afecta a la disponibilidad del oxalato soluble y por consiguiente la concentración de oxalato biodisponible en las tres preparaciones testadas era 30 mM (puntos cuadrados), 22 mM (puntos rómbicos) y 15 mM (puntos triangulares) respectivamente. (Fig. 12)

TABLA 1

Preparaciones de espinacas	pH	Conc. total de oxalato	Conc. de oxalato soluble
10 g/40 ml de jugo gástrico	2,5	50 mM	30 mM
20 g/80 ml de jugo gástrico	3,5	50 mM	22 mM
40 g/160 ml de jugo gástrico	4,2	50 mM	15 mM

- 5 La Figura 12A es una gráfica que demuestra que la biodisponibilidad del oxalato (parte soluble) se reducía rápidamente en las tres condiciones; 12B es una gráfica que muestra el porcentaje del oxalato total eliminado. Los cuadrados son 10 g de espinacas con una cantidad de micropartículas igual a 5 mg de OxDc (por actividad enzimática); los rombos son 20 g de espinacas con una cantidad de micropartículas igual a 10 mg de OxDc, los triángulos que apuntan hacia arriba son 40 g de espinacas con una cantidad de micropartículas igual a 20 mg de OxDc.
- 10 Las micropartículas con OxDc eran capaces de degradar una extensa gama de concentraciones de oxalato desde 0,05 mM hasta 30 mM en condiciones gástricas simuladas a pH comprendido entre 2,5 y 4,2 (véase Fig. 12 A y B) o en un tampón a pH 3 (Fig. 11 A y B). Partiendo de esta serie de experimentos puede estimarse que 20 mg de micropartículas con OxDc (en 1,0 ml de suspensión) pueden degradar 180 mg de oxalato en el transcurso de 30 minutos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OxThera Inc  
 <120> Composiciones y Métodos para Reducción del Oxalato  
 <130> P12864EP/P12864  
 <140> 06845574.0  
 <141> 2008-07-14  
 <160> 10  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 568  
 <212> PRT  
 <213> Oxalobacter formigenes  
 <400> 1  
 Met Ser Asn Asp Asp Asn Val Glu Leu Thr Asp Gly Phe His Val Leu  
 1 5 10 15  
 Ile Asp Ala Leu Lys Met Asn Asp Ile Asp Thr Met Tyr Gly Val Val  
 20 25 30  
 Gly Ile Pro Ile Thr Asn Leu Ala Arg Met Trp Gln Asp Asp Gly Gln  
 35 40 45  
 Arg Phe Tyr Ser Phe Arg His Glu Gln His Ala Gly Tyr Ala Ala Ser  
 50 55 60  
 Ile Ala Gly Tyr Ile Glu Gly Lys Pro Gly Val Cys Leu Thr Val Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Pro Gly Phe Leu Asn Gly Val Thr Ser Leu Ala His Ala Thr Thr  
 85 90 95  
 Asn Cys Phe Pro Met Ile Leu Leu Ser Gly Ser Ser Glu Arg Glu Ile  
 100 105 110  
 Val Asp Leu Gln Gln Gly Asp Tyr Glu Glu Met Asp Gln Met Asn Val  
 115 120 125  
 Ala Arg Pro His Cys Lys Ala Ser Phe Arg Ile Asn Ser Ile Lys Asp  
 130 135 140  
 Ile Pro Ile Gly Ile Ala Arg Ala Val Arg Thr Ala Val Ser Gly Arg  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Gly Val Tyr Val Asp Leu Pro Ala Lys Leu Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Ile Ser Val Glu Glu Ala Asn Lys Leu Leu Phe Lys Pro Ile Asp Pro  
 180 185 190

Ala Pro Ala Gln Ile Pro Ala Glu Asp Ala Ile Ala Arg Ala Ala Asp  
 195 200 205  
 Leu Ile Lys Asn Ala Lys Arg Pro Val Ile Met Leu Gly Lys Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Tyr Ala Gln Cys Asp Asp Glu Ile Arg Ala Leu Val Glu Glu Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Ile Pro Phe Leu Pro Met Gly Met Ala Lys Gly Leu Leu Pro Asp  
 245 250 255  
 Asn His Pro Gln Ser Ala Ala Ala Thr Arg Ala Phe Ala Leu Ala Gln  
 260 265 270  
 Cys Asp Val Cys Val Leu Ile Gly Ala Arg Leu Asn Trp Leu Met Gln  
 275 280 285  
 His Gly Lys Gly Lys Thr Trp Gly Asp Glu Leu Lys Lys Tyr Val Gln  
 290 295 300  
 Ile Asp Ile Gln Ala Asn Glu Met Asp Ser Asn Gln Pro Ile Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Pro Val Val Gly Asp Ile Lys Ser Ala Val Ser Leu Leu Arg Lys Ala  
 325 330 335  
 Leu Lys Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ala Glu Trp Thr Gly Ala Leu Lys  
 340 345 350  
 Ala Lys Val Asp Gly Asn Lys Ala Lys Leu Ala Gly Lys Met Thr Ala  
 355 360 365  
 Glu Thr Pro Ser Gly Met Met Asn Tyr Ser Asn Ser Leu Gly Val Val  
 370 375 380  
 Arg Asp Phe Met Leu Ala Asn Pro Asp Ile Ser Leu Val Asn Glu Gly  
 385 390 395 400  
 Ala Asn Ala Leu Asp Asn Thr Arg Met Ile Val Asp Met Leu Lys Pro  
 405 410 415  
 Arg Lys Arg Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Val Met Gly Ile Gly Met  
 420 425 430  
 Gly Tyr Cys Val Ala Ala Ala Ala Val Thr Gly Lys Pro Val Ile Ala  
 435 440 445  
 Val Glu Gly Asp Ser Ala Phe Gly Phe Ser Gly Met Glu Leu Glu Thr  
 450 455 460

Ile Cys Arg Tyr Asn Leu Pro Val Thr Val Ile Ile Met Asn Asn Gly  
 465 470 475 480  
 Gly Ile Tyr Lys Gly Asn Glu Ala Asp Pro Gln Pro Gly Val Ile Ser  
 485 490 495  
 Cys Thr Arg Leu Thr Arg Gly Arg Tyr Asp Met Met Met Glu Ala Phe  
 500 505 510  
 Gly Gly Lys Gly Tyr Val Ala Asn Thr Pro Ala Glu Leu Lys Ala Ala  
 515 520 525  
 Leu Glu Glu Ala Val Ala Ser Gly Lys Pro Cys Leu Ile Asn Ala Met  
 530 535 540  
 Ile Asp Pro Asp Ala Gly Val Glu Ser Gly Arg Ile Lys Ser Leu Asn  
 545 550 555 560 565  
 Val Val Ser Lys Val Gly Lys Lys  
 565

