

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 258**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2005 E 05854220 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1962873**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden bacterias que reducen oxalato**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2013

73 Titular/es:
**OXTHERA INTELLECTUAL PROPERTY AB
(100.0%)
Sturegatan 56
114 36 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:
KAUL, POONAM

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 258 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden bacterias que reducen oxalato

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para tratar y prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato. Más en particular, la invención se refiere a composiciones y usos que comprenden bacterias que degradan el oxalato o reducen el oxalato.

Fundamentos

10 La enfermedad de los cálculos del tracto renal-urinario (urolitiasis) es un importante problema sanitario en todo el mundo. La mayoría de los cálculos asociados con la urolitiasis se componen de oxalato cálcico sólo o de oxalato cálcico más fosfato cálcico. Otros estados de la enfermedad han sido también asociados con el exceso de oxalato. Estos incluyen la vulvodinia o dolor vulvar crónico, la oxalosis asociada con una enfermedad renal en fase final, los trastornos de la conductancia cardiaca, la enfermedad de Crohn, y otros estados de enfermedad entérica.

15 El ácido oxálico, y/o su sal, el oxalato, se encuentran en una amplia variedad de alimentos, y por lo tanto es, un componente de muchos constituyentes en las dietas humana y animal. El aumento de la absorción de oxalato puede ocurrir después de comer alimentos que contienen elevadas cantidades de ácido oxálico. Es bien sabido que los alimentos tales como las espinacas y el ruibarbo contienen altas cantidades de oxalato, pero hay una gran cantidad de otros alimentos y bebidas que también contienen oxalato. Como el oxalato se encuentra en una variedad de alimentos tan amplia, son difíciles de formular dietas con bajo contenido en oxalato y que también sean sabrosas. Además, a menudo es problemático el cumplimiento de una dieta baja en oxalato.

20 También se produce metabólicamente oxalato endógeno por las enzimas de tejido normal. El oxalato, que incluye el oxalato de la dieta que se absorbe así como el oxalato que se produce metabólicamente, no se sigue metabolizando por enzimas del tejido y por consiguiente ha de ser excretado. Esta excreción se produce sobre todo a través de los riñones. La concentración de oxalato en los fluidos renales es crítica, causando el aumento de las concentraciones de oxalato un riesgo más elevado de formación de cristales de oxalato cálcico y por lo tanto la subsiguiente formación de cálculos renales.

25 El riesgo de formación de cálculos renales gira alrededor de varios factores que todavía no están completamente explicados. La enfermedad de los cálculos del tracto renal o urinario se presenta hasta en un 12% de la población en los países occidentales y aproximadamente el 70% de estos cálculos se componen de oxalato cálcico o de oxalato cálcico más fosfato cálcico. Algunas personas (por ejemplo, pacientes con una enfermedad intestinal como la enfermedad de Crohn, la enfermedad intestinal inflamatoria, o esteatorrea, y también los pacientes que han sido sometidos a una cirugía de bypass yeyunoileal) absorben más oxalato en sus dietas que otros. Para estas personas, la incidencia de urolitiasis de oxalato aumenta de una forma acusada. El aumento de la incidencia de la enfermedad se debe al aumento de los niveles de oxalato en los riñones y en la orina, y esto, el síndrome hiperoxalúrico más frecuente en el hombre, se conoce como hiperoxaluria entérica. El oxalato es también un problema en los pacientes con una enfermedad renal en fase final y hay pruebas recientes (Solomons, C. C., M. H. Melmed, S. M. Heitler [1991] "Calcium citrate for vulvar vestibulitis" *Journal of Reproductive Medicine* 36: 879-882) que el aumento de oxalato interviene también en la vestibulitis vulvar (vulvodinia).

30 Se han aislado bacterias que degradan el oxalato a partir de heces humanas (Allison, M. J., H. M. Cook, D. B. Milne, S. Gallagher, R. V. Clayman [1986] "Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans", *J. Nutr.* 116: 455-460). Se encontró que estas bacterias son similares a las bacterias reductoras del oxalato que habían sido aisladas a partir de los contenidos intestinales de varias especies de animales (Dawson, K. A., M. J. Allison, P. A. Hartman [1980] "Isolation and some characteristics of anaerobic oxalate-degrading bacteria the rumen" *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 833-839; Allison, M. J., H. M. Cook [1981] "Oxalate degradation by microbes of the large bowel of herbivores: the effect of dietary oxalate" *Science* 212: 675-676; Daniel, S. L., P. A. Hartman, M. J. Allison [1987] "Microbial degradation of the oxalate in the gastrointestinal tracts of rats" *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1793-1797). Estas bacterias son diferentes de cualquier organismo descrito con anterioridad y se les ha dado tanto un nuevo nombre de especie como de género (Allison, M. J., K. A. Dawson, W. R. Mayberry, J. G. Foss [1985] "*Oxalabacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhibit the gastrointestinal tract." *Arch. Microbiol.* 141: 1-7).

35 No todos los seres humanos son portadores de poblaciones de *O. formigenes* en su tracto intestinal (Allison, M. J., S. L. Daniel, N. A. Comick [1995] "Oxalate-degrading bacteria" en Khan, S. R. (ed.), *Calcium oxalate in Biological Systems* CRC Press; Doane, L. T., M. Liebman, O. R. Caldwell [1989] "Microbial oxalate degradation: effects on oxalate and calcium balance in humans" *Nutrition Research* 9: 957-964). Hay concentraciones bajas o una completa carencia de bacterias degradadoras del oxalato en las muestras fecales de personas que han tenido una cirugía de bypass yeyunoileal (Allison et al [1986] "Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans" *J. Nutr.* 116: 455-460). También, ciertas personas y animales pueden mantener colonias de *O. formigenes* pero, no obstante, tienen niveles en exceso de oxalato por razones no totalmente comprendidas.

Lo que se necesita son métodos para el tratamiento de seres humanos y animales para reducir los niveles de oxalato en sus organismos para tratar o prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato. Los métodos deseables incluirían la administración de composiciones reductoras de oxalato.

Sumario de la invención

5 La presente invención comprende composiciones para tratar y prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato. Las composiciones de la presente invención comprenden composiciones farmacéuticas que comprenden microorganismos que reducen el oxalato. Los métodos de la presente invención comprenden métodos para preparar composiciones farmacéuticas. Una realización comprende métodos que reducen el riesgo de desarrollar trastornos relacionados con el oxalato reduciendo la cantidad de oxalato en el tracto gastrointestinal. Esta reducción en el
10 tracto gastrointestinal da lugar a una reducción en los niveles sistémicos de oxalato con lo que se favorece una buena salud.

En una realización de la presente invención, se logra una reducción de la absorción de oxalato suministrando bacterias de degradación del oxalato al tracto gastrointestinal. En una realización, estas bacterias son *Oxalobacter formigenes*. Estas bacterias usan oxalato como sustrato. Esta utilización reduce la concentración de oxalato soluble
15 en el intestino y, de esta forma, la cantidad de oxalato disponible para la absorción. Una reducción del oxalato en el tracto gastrointestinal puede conducir también a la eliminación de oxalato del sistema circulatorio. Los usos de la presente invención contemplan una reducción global de la carga de oxalato en una persona.

En una realización específica, esta invención proporciona métodos y composiciones para el suministro de *O. formigenes* viables al tracto gastrointestinal de las personas que están en un riesgo creciente de enfermedad relacionada con el oxalato. Las bacterias eliminan oxalato del tracto intestinal, reduciendo de esta manera la cantidad de oxalato disponible para la absorción y dando lugar al aumento de la excreción de oxalato de la sangre a los intestinos.
20

De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, los microbios que degradan el oxalato y que son distintos de *O. formigenes*, que utilizan oxalato como un sustrato, también se pueden utilizar para lograr la degradación del oxalato terapéutico, reduciendo así el riesgo de urolitiasis y otros trastornos relacionados con el oxalato. Estos otros microbios pueden ser, por ejemplo, bacterias tales como clostridia o pseudomonas. Adicionalmente, la presente invención comprende métodos y composiciones para proporcionar secuencias de polinucleótidos exógenos capaces de conferir una función reductora del oxalato a los microorganismos que no producen enzimas reductoras de oxalato de forma natural. Tales secuencias de polinucleótidos pueden utilizarse para transformar tales microorganismos naturales, aquellos que son originalmente incapaces de reducir el oxalato, en microorganismos capaces de reducir el oxalato. Estos microorganismos transformados pueden ser usados en los métodos y composiciones de la presente invención y se consideran en este documento.
25
30

En una realización de la presente invención, las composiciones comprenden los microbios que degradan el oxalato, y producen enzimas que confieren a estos microbios la capacidad de degradar el oxalato. En una realización alternativa, las composiciones pueden comprender microbios que son transformados con secuencias de polinucleótidos que confieren a los microbios transformados la capacidad de degradar el oxalato. Las secuencias de polinucleótidos que codifican genes y proteínas que reducen el oxalato se contemplan en la presente invención. Las secuencias de polinucleótidos que codifican enzimas que se encuentran en microorganismos que reducen el oxalato, tales como bacterias u hongos, u otras enzimas reductoras de oxalato, se pueden usar en los métodos de la presente invención. Las secuencias de polinucleótidos se pueden usar para transformar microorganismos o células de tal forma que los microorganismos o células tengan más actividad de reducción del oxalato, la misma actividad de reducción de oxalato, o menos actividad de reducción de oxalato que los microorganismos de reducción de oxalato de origen natural. Las secuencias de polinucleótidos se pueden usar también en sistemas sintéticos o ex vivo para proporcionar proteínas que tienen actividad de reducción de oxalato. Tales microbios o enzimas se pueden proporcionar en composiciones que se proporcionan en forma de composiciones y formulaciones farmacéuticas enseñadas en el presente documento en donde los microbios o enzimas pueden ser proporcionados en formulaciones farmacéuticas que comprenden excipientes, y otros vehículos farmacéuticos conocidos en la técnica. Además, dichas composiciones farmacéuticas comprenden vehículos de suministro, en forma de polvos, para el suministro al tracto gastrointestinal de personas o de animales.
35
40
45

50 Se pueden usar enzimas que desempeñan un papel en la degradación del oxalato en los métodos y composiciones de la presente invención e incluyen, pero sin limitarse a ellas, formil-CoA transferasa, oxalil-CoA descarboxilasa, oxalato-oxidasa, oxalato-descarboxilasa y otras enzimas, cofactores y co-enzimas que son sustituyentes de las rutas de degradación del oxalato o están implicadas en las rutas metabólicas del oxalato, en particular la reducción de oxalato.

55 También se describen usos y composiciones que comprenden enzimas para reducir los niveles de oxalato con el fin de tratar o prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato. Por ejemplo, se logra una reducción en los niveles de oxalato administrando enzimas que actúan degradando el oxalato. Estas enzimas se pueden aislar y purificar o se pueden administrar como lisado de células. El lisado de células se puede preparar de cualquier microorganismo que tenga función de reducir el oxalato, por ejemplo, *O. formigenes*. En una realización específica, las enzimas que

se administran son una o más de las enzimas de la presente invención, tales como, pero sin limitarse a ellas, oxalato-d Descarboxilasa, oxalato-oxidasa, formil-CoA transferasa y oxalil-CoA Descarboxilasa. Opcionalmente se pueden administrar factores adicionales que mejoran la actividad de la enzima. Estos factores adicionales pueden ser, por ejemplo, oxalil CoA, MgCl₂, y TPP (difosfato de tiamina, una forma activa de vitamina B₁). Las composiciones farmacéuticas que comprenden enzimas comprenden una o más enzimas y, opcionalmente, cofactores, coenzimas, y otros agentes que potencian la actividad de la enzima, individualmente o en combinación, y se proporcionan junto con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se consigue una reducción de los niveles de oxalato administrando enzimas de degradación del oxalato producidos por un microorganismo recombinante, tal como *Escherichia coli*, que ha sido transformado para que exprese las enzimas de degradación del oxalato. El hospedador recombinante se puede administrar en una forma bien sea viable o bien no viable. Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y/o suplementos nutricionales para administración oral. Estas composiciones liberan los microorganismos de degradación del oxalato, o enzimas de degradación del oxalato, en el intestino de los seres humanos o los animales. Las composiciones de la presente invención comprenden formulaciones farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención comprenden un sistema de suministro de dosis que proporciona las composiciones en el punto deseado, tal como el suministro de las composiciones al tracto gastrointestinal del receptor. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en forma de componente de los alimentos, tales como la leche, carnes, y yogur.

En otra realización de la presente invención se consigue una reducción de la absorción de oxalato en los animales domésticos, agrícolas, o exóticos deficitarios en bacterias de degradación del oxalato mediante la administración de microorganismos de degradación del oxalato.

Los usos de la presente invención comprenden tratar o prevenir condiciones relacionadas con el oxalato en seres humanos y animales mediante la administración de una cantidad eficaz de composiciones de reducción de oxalato que comprenden uno o más microorganismos de reducción de oxalato, una o más enzimas de reducción de oxalato o combinaciones y mezclas de los mismos. Las condiciones relacionadas con el oxalato incluyen, pero sin limitarse a ellas, hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales de oxalato de cálcico (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase final, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es un gráfico de los datos de una dieta alta en calcio.

La Figura 1B es un gráfico de los datos de una dieta baja en calcio.

La Figura 2A es un gráfico de oxalato excretado.

La Figura 2B es un gráfico de oxalato excretado.

La Figura 2C es un gráfico de oxalato excretado.

Las Figuras 3A-C, es un gráfico de oxalato excretado.

La Figura 4 un gráfico de oxalato excretado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende composiciones para la reducción del oxalato. Las composiciones de la presente invención comprenden microorganismos que son capaces de reducir el oxalato. Las composiciones comprenden microorganismos que son capaces de reducir el oxalato. Tales microorganismos incluyen, pero sin limitarse a ellos, *Oxalobacter formigenes*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacilos*, *Bifidobacterias*, algunos o todos de los cuales son capaces de reducir el oxalato, pero también incluyen microorganismos, tales como bacterias u hongos que se transforman con secuencias de polinucleótidos exógenos se forma que se confiere la capacidad de reducción de oxalato. Adicionalmente, los microorganismos de la presente invención incluyen microorganismos que han sido transformados con uno o más vectores reductores de oxalato que comprenden secuencias de polinucleótidos endógenos o exógenos que codifican enzimas reductoras de oxalato o actividades asociadas de manera que los microorganismos son "super-reductores". Los súper-reductores han potenciado la capacidad nativa u original de reducción de oxalato, por ejemplo, en la transformación de *Oxalobacter formigenes* con secuencias reductoras de oxalato adicionales, o microorganismos que originalmente no tienen actividad de reducción de oxalato que se transforman con una o más secuencias que codifican péptidos de reducción de oxalato que tienen por resultado una actividad potenciada de reducción de oxalato. Las secuencias que codifican la actividad de reducción del oxalato pueden o no intercalarse en el genoma o en otros vectores que se encuentran en el microorganismo. Tal transformación puede incluir la provisión de secuencias génicas que codifican proteínas o péptidos de reducción de oxalato o puede proporcionar nucleótidos de bloqueo tales como iRNA o antisentido. Las técnicas para introducir secuencias de polinucleótidos y los microorganismos de transformación son conocidas en la técnica.

Como se usa en el presente texto, las expresiones enzimas de degradación del oxalato y enzimas de reducción del oxalato son indistintas y ambas se refieren a las enzimas implicadas en la reducción o la degradación del oxalato en cualquier organismo, o a fragmentos activos o proteínas recombinantes que comprenden fragmentos activos capaces de reducir o de degradar el oxalato.

