

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 254**

51 Int. Cl.:

A61K 38/51

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2007 E 07873799 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2046373**

54 Título: **Oxalato-descarboxilasa cristalizada y métodos de uso**

30 Prioridad:

02.08.2006 US 834933 P
26.10.2006 US 854540 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.07.2013

73 Titular/es:

ALTUS PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
125 SIDNEY STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

SHENOY, BHAMI, C.;
CACHERO, TERESA, G.;
SHIN, JOHN;
ZHANG, LEKAI;
RASHID, AFTAB;
GRUJIC, DANICA;
PATEL, REENA y
MCGRATH, MARGARET, ELLEN

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 412 254 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

Oxalato-descarboxilasa cristalizada y métodos de uso

ANTECEDENTES

- 5 El ácido oxálico es un ácido dicarboxílico de fórmula $\text{HO}_2\text{C}-\text{CO}_2\text{H}$. En los organismos biológicos, el ácido oxálico está presente principalmente en forma de oxalato, que es la sal del ácido oxálico. El oxalato se encuentra en ciertos alimentos, por ejemplo espinacas, ruibarbo, fresas, arándanos, nueces, cacao, chocolate, manteca de cacahuete, sorgo y té. El oxalato es también un producto metabólico final en humanos y otros mamíferos. Es secretado por los riñones en la orina. En combinación con el calcio, el ácido oxálico forma un producto insoluble, oxalato de calcio, que es el compuesto químico más frecuente hallado en los cálculos renales.
- 10 Dado que los mamíferos no sintetizan enzimas que degraden el oxalato, los niveles de oxalato en un individuo normalmente se mantienen bajo control por la excreción y la baja absorción del oxalato de los alimentos. Una concentración elevada de oxalato está asociada a diversas patologías, como hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria entérica e hiperoxaluria idiopática (Leumann y col., *Nephrol. Dial. Transplant.* 14:2556-2558 (1999) y Earnest, *Adv. Internal Medicine* 24:407-427 (1979)). Niveles altos de oxalato pueden deberse a un consumo excesivo de oxalato con
- 15 los alimentos, a una hiperabsorción de oxalato en el tracto gastrointestinal y a anomalías de la producción de oxalato. La hiperabsorción de oxalato en el colon y el intestino delgado puede asociarse a enfermedades intestinales, incluyendo hiperabsorción provocada por enfermedades de malabsorción de ácido biliar y grasas; curación por resección; y, por ejemplo, por esteatorrea debida a enfermedad celíaca, insuficiencia pancreática exocrina, enfermedad intestinal y enfermedad hepática.
- 20 La hiperoxaluria, o aumento de la excreción urinaria de oxalato, está asociada a diversos problemas de salud relacionados con el depósito de oxalato de calcio en el tejido renal (nefrocalcinosis) o en el tracto urinario (por ejemplo, cálculos renales, urolitiasis y nefrolitiasis). El oxalato de calcio también se puede depositar por ejemplo en los ojos, vasos sanguíneos, articulaciones, huesos, músculos, corazón y otros órganos importantes, provocando daños en los mismos (Véase, por ejemplo, Leumann y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1986 1993 (2001) y Monico y col., *Kidney International* 62:392 400 (2002)). Los efectos de un nivel elevado de oxalato se pueden manifestar en diversos tejidos. Por ejemplo, su depósito en vasos sanguíneos pequeños provoca dolorosas úlceras en la piel que no se curan, en la médula ósea provocan anemia, en el tejido óseo causan fracturas o afectan al crecimiento en niños y en el corazón producen anomalías del ritmo cardíaco o una función cardíaca deficiente.
- 25 Anand R. y col., *Biochemistry* 2002, 41, 7659-7669, se refieren a la estructura de la oxalato-descarboxilasa de *Bacillus subtilis* con una resolución de 1,75 Å. La US 2004/0234514 A1 da a conocer composiciones y métodos para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con el oxalato.
- 30 Los métodos existentes para tratar niveles elevados de oxalato no son siempre eficaces y muchos pacientes con hiperoxaluria primaria requieren diálisis intensas y trasplantes de órganos. Las terapias existentes para diversas hiperoxalurias incluyen tratamiento con piridoxina a altas dosis, tratamiento con ortofosfato, magnesio, hierro, aluminio, citrato de potasio, colestiramina y glicosaminoglucano, así como regímenes para ajustar la dieta y la ingesta de fluidos, diálisis e intervención quirúrgica, como trasplante renal y hepático. Estas terapias (por ejemplo dieta baja en oxalatos o baja en grasas, piridoxina, calcio apropiado y nivel elevado de líquidos) sólo son parcialmente eficaces y pueden tener efectos secundarios nocivos no deseables, por ejemplo efectos gastrointestinales de la complementación de ortofosfato, magnesio o colestiramina y riesgo de diálisis y cirugía. Por consiguiente, se requieren métodos para eliminar con
- 35 seguridad el oxalato del cuerpo. Además, los métodos que degradan el oxalato para reducir los niveles de oxalato en una muestra biológica resultan ventajosos en comparación con una terapia que, por ejemplo, únicamente bloquee la absorción o aumente el aclaramiento de oxalato.
- 40

SUMARIO

- 45 La invención proporciona cristales de oxalato-descarboxilasa ("OXDC") y formas reticuladas de los mismos ("CLEC") y su utilización para el tratamiento de trastornos asociados al oxalato, por ejemplo hiperoxaluria. En una realización, la oxalato-descarboxilasa cristalina puede ser administrada a un mamífero, por ejemplo vía oral o directamente en el estómago, para disminuir los niveles de oxalato y/o para reducir el daño causado por los depósitos de oxalato de calcio en el mamífero. También se dan a conocer métodos para producir cristales de proteínas de extractos celulares. Además, se dan a conocer composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, que incluyen cristales de oxalato-
- 50 descarboxilasa ("OXDC") y formas reticuladas de los mismos ("CLEC").
- En un aspecto, la invención describe cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados. El agente reticulante puede ser multifuncional y, en determinadas realizaciones, se trata de un agente bifuncional, tal como glutaraldehído. En determinadas realizaciones, los cristales de oxalato-descarboxilasa se reticulan con glutaraldehído en una concentración que no altera esencialmente la actividad enzimática, por ejemplo a una concentración de al menos
- 55 aproximadamente un 0,02% (p/v). En algunas realizaciones, el nivel de reticulación del cristal de oxalato-descarboxilasa es equivalente al obtenido por tratamiento con un 0,02% (p/v) de glutaraldehído. El nivel de reticulación se puede

determinar por métodos conocidos en la técnica o descritos en este documento, por ejemplo determinando el nivel de lixiviación de proteínas, tal como se da a conocer en los Ejemplos 10-11.

La invención también describe cristales de oxalato-d Descarboxilasa, por ejemplo cristales de oxalato-d Descarboxilasa de alta actividad, por ejemplo de al menos aproximadamente un 100%, 200%, 300%, 400% o 500%, en comparación con la oxalato-d Descarboxilasa soluble.

Además, la invención también describe cristales de oxalato-d Descarboxilasa estabilizados, por ejemplo reticulados, donde dicho cristal estabilizado mantiene una actividad y/o estabilidad bajo condiciones ácidas al menos 2 a 3 veces mayor que la actividad y/o estabilidad mantenida por una oxalato-d Descarboxilasa bajo condiciones ácidas similares (por ejemplo, un pH ácido de aproximadamente 2 a 3). En algunas realizaciones, el cristal de oxalato-d Descarboxilasa estabilizado es al menos un 200%, 300% o 400% más activo y/o estable que una oxalato-d Descarboxilasa soluble bajo condiciones ácidas.

La invención también da a conocer un cristal de oxalato-d Descarboxilasa estabilizado, por ejemplo reticulado, donde dicho cristal estabilizado mantiene una actividad y/o estabilidad, en presencia de una proteasa, al menos 2 a 3 veces mayor que la actividad y/o estabilidad mantenida por una oxalato-d Descarboxilasa soluble bajo condiciones similares. En algunas realizaciones, el cristal de oxalato-d Descarboxilasa estabilizado es al menos un 200%, 300% o 400% más activo y/o estable que una oxalato-d Descarboxilasa soluble en presencia de una proteasa. La proteasa se puede seleccionar, por ejemplo, de entre una o más de, por ejemplo, pepsina, quimotripsina o pancreatina. En algunas realizaciones, la actividad de la oxalato-d Descarboxilasa estabilizada o soluble se mide después de exponer el cristal estabilizado o la oxalato-d Descarboxilasa soluble a condiciones ácidas y/o a una proteasa durante un tiempo predeterminado, por ejemplo al menos una, dos, tres, cuatro o cinco horas (por ejemplo tal como se describe en los ejemplos aquí mostrados).

En un aspecto relacionado, la invención da a conocer un cristal de oxalato-d Descarboxilasa reticulado que es esencialmente activo y estable bajo condiciones variables de pH (por ejemplo, aproximadamente pH 2,5 o 3 a 7,5 u 8,5) y/o en presencia de una proteasa, por ejemplo una proteasa seleccionada de entre una o más de pepsina, quimotripsina o pancreatina. En algunas realizaciones, el cristal reticulado mantiene una actividad al menos 2 a 3 veces mayor que la actividad mantenida por una oxalato-d Descarboxilasa soluble bajo condiciones ácidas (por ejemplo un pH ácido de aproximadamente 2 a 3) y en presencia de una proteasa, tal como se describe aquí. En otras realizaciones, el cristal de oxalato-d Descarboxilasa estabilizado es al menos un 200%, 300% o 400% más estable que una oxalato-d Descarboxilasa soluble bajo condiciones ácidas (por ejemplo un pH ácido de aproximadamente 2 a 3) y en presencia de una proteasa, tal como se describe aquí.

Las composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, que incluyen los cristales y/o los cristales de oxalato-d Descarboxilasa reticulados tal como se describen aquí también entran dentro del alcance de la invención.

En algunas realizaciones, los cristales incluyen una oxalato-d Descarboxilasa con una secuencia idéntica o esencialmente idéntica a la secuencia de una oxalato-d Descarboxilasa de una fuente natural, como una planta, una bacteria o un hongo, en particular de las especies *Bacillus subtilis*, *Collybia velutipes* o *Flammulina velutipes*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas* sp. *Synechocystis* sp. *Streptococcus mutans*, *Trametes hirsute*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *T. versicolor*, *Postia placenta*, *Myrothecium verrucaria*, *Agaricus bisporus*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus oxalaticus*, *Wautersia* sp., *Oxalicibacterium flavum*, *Ammoniiophilus oxalaticus*, *Vibrio oxalaticus*, *A. oxalativorans*, *Variovorax paradoxus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y *Mucor*. En otras realizaciones, la oxalato-d Descarboxilasa se obtiene por recombinación.

En un aspecto, la invención describe un método para reducir la concentración de oxalato en un sujeto mediante la administración de una composición, por ejemplo de una composición farmacéutica, que incluye cristales de oxalato-d Descarboxilasa, por ejemplo cristales de oxalato-d Descarboxilasa reticulados, tal como se describen aquí. En una realización, los cristales de oxalato-d Descarboxilasa se estabilizan con un agente reticulante, tal como glutaraldehído. La administración de la composición puede producir una reducción de la concentración de oxalato de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30% o al menos un 40% o más. En algunas realizaciones, la composición se administra vía oral o a través de un dispositivo extracorpóreo. En una realización, el dispositivo extracorpóreo consiste en un catéter, por ejemplo un catéter revestido con cristales de oxalato-d Descarboxilasa. En otras realizaciones, la composición se administra en forma de suspensión, polvo seco, cápsula o pastilla. En una realización, el método para reducir la concentración de oxalato en un mamífero incluye un paso de analizar la concentración de oxalato en una muestra biológica del mamífero, como una muestra de orina, sangre, plasma o suero.

En otro aspecto, la invención proporciona cristales de oxalato-d Descarboxilasa y/o cristales de oxalato-d Descarboxilasa estabilizados, por ejemplo reticulados, para su uso en un método para tratar, prevenir y/o mostrar la progresión de un trastorno asociado a una concentración elevada de oxalato en un mamífero mediante administración de los mismos. En una realización, el trastorno asociado a una concentración elevada de oxalato es un trastorno renal, articular, ocular, hepático, gastrointestinal o pancreático. En determinadas realizaciones, el trastorno es hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria idiopática, intoxicación por etilenglicol, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal, urolitiasis, nefrolitiasis, enfermedad renal crónica, hemodiálisis y *bypass* gastrointestinal.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que incluye cristales de oxalato-descarboxilasa, por ejemplo cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados (por ejemplo, los cristales y/o los cristales reticulados dados a conocer en este documento).

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar un mamífero, donde la composición farmacéutica incluye cristales de oxalato-descarboxilasa, por ejemplo cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados (por ejemplo los cristales y/o los cristales reticulados dados a conocer en este documento).

- 10 En otro aspecto, la invención describe métodos para producir cristales de proteínas, por ejemplo cristales de enzimas (por ejemplo cristales de oxalato-descarboxilasa) que incluyen proporcionar una preparación de extracto celular o pellas/precipitado/solución que contiene la proteína y cristalizar la proteína de las preparaciones. En algunas realizaciones, los métodos incluyen uno o más de los pasos de: cultivar un cultivo de células huésped procariotas que expresan la proteína; obtener una preparación de pellas o extractos que contienen la proteína deseada; solubilizar la preparación de pellas; permitir la formación de cristales de proteína; y/o además estabilizar los cristales por reticulación. Normalmente, la proteína se expresa por recombinación. En algunas realizaciones, la preparación de pellas incluye
- 15 cuerpos de inclusión.

- En algunas realizaciones, el paso de solubilización incluye la adición a la preparación de pellas de una o más de las siguientes soluciones: una solución que comprende una concentración moderada de desnaturizante (por ejemplo, urea o clorhidrato de guanidina, a una concentración por ejemplo entre aproximadamente 1M y aproximadamente 3M); una solución que comprende una alta concentración de sal, por ejemplo una o más sales seleccionadas entre cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio u otras sales, en una concentración por ejemplo de entre aproximadamente 0,3M y aproximadamente 0,8M; una solución que comprende una concentración moderada de desnaturizante bajo condiciones básicas, por ejemplo a un pH entre aproximadamente 9 y aproximadamente 12; o una solución que comprende una alta concentración de desnaturizante, por ejemplo entre aproximadamente 4M y aproximadamente 8M de urea o clorhidrato de guanidina.
- 20

- 25 En algunas realizaciones, el paso de purificación incluye eliminar desechos de las pellas, por ejemplo por separación, por ejemplo mediante uno o más pasos de rotación o centrifugación, de la preparación solubilizada de pellas y/o recogida del sobrenadante. Opcionalmente, el paso de purificación puede incluir además una cromatografía de intercambio iónico de la preparación solubilizada de pellas y/o un filtrado de la preparación solubilizada.

- 30 En algunas realizaciones, en el paso de cristalización se concentra la proteína purificada, formando así proteína cristalizada. En algunas realizaciones, la proteína cristalizada se obtiene del sobrenadante recogido después del paso de separación, por ejemplo después de uno o más pasos de rotación o centrifugación. Adicionalmente, el paso de cristalización puede incluir poner en contacto la proteína cristalizada con un agente reticulante, por ejemplo un agente reticulante aquí descrito (por ejemplo glutaraldehído). La concentración de agente reticulante a utilizar puede oscilar entre el 0,01% y el 20% p/v; típicamente entre el 0,02% y el 10%; más típicamente puede ser del 0,02%, el 0,5% o el
- 35 1% p/v.

- En algunas realizaciones, el rendimiento de la proteína en la preparación de las pellas es al menos de aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80% con respecto a la proteína específica hallada en la preparación celular a partir de la cual se obtiene la preparación de pellas. En otras realizaciones, el rendimiento de la proteína solubilizada es al menos del 90%, el 95% o más con respecto a la hallada en la preparación de pellas. En otras realizaciones, el rendimiento de la proteína cristalizada es al menos de un 50%, 60%, 70%, 80% con respecto a la hallada en la preparación de pellas.
- 40

La invención también describe cristales de proteínas, por ejemplo cristales de enzimas (por ejemplo cristales de oxalato-descarboxilasa) producidos mediante los métodos aquí descritos.

En las figuras adjuntas y la siguiente descripción se exponen los detalles de una o más realizaciones de la invención.

En particular, la invención proporciona el objeto reivindicado en las reivindicaciones 1-16 adjuntas.

45 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- FIG. 1: gráfico que muestra el perfil de actividad en función del pH de la oxalato-descarboxilasa soluble ("Soluble"), de cristales de oxalato-descarboxilasa ("Cristal") y de cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados ("CLEC").
- 50 FIG. 2: gráfico de barras que representa los niveles de oxalato en orina en ratas Sprague Dawley después de la administración de OXDC-CLEC. Cada barra representa la media $\pm$ ES (error estándar). Los asteriscos indican una diferencia significativa entre el grupo de control y tres grupos de tratamiento con $p < 0,05$ en el momento, utilizando una prueba t de Student de dos colas.
- FIG. 3: gráfico de barras que representa el efecto de OXDC-CLEC en la reducción de los niveles de oxalato en orina en ratones knockout (KO) AGT1 provocados con etilenglicol. Cada barra representa la media

- ± ES. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre el grupo de control y tres grupos de tratamiento con $p < 0,05$ en el momento, utilizando una prueba t de Student de dos colas.
- FIG. 4: gráfico de barras que representa el efecto de OXDC-CLEC en el aclaramiento de creatinina en ratones KO AGT1 provocados con etilenglicol. Cada barra representa la media ± ES. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre el grupo de control y un grupo de tratamiento de 80 mg con $p < 0,05$ mediante una prueba t de Student de dos colas.
- FIG. 5A-5C: imágenes que muestran la prevención de depósitos de oxalato de calcio en el parénquima renal después del tratamiento con OXDC-CLEC. La FIG. 5A es una sección de parénquima renal de ratones provocados con EG y tratados con 80 mg de OXDC-CLEC. Las FIG. 5B y 5C son secciones de parénquima renal del grupo de control. La sección de la FIG. 5B muestra una nefrocalcinosis moderada y la sección de la FIG. 5C muestra una nefrocalcinosis grave. Las manchas oscuras son depósitos de oxalato de calcio (ejemplo indicado mediante una flecha blanca), y las manchas claras son áreas con fibrosis intersticial (ejemplos indicados mediante flechas grises).
- FIG. 6: trazado de supervivencia Kaplan-Meier donde se comparan los tiempos de supervivencia de ratones provocados con EG y tratados con tres dosis diferentes de OXDC-CLEC o con un vehículo de control.
- FIG. 7: gráfico que representa la estabilidad de la oxalato-descarboxilasa soluble ("Sol"), del cristal de oxalato-descarboxilasa ("XTAL") y de cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados ("CLEC") a un pH bajo en los intervalos de tiempo indicados.
- FIG. 8: gráfico que representa la estabilidad de la oxalato-descarboxilasa soluble ("Sol"), de cristales de oxalato-descarboxilasa ("XTAL") y de cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados ("CLEC") en presencia de pepsina a pH 3,0 en los intervalos de tiempo indicados.
- FIG. 9: gráfico que representa la estabilidad de la oxalato-descarboxilasa soluble ("Sol"), de cristales de oxalato-descarboxilasa ("XTAL") y de cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados ("CLEC") en presencia de quimotripsina a pH 7,5 en los intervalos de tiempo indicados.
- FIG. 10: gráfico que representa la estabilidad de la oxalato-descarboxilasa soluble ("Sol"), de cristales de oxalato-descarboxilasa ("XTAL") y de cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados ("CLEC") en presencia de jugo intestinal simulado con pancreatina a pH 6,8 en los intervalos de tiempo indicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la administración de cristales de oxalato-descarboxilasa (OXDC) puede reducir los síntomas de la hiperoxaluria en un mamífero. Aquí se describen métodos de administración de cristales de OXDC para tratar diferentes trastornos relacionados con el oxalato. Además, se proporcionan cristales de OXDC y cristales reticulados (CLEC), así como composiciones que comprenden o utilizan los mismos. También se dan a conocer métodos para producir grandes cantidades de cristales de proteínas a partir de extractos celulares de una célula huésped procariota.

Definiciones

Con el fin de entender más fácilmente la presente invención, en primer lugar se definen ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se dan definiciones adicionales.

Tal como se utiliza aquí, una "muestra biológica" es material biológico recogido de células, tejidos, órganos u organismos, por ejemplo para detectar un analito. Ejemplos de muestras biológicas incluyen muestras de fluidos, células o tejidos. Los fluidos biológicos incluyen, por ejemplo, suero, sangre, plasma, saliva, orina o sudor. Las muestras de células o tejidos incluyen biopsias, tejidos, suspensiones celulares u otros especímenes y muestras, por ejemplo muestras clínicas.

Un "cristal" es una forma del estado sólido de la materia que comprende átomos dispuestos en un patrón que se repite periódicamente en las tres dimensiones (véase, por ejemplo, Barret, *Structure of Metals*, 2ª edición, McGraw-Hill, Nueva York (1952)). Una forma cristalina de un polipéptido en estado sólido, por ejemplo, es diferente de una segunda forma del estado sólido amorfo (los cristales muestran propiedades características, incluyendo forma, estructura reticular, porcentaje de disolvente y propiedades ópticas, por ejemplo índice de refracción).

Un "dispositivo extracorpóreo" es una estructura que no está dentro del cuerpo para poner un fluido corporal en contacto con cristales de OXDC en el tratamiento de un individuo. Preferentemente, un dispositivo extracorpóreo es un dispositivo utilizado para diálisis, incluyendo diálisis renal, un dispositivo para hemofiltración arterio-venosa continua, un oxigenador de membrana extracorpóreo, u otro dispositivo utilizado para filtrar productos de desecho de la corriente sanguínea. Del mismo modo, el concepto "dispositivo extracorpóreo" también abarca los componentes de los dispositivos para filtrar productos de desecho, incluyendo tubos, materiales porosos o membranas, por ejemplo. En particular, un dispositivo extracorpóreo puede consistir en un dispositivo de diálisis. También puede consistir en una membrana de un dispositivo de diálisis.

Un "fragmento funcional" de OXDC es una porción de un polipéptido de OXDC que mantiene una o más actividades biológicas de la OXDC, tal como la capacidad de catalizar la descarboxilación del oxalato. Tal como se utiliza aquí, un fragmento funcional puede comprender truncamientos terminales en uno o en ambos extremos, a no ser que se

especifique de forma diferente. Por ejemplo, un fragmento funcional puede tener 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15 o 30 o más residuos suprimidos del extremo amino y/o carboxilo de un polipéptido de OXDC. Preferentemente, los truncamientos no son superiores a 20 aminoácidos de uno o de los dos extremos. Un fragmento funcional puede estar unido opcionalmente a una o más secuencias heterólogas.

- 5 El término “individuo” o “sujeto” se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, de forma no exclusiva, cualquier animal clasificado como tal, incluyendo humanos, primates no humanos, babuinos, chimpancés, monos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas), conejos, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc.

