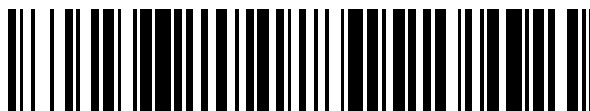


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 090**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/19</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/10</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/46</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/48</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/135</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2006 PCT/US2006/047909**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2007 WO07070677**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2006 E 06848618 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 1965816**

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

30 Prioridad:  
**14.12.2005 WO PCT/US2005/045457**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.08.2017**

73 Titular/es:  
**OXTHERA INTELLECTUAL PROPERTY AB  
(100.0%)  
13709 PROGRESS BOULEVARD, BOX 17  
ALACHUA FL 32615, SE**

72 Inventor/es:  
**SIDHU, HARMEET y  
KAUL, POONAM**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 628 090 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 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 métodos para tratar y prevenir estados relacionados con el oxalato. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones y métodos que comprenden bacterias degradadoras de oxalato o reductoras de oxalato.

**Antecedentes**

10 La enfermedad por cálculos en el riñón-tracto urinario (urolitiasis) es un problema de salud de enorme importancia en todo el mundo. La mayoría de los cálculos asociados con la urolitiasis están compuestos por oxalato de calcio solo o por oxalato de calcio y fosfato de calcio. Otras enfermedades también han sido asociadas con un exceso de oxalato. Éstas incluyen vulvodinia, oxalosis asociadas con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad de Crohn, y otras enfermedades entéricas.

15 El ácido oxálico y/o su sal, el oxalato, se encuentran en una gran variedad de alimentos y, por lo tanto, es un componente de muchos constituyentes de dietas humanas y animales. Después de comer alimentos que contienen cantidades elevadas de ácido oxálico se puede producir un aumento de la absorción de oxalato. Ya es sabido que alimentos como las espinacas y el ruibarbo contienen grandes cantidades de oxalato, pero multitud de otros alimentos y bebidas también contienen oxalato. Dado que el oxalato se encuentra en una variedad tan amplia de alimentos, es difícil formular dietas que sean bajas en oxalato y que además sean apetitosas. Además, con frecuencia, el cumplimiento de una dieta baja en oxalato es problemático.

20 También se produce metabólicamente oxalato endógeno mediante enzimas tisulares normales. El oxalato, que incluye el oxalato alimentario que es absorbido así como el oxalato producido metabólicamente, no es metabolizado por enzimas tisulares y por lo tanto ha de ser excretado. Esta excreción tiene lugar principalmente a través de los riñones. La concentración de oxalato en fluidos renales es crítica, y las concentraciones mayores de oxalato provocan un riesgo de formación de cristales de oxalato de calcio y por lo tanto de formación posterior de cálculos renales.

25 El riesgo de formación de cálculos renales gira en torno a una serie de factores que todavía no se comprenden por completo. La enfermedad por cálculos en el riñón o en el tracto urinario se produce hasta en un 12% de la población en países occidentales y aproximadamente un 70% de estos cálculos está compuesto por oxalato de calcio o por oxalato de calcio y fosfato de calcio. Algunos individuos (por ejemplo pacientes con enfermedades intestinales tales como la enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, o esteatorrea, y también pacientes que han sido sometidos a cirugía de derivación yeyunoileal) absorben una mayor cantidad del oxalato de sus dietas que otras personas. En estos individuos, la incidencia de urolitiasis por oxalato aumenta notablemente. La mayor incidencia de la enfermedad se debe a mayores niveles de oxalato en los riñones y la orina, y esto, el síndrome de hiperoxaluria más común en el hombre, se conoce como hiperoxaluria entérica. El oxalato también constituye un problema en pacientes con enfermedad renal en fase terminal y existen 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 un nivel elevado de oxalato urinario también interviene en la vestibulitis vulvar (vulvodinia).

30 Algunas bacterias que degradan oxalato han sido aisladas 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 comprobó que estas bacterias eran similares a bacterias reductoras de oxalato que habían sido aisladas de los contenidos intestinales de una serie de 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 oxalate in the gastrointestinal tracts of rats" *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1793-1797). Estas bacterias son diferentes a cualquier organismo previamente descrito y se les ha asignado tanto un nombre de especie nueva como un nombre de género nuevo (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 humanos portan poblaciones de *O. formigenes* en sus tractos intestinales (Allison, M. J., S. L. Daniel, N. A. Comick [1995] "Oxalate-degrading bacteria" In Khan, S. R. (ed.), *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 sido sometidas a cirugía de derivación yeyunoileal hay concentraciones bajas o una falta total de bacterias degradadoras de oxalato (Allison et al. [1986] "Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans" *J. Nutr.* 116:455-460). Además, determinados humanos y animales inferiores pueden mantener colonias de *O. formigenes* y no obstante tener niveles excesivos de oxalato por razones que no claramente comprendidas. Lo que se necesita son métodos para tratar a humanos y animales inferiores con el fin de reducir los niveles de oxalato en sus cuerpos para tratar o

prevenir estados relacionados con el oxalato. Algunos métodos deseables incluirían la administración de composiciones reductoras de oxalato. Ya se ha descrito una composición revestida entérica que contiene bacterias degradadoras de oxalato. El documento US20040234514A1 describe composiciones que contienen bacterias degradadoras de oxalato o enzimas que han sido liofilizadas o congeladas en forma de líquido o pasta y encapsuladas en una cápsula de gel u otra protección entérica. No obstante, los presentes inventores han detectado que existe la necesidad de desarrollar otras composiciones para administración oral concebidas para suministrar bacterias degradadoras de oxalato al intestino, es decir, dicha composición debería posibilitar el paso de las bacterias degradadoras de oxalato a través del estómago hasta el intestino sin ninguna pérdida de actividad durante el paso por el estómago. Además existe la necesidad de desarrollar composiciones que también tengan un período de validez aceptable bajo condiciones de almacenamiento.