<210> 2  
 <211> 2340  
 <212> DNA  
 <213> Oxalobacter formigenes

<400> 2  
 gagcaagatg agatgtcctt cctctgtggc aatcaggaat atattgacgg cacgtgtttt 60  
 ccctacttcc ggtgtgccag acatctccaa agatctcatg tggttttgga atccattttt 120  
 gccggtatcc cggctattcc ttacttttcc aaattgggtg taatgcaatg aatctatggt 180  
 ttttaatgct gtatggacaa ttttccggca gtgaaatttt cagatgcatt tcatttgtat 240  
 tcaggcggat ttgtttaaat tgacctgaat caatattgcc ggattgatct aggtcaatga 300  
 agtcaaattg acttatgtca atggtgccaa attgacctag gtcaacggga tttttaaagg 360  
 gtatgctggca tactcggaa tgacgttaa caacgtttat caaaccaac caaagaaagg 420  
 tattactcat gagtaacgac gacaatgtag agttgactga tggctttcat gttttgatcg 480  
 atgccctgaa aatgaatgac atcgatacca tgtatggtgt tgctcggcatt cctatcacga 540  
 acctggctcg tatgtggcaa gatgacggtc agcgttttta cagcttccgt cacgaacaac 600  
 acgcaggtta tgcagcttct atcgccggtt acatcgaagg aaaacctggc gtttgcttga 660  
 ccgtttccgc ccctggcttc ctgaacggcg tgacttcctt ggctcatgca accaccaact 720  
 gcttccaat gatcctgttg agcggttcca gtgaacgtga aatcgtcgat ttgcaacagg 780  
 gcgattacga agaaatggat cagatgaatg ttgcacgtcc aactgcaaa gcttctttcc 840  
 gtatcaacag catcaaagac attccaatcg gtatcgctcg tgcagttcgc accgctgtat 900  
 ccggacgtcc aggtggtggt tacgttgact tgccagcaaa actgttcggt cagaccattt 960  
 ctgtagaaga agctaacaaa ctgctcttca aaccaatcga tccagctccg gcacagattc 1020  
 ctgctgaaga cgctatcgct cgcgctgctg acctgatcaa gaacgccaaa cgtccagtta 1080

tcatgctggg taaaggcgct gcatacgcac aatgcgacga cgaaatccgc gcaactggtg 1140  
aagaaaccgg catcccattc ctgccaatgg gtatggctaa aggcctgctg cctgacaacc 1200  
atccacaatc cgctgctgca acccgtgctt tcgcaactgg acagtgtgac gtttgcgtac 1260  
tgatcggcgc tcgtctgaac tggctgatgc agcacggtaa aggcaaaacc tggggcgacg 1320  
aactgaagaa atacgttcag atcgacatcc aggctaacga aatggacagc aaccagccta 1380  
tcgctgcacc agttgttggg gacatcaagt ccgccgtttc cctgctccgc aaagcaactga 1440  
aaggcgctcc aaaagctgac gctgaatgga ccggcgctct gaaagccaaa gttgacggca 1500  
acaaagccaa actggctggc aagatgactg ccgaaacccc atccggaatg atgaactact 1560  
ccaattccct gggcgttggt cgtgacttca tgctggcaaa tccggatatt tccctgggta 1620  
acgaaggcgc taatgcactc gacaacactc gtatgattgt tgacatgctg aaaccacgca 1680  
aacgtcttga ctccggtacc tggggtggtta tgggtattgg tatgggctac tgcgttgctg 1740  
cagctgctgt taccggcaaa ccggttatcg ctggtgaagg cgatagcgca ttcggtttct 1800  
ccggtatgga actggaaacc atctgccgtt acaacctgcc agttaccgtt atcatcatga 1860  
acaatggtgg tatctataaa ggtaacgaag cagatccaca accaggcgtt atctcctgta 1920  
cccgtctgac ccgtggtcgt tacgacatga tgatggaagc atttggcggg aaaggttatg 1980  
ttgccaatac tccagcagaa ctgaaagctg ctctggaaga agctgttgct tccggcaaac 2040  
catgcctgat caacgcgatg atcgatccag acgctggtgt cgaatctggc cgtatcaaga 2100  
gcctgaacgt tgtaagtaaa gttggcaaga aataattagc ccaactttga tgaccgggta 2160  
cgaccggtca cataaagtgt tcgaatgccc ttcaagttta cttgaagggc atttttttac 2220  
cttgcaagtt ataaacagga aaaattgaag tattcagagc ggaaaagcag atttaagcca 2280  
cgagaaacat tcttttttat tgaaaattgc cataaacaca tttttaagc tggctttttt 2340

<210> 3  
<211> 428  
<212> PRT  
<213> Oxalobacter formigenes

<400> 3

Met Thr Lys Pro Leu Asp Gly Ile Asn Val Leu Asp Phe Thr His Val  
1 5 10 15  
Gln Ala Gly Pro Ala Cys Thr Gln Met Met Gly Phe Leu Gly Ala Asn  
20 25 30  
Val Ile Lys Ile Glu Arg Arg Gly Ser Gly Asp Met Thr Arg Gly Trp  
35 40 45  
Leu Gln Asp Lys Pro Asn Val Asp Ser Leu Tyr Phe Thr Met Phe Asn  
50 55 60  
Cys Asn Lys Arg Ser Ile Glu Leu Asp Met Lys Thr Pro Glu Gly Lys  
65 70 75 80