- 5 También se describen secuencias de polinucleótidos que codifican péptidos o proteínas que están implicados en las rutas de reducción del oxalato. Tales secuencias de polinucleótidos pueden ser derivadas de cualquier fuente y pueden ser usadas en métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como para la transformación de células de origen microbiano, vegetal o animal, e incluyendo organismos completos.

- 10 Las composiciones de la presente invención comprenden también composiciones farmacéuticas que comprenden bacterias viables reductoras de oxalato y opcionalmente excipientes o vehículos farmacéuticos en un vehículo de suministro. Las composiciones también comprenden composiciones farmacéuticas que comprenden una o más enzimas reductoras de oxalato purificadas, incluyendo pero sin limitarse a ellas, purificadas a partir de fuentes naturales de tales enzimas, producidas por vía recombinante o enzimas producidas sintéticamente, y opcionalmente excipientes o vehículos farmacéuticos, en un vehículo de suministro.

- 15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden vehículos para la administración oral en forma de polvos. Tales vehículos de administración oral se utilizan para suministrar bacterias viables y enzimas de reducción de oxalato en las dosificaciones y métodos que se enseñan en el presente texto. Tales composiciones farmacéuticas son estables. Las composiciones pueden proporcionar bacterias viables y enzimas que tienen actividad durante al menos 12 meses, con una pérdida mínima en cfu (unidades formadoras de colonias, por sus siglas en inglés) y actividad de la enzima.

- 20 También se describen plantas y animales que tienen alterada la función de reducción de oxalato. Por ejemplo, tales plantas incluyen plantas que han sido transformadas por composiciones de polinucleótidos de forma que la cantidad de oxalato en la planta está rebajada o la cantidad de ácido oxálico producido esté incrementada en comparación con las plantas no transformadas. Las composiciones de la presente invención también comprenden animales que tienen una mejor capacidad de reducir el oxalato. Por ejemplo, los animales que tienen capacidades mejoradas de reducción de oxalato se pueden usar como modelos in vivo para el estudio de las condiciones relacionadas con el oxalato.

- 25 Los métodos de la presente invención comprenden preparar las composiciones de la presente invención. Los métodos de la presente invención comprenden la transformación de células, plantas y animales, por métodos conocidos por los expertos en la técnica para la introducción de secuencias de polinucleótidos exógenos. Tales secuencias de polinucleótidos se pueden derivar de cualquier fuente y pueden ser utilizadas en métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como para la transformación de células de origen microbiano, vegetal o animal, e incluyendo organismos enteros. Los métodos comprenden también la preparación de composiciones que comprenden lisados de células que tienen actividad de reducción de oxalato, composiciones que comprenden una o
- 30 más enzimas que tienen actividad de reducción de oxalato, y composiciones que comprenden constituyentes dietéticos preparados a partir de plantas o microorganismos que tienen alterados los niveles de oxalato. Los métodos también comprenden la preparación de composiciones farmacéuticas orales estables que comprenden bacterias viables reductoras de oxalato.

- 35 Los usos de la presente invención comprenden usar las composiciones de la presente invención. Tales usos incluyen proporcionar secuencias de polinucleótidos a las células para potenciar o reprimir la capacidad de reducción del oxalato de las células así como métodos de suplementación de la dieta de manera que las composiciones de la presente invención se administran a las plantas o animales en los alimentos o en las fuentes de fertilizantes o al mismo tiempo que los alimentos o las fuentes de fertilizantes para alterar los niveles de oxalato en la comida, durante la digestión de la comida o durante la absorción por las plantas.

- 40 La presente invención pertenece a la introducción de composiciones que comprenden una o más bacterias y/o enzimas de degradación del oxalato en el tracto gastrointestinal de un ser humano o animal, en donde la actividad de las composiciones reduce la cantidad y/o la concentración de oxalato presente, reduciendo así el riesgo de enfermedad debida al oxalato.

- 45 La presente invención comprende composiciones para el tratamiento y la prevención de condiciones relacionadas con el oxalato en seres humanos y animales mediante la administración de una composición que comprende una o más enzimas reductoras de oxalato. Tales composiciones se pueden administrar una o más veces al día durante uno o más días dependiendo de la gravedad de la condición relacionada con el oxalato o la cantidad de oxalato en el intestino o los fluidos corporales del ser humano o animal. Los tratamientos pueden continuar mientras estén presentes los niveles de oxalato no deseados en el ser humano o animal. Por ejemplo, la composición enzimática se
- 50 puede administrar una o más veces al día durante un intervalo de tiempo que incluye de un día a varios años. Para los seres humanos o animales con enfermedades crónicas relacionadas con el oxalato, la composición se puede administrar durante el resto de la vida útil del ser humano o animal.

Los usos para el tratamiento y la prevención de condiciones relacionadas con el oxalato pueden comprender la administración de una composición que comprende una cantidad efectiva de enzimas reductoras del oxalato o actividad enzimática para la reducción del oxalato. Una cantidad efectiva comprende una cantidad de unidades de actividad enzimática de reducción de oxalato que reduzca una parte del oxalato presente, o un nivel de unidades de actividad enzimática de reducción de oxalato que inicie una reducción en la cantidad de oxalato o mantenga una cantidad reducida de oxalato en el individuo, en comparación con la cantidad de oxalato presente antes de la administración de la composición. El número de unidades de actividad de la actividad enzimática de reducción del oxalato que se pueden utilizar en una composición de dosis única puede variar de 0,0001 unidades a 5.000 unidades, de 5 unidades a 100 unidades, de 0,05 a 50 unidades, a 0,5 a 500, de 0,01 unidades a 50 unidades, de 0,01 unidades a 5 unidades, de 1 unidad a 100 unidades, de 25 unidades a 50 unidades, de 30 unidades a 100 unidades, de 40 unidades a 120 unidades, de 60 unidades a 15, de 50 unidades a 100 unidades, de 100 unidades a 500 unidades, de 100 unidades a 300 unidades, de 100 unidades a 400 unidades, de 100 unidades a 5.000 unidades, de 1.000 unidades a 5.000 unidades, de aproximadamente 2.500 unidades a 5.000 unidades, de 0.001 unidades a 2.000 unidades y todos los intervalos comprendidos aquí. Las composiciones pueden incluir además otras enzimas, cofactores, sustratos, coenzimas, minerales y otros agentes que son útiles en la reducción del oxalato. Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que degrade un micromol de oxalato por minuto a 37°C.

En una realización específica, la presente invención se refiere a métodos para la preparación de composiciones que comprenden células de bacterias de degradación del oxalato de la especie *Oxalobacter formigenes*, al tracto gastrointestinal humano o animal, donde la actividad de los microorganismos reduce la cantidad de oxalato presente en el intestino provocando así una reducción de las concentraciones de oxalato en los riñones y en otros fluidos celulares. En otra realización, la presente invención comprende métodos para la preparación y administración de composiciones que comprenden una o más enzimas de degradación del oxalato, derivadas de cualquier fuente, al tracto gastrointestinal humano o animal, en donde la actividad de la una o más enzimas reduce la cantidad de oxalato presente en el intestino y conduce a una reducción de las concentraciones de oxalato en los riñones y en otros fluidos celulares. Las células o enzimas introducidas degradan el oxalato y las bacterias pueden o no replicarse en el hábitat intestinal de forma que la progenie de las células iniciales colonizan el intestino y siguen eliminando el oxalato. La presencia de bacterias reductoras de oxalato reduce el riesgo de formación de cálculos renales así como otras complicaciones de la enfermedad causadas por el ácido oxálico en exceso. En una forma de realización para uso humano, las cepas específicas de *O. formigenes* usadas son cepas aisladas de muestras intestinales humanas. Las cepas son por tanto parte de la flora bacteriana intestinal humana normal. Sin embargo, como no están presentes en todas las personas, o están presentes en número insuficiente, la introducción de estos organismos corrige una deficiencia que existe en algunos seres humanos.

Sin ánimo de vinculación con ninguna teoría en particular, se cree que el enriquecimiento del contenido de los intestinos con una o más especies de bacterias de degradación del oxalato o enzimas reductoras del oxalato provoca una reducción del oxalato en el contenido intestinal. Algunas de las bacterias o enzimas administradas llevan a cabo la degradación del oxalato en el sitio de absorción o cerca del mismo. La actividad de las bacterias o enzimas administradas hace que disminuya el nivel de absorción de oxalato de la dieta. Una reducción de la concentración de oxalato en los intestinos también puede llevar a una eliminación de oxalato desde las células y la circulación general. Más específicamente, una reducción de la concentración de oxalato en los intestinos también puede llevar a un aumento de la secreción de oxalato en el intestino desde la sangre y reducir así la cantidad de oxalato que necesita ser excretado en la orina. Por tanto, los métodos de la presente invención para la administración de bacterias reductoras de oxalato o enzimas de reducción de oxalato se pueden usar para tratar o prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato tales como hiperoxaluria primaria además del tratamiento de la hiperoxaluria dietética. Las composiciones y métodos de la presente invención son particularmente ventajosos en la promoción de niveles saludables de oxalato en seres humanos y animales.

Las composiciones farmacéuticas y nutracéuticas para la introducción de bacterias de degradación del oxalato o una o más enzimas de degradación del oxalato, solas o en combinaciones, en el tracto gastrointestinal incluyen bacterias o enzimas que han sido liofilizadas o congeladas en forma de líquido o pasta y pueden ser suministradas mediante un vehículo de suministro oral. La composición liberada convierte entonces el oxalato presente en el intestino en productos inocuos. Los vehículos farmacéuticos o nutracéuticos también se pueden combinar con las bacterias o las enzimas. Estos pueden incluir, por ejemplo, tampón de solución salina-fosfato o bicarbonato. Los métodos de la presente invención comprenden la administración de composiciones reductoras de oxalato al tracto gastrointestinal de los seres humanos o animales.

Otros usos de administración de estas composiciones que comprenden uno o más microorganismos, una o más enzimas reductoras del oxalato o combinaciones y mezclas, a los intestinos incluyen añadir directamente las composiciones a las fuentes alimenticias. La una o más bacterias pueden ser añadidas como células recién recolectadas, congelar las células secas, o células protegidas de alguna otra forma. La una o más enzimas pueden ser añadidas en forma de proteínas liofilizadas, enzimas complejadas con otros materiales para mantener la actividad enzimática, y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica para la adición de enzimas activas a las composiciones. Los alimentos se pueden suplementar con composiciones de degradación del oxalato sin afectar a su sabor ni a su aspecto. Estos alimentos pueden ser, por ejemplo, el yogur, la leche, la manteca de cacahuete o el chocolate. Después de la ingestión, cuando los productos alimenticios están siendo digeridos y absorbidos por los intestinos, las composiciones de degradación del oxalato, incluyendo uno o más microorganismos, una o más

enzimas o combinaciones, degradan el oxalato presente en los intestinos, reduciendo así la absorción de oxalato en el torrente circulatorio.

Como se señaló anteriormente, se puede suplementar una diversidad de alimentos con composiciones de degradación del oxalato. Los métodos para preparar tales alimentos que contienen composiciones reductoras de oxalato incluyen mezclar un material alimenticio con una composición reductora del oxalato. Por ejemplo, los microorganismos que reducen el oxalato pueden ser cultivados en medios y pueden ser separados del medio, por ejemplo, mediante centrifugación. Los cultivos de yogur tradicionales obtenidos de una industria láctea comercial se pueden mezclar con el cultivo de microorganismos de degradación del oxalato. Esta mezcla de cultivos puede añadirse después a la premezcla básica de yogur lácteo sin afectar negativamente al sabor ni a la consistencia. El yogur puede ser producido a continuación y puede ser empacutado usando procedimientos comerciales tradicionales. En otro ejemplo, las bacterias de degradación del oxalato se pueden añadir a yogures ya producidos. En un método similar, una composición reductora del oxalato que comprende una o más enzimas reductoras del oxalato puede ser añadida al cultivo bacteriano de yogur o al producto alimenticio de yogur.

Otro ejemplo de los usos de la presente invención es añadir a la leche la composición reductora del oxalato después de haber sido homogeneizada y esterilizada. Tal método se utiliza actualmente en la industria láctea para la adición a la leche de organismos *Lactobacillus acidophilis*. Cualquier fuente alimenticia que contenga bacterias puede ser usada suplementando con bacterias de degradación del oxalato. Estos productos alimenticios incluyen productos de queso o de carne que tienen microorganismos deseables añadidos durante la elaboración. Los alimentos que comprenden composiciones de reducción de oxalato que comprenden enzimas de reducción de oxalato no se limitan a aquellos alimentos que comprenden microorganismos, sino que incluyen cualquier fuente de alimento en la que se puedan añadir enzimas activas. Los materiales comúnmente considerados como materiales alimenticios se pueden usar como material portador para las enzimas de manera que las enzimas son activas en oxalato presente en el material alimenticio en cualquier fase de la producción o el crecimiento del material alimenticio, o cualquier etapa de la digestión o por el ser humano o animal, o en oxalato presente en el intestino.

En una realización, las cepas de bacterias, por ejemplo *O. formigenes*, usadas de acuerdo con la presente invención son cultivos puros que son aislados de cultivos anaeróbicos que han sido inoculados con diluciones de contenido intestinal de seres humanos normales o, para su uso con animales, de animales normales. Se puede utilizar un medio especial que contiene oxalato cálcico que permite la detección de colonias de degradación del oxalato. En una realización, la pureza de cada cepa puede asegurarse mediante el uso de al menos dos etapas posteriores de clonación repetitiva.

Las cepas de *O. formigenes* útiles de acuerdo con la presente invención se han caracterizado basándose en varios ensayos, que incluyen: patrones de ácidos grasos celulares, patrones de proteínas celulares, DNA y RNA (Jensen, N. S., M. J. Allison (1995) "Studies on the diversity among anaerobic oxalate degrading bacteria now in the species *Oxalobacter formigenes*" Abstr. to the General Meeting of the Amer. Soc. Microbiol., 1-29), y respuestas a las sondas de oligonucleótidos (Sidhu et al. 1996). Se han descrito dos grupos de estas bacterias (Grupos I y II, ambos existentes dentro de la presente descripción de las especies). Las cepas usadas han sido seleccionadas basándose en la capacidad de degradación del oxalato, y la evidencia de la facultad de colonizar el tracto intestinal humano. Las cepas elegidas incluyen representantes de ambos Grupos I y II de la especie.

Una realización de la presente descripción implica procedimientos para la selección, preparación y administración de las apropiadas bacterias de degradación del oxalato a una diversidad de sujetos. De forma destacada, pero no exclusiva, estos son personas o animales que no albergan estas bacterias en su intestino. Estas personas o animales no colonizados o colonizados débilmente se identifican utilizando pruebas que permiten detectar de una forma rápida y definitiva *O. formigenes*, incluso cuando los organismos están en concentraciones relativamente bajas en poblaciones bacterianas mixtas, tal como las que se encuentran en los contenidos intestinales. Los métodos de la presente invención también se pueden usar para tratar a personas o animales cuyas bacterias de degradación del oxalato han sido agotadas debido, por ejemplo, a un tratamiento con antibióticos o en situaciones post-quirúrgicas. Los métodos de la presente invención se pueden usar también para tratar a las personas o animales que tienen colonias de bacterias de degradación del oxalato pero que todavía tienen niveles no saludables de oxalato debido a, por ejemplo, susceptibilidad al oxalato y/o a la producción excesiva de oxalato endógeno.

