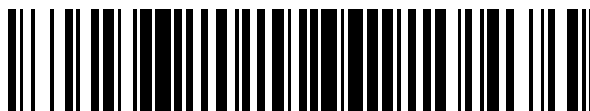


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 898**

51 Int. Cl.:

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2005** **E 05786347 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 1771201**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con el oxalato**

30 Prioridad:

15.06.2004 US 868242

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

19.11.2014

73 Titular/es:

OXTHERA INTELLECTUAL PROPERTY AB
(100.0%)

Sturegatan 56
114 36 Stockholm , SE

72 Inventor/es:

SIDHU, HARMEET

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 522 898 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con el oxalato

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones y a su uso en métodos para tratar y prevenir afecciones relacionadas con el oxalato. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones y métodos que comprenden bacterias y enzimas que degradan el oxalato o son reductoras del oxalato.

Antecedentes

- 10 La enfermedad de cálculos en el tracto renal-urinario (urolitiasis) es un importante problema sanitario a nivel mundial. La mayoría de los cálculos asociados con la urolitiasis se componen de oxalato de calcio solo u oxalato de calcio más fosfato de calcio. Otras enfermedades también se han asociado con un exceso de oxalato. Estas incluyen vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, afecciones de la conductancia cardíaca, enfermedad de Crohn y otras enfermedades entéricas.

- 15 El ácido oxálico y/o su sal, oxalato, se encuentra en una amplia variedad de alimentos y, por lo tanto, es un componente de muchos constituyentes en la dieta humana y animal. Un aumento de la absorción de oxalato puede ocurrir después de comer alimentos que contienen cantidades elevadas de ácido oxálico. Alimentos tales como las espinacas y el ruibarbo son bien conocidos por contener cantidades elevadas de oxalato, pero un gran número de otros alimentos y bebidas también contienen oxalato. Debido a que el oxalato se encuentra en una amplia variedad de alimentos, las dietas con bajo contenido en oxalato y que también sean sabrosas, son difíciles de formular. Además, el cumplimiento con una dieta baja en oxalato es frecuentemente problemático.

- 20 El oxalato endógeno también se produce metabólicamente mediante enzimas tisulares normales. El oxalato, que incluye el oxalato de la dieta que se absorbe así como el oxalato que se produce metabólicamente, no se metaboliza adicionalmente por las enzimas tisulares y por lo tanto debe ser excretado. Esta excreción se produce principalmente a través de los riñones. La concentración de oxalato en los fluidos renales es decisiva, en donde un aumento de las concentraciones de oxalato causa un mayor riesgo de formación de cristales de oxalato de calcio y, por lo tanto, la posterior formación de cálculos renales.

- 25 El riesgo de formación de cálculos renales gira en torno a una variedad de factores que todavía no se han entendido completamente. La enfermedad de cálculo renal o del tracto urinario se produce en hasta el 12% de la población en los países occidentales y cerca del 70% de estos cálculos están compuestos por oxalato de calcio u oxalato de calcio más fosfato de calcio. Algunos individuos (por ejemplo, pacientes con enfermedad intestinal, como la enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal o esteatorrea, y también pacientes que han sido sometidos a cirugía de derivación yeyuno-ileal) absorben más oxalato de sus dietas que las demás. Para estos individuos, la incidencia de urolitiasis por oxalato se incrementa notablemente. El aumento de la incidencia de la enfermedad se debe al incremento de los niveles de oxalato en los riñones y la orina, y ello, el síndrome hiperoxalúrico más común en el hombre, se conoce como hiperoxaluria entérica. El oxalato también es un problema en pacientes con enfermedad renal en fase terminal 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) de que el oxalato urinario elevado también está implicado en la vestibulitis vulvar (vulvodinia).

- 30 Las bacterias que degradan el oxalato se han aislado 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 eran similares a las bacterias reductoras de oxalato que se habían aislado a partir de los contenidos intestinales de una variedad de especies 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 oxalate in the gastrointestinal tracts of rats" *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1793-1797). Estas bacterias son diferentes de cualquier organismo descrito anteriormente y se les ha otorgado a ambas una nueva especie y un nuevo nombre 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 inhabit the gastrointestinal tract" *Arch. Microbiol.* 141:1-7).

- 35 No todos los seres humanos son portadores de poblaciones de *O. formigenes* en sus tractos intestinales (Allison, M. J., S. L. Daniel, N. A. Comick [1995] "Oxalate-degrading bacteria" En Khan, S. R. (compilador), *Calcium Oxalate in Biological Systems* CRC Press; Doane, L. T., M. Liebman, D. R. Caldwell [1989] "Microbial oxalate degradation: effects on oxalate and calcium balance in humans" *Nutrition Research* 9:957-964). En las muestras fecales de personas que han tenido una cirugía de derivación yeyuno-ileal hay concentraciones bajas o una falta completa de bacterias que degradan oxalato (Allison et al. [1986] "Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans" *J. Nutr.* 116:455-460). También, ciertos seres humanos y animales pueden conservar colonias de *O. formigenes* pero sin embargo tener niveles excesivos de oxalato por razones que no se entienden claramente.

Lo que es necesario son métodos para el tratamiento de seres humanos y animales para reducir los niveles de oxalato en sus organismos, de modo que se traten o se eviten las afecciones relacionadas con el oxalato. Los métodos deseables incluirían la administración de composiciones reductoras de oxalato.

Breve compendio de la invención

- 5 La presente invención comprende composiciones para uso en el tratamiento y la prevención de afecciones relacionadas con el oxalato de acuerdo con la reivindicación 1. Las composiciones de la presente invención comprenden *Oxalobacter formigenes* que puede reducir el oxalato y pueden comprender adicionalmente enzimas que reducen el oxalato, en el tracto intestinal. Esta reducción en el tracto intestinal conduce a una reducción de los niveles sistémicos de oxalato, favoreciendo de este modo un buen estado de salud.
- 10 En una realización de la presente invención, una reducción de la absorción de oxalato se logra mediante el suministro de bacterias que degradan el oxalato en el tracto intestinal, siendo estas bacterias *Oxalobacter formigenes*. Estas bacterias utilizan oxalato como sustrato de crecimiento. Esta utilización reduce la concentración de oxalato soluble en el intestino y, por lo tanto, la cantidad de oxalato disponible para la absorción. Una reducción del oxalato en el tracto intestinal también puede conducir a la eliminación de oxalato del sistema circulatorio.
- 15 En una realización específica, la presente invención proporciona composiciones para la administración de *O. formigenes* en el tracto intestinal de personas que tienen mayor riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato. Estas bacterias y su progenie se replican en el intestino y eliminan el oxalato del tracto intestinal, reduciendo de este modo la cantidad de oxalato disponible para la absorción y conduciendo a un aumento de la excreción de oxalato desde la sangre al intestino.
- 20 Las enzimas formil-CoA transferasa y oxalil-CoA descarboxilasa se han identificado por desempeñar una función en la degradación del oxalato. Las enzimas utilizadas en las composiciones de la presente invención incluyen formil-CoA transferasa, oxalil-CoA descarboxilasa, oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa y otras enzimas, cofactores y coenzimas que son sustituyentes de las rutas de degradación del oxalato o están implicadas en las rutas metabólicas del oxalato, particularmente en la reducción del oxalato.
- 25 En una realización de la presente invención, un hospedador apropiado se puede transformar con polinucleótidos exógenos que codifican esta enzima o actividades enzimáticas relacionadas, confiriendo de esta manera al hospedador transformado la capacidad para aumentar la degradación de oxalato. El hospedador puede ser, por ejemplo, un microbio que está particularmente bien adaptado para la administración oral y/o la colonización del intestino. Alternativamente, el hospedador puede ser una planta que, una vez transformada, producirá las actividades enzimáticas deseadas, haciendo de este modo que estas actividades estén disponibles en el intestino cuando se consume el material vegetal. Alternativamente, la planta transformada puede tener una menor cantidad de oxalato, opcionalmente debido a las acciones de las proteínas proporcionadas por la transformación y, por lo tanto, cuando se consume, la planta no proporcionará una mayor cantidad de oxalato a la dieta que lo que haría una planta no transformada.
- 30 La presente invención también comprende composiciones que comprenden enzimas para reducir los niveles de oxalato con el fin de tratar o prevenir afecciones relacionadas con el oxalato. Por ejemplo, una reducción en los niveles de oxalato se logra mediante la administración de enzimas que actúan degradando el oxalato. Estas enzimas se pueden aislar y purificar o se pueden administrar como un lisado celular. El lisado celular se puede preparar a partir de cualquier microorganismo que tiene funciones reductoras del oxalato, por ejemplo, *O. formigenes*. En una realización específica, las enzimas que se administran son una o varias de las enzimas de la presente invención, tales como oxalato 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, de oxalil CoA, MgCl₂ y TPP (difosfato de tiamina, una forma activa de la vitamina B₁). Las composiciones que incluyen enzimas comprenden una o varias enzimas, y opcionalmente, cofactores, coenzimas y otros agentes que mejoran la actividad enzimática, de forma individual o en combinación.
- 45 En una realización de la presente invención, una reducción de los niveles de oxalato se logra mediante la administración de enzimas que degradan el oxalato, producidas por un microbio recombinante, tal como *Escherichia coli* que se ha transformado para expresar enzimas que degradan el oxalato. El hospedador recombinante se puede administrar en una forma viable o no. Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y/o a suplementos nutricionales para administración oral. Estas composiciones liberan los microbios que degradan el oxalato y las enzimas que degradan el oxalato, en el intestino de seres humanos o animales. Las composiciones de la presente invención comprenden formulaciones farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los métodos y las composiciones de la presente invención comprenden un sistema de administración de dosis que proporciona las composiciones en las ubicaciones deseadas, tal como la entrega de las composiciones en el intestino del receptor. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar como un componente de los alimentos, tales como leche, carnes y yogur.
- 50
- 55

Breve descripción de las Figuras

La Fig. 1A es una representación gráfica de datos procedentes de una dieta rica en calcio.

La Fig. 1B es una representación gráfica de datos de una dieta baja en calcio.

La Fig. 2A es una representación gráfica del oxalato excretado.

La Fig. 2B es una representación gráfica del oxalato excretado.

La Fig. 2C es una representación gráfica del oxalato excretado.

5 Las Figs. 3A-C son una representación gráfica del oxalato excretado.

La Fig. 4 es una representación gráfica del oxalato excretado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende composiciones para uso de acuerdo con la reivindicación 1.