Glu Leu Leu Glu Gln Met Ile Lys Lys Ala Asp Val Met Val Glu Asn  
 85 90 95  
 Phe Gly Pro Gly Ala Leu Asp Arg Met Gly Phe Thr Trp Glu Tyr Ile  
 100 105 110  
 Gln Glu Leu Asn Pro Arg Val Ile Leu Ala Ser Val Lys Gly Tyr Ala  
 115 120 125  
 Glu Gly His Ala Asn Glu His Leu Lys Val Tyr Glu Asn Val Ala Gln  
 130 135 140  
 Cys Ser Gly Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Phe Trp Asp Gly Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Gly Ala Ala Leu Gly Asp Ser Asn Ser Gly Met His Leu  
 165 170 175  
 Met Ile Gly Ile Leu Ala Ala Leu Glu Met Arg His Lys Thr Gly Arg  
 180 185 190  
 Gly Gln Lys Val Ala Val Ala Met Gln Asp Ala Val Leu Asn Leu Val  
 195 200 205  
 Arg Ile Lys Leu Arg Asp Gln Gln Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ile Leu  
 210 215 220  
 Ala Glu Tyr Pro Gln Ala Gln Pro Asn Phe Ala Phe Asp Arg Asp Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Pro Leu Ser Phe Asp Asn Ile Thr Ser Val Pro Arg Gly Gly Asn  
 245 250 255  
 Ala Gly Gly Gly Gly Gln Pro Gly Trp Met Leu Lys Cys Lys Gly Trp  
 260 265 270  
 Glu Thr Asp Ala Asp Ser Tyr Val Tyr Phe Thr Ile Ala Ala Asn Met  
 275 280 285  
 Trp Pro Gln Ile Cys Asp Met Ile Asp Lys Pro Glu Trp Lys Asp Asp  
 290 295 300  
 Pro Ala Tyr Asn Thr Phe Glu Gly Arg Val Asp Lys Leu Met Asp Ile  
 305 310 315 320  
 Phe Ser Phe Ile Glu Thr Lys Phe Ala Asp Lys Asp Lys Phe Glu Val  
 325 330 335  
 Thr Glu Trp Ala Ala Gln Tyr Gly Ile Pro Cys Gly Pro Val Met Ser  
 340 345 350

Met Lys Glu Leu Ala His Asp Pro Ser Leu Gln Lys Val Gly Thr Val  
 355 360 365

Val Glu Val Val Asp Glu Ile Arg Gly Asn His Leu Thr Val Gly Ala  
 370 375 380

Pro Phe Lys Phe Ser Gly Phe Gln Pro Glu Ile Thr Arg Ala Pro Leu  
 385 390 395 400

Leu Gly Glu His Thr Asp Glu Val Leu Lys Glu Leu Gly Leu Asp Asp  
 405 410 415

Ala Lys Ile Lys Glu Leu His Ala Lys Gln Val Val  
 420 425

<210> 4  
 <211> 1579  
 <212> DNA  
 <213> Oxalobacter formigenes

<400> 4  
 aagcttgctt cattttgaga tgttatgcca agtgtagca acccaagtta gtaccttcag 60  
 ccctttgggc gaagtttttc tttcttggca gttcctttcg gggaaacagc cacagagaat 120  
 aaaaaccaa agttgtacca acgacaagga aatgagaaat tatgactaaa ccattagatg 180  
 gaattaatgt gcttgacttt acccacgtcc aggcaggctc tgcctgtaca cagatgatgg 240  
 gtttcttggg cgcaaacgtc atcaagattg aaagacgtgg ttccggagat atgactcgtg 300  
 gatggctgca ggacaaacca aatgttgatt ccctgtattt cacgatgttc aactgtaaca 360  
 aacgttcgat tgaactggac atgaaaaccc cggaaggcaa agagcttctg gaacagatga 420  
 tcaagaaagc cgacgtcatg gtcgaaaact tcggaccagg cgcactggac cgtatgggct 480  
 ttacttggga atacattcag gaactgaatc cacgcgtcat tctggcttcc gttaaaggct 540  
 atgcagaagg ccacgccaac gaacacctga aagtttatga aaacgttgca cagtgttccg 600  
 gcggtgctgc agctaccacc ggtttctggg atggtcctcc aaccgtttcc ggcgctgctc 660  
 tgggtgactc caactccggt atgcacctga tgatcggtat tctggccgct ctggaaatgc 720  
 gtcacaaaac cggccgtggt cagaaagttg ccgtcgctat gcaggacgct gttctgaatc 780  
 tggttcgtat caaactgcgt gaccagcaac gtctggaag aaccggcatt ctggctgaat 840  
 accacaggc tcagcctaac tttgccttcg acagagacgg taaccactg tccttcgaca 900  
 acatcacttc cgttccacgt ggtggtaacg caggtggcgg cggccagcca ggctggatgc 960  
 tgaatgtaa aggttgggaa accgatgcgg actcctacgt ttacttcacc atcgctgcaa 1020  
 acatgtggcc acagatctgc gacatgatcg acaagccaga atggaaagac gacccagcct 1080  
 acaacacatt cgaaggctgt gttgacaagc tgatggacat cttctccttc atcgaaacca 1140  
 agttcgtgca caaggacaaa ttcgaagtta ccgaatggc tgcccagtac ggcattcctt 1200  
 gcggtccggt catgtccatg aaagaactgg ctcacgatcc ttcctgcag aaagttggta 1260

ccgtcgttga agttgtcgac gaaattcgtg gtaaccacct gaccgttggc gcaccgttca 1320  
aattctccgg attccagccg gaaattaccc gtgctccgct gttgggcgaa cataccgacg 1380  
aagttctgaa agaactgggt cttgacgatg ccaagatcaa ggaactgcat gcaaaacagg 1440  
tagtttgatc cgtcagactt tctgggcaaa acggcactct ccggagtgcc gttttttgt 1500  
cacacgaaac cctaatacaa caagcacgtg caatgattcc acatcattgc ggccacattc 1560  
atccttcggg tcattactg 1579

<210> 5  
<211> 385  
<212> PRT  
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 5

Met Lys Lys Gln Asn Asp Ile Pro Gln Pro Ile Arg Gly Asp Lys Gly  
1 5 10 15

Ala Thr Val Lys Ile Pro Arg Asn Ile Glu Arg Asp Arg Gln Asn Pro  
20 25 30

Asp Met Leu Val Pro Pro Glu Thr Asp His Gly Thr Val Ser Asn Met  
35 40 45

Lys Phe Ser Phe Ser Asp Thr His Asn Arg Leu Glu Lys Gly Gly Tyr  
50 55 60

Ala Arg Glu Val Thr Val Arg Glu Leu Pro Ile Ser Glu Asn Leu Ala  
65 70 75 80

Ser Val Asn Met Arg Leu Lys Pro Gly Ala Ile Arg Glu Leu His Trp  
85 90 95

His Lys Glu Ala Glu Trp Ala Tyr Met Ile Tyr Gly Ser Ala Arg Val  
100 105 110

Thr Ile Val Asp Glu Lys Gly Arg Ser Phe Ile Asp Asp Val Gly Glu  
115 120 125

Gly Asp Leu Trp Tyr Phe Pro Ser Gly Leu Pro His Ser Ile Gln Ala  
130 135 140

Leu Glu Glu Gly Ala Glu Phe Leu Leu Val Phe Asp Asp Gly Ser Phe  
145 150 155 160

Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gln Leu Thr Asp Trp Leu Ala His Thr Pro  
165 170 175