### Compendio de la invención

La presente invención comprende composiciones y métodos para tratar y prevenir estados relacionados con el oxalato. Las composiciones de la presente invención comprenden composiciones farmacéuticas que incluyen *Oxalobacter formigenes* que reducen el oxalato. Más particularmente, la presente invención proporciona una composición para administración oral a un humano o un animal inferior, comprendiendo la composición un vehículo de administración oral que incluye una composición degradadora de oxalato que comprende a) de un 3% a un 25% de bacterias degradadoras de oxalato, b) de un 1,5% a un 6% de un disacárido, c) de un 45% a un 60% de una maltodextrina, d) de un 4% a un 6% de un alginato, y e) de un 20% a un 35% de una oligofruktosa; para suministrar bacterias degradadoras de oxalato a los intestinos de un humano o un animal inferior después de la administración oral, siendo las bacterias degradadoras de oxalato *Oxalobacter formigenes*. La composición está concebida para tener un período de validez adecuado en almacenamiento y posibilita el suministro de las bacterias degradadoras de oxalato al intestino. La presente invención también considera la posibilidad de añadir una o más enzimas degradadoras de oxalato adecuadas además de las bacterias en la composición, siempre que la enzima sea activa en el entorno intestinal, tal como, por ejemplo, un pH de aproximadamente 6,8 o más. Actualmente, según el leal saber y entender de los inventores, únicamente la enzima oxalil CoA descarboxilasa nativa es activa con dicho pH, pero esta enzima también requiere formil CoA transferasa para activar el oxalato en oxalil CoA, un sustrato de oxalil CoA descarboxilasa. En el futuro se podrán desarrollar enzimas modificadas. El uso de una enzima purificada ofrecerá ventajas adicionales con respecto a la actividad, pureza, etc. Las composiciones proporcionadas por la presente invención son suficientemente estables y están formuladas para evitar cualquier liberación de su contenido durante el paso a través del estómago con el fin de evitar cualquier degradación sustancial de las bacterias mientras éstas se encuentran en el estómago.

Los métodos de la presente invención comprenden la administración de las composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir estados relacionados con el oxalato, y métodos para producir estas composiciones farmacéuticas. Una realización comprende métodos que reducen el riesgo de desarrollar trastornos relacionados con el oxalato mediante la reducción de la cantidad de oxalato en el tracto gastrointestinal. Esta reducción en el tracto gastrointestinal conduce a una reducción en los niveles de oxalato sistémico, promoviendo de este modo una buena salud.

En una realización de la invención en cuestión se logra una reducción de la absorción de oxalato suministrando bacterias degradadoras de oxalato al tracto gastrointestinal.

Estas bacterias son *Oxalobacter formigenes*. Estas bacterias utilizan oxalato como sustrato. Esta utilización reduce la concentración de oxalato soluble en el intestino y, por lo tanto, la cantidad de oxalato disponible para absorción. Una reducción de oxalato en el tracto gastrointestinal también puede conducir a una eliminación de oxalato del sistema circulatorio. Los métodos de la presente invención consideran una reducción global de la carga de oxalato en un individuo.

En una realización específica, la invención en cuestión proporciona métodos y composiciones para el suministro de *O. formigenes* viables a los tractos gastrointestinales de personas que presentan un riesgo elevado de enfermedad relacionada con el oxalato. Las bacterias eliminan oxalato del tracto intestinal, reduciendo de este modo la cantidad de oxalato disponible para absorción y conduciendo a un aumento de la excreción de oxalato de la sangre en los intestinos.

Las composiciones comprenden los microbios que degradan oxalato, y producen enzimas que confieren a estos microbios la capacidad de degradar oxalato.

Estos microbios o enzimas pueden ser proporcionados en composiciones que se proporcionan como composiciones y formulaciones farmacéuticas aquí presentadas, en donde los microbios o enzimas pueden ser proporcionados en formulaciones farmacéuticas que comprenden excipientes y otros soportes farmacéuticos conocidos en la técnica. Además, dichas composiciones farmacéuticas comprenden vehículos de administración, tales como polvos, cápsulas, píldoras, gránulos o comprimidos, para un suministro al tracto gastrointestinal de humanos o animales inferiores.

En los métodos y composiciones de la presente invención se pueden utilizar enzimas que desempeñan una función en la degradación de oxalato y que incluyen, pero no se limitan a, formil-CoA transferasa, oxalil-CoA descarboxilasa, oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa y otras enzimas, cofactores y coenzimas que son sustituyentes de rutas de degradación de oxalato o que intervienen en rutas metabólicas de oxalato, en particular en la reducción de oxalato.