10 Las composiciones pueden comprender adicionalmente enzimas que son componentes de las rutas de reducción del oxalato. Tales composiciones comprenden una o varias enzimas y opcionalmente incluyen cofactores, coenzimas y otros factores necesarios o deseados para la actividad enzimática. Las composiciones comprenden una o varias enzimas incluyendo enzimas reductoras del oxalato que se encuentran en plantas, animales o seres humanos. Las composiciones comprenden una o varias de las enzimas reductoras del oxalato que se describen en el presente documento. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "una o varias enzimas" significa que se contempla una
15 enzima, tal como formil-CoA transferasa, o que se contempla más de una enzima, por ejemplo, formil-CoA transferasa y oxalato descarboxilasa. Tal y como se conoce en la técnica, la expresión no significa una molécula de enzima, sino múltiples de moléculas de uno o varios tipos de enzimas.

20 Tal y como se utiliza en esta memoria, las expresiones enzimas que degradan el oxalato y enzimas reductoras de oxalato son intercambiables y se refieren tanto a las enzimas implicadas en la reducción o la degradación del oxalato en cualquier organismo, como a fragmentos activos o proteínas recombinantes que comprenden fragmentos activos capaces de reducir o degradar el oxalato.

25 Las composiciones enzimáticas de la presente invención también pueden comprender formulaciones que proporcionan una protección a las moléculas enzimáticas activas frente a la degradación en el estómago o el medio intestinal. Por ejemplo, las composiciones enzimáticas comprenden composiciones que pueden proteger o confinar las enzimas. Las enzimas se pueden estar unidas covalentemente a otros compuestos, incluyendo, pero no limitados a PEG. La enzima se puede confinar o atrapar dentro de una estructura tal como el interior de una estructura de malla tridimensional, por ejemplo, preparada a base de polímeros que, o bien se degradan para liberar las enzimas o tienen tamaños de poro que permiten que la enzima salga de la estructura o permiten que los sustratos penetren en la estructura para llegar a las enzimas. Por ejemplo, el tamaño del poro permitiría que oxalato y formiato de bajo peso molecular difundan a la zona en la que están presentes las enzimas. Además, las enzimas
30 se pueden fijar o no covalentemente a la estructura del polímero. Métodos y dispositivos protegen enzimas activas de la degradación proteolítica o de otros entornos nocivos para las enzimas.

35 La presente invención se refiere a la introducción de composiciones que comprenden bacterias que degradan el oxalato que son *Oxalobacter formigenes* y opcionalmente también enzimas, en un tracto intestinal humano o animal en donde la actividad de las composiciones reduce la cantidad y/o la concentración de oxalato presente, reduciendo de este modo el riesgo de enfermedad debido al oxalato.

40 La cantidad de enzima en la composición comprende una cantidad de unidades operativas de la actividad de la enzima que reduce el oxalato que reducirá una porción del oxalato presente en el intestino del individuo o un nivel de unidades operativas de la actividad de la enzima que reduce el oxalato que iniciará una reducción de la cantidad de oxalato o mantendrá 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 operativas de la actividad de la enzima que reduce el oxalato que se puede utilizar en una composición de dosis única, puede variar desde aproximadamente 0,0001 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, desde aproximadamente 5 unidades a 100 unidades, y todos los intervalos comprendidos entre los mismos. Las composiciones pueden incluir además otras
45 enzimas, cofactores, sustratos, coenzimas, minerales y otros agentes que son útiles en la reducción del oxalato. Una unidad de la enzima es la cantidad de enzima que degradará un micromol de oxalato por minuto a 37°C.

50 En una realización específica, la presente invención se refiere a la administración de composiciones que comprenden células de bacterias que degradan el oxalato de la especie *Oxalobacter formigenes*, en el tracto intestinal humano, en donde la actividad de los microbios reduce la cantidad de oxalato presente en el intestino, provocando de este modo una reducción de las concentraciones de oxalato en los riñones y en otros fluidos celulares. En otra realización, la presente invención comprende la administración de composiciones que comprenden adicionalmente una o varias enzimas que degradan el oxalato, obtenidas a partir de cualquier fuente, en el tracto intestinal humano, en donde la actividad de una o varias enzimas reduce la cantidad de oxalato presente en el intestino y produce una reducción de las concentraciones de oxalato en los riñones y en otros fluidos celulares.
55 Las células o enzimas introducidas degradan el oxalato y las bacterias se replican en el hábitat intestinal. La

presencia de bacterias reductoras del oxalato reduce el riesgo de formación de cálculos renales así como de otras complicaciones de una enfermedad causada por el ácido oxálico. En una realización preferida para el uso en humanos, las cepas específicas de *O. formigenes* utilizadas son cepas aisladas a partir de muestras intestinales humanas. Por lo tanto, las cepas forman parte de la flora bacteriana intestinal humana normal. Sin embargo, ya que

5 no están presentes en todas las personas, o están presentes en una cantidad insuficiente, la introducción de estos organismos corrige una deficiencia presente en algunos seres humanos.

Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que el enriquecimiento del contenido del intestino con una o varias especies de bacterias que degradan el oxalato o de enzimas reductoras del oxalato provoca una reducción del oxalato en el contenido intestinal. Algunas de las bacterias o de las enzimas

10 administradas llevan a cabo una degradación del oxalato en el sitio de la absorción o cerca del mismo. La actividad de las bacterias o de las enzimas administradas disminuye el nivel de absorción de oxalato de la dieta. Una reducción de la concentración de oxalato en el intestino también puede conducir a una eliminación del oxalato desde las células y la circulación general. Más específicamente, una reducción de la concentración de oxalato en el intestino también puede conducir a una mayor secreción de oxalato en el intestino desde la sangre y, por lo tanto,

15 reducir la cantidad de oxalato que se tiene que excretar en la orina. Por lo tanto, las composiciones para uso de la presente invención para la administración de bacterias reductoras de oxalato y opcionalmente enzimas reductoras de oxalato, se pueden usar para tratar o prevenir afecciones relacionadas con el oxalato, tales como hiperoxaluria primaria, además del tratamiento de la hiperoxaluria dietética. Las composiciones de la presente invención son particularmente ventajosas para favorecer niveles de oxalato saludables en los seres humanos y los animales.

Composiciones farmacéuticas y nutracéuticas para la introducción de bacterias que degradan el oxalato o una o varias enzimas que degradan el oxalato, solas o en combinaciones, en el intestino incluyen bacterias o enzimas que se han liofilizado o congelado en forma de líquido o pasta y se han encapsulado en una cápsula de gel u otra

20 protección entérica. El material de la cápsula de gel es preferiblemente un material polímero que forma una píldora o una cápsula para la administración que es resistente a la degradación por la acidez gástrica y las enzimas del estómago, pero que se degrada con la liberación simultánea de composiciones que degradan el oxalato, mediante el pH más elevado y el contenido en ácidos biliares en el intestino. La composición liberada convierte a continuación 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 incluirían, por ejemplo, tampón de solución salina-fosfato.

Las composiciones reductoras de oxalato que comprenden una o varias bacterias reductoras de oxalato o una o varias enzimas reductoras de oxalato, o combinaciones de bacterias y enzimas, que se van a administrar, se pueden

30 entregar en forma de cápsulas o microcápsulas diseñadas para proteger la composición de los efectos adversos del ácido estomacal. Se puede utilizar uno o varios de los diversos métodos de recubrimiento protector entérico. Descripciones de tales capas entéricas incluyen el uso de acetato de celulosa (CAP) (Yacobi, A., E. H. Walega, 1988, Oral sustained release formulations: Dosing and evaluation, Pergamon Press). Otras descripciones de tecnología de encapsulación incluyen el documento de patente de EE.UU. n° 5.286.495. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como supositorios.

Otros métodos de administración de estas composiciones que comprenden uno o varios microorganismos, una o varias enzimas reductoras de oxalato o combinaciones y mezclas, en el intestino incluyen la adición de las composiciones directamente a las fuentes de alimentos. Se pueden añadir una o varias bacterias como células

40 recogidas recientemente, células liofilizadas o células protegidas de otro modo. Una o varias enzimas se pueden añadir como proteínas liofilizadas, encapsuladas o composiciones enzimáticas microencapsuladas, enzimas que forman complejos con otros materiales para mantener la actividad de las enzimas, y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica para la adición de enzimas activas a composiciones. Los alimentos pueden estar complementados con composiciones que degradan el oxalato sin afectar al sabor o a la apariencia. Estos alimentos

45 pueden ser, por ejemplo, yogur, leche, mantequilla de cacahuete o chocolate. Después de la ingestión, cuando los productos alimenticios están siendo digeridos y absorbidos por el intestino, las composiciones que degradan el oxalato, incluyendo uno o varios microorganismos, una o varias enzimas o combinaciones, degradan el oxalato presente en el intestino, reduciendo de este modo la absorción de oxalato en el torrente sanguíneo.

Como se señaló anteriormente, se puede complementar una variedad de alimentos con composiciones que degradan el oxalato. Los métodos para preparar tales alimentos que contienen composiciones reductoras del oxalato, incluyen la mezcla por adición de un material alimenticio con una composición reductora del oxalato. Por

50 ejemplo, los microbios reductores de oxalato se pueden cultivar en un medio y separar del medio, por ejemplo, mediante centrifugación. Cultivos tradicionales de yogur obtenidos a partir de un producto lácteo comercial, se pueden mezclar con el cultivo microbiano que degrada oxalato. Esta mezcla de cultivos se puede añadir a continuación a la premezcla básica de yogur lácteo sin afectar negativamente al sabor o a la consistencia. A continuación, se puede producir el yogur y envasarlo utilizando procedimientos comerciales tradicionales. En otro

55 ejemplo, las bacterias que degradan el oxalato se puede añadir a los yogures ya producidos. En un método similar, una composición reductora de oxalato que comprende una o varias enzimas reductoras de oxalato, se puede añadir al cultivo bacteriano del yogur o al producto alimenticio de yogur.

Otro ejemplo de los métodos es añadir la composición reductora de oxalato a la leche después de que se ha homogeneizado y esterilizado. Tal método se utiliza actualmente en la industria láctea para la adición de organismos

60

Lactobacillus acidophilus a la leche. Se puede utilizar cualquier fuente alimenticia que contenga bacterias mediante la complementación con bacterias que degradan el oxalato. Estos productos alimenticios incluyen queso o productos cárnicos que tienen microorganismos deseables añadidos durante el procesamiento. Los alimentos que comprenden composiciones reductoras de oxalato que comprenden enzimas que reducen el oxalato, no se limitan a aquellos alimentos que comprenden microorganismos, sino que incluyen cualquier fuente alimenticia a la que se pueden añadir enzimas activas. Los materiales que se consideran generalmente materiales alimenticios se pueden utilizar como material de soporte para las enzimas, de manera que las enzimas son activas sobre el oxalato presente en el material alimenticio en cualquier etapa de la producción o del crecimiento del material alimenticio, o en cualquier etapa de la digestión del ser humano o animal, o sobre el oxalato presente en el intestino.