Las bacterias que se pueden usar de acuerdo con la presente invención se pueden identificar mediante al menos dos métodos:

- 1) Se pueden utilizar ondas de oligonucleótidos específicos para estas bacterias, y/o
- 2) Un ensayo de cultivo en el que se inocula un medio anaeróbico con oxalato 10 mM y después de la incubación a 37°C durante 1 a 7 días, se determina la pérdida de oxalato.

Los métodos para la preparación de las composiciones farmacéuticas se enseñan en el presente texto y los métodos para el desarrollo de bacterias son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden desarrollar cultivos puros de cepas de *O. formigenes* en cultivos por tandas en grandes fermentadores y las células se pueden recolectar usando técnicas conocidas por los expertos. Las células de una sola cepa seleccionada o

mezclas de cepas conocidas pueden ser tratadas según se precise (por ejemplo, liofilizadas con trehalosa o glicerol) para preservar la viabilidad. Las células bacterianas, ya sean frescas o de la fermentación de existencias congeladas, se pueden mezclar con vehículos o excipientes, y después pueden ser liofilizadas. Después se carga un vehículo de suministro cargado con la composición en polvo.

- 5 Las composiciones farmacéuticas que se enseñan en el presente texto se ingieren en dosis y cantidades, y en intervalos determinados por las necesidades de los individuos. En algunos casos, una dosis única, o periódica, puede ser todo lo que se necesita, y en otros casos puede ser necesaria la ingestión regular (por ejemplo, con las comidas). Las dosis de cantidades efectivas se enseñan en el presente texto. Las composiciones farmacéuticas comprenden bacterias viables reductoras de oxalato y/o enzimas reductoras del oxalato solos o en combinación con
- 10 excipientes o vehículos fisiológicamente aceptables o portadores o vehículos farmacéuticos, tales términos se utilizan indistintamente en el presente texto. La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser menor que, igual a, o mayor que la cantidad de oxalato hecho constitutivamente y/o ingerido por el individuo, en una cantidad efectiva administrada en la dosis de reducción de oxalato durante un determinado período de tiempo. Para algunas condiciones relacionadas con el oxalato, la cantidad de actividad de reducción de oxalato administrada
- 15 por los métodos y composiciones de la presente invención puede ser menor que la cantidad de oxalato ingerido o hecho constitutivamente, y solamente puede necesitar para complementar o suplementar un bajo nivel de capacidad de reducción de oxalato en el paciente. Para otras condiciones, puede necesitarse proporcionar más actividad de reducción de oxalato.

- 20 Por ejemplo, en la hiperoxaluria primaria (PH), que es una enfermedad genética y una forma más grave de la hiperoxaluria, los pacientes producen aproximadamente 100-300 mg de oxalato al día. Los métodos de tratamiento de la PH y de prevención de las secuelas de la PH comprenden administrar una cantidad de una composición reductora de oxalato que sea eficaz en la reducción de al menos 100-300 mg de oxalato al día, o al menos 200 mg al día, o 300 mg al día, o mayor que 300 mg al día, o 400 mg al día. Tal régimen de administración puede ser por una ruta de administración oral. Por ejemplo, si es proporcionada por un vehículo de administración oral descrito en
- 25 el presente texto, que comprende una composición de bacterias de reducción de oxalato liofilizadas, el vehículo de suministro oral se puede proporcionar al menos una vez al día, al menos dos veces al día, por lo menos tres veces al día, por lo menos cuatro veces al día, o según sea necesario para suministrar una cantidad efectiva de actividad de reducción de oxalato.

Los portadores pueden ser materiales secos basados en sólidos para formulaciones en forma de polvo.

- 30 Los vehículos típicos para formulaciones secas incluyen trehalosa, maltodextrina, harina de arroz, celulosa microcristalina (MCC), estearato de magnesio, inositol, FOS, (oligosacáridos de fructosa), gluco-oligosacáridos (GOS), dextrosa, sacarosa, y vehículos similares.

- Los vehículos adecuados incluyen vehículos acuosos y oleaginosos tales como, por ejemplo, vaselina blanca, miristato de isopropilo, lanolina o alcoholes de lanolina, aceite mineral, monooleato de sorbitán, propilenglicol, alcohol cetilsteárico (juntos o en varias combinaciones), hidroxipropilcelulosa (PM = 100.000 a 1.000.000),
- 35 detergentes (por ejemplo, poli(estearato de oxilo) o lauril sulfato sódico) y mezclados con agua para formar una loción, un gel, una crema o una composición semi-sólida. Otros vehículos adecuados comprenden emulsiones de agua-en-aceite o de aceite-en-agua y mezclas de emulsionantes y emolientes con disolventes tales como estearato de sacarosa, cocoato de sacarosa, diestearato de sacarosa, aceite mineral, propilenglicol, 2-etil-1,3- hexanodiol , polioxipropilén-15-estearil éter y agua. Por ejemplo, las emulsiones que contienen agua, estearato de glicerol, glicerina, aceite mineral, espermaceti sintético, alcohol cetílico, butilparabeno, propilparabeno y metilparabeno son comercialmente disponibles. También se pueden incluir conservantes en el vehículo incluyendo metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico y sales de etilendiamina tetraacetato. También pueden incluirse en el portador aromas y/o colorantes bien conocidos. La composición puede incluir también un plastificante tal como glicerol o
- 40 polietilenglicol (PM = 800 a 20.000). La composición del portador puede variarse, siempre y cuando no interfiera significativamente con la viabilidad de las bacterias de reducción del oxalato o las enzimas de reducción del oxalato en la composición.

- Una composición típica de esta invención puede contener además cualquiera de los ingredientes inactivos siguientes: acacia, aspartamo, ácido cítrico, D & C Amarillo N ° 10, FD & C Amarillo No. 6, saborizante (natural y/o
- 50 artificial), polisorbato 80, alginato de propilenglicol , dióxido de silicio coloidal, y sacarosa y goma de xantano.

Una composición también puede comprender los ingredientes inactivos siguientes: aspartamo, beta caroteno, ácido cítrico, saborizante (natural y artificial), glicerina, maltol, manitol y metilcelulosa.

- En los métodos descritos en el presente texto para elaborar composiciones farmacéuticas de *O. formigenes* para administración oral al tracto gastrointestinal, que comprenden cultivar las bacterias utilizando métodos de
- 55 fermentación conocidos por los expertos en la técnica, opcionalmente congelar las células bacterianas, descongelar las células congeladas y liofilizar las células bacterianas, opcionalmente mezcladas en una solución de excipiente, seguido por el tamizado de las células liofilizadas formando un polvo y proporcionar el polvo en un vehículo de suministro para una formulación farmacéutica.

La invención se refiere además a la administración al tracto gastrointestinal humano o animal de productos de degradación del oxalato o enzimas preparadas a partir de organismos de reducción de oxalato de tales como células de *O. formigenes* o de otras fuentes, o por métodos tales como medios recombinantes. En una realización, las enzimas de degradación de oxalato pueden ser purificadas y preparadas en forma de una composición farmacéutica o nutracéutica para el consumo oral. En una realización preferida, estas enzimas se producen por vía recombinante. Las secuencias de ADN que codifican estas enzimas son conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 98/16632. Estas secuencias, u otras secuencias que codifican proteínas de degradación del oxalato, se pueden expresar en un hospedador adecuado. El hospedador puede ser, por ejemplo, *E. coli* o *Lactobacillus*. El hospedador transformado incluiría las señales adecuadas de regulación y de transporte. La proteína expresada puede ser aislada, purificada y administrada como se describe en el presente texto. Alternativamente, se puede administrar el hospedador recombinante que expresa las proteínas deseadas de degradación del oxalato. El hospedador recombinante se puede administrar en una forma bien sea viable o bien no viable. En otra realización preferida, las enzimas son recubiertas o formuladas o modificadas de alguna otra forma para proteger las enzimas de manera que no se inactiven en el estómago, y estén disponibles para ejercer su actividad de degradación del oxalato en el intestino delgado. Ejemplos de tales formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.286.495.

Las enzimas de degradación de oxalato como se usa en el presente texto incluyen todas las enzimas implicadas en las rutas del oxalato e incluyen pero no sin limitarse a ellas, oxalato-oxidasa, oxalato-d Descarboxilasa, formil-CoA transferasa y oxalil-CoA Descarboxilasa. La oxalato oxidasa se expresa en las plantas superiores y cataliza la oxidación dependiente del oxígeno del oxalato a CO₂ con formación concomitante de H₂O₂. Las oxalato oxidasas se han purificado de muchas fuentes, por ejemplo, plántulas raíces y hojas de cebada; tallos y hojas de remolacha; germen de trigo; hojas de sorgo; y piel de banana. Se ha desarrollado un procedimiento rápido de purificación de tres etapas para obtener oxalato oxidasa a partir de las raíces de la cebada. El gen que codifica la oxalato oxidasa de la raíz de cebada ha sido clonado, secuenciado y expresado.

La oxalato Descarboxilasa está presente principalmente en hongos. Recientemente se ha publicado una oxalato Descarboxilasa bacteriana en *B. subtilis* y está codificada por el gen *yvrk*. Las oxalato Descarboxilasas catalizan la degradación de oxalato libre a CO₂ y formiato. Se ha publicado la presencia de esta enzima en varios hongos, incluidos *Myrothecium*, *verrucaña*, ciertas cepas de *Aspergillus niger*, y el hongo de la pudrición blanca, *Coriolus versicolor*. El gen que codifica la oxalato Descarboxilasa de *Flammulina velutipes* ha sido clonado y secuenciado; véase el documento WO 98/42827.

La oxalil-CoA Descarboxilasa es activa en un sustrato activado por CoA y la convierte en formil-CoA. Una formil-CoA transferasa actúa entonces intercambiando formiato y oxalato en CoA. Estas enzimas han sido estudiadas en las bacterias de degradación del oxalato, *Pseudomonas oxalaticus* presentes en el suelo y en *Oxalobacter formigenes*, que residen en el tracto gastrointestinal de los vertebrados, incluyendo los seres humanos. Se ha demostrado que *O. formigenes* desempeña una relación simbiótica con su hospedador regulando la absorción de ácido oxálico en el intestino, así como los niveles de ácido oxálico en el plasma. Como resultado de ello se ha encontrado que la ausencia de esta bacteria es un factor de riesgo en los trastornos relacionados con el oxalato como la urolitiasis de oxalato cálcico idiopática recurrente y la hiperoxaluria entérica secundaria a la cirugía de bypass yeyuno-ileal, la fibrosis quística y la enfermedad intestinal inflamatoria.

Las patentes que describen diversos enzimas de degradación del oxalato y los genes que codifican estas enzimas incluyen las patentes de EE.UU. n° 5.912.125, n° 6.090.628 y n° 6.214.980. El término enzima de degradación de oxalato incluye, pero no sin limitarse a ellas, oxalato oxidasa, oxalato-d Descarboxilasa, oxalil-CoA Descarboxilasa, y formil-CoA transferasa, e incluye enzimas que son capaces de interactuar con oxalato o ácido oxálico. Estas enzimas se pueden derivar de fuentes naturales o se pueden sintetizar usando medios recombinantes conocidos en la técnica, e incluyen todos los fragmentos, tales como sitios de unión, sitios activos, o fragmentos capaces de interactuar con oxalato o con ácido oxálico. Este término también incluye, pero sin ser limitante, a todos los cofactores necesarios, coenzimas, metales, o materiales de unión o sustrato que se necesitan por la enzima en la interacción con oxalato o con ácido oxálico. La presente invención contempla también cualquier compañero de unión de estas enzimas e incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a las enzimas o interactúan con ellas.

El uso de *O. formigenes* es particularmente ventajoso porque es un organismo anaerobio que no crece en entornos de tejido aeróbicos y no produce ningún compuestos que sea tóxico para los seres humanos o animales. Como una alternativa a *O. formigenes* o a un hospedador recombinante, se pueden utilizar otras bacterias de degradación del oxalato, tales como *Clostridium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Lactobacilos*, *Bifidobacterias*. Se pueden administrar enzimas de degradación del oxalato preparadas a partir de tales bacterias alternativas o bien se puede administrar todo el microorganismo.

Además, todas las realizaciones mencionadas anteriormente son aplicables a animales domésticos, agrícolas, o mantenidos en zoológicos, que adolecen de números deficientes de bacterias de degradación del oxalato, así como a seres humanos. Por ejemplo, pueden administrarse enzimas y/o microorganismos de degradación del oxalato a mascotas domésticas, tales como perros, gatos, conejos, hurones, cobayas, hamsters y jerbos, así como a animales agrícolas, tales como caballos, ovejas, vacas y cerdos, o animales silvestres mantenidos para cría, como las nutrias

de río. Muchos animales que son capaces de reducción del oxalato pierden su capacidad cuando son capturados. La presente invención comprende métodos y composiciones para restaurar la actividad de reducción del oxalato perdida o reducida. Un aspecto de la presente invención comprende el tratamiento de animales recuperados de la naturaleza que han perdido o han disminuido la actividad de reducción de oxalato con las composiciones que se enseñan en el presente texto.

La presente invención comprende composiciones y usos para la administración de composiciones que comprenden una o más bacterias de degradación del oxalato, una o más enzimas, o combinaciones de bacterias y enzimas, en el tracto gastrointestinal humano o animal. Tales composiciones y usos son efectivos en la reducción de la cantidad y/o la concentración de oxalato presente. Tales usos y composiciones son efectivos en el tratamiento y la prevención de condiciones relacionadas con el oxalato. Un aspecto de la presente invención comprende composiciones y métodos para la introducción de enzimas de degradación del oxalato en el tracto gastrointestinal de un ser humano o animal. La presente invención comprende usos para el suministro de una o más enzimas de degradación del oxalato al tracto gastrointestinal de un ser humano o animal en forma de composiciones de vehículos farmacéuticos y/o nutracéuticos. Tales enzimas incluyen, pero no sin limitarse a ellas, oxalato oxidasa, oxalato-descarboxilasa, oxalil-CoA descarboxilasa, y formil-CoA transferasa. Estas enzimas pueden ser derivadas de fuentes conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la enzima vegetal oxalato oxidasa (OXO) puede ser purificada a partir de plántulas de cebada, y la oxalato descarboxilasa se puede purificar a partir de fuentes bacterianas o fúngicas.

Alternativamente, se pueden derivar enzimas de degradación del oxalato por medios recombinantes. Por ejemplo, medios recombinantes tales como la clonación, la expresión y la purificación, se pueden utilizar para obtener enzimas de reducción de oxalato, por ejemplo la enzima oxalato descarboxilasa de *B. subtilis*. Tales métodos recombinantes son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se describe en general la clonación y expresión del gen de oxalato-descarboxilasa de *B. subtilis* (*YvrK*): El gen de la proteína oxalato descarboxilasa (*YvrK*) ha sido clonado en el plásmido pET-9a y el pET-14b (Novagen, WI), bajo el control de un fuerte promotor del bacteriófago T7, para la sobre-expresión en forma de proteína citosólica soluble. El hospedador de la expresión era la cepa de *E. coli* BL 21 (DE3) pLysS, un lisógeno λ DE3 deficiente en proteasas y que contiene una copia cromosómica del gen de la T7-RNA polimerasa bajo el control de *lacUV5*. Además, esta cepa lleva un plásmido compatible con pET que codifica la lisozima de T7, una enzima bifuncional que corta un enlace en la capa de peptidoglicano de la pared celular e inhibe la T7 RNA polimerasa. Esto permite mayor control de la expresión basal no inducida y permite el uso de métodos que rompen la membrana interna, tales como congelación-descongelación, o detergentes suaves, etc) para lisar la célula eficientemente. La expresión del producto génico se induce mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). En consecuencia, un aspecto de la presente invención comprende métodos que comprenden la administración de enzimas de degradación del oxalato que han sido producidas por un microorganismo recombinante. Se puede utilizar una diversidad de vectores de expresión y hospedadores para producir enzimas de degradación del oxalato como proteínas recombinantes, y tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica.