5 La presente invención también comprende métodos y composiciones que incluyen enzimas para reducir los niveles de oxalato con el fin de tratar o prevenir estados relacionados con el oxalato. Por ejemplo, mediante la administración de enzimas que actúan degradando oxalato se logra una reducción de los niveles de oxalato. Estas enzimas pueden ser administradas como un material lisado celular. El material lisado celular está formado por un microorganismo que tiene función reductora de oxalato, *O. formigenes*. En una realización específica, las enzimas  
10 administradas son una o más de las enzimas de la presente invención, tales como oxalato descarboxilasa, oxalato oxidasa, formil-CoA transferasa y oxalil-CoA descarboxilasa, pero no se limitan a las mismas. Opcionalmente se pueden administrar factores adicionales que mejoran la actividad enzimática. Estos factores adicionales pueden ser, por ejemplo, oxalil CoA, MgCl<sub>2</sub>, y TPP (difosfato de tiamina, una forma activa de la vitamina B<sub>1</sub>). Las composiciones farmacéuticas que comprenden enzimas incluyen una o más enzimas y, opcionalmente, cofactores, coenzimas y  
15 otros agentes que aumentan la actividad enzimática, individualmente o en combinación, y se proporcionan junto con soportes y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención en cuestión se refiere a composiciones farmacéuticas y/o suplementos nutricionales para administración oral. Estas composiciones liberan los microbios degradadores de oxalato, o enzimas degradadoras de oxalato, en los intestinos de humanos o de animales inferiores. Las composiciones de la presente  
20 invención comprenden formulaciones farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención comprenden un sistema de administración de dosis que proporciona las composiciones a los lugares deseados, tal como el suministro de las composiciones al tracto gastrointestinal del receptor. Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas como un constituyente de alimentos tales como leche, carnes y yogur.

25 En otra realización de la invención en cuestión, mediante la administración de microorganismos, plantas y enzimas degradadores de oxalato, individualmente o en combinaciones, se logra una reducción de la absorción de oxalato en animales domesticados, agrícolas o exóticos con deficiencia de bacterias degradadoras de oxalato.

Los métodos de la presente invención comprenden el tratamiento o la prevención de estados relacionados con el oxalato en humanos y animales inferiores mediante la administración de una cantidad eficaz de composiciones reductoras de oxalato que comprenden uno o más microorganismos reductores de oxalato, una o más enzimas reductoras de oxalato o combinaciones y mezclas de los mismos. Los estados relacionados con el oxalato incluyen, pero no se limitan a, hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática por cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

### 35 Breve descripción de las figuras

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

La FIGURA 1B es un gráfico de 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.

40 La FIGURA 2C es un gráfico de oxalato excretado.

Las FIGURAS 3A-C son gráficos de oxalato excretado.

La FIGURA 4 es un gráfico de oxalato excretado.

La FIGURA 5 es un gráfico de UFC/cápsula en cápsulas revestidas en función del almacenamiento en semanas a 4 °C y -20 °C.

45 La FIGURA 6 es un gráfico que muestra pérdidas medias en cápsulas revestidas en función del almacenamiento en semanas a 4 °C y -20 °C.

La FIGURA 7 es un gráfico de pérdidas medias en cápsulas de gelatina frente a cápsulas de HPMC en función del tiempo en semanas.

50 La FIGURA 8 es un gráfico de pérdidas medias en cápsulas con revestimiento acuoso frente a cápsulas con revestimiento orgánico.

La FIGURA 9 es un gráfico de pérdidas medias clasificadas por tipo de revestimiento y de cápsula.

La FIGURA 10 es un gráfico de pérdidas medias con o sin Avicel®.

La FIGURA 11 es un gráfico de pérdidas medias en tubos de polipropileno frente a envases blíster.

La FIGURA 12 es un gráfico de pérdidas medias en tubos de polipropileno frente a envases blíster sin barras de error.

## 5 Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende métodos y composiciones para la reducción de oxalato. Las composiciones de la presente invención comprenden bacterias, pero en algunas realizaciones pueden contener microorganismos, enzimas, secuencias de polinucleótidos, vectores, células, plantas o animales capaces de reducir el oxalato. Algunas composiciones comprenden microorganismos capaces de reducir el oxalato. Estos microorganismos incluyen *Oxalobacter formigenes*.

Algunas composiciones también comprenden enzimas que son componentes de rutas de reducción de oxalato. Estas composiciones comprenden una o más enzimas y opcionalmente incluyen cofactores, coenzimas y otros factores necesarios o deseables para la actividad enzimática. Algunas composiciones comprenden una o más enzimas, que incluyen, pero no se limitan a, enzimas reductoras de oxalato y otras enzimas que intervienen en el metabolismo de oxalato que se encuentran en plantas, animales inferiores o humanos. Las composiciones comprenden una o más de las enzimas reductoras de oxalato aquí descritas. Tal como se utiliza aquí, el concepto "una o más enzimas" significa que puede estar presente un tipo de enzima, tal como formil-CoA transferasa, o que la composición presenta más de un tipo de enzima, tal como una composición que comprende, por ejemplo, oxalil CoA descarboxilasa y formil CoA transferasa; oxalato descarboxilasa y oxalato oxidasa, o una combinación de enzima de tipo silvestre y enzima mutante. Como es sabido en la técnica, el término no significa una molécula de enzima, sino múltiples moléculas de uno o más tipos de enzima.

Tal como se utilizan aquí, los conceptos "enzimas degradadoras de oxalato" y "enzimas reductoras de oxalato" son intercambiables y ambos se refieren a enzimas que intervienen en la reducción o la degradación de oxalato en cualquier organismo, o a fragmentos activos o proteínas recombinantes que comprenden fragmentos activos capaces de reducir o degradar oxalato.

Las composiciones de la presente invención también comprenden composiciones farmacéuticas que incluyen bacterias reductoras de oxalato viables, y opcionalmente excipientes o soportes farmacéuticos, en un vehículo de administración. Las composiciones también comprenden composiciones farmacéuticas que comprenden una o más enzimas reductoras de oxalato purificadas, que incluyen, pero no se limitan a, enzimas purificadas a partir de fuentes naturales de dichas enzimas, enzimas producidas de forma recombinante o producidas por síntesis, y opcionalmente excipientes o soportes farmacéuticos, en un vehículo de administración.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden vehículos de administración oral que incluyen, pero no se limitan a, polvos, cápsulas, píldoras, gránulos y comprimidos, que pueden estar revestidos para resistir entornos rigurosos tales como el estómago. Estos vehículos de administración oral se utilizan para suministrar bacterias reductoras de oxalato viables y enzimas en las dosis y métodos aquí descritos. Dichas composiciones farmacéuticas son estables. Las composiciones pueden proporcionar bacterias viables y, si procede, enzimas que presentan actividad durante al menos 12 meses, con una pérdida mínima de ufc (unidades formadoras de colonias) y de actividad enzimática.