Lys Glu Val Ile Ala Ala Asn Phe Gly Val Thr Lys Glu Glu Ile Ser  
180 185 190

Asn Leu Pro Gly Lys Glu Lys Tyr Ile Phe Glu Asn Gln Leu Pro Gly



agctttattg acgatgtagg tgaaggagac ctttgggtact tcccgtcagg cctgccgcac 420  
 tccatccaag cgctggagga gggagctgag ttctgtctcg tgtttgacga tggatcattc 480  
 tctgaaaaca gcacgttcca gctgacagat tggctggccc acaactcaaa agaagtcatt 540  
 gctgcgaact tcggcgtgac aaaagaagag atttccaatt tgcctggcaa agaaaaatat 600  
 atatttgaaa accaacttcc tggcagttta aaagatgata ttgtggaagg gccgaatggc 660  
 gaagtgcctt atccatttac ttaccgcctt cttgaacaag agccgatcga atctgagggg 720  
 ggaaaagtat acattgcaga ttcgacaaac ttcaaagtgt ctaaaacat cgcatcagcg 780  
 ctcgtaacag tagaaccgg cgccatgaga gaactgcact ggcacccgaa taccacgaa 840  
 tggcaatact acatctccgg taaagctaga atgaccgttt ttgcatctga cggccatgcc 900  
 agaacgttta attaccaagc cggatgatgc ggatagtac catttgcaat gggtcattac 960  
 gttgaaaaca tcggggatga accgcttgc ttttagaaa tcttcaaaga cgaccattat 1020  
 gctgatgtat ctttaacca atggcttgcc atgcttcctg aacatttgt tcaagcgcac 1080  
 cttgacttgg gcaagactt tactgatgtg ctttcaaag aaaagcacc agtagtgaaa 1140  
 aagaaatgca gtaaataa 1158

<210> 7  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Hordeum vulgare

<400> 7

Met Gly Tyr Ser Lys Asn Leu Gly Ala Gly Leu Phe Thr Met Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Pro Ala Ile Met Ala Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe  
 20 25 30  
 Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr  
 35 40 45  
 Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp Phe Leu Phe Ser Ser Lys  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro Asn Gly Ser Ala Val Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser  
 85 90 95  
 Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ile  
 100 105 110  
 His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Met Val Met Lys Gly Glu Leu Leu  
 115 120 125  
 Val Gly Ile Leu Gly Ser Phe Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg



<400> 9  
 aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60  
 ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaaccgat 120  
 catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180  
 ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcattc 240  
 gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300  
 tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaa agggcgcagc 360  
 tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggacttcc cgtcaggcct gccgcactcc 420  
 atccaagcgc tggaggagg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480  
 gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540  
 gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600  
 tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa 660  
 gtgccttattc catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgagggagga 720  
 aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780  
 gtaacagtag aaccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg 840  
 caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900  
 acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacggt 960  
 gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020  
 gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080  
 gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccaggt agtgaaaaag 1140  
 aatgcagta aa 1152

<210> 10  
 <211> 1164  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia del gen Yvrk optimizada para E. coli con sitios de restricción en los extremos 5' y 3'

<400> 10  
 catatgaaaa aacagaatga cattccacag ccgattcgcg gcgataaagg cgcgaccgctc 60  
 aaaattcctc gcaatatcga acgcgaccgc cagaatccgg atatgctggt gccgccggag 120  
 acggaccatg gcacggtgtc taacatgaaa ttctctttta gcgataccca caaccgcctg 180  
 gaaaaagggtg gctacgcgcg cgaggttacc gtccgtgaac tgccaattag cgaaaatctg 240  
 gcttcggtta acatgcgtct gaaaccaggt gctatccgtg agctgcactg gcacaaggaa 300  
 gcggaatggg cgtatatgat ttacggttca gcacgtgta ccatcgtaga cgagaaagg 360  
 cgtagcttta tcgatgatgt tggcgaagggt gatctgtggt atttcccatc tggcctgccg 420  
 cattcgattc aggcgctgga agaaggcgcgt gaatttctgc tgggtgttcga tgatggttcc 480  
 ttttctgaaa acagcacggt ccagctgacg gattggctgg cgcacacgcc gaaagaagtc 540

ES 2 362 897 T3

attgcgcca	atdddgggt	aaccaaagaa	gaaattdcca	acdgccggg	caaagaaaag	600
tatatdddg	agaatcagct	gccgggctct	ctgaaggacg	atattgtaga	aggccctaac	660
ggtgaggtgc	cgtatccgtt	cacctatcgt	ctgctggagc	aggaaccgat	tgaaagcgaa	720
ggcggtaaag	ttatatcgc	agattccact	aacttdaaag	tctccaagac	cattgccagc	780
gccctgggtca	ccgtggaacc	gggagcgatg	cgcgagctgc	actggcatcc	gaacacgcac	840
gaatggcagt	attatattdc	cggcaaagca	cgcattgaccg	tdtdtcctc	agatggacac	900
gctcgcacgt	tdaattatca	agcgggtgat	gtdggctacg	tdccttdcgc	catgggccat	960
tatgtagaaa	atattggcga	tgaacctg	gtgtdtctgg	agatcttdaa	agatgaccac	1020
tatgccgatg	tdtctactgaa	tcagtggctg	gccattgctgc	cggaaacttd	tgtdcaggcg	1080
catctggacc	tdggtaaaga	cttdaccgat	gtgctgagca	aagaaaaaca	cccggtagtc	1140
aagaagaaat	gcagtaaagg	atcc				1164