En una realización, las cepas de bacterias *O. formigenes*, usadas de acuerdo con la presente invención, son cultivos puros que se aíslan a partir de cultivos anaerobios que se han inoculado con diluciones de contenidos intestinales procedentes de seres humanos normales. Se puede emplear un medio que contiene oxalato de calcio especial que permite la detección de colonias que degradan el oxalato. En una realización, la pureza de cada cepa se puede asegurar 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 varias pruebas, estas incluyen: patrones de ácidos grasos celulares, patrones de proteínas celulares, ADN y ARN (Jensen, N. S., M. J. Allison (1995) "Studies on the diversity among anaerobic oxalate degrading bacteria now in the species *Oxalobacter formigenes*" Resumen del General Meeting of the Amer. Soc. Microbiol., 1-29), y respuestas a sondas de oligonucleótidos (Sidhu et al. 1996). Se han descrito dos grupos de estas bacterias (Grupos I y II, en donde ambos están presentes en la presente descripción de las especies). Las cepas utilizadas se han seleccionado basándose en la capacidad para degradar el oxalato, y la evidencia de la capacidad para colonizar el tracto intestinal humano. Las cepas seleccionadas incluyen representantes de ambos Grupos I y II de las especies.

Una realización de la presente invención implica la administración de las bacterias que degradan el oxalato apropiadas a una diversidad de sujetos. En lugar destacado, pero no exclusivamente, se trata de personas que no albergan estas bacterias en sus intestinos. Estas personas no colonizadas o débilmente colonizadas se identifican utilizando pruebas que permiten una detección rápida y definitiva de *O. formigenes*, incluso cuando los organismos están a concentraciones relativamente bajas en poblaciones bacterianas mezcladas, tal como se encuentran en los contenidos intestinales. Las composiciones para uso de la presente invención también se pueden usar para tratar individuos cuyas bacterias que degradan el oxalato se han agotado debido a, por ejemplo, un tratamiento antibiótico o en situaciones postoperatorias. Las composiciones para uso de la presente invención también se pueden usar para tratar individuos que tienen colonias de bacterias que degradan el oxalato, pero que todavía tienen niveles poco saludables de oxalato debido a, por ejemplo, una susceptibilidad hacia el oxalato y/o una producción excesiva de oxalato endógeno.

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

1) Se pueden utilizar sondas de oligonucleótidos específicas para estas bacterias; y/o

2) Una prueba de cultivo en donde se inocula un medio anaerobio con oxalato 10 mM y después de la incubación a 37°C, durante 1 a 7 días, se determina la pérdida de oxalato.

Los cultivos puros de cepas de *O. formigenes* se pueden cultivar en grandes cultivos por lotes en fermentador y las células se pueden recoger utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las células de una cepa aislada seleccionada o de mezclas de cepas conocidas se pueden tratar según sea necesario (por ejemplo, liofilizadas con trehalosa o glicerol) para conservar la viabilidad y luego se colocan en cápsulas diseñadas para proteger las células durante su paso a través del estómago ácido (cápsulas con capa entérica).

Las células se ingieren en cantidades y a intervalos determinados según las necesidades de los individuos. En algunos casos, un uso aislado o periódico puede ser todo lo que se necesita y en otros casos puede ser necesaria una ingestión regular (por ejemplo, con las comidas).

La invención se refiere además a la administración en el tracto intestinal humano de enzimas que degradan el oxalato preparadas a partir de organismos reductores de oxalato, tales como células de *O. formigenes* o a partir de otras fuentes, o por métodos tales como mediante medios recombinantes. En una realización, las enzimas que degradan el oxalato se pueden purificar y preparar como una composición farmacéutica o nutracéutica para consumo oral. En una realización preferida, estas enzimas se producen de forma 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 que degradan el oxalato, se pueden expresar en un hospedador adecuado. El hospedador puede ser, por ejemplo, *E. coli* o *Lactobacillus*. El hospedador transformado incluiría señales reguladoras y transportadoras apropiadas. La proteína expresada se puede aislar, purificar y administrar como se describe en esta memoria. Alternativamente, se puede administrar el hospedador recombinante que expresa las proteínas deseadas que degradan el oxalato. El hospedador recombinante se puede administrar ya sea en una forma viable o no viable. En otra realización preferida, las

enzimas se revisten o se formulan o modifican de otra manera para proteger las enzimas, de modo que no se inactiven en el estómago y estén disponibles para ejercer su actividad degradante del oxalato en el intestino delgado. Ejemplos de tales formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento de Patente de EE.UU. nº 5.286.495.

Las enzimas que degradan el oxalato tal y como se emplean en esta memoria, incluyen todas las enzimas implicadas en las rutas del oxalato e incluyen la oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa, formil CoA transferasa y oxalil-CoA descarboxilasa. La oxalato oxidasa se expresa en las plantas superiores y cataliza la oxidación dependiente de oxígeno del oxalato a CO₂ con una formación concomitante de H₂O₂. Las oxalato oxidasas se han purificado a partir de muchas fuentes, por ejemplo, plántulas, raíces y hojas de cebada; tallos y hojas de remolacha; germen de trigo; hojas de sorgo; y cáscara de plátano. Un procedimiento de purificación rápida en tres etapas se ha desarrollado para obtener oxalato oxidasa a partir de raíces de cebada. El gen que codifica la oxalato oxidasa de la raíz de la cebada se ha clonado, secuenciado y expresado.

La oxalato descarboxilasa está presente principalmente en los hongos. Una oxalato descarboxilasa bacteriana se ha descrito recientemente en *B. subtilis* y está codificada por el gen *yvrk*. Las oxalato descarboxilasas catalizan la degradación de oxalato libre en CO₂ y formiato. Esta enzima se ha descrito en varios hongos, incluyendo *Myrothecium*, *verrucaria*, ciertas cepas de *Aspergillus niger* y hongos de pudrición blanca, *Coriolus versicolor*. El gen que codifica la oxalato descarboxilasa de *Flammulina velutipes* se ha clonado y secuenciado; véase el documento WO 98/42827.

La oxalil-CoA descarboxilasa es activa sobre un sustrato activado con CoA y la convierte en formil-CoA. Una formil CoA transferasa actúa entonces para intercambiar formiato y oxalato en CoA. Estas enzimas se han estudiado en las bacterias que degradan el oxalato, *Pseudomonas oxalaticus* presente en el suelo y en *Oxalobacter formigenes*, que reside en el tracto gastrointestinal de los vertebrados, incluidos los humanos. Se ha observado que *O. formigenes* tiene una relación simbiótica con su hospedador mediante la regulación de la absorción de ácido oxálico en el intestino, así como los niveles de ácido oxálico en plasma. Como resultado se ha encontrado que la ausencia de esta bacteria es un factor de riesgo en las afecciones relacionadas con el oxalato, como la urolitiasis de oxalato de calcio recurrente idiopática y la hiperoxaluria entérica derivada de una cirugía de derivación yeyuno-ileal, fibrosis quística y enfermedad inflamatoria intestinal.

Patentes que describen diversas enzimas que degradan el oxalato y los genes que codifican estas enzimas incluyen los documentos de Patentes de EE.UU. nº 5.912.125; 6.090.628; y 6.214.980. La expresión enzima que degrada el oxalato incluye, pero no se limita a, oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa, oxalil-CoA descarboxilasa y formil-CoA transferasa, e incluye enzimas que son capaces de interaccionar con oxalato o ácido oxálico. Estas enzimas se pueden obtener a partir de fuentes naturales o se pueden sintetizar utilizando medios recombinantes conocidos en la técnica, e incluyen todos los fragmentos, tales como sitios de unión, sitios activos o fragmentos capaces de interaccionar con oxalato o ácido oxálico. Esta expresión también incluye pero no se limita a, todos los cofactores necesarios, coenzimas, metales, o la unión a materiales de sustrato que son necesarios para la enzima en la interacción con oxalato o ácido oxálico. La presente invención también contempla cualquier pareja de unión de estas enzimas e incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen o interaccionan con las enzimas.

El uso de *O. formigenes* es particularmente ventajoso porque es un microorganismo anaerobio que no crece en entornos de tejidos aerobios y no produce ningún compuesto que sea tóxico para los seres humanos o animales. Como una alternativa a *O. formigenes* o un hospedador recombinante, se pueden utilizar otras bacterias que degradan el oxalato, tales como *Clostridium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*. Enzimas que degradan el oxalato, preparadas a partir de tales bacterias alternativas se pueden administrar o se puede administrar el microbio completo.

La presente invención comprende composiciones que comprenden *Oxalobacter formigenes* o combinaciones de *Oxalobacter formigenes* y enzimas para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, respectivamente. Tales composiciones son eficaces en la reducción de la cantidad y/o concentración de oxalato presente. Tales composiciones son eficaces en el tratamiento y la prevención de afecciones relacionadas con el oxalato. Tales enzimas incluyen oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa, oxalil-CoA descarboxilasa y formil-CoA transferasa. Estas enzimas se pueden obtener a partir de fuentes conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la enzima vegetal, oxalato oxidasa (OXO) se puede purificar a partir de plántulas de cebada, y la oxalato descarboxilasa se puede purificar a partir de fuentes bacterianas o fúngicas.

Alternativamente, las enzimas que degradan el oxalato se pueden obtener por medios recombinantes. Por ejemplo, medios recombinantes tales como clonación, expresión y purificación se pueden utilizar para obtener enzimas reductoras del 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 la expresión del gen de la oxalato descarboxilasa de *B. subtilis* (*YvrK*): El gen de la proteína oxalato descarboxilasa (*YvrK*) se ha clonado en el plásmido pET-9a y pET-14b (Novagen, WI), bajo el control de un promotor fuerte del bacteriófago T7, para una hiperexpresión como proteína citosólica soluble. El hospedador para la expresión era la cepa de *E. coli* BL 21 (DE3) pLysS, un lisógeno λDE3 carente de proteasas y que contiene una copia cromosómica del gen de la polimerasa de ARN T7, bajo el control de lacUV5. Además, esta cepa es portadora de un plásmido compatible con pET que

codifica la lisozima de T7, una enzima bifuncional que corta un enlace en la capa de peptidoglicanos de la pared celular e inhibe la ARN polimerasa de T7. Esto permite un mayor control de la expresión basal no inducida y permite el uso de métodos que destruyen la membrana interna, tales como congelación-descongelación o detergentes suaves, etc.) para lisar de forma eficaz la célula. La expresión del producto génico se induce mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Una variedad de vectores de expresión y de hospedadores se puede utilizar para producir enzimas que degradan el oxalato como proteínas recombinantes, y tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica.