Más específicamente, una composición de la invención puede ser una composición en donde el vehículo de administración oral comprende una cápsula de gel. En una realización específica, dicha cápsula de gel se refuerza adicionalmente para excluir la intrusión de jugos gástricos en la cápsula durante su tránsito a través del estómago. Se ha comprobado que un refuerzo adecuado consiste en precintar la cápsula de gel cosiendo los bordes de las dos partes de la cápsula con un material adecuado. Los presentes inventores han comprobado que, cuando la cápsula de gel está hecha de gelatina, un material de costura adecuado es gelatina y, cuando la cápsula de gel está hecha de hidroxipropilmetil celulosa (HPMC), un material de costura adecuado es la HPMC. También pueden resultar adecuadas algunas combinaciones o el uso de otros materiales con propiedades similares. Las bacterias degradadoras de oxalato presentes en una composición de la invención pueden estar en forma de una pasta celular, un polvo liofilizado, micropartículas o nanopartículas, emulsiones de micropartículas o nanopartículas, etc.

Una característica de una composición de la presente invención consiste en su capacidad para resistir el impacto negativo del entorno gástrico ácido (y también el impacto negativo de enzimas presentes en el estómago). Un método consiste en dotar a la composición de un revestimiento entérico. En estos casos, cuando una cápsula de gel está provista de un precinto, el revestimiento entérico se proporciona después del proceso de precintado. Los materiales de revestimiento entéricos adecuados son normalmente materiales poliméricos tales como, por ejemplo, materiales utilizados convencionalmente en la industria farmacéutica para producir revestimientos entéricos. Éstos incluyen materiales enumerados en Remington's Pharmaceutical Science, en particular derivados de celulosa, incluyendo acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa y acetato succinato de hidroxipropil metilcelulosa; polímeros de ácido metacrílico, incluyendo copolímeros de ácido metacrílico tales como Eudragit® L y S, disponibles de Röhm GmbH, Alemania; y acetato ftalato de polivinilo y similares.

En una composición de la presente invención, en donde la actividad degradadora de oxalato es proporcionada por una pasta celular, la composición degradadora de oxalato tiene un valor ufc/g de al menos de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$ , de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$ . Dicha pasta celular normalmente tiene un nivel más alto de ufc/g cuando no está en una composición de administración de la presente invención y cada etapa de proceso puede contribuir a una reducción del valor ufc/g de la composición final, lo que, por consiguiente, ha de ser tenido en cuenta durante la preparación. Normalmente, una composición degradadora de oxalato de la invención tiene un valor ufc/forma farmacéutica unitaria de aproximadamente  $5 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ , o de aproximadamente  $5 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$ .

Una composición de la invención está convenientemente en una forma farmacéutica unitaria, tal como, por ejemplo, cápsulas, sobres, comprimidos o similares. En una realización interesante, la composición está en forma de una cápsula. Los comprimidos también son interesantes, pero pueden tener un problema de reducción de la estabilidad y la actividad, en concreto el riesgo de perder actividad durante el proceso de producción de los comprimidos. Además, cualquier revestimiento que se haya de aplicar sobre la superficie del comprimido puede tener el riesgo de entrar en contacto directo con las bacterias y, de este modo, aumentar el riesgo de pérdida de actividad y estabilidad.

Tal como se demuestra en los ejemplos aquí incluidos, una composición proporcionada por la invención tiene una estabilidad de almacenamiento aceptable. Así, la pérdida de unidades formadoras de colonias de las bacterias degradadoras de oxalato en una composición de la invención después de 6 meses de almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  es de a lo sumo 3 log, tal como, por ejemplo, a lo sumo 2 log, a lo sumo 1 log o a lo sumo 0,5 log, y/o la pérdida de unidades formadoras de colonias de las bacterias degradadoras de oxalato en una composición de la invención después de 12 meses de almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  es de a lo sumo 3 log, tal como, por ejemplo, a lo sumo 2 log, a lo sumo 1 log o a lo sumo 0,5 log.

Adicional o alternativamente, la pérdida de unidades formadoras de colonias de las bacterias degradadoras de oxalato en una composición de la invención después de 6 meses de almacenamiento a  $-20^\circ\text{C}$  es de a lo sumo 2 log, tal como, por ejemplo, a lo sumo 1,5 log, a lo sumo 1 log o a lo sumo 0,5 log, y/o la pérdida de unidades formadoras de colonias de las bacterias degradadoras de oxalato en una composición de la invención después de 12 meses de almacenamiento a  $-20^\circ\text{C}$  es de a lo sumo 2 log, tal como, por ejemplo, a lo sumo 1,5 log, a lo sumo 1 log o a lo sumo 0,5 log.

La estabilidad aceptable también se puede expresar mediante la actividad enzimática. Así, una composición degradadora de oxalato de la presente invención tiene una actividad enzimática degradadora de oxalato/g de al menos de aproximadamente 2 mg de oxalato degradado/h a aproximadamente 2.500 mg de oxalato degradado/h, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 mg/h o de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/h.