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende partículas que contienen una o más enzimas degradantes del oxalato incrustadas en un primer material polímero, en donde la enzima incrustada retiene al menos dos veces la actividad de las una o más enzimas no incrustadas libres obtenidas del mismo lote después de incubación en fluido gástrico simulado USP a 37°C durante al menos 60 minutos y en donde el primer material polímero está reticulado consigo mismo y con las una o más enzimas.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la actividad de las una o más enzimas degradantes del oxalato disminuye como máximo hasta aproximadamente 30% cuando se incuba en una solución tampón acuosa que tiene un pH comprendido en el intervalo que va desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,5 durante 60 minutos y ajustándose la actividad inicial a 100%.
- 15 3. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la actividad de una o más enzimas degradantes del oxalato disminuye como máximo hasta aproximadamente 20% cuando se incuba en una solución tampón acuosa que tiene un pH comprendido en el intervalo que va desde aproximadamente 1 a aproximadamente 4,5 durante 2 horas, y ajustándose la actividad inicial a 100%.
- 20 4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tampón contiene adicionalmente una proteasa.
- 25 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la concentración de la proteasa está comprendida en un intervalo que va desde aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.
- 30 6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las una o más enzimas degradantes del oxalato son enzimas aisladas/purificadas.
- 30 7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las una o más enzimas degradantes del oxalato se seleccionan del grupo constituido por oxalato-descarboxilasa, oxalil-CoA-descarboxilasa, o una combinación de oxalato-oxidasa y formil-CoA-transferasa, o una combinación de las mismas.
- 35 8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la una o más enzimas degradantes del oxalato es oxalato-descarboxilasa.
- 40 9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las una o más enzimas degradantes del oxalato incrustadas retienen al menos dos veces la actividad de las una o más enzimas no incrustadas libres obtenidas del mismo lote después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 2 a 37°C durante al menos 60 minutos.
- 40 10. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la cual el nivel de actividad enzimática retenido después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 2 se incrementa por un factor de al menos 2 en comparación con las composiciones del mismo lote de enzimas incrustadas en el primer material polímero pero que carecen de reticulaciones.
- 45 11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las partículas están recubiertas de un segundo material polímero.
- 50 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, para la cual el nivel de actividad enzimática retenida después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 2 se incrementa por un factor de al menos 2 en comparación con composiciones del mismo lote pero de enzimas incrustadas en el primer material polímero pero que carecen de un recubrimiento con un segundo material polímero.
- 55 13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en donde los materiales polímeros primero y/o segundo están reticulados consigo mismos o uno con otro o con las una o más enzimas.
- 60 14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el nivel de actividad enzimática retenida después de incubación en 84 mM de HCl y 3,2 mg/ml de pepsina a pH > 1 a 37°C durante al menos 60 minutos se incrementa por un factor de al menos 2 en comparación con composiciones del mismo lote de enzimas incrustadas en el primer material polímero pero que carecen de reticulaciones y de una segunda capa de material polímero.

FIGURA 1

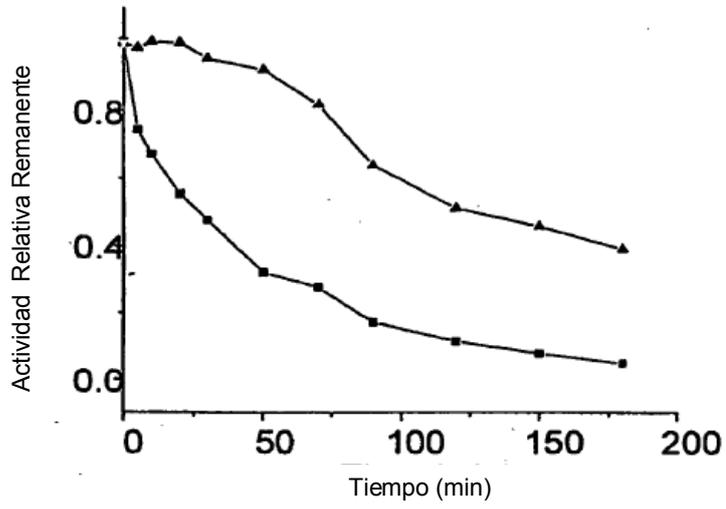
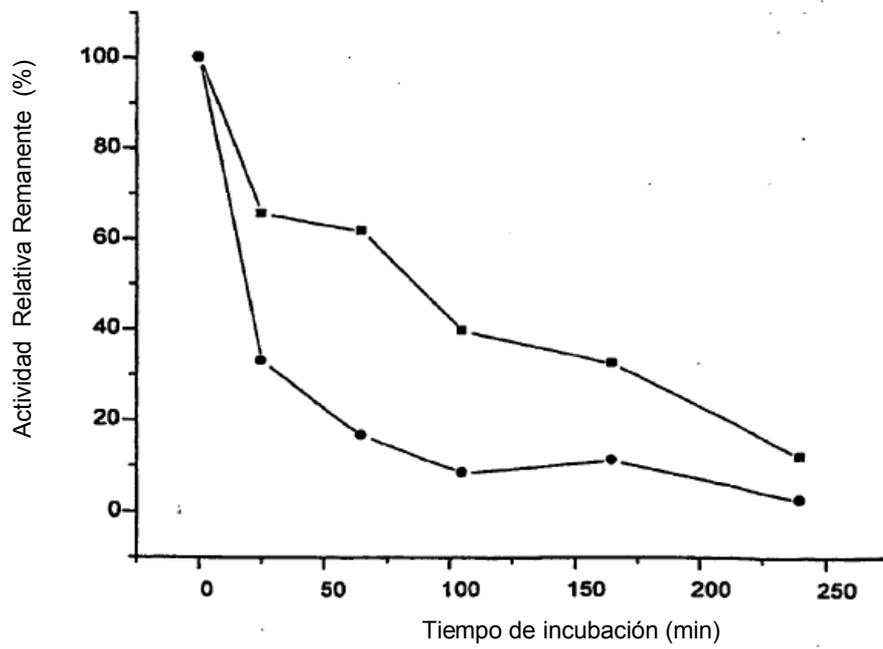