O. formigenes se ha aislado a partir de muestras fecales humanas y se ha clonado mediante la selección de colonias individuales. Esto incluye la cepa HC-1 que se obtuvo originalmente a través de Ixion Biotechnology en 1996 por el Dr. Milton Allison. Por ejemplo, se puede utilizar material congelado de la cepa HC-1 humana.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende composiciones para el suministro de bacterias reductoras del oxalato y enzimas que degradan el oxalato, que pueden reducir el oxalato en el tracto intestinal de personas que tienen un riesgo incrementado frente a enfermedades y/o afecciones relacionadas con el oxalato. Tales enfermedades y afecciones incluyen la hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales por oxalato de calcio (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal. Los seres humanos que se han sometido a tratamiento con antibióticos, tratamiento quimioterapéutico u otros tratamientos que modifican la flora intestinal, se tratan con las composiciones de la presente invención. La presente invención se usa para restaurar la capacidad de reducir el oxalato en seres humanos con flora intestinal modificada. Un aumento de los niveles de excreción de oxalato urinario favorece la formación de cálculos renales, contribuye a la cicatrización renal e incluso puede dar lugar a una insuficiencia renal. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende composiciones para reducir la formación de cálculos renales.

Una reducción de las concentraciones globales de oxalato en el intestino también puede conducir a la eliminación de oxalato a partir de las células y la circulación general. Más específicamente, una reducción de la concentración de oxalato en el intestino también puede conducir a una mayor secreción de oxalato al intestino desde la sangre. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría en particular, actualmente se cree que existe un gradiente transepitelial para la eliminación entérica de oxalato. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende composiciones y métodos para reducir los niveles sanguíneos de oxalato e incrementar la excreción de oxalato, favoreciendo la excreción de oxalato desde la sangre a través de un gradiente transepitelial de oxalato para la excreción de oxalato en el colon. La presente invención comprende proporcionar una composición en el intestino de un ser humano para reducir la concentración o el nivel de oxalato de un ser humano. Tal reducción puede comprender la reducción de la cantidad de oxalato que se encuentra en el intestino, 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 utilizar una solo vial de reserva de HC-1 para generar un cultivo de siembra con el fin de iniciar el crecimiento en una producción por fermentación a gran escala. Las bacterias de cada fermentación se recogen por centrifugación y se mezclan con excipientes crioprotectores, que proporcionan protección contra la liofilización. La pasta de células también se puede someter a liofilización dando como resultado un polvo fino que tiene una potencia en el rango de 10^7 a 10^9 ufc/gramo. El polvo resultante se coloca en cápsulas de gelatina que tienen una capa entérica para una administración segura de las bacterias en el intestino delgado.

Las composiciones de la presente invención comprenden composiciones preparadas a partir de extractos de una o varias bacterias reductoras de oxalato, en el intervalo desde aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{12} ufc/gramo, desde aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{10} ufc/gramo, desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{12} ufc/gramo, desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} ufc/gramo, desde aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 ufc/gramo, desde aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 ufc/gramo y todos los intervalos intermedios.

Las composiciones de la presente invención también comprenden composiciones que comprenden adicionalmente una o varias enzimas que tienen actividad reductora de oxalato. Una cantidad eficaz de una composición enzimática es capaz de reducir una porción de oxalato en el intestino o disminuir la concentración de oxalato en un ser humano desde el nivel medido antes de la administración de la composición. Una medición de este tipo puede ser una medición del oxalato presente en el intestino procedente de fuentes alimenticias o puede ser un nivel medido en un fluido corporal como la sangre o la orina.

La presente invención comprende composiciones que contienen *O. formigenes* para uso según la reivindicación 1. Los sujetos se dosifican preferentemente con cápsulas entéricas que contienen $\geq 10^6$ ufc de células viables de *O. formigenes*. Tal dosificación se produce preferiblemente dos veces al día con las dos comidas principales. La presente invención también comprende composiciones reductoras de oxalato que comprenden *Oxalobacter formigenes* y una o varias enzimas reductoras de oxalato para uso según la reivindicación 2 que incluyen 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, de forma continua, como todos los días durante un período meses o años, para tratar o prevenir afecciones relacionadas con el oxalato. Por ejemplo, a una persona o un animal se pueden

administrar composiciones que reducen el oxalato más de una vez al día durante años para tratar o prevenir afecciones relacionadas con el oxalato. Una administración de este tipo puede tener lugar a través de rutas conocidas para la administración de productos farmacéuticos. La administración a través de vías orales o intestinales o en combinación con materiales alimenticios, se contempla en la presente invención.

- 5 Cabe señalar que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Todas las patentes, solicitudes de patentes y referencias incluidas en este documento se incorporan específicamente como referencias en su totalidad.

- 10 A continuación se encuentran los ejemplos que ilustran procedimientos para la puesta en práctica de la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse en modo alguno como una imposición de limitaciones del alcance de la presente invención. Por el contrario, se ha de entender claramente que se puede recurrir a otras realizaciones, modificaciones y equivalentes diferentes de las mismas que los expertos en la técnica puedan sugerir después de leer la descripción del presente documento, sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

- 15 Tratamiento de pacientes con riesgo elevado.

Pacientes hiperoxalúricos primarios ingirieron cápsulas con capa entérica que contenían polvo liofilizado de *O. formigenes* dos veces al día, preferiblemente con sus dos comidas principales diarias. Cada cápsula de tamaño 2 contenía aproximadamente 137 mg de polvo a granel liofilizado que contenía al menos 10^8 unidades formadoras de colonias (ufcs)/gramo.

- 20 Para sujetos de alto riesgo esto puede ser un tratamiento de por vida. Los sujetos en estudios clínicos mostraron que la colonización se reducía cuando se interrumpía el tratamiento. En el estudio clínico, el tratamiento se realizó durante 4 semanas y hubo dos semanas de seguimiento. El tratamiento de 4 semanas dio como resultado una disminución significativa de los niveles de oxalato en sangre y orina, en comparación con los niveles basales. Sin embargo, durante el período de seguimiento, el recuento de *Oxalobacter* en heces disminuyó y los valores de oxalato en plasma y orina empezaron a aumentar. Por lo tanto, se propone que será necesario una toma continua de composiciones reductoras del oxalato para proporcionar las condiciones de oxalato reducido. Las composiciones que comprenden bacterias que pueden colonizar y establecerse de forma continua en el intestino, podrían provocar que fueran necesarias menos administraciones de composiciones reductoras de oxalato.

- 25 Las cápsulas con capa entérica de células *O. formigenes* pueden ser ingeridas por poblaciones de pacientes con alto riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato. Estas incluyen:

1. Las personas que producen demasiado oxalato endógeno debido, por ejemplo, a un defecto genético como hiperoxaluria primaria.
2. Las personas con riesgo de urolitiasis con oxalato urinario elevado debido a una enfermedad entérica (hiperoxaluria entérica).
- 35 3. Las personas que tienen antecedentes de urolitiasis con episodios múltiples de litiasis idiopática.
4. Las personas con niveles elevados de oxalato sérico debido a una enfermedad renal en fase terminal.
5. Las personas con vestibulitis vulvar.
6. Las personas que tienen dietas con altos niveles de oxalato, tales como las que se encuentran en determinadas zonas y estaciones en la India y Arabia Saudita. Esto también incluiría individuos que prefieren alimentos como las espinacas que tienen un nivel elevado de oxalato.
- 40

A cualquiera de 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 elevados de lo normal, se trata dos veces al día, con una cápsula diseñada para la entrega de su contenido en el intestino grueso, en donde la cápsula contiene aproximadamente 10^6 ufcs de *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con la comida.

45 Ejemplo 2

Tratamiento de pacientes con poco riesgo:

- Células de *O. formigenes* protegidas entéricamente, tales como las proporcionadas en cápsulas con capa entérica también, pueden ser ingeridas por individuos en poblaciones con poco riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato. Sería deseable colonizar estos pacientes con uno o dos tratamientos que comprenden composiciones de materiales reductores del oxalato, tales como bacterias reductoras del oxalato. Estos pacientes también podrían recibir tratamientos de rutina con materiales que reducen el oxalato, como suplementos o adiciones a alimentos tales
- 50

como leche o yogur. Estos incluyen:

1. Las personas que han perdido poblaciones de bacterias normales que degradan el oxalato debido a: tratamientos con antibióticos orales o episodios de enfermedad diarreica.

5 2. Los niños pueden ser inoculados de modo que se establezca más fácilmente una población normal protectora de *Oxalobacter* que como es el caso años más tarde, cuando actúan los principios de exclusión competitivos.

Las personas o animales que tienen poco riesgo se tratan dos veces al día, con una cápsula diseñada para entregar su contenido en el intestino grueso, en donde la cápsula contiene al menos 10^7 ufc's de uno o varios organismos reductores de oxalato, tales como *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con la comida.

Ejemplo 3

10 Este ejemplo no forma parte de la invención. Uso de enzimas que degradan el oxalato procedentes de *Oxalobacter formigenes* para controlar la hiperoxaluria.

Se realizó un estudio para evaluar la eficacia de enzimas que degradan el oxalato procedentes de *Oxalobacter formigenes* para el control de la hiperoxaluria.

Animales utilizados: ratas macho Sprague Dawley: PC 250-300 g

15 Dietas utilizadas: Dieta normal (D.N.): Harlan Teklad TD 89222; 0,5% de Ca, 0,4% de P.

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

20 Sistema de Entrega de Fármacos (cápsulas): cápsulas de tamaño 9 para estudios preclínicos en ratas (Capsu-Gel). Eudragit L-100-55 con capa entérica (Hulls America, Inc.). Recogida de orina basal de 24 horas. Análisis fecal para *Oxalobacter formigenes* - las ratas no fueron colonizadas con *Oxalobacter formigenes*.

Protocolo experimental:

A. Estudios a largo plazo:

Protocolo Animal:

25 Grupo I (n = 4): Alimentado con dieta de oxalato con lisado. Las ratas recibieron dos cápsulas todos los días a las 4:00 pm y dieta de oxalato durante la noche. La dieta se retiró durante el día (8:00 am a 4:00 pm)

Grupo II (n = 4): Alimentado con dieta de oxalato como se ha descrito para el Grupo I (Testigos hiperoxalúricos).

Las muestras de orina de 24 h se recogieron el Día 7 y el Día 9 del tratamiento anterior.