Otro aspecto de la presente invención comprende usos para la reducción de la absorción de oxalato suministrando bacterias de degradación del oxalato al tracto gastrointestinal de un ser humano o animal. Tales bacterias pueden incluir, pero sin limitarse a ellas, *Oxalobacter formigenes*, Clostridium, Lactobacilos, Bifidobacterias y Pseudomonas. Se ha aislado *O. formigenes* a partir de muestras fecales humanas y se ha clonado a través de la selección de colonias individuales. Esto incluye el material aislado HC-1, que fue originalmente obtenido por Ixion Biotechnology en 1996 por el Dr. Milton Allison. Por ejemplo se puede usar material congelado de cepa humana HC-1. Los métodos de la presente invención comprenden el enriquecimiento de los intestinos con una o más especies de bacterias de degradación del oxalato, la reducción global del oxalato en el contenido intestinal, reduciendo la absorción de oxalato en el intestino, la reducción de la concentración de oxalato en la sangre y en los fluidos renales y la reducción de los efectos deletéreos en el organismo debidos a la presencia de oxalato.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención comprende composiciones y usos para el suministro de bacterias reductoras de oxalato y enzimas de degradación de oxalato que pueden reducir el oxalato al tracto intestinal de personas que tienen un riesgo incrementado de enfermedades y/o condiciones relacionadas con el oxalato. Tales enfermedades y condiciones incluyen, pero no se limitan a las mismas, hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales de oxalato cálcico (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase final, trastornos de la conductancia cardiaca, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, personas que han sido sometidas a cirugía de bypass yeyuno-ileal, personas que tienen concentraciones insuficientes de bacterias de degradación del oxalato, y otros estados de enfermedad entérica. Los seres humanos y los animales que han sido sometidos a tratamiento con antibióticos, tratamiento de quimioterapia u otros tratamientos que cambian la flora intestinal, se tratan con las composiciones y métodos de la presente invención. La presente invención se usa para restaurar la capacidad de reducción de oxalato a los seres humanos o animales con la flora intestinal cambiada. El aumento de los niveles de excreción urinaria de oxalato favorece la formación de cálculos renales, contribuyen a la cicatrización renal, e incluso puede tener por resultado insuficiencia renal. En consecuencia, un aspecto de la presente invención comprende composiciones y usos para reducir la formación de cálculos renales.

Una reducción en las concentraciones globales de oxalato en los intestinos puede llevar también a la eliminación de oxalato de las células y de la circulación general. Más específicamente, una reducción de la concentración de

oxalato en los intestinos puede llevar también al aumento de la secreción de oxalato en el intestino desde la sangre. Sin ánimo de vinculación con ninguna teoría en particular, actualmente se cree que hay un gradiente transepitelial para la eliminación entérica de oxalato. En consecuencia, un aspecto de la presente invención comprende composiciones y métodos para reducir los niveles en sangre de oxalato y aumentar la excreción de oxalato favoreciendo la excreción de oxalato a partir de la sangre a través de un gradiente transepitelial de oxalato de la excreción de oxalato del colon. Un método de la presente invención comprende proporcionar a los intestinos de un ser humano o animal una composición para reducir la concentración o el nivel de oxalato de un ser humano o animal. Tal disminución puede comprender la disminución de la cantidad de oxalato que se encuentra en los intestinos, en la sangre, en el suero, en los fluidos tisulares, y en otros fluidos corporales.

Una composición de la presente invención comprende una pasta de *O. formigenes* preparada para la administración oral. Para cada lote de pasta de *O. formigenes*, se usa un solo vial madre de HC-1 para generar un cultivo de siembra con el fin de iniciar el desarrollo en fermentación de producción a gran escala. Las bacterias de cada fermentación se recolectan mediante centrifugación y se mezclan con excipientes crioprotectores, que proporcionan protección contra la liofilización. La pasta celular puede ser también sometida a liofilización, o secado por pulverización, o secado al vacío, lo que tiene por resultado un polvo fino que tiene una potencia en el intervalo de 10^7 a 10^9 ufc/gramo.

Las composiciones de la presente invención comprenden composiciones preparadas a partir de extractos de una o más bacterias de reducción de oxalato en el intervalo de 10^3 a 10^{12} ufc/gramo, de 10^3 a 10^{10} ufc/gramo, de 10^5 a 10^{12} ufc/gramo, de 10^5 a 10^{10} ufc/g, de 10^7 a 10^9 ufc/g, de 10^7 a 10^8 ufc/gramo y todos los intervalos entre estos.

En el presente texto se describen también composiciones que comprenden uno o más enzimas que tienen actividad para la reducción de oxalato. Un aspecto de la invención comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición enzimática al tracto gastrointestinal de un ser humano o animal. Una cantidad efectiva de una composición enzimática es capaz de reducir una porción de oxalato en los intestinos o hacer disminuir la concentración de oxalato en un ser humano o animal desde el nivel medido antes de administrar la composición. Dicha medida puede ser una medida del oxalato presente en el intestino a partir de fuentes alimenticias o puede ser un nivel medido en un fluido corporal como la sangre o la orina.

La presente invención comprende usos para tratar o prevenir condiciones relacionadas con el oxalato mediante la administración de composiciones que contienen *O. formigenes* al tracto gastrointestinal de un ser humano o animal. Se puede administrar a los sujetos cápsulas entéricas que contienen $\geq 10^3$ ufc/g de células viables de *O. formigenes*. Tal dosificación puede ocurrir al menos dos veces al día con las comidas. La presente invención comprende también usos para la administración de composiciones de reducción de oxalato que comprenden uno o más microorganismos de reducción de oxalato, una o más enzimas reductoras del oxalato o combinaciones de los mismos. Un uso de la presente invención comprende la administración al menos una vez al día de una cantidad eficiente de una composición de reducción de oxalato en el que la composición de reducción de oxalato comprende una o más enzimas reductoras del oxalato. Los usos incluyen también la administración de tales composiciones más de una vez al día, más de dos veces al día, más de tres veces al día y en un intervalo de 1 a 15 veces al día. Tales administraciones pueden ser continuadamente, como todos los días durante un período de días, semanas, meses o años, o pueden ocurrir en momentos específicos para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con el oxalato. Por ejemplo, se pueden administrar a una persona o un animal composiciones reductoras de oxalato por lo menos una vez al día durante años para tratar o prevenir las condiciones relacionadas con el oxalato o se puede administrar a una persona o animal composiciones reductoras de oxalato al menos una vez al día sólo en los momentos en los que se ingieren alimentos que contienen oxalato, o por un período de tiempo restringido, tal como días o semanas, después de procedimientos o tratamientos que interfieren con la flora bacteriana normal. Tal administración puede ocurrir a través de vías conocidas para la administración de productos farmacéuticos. La administración a través de las vías oral o intestinal, o en combinación con materiales alimenticios, se contemplan en la presente invención.

También se describe en el presente texto un sistema terapéutico para reducir el oxalato, que comprende un recipiente que comprende la etiqueta y una composición terapéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicha etiqueta comprende instrucciones para el uso de la composición para la reducción del oxalato.

Típicamente, el sistema está presente en forma de un paquete que contiene una composición terapéutica de esta invención, o en combinación con material de envasado. El material de envasado incluye una etiqueta o instrucciones para el uso de los componentes del paquete. Las instrucciones indican el uso que se contempla del componente de envase como se describe en el presente texto para los métodos o composiciones de la invención. Por ejemplo, un sistema puede comprender una o más dosis unitarias de una composición terapéutica de acuerdo con la invención. Alternativamente, el sistema puede contener cantidades a granel de una composición terapéutica. La etiqueta contiene instrucciones para usar la composición terapéutica en forma de dosis unitaria o bien formas a granel según sea lo apropiado, y puede incluir información relativa al almacenamiento de la composición, indicaciones de la enfermedad, dosificaciones, vías de administración e información de este tipo.

La presente invención comprende composiciones farmacéuticas y usos para la reducción del oxalato en los seres humanos y los animales. Una composición para reducir una concentración de oxalato en un ser humano o animal comprende un vehículo de suministro oral que comprende una composición reductora de oxalato que comprende a)

de 0,5% a 95% de una bacteria de reducción de oxalato; b) de 0,1% a 50 % de un disacárido; c) de 3% a 85% de una maltodextrina; d) de 0,5% a 25% de un alginato, y e) de 1,0% a 60% de una oligofructosa. La composición puede comprender un vehículo de suministro oral.

5 Las composiciones pueden comprender bacterias reductoras de oxalato, esto es *Oxalobacter formigenes*, Pseudomonas, Clostridium, Lactobacilos, Bifidobacterias, o una bacteria transformada con uno o más vectores que comprenden secuencias de polinucleótidos exógenos o endógenos que codifican enzimas reductoras de oxalato, o composiciones en las que las bacterias de reducción del oxalato es *Oxalobacter formigenes*, o composiciones en las que las bacterias de reducción del oxalato es *Oxalobacter formigenes* cepa HC1. Las composiciones de reducción del oxalato pueden comprender un polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de 10 micrómetros a 2.000 micrómetros, o de 100 micrómetros a 1.000 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.500 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.000 micrómetros, de 500 a 1.500 micrómetros, o cualquier intervalo dentro de éstos o próximo a los mismos.

15 La composición puede comprender el disacárido, trehalosa, o en el que el alginato es alginato sódico. La composición de reducción de oxalato puede tener un valor de ufc/g de, al menos, 1 E+03 a 1 E+13 de bacterias de reducción de oxalato, la composición de reducción de oxalato puede tener una actividad de reducción enzimática de oxalato/g de, al menos, 2 mg de oxalato degradado/h a 2.500 mg de oxalato degradado/h.

20 Una composición para reducir la concentración de oxalato en un ser humano o animal puede comprender un vehículo de suministro oral que comprende una composición de reducción de oxalato que comprende una composición que comprende un vehículo de suministro que comprende una composición que comprende, a) de 3% a 25% de bacterias de reducción de oxalato; b) de 1,5% a 6% de un disacárido; c) de 45% a 60% de una maltodextrina; d) de 4% a 6% de un alginato, y e) de 20 % a 35% de una oligofructosa.

25 Una composición para la reducción del oxalato comprende una cantidad efectiva de actividad de educación de oxalato que reduzca una porción de oxalato presente que comprende a) de 0,5% a 95% de bacterias viables de reducción de oxalato liofilizadas; y b) de 95 % a 0,5% de un excipiente farmacéuticamente aceptable, y comprende además un vehículo farmacéutico de suministro. El vehículo farmacéutico de suministro puede comprender un polvo. Una cantidad efectiva de actividad de reducción de oxalato puede ser proporcionada por bacterias de reducción de oxalato que pueden ser *Oxalobacter formigenes*, Pseudomonas, Clostridia, Lactobacilos, Bifidobacterias, o una bacteria transformada con uno o más vectores que comprenden secuencias de polinucleótidos exógenos o endógenos que codifican enzimas reductoras de oxalato, que puede ser *Oxalobacter formigenes*, o que puede ser cepa HC1 de *Oxalobacter formigenes*. La composición puede proporcionarse en forma de polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de 10 micrómetros a 2.000 micrómetros, o de 100 micrómetros a 1.000 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.500 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.000 micrómetros, 500 a 1.500 micrómetros, o cualquier intervalo dentro de éstos o próximo a los mismos. La composición de reducción de oxalato puede tener un valor de ufc/g de, al menos, aproximadamente 1 E+03 a aproximadamente 1 E+13 de bacterias de reducción de oxalato. La composición reductora de oxalato puede tener una actividad enzimática de reducción de oxalato de, al menos, 2 mg de oxalato degradado/h a 2.500 mg de oxalato degradado/h.

40 Los usos de la presente invención comprenden reducir las concentraciones de oxalato en los seres humanos y los animales, tratar condiciones de oxalato en seres humanos y animales, prevenir condiciones de oxalato en seres humanos y animales, y preparar composiciones de reducción de oxalato. La presente invención comprende también sistemas para la reducción de oxalato. Un uso para reducir la concentración de oxalato en un ser humano o animal comprende administrar a un ser humano o animal una cantidad efectiva de una composición que comprende un vehículo de suministro que comprende una composición de reducción de oxalato que comprende, a) de 0,5% a 95% de bacterias de reducción de oxalato; b) de 0,1% a 50% de un disacárido; c) de 3% a 85% de una maltodextrina; d) de 0,5% a 25% de alginato, y e) de 1,0 % a 60% de una oligofructosa. El vehículo de suministro es un polvo. Las bacterias de reducción de oxalato pueden ser *Oxalobacter formigenes*, Pseudomonas, Clostridium, Lactobacilos, Bifidobacterias, o una bacteria transformada con uno o más vectores que comprenden secuencias de polinucleótidos exógenos o endógenos que codifican enzimas reductoras de oxalato, puede ser *Oxalobacter formigenes*, o puede ser la cepa HC1 de *Oxalobacter formigenes*. La composición puede proporcionarse en forma de un polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de 10 micrómetros a 2.000 micrómetros, o de 100 micrómetros a 1.000 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.500 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.000 micrómetros, de 500 a 1.500 micrómetros, o cualquier intervalo dentro de éstos o próximo a los mismos. La composición puede comprender el disacárido, trehalosa, o en donde el alginato es alginato sódico. La composición de reducción de oxalato puede tener un valor de ufc / g de, al menos, de aproximadamente 1 E+03 a aproximadamente 1 E+13 de bacterias de reducción de oxalato, la composición reductora de oxalato puede tener una actividad enzimática de reducción de oxalato de, al menos, 2 mg de oxalato degradado/h a 2.500 mg de oxalato degradado/hr, administrada por vías de administración oral.

60 Los usos pueden comprender también prevenir una condición relacionada con oxalato que comprende la administración de las composiciones enseñadas en el presente texto. Tales usos pueden comprender también el tratamiento de una condición relacionada con el oxalato que comprende administrar las composiciones enseñadas en el presente texto. Las condiciones relacionadas con el oxalato incluyen, pero sin limitarse a ellas, hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales de oxalato cálcico (urolitiasis), hiperoxaluria

entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con la enfermedad renal en fase final, trastornos de conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esteatorrea, pacientes que han sido sometidos a cirugía gastrointestinal, tal como la cirugía de bypass yeyuno-ileal, o que han sido sometidos a tratamiento con antibióticos. Los usos incluyen la administración de las composiciones que se enseñan en este documento más de una vez al día durante un período de tiempo que alcanza hasta que se reduce el nivel suficiente de oxalato o indefinidamente para controlar continuamente los niveles de oxalato. Un uso comprende prevenir una condición relacionada con el oxalato que comprende la administración a un ser humano o animal de una cantidad efectiva de la actividad reductora de oxalato que reduzca una porción del oxalato presente, que comprende a) de 0,5% a 95% de bacterias reductoras de oxalato viables liofilizadas; y b) de 95% a 0,5% de un excipiente aceptable farmacéuticamente, y que comprende además un vehículo farmacéutico de suministro. El vehículo farmacéutico de suministro puede comprender un polvo. Las bacterias de reducción de oxalato pueden ser *Oxalobacter formigenes*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacilos*, *Bifidobacterias*, o una bacteria transformada con uno o más vectores que comprenden secuencias de polinucleótidos exógenos o endógenos que codifican enzimas reductoras de oxalato, pueden ser *Oxalobacter formigenes*, o pueden ser cepa HC1 de *Oxalobacter formigenes*. La composición se puede proporcionar como un polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de 10 micrómetros a 2.000 micrómetros, o de 100 micrómetros a 1.000 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.500 micrómetros, o de 500 micrómetros a 1.000 micrómetros, de 500 a 1.500 micrómetros, o cualquier intervalo dentro de éstos o próximo a los mismos. La composición puede comprender el disacárido, trehalosa, o en el que el alginato es alginato sódico. La composición de reducción de oxalato puede tener un valor de ufc/g de, al menos, $1 \text{ E}+03$ a $1 \text{ E}+13$ de bacterias de reducción de oxalato, la composición reductora de oxalato puede tener una actividad enzimática de reducción de oxalato/g de al menos 2 mg de oxalato degradado/h a 2.500 mg de oxalato degradado/h. La composición puede administrarse por vías de administración orales. Las condiciones relacionadas con el oxalato que se pueden tratar o prevenir incluyen hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales de oxalato cálcico (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase final, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esteatorrea, pacientes que han sido sometidos a cirugía gastrointestinal tal como la cirugía de bypass yeyunoileal, o que han sido sometidos a tratamiento con antibióticos.