FIGURA 2



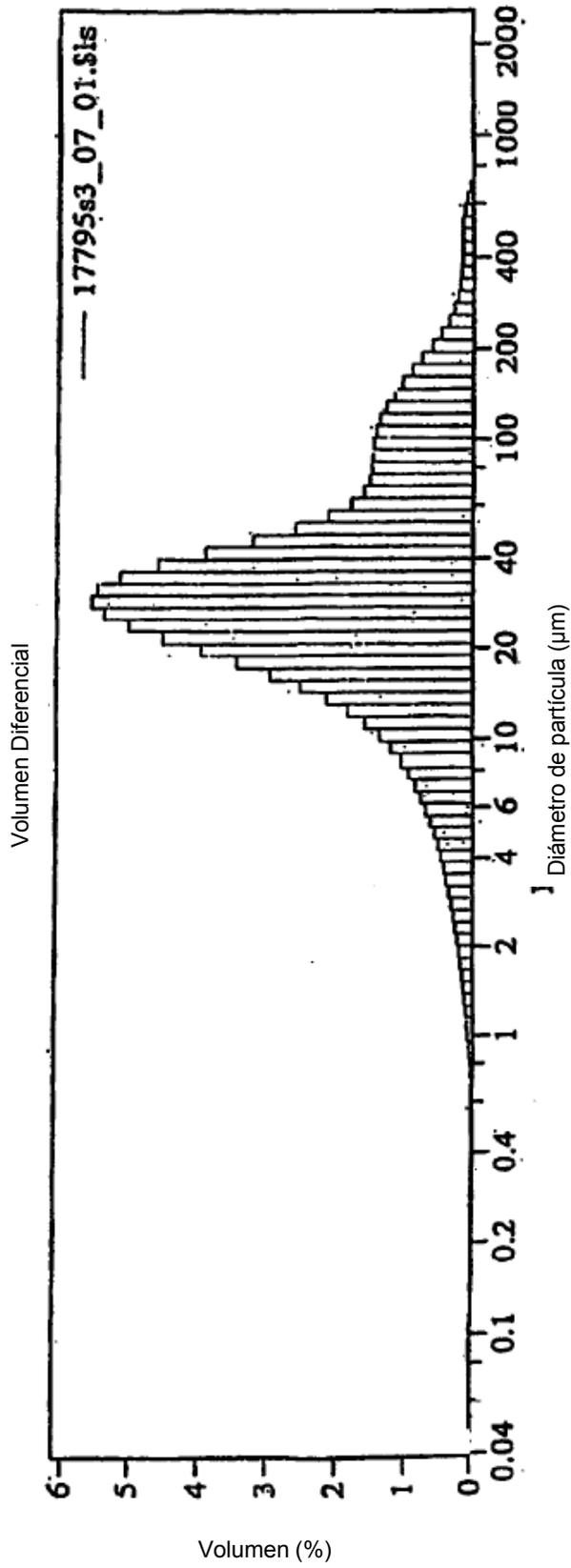


FIGURA 3

FIGURA 4

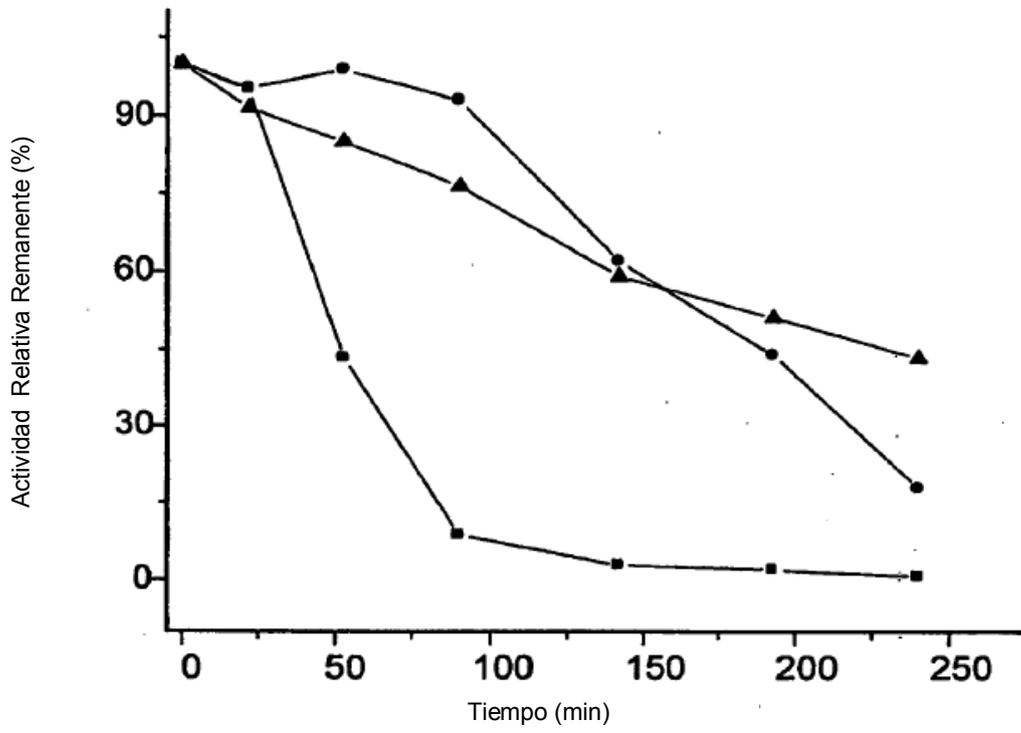


FIGURA 5

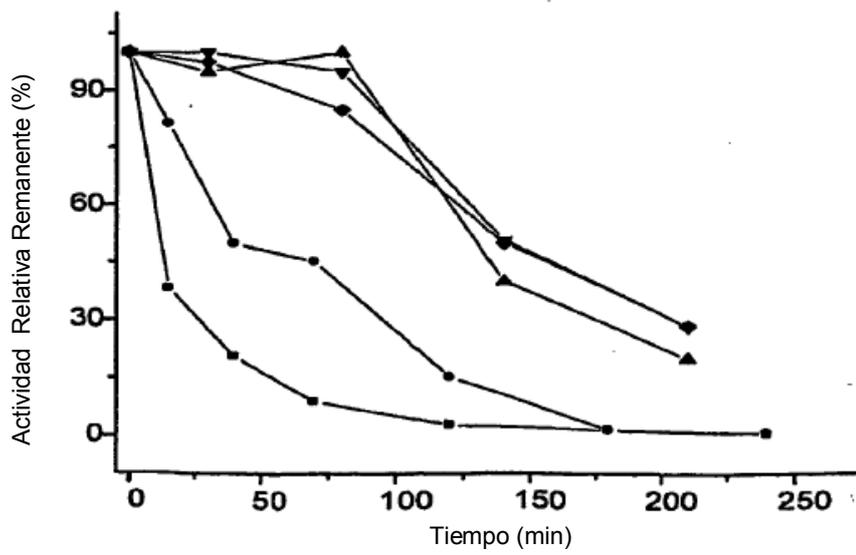


FIGURA 6