- 10 El término “aislado” se refiere a una molécula que está esencialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está esencialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente celular o tisular de la que se deriva. El término se refiere a preparaciones donde la proteína aislada es suficientemente pura para ser administrada como una composición farmacéutica, o presenta una pureza de al menos un 70% a un 80% (p/p), preferentemente una pureza de al menos un 80%, 90% (p/p), de forma especialmente preferente una pureza de un 90 a un 95%, y de forma totalmente preferente una pureza de al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 100% (p/p).

- 15 Tal como se utiliza aquí, el término “aproximadamente” se refiere hasta un $\pm 10\%$ del valor calificado por dicho término. Por ejemplo, aproximadamente 50 mM se refiere a $50 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$; aproximadamente 4% se refiere a $4\% \pm 0,4\%$.

- 20 Tal como se utiliza aquí, “trastorno asociado al oxalato” se refiere a una enfermedad o trastorno asociado con niveles patológicos de ácido oxálico u oxalato, incluyendo, de forma no exclusiva, hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria idiopática, intoxicación por etilenglicol (oxalato), enfermedad idiopática por cálculos urinarios, insuficiencia renal (incluyendo insuficiencia renal progresiva, crónica o terminal), esteatorrea, malabsorción, enfermedad ileal, vulvodinia, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis quística, insuficiencia pancreática exocrina, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, nefrocalcinosis, urolitiasis y nefrolitiasis. Estos estados y trastornos pueden ser opcionalmente agudos o crónicos. En la técnica se conocen trastornos asociados al oxalato relacionados con los riñones, huesos, hígado, tracto gastrointestinal y páncreas. Además, es bien conocido que el oxalato de calcio se puede depositar en una gran variedad de tejidos, incluyendo, de forma no exclusiva, ojos, vasos sanguíneos, articulaciones, huesos, músculos, corazón y otros órganos importantes, produciendo una serie de trastornos asociados al oxalato.

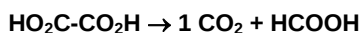
- 30 El ácido oxálico se presenta predominantemente en su forma de sal, oxalato (como sales de la base conjugada correspondiente), al pH de la orina y del fluido intestinal (pK_{a} 1,23, $\text{pK}_{\text{a}2}$ 4,19) (Earnest, Adv. Internal Medicine 24:407 427 (1979)). Los conceptos “ácido oxálico” y “oxalato” se utilizan indistintamente en la presente descripción. Las sales de oxalato que comprenden litio, sodio, potasio y hierro (II) son solubles, pero el oxalato de calcio normalmente es muy poco soluble en agua (por ejemplo, sólo se disuelven aproximadamente 0,58 mg/100 ml a 18°C (Earnest, Adv. Internal Medicine 24:407 427 (1979))). El ácido oxálico de los alimentos también se denomina oxalato dietético. El oxalato producido por procesos metabólicos se denomina oxalato endógeno. El oxalato circulante es el oxalato presente en un fluido corporal circulante, tal como la sangre.

- 35 Los conceptos “dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refieren a la cantidad de un compuesto que conduce a la prevención, el retraso de la aparición de los síntomas o a la mejoría de los síntomas de una afección relacionada con el oxalato, incluyendo hiperoxaluria, por ejemplo hiperoxaluria primaria o hiperoxaluria entérica. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz será suficiente para tratar, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición y/o reducir el riesgo de aparición de uno o más síntomas de un trastorno asociado a concentraciones elevadas de oxalato. La cantidad eficaz se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica y tal como se describe en secciones posteriores en esta descripción.

- 45 Los términos “tratamiento”, “método terapéutico” y afines se refieren al tratamiento de un trastorno existente y/o a medidas profilácticas/preventivas. Los sujetos que requieren tratamiento pueden incluir individuos que ya padecen un trastorno médico particular y también aquellos que tienen riesgo de padecer o que en última instancia pueden llegar a padecer dicho trastorno. La necesidad de tratamiento se evalúa, por ejemplo, por la presencia de uno o más factores de riesgo asociados con el desarrollo de un trastorno, la presencia o progresión de un trastorno, o la receptividad probable al tratamiento de un sujeto que padece la enfermedad. El tratamiento puede incluir ralentizar o invertir el progreso de un trastorno.

Oxalato-descarboxilasa

- 50 Tal como se utiliza aquí, el concepto “oxalato-descarboxilasa” (OXDC) (EC 4.11.2) se refiere a una enzima oxalato-carboxi-liasa. Las oxalato-descarboxilasas son un grupo de enzimas conocidas en la técnica capaces de catalizar, independientemente del oxígeno (O_2) molecular, la oxidación de oxalato en dióxido de carbono y formiato de acuerdo con la siguiente reacción:



- Dentro de esta definición se incluyen las isoformas de la oxalato-d Descarboxilasa, y las glicoformas de estas isoformas. El concepto abarca OXDC de plantas, bacterias y hongos, incluyendo oxalato-d Descarboxilasas reales de bacterias y hongos, por ejemplo de las especies *Bacillus subtilis*, *Collybia velutipes* o *Flammulina velutipes*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas sp.*, *Synechocystis sp.*, *Streptococcus mutans*, *Trametes hirsute*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *T. versicolor*, *Postia placenta*, *Myrothecium verrucaria*, *Agaricus bisporus*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus oxalaticus*, *Wautersia sp.*, *Oxalicibacterium flavum*, *Ammoniophilus oxalaticus*, *Vibrio oxalaticus*, *A. oxalativorans*, *Variovorax paradoxus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Mucor*. Opcionalmente, la OXDC dependerá adicionalmente de la coenzima A, por ejemplo OXDC de organismos del tracto gastrointestinal. En determinadas circunstancias, la OXDC es una proteína hexamérica soluble.
- 10 Las oxalato-d Descarboxilasas son producidas por plantas superiores, bacterias y hongos y tienen actividad enzimática de oxalato-carboxi- liasa. Las oxalato-d Descarboxilasas incluyen aquellas producidas por las especies *Bacillus subtilis*, *Collybia velutipes* o *Flammulina velutipes*, *Aspergillus niger*; *Pseudomonas sp.*, *Synechocystis sp.*, *Streptococcus mutans*, *Trametes hirsute*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *T. versicolor*, *Postia placenta*, *Myrothecium verrucaria*, *Agaricus bisporus*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus oxalaticus*.
- 15 *Wautersia sp.*, *Oxalicibacterium flavum*, *Ammoniophilus oxalaticus*, *Vibrio oxalaticus*, *A. oxalativorans*, *Variovorax paradoxus*, *Xanthobacter autotrophicus sp.*, *oxalativorans*, *Variovorax paradoxus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Mucor*, que se identifican generalmente como OXDC tipo cupina. Las proteínas tipo cupina son una clase amplia de proteínas que comparten determinadas características estructurales. Las OXDC, tales como las G-OXDC de *Collybia sp.*, son activas por ejemplo como glicoproteínas hexaméricas.
- 20 Las oxalato-d Descarboxilasas utilizadas para preparar el cristal y útiles en los métodos aquí descritos se pueden aislar por ejemplo de una fuente natural o se pueden derivar de una fuente natural. Tal como se utiliza aquí, el concepto “derivado de” significa que presenta una secuencia de aminácidos o de ácidos nucleicos naturalmente existente en la fuente. Por ejemplo, la oxalato- Descarboxilasa derivada de *Bacillus subtilis* incluirá una secuencia primaria de una proteína de oxalato-d Descarboxilasa de *Bacillus subtilis* o será codificada por un ácido nucleico que incluye una
- 25 secuencia presente en *Bacillus subtilis* que codifica una oxalato-d Descarboxilasa o una degenerada de ésta. Una proteína o ácido nucleico derivado de una fuente incluye moléculas aisladas de la fuente, producidas por recombinación y/o sintetizadas o modificadas químicamente. Los cristales aquí previstos se pueden formar a partir de polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos de OXDC, o de un fragmento funcional de OXDC que mantiene la actividad de degradación de oxalato. Preferentemente, la OXDC mantiene al menos una característica funcional de una OXDC de
- 30 origen natural, por ejemplo mantiene la capacidad de catalizar la degradación de oxalato, la capacidad de multimerizar y/o los requisitos de manganeso.

Oxalato-d Descarboxilasas aisladas

- Ya se han aislado oxalato-d Descarboxilasas que, en consecuencia, están disponibles de muchas fuentes, incluyendo de las especies *Bacillus subtilis*, *Collybia velutipes* o *Flammulina velutipes*, *Aspergillus niger* *Pseudomonas sp.*, *Synechocystis sp.*, *Streptococcus mutans*, *Trametes hirsute*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *T. versicolor*; *Postia placenta*, *Myrothecium verrucaria*, *Agaricus bisporus*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus oxalaticus*, *Wautersia sp.*, *Oxalicibacterium flavum*, *Ammoniophilus oxalaticus*, *Vibrio oxalaticus*, *A. oxalativorans*, *Variovorax paradoxus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Mucor*. También se pueden comprar OXDC a proveedores comerciales, por ejemplo de Sigma. Ya se han descrito previamente métodos
- 35 para aislar OXDC de una fuente natural, por ejemplo en las siguientes referencias: Tanner y col., The Journal of Biological Chemistry 47:43627-43634. (2001); Dashek, W.V. y Micales, J.A., Methods in plant biochemistry and molecular biology. Boca Raton, FL: CRC Press. 5:49-71. (1997); Magro y col., FEMS Microbiology Letters, 49: 49-52. (1988); Anand y col., Biochemistry. 41: 7659-7669. (2002); y Tanner y Bornemann, S. Journal of Bacteriology. 182: 5271-5273 (200). Estas oxalato-d Descarboxilasas aisladas pueden utilizarse para formar los cristales y para los métodos
- 40 aquí descritos.
- 45

Oxalato-d Descarboxilasa recombinante

- Alternativamente, para formar los cristales y para los métodos aquí descritos se pueden utilizar OXDC recombinantes. En algunos casos, las OXDC recombinantes incluyen o son codificadas por secuencias de una secuencia de OXDC de origen natural. Además, aquí se describen OXDC que comprenden una secuencia de aminoácidos homóloga o
- 50 esencialmente idéntica a una secuencia de origen natural. También están previstas OXDC codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o esencialmente idéntico a un ácido nucleico codificador de OXDC de origen natural, y éstas se pueden cristalizar y/o administrar tal como se describe aquí.

- Los polipéptidos calificados aquí como “recombinantes” son polipéptidos producidos por tecnologías de ADN recombinante, incluyendo aquellos generados mediante procedimientos basados en un método de recombinación artificial, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o la clonación en un vector utilizando enzimas de restricción. Los polipéptidos “recombinantes” son también polipéptidos que tienen una expresión alterada, tal como un polipéptido de origen natural con expresión modificada por recombinación en una célula, como una célula huésped.
- 55

En una realización, la OXDC se produce por recombinación a partir de un ácido nucleico que es homólogo a una secuencia de ácidos nucleicos de OXDC de *Bacillus subtilis* o *Collybia velutipes*, y en algunos casos se modifica, por ejemplo para aumentar u optimizar la producción recombinante en un huésped heterólogo. Un ejemplo de secuencia modificada de este tipo es el representado por la SEQ ID N°: 1 (ácido nucleico), que incluye la secuencia de ácidos nucleicos del marco de lectura abierta de OXDC de *Collybia velutipes* para expresión en *Candida boidinii*. La secuencia de OXDC ha sido modificada para reducir su contenido en GC, está unida a una secuencia de señal de secreción de factor de apareamiento, y está flanqueada por sitios de segmentación de endonucleasa de restricción producidos por ingeniería. En otra realización, la OXDC se produce por recombinación a partir de la SEQ ID N°:2, o de la secuencia de ácidos nucleicos de OXDC de *Bacillus subtilis* no modificada que está disponible en el GenBank con el número de acceso Z99120. La secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID N°: 2 es la representada por la SEQ ID N°: 3.

Los polipéptidos de OXDC útiles para formar cristales de OXDC pueden expresarse en una célula huésped, por ejemplo una célula huésped que comprende un constructo de ácido nucleico que incluye una secuencia codificadora de un polipéptido de OXDC o un fragmento funcional del mismo. Una célula huésped adecuada para la expresión de OXDC puede ser una célula de levadura, bacteria, hongo, insecto, planta o mamífero, por ejemplo, o de plantas transgénicas, animales transgénicos o un sistema libre de células. Preferentemente, la célula huésped es capaz de glicosilar el polipéptido de OXDC en caso necesario, de establecer enlaces disulfuro, de segregar la OXDC y/o de soportar la multimerización de polipéptidos de OXDC. Las células huésped preferentes incluyen, de forma no exclusiva, células de *E.coli* (incluyendo *E.coli* Origami B y *E.coli* BL21), *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus*, Sf9, células de ovario de hámster chino (CHO) y células 293 (riñón embrionario humano) y otras células humanas. Otros huéspedes adecuados para la producción de OXDC son plantas transgénicas y animales transgénicos, incluyendo cerdos, vacas, cabras, caballos, gallinas y conejos.

Para la producción recombinante de OXDC, el o la célula huésped debería comprender un constructo en forma de un plásmido, vector, fagémido o casete de transcripción o expresión que comprenda al menos un ácido nucleico que codifica una OXDC o un fragmento funcional de la misma. Existen diversos constructos disponibles, incluyendo aquellos que se mantienen en copia simple o copia múltiple, o que se integran en el cromosoma de la célula huésped. Muchos sistemas, componentes y reactivos para la expresión recombinante están disponibles comercialmente, por ejemplo de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA); U.S. Biological (Swampscott, MA); BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA); Novagen (Madison, WI); Siratagene (La Jolla, CA); y Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), (Braunschweig, Alemania).

La expresión recombinante de OXDC se controla opcionalmente mediante un promotor heterólogo, incluyendo un promotor constitutivo y/o inducible. También son apropiados promotores tales como T7, el promotor de alcohol-oxidasa (AOX), promotores de dihidroxi-acetona-sintasa (DAS), el promotor Gal 1, 10, el promotor de fosfoglicerato-quinasa, el promotor de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, el promotor de alcohol-deshidrogenasa, el promotor de cobre metalotioneína (CUP1), el promotor de fosfatasa ácida, CMV y promotores polihedrina arE. El promotor particular se selecciona en función del huésped o de la célula huésped. Además, también se pueden utilizar, por ejemplo, promotores inducibles por metanol, sulfato de cobre, galactosa, mediante fosfato bajo, por alcohol, por ejemplo etanol, bien conocidos en la técnica.

Un ácido nucleico que codifica la OXDC puede comprender opcionalmente secuencias heterólogas. Por ejemplo, en algunas realizaciones se incluye una secuencia de secreción en el N-terminus de un polipéptido de OXDC. Pueden resultar útiles secuencias de señal tales como las de un factor de apareamiento, BGL2, fosfatasa ácida de levadura (PHO), xilanasas, alfa-amilasa, de otras proteínas segregadas por levadura, y péptidos señal de secreción derivados de otras especies capaces de dirigir la secreción de la célula huésped. Del mismo modo, otras secuencias heterólogas tales como engarces (por ejemplo, engarces que comprenden un sitio de endonucleasa de segmentación o restricción) y uno o más elementos de control de expresión, una secuencia intensificadora, una secuencia de terminación, una secuencia líder y una o más señales de traducción, también entran dentro del alcance de esta descripción. Estas secuencias se pueden incluir opcionalmente en un constructo y/o unir al ácido nucleico que codifica OXDC. A no ser que se especifique otra cosa, las secuencias "unidas" pueden estar asociadas entre sí directa o indirectamente.

Del mismo modo, un epitopo o marcador de afinidad tal como histidina, HA (péptido de hemaglutinina), proteína de unión de maltosa, AviTag®, FLAG, o glutatión-S-transferasa, también puede estar opcionalmente unido al polipéptido de OXDC. Opcionalmente, un marcador se puede segmentar de la OXDC después de producir o purificar ésta. El experto puede seleccionar fácilmente secuencias heterólogas apropiadas, por ejemplo, combinar la célula huésped, el constructo, el promotor y/o la secuencia señal de secreción.

Los homólogos o variantes de OXDC se diferencian de una secuencia de OXDC de referencia en uno o más residuos. Por ejemplo, los aminoácidos estructuralmente similares se pueden sustituir por algunos de los aminoácidos especificados. Los aminoácidos estructuralmente similares incluyen: (I, L y V); (F e Y); (K y R), (Q y N); (D y E); y (G y A). Los homólogos de OXDC aquí descritos también incluyen la delección, adición o sustitución de aminoácidos. Estos homólogos y variantes incluyen (i) variantes polimórficas y mutantes naturales o artificiales, (ii) polipéptidos modificados donde uno o más residuos están modificados, y (iii) mutantes que comprenden uno o más residuos modificados.

Un polipéptido o un ácido nucleico de OXDC es "homólogo" (o es un "homólogo") si tiene al menos una identidad de secuencia con la secuencia de referencia de un 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100%. Si el homólogo no es idéntico a la secuencia de referencia, se trata de una "variante". Un homólogo es "esencialmente idéntico" a una secuencia de OXDC de referencia si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos del homólogo se diferencia de la secuencia de referencia (por ejemplo por truncamiento, delección, sustitución o adición) en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20 o 50 residuos y mantiene (o codifica un polipéptido que mantiene) la capacidad para catalizar la degradación de oxalato. Los fragmentos de la oxalato-descarboxilasa pueden ser homólogos, incluyendo variantes y/o secuencias esencialmente idénticas. Por ejemplo, los homólogos se pueden derivar de diversas fuentes de OXDC o se pueden derivar de una secuencia de referencia o estar relacionados con ésta mediante mutación por truncamiento, delección, sustitución o adición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos de alineación estándar, por ejemplo Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito por Altschul y col., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990), el algoritmo de Needleman y col., J. Mol. Biol., 48:444-453 (1970), o el algoritmo de Meyers y col., Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988). Estos algoritmos están incorporados en los programas BLASTN, BLASTP, y "BLAST 2 Sequences" (examinados en McGinnis y Madden, Nucleic Acids Res. 32:W20-W25, 2004). Si se utilizan estos programas, se pueden emplear los parámetros por defecto. Por ejemplo, para secuencias de nucleótidos se pueden utilizar los siguientes ajustes para "BLAST 2 Sequences": programa BLASTN, premio por apareamiento 2, penalización por desapareamiento 2, penalizaciones por intervalo abierto e intervalo de ampliación 5 y 2, respectivamente, intervalo x_dropoff 50, previsto 10, tamaño de palabra 11, filtro ON. Para las secuencias de aminoácidos se pueden utilizar los siguientes ajustes para "BLAST 2 Sequences": programa BLASTP, matriz BLOSUM62, penalizaciones por intervalo abierto e intervalo de ampliación 11 y 1, respectivamente, intervalo x_dropoff 50, previsto 10, tamaño de palabra 3, filtro ON. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos para OXDC que son apropiadas para formar los cristales aquí descritos pueden incluir secuencias homólogas, variantes o esencialmente idénticas.

Purificación de oxalato-descarboxilasa

Las proteínas o polipéptidos de oxalato-descarboxilasa se pueden purificar a partir de la fuente, tal como una fuente natural o recombinante, antes de la cristalización. Un polipéptido que aquí se designa como "aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de su entorno natural, como proteínas, lípidos y/o ácidos nucleicos de su fuente de origen (por ejemplo células, tejido (por ejemplo tejido vegetal), o fluidos o medios (en caso de un polipéptido segregado)). Los polipéptidos aislados incluyen los obtenidos mediante los métodos aquí descritos u otros métodos adecuados y comprenden polipéptidos sustancialmente puros o esencialmente puros y polipéptidos producidos mediante síntesis química, mediante producción recombinante o por combinaciones de métodos biológicos y químicos. Opcionalmente, una proteína aislada se somete a procesos adicionales después de su producción, por ejemplo pasos de purificación.

La purificación puede comprender el intercambio de un tampón y pasos cromatográficos. Opcionalmente se puede emplear un paso de concentración, por ejemplo por diálisis, cromatografía por cromatoenfoco, y/o asociada con intercambio de tampón. En ciertos casos se puede emplear una cromatografía de intercambio catiónico o aniónico para la purificación, incluyendo cromatografía por Q-sepharose, DEAF sepharose, DE52, sulfopropil sepharose o una columna de intercambio catiónico CM52 o similar. Opcionalmente, un intercambio de tampón precede a la separación cromatográfica y se puede llevar a cabo mediante filtración de flujo tangencial, por ejemplo diafiltración. En determinadas preparaciones, la OXDC tiene una pureza de al menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% o 99,9%.

La purificación en pasadas a escala de gramos es apropiada para preparar OXDC, optimizándose procedimientos para una purificación de OXDC eficiente y económica a escala de fabricación. Por ejemplo, está prevista una purificación de al menos 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1.000 gramos o más de OXDC en un procedimiento de purificación. En un ejemplo de procedimiento, está prevista una filtración de flujo tangencial de muestras iniciales de al menos 10 l, 50 l, 100 l, 500 l, 1.000 l o más, permitiendo el intercambio de tampón y la precipitación de proteínas contaminantes. Opcionalmente se utiliza una columna de Q-sepharose simple para la purificación de OXDC.

La cristalización de OXDC purificada también puede eliminar contaminantes, por ejemplo para purificar adicionalmente preparaciones de OXDC. Por ejemplo, la OXDC cristalizada descrita en los Ejemplos 2-6 tiene niveles reducidos de contaminantes de bajo peso molecular en comparación con la OXDC purificada soluble. En algunos aspectos, los contaminantes con un masa medida (espectroscopía de masas por ionización de desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS)) de 0-10 kDa, 1-10 kDa, 0,5-5 kDa o 2-5 kDa se excluyen selectivamente de la forma cristalina. Por ejemplo, los contaminantes con masas medidas de aproximadamente 2,5, 3,0, 3,7, 3,8, 4,0, 4,2 o 5,0 kDa se pueden eliminar esencialmente por cristalización. La purificación por cristalización se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, una oxalato-descarboxilasa cruda que contiene medios de fermentación.

Cristalización de oxalato-descarboxilasa

Los cristales de oxalato-descarboxilasa se pueden preparar utilizando un polipéptido de OXDC, como un hexámero, tal como se describe más arriba (véase Anand y col., Biochemistry 41:7659-7669 (2002)). Es posible utilizar difusión de vapor (por ejemplo métodos de gota pendiente y de gota sobre superficie) y métodos de cristalización por lotes, por ejemplo. Los cristales de oxalato-descarboxilasa se pueden desarrollar por cristalización controlada de la proteína a

partir de una solución acuosa o de una solución acuosa que incluye disolventes orgánicos. Las condiciones a controlar incluyen, por ejemplo, la tasa de evaporación del disolvente, la presencia de co-solutos y tampones apropiados, el pH y la temperatura.

5 Para la administración terapéutica, por ejemplo para tratar una afección o trastorno relacionado con los niveles de oxalato, son apropiados diversos tamaños de cristales de OXDC. En determinadas realizaciones se administran cristales con un tamaño medio inferior a aproximadamente 500 μm . También están previstos cristales de oxalato-d Descarboxilasa con un tamaño medio, máximo o mínimo (por ejemplo) de una longitud de aproximadamente 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 1.000 μm . Las duchas microcristalinas también son adecuadas.