Los métodos para preparar una composición farmacéutica reductora de oxalato, comprenden proporcionar bacterias de reducción de oxalato en una concentración de al menos $1 \text{ E}+03$ a $1 \text{ E}+13$; opcionalmente mezclar las bacterias reductoras de oxalato con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables; liofilizar las bacterias; y cargar o proporcionar las bacterias en un vehículo farmacéutico de suministro. Tales excipientes pueden comprender uno o más de los componentes disacárido, maltodextrina, alginato u oligofruktosa. Las bacterias de reducción de oxalato pueden ser *Oxalobacter formigenes*, *Pseudomonas*, *Clostridia*, *Lactobacilos*, *Bifidobacterias*, o una bacteria transformada con uno o más vectores que comprenden secuencias de polinucleótidos exógenos o endógenos que codifican enzimas reductoras de oxalato, pueden ser *Oxalobacter formigenes*, o pueden ser la cepa HC1 de *Oxalobacter formigenes*. El vehículo de administración farmacéutica puede ser un polvo.

Se ha de hacer observar que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa distinta.

Los siguientes son ejemplos que ilustran procedimientos para la práctica de la invención.

Ejemplo I

Tratamiento de pacientes de alto riesgo.

Pacientes con hiperoxaluria primaria fueron alimentados con cápsulas con recubrimiento entérico que contienen polvo liofilizado de *O. formigenes* dos veces al día preferiblemente con sus dos comidas principales del día. Cada cápsula de tamaño 2 contenía aproximadamente 137 mg de polvo a granel liofilizado que contiene al menos 10^8 unidades formadoras de colonias (ufc)/gramo.

Para los sujetos de alto riesgo que esto puede ser un tratamiento para toda la vida. Los sujetos de los estudios clínicos mostraron que la colonización descendió cuando se detuvo el tratamiento. En el estudio clínico, el tratamiento se hizo durante 4 semanas y hubo un seguimiento de dos semanas. El tratamiento de 4 semanas tuvo por resultado una disminución significativa de los niveles de oxalato en sangre y en orina en comparación con los niveles de la línea base. Pero durante el período de seguimiento, los recuentos de condes de *Oxalobacter* en las heces disminuyeron y los valores de oxalato en plasma y orina comenzaron a aumentar. Así pues, se propone que será necesaria la alimentación continua de composiciones reductoras de oxalato para proporcionar las condiciones de un oxalato reducido. Las composiciones que comprenden bacterias que pueden colonizar y establecerse de forma continua en el intestino podrían conducir a la necesidad de menos administraciones de composiciones reductoras de oxalato.

Las cápsulas con recubrimiento entérico de células de *O. formigenes* pueden ser ingeridas por poblaciones de pacientes con alto riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato. Estos incluyen:

1. Personas que producen demasiada cantidad de oxalato endógeno debido, por ejemplo, a un defecto genético como la hiperoxaluria primaria.

2. Personas en riesgo de urolitiasis con elevado oxalato urinario debido a una enfermedad entérica (hiperoxaluria entérica).

5 3. Personas que tienen un historial de urolitiasis con múltiples episodios de enfermedad idiopática de cálculos.

4. Personas con altos niveles de oxalato en el suero debido a una enfermedad renal en fase final.

5. Personas con vestibulitis vulvar.

10 6. Las personas que tienen dietas con altos niveles de oxalato, tales como se encuentran en ciertas áreas y épocas de la India y de Arabia Saudí. Esto también incluiría a los individuos que prefieren alimentos como la espinaca, que son altos en oxalato.

15 A cualquiera de las personas o de los animales descritos anteriormente se les proporciona una composición de la presente invención. Por ejemplo, una persona con niveles de oxalato endógenos más altos que los normales es tratada dos veces al día, con una cápsula diseñada para el suministro de su contenido al intestino grueso, en donde la cápsula contiene aproximadamente 10^6 ufc de *O. formigenes*. La cápsula preferiblemente se administra con el alimento.

Ejemplo 2.

Tratamiento de pacientes de bajo riesgo:

20 Las células de *O. formigenes* con protección entérica, tal como se proporcionan en cápsulas con recubrimiento entérico, pueden también ser ingeridas por los individuos de las poblaciones de menor riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato. Sería de desear colonizar estos pacientes con uno o dos tratamientos que comprenden composiciones de materiales reductores de oxalato, tales como bacterias reductoras de oxalato. Estos pacientes podrían también recibir rutinariamente tratamientos de materiales de reducción de oxalato, bien sea como suplementos o bien como adiciones a alimentos tales como la leche o el yogur. Estos incluyen:

25 1. Personas que han perdido poblaciones de bacterias de degradación del oxalato normales debido a tratamientos con antibióticos orales o episodios de enfermedad diarreica.

2. Los lactantes pueden ser inoculados para que una población protectora normal de *Oxalobacter* sea establecida más fácilmente que en el caso de hacerlo más adelante, cuando funcionan los principios de exclusión competitiva.

30 Las personas o animales que tienen riesgo bajo son tratados dos veces al día, con una cápsula diseñada para el suministro de su contenido en el intestino grueso, en donde la cápsula contiene al menos 10^7 ufc de uno o más organismos de reducción de oxalato, tales como *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con alimento.

Ejemplo 3

Uso de enzimas de degradación del oxalato procedentes de *Oxalobacter formigenes* para controlar la hiperoxaluria.

35 Se realizó un estudio para evaluar la eficacia de las enzimas de degradación del oxalato procedentes de *Oxalobacter formigenes* para el control de la hiperoxaluria.

Animales utilizados: Ratas macho Sprague Dawley; BW 250-300 g

Dietas empleadas: Dieta normal (ND); Harlan Teklad TD 89222; 0,5% Ca, 0,4% P

40 Fármaco usado: mezcla liofilizada de lisado de *Oxalobacter formigenes* (fuente de enzimas) con oxalil CoA, $MgCl_2$ y TPP.

Sistema de suministro de fármaco (cápsulas): cápsulas de tamaño 9 para estudios preclínicos en ratas (Capsu-GEI). Revestimiento entérico Eudragit L-100-55 (Hulls America, Inc.). Recolección de orina basal de 24 horas. Análisis fecal de *Oxalobacter formigenes* – las ratas no fueron colonizadas con *Oxalobacter formigenes*.

Protocolo experimental:

45 A. Estudios a largo plazo:

Protocolo de animales:

Grupo I (n = 4): alimentados con la dieta de oxalato con lisado. Las ratas recibieron dos cápsulas todos los días a las 16:00 y la dieta de oxalato durante la noche. La dieta fue eliminada durante el día (de 8:00 a 16:00)

Grupo II (n = 4): alimentados con dieta de oxalato como se describe para el Grupo I (controles hiperoxalúricos).

Muestras de orina de 24 h fueron recogidas el Día 7 y el Día 9 del tratamiento anterior.

- 5 Los datos acerca de la concentración media de oxalato en orina para los dos grupos de ratas que se muestran anteriormente indicaron que la alimentación de lisado de *Oxalobacter* hizo disminuir la concentración de oxalato en orina en las ratas del Grupo I en comparación con los controles hiperoxalúricos (Grupo II). Las enzimas no pueden ser activas durante mucho tiempo en el tracto gastrointestinal; por consiguiente se llevaron a cabo estudios a corto plazo como se describe a continuación.

10 B. Estudios a corto plazo:

Protocolo de animales:

Grupo I (n = 4): Alimentación 1 cápsula a las 8:00; oxalato de la dieta durante dos horas (las ratas se mantuvieron en ayunas durante la noche para que coman bien durante este periodo) y 1 cápsula a las 10:00.

Grupo II (n = 4): La dieta de oxalato por dos horas como para el Grupo I.

- 15 Se recogió la orina de todos los animales durante el siguiente periodo de cinco horas y se analizaron para la concentración de oxalato.

Esto se realizó en los días 11, 12 y 15 de este estudio.

- 20 Los resultados de este estudio indican que la alimentación del lisado de *Oxalobacter* produce una disminución significativa en los niveles de oxalato en orina en un periodo de 5 horas después de la administración de oxalato y fármaco en las ratas del Grupo I en comparación con el grupo de control hiperoxalúrico (Grupo II). En este punto, se llevó a cabo un estudio cruzado entre los dos grupos de ratas.

C. Estudios cruzados (Cross-Over):

Protocolo de animales:

Grupo I: Alimentados con dieta de oxalato dos veces al día a las 8:00-10:00 y a las 15:00 -17:00

- 25 Grupo II: Alimentados con 1 cápsula dos veces al día antes de alimentar con la dieta de oxalato como para el Grupo I.

Los estudios a corto plazo para el efecto de la alimentación de lisado de *Oxalobacter* sobre los niveles de oxalato en orina se realizaron como se describe en la Sección B anterior en el día 2 y el día 5 después del cruzamiento.

- 30 Los estudios cruzados muestran que las ratas previamente hiperoxalúricas del Grupo II, que fueron alimentadas con el lisado de *Oxalobacter*, mostraron una disminución de los niveles de oxalato en la orina. En cambio las ratas del Grupo-I reversionaron a la hiperoxaluria tras la retirada del fármaco.

Ejemplo 4

Tratamiento con células de *Oxalobacter formigenes* a ratas.

- 35 Se realizó un estudio para evaluar el destino del oxalato de la dieta cuando se incluyen células de *Oxalobacter formigenes* en la dieta.

Métodos:

- 40 Ratas Wistar macho se alimentaron con una dieta normal de calcio (1%), alta en oxalato (0,5%), o una dieta baja en calcio (0,02%), alta en oxalato (0,5%) durante dos experimentos distintos. Se administró ¹⁴C-oxalato (2,0 µCi) el día 1 y de nuevo el día 7 del estudio. Células de *Oxalobacter formigenes* (380 mg/d) se administraron al agua de bebida de la rata en los días 5-11. Se midió el destino del ¹⁴C procedente del oxalato basándose en el análisis de ¹⁴C en las heces, la orina y el aire expirado. Las ratas sirvieron de autocontroles y las medidas durante el periodo de control (antes de alimentar las células de *Oxalobacter*) se hicieron durante los días 1-4; durante el periodo experimental (cuando se alimentaron las células bacterianas) las medidas se realizaron en los días 7-11.

Resultados:

- 45 1. Cuando las ratas se alimentaron con la dieta normal de calcio (1%), se recuperó menos del 1% de la dosis administrada de ¹⁴C procedente del oxalato en el aire expirado (como dióxido de carbono producido a partir de ¹⁴C oxalato en el intestino, absorbido en la sangre y, después expirado) sin embargo en todos los casos se recuperó

más ^{14}C durante el periodo en el que las ratas fueron alimentadas con células de *Oxalobacter* (Fig. 1a). Esto está en contradicción con los resultados obtenidos cuando la dieta era baja en calcio (0,02%) cuando más del 50% del ^{14}C del oxalato fue recuperado como dióxido de carbono en el aire expirado durante el periodo experimental cuando las ratas fueron alimentadas con células *Oxalobacter* (Fig. 1b). Estos resultados son sorprendentemente diferentes de las cantidades muy bajas de ^{14}C (menos de 5%) recuperadas durante el periodo de control (antes de la alimentación de células de *Oxalobacter*). Así pues la alimentación con las células *Oxalobacter formigenes* a las ratas aumentó notablemente la cantidad de oxalato de la dieta que se degradó en el tracto intestinal.

2. La alimentación con células de *Oxalobacter* también hizo disminuir la cantidad de ^{14}C -oxalato que fue excretada en la orina. Los valores para una recolección de 4 días durante los periodos tanto de control como experimental y para un único día en cada uno de estos periodos se muestran en las figuras 2a y 2b respectivamente. Las cantidades de oxalato recuperadas en las heces de rata también fueron durante el periodo experimental (cuando se alimentaron las células de *Oxalobacter*) menores que las encontradas para el periodo de control (Fig. 2c).

La mayoría de las ratas de laboratorio no llevan *Oxalobacter* en su tracto intestinal (no están colonizadas). Los presentes resultados indicaron que la administración deliberada de estas bacterias de degradación del oxalato a las ratas hizo que una gran porción del oxalato de la dieta se degrade y que en consecuencia se excretase en la orina menos oxalato de la dieta.

Los efectos del calcio de la dieta en la degradación del oxalato son notables. El calcio se compleja con oxalato de forma que su solubilidad y su disponibilidad para el ataque por *Oxalobacter* son limitadas y la cantidad que se degrada cuando las ratas se alimentan con una dieta alta en calcio es mucho menor que las cantidades degradadas cuando el calcio en la dieta es bajo.

Ejemplo 5.

Efecto de la alimentación de *O. formigenes* sobre la excreción de oxalato en la orina en cerdos.

Los cerdos son colonizados naturalmente con *Oxalobacter*. La descolonización se consiguió en cerdos experimentales mediante la suplementación de la dieta con antibióticos. Los cerdos fueron alimentados con *Oxalobacter* en caldo de cultivo, que era consumido con facilidad. Los cerdos fueron alimentados con un pienso basado en soja/maíz suplementado con 1.300 mg de oxalato/kg. La dieta basal contenía 680 mg de oxalato/kg. Los resultados se muestran en las FIGS. 3a-c para tres cerdos individuales.

En los tres cerdos el oxalato en la orina se redujo drásticamente durante el consumo de *Oxalobacter*. El nivel de excreción de oxalato en estos cerdos disminuyó a un mínimo de aproximadamente 6 mg/g de creatinina en los tres cerdos. Esto se ha de comparar con un nivel de 8-10 mg/g de creatinina que se ha observado en seres humanos que toman dietas de fórmula libre de oxalato. Este nivel se equipara con la síntesis endógena en los seres humanos cuando la carga dietética ha sido eliminada. Parece que este nivel refleja la síntesis endógena en cerdos y que la absorción intestinal ha sido eliminada por el tratamiento con *Oxalobacter*. Además, estos resultados indican que el *Oxalobacter* ingerido fue capaz de eliminar tanto el oxalato cristalino añadido como el oxalato transmitido por los alimentos que era biodisponible.

En este experimento, cada cerdo fue alimentado con 1,0 g de pasta de células con la comida de la mañana. A un valor de OD_{600} de 0,6, recuento de células viables es $2,1 \times 10^8$ células/ml, que se extrapola a $2,1 \times 10^{13}$ células por 100 L. El funcionamiento del fermentador de 100 L proporciona como promedio de 50-60 g de peso húmedo de células. Por consiguiente, 1 g de peso húmedo de células es aproximadamente $3,5 \times 10^{11}$ células viables.