En algunas situaciones está previsto que el suministro de dicha composición a los intestinos conduzca a la colonización del intestino con bacterias degradadoras de oxalato. Las bacterias pueden llegar a formar parte de la flora intestinal normal, tal como muestran los análisis de la materia fecal después de interrumpir el tratamiento con bacterias reductoras de oxalato. En algunos casos, la colonización del intestino es transitoria. La experiencia previa en estudios en humanos ha mostrado que las bacterias podían ser detectadas en la muestra de heces una semana después de interrumpir el tratamiento con bacterias reductoras de oxalato, pero no estaban presentes en una muestra recogida dos semanas después del tratamiento.

Una composición de la presente invención se presenta normalmente como una forma farmacéutica sólida. Por consiguiente, es adecuado que la composición reductora de oxalato comprenda un polvo liofilizado. Con este fin, la presencia de un agente criopreservante es adecuada, en especial durante la preparación de la composición. Algunos agentes criopreservantes adecuados con carbohidratos, aminoácidos, polímeros, polioles, y sales de ácidos orgánicos. En una realización específica, el agente criopreservante es un disacárido tal como, por ejemplo, trehalosa.

El agente criopreservante puede ser un carbohidrato seleccionado entre el grupo consistente en trehalosa, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa, sacarosa, diglucosa, rafinosa, almidón, incluyendo almidón de maíz, almidón de patata, almidón de arroz, almidón de tapioca y almidón de trigo, o puede ser un alcohol de azúcar, tal como manitol, xilitol, sorbitol, inositol y maltitol.

Como es sabido en la industria farmacéutica, en la formulación de composiciones farmacéuticas se pueden utilizar excipientes farmacéuticamente aceptables con el fin de ajustar las propiedades técnicas de las composiciones (por ejemplo la fluidez de un polvo para rellenar la cápsula o la máquina de producción de comprimidos; adición de agentes de carga para aumentar la masa de la forma farmacéutica individual; adición de agentes ligantes, materiales de relleno, diluyentes, etc.). En la presente invención, normalmente es necesario añadir excipientes para aumentar la masa de cada forma farmacéutica. En una realización interesante, el excipiente también puede tener otras propiedades adecuadas, tales como, por ejemplo, aumentar la fluidez del polvo que se ha de rellenar por ejemplo en cápsulas, aumentar la estabilidad, o puede actuar como un agente criopreservante o un deshumectador. Por consiguiente, en una realización, una composición de la invención comprende uno o más excipientes que son

excipientes farmacéuticamente aceptables. En particular, dicho excipiente puede ser un agente de carga. En algunos casos, el excipiente también tiene propiedades criopreservantes.

5 Los ejemplos de dichos excipientes utilizables en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, maltodextrina, rafilose/oligofructosa y alginato, o partir de gelatina, derivados de celulosa, lactosa o almidones. En una realización específica, el excipiente es un alginato, tal como, por ejemplo, una sal de metal alcalino o de metal alcalinotérreo de ácido algínico, incluyendo alginato de sodio, alginato de potasio o alginato de calcio.

10 Una composición de la invención también puede comprender uno o más deshumectadores, tales como, por ejemplo, celulosas, derivados de celulosas, sílice y derivados de sílice. Algunos ejemplos específicos son celulosa, celulosa microcristalina, carboximetil celulosa de sodio, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, o una sílice incluyendo un dióxido de silicio pirogénico. En particular, la celulosa microcristalina puede ser Avicel<sup>TM</sup> y/o el dióxido de silicio pirogénico puede ser Cabosil<sup>TM</sup>.

Se considera que el área superficial específica de uno o más deshumectadores es importante para su función. Por consiguiente, en una realización, el o los deshumectadores tienen un área superficial específica de al menos 0,6 m<sup>2</sup>/g, tal como, por ejemplo, al menos 0,7 m<sup>2</sup>/g, o al menos 1 m<sup>2</sup>/g.

15 El vehículo de administración comprende de aproximadamente un 3% a aproximadamente un 25% de bacterias degradadoras de oxalato, b) de aproximadamente un 1,5% a aproximadamente un 6% de un disacárido, c) de aproximadamente un 45% a aproximadamente un 60% de una maltodextrina, d) de aproximadamente un 4% a aproximadamente un 6% de un alginato, y e) de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 35% de una oligofructosa.

20 En los casos en los que se emplea un polvo liofilizado, el polvo normalmente tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 2.000 micras, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.500 micras, de aproximadamente 600 micras a aproximadamente 1.000 micras, tal como aproximadamente 800 micras.

25 La composición administrada está normalmente en forma sólida, por ejemplo en forma de partículas o en una forma farmacéutica sólida, por ejemplo en forma de sobres, cápsulas o comprimidos (por ejemplo las partículas se procesan adicionalmente en una forma farmacéutica adecuada mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica). Con este fin se pueden añadir excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados, tales como, por ejemplo, materiales de relleno, ligantes, desintegrantes, colorantes, saborizantes, agentes reguladores del pH, estabilizadores, amortiguadores, agentes solubilizantes, conservantes, cofactores para las enzimas, etc. Además se pueden añadir una o más sustancias terapéuticas y/o profilácticas y/u otras enzimas, cofactores, sustratos, coenzimas, minerales y otros agentes que son útiles en la reducción de oxalato.

30 Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen: dextrinas, maltodextrinas, dextrosa, fructosa, glucosa, lactosa, derivados de celulosa incluyendo carboximetilcelulosa calcio, carboximetilcelulosa sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), celulosa microcristalina (por ejemplo diversas clases de Avicel®), almidones o almidones modificados (por ejemplo almidón de patata, almidón de maíz, almidón de arroz, almidón pregelatinizado), acetato de polivinilo, polivinilpirrolidona, agar, alginato de sodio, croscarmelosa de sodio, hidrogenofosfato de calcio, fosfato de calcio (por ejemplo fosfato de calcio básico, hidrogenofosfato de calcio), sulfato de calcio, carboxialquilcelulosa, dextranos, fosfato de calcio dibásico, gelatina, goma arábiga, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, polietilenglicol, óxido de polietileno, y como lubricantes: talco, 40 estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, aceites vegetales hidrogenados y similares.