30 Los datos de la concentración media de oxalato urinario para los dos grupos de ratas mostrados anteriormente, indicaban que la alimentación con lisado de *Oxalobacter* reducía la concentración de oxalato urinario en las ratas del Grupo I, en comparación con los testigos hiperoxalúricos (Grupo II). Las enzimas no pueden estar activas durante un largo periodo de tiempo en el tracto gastrointestinal; por lo tanto, se realizaron estudios a corto plazo, como se describe a continuación.

B. Estudios a corto plazo:

Protocolo Animal:

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

Grupo II (n = 4): Dieta de oxalato durante dos horas como para el Grupo I.

Se recogió la orina de todos los animales para el siguiente periodo de cinco horas y se analizó la concentración de oxalato.

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

Los resultados de este estudio muestran que la alimentación con lisado de *Oxalobacter* produce una disminución significativa de los niveles de oxalato urinario en un periodo de 5 horas después de la administración de oxalato y del fármaco en las ratas del Grupo I, en comparación con el grupo testigo hiperoxalúrico (Grupo II). En ese momento, se realizó un estudio cruzado entre los dos grupos de ratas.

45 C. Estudios cruzados:

Protocolo Animal:

Grupo I: Alimentado con dieta de oxalato dos veces al día de 8:00 a 10:00 am y de 3:00 pm a 5:00 pm.

Grupo II: Alimentado con 1 cápsula dos veces al día antes de la alimentación con la dieta de oxalato como para el Grupo I.

- 5 Se llevaron a cabo estudios a corto plazo para analizar el efecto de una alimentación con lisado de *Oxalobacter* sobre los niveles de oxalato en orina, tal y como se ha descrito en la Sección B anterior, el día 2 y el día 5 después de los estudios cruzados.

10 Los estudios cruzados mostraron que las ratas del Grupo II que previamente eran hiperoxalúricas, que fueron alimentadas con lisado *Oxalobacter*, mostraron un descenso de los niveles de oxalato urinario. En cambio, las ratas del Grupo I revirtieron a hiperoxaluria tras la retirada del fármaco.

Ejemplo 4

Este ejemplo no forma parte de la invención. Tratamiento de las ratas con células de *Oxalobacter formigenes*.

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

15 Métodos:

20 Ratas machos Wistar 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%) en dos experimentos distintos. Se proporcionó oxalato ^{14}C (2,0 μCi) el día 1 y de nuevo el día 7 del estudio. Las células de *Oxalobacter formigenes* (380 mg/d) se administraron a las ratas en agua potable los días 5-11. El destino del oxalato ^{14}C se midió basándose en el análisis del ^{14}C en las heces, la orina y el aire espirado. Las ratas sirvieron como autocontroles y las mediciones durante el periodo de control (antes de que se proporcionaran las células de *Oxalobacter*) se realizaron durante los días 1-4; durante el periodo experimental (cuando se proporcionaron las células bacterianas) las mediciones se realizaron los días 7-11.

Resultados:

25 1. Cuando las ratas fueron alimentadas con la dieta de calcio normal (1%), menos del 1% de la dosis administrada de ^{14}C procedente del oxalato, se recuperó en el aire espirado (como dióxido de carbono producido a partir de oxalato ^{14}C en el intestino, absorbido en la sangre y luego espirado), sin embargo en todos los casos la mayoría del ^{14}C se recuperó durante el periodo en el que las ratas fueron alimentadas con células de *Oxalobacter* (Fig. 1a). Esto difiere de los resultados obtenidos cuando la dieta era baja en calcio (0,02%), cuando más del 50% del ^{14}C procedente del oxalato se recuperó como dióxido de carbono en el aire espirado durante el periodo experimental, cuando las ratas fueron alimentadas con células de *Oxalobacter* (Fig. 1b). Estos resultados son sorprendentemente diferentes de las cantidades muy bajas de ^{14}C (menos del 5%) recuperadas durante el periodo de control (antes de la alimentación con células de *Oxalobacter*). Por lo tanto, alimentar las ratas con células de *Oxalobacter formigenes* aumenta notablemente la cantidad de oxalato de la dieta que se degrada en el tracto intestinal.

35 2. La ingestión de células de *Oxalobacter* también disminuía la cantidad de oxalato ^{14}C que se excretaba en la orina. Los valores de las recogidas durante 4 días durante los periodos de control y experimental y durante un solo día en cada uno de estos periodos, se muestran en las Figs. 2a y 2b respectivamente. Las cantidades de oxalato recuperado en las heces de las ratas, también fueron más bajas durante el periodo experimental (cuando se ingirieron células de *Oxalobacter*) que las que se encontraron en el periodo de control (Fig. 2c).

40 La mayoría de las ratas de laboratorio no son portadoras de *Oxalobacter* en sus tractos intestinales (no están colonizadas). Los presentes resultados mostraron que la administración ventajosa de estas bacterias que degradan el oxalato a las ratas, causaba que una gran parte del oxalato de la dieta se degradara y que por consiguiente se excretara menos oxalato de la dieta en la orina.

45 Los efectos del calcio de la dieta sobre la degradación del oxalato son característicos. El calcio forma un complejo con el oxalato de manera que su solubilidad y disponibilidad para el ataque de *Oxalobacter* es limitada y la cantidad que se degrada cuando las ratas se alimentan con una dieta rica en calcio es mucho menor que las cantidades degradadas cuando la dieta es baja en calcio.

Ejemplo 5

Este ejemplo no forma parte de la invención. Efecto de la ingestión de *O. formigenes* sobre la excreción de oxalato urinario en cerdos.

50 Los cerdos están colonizados de manera natural con *Oxalobacter*. La descolonización se logró en cerdos experimentales mediante la complementación de la dieta con antibióticos. Los cerdos fueron alimentados con *Oxalobacter* en caldo de cultivo, que ingirieron rápidamente. Los cerdos fueron alimentados con una alimentación a

base de soja/maíz complementada con 1300 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 urinario disminuyó drásticamente durante el consumo de *Oxalobacter*. El nivel de excreción de oxalato en estos cerdos se redujo a un mínimo de aproximadamente 6 mg/g de creatinina en los tres cerdos. Esto se compara con un nivel de 8-10 mg/g de creatinina que se ha observado en los seres humanos que toman dietas con fórmulas exentas de oxalato. Este nivel se equipara a la síntesis endógena en seres humanos cuando se ha eliminado la carga de la dieta. Parece que este nivel refleja la síntesis endógena en cerdos y que la absorción intestinal se ha eliminado con el tratamiento con *Oxalobacter*. Además, estos resultados indican que el *Oxalobacter* ingerido era capaz de eliminar tanto el oxalato cristalino añadido como el oxalato de origen alimentario que estaba biodisponible.

En este experimento cada cerdo ingirió 1,0 g de pasta de células con la comida de la mañana. Con una DO_{600} de 0,6, el 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 fermentador de 100 L nos proporciona un promedio de 50-60 g en peso húmedo de células. Por lo tanto, 1 g en 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 más arriba, podría eliminar la absorción intestinal de aproximadamente 2,0 g de oxalato presente por kg de dieta (1300 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 similar al de los 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/día, por lo tanto, una dosis diaria promedio de 10^8 a 10^{10} células viables sería suficiente para evitar que la absorción de oxalato de la dieta.

Ejemplo 6

Este ejemplo no forma parte de la invención. Efecto del suplemento de *O. formigenes* sobre la excreción de oxalato urinario en ratas alimentadas con una dieta rica en oxalato.

Se realizó un estudio para determinar el efecto de la formulación IxOC-3 sobre el estado de la colonización y los niveles de oxalato en orina después de una dieta rica en oxalato. Una formulación IxOC-3 comprende células viables liofilizadas de una bacteria reductora de oxalato, tal como *O. formigenes*. La formulación contiene aproximadamente 10^6 - 10^7 ufc/g por dosis. La formulación también comprende agentes de criopreservación tales como trehalosa y maltodextrina.

Métodos:

Ratas macho Harlan Sprague Dawley se asignaron aleatoriamente a 3 grupos (6 animales/grupo). Los animales del grupo 1 sirvieron como grupo testigo y se les administró una formulación de placebo con capa entérica de tamaño 9, dos veces al día mediante sonda oral, con un nivel de dosis de 10^0 unidades formadoras de colonias (ufcs). A los animales de los grupos 2 y 3 se les administró la formulación IxOC-3 de *Oxalobacter formigenes* en forma de cápsulas con capa entérica de tamaño 9, dos veces al día mediante sonda oral, con niveles de dosis de 10^6 y 10^7 ufc/g, respectivamente. La cápsula en la sonda fue seguida por un lavado con agua del grifo esterilizada en autoclave en los tres grupos. Después de un período inicial de aclimatación, todos los grupos fueron alimentados con una dieta convencional complementada con 1% de oxalato por gramo.

Los materiales del ensayo y el material testigo del placebo se prepararon siguiendo un protocolo estandarizado. Antes del uso, se analizaron muestras representativas de cada material del ensayo para confirmar la identidad, la pureza y la potencia de las cápsulas del ensayo, así como para confirmar la ausencia de *Oxalobacter formigenes* en el material testigo del placebo durante el período de la dosificación.

La dieta se restringió a dos períodos de 1 hora diaria, comenzando 15 minutos después de la sonda de la mañana y la tarde, para asegurar que las cápsulas se dosificaban a un estómago vacío. Se proporcionó agua a voluntad. El consumo de alimentos se registró dos veces al día. Se recogieron muestras de orina y de heces de 24 horas el Día 1 (antes de la dieta complementada con oxalato) y luego semanalmente. Los datos de la orina se analizaron a través de un análisis de medidas repetidas para estudiar las diferencias en los parámetros urinarios medios en todos los grupos de dosificación y a lo largo del tiempo. Un grupo de dosificación por término de interacción en el tiempo también se incluyó para evaluar cualquier posible interacción entre el grupo de dosificación y el tiempo.

Resultados:

Los resultados del análisis indicaban que había una interacción estadísticamente significativa entre los grupos de dosis y el tiempo ($p < 0,0001$) para todos los parámetros, lo que indica que el perfil de parámetros urinarios a lo largo del tiempo era diferente entre los grupos de dosificación. Para ayudar en la interpretación de esta interacción, se realizó un análisis de los datos por momentos para cada parámetro, para determinar si había una diferencia entre los

grupos de dosificación con respecto a los parámetros urinarios medios. Este análisis reveló que para los grupos de dosis baja y dosis más elevada, había un incremento en el oxalato urinario desde el inicio hasta el día 7 ($p < 0,0001$ ambos grupos), pero no hubo un incremento desde el día 7 hasta el día 28 ($p = 0,1094$ dosis baja y $p = 0,6910$ dosis alta). Para el grupo de placebo, sin embargo, hubo un aumento desde el inicio hasta el día 28 ($p = 0,0010$). También el día 21 y el día 28, los niveles de oxalato urinario medio en el Grupo I placebo eran significativamente más elevados que los de los grupos de dosis baja (Grupo II) y alta (Grupo III), pero no había ninguna diferencia significativa entre la dosis baja y la dosis alta. Por lo tanto, hubo una disminución significativa general de la excreción de oxalato urinario en las ratas tratadas, en comparación con las ratas que fueron alimentadas con el placebo.