La dosis de $3,5 \times 10^{11}$ células viables como se ha indicado anteriormente podría eliminar la absorción intestinal de alrededor de 2,0 g de oxalato presente por kg de dieta (1.300 mg de oxalato añadido + 680 mg presentes en la dieta). Los animales consumieron 1 kg de dieta por comida.

El peso corporal de los cerdos es de aproximadamente 90 kg. y se cree que el sistema digestivo de los cerdos es muy parecido al de los seres humanos. En los seres humanos el consumo medio diario de oxalato es de aproximadamente 100-400 mg dependiendo de la composición de la dieta, que también se divide en tres comidas al día, por consiguiente como promedio una dosis diaria de 10^8 a 10^{10} células viables serían suficientes para prevenir la absorción dietética de oxalato.

Ejemplo 6

Efecto de la suplementación con *O. formigenes* sobre la excreción de oxalato en la orina en ratas alimentadas con dieta alta en oxalato.

Se realizó un estudio para determinar el efecto de la formulación IxOC-3 sobre el estatus de colonización y los niveles de oxalato en la orina después de una dieta de alto contenido en oxalato. Una formulación IxOC-3 comprende células viables liofilizadas de bacterias reductoras de oxalato, como *O. formigenes*. La formulación contiene aproximadamente 10^6 - 10^7 ufc/gramo por dosis. La formulación también comprende agentes crioconservantes tales como trehalosa y maltodextrina.

Métodos:

- 5 Ratas macho Harlan Sprague Dawley se asignaron aleatoriamente a 3 grupos (6 animales/grupo). Los animales del grupo 1 sirvieron como grupo testigo o de control y se les administró formulación placebo con recubrimiento entérico de tamaño 9 dos veces al día mediante alimentación forzada en un nivel de dosis de 10^0 unidades formadoras de colonias (UFC). Se administró a animales de los grupos 2 y 3 formulación IxOC-3 de *Oxalobacter formigenes* en forma de cápsulas con recubrimiento entérico de tamaño 9 dos veces al día mediante ingestión oral forzada a niveles de dosis de 10^6 y 10^7 ufc respectivamente. La ingestión forzada de las cápsulas fue seguida por un lavado con agua de la red tratada en autoclave para los tres grupos. Después de un periodo de aclimatación inicial, todos los grupos fueron alimentados con una dieta estándar suplementada con 1% de oxalato por grupo.
- 10 Los materiales de ensayo y el material de control de placebo se prepararon siguiendo un protocolo normalizado. Antes de su uso, se analizaron muestras representativas de cada material de ensayo para confirmar la identidad, la pureza, y la potencia de las cápsulas de ensayo, así como para confirmar la ausencia de *Oxalobacter formigenes* en el material de control de placebo durante el periodo de dosificación.
- 15 La dieta fue limitada a dos periodos de 1 hora al día que se inician 15 minutos después de la ingestión forzada de la mañana y de la tarde para asegurarse de que las cápsulas fueron dosificadas en un estómago vacío. Se proporcionó agua a voluntad. El consumo de alimento se registró dos veces al día. Se recogieron muestras fecales y de orina de 24 horas en el día 1 (antes de la dieta suplementada con oxalato) y semanalmente después de ello. Los datos de la orina se analizaron a través de un análisis de medidas repetidas para diferencias en los parámetros urinarios medios a través de los grupos de dosificación y el tiempo. También se incluyó un grupo de dosificación por el término de interacción del tiempo para establecer cualquier posible interacción entre el grupo de dosis y el tiempo.

Resultados:

- 25 Los resultados del análisis indicaron que hubo una interacción estadísticamente significativa entre los grupos de dosis y el tiempo ($p < 0,0001$) para todos los parámetros que indican que el perfil de parámetros de orina a través del tiempo era diferente a través de los grupos de dosificación. Para ayudar en la interpretación de esta interacción, se llevó a cabo un análisis de los datos por dato del tiempo para cada parámetro para determinar si había una diferencia entre los grupos de dosificación con respecto a los parámetros de orina medios. Este análisis reveló que para los grupos de dosis alta y dosis baja hubo un aumento en el oxalato en la orina desde la línea base hasta 7 días ($p < 0,0001$ ambos grupos), pero no hubo un aumento desde los 7 días a los 28 días ($p = 0,1094$ dosis baja y $p = 0,6910$ dosis alta). Para el grupo de placebo, sin embargo, hubo un aumento desde la línea base hasta los 28 días ($p = 0,0010$). También en el día 21 y en el día 28 los niveles de oxalato en la orina en el Grupo I de placebo fueron significativamente más altos que los de los grupos de dosis baja (Grupo II) y alta (Grupo III), pero no hubo una diferencia significativa entre la dosis baja y la dosis alta. Así pues, hubo una disminución global significativa en la excreción de oxalato en la orina en las ratas tratadas en comparación con las ratas que fueron alimentadas con el placebo.

35 Ejemplo 7

Efectos de la administración oral de *O. formigenes* sobre los niveles de oxalato en la orina en pacientes que padecen hiperoxaluria primaria (PH).

- 40 Nueve pacientes con hiperoxaluria primaria (PH) probada por biopsia participaron en el estudio. Después de recibir las evaluaciones iniciales de línea base, a todos los sujetos se les administró *Oxalobacter formigenes* 1 g de pasta celular ($\geq 10^{10}$ ufc/gramo) ofrecida con sus comidas principales durante 4 semanas. Durante este periodo de tiempo, todos los pacientes continuaron tomando su medicación normal, se les pidió a comer su dieta normal, y mantener su ingesta de líquidos tan alta como la normal. A excepción de las espinacas y el ruibarbo, los alimentos ricos en oxalato no estaban prohibidos. La colonización de *Oxalobacter* y su influencia sobre los niveles en plasma y en orina de oxalato se miden en las semanas 5 y 6. La eficacia del tratamiento fue seguida en términos de la excreción de oxalato en la orina en sujetos con una función renal normal y oxalato en plasma en sujetos con enfermedad renal en fase final (ESRD).

Resultados:

- 50 1. El tratamiento demostró una disminución significativa de oxalato en orina en pacientes con función de orina normal. El oxalato en el plasma disminuyó significativamente en siete de los nueve sujetos. Hubo una disminución drástica de oxalato en plasma en dos sujetos con ESRD que proporciona evidencia para la eliminación entérica de oxalato endógeno en el intestino en contra de un gradiente de trans-epitelial.
2. El consumo de *O. formigenes* cepa HC-1 en dosis que están en el intervalo de 0,25 g a 2,0 g por comida fue bien toleradas por los voluntarios sanos normales que reciben dietas que contienen niveles de oxalato medios o altos. Una dosis de pasta de células de 1,0 g dos veces al día durante 28 días fue bien tolerada por los pacientes de PH.

55 Ejemplo 8

Tratamiento de pacientes de alto riesgo con composiciones enzimáticas de reducción de oxalato.

5 Pacientes hiperoxalúricos primarios son alimentados con una o más cápsulas con recubrimiento entérico que contienen una composición enzimática reductora de oxalato liofilizada, que comprende oxalato-descarboxilasa y/o oxalato oxidasa, dos veces al día preferiblemente con las dos comidas principales del día. Se administra una cantidad efectiva de la composición enzimática. Por ejemplo, cada cápsula de tamaño-2 contiene aproximadamente 5 a 100 unidades de cada enzima.

Para los sujetos de alto riesgo, esto es una administración continua durante un período de tiempo prolongado, probablemente un tratamiento de por vida. La colonización bajará cuando se detenga el tratamiento.

10 Cápsulas con recubrimiento entérico de composiciones de reducción de oxalato que comprenden enzimas reductoras de oxalato pueden ser administradas a poblaciones de pacientes con alto riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato. Estas incluyen:

1. Personas que producen demasiado oxalato endógeno debido, por ejemplo, a un defecto genético como la hiperoxaluria primaria.
- 15 2. Personas en riesgo de urolitiasis de nivel elevado de oxalato en la orina debido a una enfermedad entérica (hiperoxaluria entérica)
3. Personas que tienen antecedentes in historial de urolitiasis con episodios múltiples de enfermedad idiopática de cálculos.
4. Personas con altos niveles de oxalato en el suero debidos a una enfermedad renal en fase final.
5. Personas con vestibulitis vulvar.
- 20 6. Personas que tienen dietas con altos niveles de oxalato, tales como se encuentran en ciertas zonas y épocas en la India y en Arabia Saudi. Esto incluiría también a las personas que llegan a preferir alimentos como la espinaca que son de alto contenido en oxalato.

25 A todas las personas o animales descritos anteriormente se les proporciona una composición de la presente invención. Por ejemplo, una persona con niveles de oxalato endógeno más alto que los normales es tratada dos veces al día, con una cápsula diseñada para el suministro de su contenido en el intestino grueso, en donde la cápsula contiene aproximadamente una cantidad efectiva equivalente de una composición enzimática que tiene actividad enzimática similar a la proporcionada por 10^7 ufc de una bacteria reductora de oxalato, como *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con aimento.

Ejemplo 9

30 Tratamiento de los pacientes de bajo riesgo con composiciones enzimáticas de reducción de oxalato.

35 Las composiciones reducción de oxalato con protección entérica que comprenden una mezcla de las enzimas reductoras del oxalato oxalato descarboxilasa y/o oxalato oxidasa, tales como las que se proporcionan en cápsulas con recubrimiento entérico pueden ser también administradas a individuos en poblaciones de bajo riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato o en riesgo de condiciones relacionadas con el oxalato. Una cantidad efectiva de la composición enzimática se administra en el régimen de tratamiento deseado.

40 Sería de desear administrar las composiciones a estos pacientes, ya sea durante períodos de tiempo más cortos cuando están en riesgo de condiciones relacionadas con oxalato o simultáneamente con materiales que contribuyen a la condición relacionada con el oxalato. Estos pacientes podrían también recibir rutinariamente tratamientos de composiciones de reducción de oxalato, bien sea como suplementos o como adiciones a alimentos tales como la leche o el yogur. Estos incluyen a las personas que han perdido poblaciones de bacterias normales de degradación del oxalato debido a tratamientos con antibióticos orales o episodios de enfermedades diarreicas, o lactantes.

45 Las personas o animales que son de bajo riesgo son tratados dos veces al día, con una cápsula diseñada para el suministro de su contenido en el intestino grueso, en donde la cápsula contiene una cantidad efectiva de la composición enzimática. Por ejemplo, cada cápsula de tamaño-2 contiene aproximadamente 5 a 100 unidades de cada enzima. La cápsula se administra preferiblemente con aimento.

Ejemplo 10.

Método para preparar cápsulas con recubrimiento entérico que contienen *Oxalobacter formigenes* liofilizado.

50 Se utilizó una pasta de células de *Oxalobacter formigenes* de 200 gramos. La pasta de células puede ser fresca, de la fermentación, o puede ser a partir de existencias congeladas que se descongelan. Una solución crioprotectora o crioprotectora de trehalosa 100 mM se mezcló con la pasta de células. La solución fue agitada constantemente. Esta mezcla se mezcló después con una mezcla de excipientes. La mezcla de excipientes era Maltodextrina M500 y

5 alginato sódico mezclados, y se añade a la solución de Raftilose P95 al 79%. Después, la mezcla de pasta de células se vertió en la bandeja o las bandejas de liofilización. Las bandejas llenas se liofilizan entonces en un secador Edwards Lyofast S24 (puede usarse cualquier tipo de secador adecuado), durante 40 a 65 horas, que puede ser alterado para diferentes series de producción. Después de la liofilización, la torta seca se molió a mano y se empujó a través de un tamiz de malla US 20. Esto proporcionó un polvo con un tamaño de partícula < 850 µm.

10 Una vez tamizado el polvo seco, estaba listo para el llenado en cápsulas. Las cápsulas se llenaron usando una máquina manual de llenado de cápsulas, pero puede ser utilizado cualquier método de relleno de cápsulas, tal como máquinas de llenado automático. En general, se usaron cápsulas de tamaño 2. Las cápsulas se recubrieron con polímeros de recubrimiento entérico tales como Eudragit (obtenido comercialmente de Rohm Pharma (Degussa)) usando un proceso de revestimiento acuoso, alternativamente se puede utilizar un proceso de recubrimiento con disolvente. Esta empresa elabora muchos tipos de polímeros Eudragit diferentes que se disuelven específicamente a distintos pH.

15 El recubrimiento se llevó a cabo usando técnicas estándar. Los polímeros Eudragit son polímeros y copolímeros de ácido metacrílico. Por ejemplo, el Eudragit L100-55 es un copolímero de ácido metacrílico de tipo C, el Eudragit L30 es una dispersión de copolímero de ácido metacrílico, y el Eudragit S100 es un copolímero de ácido metacrílico de tipo B. Estos y otros recubrimientos entéricos son conocidos en la técnica.

Revestimiento acuoso.

20 Se utilizaron Eudragit FS30D, un agente de formación de película, y Eudragit L30D55, un agente de formación de película y otros materiales, junto con plastificantes, antiadhesivos, y vehículos, tales como el agua y los conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Se recubrieron 800 gramos de cápsulas con una suspensión de recubrimiento para obtener cápsulas recubiertas uniformemente con perfil de disgregación USP. Perfil de disgregación: sin desintegración en fluido gástrico simulado (pH 1,2) en una hora y desintegración completa en fluido intestinal simulado (pH 6,8) dentro de una hora.

Proceso de recubrimiento con disolvente:

25 Pueden usarse agente de formación de película Eudragit L100-55, Eudragit S100, un agente de formación de película y se usaron junto con otros materiales, tales como plastificantes, antiadhesivos, y vehículos, tales como agua y los conocidos en las técnicas farmacéuticas.

30 Se recubrieron 800 gramos de cápsulas con una suspensión de recubrimiento para obtener cápsulas recubiertas uniformemente con perfil de disgregación USP. Perfil de disgregación USP: sin desintegración en fluido gástrico simulado (pH 1,2) en una hora y desintegración completa en fluido intestinal simulado (pH 6,8) dentro de una hora.

Ejemplo 11.

35 Para cápsulas de suministro oral preparadas con el método del Ejemplo 1, para siete experimentos diferentes, a lo largo de 1 año de ensayo, se obtuvieron los datos siguientes. Las composiciones farmacéuticas preparadas de esta manera fueron evaluadas en cuanto a su estabilidad en términos de viabilidad bacteriana y actividad de degradación de oxalato. En la tabla que sigue, Tabla 1, que muestra 7 series de producción y la estabilidad de composiciones farmacéuticas que comprenden cápsulas con recubrimiento entérico que comprenden bacterias viables de reducción de oxalato, en particular, *O. formigenes*.

TABLA 1

Exp. nº	0 meses	1	2	3	3,4	6	9	12
1	3,6 E+08	2,2 E+06		1,6 E+06		1,1 E+06	1,2 E+06	5,1 E+05
2	3,6 E+08	1,8 E+07			3,9 E+06	1,5 E+06	2,2 E+06	6,0 E+05
3	1,5 E+08	1,8 E+07	4,2 E+06	4,2 E+06		2,0 E+06	1,8 E+06	1,1 E+06
4	1,5 E+08		3,5 E+06	3,5 E+06		4,1 E+06	1,7 E+06	1,1 E+06
5	1,5 E+08							
6	2,4 E+08	2,9 E+07				3,4 E+06	3,7 E+06	2,3 E+05
7	2,4 E+08	7,1 E+07				2,0 E+06	1,2 E+06	1,5 E+05

Otro ejemplo se muestra en los datos de la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2

Tiempo en meses	Act de degradación de OX/cáp. (mg/h/cápsula)
0	2,9
1	3,9
3	3,48
6	3,6
9	1,6
12	2,5

Los datos de estabilidad de un polvo liofilizado que comprende bacterias de reducción del oxalato producido por el método del Ejemplo 10, con *Oxalobacter formigenes*, se muestran en la Tabla 2A.