Los métodos de la presente invención comprenden la preparación y el uso de las composiciones de la presente invención. Los métodos también comprenden la preparación de composiciones que comprenden materiales lisados celulares que tienen actividad reductora de oxalato, composiciones que comprenden una o más enzimas que tienen actividad reductora de oxalato, y composiciones que comprenden constituyentes alimentarios preparados a partir de 45 plantas o microorganismos que tienen niveles de oxalato modificados. Los métodos también comprenden la preparación de composiciones farmacéuticas orales estables que comprenden bacterias reductoras de oxalato viables.

Los métodos de la presente invención comprenden el uso de las composiciones de la presente invención. La presente invención comprende métodos de administración de las composiciones de la presente invención a plantas o animales para modificar los niveles de oxalato de la planta o animal. Los métodos también incluyen métodos de 50 complementación alimentaria de tal modo que las composiciones de la presente invención se administran a plantas o animales en fuentes de alimento o de fertilizante o de forma concurrente con fuentes de alimento o de fertilizante para modificar los niveles de oxalato en el alimento, durante la digestión del alimento o durante la absorción por las plantas.

55 Los métodos de la presente invención comprenden métodos para tratar o prevenir estados relacionados con el oxalato. Los métodos comprenden la administración de las composiciones de la presente invención en cantidades eficaces para modificar el nivel de oxalato en un organismo. Estos métodos son eficaces para el tratamiento de estados relacionados con el oxalato en humanos y animales inferiores, que incluyen, pero no se limitan a,

hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática por cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, esteatorrea, pacientes que han sido sometidos a cirugía gastrointestinal, tal como cirugía de derivación yeyunoileal, tratamiento con antibióticos, y colitis ulcerosa.

La invención en cuestión está relacionada con la introducción de composiciones que comprenden una o más bacterias y/o enzimas degradadoras de oxalato en un tracto gastrointestinal humano o animal, donde la actividad de las composiciones reduce la cantidad y/o la concentración de oxalato presente, reduciendo de este modo el riesgo de enfermedad debida a oxalato.

La presente invención comprende métodos y composiciones para el tratamiento y la prevención de estados relacionados con el oxalato en humanos y animales inferiores. Un método para tratar estados relacionados con el oxalato comprende la administración de una composición que incluye una o más enzimas reductoras de oxalato. Estas composiciones se pueden administrar una o más veces al día durante uno o más días, dependiendo de la gravedad del estado relacionado con el oxalato o de la cantidad de oxalato en el intestino o los fluidos corporales del humano o el animal inferior. Los tratamientos pueden continuar siempre que el humano o el animal inferior presenten niveles de oxalato no deseados. Por ejemplo, la composición enzimática puede ser administrada una o más veces al día durante un intervalo de tiempo que va desde un día hasta años. Para humanos o animales inferiores con estados crónicos relacionados con el oxalato, la composición puede ser administrada durante todo el resto de la vida del humano o del animal inferior.

Los métodos para tratar y prevenir estados relacionados con el oxalato pueden comprender la administración de una composición que incluye una cantidad eficaz de enzimas reductoras de oxalato o de actividad enzimática para la reducción de oxalato. Una cantidad eficaz comprende una cantidad de unidades de actividad de la actividad enzimática reductora de oxalato que reducirá una parte del oxalato presente, o un nivel de unidades de actividad de la actividad enzimática reductora de oxalato que iniciará una reducción en 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. La cantidad de unidades de actividad de la actividad enzimática reductora de oxalato que puede ser utilizada en una composición de dosis única puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, de aproximadamente 5 unidades a 100 unidades, de 0,05 a 50 unidades, de 0,5 a 500, de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 50 unidades, de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 5 unidades, de aproximadamente 1 unidad a aproximadamente 100 unidades, de aproximadamente 25 unidades a aproximadamente 50 unidades, de aproximadamente 30 unidades a aproximadamente 100 unidades, de aproximadamente 40 unidades a aproximadamente 120 unidades, de aproximadamente 60 unidades a aproximadamente 15 unidades, de aproximadamente 50 unidades a aproximadamente 100 unidades, de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 500 unidades, de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 300 unidades, de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 400 unidades, de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, de aproximadamente 1.000 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, de aproximadamente 2.500 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, de aproximadamente 0,001 unidades a aproximadamente 2.000 unidades, y todos los intervalos incluidos dentro de éstos. Las composiciones pueden incluir además otras enzimas, cofactores, sustratos, coenzimas, minerales y otros agentes útiles en la reducción de oxalato. Una unidad de la enzima es la cantidad de enzima que degradará un micromol de oxalato por minuto a 37 °C.