10 Los rangos apropiados serán evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, los cristales de proteína pueden tener una longitud máxima de entre aproximadamente 0,01 μm y aproximadamente 500 μm , alternativamente de entre 0,1 μm y aproximadamente 50 μm . En una realización particular, la longitud máxima oscila entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 10 μm . Además, la forma de los cristales se puede seleccionar entre esferas, agujas, barras, placas, como hexágonos y cuadrados, romboides, cubos, bipirámides y prismas. En realizaciones ilustrativas, los cristales son cubos con una longitud máxima inferior a 5 μm .

15 En general, los cristales se producen combinando la proteína a cristalizar con un disolvente acuoso apropiado o con un disolvente acuoso que contiene agentes de cristalización apropiados, tales como sales o disolventes orgánicos. El disolvente se combina con la proteína y opcionalmente se agita a una temperatura, determinada experimentalmente, apropiada para inducir la cristalización y aceptable para mantener la actividad y estabilidad de la proteína. El disolvente puede incluir opcionalmente co-solutos, tales como cationes monovalentes o divalentes, cofactores o agentes caotrópicos, así como especies tampón para controlar el pH. Para facilitar la cristalización, la necesidad de co-solutos y su concentración se determina experimentalmente. En un proceso a escala industrial, la precipitación controlada que conduce a la cristalización puede llevarse a cabo mediante la combinación de la proteína, el precipitante, co-solutos y opcionalmente tampones en un proceso por lotes, por ejemplo. Es posible adoptar métodos y condiciones de cristalización en laboratorio adicionales, tales como diálisis o difusión de vapor (McPherson y col., *Methods Enzymol.* 114:112-20 (1985) y Gilliland, *Crystal Growth* 90:51.-59 (1998)). En ocasiones, una incompatibilidad entre el agente reticulante y el medio de cristalización puede requerir un cambio de tampón (disolvente) antes de la reticulación.

30 Tal como se expone en los ejemplos, la oxalato-d Descarboxilasa cristaliza bajo diversas condiciones, incluyendo un amplio intervalo de pH (por ejemplo pH 3,5 a 8,0). En algunas realizaciones descritas se incluye un precipitante, tal como polietilenglicol (por ejemplo PEG 200, PEG 400, PEG 600, PEG 1000, PEG 2000, PEG 3000, PEG 8000 [véanse los Ejemplos 7 y 8]) o un co-disolvente orgánico, tal como 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD). Las sales habituales a utilizar incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato amónico, acetato de zinc, etc.

35 La oxalato-d Descarboxilasa puede estar presente en una concentración de, por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/ml o más en el medio de cristalización. La eficiencia o rendimiento de la reacción de cristalización es de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. En una realización se desarrollan o producen cristales de oxalato-d Descarboxilasa mediante un proceso por lotes donde una solución de oxalato-d Descarboxilasa se mezcla con un tampón apropiado. En determinadas realizaciones, el tampón consiste en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 y NaCl 100 mM con cisteína-HCl 2 mM.

Cristalización a partir de células o extractos celulares

40 Los cristales se pueden preparar directamente a partir de células o extractos celulares crudos. En una realización se recolectan células bacterianas que expresan la oxalato-d Descarboxilasa. Las células se resuspenden, con o sin DNasa, y se homogeneizan. Después se añade una solución salina a la lisis celular para alcanzar una concentración de sal de aproximadamente 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M o más. La sal añadida puede ser una sal de sodio, de potasio, de calcio u otras. Opcionalmente se pueden extraer las proteínas de la mezcla celular retirando los residuos celulares. En una realización, la mezcla celular homogeneizada se centrifuga, quedando las proteínas en la solución sobrenadante. Los cristales se generan reduciendo la concentración de sal de la mezcla celular o de la solución proteica. En una realización, se elimina la sal por diálisis para mantener la concentración de proteínas. Para aumentar el rendimiento de la cristalización, la solución de proteínas se puede concentrar antes de reducirse la concentración de sal de la solución. Los cristales se pueden generar en una solución a pH de aproximadamente 6, 7 u 8.

50 Los cristales se pueden preparar a partir de un precipitado o pella de proteínas. En una realización se recolectan las células que expresan las proteínas deseadas y la proteína de oxalato-d Descarboxilasa se recoge en un precipitado o pella. La pella o precipitado que contiene proteína de oxalato-d Descarboxilasa se solubiliza en una solución salina. Los cristales se forman reduciendo la concentración de sal en la solución proteica. Para conseguir un rendimiento de cristalización elevado, la concentración de sal en la solución proteica solubilizada es al menos 0,3M, 0,4M, 0,5M o más antes de que se reduzca para producir cristales.

55 También se pueden preparar los cristales a partir de una solución de proteína. En una realización, se concentra una solución proteica de oxalato-d Descarboxilasa en una solución salina y los cristales se forman al reducir la concentración

de sal en la solución. Para lograr rendimientos de cristalización elevados, la concentración de sal es al menos 0,3M, 0,4M, 0,5M o más antes de que se reduzca para producir cristales.

Cristales estabilizados

Una vez desarrollados los cristales de oxalato-descarboxilasa en un medio adecuado, éstos se pueden estabilizar opcionalmente, por ejemplo mediante reticulación. La reticulación conduce a una estabilización de la red cristalina mediante la introducción de enlaces covalentes entre las moléculas proteicas que constituyen el cristal. Esto posibilita la transferencia de la proteína a un entorno alternativo que en otro caso podría ser incompatible con la presencia de la red cristalina o incluso con la presencia de proteína intacta. Los cristales de oxalato-descarboxilasa se pueden reticular, por ejemplo, con grupos lisina-amina, grupos tiol (sulfhidrilo) y fracciones de carbohidratos. Los cristales reticulados también se denominan aquí "OXDC-CLEC", "CLEC-OXDC" o "CLEC".

Un cristal reticulado puede alterar la estabilidad enzimática (por ejemplo pH, temperatura, estabilidad mecánica y/o química), el perfil de pH de la actividad de OXDC, la solubilidad, la uniformidad del tamaño o el volumen de los cristales, la tasa de liberación de enzima del cristal, y/o el tamaño de poro y la forma entre moléculas enzimáticas individuales en la red cristalina subyacente.

Ventajosamente, la reticulación o estabilización de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo de modo que los cristales comprenden una OXDC que tiene una actividad de un 60%, 80%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% o superior en comparación con una OXDC soluble. La estabilidad se puede aumentar al menos en un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% o más en comparación con una OXDC soluble. La estabilidad se puede medir bajo condiciones de almacenamiento, tales como estabilidad de pH, estabilidad de temperatura, estabilidad frente a proteasas intestinales, estabilidad de disolución y estabilidad biológica *in vivo*, por ejemplo.

En algunas realizaciones, la reticulación ralentiza la disolución de los polipéptidos de OXDC en el cristal en solución, inmovilizando efectivamente las moléculas de proteína en las partículas microcristalinas. Al exponerse a un activador en el entorno que rodea los cristales de proteína reticulados, por ejemplo bajo condiciones de uso en lugar de condiciones de almacenamiento, las moléculas de proteína se disuelven lentamente, liberando el polipéptido de OXDC activo y/o aumentando la actividad de OXDC. La velocidad de disolución se controla, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes factores: el grado de reticulación, el tiempo de exposición de los cristales de proteína al reticulante, la velocidad de adición del agente reticulante a los cristales proteicos, la naturaleza del reticulante, la longitud de cadena del reticulante, el pH, la temperatura, la presencia de reactivos sulfhidrilo como cisteína, glutatión, el área superficial de los cristales proteicos reticulados, el tamaño de los cristales proteicos reticulados, y su forma.

La reticulación se puede lograr utilizando un agente reticulante seleccionado entre una amplia variedad de agentes reticulantes o una combinación de los mismos, incluyendo un agente multifuncional, de forma simultánea (en paralelo) o secuencial. Al exponerse a un activador en el entorno que los rodea, o durante un período de tiempo determinado, los enlaces de reticulación entre los cristales de proteína reticulados con dichos agentes reticulantes multifuncionales disminuyen o se debilitan, lo que conduce a la disolución de las proteínas o a la liberación de la actividad. Alternativamente, los enlaces se pueden romper en el punto de unión, lo que conduce a la disolución de proteínas o a la liberación de actividad. Véanse las patentes US 5.976.529 y 6.140.475.

En algunas realizaciones, el agente reticulante es un agente reticulante multifuncional con al menos 2, 3, 4, 5 o más fracciones activas. En diversas realizaciones, el agente se selecciona de entre glutaraldehído, succinaldehído, octanodialdehído, glioxal, ditiobis(succinimidilpropionato), 3,3'-ditiobis(sulfosucinimidilpropionato), dimetil 3,3'-ditiobispropionimidato-HCl, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato, hexametilendiamina, diaminoctano, etilendiamina, anhídrido succínico, anhídrido fenilglutárico, salicilaldehído, acetimidato, formalina, acroleína, semialdehído succínico, butiraldehído, dodecildehído, gliceraldehído y *trans*-oct-2-enal.

Otros agentes reticulantes multifuncionales adicionales incluyen halotriazinas, por ejemplo cloruro cianúrico; halopirimidinas, por ejemplo 2,4,6-tricloro/bromo-pirimidina; anhídridos o haluros de ácidos mono o dicarboxílicos alifáticos o aromáticos, por ejemplo anhídrido maleico, cloruro de (met)acrilolilo, cloruro de cloroacetilo; compuestos de N-metilol, por ejemplo N-metilol cloroacetamida; diisocianatos o diisotiocianatos, por ejemplo fenilen-1,4-diisocianato y aziridinas. Otros agentes reticulantes incluyen epóxidos, por ejemplo diepóxidos, triepóxidos y tetraepóxidos. En una realización, el agente reticulante es glutaraldehído, un agente bifuncional, y el glutaraldehído se utiliza solo o en secuencia con un epóxido. También se pueden utilizar otros reactivos reticulantes (véase, por ejemplo, el catálogo de 1996 de Pierce Chemical Company) de forma simultánea (en paralelo) o secuencial con agentes reticulantes reversibles, tales como los descritos más abajo.

De acuerdo con una realización alternativa de esta invención, la reticulación se puede llevar a cabo utilizando agentes reticulantes reversibles, en paralelo o de forma secuencial. Los cristales de proteína reticulados resultantes se caracterizan por un engarce multifuncional reactivo en el que está incorporado un activador como grupo independiente. La funcionalidad reactiva participa en la unión entre sí de las cadenas laterales de aminoácidos reactivas en una proteína y el activador consiste en un enlace que se puede romper alterando una o más condiciones del entorno (por ejemplo el pH, presencia de agente reductor, temperatura o actividad de agua termodinámica).

El agente reticulante puede ser homofuncional o heterofuncional. La funcionalidad (o fracción) reactiva se puede elegir, por ejemplo, de entre los siguientes grupos funcionales (donde R, R', R'' y R''' pueden ser grupos alquilo, arilo o hidrógeno):

- I. Donadores acilo reactivos, por ejemplo: ésteres carboxilato RCOOR' , amidas RCONHR' , acilazidas RCON_3 , carbodiimidas $\text{R-N=C=N-R}'$, ésteres de N-hidroximida $\text{RCO-O-NR}'$, imidoésteres R-C=NH_2 (OR'), anhídridos $\text{RCO-O-COR}'$, carbonatos $\text{RO-CO-O-R}'$, uretanos $\text{RNHCONHR}'$, haluros de ácidos RCOHal (siendo Hal =halógeno), acilhidrazidas RCONNR' , y O acilisoureas $\text{RCO-O-C=NR}'(\text{NR}''\text{R}''')$.
- II. Grupos carbonilo reactivos, por ejemplo: aldehídos RCHO y cetonas RCOR' , acetales $\text{RCO}(\text{H}_2\text{R}')^2$ y cetales $\text{KR}'\text{CO}_2\text{R}''$ (algunos grupos funcionales que contienen carbonilo reactivo conocidos por los expertos en la técnica de la inmovilización y reticulación de proteínas están descritos en la literatura (Pierce Catalog and Handbook, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. (1994); S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1991));
- III. Donadores de alquilo o arilo, por ejemplo: haluros de alquilo o arilo R-Hal , azidas R-N_3 , ésteres sulfato $\text{RSO}_3\text{R}'$, ésteres fosfato $\text{RPO}(\text{OR}')_3$, sales de alquiloxonio R_3O^+ , sulfonio R_3S^+ , ésteres nitrato RONO_2 , aceptores de Michael $\text{RCR}'=\text{C}=\text{COR}''$, fluoruros de arilo ArF , isonitrilos $\text{RN}=\text{C-}$, haloaminas $\text{R}_2\text{N-Hal}$, alquenos y alquinos;
- IV. Grupos que contienen azufre, por ejemplo: disulfuros RSSR' , sulfhidrilos RSH y epóxidos $\text{R}_2\text{C}\Delta^{\text{O}}\text{CR}'_2$; y
- V. Sales, por ejemplo: sales de alquil- o aril-amonio R_4N^+ , carboxilato RCOO^- , sulfato ROSO_3^- , fosfato ROPO_3^- , y aminas R_3N .

Los agentes reticulantes reversibles comprenden por ejemplo un activador. Los activadores incluye alquilo, arilo u otra cadena con un grupo activador que puede reaccionar con la proteína a reticular. Estos grupos reactivos pueden ser cualquiera de una variedad de grupos, tales como aquellos susceptibles de desplazamiento nucleófilo, de radicales libres o electrófilo, incluyendo haluros, aldehídos, carbonatos, uretanos, xantanos y epóxidos, entre otros. Por ejemplo, los grupos reactivos pueden ser lábiles a los ácidos, bases, fluoruros, enzimas, reducción, oxidación, tioles, metales, fotólisis, radicales o calor.

En T.W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons (Eds.) (1981) se describen otros ejemplos de agentes reticulantes reversibles. En un reticulante adecuado para producir cristales de proteína reticulados capaces de una solubilización controlada reversible se puede incorporar cualquier estrategia para la protección reversible de grupos. En el análisis de Waldmann de esta materia, en Angewante Chemie Int. Ed. Engl., 35:2056 (1996), se citan diversas propuestas.

Otros tipos de agentes reticulantes reversibles son reticulantes que contienen enlaces disulfuro. El activador que rompe los enlaces de reticulación formados por estos agentes reticulantes es la adición de un agente reductor, como cisteína, al entorno de los cristales proteicos reticulados. En Pierce Catalog and Handbook (1994-1995) se describen ejemplos de agentes reticulantes disulfuro. En la patente US nº 6.541.606 se dan a conocer ejemplos de estos reticulantes y métodos correspondientes.

Además, también se pueden utilizar agentes reticulantes que producen una reticulación entre fracciones carbohidrato o entre una fracción carbohidrato y un aminoácido.

La concentración de agente reticulante puede oscilar entre aproximadamente el 0,01% y el 20%, entre aproximadamente el 0,02% y el 10%, o entre aproximadamente el 0,05% y el 5% p/v en solución. Normalmente, el agente reticulante está en una concentración de aproximadamente el 0,5% o aproximadamente el 1% p/v. Por ejemplo, la concentración de agente reticulante puede ser de aproximadamente el 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 3,5%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, o 20% p/v en solución [véase la Tabla 2 en los ejemplos]. Puede ser necesario cambiar los tampones antes de la reticulación. Opcionalmente, los cristales, incluyendo CLEC, se pueden liofilizar o formular de otro modo.

Los cristales, incluyendo el cristal reticulado aquí descrito, son útiles en los métodos de tratamiento y en los métodos para reducir los niveles de oxalato aquí descritos. Los cristales de OXDC también son útiles en métodos relacionados con procesos industriales (por ejemplo síntesis, procesamiento, biorreparación, desinfección, esterilización) y en métodos para tratar plantas, como en caso de micosis vegetales, por ejemplo tal como se analiza en Svedruzic y col., Arch. Biochem. Biophys. 433: 176-192(2005). Algunas de estas aplicaciones no terapéuticas de la OXDC soluble o amorfa se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 5.866.778, 6.218.134, 6.229.065, 6.235.530 y 6.503.507. Los cristales aquí descritos pueden destinarse a tales usos gracias una o más propiedades de los cristales de OXDC estabilizados arriba descritos, tal como una estabilidad elevada de la enzima oxalato-descarboxilasa.

Secado de cristales de oxalato-descarboxilasa

Los cristales de oxalato-descarboxilasa se secan por la eliminación de agua, del disolvente orgánico o del polímero líquido mediante medios que incluyen secado con N_2 , aire o gases inertes, secado en estufa de vacío, liofilización, lavado con un disolvente orgánico volátil seguido de evaporación del disolvente, evaporación en campana extractora, secado en bandeja, secado en lecho fluidizado, secado por pulverización, secado en vacío o secado por rodillo. Normalmente, el secado se alcanza cuando los cristales se convierten en un polvo fluido. El secado se puede llevar a

cabo haciendo pasar una corriente de gas sobre los cristales húmedos. El gas se puede seleccionar de entre el grupo consistente en nitrógeno, argón, helio, dióxido de carbono, aire o combinaciones de los mismos.

- En principio, los cristales secos se pueden preparar por liofilización. Sin embargo, esta técnica implica un enfriamiento rápido del material y sólo se puede aplicar a productos resistentes a la congelación. En una realización, la solución acuosa que contiene una oxalato-d Descarboxilasa cristalina primero se congela a una temperatura entre -40 y ~50°C y después se retira bajo vacío.

Producción de cristales de oxalato-d Descarboxilasa o formulaciones o composiciones que los contienen

En un aspecto se dan a conocer cristales de oxalato-d Descarboxilasa, o formulaciones o composiciones que comprenden dichos cristales. Estas composiciones se pueden preparar de acuerdo con el siguiente proceso:

- 10 En primer lugar, la oxalato-d Descarboxilasa se cristaliza. A continuación se añaden directamente al licor madre excipientes o ingredientes seleccionados entre azúcares, alcoholes de azúcar, agentes de aumento de viscosidad, agentes humectantes o solubilizantes, sales tampón, agentes emulsionantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes y agentes de revestimiento. Alternativamente, el licor madre se retira, tras lo cual los cristales se suspenden en una solución de excipiente durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 24 horas. La concentración de excipiente oscila normalmente entre aproximadamente el 0,01 y aproximadamente el 10% (p/p). La concentración de ingrediente oscila entre aproximadamente el 0,01 y aproximadamente el 90% (p/p). La concentración de cristal oscila entre aproximadamente el 0,01 y aproximadamente el 99% (p/p).

- Después, el licor madre se retira de la suspensión espesa de cristales por filtración o centrifugación. A continuación, los cristales se lavan opcionalmente con soluciones de aproximadamente un 50 a un 100% (p/p) de uno o más disolventes orgánicos, por ejemplo etanol, metanol, isopropanol o acetato de etilo, a temperatura ambiente o a temperaturas entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 25°C.

- Luego se secan los cristales haciendo pasar una corriente de nitrógeno, aire o gas inerte sobre los mismos. Alternativamente, los cristales se secan mediante secado por aire, por pulverización, liofilización o secado en vacío. El secado se lleva a cabo durante un mínimo de aproximadamente 1 hora y un máximo de aproximadamente 72 horas después del lavado, hasta que el contenido de humedad del producto final sea inferior a aproximadamente el 10% en peso, de forma especialmente preferente inferior a aproximadamente el 5% en peso. Finalmente se puede llevar a cabo una micronización (reducción del tamaño) de los cristales, en caso necesario.

- De acuerdo con una realización de esta invención, cuando se preparan cristales de oxalato-d Descarboxilasa o formulaciones o composiciones que los contienen, durante la cristalización no se añaden potenciadores, como agentes tensioactivos. Los excipientes o ingredientes se añaden al licor madre después de la cristalización a una concentración de entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 10% (p/p), alternativamente a una concentración entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 25% (p/p), alternativamente en una concentración entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 50% (p/p). El excipiente o ingrediente se incubaba con los cristales en el licor madre durante un tiempo de aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 horas, alternativamente la incubación se lleva a cabo durante un tiempo entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 12 horas, alternativamente la incubación se lleva a cabo durante un tiempo entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 24 horas.

En otra realización de la invención, el ingrediente o excipiente se disuelve en una solución diferente del licor madre y los cristales se retiran del licor madre y se suspenden en la solución de ingrediente o excipiente. Las concentraciones del ingrediente o excipiente y los tiempos de incubación son iguales a los arriba descritos.

- 40 Otra ventaja de la presente invención consiste en que los cristales de oxalato-d Descarboxilasa, o las formulaciones basadas en éstos, encapsulados dentro de soportes poliméricos para formar composiciones que comprenden microesferas se pueden secar por liofilización. La liofilización o criodesecación permite separar el agua de la composición. La composición de cristales de oxalato-d Descarboxilasa primero se congela y después se coloca en alto vacío. En vacío, el agua cristalina se sublima y abandona la composición de cristales de oxalato-d Descarboxilasa, conteniendo únicamente el agua firmemente unida. Además, este proceso estabiliza la composición y facilita el almacenamiento y transporte a temperatura ambiente habitual.

- El secado por pulverización permite separar agua de la preparación cristalina. Es sumamente adecuado para la producción continua de sólidos secos en forma de polvo, granulado o aglomerado a partir de materias primas líquidas, como soluciones, emulsiones y suspensiones bombeables. En el secado por pulverización, la materia prima líquida se atomiza en una pulverización de pequeñas gotas y las gotas se ponen en contacto con aire caliente en una cámara de secado. Las pulverizaciones se producen mediante atomizadores giratorios (de rueda) o de boquilla. La evaporación de humedad de las gotas y la formación de partículas secas se desarrollan bajo condiciones de temperatura y corriente de aire controladas. Para las operaciones de secado por pulverización se requieren temperaturas relativamente altas. No obstante, en general los daños causados por calor en los productos son pequeños, debido a un efecto de enfriamiento por evaporación durante el período de secado crítico y porque el tiempo posterior de exposición a altas temperaturas del material seco puede ser muy corto. La cámara de secado descarga el polvo de forma continua. Las condiciones de

funcionamiento y el diseño de la secadora se seleccionan en función de las características de secado del producto y de la especificación del polvo. El secado por pulverización es un proceso ideal cuando el producto final ha de cumplir unas normas de calidad precisas en cuanto a la distribución del tamaño de partícula, contenido de humedad residual, densidad aparente y forma de partícula.

5 Composiciones

Los cristales de OXDC, incluyendo los cristales reticulados, se proporcionan en forma de una composición, tal como una composición farmacéutica (véase, por ejemplo, la patente US nº 6.541.606, que describe formulaciones y composiciones de cristales proteicos). Las composiciones farmacéuticas que comprenden cristales de OXDC incluyen cristales de OXDC con uno o más ingredientes o excipientes, incluyendo, de forma no exclusiva, azúcares y polímeros biocompatibles. La American Pharmaceutical Association y la Pharmaceutical Society of Great Britain describen conjuntamente ejemplos de excipientes en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, y más abajo se exponen otros ejemplos.