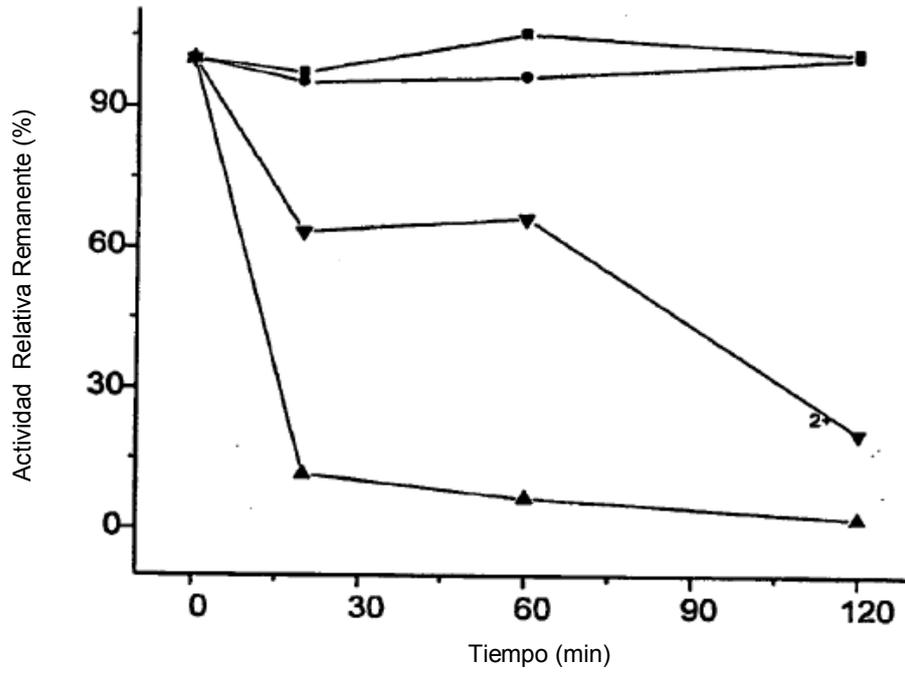


FIGURA 7

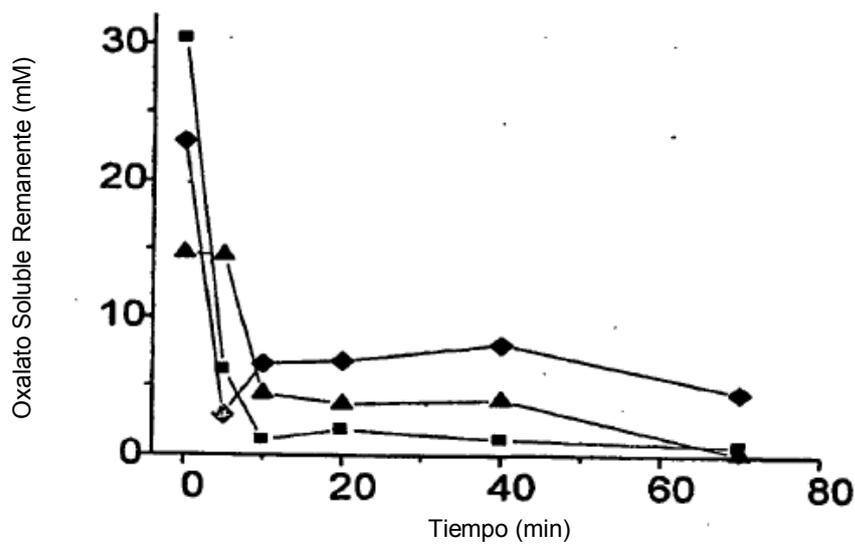


FIGURA 8

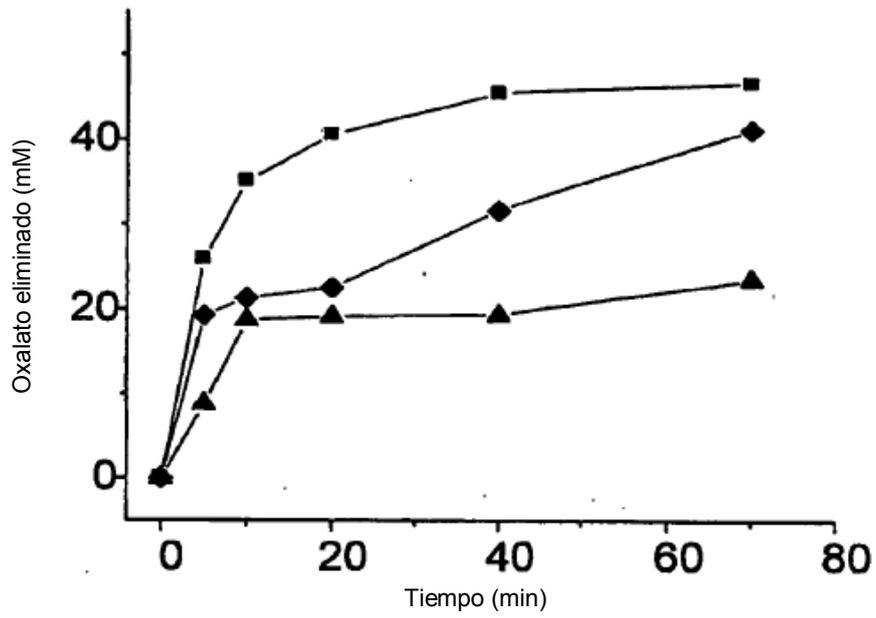


FIGURA 9

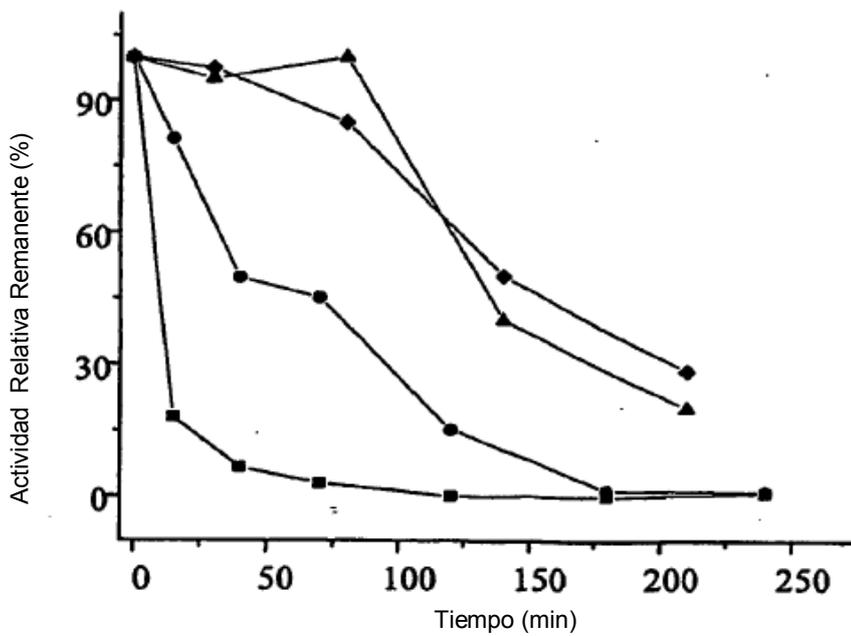