En una realización específica, la invención en cuestión está relacionada con métodos para la preparación y la administración de composiciones que comprenden células de bacterias degradadoras de oxalato de la especie *Oxalobacter formigenes* al tracto gastrointestinal humano o animal, donde la actividad de los microbios reduce la cantidad de oxalato presente en el intestino, causando 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 métodos para la preparación y la administración de composiciones que comprenden una o más enzimas degradadoras de oxalato derivadas de cualquier fuente, al tracto gastrointestinal humano o animal, donde la actividad de la o las enzimas reduce la cantidad de oxalato presente en el intestino y conduce a una reducción de concentraciones de oxalato en los riñones y en otros fluidos celulares. Las células o enzimas introducidas degradan el oxalato y las bacterias se pueden reproducir o no en el hábitat intestinal de tal modo que la progenie de las células iniciales colonizan el intestino y continúan eliminando oxalato. La presencia de bacterias reductoras de oxalato reduce el riesgo de formación de cálculos renales así como otras complicaciones patológicas causadas por un exceso de ácido oxálico. En una realización para uso humano, las cepas específicas de *O. formigenes* utilizadas son cepas aisladas de muestras intestinales humanas. Por lo tanto, las cepas forman parte de la flora bacteriana intestinal humana normal. Sin embargo, dado que no están presentes en todas las personas, o que están presentes en cantidades insuficientes, la introducción de estos organismos corrige una deficiencia existente en algunos humanos.

Aunque sin ánimo de apoyar ninguna teoría en particular, se cree que el enriquecimiento del contenido de los intestinos con una o más especies de bacterias degradadoras de oxalato o de enzimas reductoras de oxalato provoca una reducción de oxalato en el contenido intestinal. Algunas de las bacterias o las enzimas administradas llevan a cabo una degradación de oxalato en el sitio de absorción o cerca del mismo. La actividad de las bacterias o



de las enzimas administradas reduce el nivel de absorción de oxalato alimentario. Una reducción de la concentración de oxalato en los intestinos también puede conducir a una eliminación de oxalato de células y de la circulación general. Más específicamente, una reducción de la concentración de oxalato en los intestinos también puede conducir a un aumento de la secreción de oxalato en el intestino desde la sangre y, por lo tanto, reduce la cantidad de oxalato que ha de ser excretado en la orina. Por lo tanto, los métodos de la invención en cuestión para administrar bacterias reductoras de oxalato o enzimas reductoras de oxalato pueden ser utilizados para tratar o prevenir estados relacionados con el oxalato, tales como la hiperoxaluria primaria además del tratamiento de la hiperoxaluria alimentaria. Las composiciones y los métodos de la invención en cuestión son particularmente ventajosos para favorecer niveles de oxalato saludables en humanos y en animales inferiores.

Las composiciones farmacéuticas y nutracéuticas para la introducción de bacterias degradadoras de oxalato o de una o más enzimas degradadoras de 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 que pueden ser suministradas mediante un vehículo de administración oral, tal como mediante una cápsula de gel u otro vehículo de protección entérica. El material de la cápsula de gel es preferiblemente un material polimérico que forma una píldora o cápsula de administración que es resistente a la degradación por la acidez gástrica y las enzimas del estómago, pero que se degrada con liberación concomitante de composiciones degradadoras de oxalato por el pH más alto y el contenido de ácido biliar en el intestino. Después, la composición liberada convierte el oxalato presente en el intestino en productos inocuos. También es posible combinar soportes farmacéuticos o nutracéuticos con las bacterias o las enzimas. Éstos pueden incluir, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato o con bicarbonato. Los métodos de la presente invención comprenden la administración de composiciones reductoras de oxalato al tracto gastrointestinal de humanos o animales inferiores.

Las composiciones reductoras de oxalato que comprenden una o más bacterias reductoras de oxalato o una o más enzimas reductoras de oxalato, o combinaciones de bacterias y enzimas, que han de ser administradas pueden ser suministradas como cápsulas o microcápsulas concebidas para proteger la composición de efectos adversos del ácido del estómago. Se pueden utilizar uno o más de diversos métodos de revestimiento protector entérico. Las descripciones de estos revestimientos entéricos incluyen el uso de acetato ftalato de celulosa (AFC) (Yacobi, A., E. H. Walega, 1988, Oral sustained release formulations: Dosing and evaluation, Pergammon Press). La patente de los EE.UU. n° 5,286,495 incluye otras descripciones de tecnología de encapsulación. Las composiciones de la invención en cuestión también pueden ser formuladas como supositorios.

Otros métodos de administración de estas composiciones, que comprenden uno o más microorganismos, una o más enzimas reductoras de oxalato o combinaciones y mezclas, a los intestinos incluyen la adición de las composiciones directamente a fuentes de alimento. La o las bacterias se pueden añadir como células recién cosechadas, células liofilizadas o células protegidas de otro modo. La o las enzimas se pueden añadir como proteínas liofilizadas, composiciones enzimáticas encapsuladas o microencapsuladas, enzimas en complejo con otros materiales para mantener la actividad de las enzimas, y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica para añadir enzimas activas a composiciones. Algunos alimentos pueden ser complementados con composiciones degradadoras de oxalato sin que ello afecte a su sabor o su aspecto. Estos alimentos pueden ser, por ejemplo, yogur, leche, manteca de cacahuete o chocolate. Después de su ingestión, cuando los productos alimenticios están siendo digeridos y absorbidos por los intestinos, las composiciones degradadoras de oxalato, que incluyen 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 sanguíneo.

Tal como se ha indicado más arriba, una variedad de alimentos pueden ser complementados con composiciones degradadoras de oxalato. Los métodos para producir dichos alimentos que contienen composiciones reductoras de oxalato incluyen la mezcla de un material alimenticio con una composición reductora de oxalato. Por ejemplo, los microbios reductores de oxalato se pueden cultivar en medios y después separar de los medios, por ejemplo, mediante centrifugación. El cultivo de microbios degradadores de oxalato se puede mezclar con cultivos de yogur tradicionales obtenidos a partir de un producto lácteo comercial. Esta mezcla de cultivos se puede añadir después a la mezcla previa de yogur lácteo básico sin que ello influya negativamente en el sabor o la consistencia. Después, el yogur se puede producir y envasar utilizando procedimientos comerciales tradicionales. En otro ejemplo, las bacterias degradadoras de oxalato se pueden añadir a yogures ya producidos. En un método similar, una composición reductora de oxalato que comprende una o más enzimas reductoras de oxalato se puede añadir al cultivo bacteriano de yogur o al producto alimenticio de yogur.