La enzima OXDC se puede administrar como un cristal en una composición en cualquiera de una variedad de formas de sales fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo farmacéutico y/o aditivo aceptable como parte de una composición farmacéutica. Los expertos en la técnica conocen bien las formas de sales fisiológicamente aceptables y las técnicas y excipientes de formulación farmacéutica estándar (véase, por ejemplo, Physician's Desk Reference (PDR) 2003, 57 edición, Medical Economics Company, 2002; y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, editores Gennado y col., 20 edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000). Para los fines de esta solicitud, el término "formulaciones" incluye "formulaciones de cristales".

La oxalato-d Descarboxilasa útil en los métodos de esta invención se puede combinar con un excipiente. De acuerdo con esta invención, el "excipiente" actúa como material de carga o como una combinación de materiales de carga a utilizar en una composición farmacéutica. A continuación se dan ejemplos de ingredientes y excipientes a utilizar en las composiciones.

Polímeros biocompatibles: Los polímeros biocompatibles son polímeros que son no antigénicos (cuando no se utilizan como adyuvantes), no carcinógenos, no tóxicos y que no son inherentemente incompatibles de otro modo con los organismos vivos, y que pueden ser utilizados en las composiciones de cristal de OXDC aquí descritas. Como ejemplos se incluyen: ácido (poli)acrílico, (poli)cianoacrilatos, (poli)aminoácidos, (poli)anhídridos, (poli)depsipéptidos, (poli)ésteres tales como ácido (poli)láctico PLA, ácido (poli)glicólico o PLGA, (poli)β-hidroxibutirato, (poli)caprolactona y (poli)dioxanona; (poli)etilenglicol, (poli)(hidroxipropil)-metacrilamida, (poli)[(organo)fosfaceno], (poli)(ortoésteres), alcohol (poli)(vinílico), (poli)vinilpirrolidona, copolímeros de anhídrido maleico - alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

Polímeros biodegradables, es decir, las composiciones de cristal de OXDC pueden incluir polímeros que se degradan por hidrólisis o solubilización. La degradación puede ser heterogénea (se produce principalmente en la superficie de la partícula) u homogénea (la degradación se produce uniformemente por toda la matriz polimérica).

Las composiciones de cristal de OXDC pueden incluir ingredientes tales como uno o más excipientes, o ingredientes o excipientes farmacéuticos. Los ingredientes pueden ser ingredientes inertes o activos.

Métodos para tratar trastornos asociados al oxalato con cristales de OXDC.

Los métodos de la invención comprenden la administración de una oxalato-d Descarboxilasa, por ejemplo cristales de OXDC o formas reticuladas de los mismos, a un individuo mamífero, para tratar, prevenir o reducir el riesgo de aparición de una afección asociada a niveles elevados de oxalato. Los niveles elevados de oxalato se pueden detectar, por ejemplo, en una muestra biológica del sujeto, por ejemplo un fluido corporal, incluyendo orina, sangre, suero o plasma. En determinadas realizaciones se detectan los niveles de oxalato en orina. Los cristales y/o las composiciones que comprenden cristales se pueden administrar mediante los métodos aquí descritos.

En algunas realizaciones se proporcionan métodos para tratar la hiperoxaluria en individuos con hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria causada por intervención quirúrgica, hiperoxaluria idiopática, oxalosis. En otros casos, ciertos trastornos renales, óseos, hepáticos, del tracto gastrointestinal y páncreas relacionados con un nivel elevado de oxalato pueden tratarse con los métodos aquí descritos. Otros trastornos o enfermedades tratados con los métodos que aquí se proporcionan incluyen, de forma no exclusiva, intoxicación por etilenglicol (oxalato), enfermedad idiopática por cálculos urinarios, insuficiencia renal (incluyendo insuficiencia renal progresiva, crónica o terminal), esteatorrea, malabsorción, enfermedad ileal, vulvodinia, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis quística, insuficiencia pancreática exocrina, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, nefrocalcinosis, osteoporosis, urolitiasis y nefrolitiasis. Estos estados y trastornos pueden ser opcionalmente agudos o crónicos.

Los métodos de la invención pueden reducir los niveles de oxalato en un individuo al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más en comparación con los niveles obtenidos en un individuo no tratado o de control. En algunas realizaciones, la reducción se mide comparando el nivel de oxalato en un individuo antes y después de la administración de OXDC. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar o mejorar una
 5 afección o trastorno asociado al oxalato, con el fin de permitir que uno o más síntomas de la afección o trastorno mejore al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. En determinadas realizaciones, los métodos reducir los niveles de estimulación endógena y/o adsorción del oxalato de la dieta.

En algunas realizaciones se proporcionan métodos para tratar individuos con un genotipo asociado a altos niveles de oxalato, tales como individuos homocigóticos o heterocigóticos para una mutación que reduce la actividad de, por
 10 ejemplo, la alamina: glioxalato-aminotransferasa, glioxilato-reductasa/hidroxipiruvato-reductasa, glicolato-oxidasa hepática, u otra enzima implicada en el metabolismo del oxalato o asociada con la hiperoxaluria. En otras realizaciones se proporcionan métodos para tratar individuos que presentan una colonización entérica reducida de *Oxalobacter formigenes* o que carecen de la misma.

Los métodos dados a conocer incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de oxalato-
 15 descarboxilasa a un individuo mamífero que presenta riesgo de padecer, que es susceptible de padecer o que padece una afección asociada a niveles elevados de oxalato. Las poblaciones tratadas mediante los métodos de la invención incluyen, de forma no exclusiva, individuos que padecen o que presentan un riesgo de desarrollar un trastorno asociado al oxalato, por ejemplo hiperoxaluria primaria o hiperoxaluria entérica.

Los individuos tratados de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, de forma no exclusiva, mamíferos,
 20 incluyendo humanos, primates no humanos, primates, babuinos, chimpancés, monos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas), conejos, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc.

Indicaciones, síntomas e indicadores de la enfermedad

Existen muchos métodos para evaluar el desarrollo o la progresión de trastornos asociados al oxalato o de afecciones
 25 asociadas a niveles elevados de oxalato. Estos trastornos incluyen, de forma no exclusiva, cualquier afección, enfermedad o trastorno tal como los ya definidos. El desarrollo o la progresión de un trastorno asociado al oxalato se puede evaluar midiendo el oxalato en orina, en plasma, midiendo la función renal o hepática, o detectando depósitos de oxalato de calcio, por ejemplo.

La afección, enfermedad o trastorno se pueden identificar detectando o midiendo las concentraciones de oxalato, por
 30 ejemplo en una muestra de orina u otra muestra o fluido biológico. Un síntoma inicial de la hiperoxaluria típico son cálculos renales, que pueden estar asociados a dolor fuerte o repentino del abdomen o del costado, sangre en la orina, deseo frecuentes de orinar, dolor al orinar, o fiebre y escalofríos. Los cálculos renales pueden ser sintomáticos o asintomáticos, y se pueden visualizar, por ejemplo, por radiografía abdominal por rayos X, ultrasonido o exploración por tomografía computerizada (TC). Si la hiperoxaluria no se controla, los riñones resultan dañados, afectando a la función renal. Los riñones pueden incluso fallar. La insuficiencia renal (y el mal funcionamiento de los riñones) se puede
 35 identificar por una disminución o ausencia de producción de orina (tasa de filtración glomerular), sensación de malestar general, cansancio y fatiga acusada, náuseas, vómitos, anemia y/o falta de desarrollo y crecimiento anormal en niños. Los depósitos de oxalato de calcio en otros tejidos y órganos se pueden detectar también mediante métodos que incluyen visualización directa (por ejemplo en los ojos), rayos X, ultrasonidos, TC, ecocardiograma o biopsia (por ejemplo hueso, hígado o riñón).

La función renal y hepática, así como las concentraciones de oxalato, también se pueden evaluar utilizando ensayos
 40 directos e indirectos reconocidos en la técnica. El contenido químico de orina, sangre u otras muestras biológicas también se puede analizar mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, se pueden medir los niveles de oxalato, glicolato y glicerato. Ya existen ensayos bien conocidos para analizar la función hepática y renal, por ejemplo el análisis de tejido hepático para detectar deficiencias enzimáticas y el análisis de tejido renal para detectar depósitos de oxalato.
 45 También es posible analizar muestras para detectar cambios de ADN conocidos por causar hiperoxaluria primaria.

Otras indicaciones para el tratamiento incluyen, de forma no exclusiva, la presencia de uno o más factores de riesgo,
 50 incluyendo los descritos más arriba y en las siguientes secciones. Un sujeto con riesgo de desarrollar o susceptible a padecer una afección, enfermedad o trastorno, o un sujeto que puede ser particularmente receptivo al tratamiento con oxalato-decarboxilasa puede ser identificado determinando la presencia o ausencia de uno o más de dichos factores de riesgo, diagnóstico o indicadores de pronóstico. Del mismo modo, un individuo con riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con el oxalato puede ser identificado mediante análisis de uno o más marcadores genéticos o fenotípicos.

Los métodos descritos son útiles en caso de sujetos con niveles de oxalato en orina de al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80,
 55 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 o 400 mg durante un período de 24 horas, o más. En determinadas realizaciones, el nivel de oxalato está asociado con uno o más síntomas o patologías. Los niveles de oxalato se pueden medir en una muestra biológica, por ejemplo un fluido corporal, incluyendo sangre, suero, plasma u orina. Opcionalmente, el oxalato se normaliza con respecto a una proteína o sustancia estándar, tal como creatinina en orina. En algunas realizaciones,

los métodos reivindicados incluyen la administración de oxalato-descarboxilasa para reducir los niveles de oxalato circulantes en un sujeto hasta niveles indetectables, o a menos del 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% de los niveles de oxalato del sujeto antes del tratamiento, en un plazo de 1, 3, 5, 7, 9, 12 o 15 días.

- 5 La hiperoxaluria en humanos se puede caracterizar por una excreción de oxalato en orina superior a 40 mg (aproximadamente 440 μ mol) o a 30 mg al día. Los niveles límite son, por ejemplo, 43 mg/día (aproximadamente 475 μ mol) en el caso de los hombres y 32 mg/día (aproximadamente 350 μ mol) en el caso de las mujeres. La hiperoxaluria también se puede definir como una excreción de oxalato en orina mayor de 30 mg al día por gramo de creatinina urinaria. Las personas con hiperoxaluria leve pueden excretar al menos 30-60 (342-684 μ mol) o 40-60 (456-684 μ mol) mg de oxalato al día. Las personas con hiperoxaluria entérica pueden excretar al menos 80 mg de oxalato urinario al día (912 μ mol) y las personas con hiperoxaluria primaria pueden excretar al menos 200 mg al día (2.280 μ mol) (véase por ejemplo Borowski A.E, Langman CB. Hyperoxaluria and Oxalosis: Current Therapy and Future directions. Exp Opinion Phrama (2006, en prensa)).

Administración de cristales de OXDC y de composiciones de los mismos

- 15 La administración de oxalato-descarboxilasa de acuerdo con los métodos de la invención no está limitada a ningún sistema de administración particular e incluye la administración a través del tracto gastrointestinal superior, por ejemplo la boca (por ejemplo en cápsulas, suspensiones, pastillas o con los alimentos), el estómago o el intestino superior (por ejemplo mediante sonda o inyección), para reducir los niveles de oxalato de un individuo. En determinados casos, la OXDC se administra para reducir los niveles y/o concentraciones de oxalato endógeno. La OXDC también se puede suministrar mediante un dispositivo extracorpóreo, como un aparato de diálisis, un catéter o una estructura o dispositivo que entra en contacto con una muestra biológica de un individuo.

- 25 La administración a un individuo puede tener lugar en una sola dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una variedad de formas fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica (arriba descritos). En los métodos dados a conocer, la oxalato-descarboxilasa se puede administrar sola, de forma simultánea o consecutiva, a lo largo de intervalos solapados o no solapados entre sí, con uno o más agentes biológicamente activos adicionales, por ejemplo piridoxina (vitamina B-6), ortofosfato, magnesio, glicosaminoglicanos, calcio, hierro, aluminio, magnesio, citrato de potasio, colestiramina, hidrocoloide marino orgánico, jugos vegetales, por ejemplo jugo de tallo del plátano o jugo de remolacha, o L-cisteína. Se proporcionan agentes biológicamente activos que reducen los niveles de oxalato o que aumentan la actividad o disponibilidad de la OXDC. En la administración secuencial, la oxalato-descarboxilasa y el o los agentes adicionales se pueden administrar en cualquier orden. En algunas realizaciones, la duración de un intervalo solapado puede ser de más de 2, 4, 6, 12, 24 o 48 semanas o más.

- 35 La oxalato-descarboxilasa se puede administrar como único compuesto activo o en combinación con otro compuesto o composición activa. A no ser que se indique otra cosa, la oxalato-descarboxilasa se administra en una dosis de aproximadamente 10 μ g/kg a 25 mg/kg o 100 mg/kg, dependiendo de la gravedad de los síntomas y la progresión de la enfermedad. El médico que prescribe el tratamiento selecciona la dosis terapéuticamente eficaz de OXDC y ésta puede oscilar aproximadamente entre 10 μ g/kg y 20 mg/kg, entre 10 μ g/kg y 10 mg/kg, entre 10 μ g/kg y 1 mg/kg, entre 10 μ g/kg y 100 μ g/kg, entre 100 μ g/kg y 1 mg/kg, entre 100 μ g/kg y 10 mg/kg, entre 500 μ g/kg y 5 mg/kg, entre 500 μ g/kg y 20 mg/kg, entre 1 mg/kg y 5 mg/kg, entre 1 mg/kg y 25 mg/kg, entre 5 mg/kg y 100 mg/kg, entre 5 mg/kg y 50 mg/kg, entre 5 mg/kg y 25 mg/kg, y entre 10 mg/kg y 25 mg/kg. Adicionalmente, también se pueden utilizar las dosis específicas indicadas en los ejemplos o en Physician's Desk Reference (PDR) 2003, 57 edición, Medical Economics Company, 2002.

Los cristales de oxalato-descarboxilasa de la presente invención se pueden administrar vía un dispositivo extracorpóreo o catéter para el suministro de oxalato-descarboxilasa a un paciente. Los catéteres, por ejemplo catéteres urinarios, se pueden revestir con composiciones que contienen cristales de oxalato-descarboxilasa.

- 45 Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la invención. El experto en la materia reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que se pueden realizar sin alterar el espíritu o el alcance de la presente invención. Estas modificaciones y variaciones están incluidas dentro del alcance de la invención. Los ejemplos no limitan en modo alguno la invención.

Ejemplos

- 50 **Ejemplo 1: Fermentación y purificación de la oxalato-descarboxilasa**

La oxalato-descarboxilasa (OXDC) de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) es una proteína homohexamérica de 261 kDa que consiste en seis monómeros idénticos. Cada monómero contiene 385 aminoácidos, con un peso molecular calculado de ~43-44 kDa y un punto isoelectrico de 5,2. El gen de OXDC, anteriormente conocido como yvrK, se amplificó por PCR utilizando ADN genómico de *B. subtilis* como patrón.

El gen de OXDC amplificado se clonó primero en el vector pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA) y después se subclonó y expresó a partir del vector de expresión pET-11a utilizando células BL21 (DE3) pLysS de *E. coli*. Dado que la expresión genética en los vectores pET-11a está bajo el control del promotor T7, la expresión de OXDC se reguló mediante inducción con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido).

- 5 Para alcanzar altos niveles de expresión de OXDC recombinante en *E. coli* se empleó una fermentación. La expresión se llevó a cabo en 800 l (litros) de medio de fermentación que contenía hidrolizado de caseína (USB Corporation, Cleveland, OH) o peptona de soja, extracto de levadura (USB Corporation), NaCl (Fisher Scientific), antiespumante PPG 2000 (PPG), KOH (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) y ampicilina (USB Corporation). Dado que la OXDC es una enzima dependiente del manganeso, en el medio de fermentación se incluyó $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mM (Mallinckrodt Baker Inc.). La expresión de OXDC se indujo mediante adición de IPTG 0,4 mM (Lab Scientific). Las células que expresaban OXDC se dispusieron en matraces de agitación o en un fermentador. Mediante este método, la OXDC se expresó principalmente en preparaciones de pellas.

- 15 Para la fermentación se utilizó un material de glicerol de células BL21 transformadas con pET11a-OXDC. Para 800 l de fermentación se preparó un cultivo previamente sembrado con 2 x 250 ml, conteniendo cada uno 50 ml de medio (LB más 100 µg/ml de ampicilina). También se utilizaron 2 x 0,5 ml de inóculo. Los cultivos se incubaron a 35°C, 250 rpm durante 6 horas. Después, el cultivo se transfirió a 6 matraces de 2 l, conteniendo cada uno de ellos 1 l de medio (LB más 100 µg/ml de ampicilina). A cada matraz se añadieron 10 ml de cultivo iniciador. Estos cultivos se incubaron a 35°C, 250 rpm durante 122 horas. Seis litros de este cultivo se transfirieron al fermentador de 800 l que contenía el medio apropiado tal como se describe más arriba. El cultivo se desarrolló a 37°C, pH 7,0, bajo agitación a 1.000 rpm con oxígeno disuelto alrededor de 30-40 hasta que la DO_{600} alcanzó un valor de aproximadamente 0,3 (este proceso duró aproximadamente 2-3 horas). La expresión de OXDC se indujo con 0,4 mM de IPTG más $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mM. El cultivo se indujo durante 4 horas a 37°C, 100 rpm. Después, las células se recolectaron y se congelaron para su uso posterior. La DO_{600} en el momento de la recolección era de aproximadamente 5,5-8,0.

- 25 Las células se resuspendieron en una proporción de 1 kg de pasta celular por 4 l de tampón que contenía Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, y en presencia o ausencia de 15-25 U/ml de DNasa. La suspensión celular se mezcló (50-60 rpm) durante una noche a 4°C. La suspensión celular se pasó a través de un homogeneizador previamente enfriado tres veces sobre hielo. La eficiencia de la lisis celular se comprobó bajo microscopio y la suspensión celular intacta se utilizó como control. Las células se centrifugaron a 4.000 rpm durante 40 minutos en botellas de 1 l a 4°C. El sobrenadante y la pella se guardaron para caracterización mediante SDS-PAGE. La expresión de OXDC se analizó mediante SDS-PAGE.
- 30 La mayoría de la OXDC se encontraba en la pella, que comprendía cuerpos de inclusión y otros precipitados. La pella se recogió por centrifugación a 4.000 rpm durante 40 minutos y se utilizó inmediatamente o se congeló a -70°C para uso posterior.

A partir de 800 l de reacción de fermentación se obtuvieron entre 5.000 y 5.500 g de células, que produjeron pellas con un peso húmedo entre 2.800 y 3.000 g.

- 35 **Ejemplo 2: Cristalización de la oxalato-descarboxilasa a partir de pellas solubilizadas con una concentración moderada de desnaturalizante, seguida de cromatografía de intercambio aniónico**

Para preparar los cristales de OXDC se utilizaron pellas de OXDC almacenadas congeladas a -20°C.

En este procedimiento, las pellas se solubilizaron bajo condiciones moderadas de concentración de desnaturalizante y pH. Después se replegó la proteína solubilizada utilizando una columna de matriz de intercambio aniónico.

- 40 Las pellas se solubilizaron en urea 2 M, Tris 100 mM pH 10,0, DTT 10 mM y NaCl 100 mM (1:10 p/v). La solución se agitó a temperatura ambiente (TA) durante 2 horas y después se centrifugó a 15 K durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se guardó. La pella se pesó con cuidado y se guardó por separado.

- 45 Las pellas solubilizadas en sobrenadante se añadieron gota a gota, a un caudal de 10 ml/min, a 10 volúmenes de una solución consistente en urea 2 M, Tris 100 mM pH 8,0, DTT 1 mM, y MnCl_2 1 mM, con agitación suave y constante. Una vez completa la adición del sobrenadante, la solución de proteína se incubó a TA durante 1 hora. Después de la incubación, la solución de proteína se preparó para una cromatografía de intercambio aniónico mediante una centrifugación a 15 K durante 30 minutos a 4°C para eliminar cualquier precipitación posible.

- 50 Se preparó una columna de cromatografía de intercambio aniónico empaquetando una matriz de Q Sepharose en columna de vidrio. La columna se dispuso en una FPLC y se equilibró por lavado con 10 volúmenes de columna (VC) de una solución de urea 0,5 M, Tris 100 mM pH 8,0, DTT 1 mM y MnCl_2 1 mM. El caudal se mantuvo a 6 ml/min. La pella solubilizada se cargó en la columna. La carga proteínica era de 8-10 mg/ml de matriz. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con al menos 10 VC de Tris 100 mM pH 8,0, DTT 1 mM y MnCl_2 1 mM, con un caudal de 6 ml/min. Mediante este paso se eliminó urea de la muestra de proteína unida y se dejó que la proteína se replegara a su conformación nativa.

La proteína se eluyó de la columna con NaCl 1 M, Tris 100 mM pH 8,0, y DTT 1 mM, mediante un gradiente por pasos o elución por pasos. La elución de la proteína se controló a 280 nm y se recogieron fracciones de 10 ml. Las fracciones pico se juntaron y se ensayaron mediante SDS-PAGE y actividad enzimática.

Las fracciones pico que contenían OXDC se concentraron a 15 mg/ml mediante agitación de las células utilizando una membrana 10.000 MWCO y diálisis contra 10 volúmenes de Tris mM pH 8,0, CaCl 100 mM y DTT 1 mM. Se realizaron dos cambios de tampón a intervalos de una hora y, después de un tercer cambio de tampón, la diálisis continuó a lo largo de una noche para una recuperación máxima de cristales. La proteína cristalizada en bolsas de diálisis se recuperó centrifugando la muestra a 2 K durante 15 minutos a 4°C. Después de la diálisis, aproximadamente un 70% de la OXDC replegada había cristalizado. Los cristales tenían forma cúbica y un tamaño uniforme. Los cristales mostraban una actividad de ~44 unidades.

Ejemplo 3: Cristalización de la oxalato-descarboxilasa por solubilización de pellas utilizando alta concentración de desnaturante, seguida de cromatografía de intercambio aniónico

Mediante este método, las pellas se solubilizaron en urea 5 M, Tris 540 mM pH 8,6, NaCl 100 mM, DTT 10 mM (1:5 p/v). La solución se agitó a TA durante 2 horas y luego se centrifugó a 15 K durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó con cuidado y se guardó. La pella se pesó y se guardó por separado.

Se preparó una columna de cromatografía de intercambio aniónico empaquetando una matriz de Q Sepharose en columna de vidrio. La columna se dispuso en una FPLC y se equilibró por lavado con 3 volúmenes de columna (VC) de urea 4 M, Tris 100 mM pH 8,6 y DTT 10 mM. La columna se lavó adicionalmente con 7 VC en NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH 8, MnCl₂ 1 mM, DTT 10 mM y se eluyó en un solo paso con 3 VC de NaCl 0,5 M, Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM, MnCl₂ 1 mM.

Se recogieron fracciones apropiadas y la proteína se identificó mediante SDS-PAGE y ensayo de actividad. La proteína soluble se concentró en presencia de un alto contenido de sal (NaCl 0,5 M). Un volumen total de 450 ml se eluyó con sal 0,5 M y se concentró a 45 ml con filtración pellicon en NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM. Después de concentrar la proteína, se llevó a cabo una dilución para reducir la concentración de sal NaCl de 0,5 M a 0,1 M. En este punto comenzaron a formarse cristales de OXDC. En este ejemplo, el volumen se llevó a 210 ml en NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM equivalente. Los cristales formados se centrifugaron y se recuperaron en NaCl 100 mM y Tris 50 mM pH 8,0, en presencia o ausencia de DTT 1 mM.