FIGURA 10

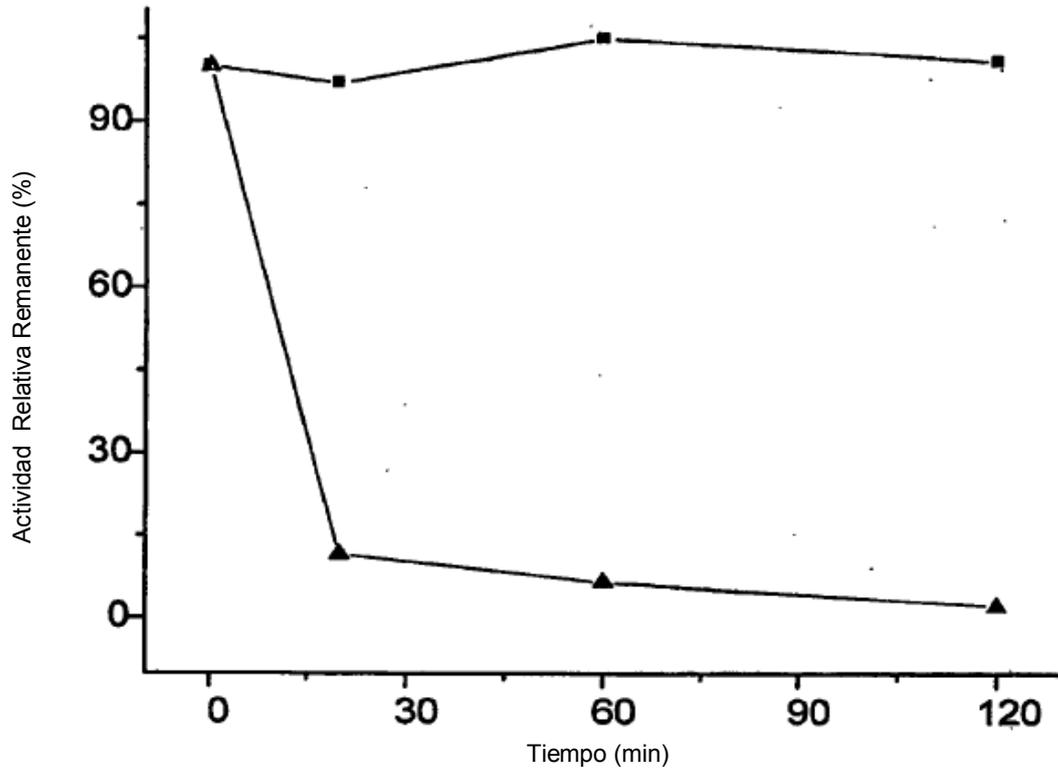


FIGURA 11

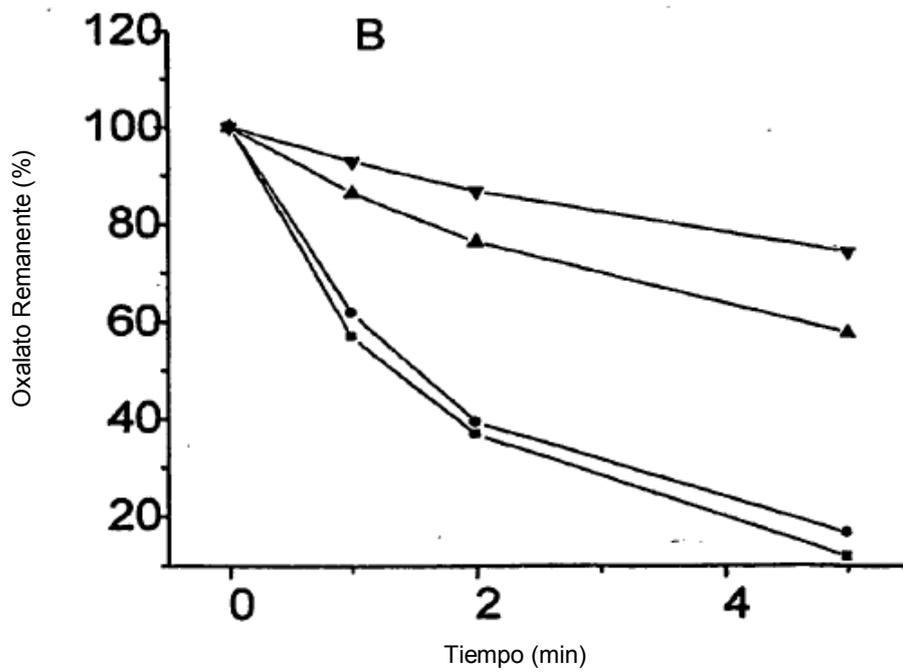
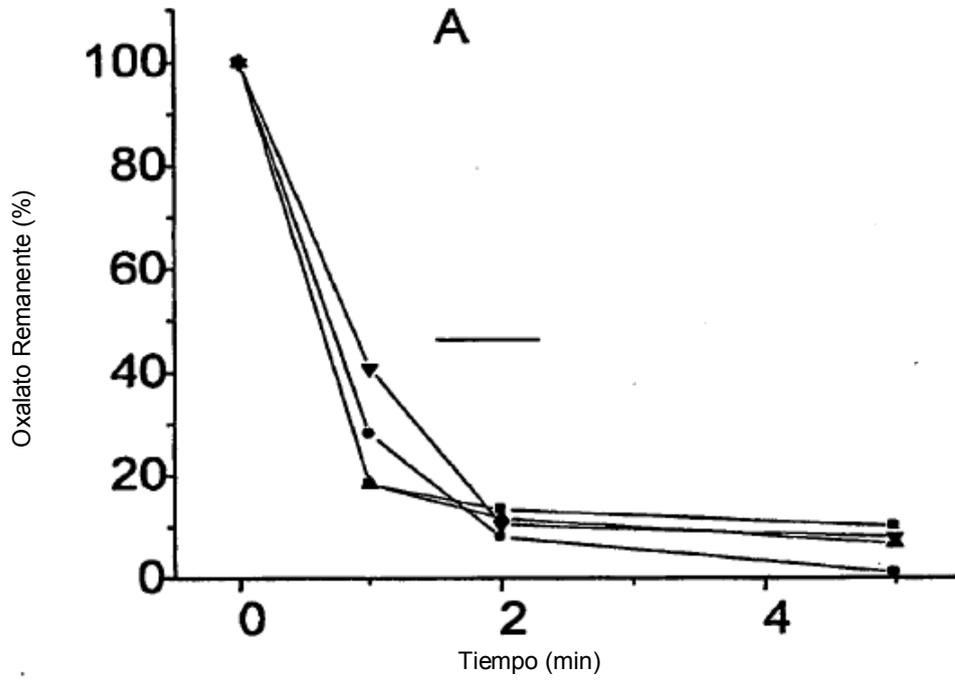


FIGURA 12