Tiempo en meses	ufc/g de polvo
0	1,8 E+8
3	8,45 E+9
6	1,06 E+10
126	7,1 E+9

En otra serie de producción, se obtuvieron los siguientes datos:

5

TABLA 3

Mes	ufc/g de polvo	ufc/cápsula	Actividad/g de polvo	Actividad/cápsula
0	2,4 E+08	3,3 E+07	18,6	2,55
1	2,9 E+07	4,0 E+06	42,9	5,88
2	1,7 E+07	2,3 E+06	39,1	5,36
6	3,4 E+06	4,7 E+05	23,2	3,18
9	3,7 E+06	5,1 E+05	24,8	3,40
12	2,3 E+05	3,2 E+04	22,2	3,04

La actividad es mg de oxalato degradado por hora.

Ejemplo 13

Formulaciones para el suministro oral de composiciones farmacéuticas de *Oxalobacter formigenes* viable

Formulación 1

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	24,00	6 %
D(+) Trehalosa (crioprotector)	11,34	3 %
Maltodextrina QD M-500	240,00	57 %
Alginato sódico	16,00	4 %
Raftilosa P95 u oligofruktosa	126,24	30 %

10 Por ejemplo, se puede obtener la trehalosa de Sigma Co. La trehalosa es un disacárido y por tanto una formulación de la presente invención que comprende un disacárido tal como maltosa, lactosa, celobiosa, sacarosa, diglucosa, o

5 trehalosa. La maltodextrina QD M-500 tiene un valor DE de 10 y es un polvo blanco o polvo blanco granular. Es un polímero sacárido nutritivo no dulce, compuesto de unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces alfa-1-4. DE es equivalente de dextrosa, una medida cuantitativa del grado de hidrólisis del polímero de almidón. Cuanto más alto es el valor de DE, tanto mayor es el grado de hidrólisis del almidón. Los estabilizantes son también componentes de la formulación, tales como alginato de sodio, que también se usa como estabilizante, espesante, agente gelificante, o emulsionante. El alginato sódico es un hidrato de carbono natural de amilosa destilado de las algas. Se aplica mucho en alimentación, medicina, textiles, impresión y teñido, fabricación de papel y productos químicos diarios como espesante, emulsionante, estabilizante y aglutinante. La fórmula molecular es $C_6H_7O_6Na)_n$, y es un polvo vagiforme de color blanco o amarillo claro, inodoro e insípido, se disuelve en agua, insoluble en etanol y éter. La rafilosa P95 es un polvo de 95% de oligofructosa DP₂ a DP₇, y los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa (5%).

Formulación 2

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	41,7,00	10 %
D(+) Disacárido	11,34	3 %
Maltodextrina QD M-500	221,00	53 %
Alginato sódico	16,00	4 %
Oligofructosa	126,24	30 %

Formulación 3

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	24,00	6 %
D(+) Disacárido (maltosa)	11,34	3 %
Maltodextrina QD M-500	240,00	57 %
Alginato sódico	16,00	4 %
Oligofructosa	126,24	30 %

Formulación 4

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	83,4	20 %
D(+) Disacárido	22,6	6 %
Maltodextrina QD M-500	196,26	47 %
Alginato sódico	16,00	4 %
Rafilosa P95	95,91	23 %

15 Formulación 5

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	62,64	15 %
D(+) Disacárido	25,05	3 %
Maltodextrina QD M-500	212,97	53 %
Alginato sódico	16,00	4 %
Oligofructosa	100,22	24 %

Formulación 6

ES 2 426 258 T3

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	12,52	3 %
D(+) Disacárido	6,26	1,5 %
Maltodextrina QD M-500	240,00	57 %
Alginato sódico	25,05	6 %
Oligofructosa	137,80	33 %

Formulación 7

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	104,40	25 %
D(+) Trehalosa	25,05	6 %
Maltodextrina QD M-500	187,91	45 %
Alginato sódico	16,00	4 %
Oligofructosa	83,52	20 %

Formulación 8

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de Ox. formigenes (seca)	396,04	95 %
Excipiente de disacárido	8,34	2 %
Mezcla excipiente – Maltodextrina, Na alginato, Oligofructosa	12,5	3 %

REIVINDICACIONES

1. Una composición para reducir la concentración de oxalato en una persona o animal, que consiste en un polvo, que comprende una composición de reducción de oxalato que comprende:
- a) de 0,5% a 95% de bacterias de reducción de oxalato;
- 5 b) de 0,1% a 50% de un disacárido;
- c) de 3% a 85% de una maltodextrina;
 - d) de 0,5% a 25% de un alginato; y
 - e) de 1,0% a 60% de una oligofructosa.
- y en donde la bacteria de reducción del oxalato es *Oxalobacter formigenes*.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1ª, en la que la bacteria de reducción del oxalato es *Oxalobacter formigenes*, cepa HC1.
3. La composición según la reivindicación 1ª, en la que la composición de reducción del oxalato tiene un valor de ufc/g de aproximadamente al menos 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{13} bacterias de reducción del oxalato.
- 15 4. La composición según la reivindicación 1ª, en la que una dosis única de la composición de reducción del oxalato tiene una actividad enzimática de reducción del oxalato de aproximadamente 5 unidades a aproximadamente 5.000 unidades.
5. Una composición para la reducción del oxalato, que comprende una cantidad efectiva de actividad de reducción del oxalato que reduzca una porción del oxalato presente, que comprende:
- de 0,5% a 95% de bacterias de reducción del oxalato liofilizadas viables;
- 20 de 95% a 0,5% de un excipiente aceptable farmacéuticamente;
- en donde la composición es un polvo.
6. La composición según la reivindicación 5ª, en la que la bacteria de reducción del oxalato es *Oxalobacter formigenes*.
7. La composición según la reivindicación 6ª, en la que la bacteria de reducción del oxalato es *Oxalobacter formigenes*, cepa HC1.
- 25 8. Un método para preparar una composición farmacéutica en polvo que reduce el oxalato que comprende proporcionar bacterias *Oxalobacter formigenes* de reducción del oxalato en una concentración de al menos 1×10^3 a 1×10^{13} ;
- 30 opcionalmente mezclar las bacterias de reducción del oxalato con uno o más excipientes aceptables farmacéuticamente;
- liofilizar las bacterias; y
- cargar las bacterias en un vehículo farmacéutico de suministro que consiste en un polvo.
9. El método según la reivindicación 8ª, en el que los excipientes comprenden uno o más entre disacáridos, maltodextrina, alginato u oligofructosa.
- 35 10. El método según la reivindicación 8ª, en el que la bacteria de reducción del oxalato es *Oxalobacter formigenes*, cepa HC1.