Ejemplo 4: Cristalización de la oxalato-descarboxilasa por solubilización de pellas a pH alto y concentración moderada de desnaturante, seguida de concentración sobre fibras huecas

Unas pellas que contenían cuerpos de inclusión y otros precipitados (3,93 kg) se solubilizaron en 9,5 l de Tris 50 mM pH 12, NaCl 500 mM, urea 2 M, DTT 10 mM, durante 2 horas a temperatura ambiente. El volumen final era de 12 l, pH 9,9. La muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 45 minutos y se recuperó el sobrenadante. El volumen total después de la centrifugación era de 11,1 l, pH 9,9. La muestra se concentró a 5 l sobre fibras huecas y a lo largo de una hora el volumen se aumentó lentamente hasta 20 l con Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, urea 2 M, DTT 10 mM. Este proceso se llevó a cabo durante una hora. La concentración final de urea en este punto se estimó en aproximadamente 0,5 M. El volumen se concentró a 6 l en fibras huecas durante 2,5 horas. La muestra se diluyó a 24 l con Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, DTT 1 mM, MnCl₂ 1 mM, L-arginina 200 mM durante 30 minutos. En este punto se estimó una concentración de urea de 125 mM. Luego se llevó a cabo otra ronda de concentración hasta un volumen final de 5 l. La muestra se diluyó a 18 l con Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 4500 mM, DTT 1 mM, MnCl₂ 1 mM, y se concentró de nuevo a 6,5 l. En ese momento, el pH era de 8,1. La muestra se centrifugó durante 45 minutos a 7.000 rpm y la pella final se guardó para analizarla. Después de la centrifugación, se llevó a cabo un paso de dilución con Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM, para obtener los cristales. La dilución se realizó a 30 l utilizando una bomba peristáltica, mezclando a temperatura ambiente. El caudal de la dilución se estimó en 50 ml/min. La dilución tardó aproximadamente 9 horas. Los cristales se recogieron por centrifugación y el sobrenadante se guardó para su análisis. Los cristales se lavaron tres veces con Tris 50 mM, NaCl 100 mM pH 8 y se resuspendieron en Tris 50 mM, NaCl 100 mM pH 8. Los cristales se guardaron a 4°C.

Ejemplo 5: Cristalización de la oxalato-descarboxilasa a partir de extractos celulares utilizando alta concentración de sal

(1) Cristalización por solubilización de pellas que contienen proteínas utilizando alta concentración de sales, seguida de concentración y dilución

Pellas congeladas (465 g) del Ejemplo 1 se solubilizaron en 2,3 l de Tris 100 mM, L-cisteína HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0, durante 2 horas a temperatura ambiente, formando una oxalato-descarboxilasa soluble. La muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 45 minutos y se recuperó el sobrenadante. El volumen final era de 2,15 l y la concentración de proteína medida era de 24,14 mg/ml. La muestra se concentró a 550 ml mediante filtración de flujo tangencial (10 kD Pall) durante una hora y después se diluyó a 2.750 l con Tris 100 mM pH 8,0, L-cisteína HCl 1 mM en 30 minutos a un caudal de 73 ml/min y agitación durante una hora a temperatura ambiente. Después se dejó que se formaran cristales durante una noche en un espacio frío. Los cristales se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se guardó

para analizarlo. Los cristales se lavaron tres veces con Tris 100 mM, NaCl 100 mM pH 8 y después se resuspendieron en Tris 100 mM, NaCl 100 mM pH 8. Los cristales se guardaron a 4°C. La OXDC de *B. subtilis* recombinante purificada a partir de medio de expresión de *E. coli* presenta una actividad específica de aproximadamente 50-60 u/mg bajo condiciones de ensayo estándar (véase el Ejemplo 15).

5 (2) *Cristalización por solubilización de pellas utilizando alta concentración de sales, seguida de concentración y diálisis*

10 Pellas congeladas (510 g) del Ejemplo 1 se solubilizaron en 3 l de Tris 100 mM, L-cisteína HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0, durante 2 horas a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. La muestra se concentró a 500 ml mediante filtración de flujo tangencial (10 kD Pall) durante una hora y después se dializó contra Tris 100 mM pH 8,0 bajo agitación. Después se dejó que se formaran cristales durante una noche en un espacio frío. Los cristales se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se guardó para analizarlo. Los cristales se lavaron tres veces con Tris 100 mM, pH 8,0 y después se resuspendieron en Tris 100 mM, pH 8,0. Los cristales se guardaron a 4°C. El rendimiento de los cristales fue del 60%.

(3) *Cristalización por solubilización de pellas utilizando alta concentración de sales, seguida de concentración y diálisis*

15 Pellas congeladas (510 g) del Ejemplo 1 se solubilizaron en 3 l de Tris 100 mM, L-cisteína HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0, durante 2 horas a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. La muestra se concentró a 500 ml mediante filtración de flujo tangencial (10 kD Pall) durante una hora y después se dializó contra Tris 100 mM pH 7,5 bajo agitación. Después se dejó que se formaran cristales durante una noche en un espacio frío. Los cristales se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se guardó para analizarlo. Los cristales se lavaron tres veces con Tris 100 mM, pH 7,5 y después se resuspendieron en Tris 100 mM, pH 7,5. Los cristales se guardaron a 4°C. El rendimiento de los cristales fue del 67%.

(4) *Cristalización por solubilización de pellas utilizando alta concentración de sales, seguida de concentración y diálisis*

25 Pellas congeladas (510 g) del Ejemplo 1 se solubilizaron en 3 l de Tris 100 mM, L-cisteína HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0, durante 2 horas a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. La muestra se concentró a 500 ml mediante filtración de flujo tangencial (10 kD Pall) durante una hora y después se dializó contra Tris 100 mM pH 7,0 bajo agitación. Después se dejó que se formaran cristales durante una noche en un espacio frío. Los cristales se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se guardó para analizarlo. Los cristales se lavaron tres veces con Tris 100 mM, pH 7,0 y después se resuspendieron en Tris 100 mM, pH 7,0. Los cristales se guardaron a 4°C. El rendimiento de los cristales fue de aproximadamente el 80%.

(5) *Cristalización por solubilización de pellas utilizando alta concentración, seguida de concentración y diálisis*

30 Pellas congeladas (510 g) del Ejemplo 1 se solubilizaron en 3 l de Tris 100 mM, L-cisteína HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0, durante 2 horas a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. La muestra se concentró a 500 ml mediante filtración de flujo tangencial (10 kD Pall) durante una hora y después se dializó contra tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 6,5, bajo agitación. Después se dejó que se formaran cristales durante una noche en un espacio frío. Los cristales se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se guardó para analizarlo. Los cristales se lavaron tres veces con tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 6,5, y después se resuspendieron en tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 6,5. Los cristales se guardaron a 4°C. El rendimiento de los cristales fue de aproximadamente el 70%.

(6) *Cristalización por solubilización de pellas utilizando alta concentración de sales, seguida de concentración y diálisis*

40 Pellas congeladas (510 g) del Ejemplo 1 se solubilizaron en 3 l de Tris 100 mM, L-cisteína HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0, durante 2 horas a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. La muestra se concentró a 500 ml mediante filtración de flujo tangencial (10 kD Pall) durante una hora y después se dializó contra tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 6,0, bajo agitación. Después se dejó que se formaran cristales durante una noche en un espacio frío. Los cristales se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se guardó para analizarlo. Los cristales se lavaron tres veces con tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 6,0, y después se resuspendieron en tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 6,0. Los cristales se guardaron a 4°C. El rendimiento de los cristales fue de aproximadamente el 60%.

(7) *Cristalización de OXDC a partir de pasta celular después de homogeneización y solubilización*

50 Las células se resuspendieron en una proporción de 1 kg de pasta celular por 3 l de tampón que contenía Tris 100 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, cisteína 5 mM y cloruro de manganeso 1 mM. La suspensión celular se mezcló (50-60 rpm) durante una noche a 4°C. La suspensión celular se pasó a través de un homogeneizador previamente enfriado dos veces sobre hielo. La eficiencia de la lisis celular se comprobó bajo microscopio y la suspensión celular intacta se utilizó como control. El volumen de la suspensión se aumentó a 10 l y la suspensión se mezcló con agitador aéreo durante 3 horas a temperatura ambiente. El extracto crudo se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante y la pella se guardaron para caracterización mediante SDS-PAGE. La expresión de

OXDC se analizó mediante SDS-PAGE. La mayoría de la OXDC se encontraba en el sobrenadante. El volumen final era de 10 l y la concentración de proteína medida era de 34 mg/ml. La muestra se concentró a 3,5 l mediante filtración de flujo tangencial (10 kD Pall) durante una hora, y después se diluyó utilizando tampón de cristalización (Tris 100 mM, NaCl 100 mM pH 7,5), con agitación durante una hora a temperatura ambiente. Los cristales se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se guardó para analizarlo. Los cristales se lavaron tres veces con Tris 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5, y después se resuspendieron en Tris 100 mM y NaCl 100 mM, pH 7,5. Los cristales se guardaron a 4°C.

Ejemplo 6: Cristalización de OXDC a partir de proteína soluble

La OXDC se expresó en *E. coli* en un matraz de agitación. Las células se sometieron a lisis en un microfluidizador con tampón Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, que contenía 25 U/ml de DNasa I. El lisado celular se incubó a temperatura ambiente durante una hora para permitir la formación de cristales de OXDC. Los cristales se centrifugaron y se reconstituyeron en Tris 100 mM, NaCl 100 mM, pH 8.

Ejemplo 7: Cristalización de OXDC mediante difusión de vapor

Se llevaron a cabo pruebas de cristalización de gota pendiente utilizando kits de cristalización en matriz dispersa comerciales: Crystal Screen (Hampton Research; Aliso Viejo, CA), Crystal Screen 2 (Hampton Research), Wizard I (Emerald Biosystems; Bainbridge Island, WA), Wizard II (Emerald Biosystems), Cryo I (Emerald Biosystems) y Cryo II (Emerald Biosystems).

En cada pocillo se dispusieron 600 µl de reactivo. Sobre un cubreobjeto de microscopio de vidrio se dispusieron 3 µl de reactivo y a la gota de reactivo se le añadieron 3 µl de OXDC con un mezclado mínimo. A partir de estos 6 µl de reactivo y una gota de OXDC se prepararon hasta cinco gotas más. Como el mezclado de las gotas fue mínimo, cada una de las gotas (más pequeñas) posteriores tenía una proporción diferente y desconocida de proteína con respecto al reactivo, aumentando así la probabilidad de obtener cristales en un breve período de tiempo. Después de una noche de incubación a temperatura ambiente, las gotas pendientes se examinaron bajo un microscopio en cuanto a la presencia de cristales. Se obtuvo una gran cantidad de condiciones de cristalización, tal como muestra la Tabla 1.

Tabla 1: Condiciones de cristalización para OXDC en gotas pendientes^a

Precipitante	Descripción de los cristales
40% (p/p) etanol, fosfato citrato 0,1 M, pH 4,20, 5% (p/v) PEG 1000	Agujas
20% (p/v) PEG-3000, HEPES 0,1 M, pH 7,50, NaCl 0,2 M	Barras
20% (p/v) PEG-3000, acetato 0,1 M, pH 4,5	Barras, placas
20% (p/v) PEG 8000, fosfato citrato 0,1 M, pH 4,20, NaCl 0,2 M	Placas
10% (p/v) PEG 8000, cacodilato 0,1 M, pH 6,50, acetato de magnesio 0,2 M	Barras
9% (p/v) PEG 8000, cacodilato 0,1 M, pH 6,50, acetato de calcio 0,2 M	Agujas
40% (v/v) PEG 400, Na/fosfato 0,1 M, pH 6,20, NaCl 0,2 M	Agujas
10% (v/v) PEG 8000, Na/fosfato 0,1 M, pH 6,20, NaCl 0,2 M	Barras
20% (p/v) PEG 2000 MME, Tris 0,1 M, pH 7,0	Placas
^a La concentración de OXDC, determinada mediante el ensayo de Bradford, era de aproximadamente 1,7 mg/ml	

Ejemplo 8: Cristalización de OXDC por microlotes

La oxalato-descarboxilasa se pudo cristalizar mediante el método de microlotes a partir de una serie de condiciones de cristalización:

- (i) 10 µl de OXDC purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 10 µl de PEG 8000 al 16%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales grandes con algunos precipitados.
- (ii) 10 µl de OXDC purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 10 µl de PEG 8000 al 20%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales grandes sin ningún precipitado.
- (iii) 10 µl de OXDC purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 10 µl de PEG 8000 al 24%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales más pequeños con forma de cubo.

- (iv) 10 µl de OXDC purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 10 µl de PEG 8000 al 28%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales muy pequeños con forma de cubo. No se produjo ninguna precipitación.
- 5 (v) 8 µl de OXDC purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 12 µl de PEG 8000 al 24%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales muy pequeños con forma de cubo. No se produjo ninguna precipitación.
- (vi) 9 µl de OXDC purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 11 µl de PEG 8000 al 24%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales pequeños con forma de cubo. No se produjo ninguna precipitación.
- 10 (vii) 10 µl de oxalato-descarboxilasa purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 10 µl de PEG 8000 al 24%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales pequeños con forma de cubo. No se produjo ninguna precipitación.
- (viii) 11 µl de oxalato-descarboxilasa purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 9 µl de PEG 8000 al 24%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales con forma de cubo.
- 15 No se produjo ninguna precipitación.
- (ix) 12 µl de OXDC purificada en una concentración de 23,46 mg/ml se mezclaron con 8 µl de PEG 8000 al 24%. La cristalización se produjo inmediatamente en 2-5 segundos. Se formaron cristales con forma de cubo. No se produjo ninguna precipitación.

Ejemplo 9: Actividad de OXDC soluble y cristales de OXDC

- 20 La OXDC soluble se recogió tal como se describe en el Ejemplo 5 después de haber solubilizado y centrifugado las pellas y de haber recuperado el sobrenadante. Los cristales de OXDC se recogieron tal como se describe en el Ejemplo 5 después de haberlos recolectado y lavado. Las actividades de la OXDC soluble y los cristales de OXDC se midieron de acuerdo con el Ejemplo 15. En un experimento, la actividad de la OXDC soluble era de 12 unidades/mg y la actividad de los cristales de OXDC era de 35 unidades/mg.
- 25 La OXDC soluble se recoge tal como se describe en cualquiera de los Ejemplos 2-5 y los cristales de OXDC se recolectan tal como se describe en cualquiera de los Ejemplos 2-8. Las actividades de la OXDC soluble y los cristales de OXDC se miden de acuerdo con el Ejemplo 15. La actividad de los cristales de OXDC puede llegar a ser de al menos aproximadamente el 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a la actividad de la OXDC soluble.

Ejemplo 10: Reticulación de los cristales de oxalato-descarboxilasa con glutaraldehído

- 30 Los cristales de oxalato-descarboxilasa preparados de acuerdo con cualquiera de los Ejemplos 2-8 se reticularon utilizando glutaraldehído. Después de la cristalización, los cristales de OXDC se concentraron a 20-30 mg/ml. Luego se añadieron 0,8 ml de glutaraldehído al 25% a 20 ml de cristales para preparar una solución de glutaraldehído al 1%, y los cristales se voltearon durante 18 horas a temperatura ambiente. Los cristales reticulados se lavaron cinco veces con Tris 100 mM, pH 7,00, y se resuspendieron en Tris 10 mM, pH 7,00.
- 35 La actividad específica de la OXDC cristalina se comparó con la actividad específica de la OXDC reticulada (designada como OXDC-CLEC) (seis ensayos) y se comprobó que los cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados mantienen entre más de un 30% y más de un 50% de la actividad original de la proteína cristalina, en varias preparaciones.
- Partes alícuotas de 1 ml de cristales de OXDC (60 mg/ml) se reticularon con diferentes concentraciones de glutaraldehído (desde un 0,05% hasta un 2%, concentración final) a pH 8,0 a 25°C, durante 18 horas, para analizar los efectos de las concentraciones variables de glutaraldehído en la actividad enzimática. La reticulación terminó con la separación de los cristales reticulados por centrifugación a 2.000 rpm en un tubo Eppendorf y resuspensión posterior de los cristales reticulados en 1 ml de Tris HCl 100 mM, pH 7,0. Después, la OXDC reticulada (OXDC-CLEC) se lavó cinco veces con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, seguidas de tres lavados con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 (véanse los resultados en la Tabla 2, más abajo).
- 40

Ejemplo 11: Solubilidad controlada por pH de los cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados

- La solubilidad de diversos cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados se examinó siguiendo una reducción del pH de 7,5 a 3,0. Los cristales reticulados se incubaron a 1 mg/ml en glicina HCl 50 mM (pH 3,0). Después de 5 horas de incubación a 37°C bajo agitación se recogieron partes alícuotas. La concentración de proteína soluble se midió a OD₂₈₀ después de la separación de los cristales reticulados no disueltos mediante centrifugación a 2.000 rpm y filtración del sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2.
- 50

Tabla 2: Reticulación de cristales de OXDC con diferentes porcentajes de glutaraldehído y solubilidad de OXDC-CLEC controlada por pH

Muestra	% Glutaraldehído	% Lixiviación de proteína
OXDC-CLEC-1	0,005	100,0
OXDC-CLEC-2	0,010	100,0
OXDC-CLEC-3	0,050	2,2
OXDC-CLEC-4	0,075	0,0
OXDC-CLEC-5	0,100	0,0
OXDC-CLEC-6	0,200	0,0
OXDC-CLEC-7	1,000	0,0

Estos resultados indican que en presencia de al menos aproximadamente un 0,05% (concentración final) de glutaraldehído se forma un cristal de OXDC reticulado con glutaraldehído esencialmente estable.

Ejemplo 12: Perfil de actividad de pH de OXDC soluble, OXDC cristalina y OXDC-CLEC

Se reticularon cristales de oxalato-descarboxilasa, preparados tal como se describe en los Ejemplos 2-8, mediante adición de glutaraldehído (Sigma). Una parte alícuota de 1 ml de cristales de OXDC (30-40 mg/ml) se reticuló con glutaraldehído al 1% (concentración final) con pH 8,0 a 25°C durante 18 horas. La reticulación terminó por separación de los cristales reticulados por centrifugación a 2.000 rpm en un tubo Eppendorf y resuspensión posterior de los cristales reticulados en 1 ml de Tris HCl 100 mM, pH 7,0. Después, la OXDC-CLEC se lavó cinco veces con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, seguidas de tres lavados con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,0. El perfil de actividad de pH de la OXDC-CLEC se analizó midiendo la actividad de los cristales tal como se describe en el Ejemplo 15 utilizando diversos tampones y valores pH: tampón de glicina-HCl 50 mM, pH 2,0 y 3,0; tampón de succinato 50 mM, pH 4,0, 5,0 y 6,0; y tampón Tris 50 mM, pH 7,0. El nivel de actividad con cada pH se analizó dos veces y se calculó la actividad media. Los resultados, mostrados en la FIGURA 1, indican que la OXDC-CLEC es más activa que su equivalente soluble entre pH 3,5 y 6,0. El cristal no reticulado mostraba una actividad mucho más alta, entre aproximadamente un 50% y aproximadamente un 200%, 300% o 400% mayor que la de la forma soluble de la oxalato-descarboxilasa con un pH diferente.

Ejemplo 13: Terapia con oxalato-descarboxilasa en un modelo animal de hiperoxaluria entérica

Modelo de hiperoxaluria entérica en ratas. Estudio de intervalos de dosis: Las ratas Sprague Dawley (SD) macho alimentadas con una dieta rica en oxalato constituyen un sistema animal adecuado para el estudio de la hiperoxaluria entérica. En este estudio, la administración de un 1,1% de oxalato de potasio en la dieta condujo a un aumento del oxalato en orina en un factor de 5 a 10.

Veinte ratas Sprague Dawley (SD) con menos de 35 días de edad y con un peso de 100-120 gramos se dividieron de forma aleatoria en un grupo de control y grupos experimentales (cinco ratas por grupo). Las ratas se aclimataron durante 7 días en jaulas metabólicas individuales (LabProducts, Inc.; Seaford, DE) antes del tratamiento. Durante este período, las ratas dispusieron a voluntad de agua acidificada complementada y fueron alimentadas con una dieta sintética que tenía un 1,1% de oxalato de potasio y una baja concentración (0,5%) de calcio (Research Diets TD89222PWD; Harlan Teklad; Madison, WI). Las ratas se mantuvieron con esta dieta durante todo el tratamiento.

Después del período de aclimatación, las ratas de ensayo recibieron tres dosis diferentes de oxalato-descarboxilasa recombinante, formulada como cristales reticulados con glutaraldehído al 1% (véase, por ejemplo, el Ejemplo 9), durante 4 semanas consecutivas. Los cristales se administraron vía oral en forma de una mezcla congelada/seca de alimento-enzima (5, 25 y 80 mg de suspensión espesa de OXDC-CLEC en Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, en cada caso mezclados por separado con 15 g de comida y liofilizados; cada mañana, los recipientes de comida se rellenaban con ~20 g de la mezcla de alimento/enzima). Antes del tratamiento, las ratas se dividieron de forma aleatoria entre un grupo de control y un grupo experimental según su oxalato en orina basal.

Análisis de muestras de orina: Se recogieron muestras de orina durante 24 horas en jaulas metabólicas sobre ácido (230 µl de ácido clorhídrico 6 N se mezclaron con la muestra de orina recogida durante 24 horas) para reducir al mínimo la descomposición espontánea del ácido ascórbico urinario en oxalato. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su posterior análisis. Se recogieron muestras de las diuresis diarias y múltiples muestras de orina de 24 h (horas) para realizar mediciones de oxalato y creatinina. En el Ejemplo 15 se describen ensayos de oxalato y creatinina. La excreción urinaria de oxalato y creatinina se expresó como los µmol de oxalato y creatinina detectados en muestras de orina de 24 h. Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t de Student.

Tal como muestra la FIGURA 2, la administración oral de OXDC-CLEC a ratas SD con hiperoxaluria crónica produjo una reducción constante del oxalato en orina a partir del cuarto día de tratamiento. La reducción continua máxima entre un 25 y un 40% se registró en el grupo correspondiente a la dosis más alta (80 mg OXDC-CLEC). Las dosis más bajas (5 mg y 25 mg) de OXDC-CLEC produjeron una menor reducción del oxalato urinario (hasta un 30% en el grupo de 25 mg y un 20% en el grupo de 5 mg, respectivamente). Las dosis de 25 mg y 80 mg produjeron una reducción significativa

durante todos los días de ensayo (excepto el día 21 en el caso del grupo de 25 mg), mientras que la dosis menor (5 mg) tuvo un efecto mínimo que no era significativo. Este resultado revela un efecto dependiente de la dosis en la terapia con OXDC-CLEC.