Ejemplo 7

- 10 Efectos de la administración oral de *O. formigenes* sobre los niveles de oxalato urinario en pacientes que padecen hiperoxaluria primaria (HP).

Métodos:

- 15 Nueve pacientes con biopsia probada de hiperoxaluria primaria (HP) participaron en el estudio. Después de recibir unas evaluaciones iniciales de referencia, a todos los sujetos se les administró 1 g de pasta de células de *Oxalobacter formigenes* ($\geq 10^{10}$ ufc/gramo) entregado con sus comidas principales durante 4 semanas. Durante este período de tiempo, todos los pacientes continuaron tomando su medicación normal, se les pidió que comieran su dieta normal y mantuvieran su consumo normal de líquidos. A excepción de espinacas y ruibarbo, no estaban prohibidos los alimentos ricos en oxalato. La colonización de *Oxalobacter* y su influencia sobre los niveles plasmáticos y urinarios de oxalato se midieron las semanas 5 y 6. La eficacia del tratamiento se vigiló en términos de excreción de oxalato urinario en los sujetos con función renal normal y oxalato en plasma en sujetos con enfermedad renal en fase terminal (ESRD).

Resultados:

- 25 1. El tratamiento mostró una disminución significativa del oxalato urinario en los sujetos con función urinaria normal. El oxalato en plasma disminuyó significativamente en siete de los nueve sujetos. Hubo una disminución drástica del oxalato en plasma en dos sujetos con ESRD proporcionando una evidencia de la eliminación entérica del oxalato endógeno en el intestino, frente a un gradiente transepitelial.
- 30 2. El consumo de la cepa HC-1 de *O. formigenes* a dosificaciones en el intervalo de 0,25 g a 2,0 g por comida, fue bien tolerado por los voluntarios normales y sanos que recibieron dietas que contenían niveles medios o altos de oxalato. Una dosificación de pasta de células de 1,0 g dos veces al día durante 28 días, fue bien tolerada por los pacientes con HP.

Ejemplo 8

Tratamiento de pacientes de alto riesgo con composiciones de enzimas que reducen el oxalato.

- 35 Pacientes hiperoxalúricos primarios se alimentan con una o varias cápsulas con capa entérica que contienen una composición liofilizada de enzimas reductoras de oxalato, que comprende oxalato descarboxilasa y/u oxalato oxidasa, dos veces al día preferiblemente en las dos comidas principales del día. Se administra una cantidad eficaz de la composición enzimática. Por ejemplo, cada cápsula de tamaño 2 contiene aproximadamente 5-100 unidades de cada enzima.

Los sujetos con alto riesgo, se tratan con una administración continua durante un período de tiempo prolongado, probablemente un tratamiento de por vida. La colonización se reducirá cuando se detenga el tratamiento.

- 40 Las cápsulas de capa entérica de composiciones reductoras del oxalato que comprenden enzimas reductoras de oxalato, se pueden administrar a poblaciones de pacientes con alto riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato. Estas incluyen:

1. Las personas que producen demasiado oxalato endógeno debido, por ejemplo, a un defecto genético como hiperoxaluria primaria
- 45 2. Las personas con riesgo de urolitiasis con oxalato urinario elevado debido a una enfermedad entérica (hiperoxaluria entérica).
3. Las personas que tienen antecedentes de urolitiasis con múltiples episodios de litiasis idiopática.
4. Las personas con niveles elevados de oxalato sérico debido a una enfermedad renal en fase terminal.
5. Las personas con vestibulitis vulvar.
- 50 6. Las personas que tienen dietas con altos niveles de oxalato, tales como las que se encuentran en determinadas zonas y estaciones en la India y en Arabia Saudita. Esto también incluiría individuos que prefieren alimentos como

las espinacas que tienen un alto contenido en oxalato.

- 5 A cualquiera de 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 elevados de lo normal, se trata dos veces al día, con una cápsula diseñada para la entrega de su contenido en el intestino grueso, en donde la cápsula contiene aproximadamente una cantidad eficaz equivalente de una composición enzimática que tiene actividad enzimática similar a la proporcionada por 10^7 ufc's de una bacteria reductora de oxalato, tal como *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con la comida.

Ejemplo 9

Tratamiento de pacientes con poco riesgo con composiciones de enzimas reductoras de oxalato.

- 10 Composiciones con capa entérica, reductoras de oxalato que comprenden una mezcla de enzimas reductoras del oxalato, oxalato descarboxilasa y/u oxalato oxidasa, tales como las proporcionadas en cápsulas con capa entérica, también se pueden administrar a individuos en poblaciones con menor riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato o con riesgo de afecciones relacionadas con el oxalato. Una cantidad eficaz de la composición enzimática se administra con el régimen de tratamiento deseado.
- 15 Sería deseable que la administración de las composiciones a estos pacientes fuera durante períodos de tiempo más cortos cuando tienen riesgo de afecciones relacionadas con el oxalato o simultáneamente con materiales que contribuyen a una afección relacionada con el oxalato. Estos pacientes también podrían recibir tratamientos rutinarios con composiciones reductoras del oxalato, ya sea como suplementos o como adiciones a alimentos tales como la leche o el yogur. Estos incluyen personas que han perdido las poblaciones normales de bacterias que
- 20 degradan el oxalato debido a: tratamientos con antibióticos orales o episodios de enfermedad diarreica, o niños.
- Las personas o animales que tienen poco riesgo son tratados dos veces al día, con una cápsula diseñada para la entrega de su contenido en el intestino grueso, en donde la cápsula contiene una cantidad eficaz de la composición enzimática. Por ejemplo, cada cápsula de tamaño 2 contiene aproximadamente 5-100 unidades de cada enzima. La cápsula se administra preferiblemente con la comida.
- 25 Debe entenderse que los ejemplos y las realizaciones descritos en este documento solo tienen fines ilustrativos y que los expertos en la técnica podrán sugerir diversas modificaciones o cambios que los tengan en cuenta y se tienen que incluir en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende *Oxalobacter formigenes* viable para uso en el tratamiento de una afección relacionada con el oxalato seleccionada a partir del grupo que consiste en hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática de cálculos renales por oxalato de calcio (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal mediante una reducción de la concentración de oxalato en un ser humano, en donde la composición se administra más de una vez al día de forma continua cada día durante un periodo de meses o años.
5
2. Una composición para uso según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una o varias enzimas que degradan el oxalato, en donde la enzima o varias enzimas que degradan el oxalato son oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa, oxalil-CoA descarboxilasa o formil-CoA transferasa, o combinaciones de las mismas.
10
3. Una composición para uso según la reivindicación 2, en la que la enzima o varias enzimas que degradan el oxalato se obtienen a partir de cualquier fuente.
4. Una composición para uso según la reivindicación 3, en donde las enzimas que degradan el oxalato se producen de forma recombinante.
5. Una composición para uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende adicionalmente coenzimas, cofactores, sustratos y otros sustituyentes de las vías de degradación del oxalato.
15
6. Una composición para uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende una capa entérica.
7. Una composición para uso según la reivindicación 1, en la que la administración se realiza por las vías de administración orales.
20