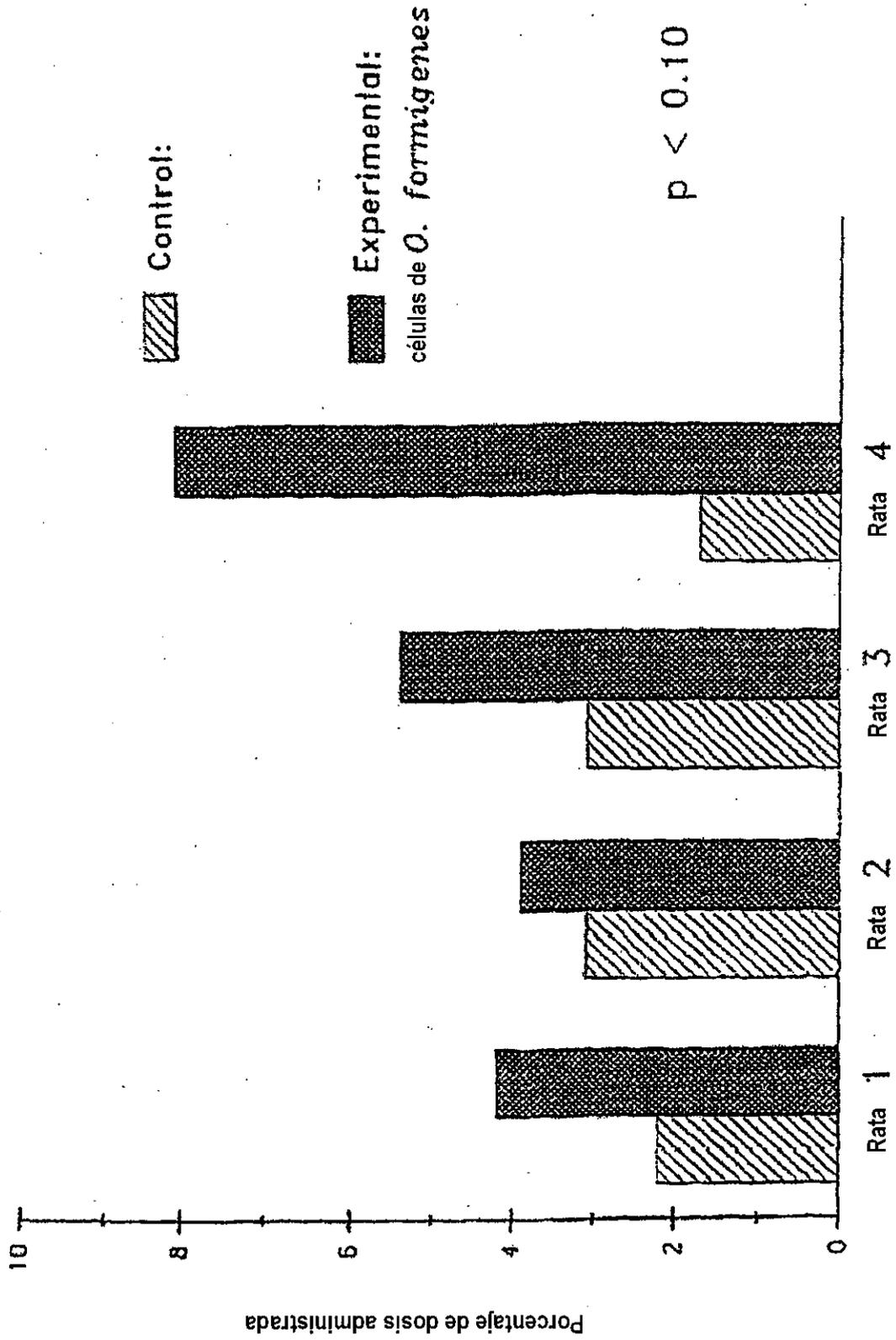


FIG. 1A

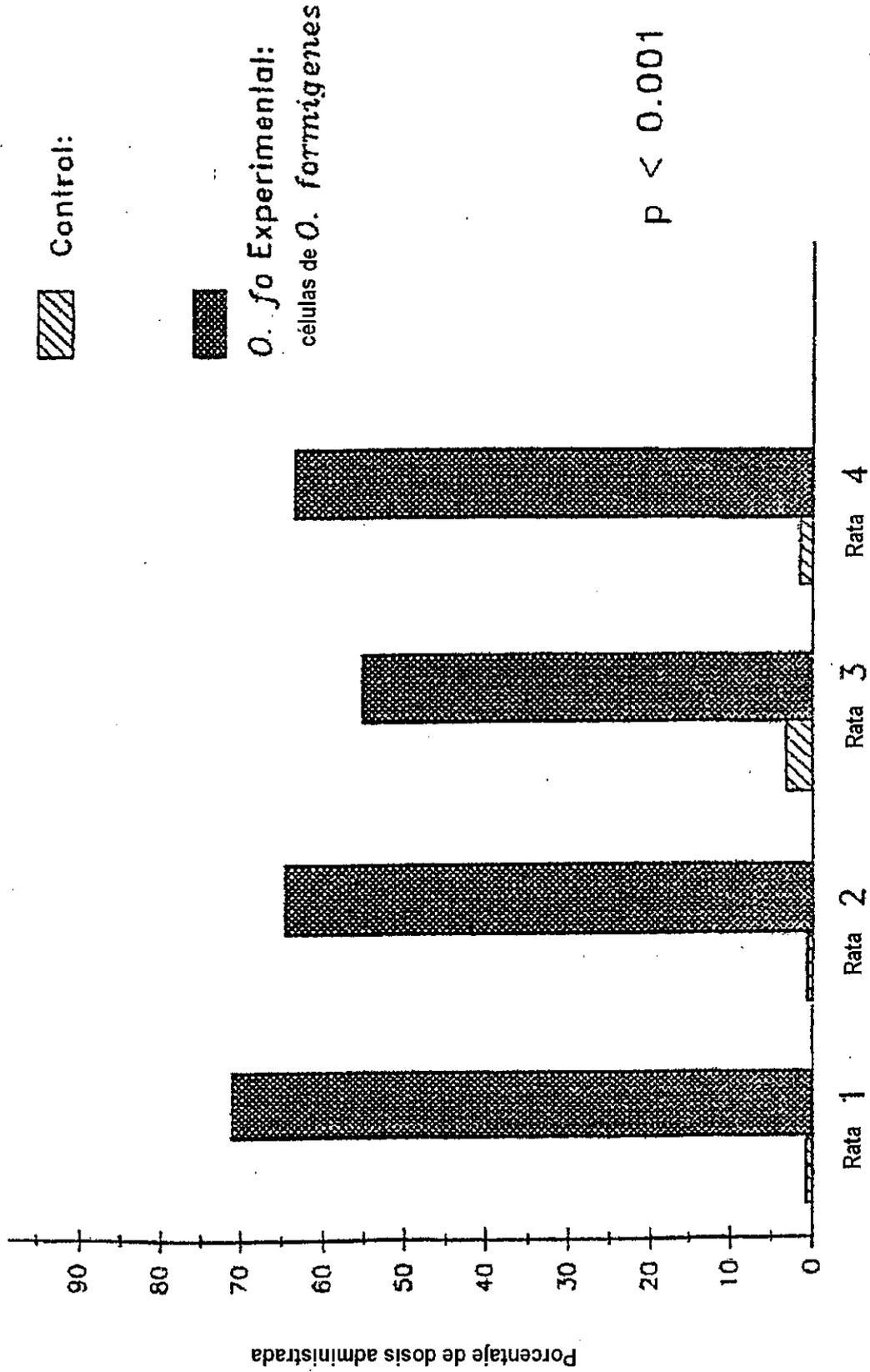


FIG. 1B

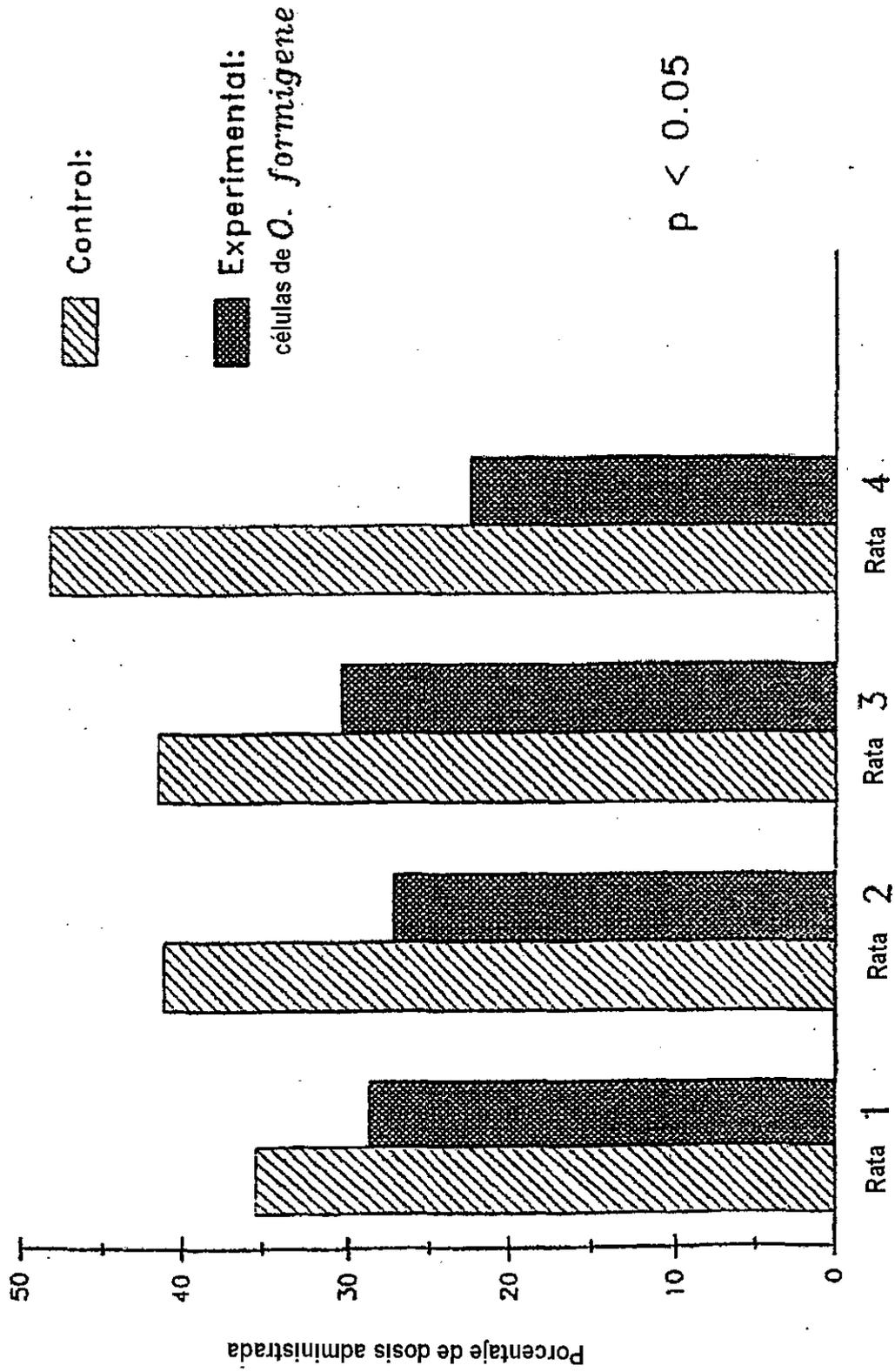


FIG. 2A

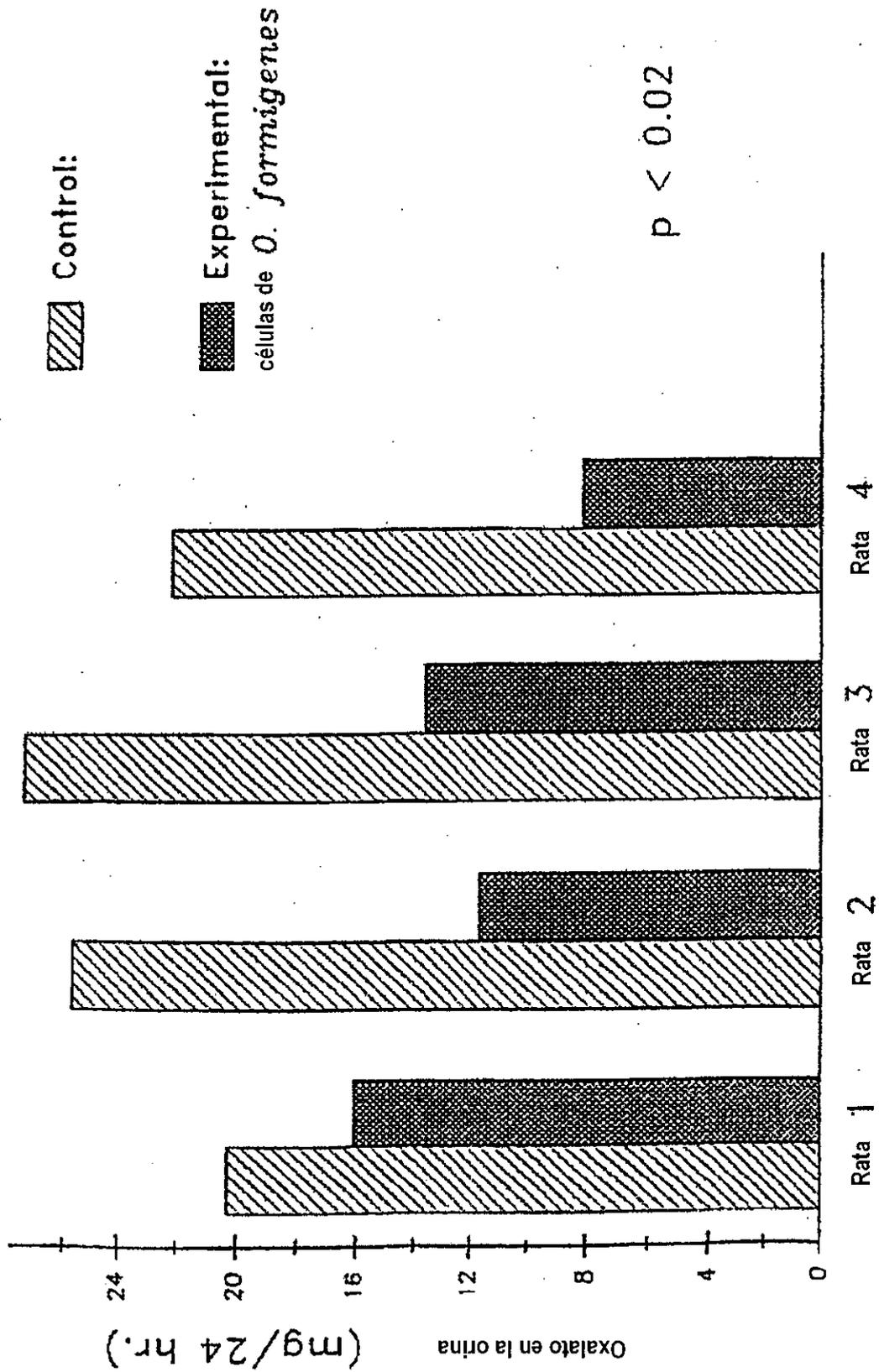


FIG. 2B

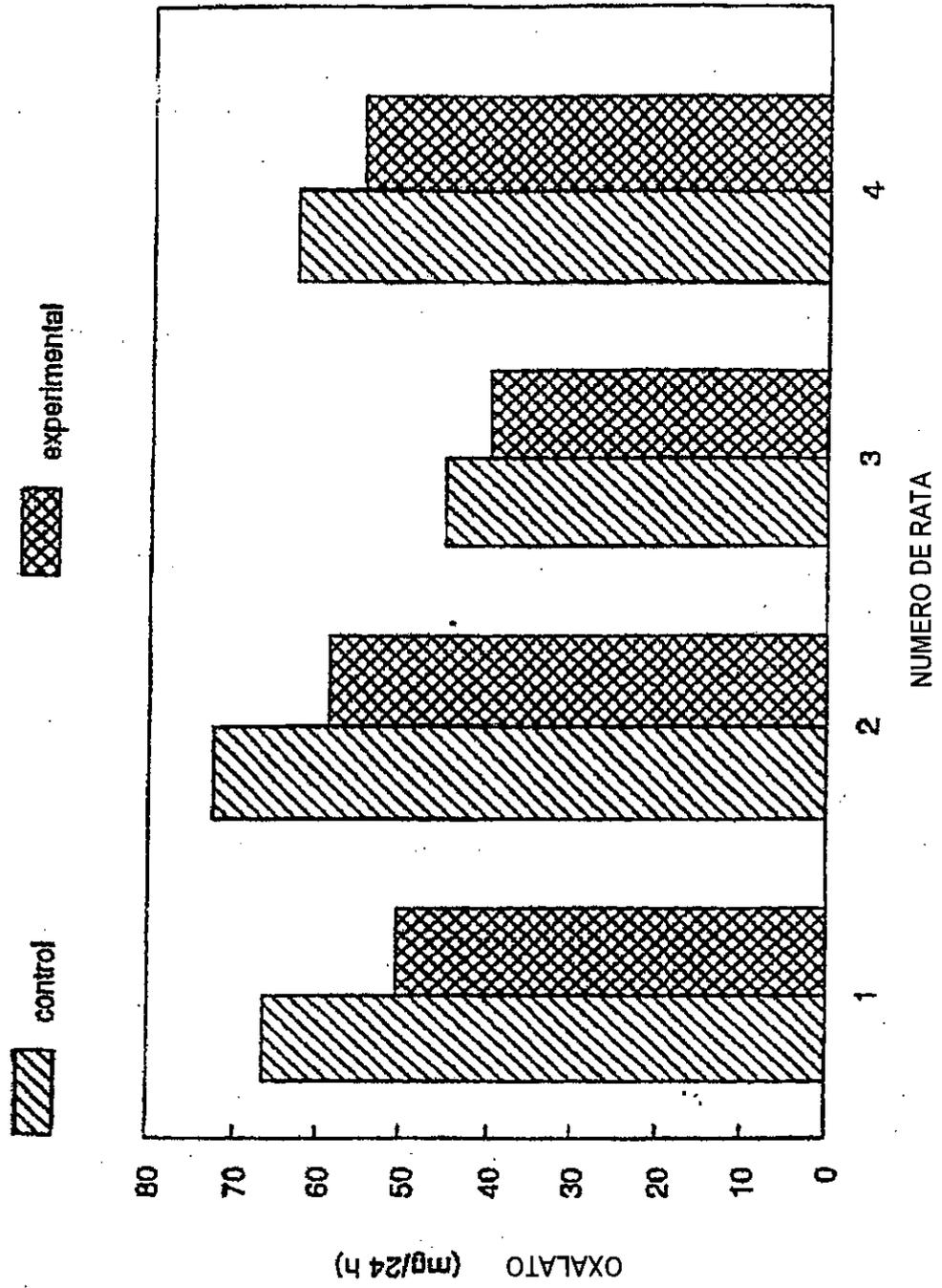


FIG. 2C

FIG. 3A

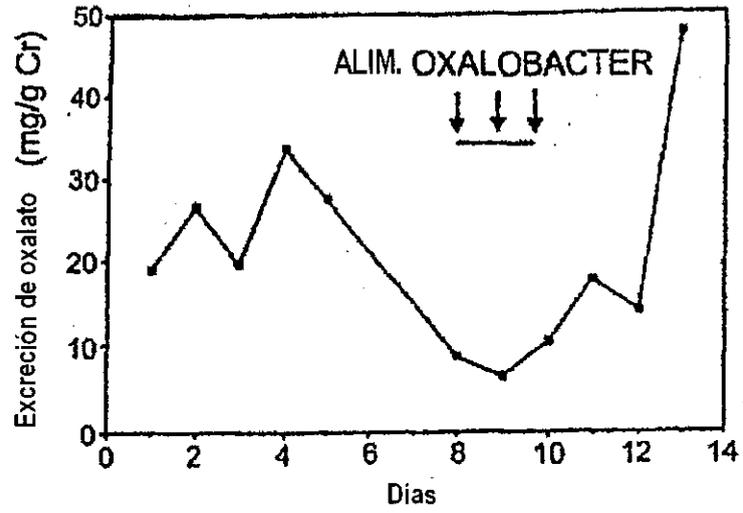


FIG. 3B

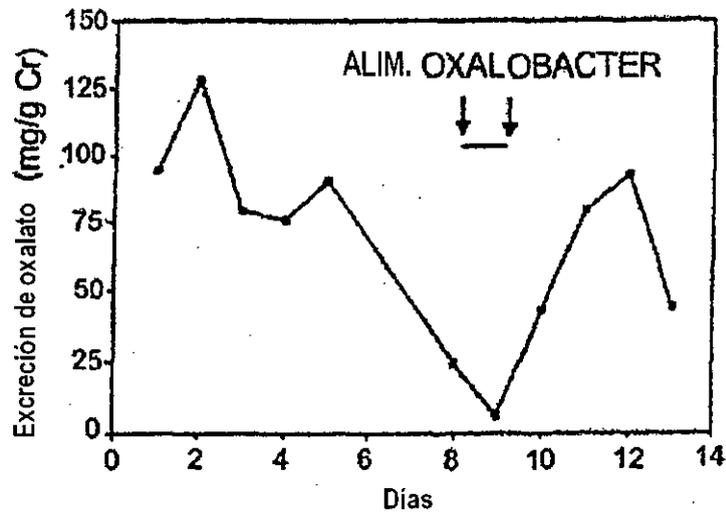


FIG. 3C

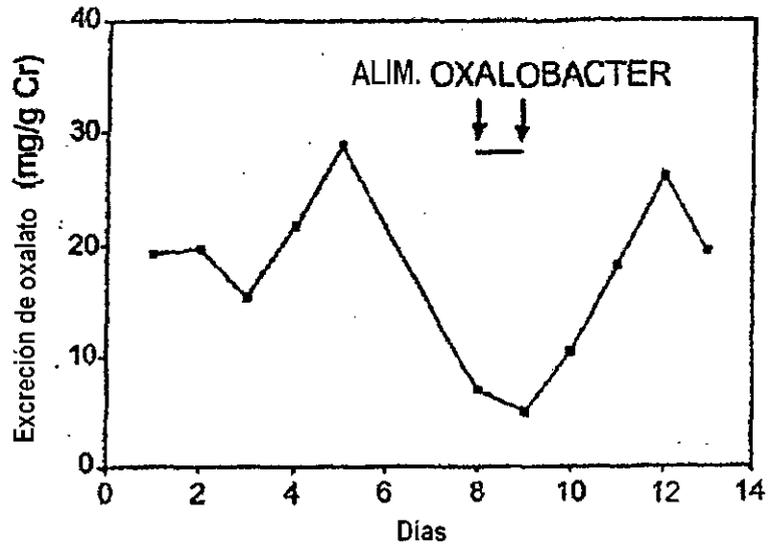


FIG. 4

Tabla 1: EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON <i>O. FORMIGENES</i> (FORMULACION IxOC-3) SOBRE LA EXCRECION DE OXALATO EN LA ORINA (MICROMOLES/DIA) EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RICA EN OXALATO					
GRUPO N°	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
I (placebo)	4,57 ± 0,82	13,97 ± 3,22	17,56 ± 6,24	22,75 ± 3,16	25,43 ± 8,04
II (dosis baja)	4,56 ± 0,58	11,43 ± 1,78	12,82 ± 4,21	13,00 ± 2,11 ^a	13,63 ± 2,53 ^b
III (dosis alta)	4,04 ± 1,27	14,22 ± 3,00	12,74 ± 2,69	13,60 ± 3,29 ^a	14,37 ± 4,64 ^c
Grupo I = 1% de oxalato (HOD) + 0 ufc			^a p < 0,001 en comparación con Grupo I		
Grupo II = HOD + 10 ⁶ ufc de <i>O. formigenes</i>			^b p < 0,0022 en comparación con Grupo I		
Grupo III = HOD + 10 ⁶ ufc de <i>O. formigenes</i>			^c p < 0,0041 en comparación con Grupo I		