Ejemplo 14: Modelo de terapia oral de hiperoxaluria primaria con oxalato-descarboxilasa

5 Modelo de ratón para la hiperoxaluria primaria de tipo I: Los ratones knockout AGT1 carecen de la enzima peroxisomal hepática alanina: glioxalato-aminotransferasa, una deficiencia que provoca hiperoxaluria primaria de tipo I. Se criaron unos ratones quiméricos para homocigotismo en cepas de fondo C57B16 y 129/sv. Todos los ratones *Agxt* homocigóticos presentaban una hiperoxaluria moderada (1-2 mmol/l, un aumento del oxalato urinario a un valor aproximadamente 5-10 veces mayor que los valores normales, en comparación con el tipo natural (0,2 mmol/l). También se comprobó que, a lo largo de su vida posterior (4-7 meses de edad), un 30-50% de los machos y un 0% de las hembras desarrollaron nefrocalcinosis moderada y cálculos de oxalato de calcio en el tracto urinario. Curiosamente, cuando la mutación se analizó en una cepa C57B16 homogénea, la hiperoxaluria no estaba asociada al desarrollo de cálculos urinarios en ninguno de los dos sexos, lo que pone de relieve la variabilidad fenotípica observada normalmente en esta enfermedad.

15 En estos experimentos se utilizaron en total 44 ratones macho (cepa AGT1 KO/129sv, desarrollada por el Dr. Salido, La Laguna, Tenerife, España). Los ratones se dividieron de forma aleatoria en un grupo de control y tres grupos experimentales. Los ratones pesaban 20-25 gramos y tenían menos de 6 meses de edad.

20 Los ratones AGT1 KO (129sv) recibieron etilenglicol (EG) para provocar una hiperoxaluria grave y la formación de depósitos de oxalato de calcio en el parénquima renal. El EG es un alcohol común que se metaboliza en el hígado produciendo oxalato. Normalmente, después de 2-6 semanas de la provocación con EG, los ratones AGT1 KO en el fondo 129/sv muestran signos de insuficiencia renal determinados por (i) la excreción variable de oxalato en la orina, (ii) la disminución del aclaramiento de creatinina, y (iii) la nefrocalcinosis que finalmente conduce al fallo renal y la muerte.

25 Antes del tratamiento, los ratones se aclimataron durante 7 días en jaulas metabólicas individuales (Tecniplast USA Inc. Exton, PA, EE.UU.) y recibieron una dieta de cría estándar (17% proteínas, 11% grasas, 53,5% carbohidratos) que contenía menos de un 0,03-0,08% de oxalato y aproximadamente un 0,5-0,9% de calcio. Después del período de aclimatación, los ratones se dividieron en cuatro grupos; tres grupos de tratamiento fueron alimentados con oxalato-descarboxilasa-CLEC mezclada con comida, mientras que los ratones del grupo de control correspondiente recibieron la misma dieta sin la adición del artículo de ensayo. Desde el primer día de tratamiento hasta el final del estudio, los ratones dispusieron a voluntad de agua potable complementada con un 0,7% de EG. Después de varios días de provocación, los ratones excretaban aproximadamente 3-6 mmol/l de oxalato al día en su orina, lo que corresponde a aproximadamente 10-20 veces la excreción en los ratones de referencia (no provocados).

35 Administración de enzima OXDC-CLEC; estudio de intervalos de dosis: En un estudio de dosis de OXDC-CLEC se utilizaron en total 44 ratones macho de la cepa AGT KO/129sv. Los ratones pesaban 20-25 gramos y tenían menos de 6 meses de edad. Los ratones fueron provocados con EG y después se dividieron de forma aleatoria entre un grupo de control y un grupo experimental. A lo largo de cuatro semanas consecutivas se controló la eficacia de tres dosis diferentes de oxalato-descarboxilasa recombinante, formulada en forma de cristales reticulados (glutaraldehído al 1%; véase el Ejemplo 9). Tal como se utiliza en este ejemplo, el concepto "OXDC-CLEC" se refiere a oxalato-descarboxilasa recombinante, formulada en forma de cristales reticulados (glutaraldehído al 1%, tal como se describe en el Ejemplo 9). La OXDC-CLEC se administró vía oral en forma de una mezcla de comida-enzima congelada/seca en dosis nominales de 5, 25 y 80 mg/día. Una cantidad adecuada de suspensión espesa de enzima en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) se mezcló con 3,5 g de alimento y se liofilizó. Cada mañana, los recipientes de comida se rellenaban con ~7 g de la mezcla de alimento/enzima.

45 Evaluación de la eficacia de la OXDC-CLEC: La eficacia de la terapia enzimática se controló mediante la reducción del oxalato en orina, la prevención de la deposición de oxalato de calcio en el parénquima renal, y la supervivencia. Al final del estudio, los ratones supervivientes fueron sacrificados y se tomaron muestras de sangre para realizar mediciones de creatinina.

50 Análisis de muestras de orina: Se recogieron muestras de orina durante 24 horas en jaulas metabólicas sobre ácido (50 µl de ácido clorhídrico 6 N por 3-4 ml de orina) para reducir al mínimo la descomposición espontánea del ácido ascórbico urinario en oxalato. Las muestras de orina se guardaron a -20°C hasta su posterior análisis. Se recogieron muestras de las diuresis diarias y múltiples muestras de orina de 24 h para medir los niveles de oxalato y creatinina. En el Ejemplo 15 se describen ensayos de oxalato y creatinina. La excreción urinaria de oxalato y creatinina se expresó como los µmol de oxalato y creatinina excretados en la muestra de 24 h (ml). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t de Student.

55 Análisis de muestras de sangre: Al final del estudio, los ratones fueron sacrificados y se tomaron muestras de suero. Para la medición de la creatinina en suero se utilizó una versión ligeramente modificada del método de reacción de Jaffe (véase, por ejemplo, el Creatinine Microassay Plate Kit de Oxford Medical Research, Inc.; Slot, Scand J. Clin. Lab. Invest. 17.381, 1965; y Heinegard D, Clin. Chim. Acta 43 1305, 1973), 80 µl de muestras de suero no diluidas se

mezclaron con 800 µl de pícrico alcalino en las cubetas y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo de color se midió por espectrofotometría a 510 nm. Después se añadieron 33,3 µ de ácido acético al 60% para extinguir la reacción no específica. Las muestras se mezclaron a fondo y, después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó una nueva lectura a 510 nm. La absorbancia final presente era la diferencia entre las dos lecturas. Para realizar una curva estándar se utilizaron diluciones en serie de solución de creatinina 1 mM.

La función renal se controló indirectamente midiendo el aclaramiento de creatinina. El aclaramiento de creatinina se expresa como la tasa de excreción de creatinina ($U_{cr} \times V$), donde U_{cr} representa la concentración de creatinina (µmol/l) en una muestra de orina, dividida por la creatinina en plasma (P_{cr}). Esto se representa de la siguiente manera:

$$C_{cr} = (U_{cr} \times V) / P_{cr} = \text{ml/h}$$

Los parámetros de seguridad controlados durante el estudio fueron la mortalidad, la ingesta de alimento y agua y el peso corporal. A lo largo de todo el estudio se realizaron una vez al día controles de mortalidad y observaciones clínicas laterales en jaula. La ingestión de alimento se midió una vez al día y la ingestión de agua se registró semanalmente. Al comienzo del estudio y al final del mismo se registraron los pesos corporales de todos los animales.

Tal como muestra la FIGURA 3, la administración oral de OXDC-CLEC a ratones AGT1 KO (129sv) provocados con EG condujo a una reducción significativa de los niveles de oxalato en orina a partir del cuarto día de tratamiento y hasta el final del estudio en comparación con los ratones de control no tratados correspondientes. En los tres grupos de tratamiento se observó una reducción entre el 30 y el 50%, observándose la reducción máxima en el grupo correspondiente a la dosis más alta (80 mg de OXDC-CLEC). Las dosis más bajas (25 mg y 5 mg) de OXDC-CLEC produjeron una reducción del oxalato en la orina hasta un 35%.

Los resultados se analizaron mediante pruebas t de Student de dos colas no pareadas. Al comienzo del estudio, cada grupo de dosificación tenía n = 11 ratones, pero varios ratones murieron en el curso del estudio a causa de la provocación con etilenglicol. Los resultados presentados solo incluyen ratones que estaban vivos el día particular de las mediciones de oxalato en la orina. El mejor modo de explicar la curva en forma de campana de la excreción de oxalato urinario en el grupo de control consiste en la observación de que la elevación inicial del oxalato urinario conduce a nefrocalcinosis, a una reducción de la función de filtrado renal y, en consecuencia, a una tasa de excreción de oxalato reducida con el paso del tiempo, y finalmente a la muerte en el peor de los casos.

Evaluación de la función renal por medición del aclaramiento de creatinina. Al final del estudio, todos los animales que habían sobrevivido a 4 semanas de provocación con EG fueron sacrificados y se tomó sangre para medir la creatinina en plasma y el aclaramiento de creatinina. Los 11 ratones del grupo que recibió la dosis de 80 mg sobrevivieron a las 4 semanas de provocación con EG; 8 de los 11 ratones del grupo que recibió la dosis de 25 mg de OXDC-CLEC sobrevivieron; 8 de los 11 ratones del grupo que recibió la dosis de 5 mg de OXDC-CLEC sobrevivieron; y 7 de los 11 ratones del grupo de control sobrevivieron. Para la medición de la creatinina de suero se utilizó el método de reacción de Jaffe ligeramente modificado arriba descrito (véase, por ejemplo, Creatinine Microassay Plate Kit de Oxford Medical Research, Inc.; Slot, Scand J. Clin. Lab. Invest. 17:381, 1965; y Heinegard, Clin. Chim. Acta 43:305, 1973).

La eficacia de la OXDC-CLEC administrada vía oral en la función renal se evaluó midiendo el aclaramiento de creatinina. La FIGURA 4 muestra el aclaramiento de creatinina en los ratones que sobrevivieron a todo el mes de estudio. En comparación con el grupo de control, el aclaramiento de creatinina era considerablemente más alto en los ratones que recibieron 80 mg de OXDC-CLEC ($p < 0,05$).

Todos los ratones (11/11) del grupo de tratamiento con 80 mg de OXDC-CLEC sobrevivieron a las 4 semanas de régimen de provocación con EG, mientras que solo 7 ratones (7/11) del grupo de control sobrevivieron a dicho régimen. La tasa de filtración renal, analizada mediante el aclaramiento de creatinina, era también considerablemente más baja que en el grupo que recibió la dosis de 80 mg (FIGURA 4).

Análisis de histopatología renal: Los riñones de los ratones se procesaron de forma rutinaria para inclusión de parafina y se dispusieron para obtener secciones transversales completas de los mismos. Cada riñón se cortó en 12 secciones de 4 µm por riñón y se tiñeron bien con hematoxilina y eosina para examen histológico rutinario, bien mediante el método histoquímico de sustitución de metal Yasue específico para detectar la presencia de cristales de oxalato de calcio en el tejido renal. Los portaobjetos se examinaron bajo el microscopio utilizando una ampliación 20X y el examinador puntuó las secciones en una escala de 4 categorías, aplicando los mismos criterios a cada una de las áreas anatómicas del riñón (corteza, médula y papila). Las categorías eran: (i) ninguna (ningún cristal de oxalato en ningún campo); (ii) mínima (1-5 cristales en cualquier campo); (iii) moderada (6-10 cristales en cualquier campo); y (iv) grave (todos los campos con múltiples grupos de cristales).

Las FIGURAS 5A-5C muestran imágenes representativas de tejido renal tanto de animales tratados como de animales de control. Los cristales de calcio Yasue-positivos eran visibles en el parénquima renal con una ampliación 20X. Todos los ratones tratados con 80 mg de OXDC-CLEC tenían un riñón sano normal sin trazas de depósitos de oxalato de calcio (FIGURA 5A). En el grupo de control y en algunos ratones de los grupos con dosis de tratamiento bajas se

observó nefrocalcinosis moderada (FIGURA 5B) y nefrocalcinosis grave (FIGURA 5C). Las flechas blancas indican depósitos de oxalato de calcio y las flechas grises de la FIGURA 5C indican un área grande con fibrosis intersticial.

El examen histológico de los riñones utilizando el método de sustitución de metal Yasue específico mostró depósitos principalmente en la corteza y en la parte medular de los riñones. En el caso de la nefrocalcinosis grave (FIGURA 5C) había depósitos de oxalato de calcio distribuidos de forma aleatoria en los riñones. También se podían ver signos de fibrosis e inflamación y la morfología de los glomérulos había cambiado con la formación ocasional de depósitos de oxalato de calcio dentro de los glomérulos. Todos los ratones (11/11) del grupo que había recibido la dosis de 80 mg tenían una morfología normal de los riñones en la necropsia, sin ninguna traza de deposición de oxalato de calcio en los riñones ni en la vejiga urinaria. En cambio, el 100% (11/11) de los ratones del grupo de control no tratado presentaba depósitos de oxalato de calcio. En los grupos tratados con dosis más bajas (25 mg o 5 mg de OXDC-CLEC), un 63% (7/11) de los ratones presentaba depósitos de oxalato de calcio en los riñones. Estos resultados demuestran un efecto positivo, dependiente de la dosis, de la terapia oral con OXDC-CLEC en los ratones AGT1 KO provocados con EG para reducir la hiperoxaluria y prevenir la deposición de cristales de oxalato de calcio en los riñones. La Tabla 3 muestra un resumen de los análisis histopatológicos de los 4 grupos de ratones.

Tabla 3 Gravedad de la nefrocalcinosis y cantidad de ratones afectados en los grupos tratados y en el grupo control después del tratamiento oral con OXDC-CLEC

CANTIDAD DE RATONES CON NEFROCALCINOSIS					
grupos dosis*	grave	moderada	mínima	ninguna	depósitos de oxalato-Ca (%)
CONTROL n = 11	4 (4 murieron)	-	7	-	100
80 mg n = 11	-	-	-	11	0
25 mg n = 11	3 (3 murieron)	2	2	4	63
5 mg n = 11	3 (3 murieron)	-	4	4	63

También se evaluó la eficacia del tratamiento oral con OXDC-CLEC en la frecuencia de formación de cálculos urinarios en ratones de control y en ratones de los tres grupos de tratamiento diferentes. En la vejiga urinaria de ratones AGT1 KO provocados con EG se hallaron dos tipos de cálculos diferentes: cálculos de oxalato de calcio monohidrato y cálculos de oxalato de calcio dihidrato. Un 36% (4/11) de los ratones del grupo de control y un 19% (2/11) de los ratones de los grupos tratados con dosis bajas presentaban cálculos perfectamente visibles en la vejiga. En el grupo que recibió la dosis alta de OXDC-CLEC (80 mg) no se observó ningún cálculo en la vejiga. El análisis de difracción por rayos X mostró que los cálculos blanquecinos de superficie rugosa están compuestos principalmente por oxalato de calcio monohidrato, mientras que los cálculos relativamente grandes con ángulos agudos cristalinos corresponden al oxalato de calcio dihidrato.

Análisis de la tasa de supervivencia mediante el estimador de Kaplan-Meier. El efecto del tratamiento con OXDC-CLEC en la tasa de supervivencia de ratones provocados con etilenglicol se analizó utilizando el método de Kaplan-Meier, en el que la supervivencia de sujetos muertos en un determinado momento se divide por la cantidad de sujetos que seguían vivos en ese momento del estudio. Este método muestra gráficamente la diferencia entre los grupos del estudio (FIGURA 6). Para los cálculos, frecuentemente se utilizan programas estadísticos tales como Kalieda graph y STATS.

El tratamiento oral con OXDC-CLEC aumentó la tasa de supervivencia de ratones AGT1 KO provocados con EG en comparación con la tasa de supervivencia de los controles correspondientes. Todos los ratones (11/11) del grupo de tratamiento con 80 mg de OXDC-CLEC sobrevivieron a los 30 días del período de estudio sin signos de enfermedad, mientras que 4 de los ratones del grupo de control presentaban nefrocalcinosis grave con desarrollo de cálculos urinarios.

Dado que la OXDC-CLEC está prevista para administración oral, también se evaluó el potencial de reacciones adversas de los cristales reticulados en tejidos gastrointestinales (GI). El tracto digestivo de los ratones AGT1 KO provocados con EG se examinó macroscópicamente y en diferentes partes del tracto GI, incluyendo el estómago (cuerpo y antro) y el intestino delgado (yeyuno e íleon). La evaluación confirmó que las cuatro semanas de tratamiento oral con OXDC-CLEC eran bien toleradas y no provocaban ningún cambio estructural o morfológico en el tracto GI. En el intestino grueso se observaron resultados similares.

Resumen del estudio de intervalos de dosis en ratones AGT1 KO provocados con EGF y tratados por vía oral con oxalato-descarboxilasa-CLEC. El tratamiento oral con OXDC-CLEC en un modelo animal de hiperoxaluria primaria fue seguro y eficaz. En resumen, cuatro semanas de tratamiento oral con OXDC-CLEC redujeron el oxalato urinario en un 30 - 50%. Con cada una de las tres dosis del artículo de ensayo evaluado se registró una reducción significativa y constante. Cuatro semanas de tratamiento oral con la dosis de tratamiento más alta evitaron la deposición de oxalato de calcio en el parénquima de riñón. Cuatro semanas de tratamiento oral aumentaron la tasa de supervivencia con las dos

dosis más bajas y evitaron la mortalidad animal con la dosis más alta estudiada. Por último, cuatro semanas de régimen de tratamiento no produjeron ningún cambio macroscópico ni microscópico en el tracto GI.

Ejemplo 15: Ensayos

5 Determinación de la concentración de proteínas: La concentración de oxalato-descarboxilasa se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. La absorbancia de una densidad óptica (DO) de 1,36 se consideró como 1 mg/ml.

10 Ensayo de actividad de OXDC: Para medir la actividad de la oxalato-descarboxilasa soluble, cristales de oxalato-descarboxilasa y cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados (OXDC-CLEC) se utilizó el protocolo de Sigma Aldrich (Enzymatic Assay of Oxalate Decarboxylase EC 4.1.1.2). Se trata de un ensayo indirecto de actividad en dos etapas. En la primera reacción, la OXDC convierte el oxalato sustrato en formiato y dióxido de carbono. En la segunda reacción, el hidrógeno formiato se transfiere estequiométricamente a NAD para formar NADH por la formiato-deshidrogenasa. La concentración subsiguiente de NADH se cuantifica espectrofotométricamente a 340 nm. La unidad (u) de actividad enzimática se define de la siguiente manera: una unidad de oxalato-descarboxilasa transformará 1,0 µmol de oxalato en formiato y dióxido de carbono por minuto con pH 5 y a 37°C.

15 Las muestras de ensayo se normalizaron a una concentración de 0,007-0,02 y 0,009-0,03 mg/ml en el caso de los cristales de OXDC y OXDC-CLEC, respectivamente, en tampón de fosfato de potasio 5 mM, pH 7,0, con DTT 1 mM (Sigma). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante la absorbancia a 280 nm. La formiato-deshidrogenasa (FDH) a 40 U/ml se preparó en H₂O de fría antes de su uso y se mantuvo sobre hielo. Todos los demás reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente. Los reactivos se introdujeron en microtubos de 2 ml con barra de agitación en el siguiente orden: 300 µl de fosfato de potasio 100 mM y 200 µl de oxalato de potasio, pH 4,0, se mezclaron y calentaron durante 5 minutos en un baño de agua a 37°C, después se añadieron 100 µl de fosfato de potasio 5 mM con DTT 1 mM al vial vacío y 100 µl de oxalato-descarboxilasa diluida a todos los demás viales. Dos minutos después, la reacción se interrumpió con fosfato de potasio dibásico 150 mM. En la segunda reacción se añadieron 25 µl de NAD a 100 µl de solución FDH y la incubación continuó durante otros 20 minutos. Después, todas las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 16.100 rpm. A continuación, las mezclas de reacción se transfirieron a cubetas UV de 1,5 ml y se determinó la absorbancia a 340 nm utilizando un Shimadzu BioSpec (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Maryland).

La actividad específica enzimática se calculó de la siguiente manera

$$\text{Unidades/ml OXDC} = \frac{\text{volumen abs. x total (1,725 ml) x factor de dil.]}{(\text{ext. NADH} = 6,22)(\text{vol. OXDC} = 0,1 \text{ ml})(\text{tiempo de ensayo} = 2/5 \text{ min})} \quad \begin{matrix} 30 \\ \text{En un} \\ \text{experi} \\ \text{mento} \\ \text{espec} \end{matrix}$$

35 ifico, los cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados (OXDC-CLEC) (cristales con forma de diamante, reticulados con glutaraldehído al 1% mediante volteo durante una noche; véase el Ejemplo 9) se compararon con los cristales de OXDC. Los OXDC-CLEC mantuvieron un 50% de la actividad de la preparación de OXDC cristalina correspondiente.

40 Determinación de oxalato mediante el método colorimétrico: Los kits colorimétricos de oxalato para la determinación cuantitativa de oxalato en orina se adquirieron de Trinity Biotech USA (St. Louis, MO) o Greiner Diagnostic AG (Dennliweg 9, Suiza). Las muestras de orina se diluyeron y se trataron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo comprende dos reacciones enzimáticas: (a) el oxalato se oxida en dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno mediante la oxalato-oxidasa, y (b) el peróxido de hidrógeno así formado reacciona con 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) y ácido 3-(dimetilamino) benzoico (DMAB) en presencia de peroxidasa para producir un tinte de indamina que puede ser detectado mediante la absorbancia a 590 nm. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de oxalato en la muestra. Los valores de oxalato en la orina se calculan a partir de la curva estándar.

45 Determinación de creatinina mediante el método colorimétrico: Los kits colorimétricos de creatinina para la determinación cuantitativa de creatinina en la orina se adquirieron de Quidel Corporation (San Diego, CA: METRA Creatinine Assay kit) o Randox Laboratories (Antrim, Reino Unido). El ensayo se basa en el principio de que la creatinina reacciona con ácido pícrico en solución alcalina para formar un producto que tiene una absorbancia a 492 nm. La cantidad de complejo formado es directamente proporcional a la concentración de creatinina. Unas muestras de 24 h de orina de rata recogidas de jaulas metabólicas individuales se diluyeron en un factor 15 con agua bidestilada. Veinte µl de muestra de orina diluida se mezclaron con 20 µl de ácido pícrico/hidróxido de sodio (1:1). La absorbancia a 492 nm se midió después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los valores de creatinina urinaria se calcularon a partir de la curva estándar.

Ejemplo 16: Terapia con OXDC para el tratamiento de trastornos asociados al oxalato en humanos

Los humanos que requieren un tratamiento o prevención de un trastorno asociado al oxalato, como hiperoxaluria, pueden ser tratados mediante la administración oral de cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados. Los cristales de oxalato-descarboxilasa se administran en una dosis aproximada de 10 µg/kg a 25 mg/kg; 1 mg/kg a 25 mg/kg, o 5 mg/kg a 100 mg/kg, determinada por el médico que aplica el tratamiento y en función de la gravedad de los síntomas y la progresión de la enfermedad. Los cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados se administran 1, 2, 3, 4 o 5 veces al día, o se administran con menos frecuencia, por ejemplo una o dos veces por semana. Esta administración oral de OXDC-CLEC conduce a una reducción de los niveles de oxalato en orina de al menos un 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70% o más.