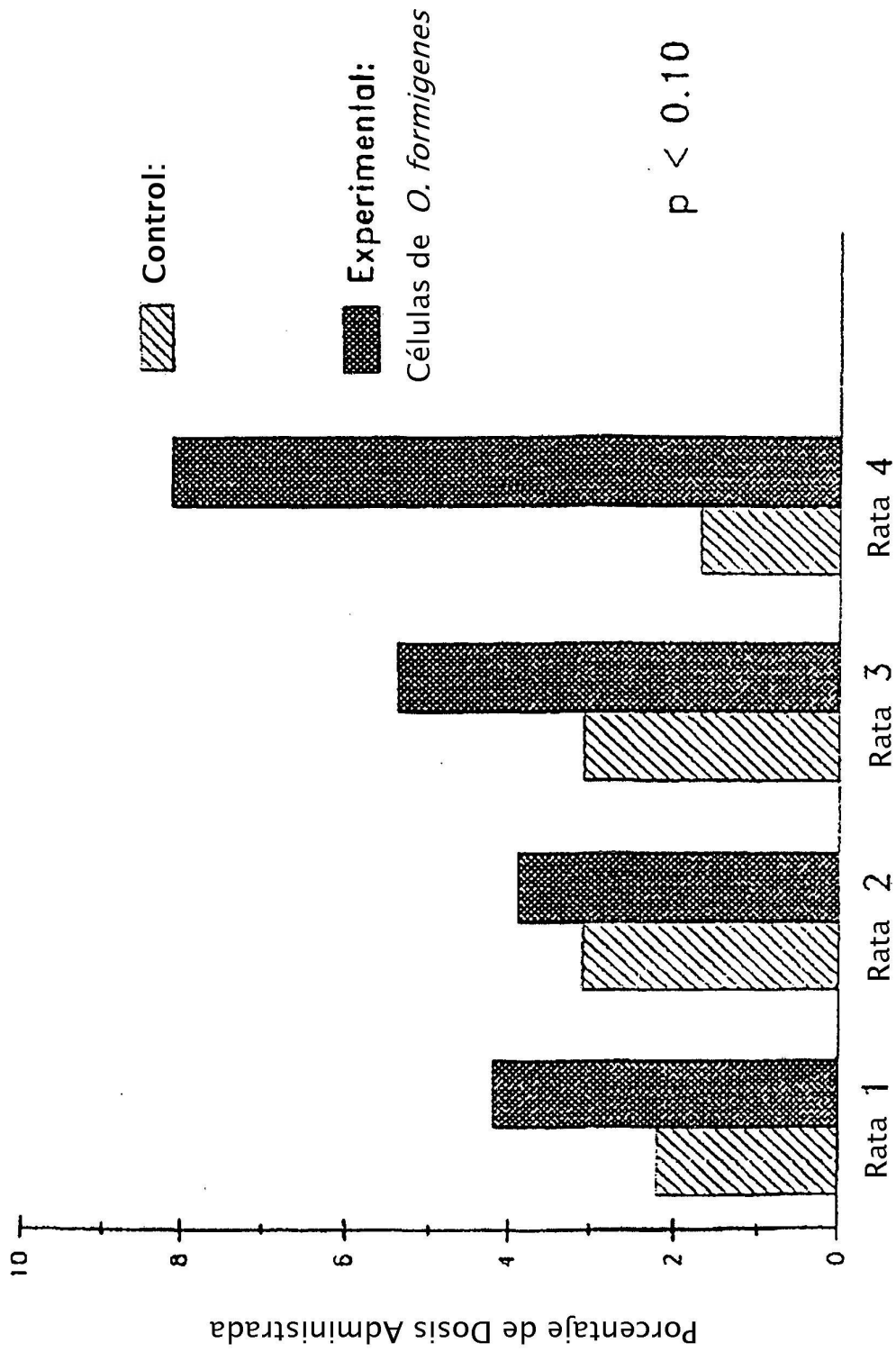


FIG. 1A

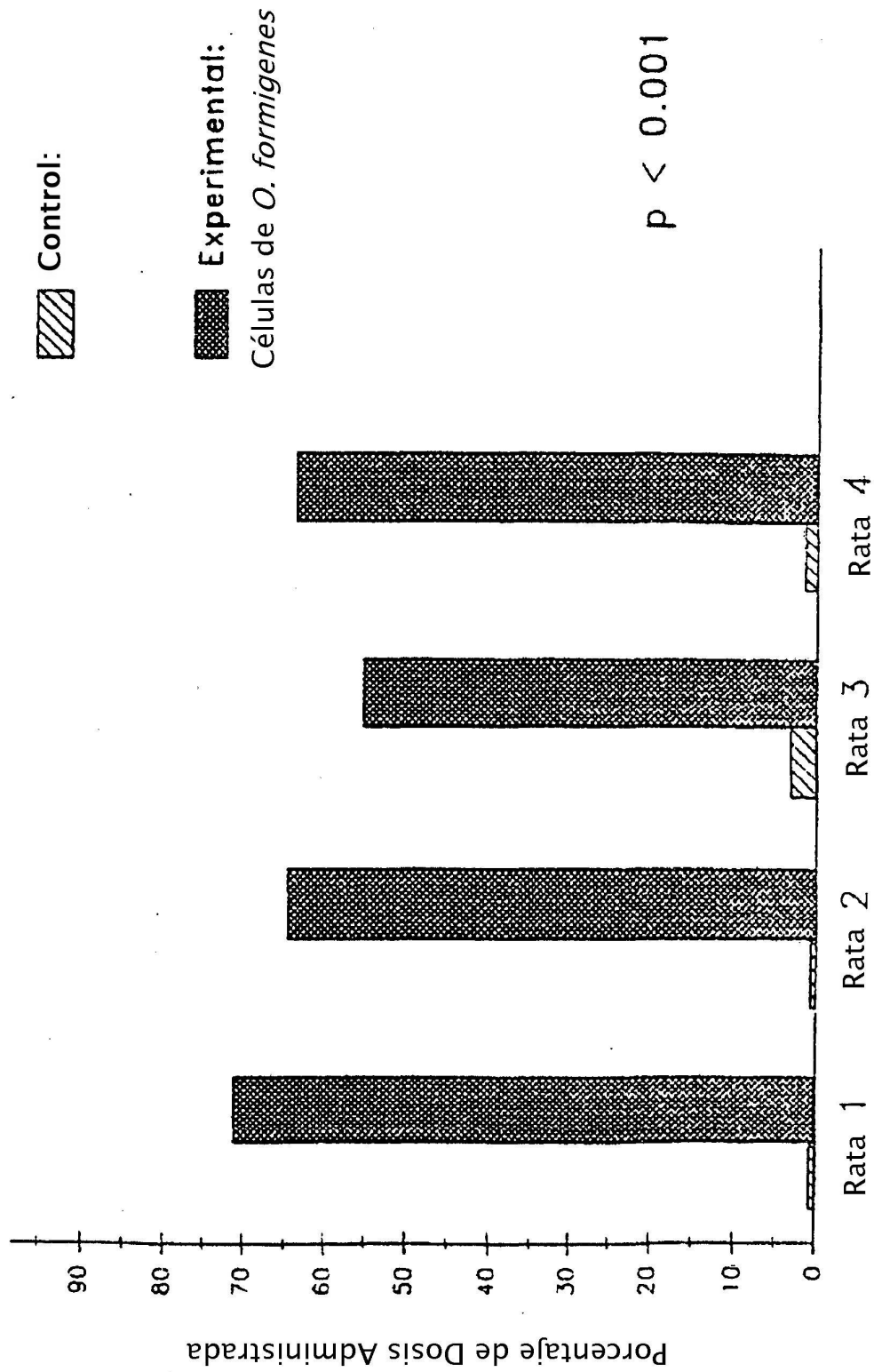


FIG. 1B

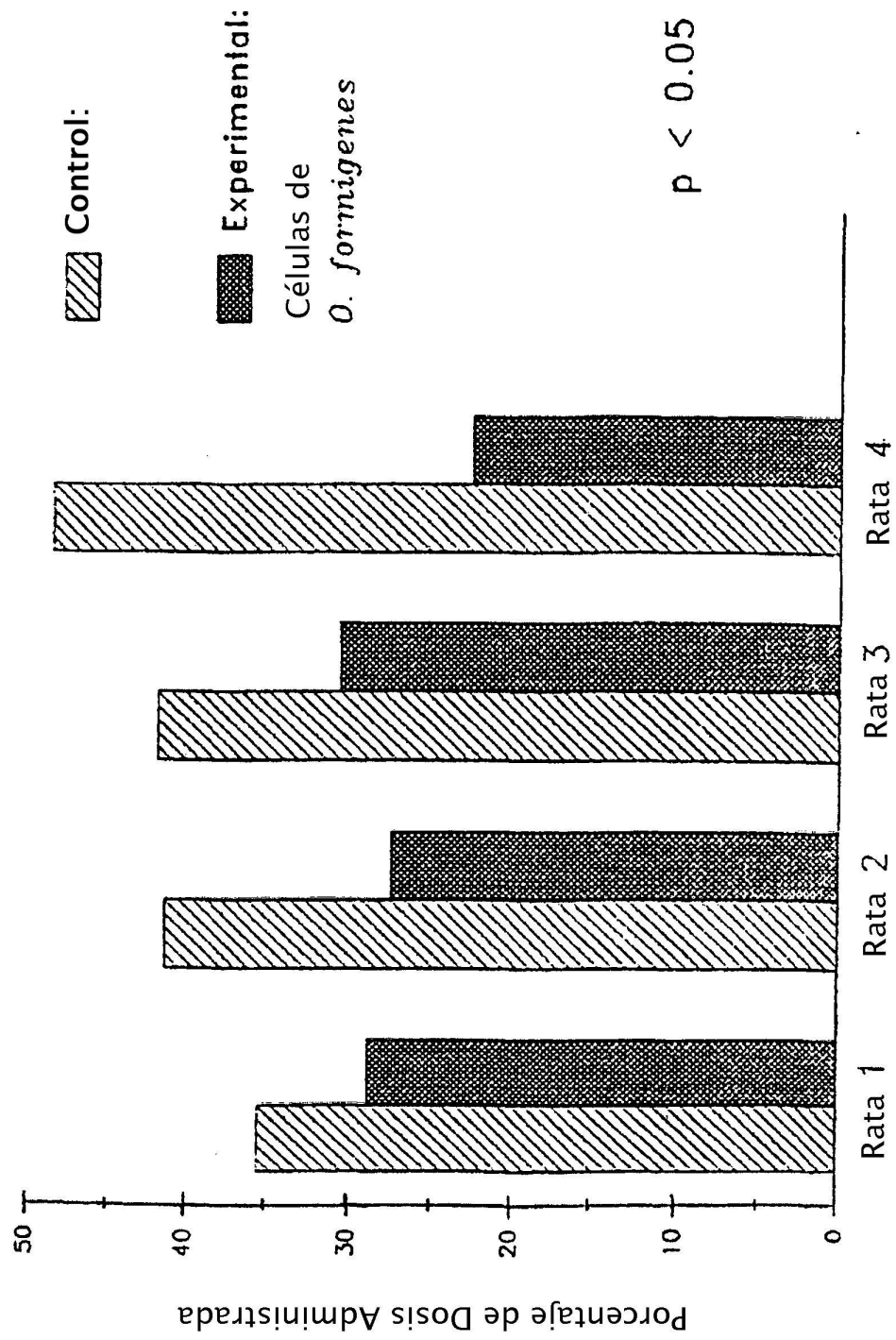


FIG. 2A

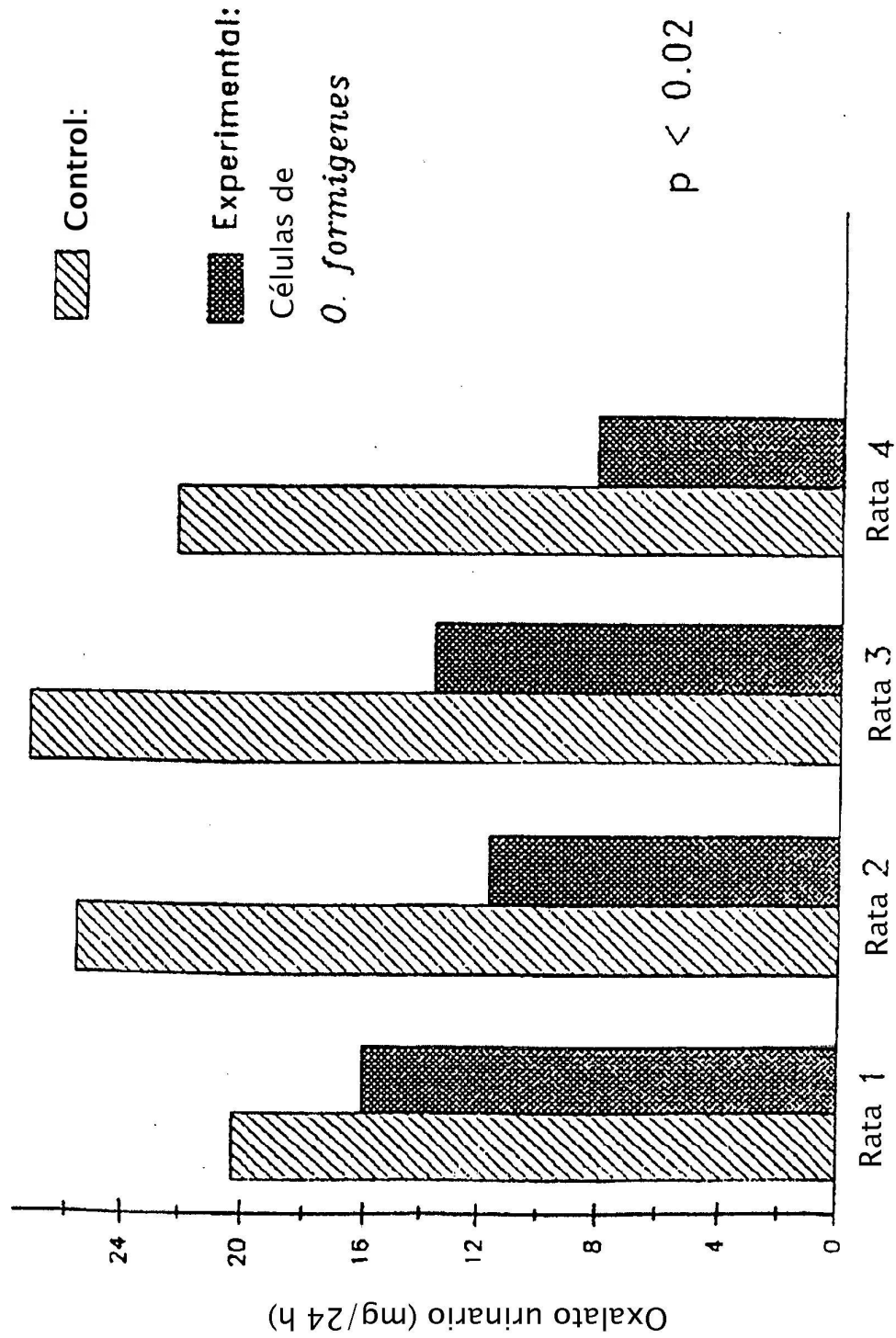


FIG. 2B

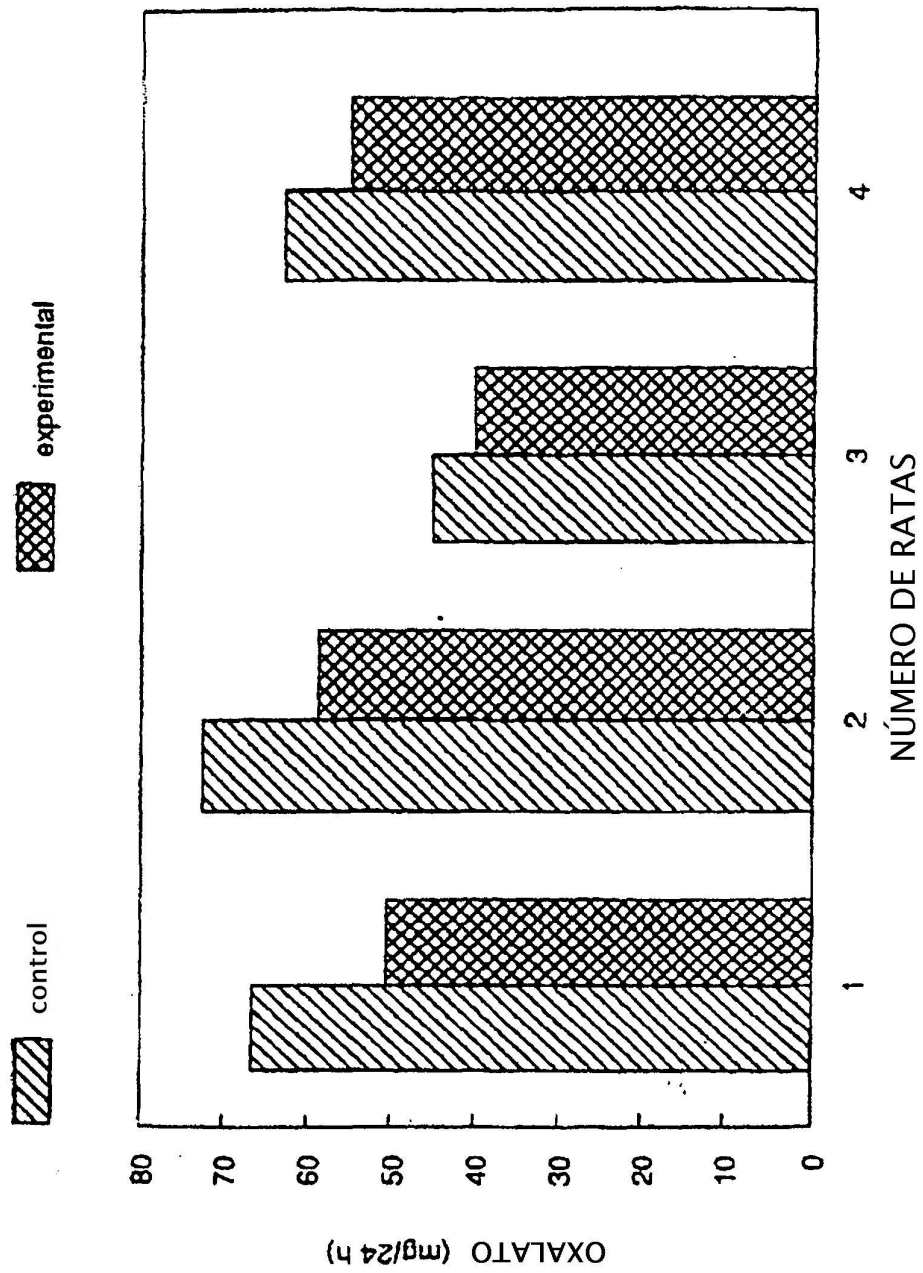


FIG. 2C

FIG. 3A

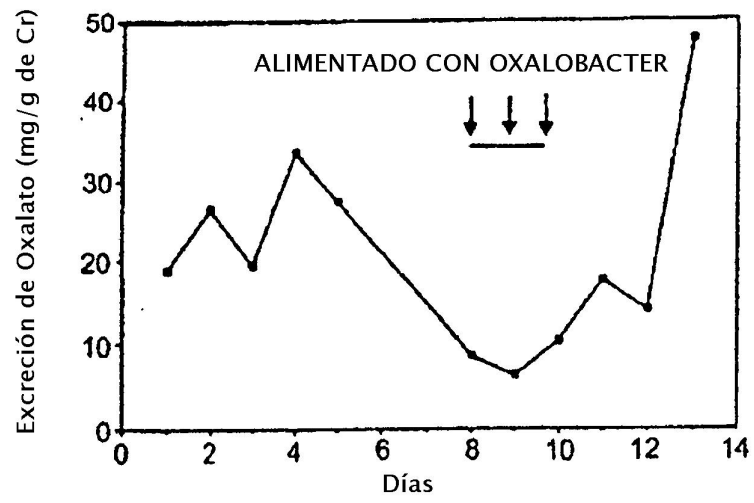


FIG. 3B

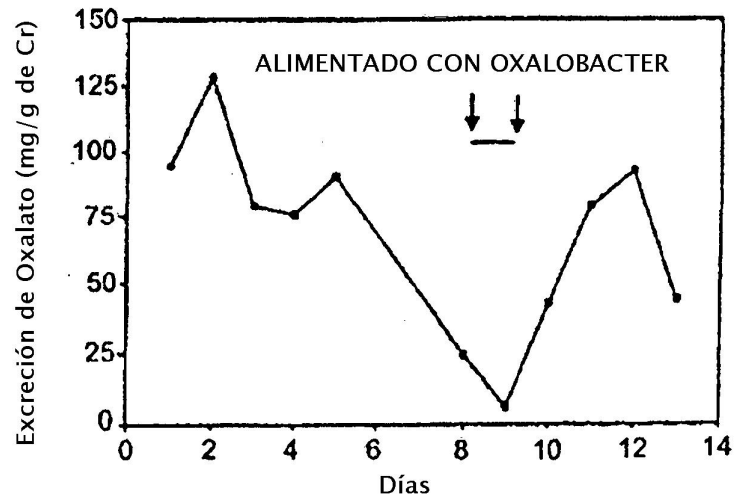


FIG. 3C

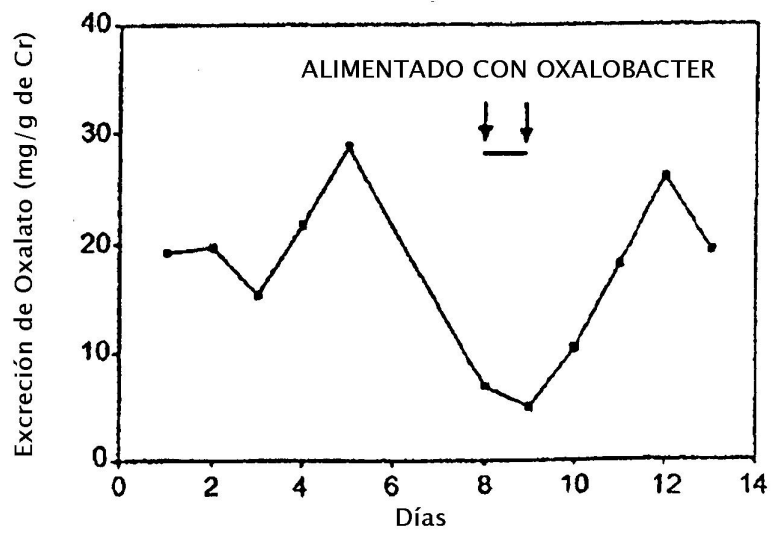


FIG. 4

Tabla-1: EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN CON <i>O.FORMIGENES</i> (FORMULACIÓN 1xOC-3) SOBRE LA EXCRECIÓN DE OXALATO URINARIO (MICROMOLES/DÍA) EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN OXALATO					
GRUPO N°	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
I (Placebo)	4.57 ± 0.82	13.97 ± 3.32	17.56 ± 6.24	22.75 ± 3.16	25.43 ± 8.04
II (Dosis baja)	4.16 ± 0.58	11.43 ± 1.78	12.82 ± 4.21	13.00 ± 2.11 ^a	13.63 ± 2.53 ^b
III (Dosis elevada)	4.04 ± 1.27	14.22 ± 3.00	12.74 ± 2.69	13.60 ± 3.29 ^a	14.57 ± 4.64 ^c
Grupo I = 1% de oxalato (HOD) + 0 ufc			^a p<0.0001 en comparación con el Grupo -I		
Grupo II = HOD + 10 ⁶ ufc de <i>O.formigenes</i>			^b p=0.0022 en comparación con el Grupo -I		
Grupo III = HOD + 10 ⁷ ufc de <i>O.formigenes</i>			^c p=0.0041 en comparación con el Grupo -I		