Ejemplo 17: Producción recombinante de oxalato-descarboxilasa

10 En células renales embrionarias humanas (HEK293): Un ADN codificador de OXDC (por ejemplo SEQ ID N°: 1 o 2) se clona en un vector de expresión adecuado. Después de la confirmación de la secuencia, el vector se puede linealizar y se puede llevar a cabo una transformación del vector linealizado en células HEK293 previamente sembradas utilizando reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 en una placa de 6 cm de diámetro. La reacción de transfección se cultiva durante una noche en un medio apropiado, y los transformantes se seleccionan en medio complementado con 0,5 g/l de neomicina. Los clones de células HEK293 transfectados de forma estable se identifican después de cultivarlos en un medio que contiene neomicina durante hasta 3 semanas. Después, los clones se aíslan y propagan, y se utilizan para la expresión de OXDC.

20 En células de ovario de hámster chino (CHO): Un ADN codificador del gen de OXDC se clona en un vector de expresión adecuado. Después se separan células CHO lec 3.2.8.1 cultivadas mediante digestión con tripsina y se recogen mediante centrifugación. A continuación, las células se suspenden en tampón salino tamponado con fosfato de electroporación (EPBS) hasta una concentración final de $\sim 1 \times 10^7$ /ml, y se transforman con el vector linealizado por electroporación. Después del cultivo durante una noche, el medio se cambia por medio complementado con 0,5 g/l de neomicina. Después se llevan a cabo cambios sucesivos de medio para seleccionar clones celulares CHO transfectados de forma estable. Una vez establecidos y propagados los clones celulares transfectados de forma estable, las células se utilizan para expresión de OXDC.

30 En *Pichia Pastoris*: Un ADN codificador del gen de OXDC se clona en un vector de expresión adecuado. Después de confirmar la secuencia, el vector se puede linealizar y después transformar en un huésped de *Pichia Pastoris* (véase Whittaker y colaboradores J. Biol. Inorg. Chem. 7:136-145, 2002). Los transformantes se seleccionan con zeocina, se expanden en medio complejo de glicerón tamponado (BMGY), y se inducen con metanol. Después se puede aislar la OXDC del medio de cultivo.

En *Saccharomyces cerevisiae*: El gen de OXDC sintético se puede clonar en un vector de expresión adecuado que contiene, por ejemplo, el promotor Gall (pGal) y secuencias de terminación para la expresión. Después de confirmar la secuencia, el vector de expresión se transforma en el *Saccharomyces cerevisiae* competente W303-1A por electroporación. Los transformantes se seleccionan y propagan antes de utilizarlos para la expresión de OXDC.

35 En células de insecto: El ADN codificador de OXDC se puede clonar en un vector de expresión adecuado, por ejemplo un sistema de baculovirus. Después de confirmar la secuencia, el vector se puede transformar en células de *E. coli* DH10Bac competentes, y las células de *E. coli* que contienen el báculo recombinante se pueden seleccionar y verificar. El ADN de báculo recombinante se aísla y se utiliza para transfectar células Sf9 de insecto utilizando reactivos tales como el reactivo Cellfectin™ (Invitrogen, Carlsbad, California). Las partículas de baculovirus recombinante se pueden aislar, propagar y titular antes de utilizarlas para infectar células Sf9 para la expresión de OXDC.

45 En *E. coli*: El ADN codificador de OXDC se clona en un vector de expresión de *E. coli* adecuado. Después de confirmar la secuencia, el vector se transforma en BL21 de *E. coli* competente o, en caso necesario, en Origami B (DE3) de *E. coli*, que permite la formación de enlaces disulfuro en la proteína recombinante expresada en esta cepa. Los transformantes se seleccionan cultivándolos sobre placas de nutriente que contienen antibióticos y se verifican mediante PCR de colonia utilizando cebadores específicos del gen de OXDC. Después, los transformantes se cultivan en el medio líquido y se inducen con isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para la expresión de OXDC.

Ejemplo 18: Secuencias

50 Secuencia de *Collybia velutipes* (SEQ ID N°: 1) para expresión en *Candida boidinii*. Dos secuencias Not I están subrayadas; el triplete ATA en negrita es un codón espaciador; la secuencia con subrayado doble es una secuencia de factor de apareamiento alfa optimizada para *C. boidinii*; la secuencia codificadora de OXDC está representada en letras minúsculas.

```

1  ataagaatGCGGCCGCATAATGAGATTTCATCTATTTTACTGCTGTT
50  TTATTTGCTGCTTCTTCTGCTTACGCTGCTCCAGTTAATACTACTACTGA

```

```

100 AGATGAAACTGCTCAAAATCCAGCTGAAGCTGTATTCGGTATTCCTGATT
150 TAGAAGGTGATTTTGATGTTGCTGTTTTACCAATTTCTAATTCACAAAT
200 AATGGTCTAATTAATTTAATACTACTATTGCTTCTAATGCTCTCTAAGA
250 ACAAGGTCTTCTTTAGAAAAAAGAGAAGCTGAAGCTatgtttaataatt
300 ttcaaagattattaactggtattttattatctgggtttactgctgggtgtt
350 ccattagcttctactactactggtactggtactgctactggtacttctac
400 tgctgctgaaccatctgctactggtccatttgctctactgatccaaatc
450 cagttttatggaatgaaacttctgatccagcttttagttaaaccagaaaga
500 aatcaattagggtgctactattcaagggtccagataatttaccatttgattt
550 acaaaatccagatttattagctccaccaactactgatcagggttttggtg
600 gtaatgctaaatggccattttctttttctaaacaaagattacaaactggt
650 ggttgggttagacaaacaaatgaagttggtttaccattagctactaattt
700 agcttgtaactaatatgagattagaagctgggtgctatttagagaattacatt
750 ggcataaaaaatgctgaatgggttattggttttaaagggtctactcaaatt
800 tctgctgctgataatgaaggggagaaactatatttctactggttggtccagg
850 tgatttatggtattttccaccaggtattccacattctttacaagctactg
900 ctgatgatccagaagggtctgaatttatttttagtttttgattctgggtgct
950 tttaatgatgatgggtacttttttattaactgattgggttatctcargttcc
1000 aatggaagttatttttaaaaaatttttagagctaaaaatccagctgcttgggt
1050 ctcatattccagctcaacaattatataattttccatctgaaccaccagct
1100 gataatcaaccagatccagttttctccacaagggaactggtccattaccata
1150 ttcttttaatttttcttctgttgaaccaactcaatattctgggtgggactg
1200 ctaaaattgctgattctactacttttaatatattctggtgctattgctgtt
1250 gctgaagttactggtgaaccaggtgctttaagagaattacattggcatcc
1300 aactgaagatgaatggactttttttatttctggtaatgctagagttacta
1350 tttttgctgctcaatctggtgcttctacttttgattatcaagggtgggtgat
1400 attgcttatggtccagcttctatgggtcattatggttgaaaatattggtaa
1450 tactactttaacttatttagaagtttttaactactgatagatttgcctgatg
1500 tttctttatctcaatgggttagctttaactccaccatctggttggttcaagct
1550 catttaaattagatgatgaacttttagctgaattaaaacaatttgctac
1600 taaagctactgttgttgggtccagtttaattaaGCGGCCGCTaaactat 1646

```

Secuencia de *Bacillus subtilis* (SEQ ID N° 2): La "G" subrayada en la posición 705 indica una sustitución de bases A → G. Esta sustitución de bases no altera la secuencia de aminoácidos.

```

1  ATGAAAAAACAAATGACATTCGCGAGCCAAATTAGAGGAGACAAAGGAG
50  CAACCGGTAAAAATCCCGCGCAATATTGAAAGAGACCGGCAAAACCCTGAT
100 ATGCTTCGTTCCGCCCTGAAACCGATCATGGCACCGTCAGCAATATGAAAGTT
150 TTCATTCTCTGATACCTCAAAACCGATTAGAAAAAGGCGGATATGCCCGGG
200 AAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATTTCAGAAAACCTTGCCATCCGTAAAT
250 ATGCCGGCTGAAGCCAGGCGCGATTCCGCGAGCTTCACTGGCATAAAGAAGC
300 TGAATGGGCTTATATGATTTACCGAAGTGCAAGAGTCACAAATTGTAGATG
350 AAAAAAGGCGCGAGCTTTATTGACCATGTAGGTGAAGGAGACCTTTTGCTAC
400 TTCCCGCTCAGGCCTGCCGCACTCCATCCAAGCGCTGGAGGAGGAGCTGA
450 GTTCCTGCTCGTGTGTTGACGATGGATCATTCCTCTGAAAACAGCACGTTCC
500 AGCTGACAGATTGGCTGGCCACACTCCAAAAGAAGTCATTGCTGCGAAC
550 TTCCGGCTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCTGCCAAAGAAAATA
600 TATATTTGAAAACCAACTTCCTGGCAGTTTAAAAGATGATATTGTGGGAAG
650 GCGCGAATGGCGAAGTGCCCTTATCCATTTTACTTACCGCCTTCTTGAACAA
700 GAGCCGATCGAATCTGAGGAGAGAAAAGTATACATTCCAGATTCGACAAA
750 CTTCAAAAGTGCTTAAAACCATCGCATCAGCGCTCGTAACAGTAGAACCCG
800 GCGCCATGAGAGAACTGCACTGGCACCCTGAATACCCACGAATGGCAATAC
850 TACATCTCCGGTAAAGCTAGAATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGC
900 CAGAACGTTTAATTACCAAGCCGGTGATGTGCGGATATGTACCATTTCGAA
950 TGGGTCAATTACGTTGAAAACATCGGGGATGAACCGCTTGCTCTTTTAGAA
1000 ATCTTCAAAGACGACCATTATGCTGATCTATCTTTAAACCAATGGCTTGC
1050 CATGCTTCCTGAAACATTTGTTCAAGCCGACCTTGACTTGGGCAAGACT
1100 TTAATGATGTGCTTTCAAAAGAAAAGCACCCAGTACTGAJAAAAGAAATGC
1150 ACTAAATAA .1158

```

Más abajo se muestra la proteína de oxalato-descarboxilasa traducida de la secuencia de *Bacillus subtilis* (Swiss-Prot: O34714) (SEQ ID N°: 3),

```

1  MKKQNDIPQPIRGDKGATVKIIPRNIERDRQNFDMLVPPETDHGTVSNMK
50  FFSFDTHNRLEKGGYAREVTVRELPISENLASVNMRLKPGAIKELHWHKE
100  AEWAYMIYGSARVTIVDEKGRSFIDDVGEGLWYFPGSLPHSTQALEZGA
150  EFLLVFDGGSFSENSTFQLTDWLAHTPREVIAANPGVTKEISNLPGKEK
200  YIFENQLPGSLKDDIVEGPNCEVPYPFTYRLLEQEPSESGOKVYIADST
250  NPKVSKTILASALVTVEPGAMRELHWHPNTHWQYYISGKARMTVFASDGH
300  ARTFNYQAGDVGYVPPFANGHYVENIGDEPLVFLETFKDDHYADVSLNQWL
350  AMLPETFVQAHLDLGKDPDVLSEKHPVVKKCKSK 385

```

5 Ejemplo 19: Estabilidad de OXDC soluble, OXDC cristalina y OXDC-CLEC a pH bajo (3,0)

En 1 ml en cada caso de tampón de citrato de sodio, pH 3,0, se recogieron 2,5 mg/ml de OXDC soluble (Ejemplo 5), 5,0 mg/ml de OXDC cristalina (Ejemplo 5) y 5,0 mg/ml de OXDC-CLEC (Ejemplo 10) en tubos Eppendorf y se incubaron durante 5 horas a 37°C. Después de 0,2 y 5 horas se tomaron muestras para medir la estabilidad de la enzima. Las actividades se determinaron tal como se describe en el Ejemplo 15. La FIGURA 7 presenta resultados que muestran la estabilidad de la OXDC y OXDC-CLEC a pH 3,0 después de 0,2 y 5 horas. La OXDC-CLEC retuvo aproximadamente el 100% de la actividad después de 5 horas de incubación a pH 3,0, mientras que la OXDC soluble perdió durante las 2 primeras horas aproximadamente un 51% de la actividad y después de 5 horas solo mantenía aproximadamente un 40% de la actividad en comparación con la actividad original. La OXDC cristalina era más estable que la OXDC soluble,

manteniendo aproximadamente un 68% de la actividad en 1 hora y aproximadamente un 67% de la actividad en 2 horas.

Ejemplo 20: Estabilidad de la OXDC soluble, la OXDC cristalina y cristales de OXDC-CLEC en presencia de pepsina

- 5 En 1 ml en cada caso de tampón de citrato de sodio, pH 3,0, se recogieron 1,0 mg/ml de OXDC soluble (Ejemplo 5), 10,0 mg/ml de OXDC cristalina (Ejemplo 5) y 1,0 mg/ml de OXDC-CLEC (Ejemplo 10) en tubos Eppendorf y se incubaron con pepsina (la carga de pepsina se preparó en una concentración de 1 mg/ml en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,5) a una proporción 50:1 OXDC:pepsina durante 5 horas a 37°C. Después de 0,2 y 5 horas se tomaron muestras para medir la estabilidad de la enzima. Las actividades se determinaron como en el Ejemplo 15. La FIGURA 8 presenta resultados que muestran la estabilidad de la OXDC soluble, OXDC cristalina y OXDC-CLEC en presencia de pepsina después de 0,2 y 5 horas.

- 15 Tal como muestra la FIGURA 8, tanto en caso de un pH bajo como en presencia de pepsina se puso de manifiesto una superioridad de la formulación de OXDC-CLEC frente a la OXDC soluble. La muestra de OXDC-CLEC mantuvo aproximadamente un 60% de la actividad después de 5 horas de incubación a 37°C, mientras que la mayoría de la OXDC soluble y la OXDC cristalina se había degradado después de 2 horas por la pepsina y solo mantenía aproximadamente un 20% de la actividad después de 3 horas.

Ejemplo 21: Estabilidad de la OXDC soluble, la OXDC cristalina y la OXDC-CLEC en presencia de quimotripsina

- 20 En 1 ml en cada caso de tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, se recogieron 1,0 mg/ml de OXDC soluble (Ejemplo 5), 10,0 mg/ml de OXDC cristalina (Ejemplo 5) y 1,0 mg/ml de OXDC-CLEC (Ejemplo 10) en tubos Eppendorf y se incubaron con quimotripsina (la carga de quimotripsina se produjo en una concentración de 1 mg/ml en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, recién preparado) a una proporción 50:1 OXDC:quimotripsina durante 5 horas a 37°C. Después de 0,2 y 5 horas se tomaron muestras para medir la estabilidad de la enzima. Las actividades se determinaron como en el Ejemplo 15. La FIGURA 9 presenta resultados que muestran la estabilidad de la OXDC soluble, OXDC cristalina y OXDC-CLEC en presencia de quimotripsina después de 0,2 y 5 horas.

- 25 Los resultados de la FIGURA 9 muestran que la OXDC-CLEC y a la OXDC cristalina no reticulada eran estables y resistentes a la segmentación proteolítica por quimotripsina después de 5 horas de incubación. Los análisis mostraron que la enzima de OXDC-CLEC y OXDC cristalina no reticulada mantenían aproximadamente un 100% de la actividad en comparación con sus valores originales en 5 horas. Al mismo tiempo, la proteína soluble había perdido aproximadamente un 50% de la actividad después de 2 horas de exposición a quimotripsina y 5 horas después toda la OXDC soluble se había degradado, manteniendo un 0% de la actividad.

Ejemplo 22: Estabilidad de la OXDC soluble, la OXDC cristalina y la OXDC-CLEC en jugo intestinal simulado con pancreatina

- 35 En un jugo intestinal simulado (jugo intestinal simulado preparado de acuerdo con la recomendación USB) se recogieron 5,0 mg de OXDC soluble (Ejemplo 5), 10,0 mg/ml de OXDC cristalina (Ejemplo 5) y 10,0 mg/ml de OXDC-CLEC (Ejemplo 10). 6,8 mg de fosfato de potasio monobásico se disolvieron en 250 ml de agua y se mezclaron con 77 ml de hidróxido de sodio 0,2N y 500 ml de agua desionizada. Después se añadieron 10 mg de pancreatina y el pH se ajustó a 6,8 con ácido clorhídrico 0,2N o hidróxido de sodio 0,2N. Luego se añadió agua a 1 l, 1 ml en cada caso, en tubos Eppendorf y la mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C. Se tomaron muestras después de 0, 1 y 2 horas para medir la estabilidad de la enzima. Las actividades se determinaron como en el Ejemplo 15. La FIGURA 10 muestra los resultados.

- 40 Los resultados mostrados en la FIGURA 10 indican que la OXDC-CLEC es estable en jugo intestinal simulado con pancreatina, manteniendo aproximadamente el 100% de la actividad. En cambio, la pancreatina (mezcla de lipasa, amilasa y proteasa) degradó la mayor parte de la OXDC soluble en 1 hora, y ésta solo mantenía una actividad de un aproximadamente 26% y un 28% después de 1 hora y 2 horas de incubación, respectivamente. La OXDC cristalina no reticulada era mucho más estable que su forma soluble en presencia de pancreatina, que solo perdió aproximadamente un 76% y aproximadamente un 49% después de 1 hora y 2 horas de incubación, respectivamente.

- 45 Además, la OXDC-CLEC protege la enzima frente a la segmentación por proteasas, como pepsina y quimotripsina. La estabilidad de la OXDC-CLEC puede corresponder al menos a aproximadamente un 100%, 200%, 300%, 400% o más de la estabilidad de la OXDC soluble en las mismas condiciones. La OXDC-CLEC mantiene sus actividades en una proporción aproximadamente 2, 3 o 4 veces mayor que la OXDC soluble bajo las mismas condiciones. Por consiguiente, en comparación con la OXDC soluble, la OXDC-CLEC es tanto activa como estable bajo las condiciones rigurosas del intestino, que oscilan entre un pH ácido de aproximadamente 2,5 o 3 y un pH de aproximadamente 7,5 u 8, y que contiene diversas proteasas.

Aquí se han descrito diversas realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que es posible realizar diversas modificaciones sin salirse del alcance de la invención. Por consiguiente, otras realizaciones entran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende cristales de oxalato-descarboxilasa, donde los cristales de oxalato-descarboxilasa están reticulados con un agente reticulante y tienen una actividad que corresponde al menos a aproximadamente el 100% de la actividad de una forma soluble de la oxalato-descarboxilasa.
2. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su utilización en un tratamiento de un trastorno asociado al oxalato en un mamífero, seleccionándose dicho trastorno entre hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria idiopática, intoxicación por etilenglicol (oxalato), enfermedad idiopática por cálculos urinarios, insuficiencia renal (incluyendo insuficiencia renal progresiva, crónica o terminal), esteatorrea, malabsorción, enfermedad ileal, vulvodinia, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis quística, insuficiencia pancreática exocrina, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, nefrocalcinosis, urolitiasis y nefrolitiasis, opcionalmente agudos o crónicos.
3. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su uso según la reivindicación 2, donde el trastorno se relaciona con una función renal o hepática.
4. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su uso según la reivindicación 2, donde el trastorno se selecciona de entre el grupo consistente en hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria idiopática, intoxicación por etilenglicol, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal, urolitiasis, nefrolitiasis y un trastorno renal.
5. Utilización de una composición de cristales de oxalato-descarboxilasa en un dispositivo extracorpóreo, caracterizada porque el dispositivo extracorpóreo no está dentro del cuerpo y porque permite el contacto de un fluido corporal con dichos cristales de descarboxilasa.
6. Utilización según la reivindicación 5, caracterizada porque el dispositivo es un dispositivo de diálisis o una membrana de un dispositivo de diálisis.
7. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizados porque están enlazados de forma covalente mediante un agente reticulante.
8. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su utilización según la reivindicación 7, caracterizados porque son activos y estables en el tracto gastrointestinal del mamífero.
9. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su utilización según la reivindicación 7, caracterizados porque son activos y estables a valores de pH de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8.
10. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su utilización según la reivindicación 7, caracterizados porque están previstos para ser administrados vía oral.
11. Cristales de oxalato-descarboxilasa para su utilización según la reivindicación 7, para reducir el oxalato en al menos un 15%.
12. Utilización según la reivindicación 5 o 6, caracterizada porque los cristales de oxalato-descarboxilasa están enlazados de forma covalente mediante un agente reticulante.
13. Utilización según la reivindicación 12, caracterizada porque los cristales de oxalato-descarboxilasa son activos y estables a valores pH de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8.
14. Utilización según la reivindicación 12 para reducir el oxalato en al menos un 15%.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque los cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados tienen una actividad correspondiente al menos a aproximadamente un 150% de la actividad de la forma soluble de la oxalato-descarboxilasa.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque los cristales de oxalato-descarboxilasa reticulados están reticulados con glutaraldehído.

FIG. 1

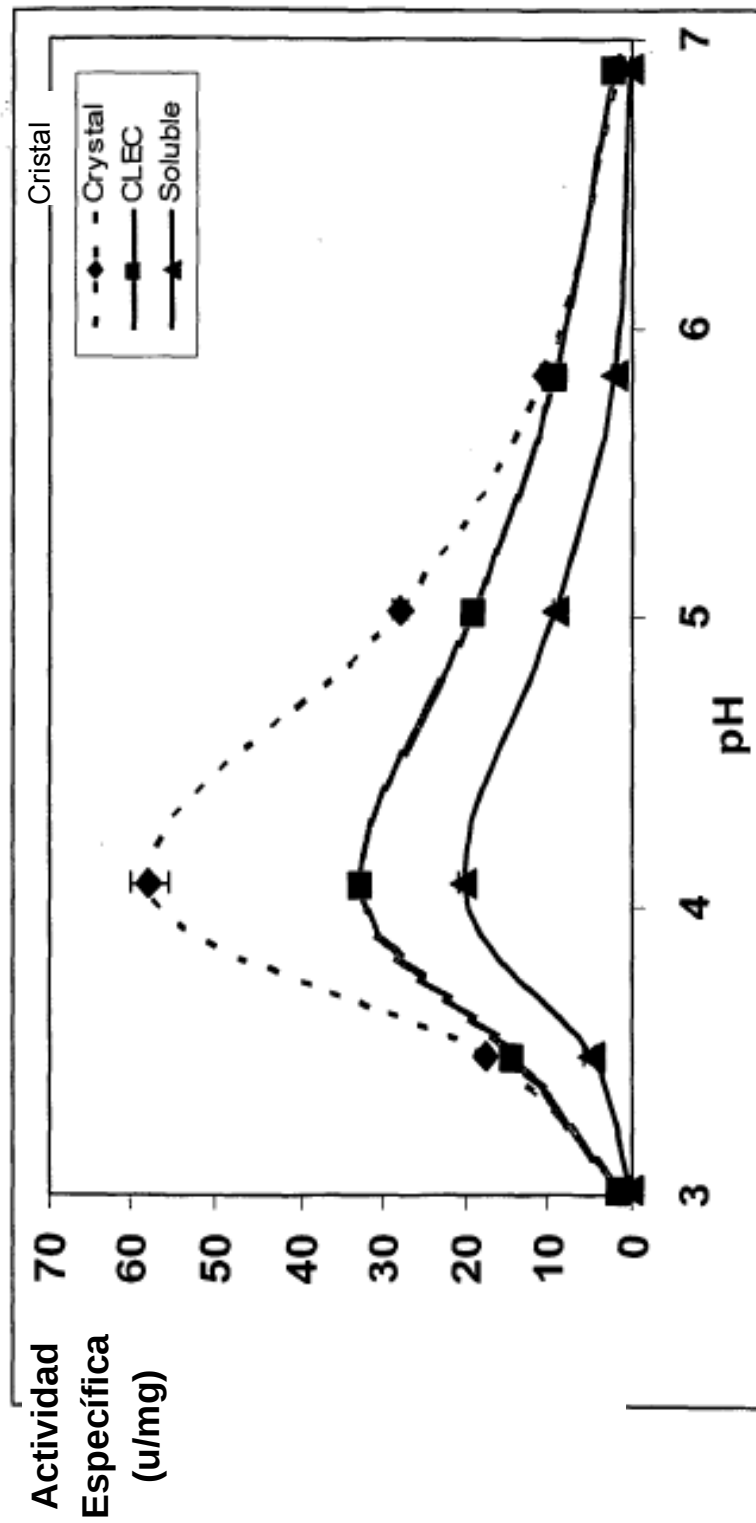


FIG. 2

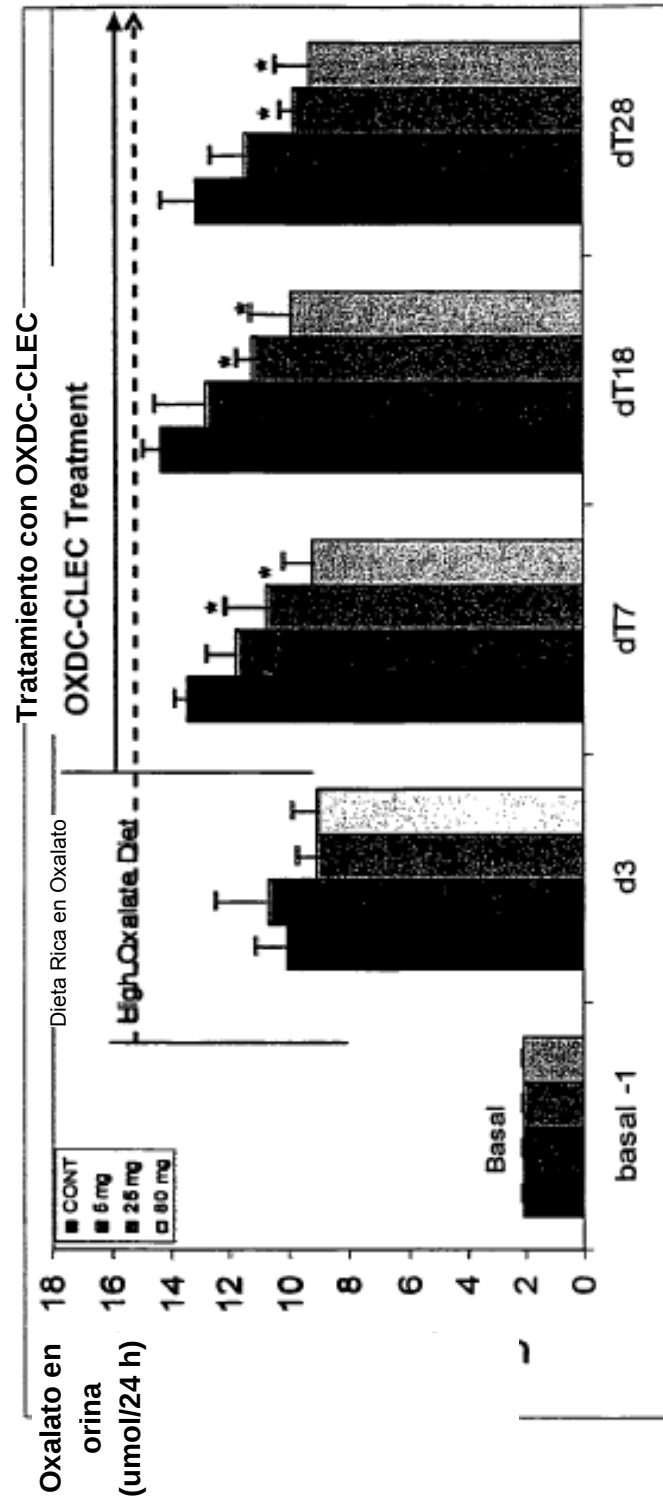


FIG. 3

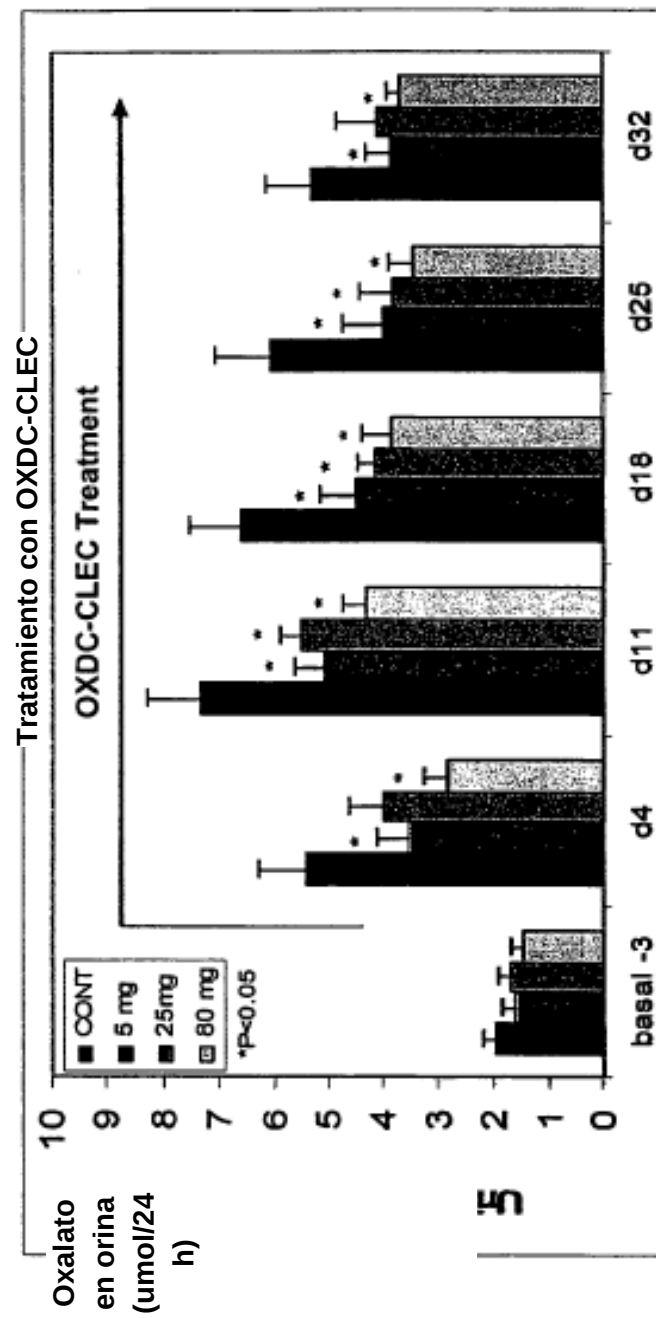


FIG. 4

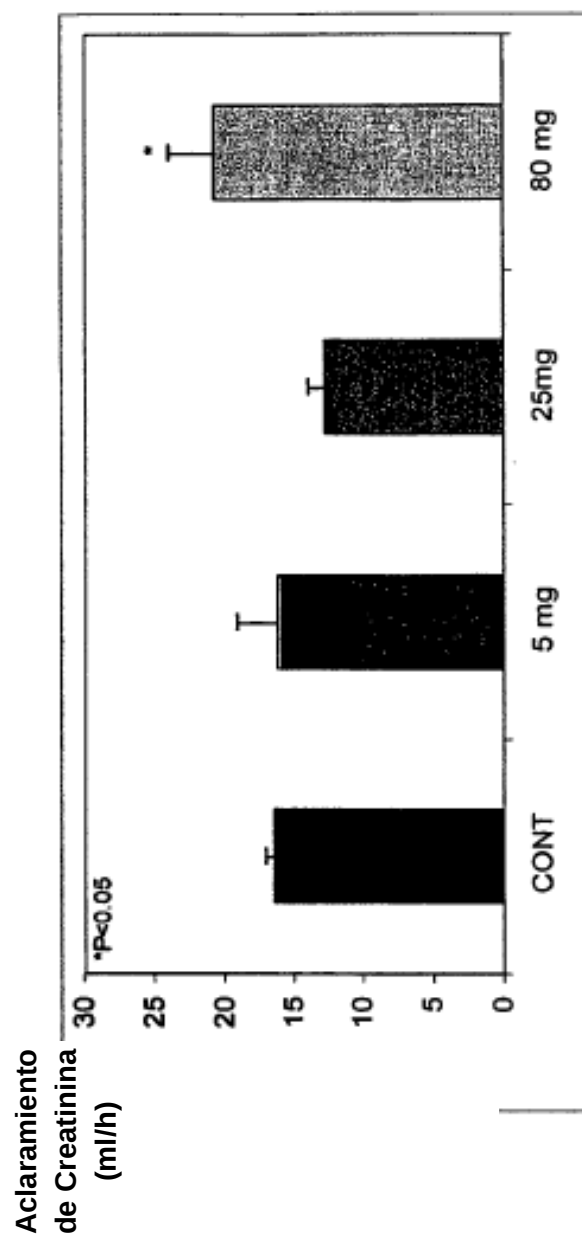


FIG. 5C

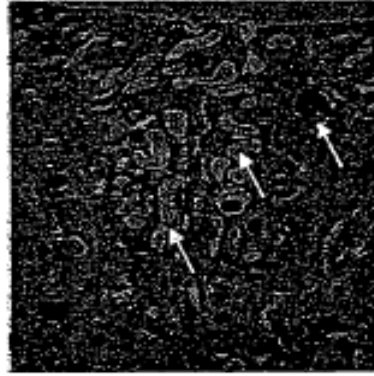


FIG. 5B

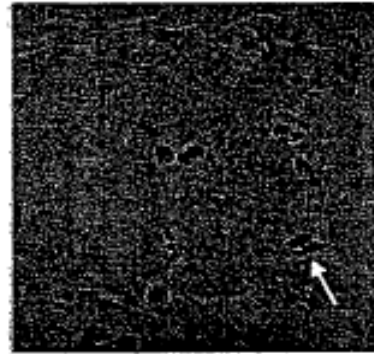


FIG. 5A



FIG. 6

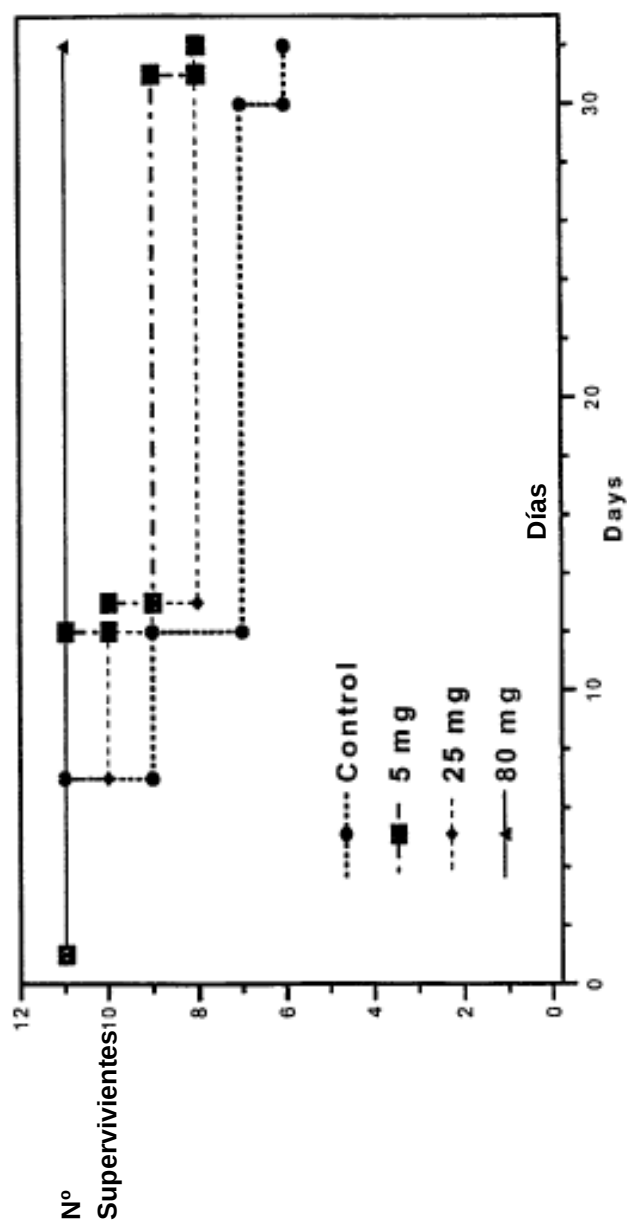


FIG. 7

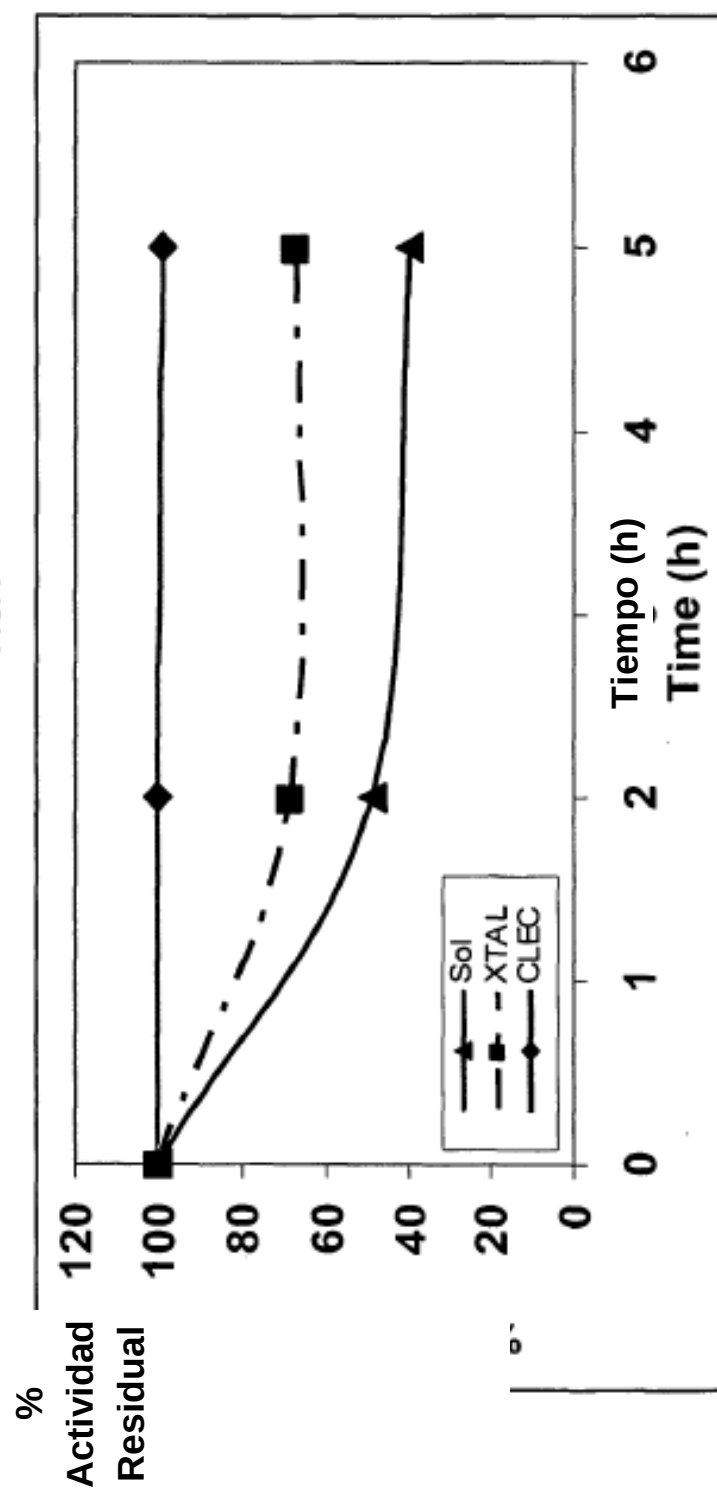


FIG. 8

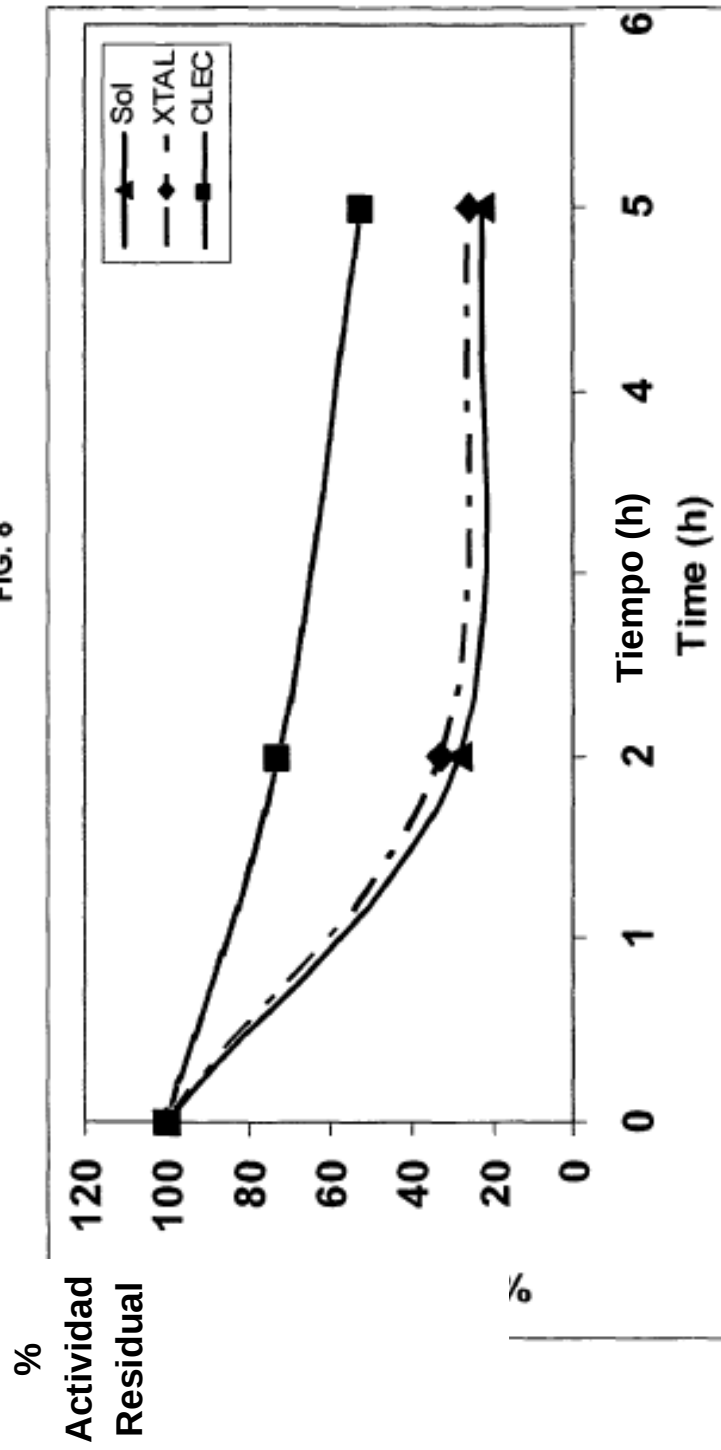


FIG. 9

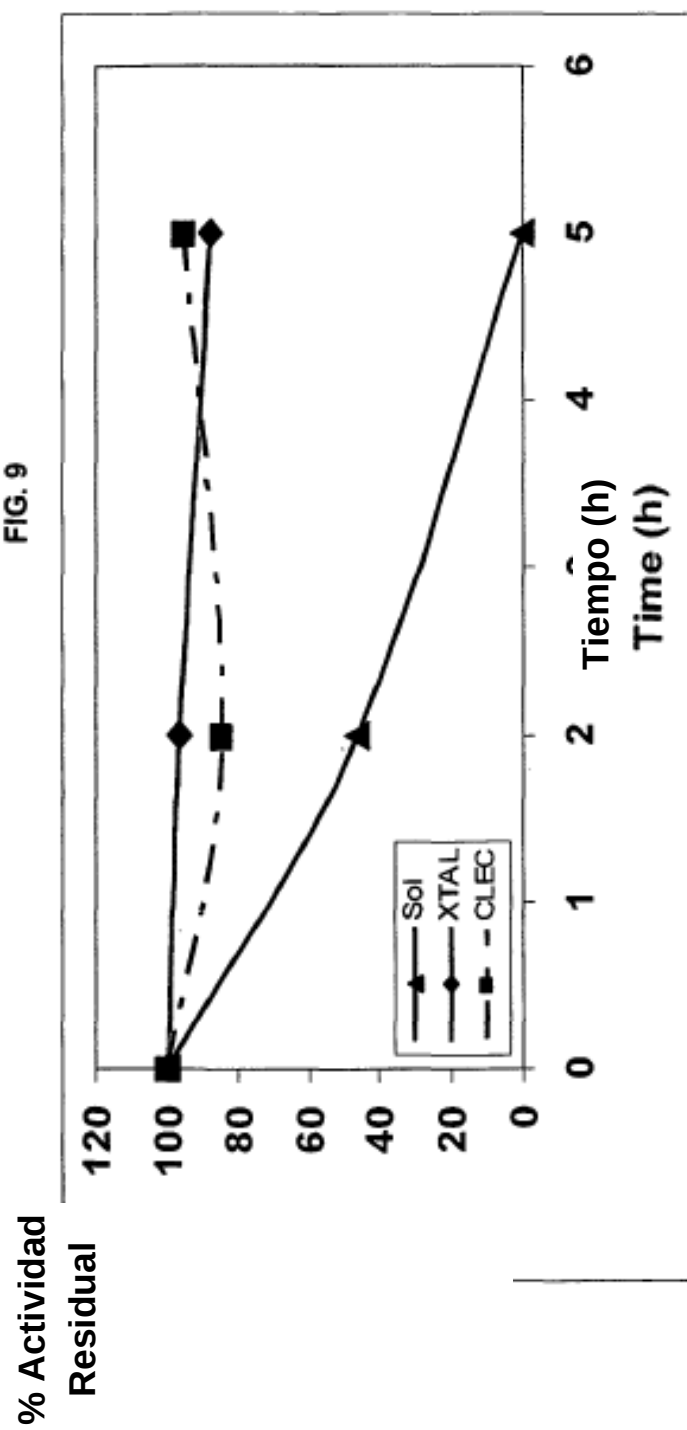


FIG. 10