Otro ejemplo de los métodos de la presente invención consiste en añadir la composición reductora de oxalato a leche después de que ésta haya sido homogeneizada y esterilizada. Este método se utiliza actualmente en la industria láctea para añadir organismos *Lactobacillus acidophilis* a leche. Cualquier fuente de alimento que contenga bacterias puede ser utilizada complementándola con bacterias degradadoras de oxalato. Estos productos alimenticios incluyen queso o productos cárnicos a los que se les añaden microorganismos deseables durante el procesamiento. Los alimentos que comprenden composiciones reductoras de oxalato que incluyen enzimas reductoras de oxalato no están limitados a aquellos alimentos que comprenden microorganismos, sino que incluyen cualquier fuente de alimento a la que se le puedan añadir enzimas activas. Los materiales comúnmente considerados como materiales alimenticios pueden ser utilizados como material de soporte para las enzimas, de modo que las enzimas son activas sobre el oxalato presente en el material alimenticio en cualquier etapa de

producción desarrollo del material alimenticio, o en cualquier etapa de la digestión por el humano o el animal inferior, o sobre el oxalato presente en el intestino.

En una realización, las cepas de bacterias *O. formigenes* utilizadas de acuerdo con la invención en cuestión son cultivos puros que se aíslan de cultivos anaeróbicos que han sido inoculados con diluciones de contenidos intestinales de humanos normales o, para uso con animales, de animales normales. Se puede utilizar un medio que contiene oxalato de calcio especial que permite la detección de colonias degradadoras de oxalato. En una realización, la pureza de cada cepa se puede asegurar mediante el uso de al menos dos etapas de clonación repetitiva subsiguientes.

Las cepas de *O. formigenes* útiles de acuerdo con la invención en cuestión han sido caracterizadas sobre la base de diversos ensayos, que 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*" Abstr. to the 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, ambos existentes dentro de la presente descripción de la especie). Las cepas utilizadas han sido seleccionadas sobre la base de la capacidad de degradación de oxalato y las pruebas de la capacidad para colonizar el tracto intestinal humano. Las cepas seleccionadas incluyen representantes de los dos Grupos I y II de la especie.

Una realización de la presente invención implica procedimientos para la selección, la preparación y la administración de las bacterias degradadoras de oxalato apropiadas a una diversidad de individuos. Principalmente, pero no de forma exclusiva, éstos son personas o animales que no albergan estas bacterias en sus intestinos. Estas personas o animales no colonizados o débilmente colonizados se identifican utilizando análisis que permiten una detección rápida y definitiva de *O. formigenes* incluso cuando los organismos están en concentraciones relativamente bajas en poblaciones bacterianas mixtas tales como las que se encuentran en el contenido intestinal. Los métodos de la invención en cuestión también pueden ser utilizados para tratar a individuos o animales cuyas bacterias degradadoras de oxalato se han agotado, por ejemplo debido a un tratamiento antibiótico o en situaciones posoperatorias. Los métodos de la invención en cuestión también pueden ser utilizados para tratar a individuos o animales que tienen colonias de bacterias degradadoras de oxalato pero que siguen teniendo niveles insalubres de oxalato, por ejemplo debido a una susceptibilidad al oxalato y/o a una producción excesiva de oxalato endógeno.

Las bacterias que pueden ser utilizadas de acuerdo con la invención en cuestión se pueden identificar mediante al menos dos métodos:

1) se pueden utilizar sondas de oligonucleótido específicas para estas bacterias; y/o

2) en un ensayo de cultivo se inocula un medio anaeróbico con oxalato 10 mM y después de 1 a 7 días de incubación a 37 °C se determina la pérdida de oxalato.

Aquí se exponen métodos para preparar las composiciones farmacéuticas y los métodos para cultivar bacterias son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en un cultivo por cargas en un fermentador grande se pueden desarrollar cultivos puros de cepas de *O. formigenes* y las células se pueden cosechar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las células de una cepa individual seleccionada o de mezclas de cepas conocidas se pueden tratar del modo necesario (por ejemplo, se pueden liofilizar con trehalosa o glicerol) para preservar la viabilidad, y después se disponen en cápsulas concebidas para proteger las células durante su paso a través del estómago ácido (cápsulas con revestimiento entérico). Las células bacterianas, bien recientes de la fermentación, bien de reservas congeladas, se pueden mezclar con soportes o excipientes, y después liofilizar. Después, un vehículo de administración se carga con la composición en polvo. Por ejemplo, para suministrar a los intestinos de un humano o un animal inferior una composición de bacterias viables reductoras de oxalato, una composición farmacéutica estable puede comprender un vehículo de administración de una cápsula que tiene un revestimiento entérico y dentro de la cápsula está encerrada una composición liofilizada en polvo de bacterias reductoras de oxalato viables.

Las composiciones farmacéuticas aquí descritas se ingieren en dosis y cantidades y a intervalos determinados por las necesidades de los individuos. En algunos casos puede que solo se requiera una única dosis o una dosis periódica, y en otros casos puede ser necesaria una ingestión regular (por ejemplo con las comidas). Aquí se exponen dosis de cantidades eficaces. Las composiciones farmacéuticas comprenden bacterias reductoras de oxalato viables y/o enzimas reductoras de oxalato solas o en combinación con excipientes o soportes fisiológicamente aceptables o soportes o excipientes farmacéuticos, estos conceptos se utilizan aquí indistintamente. La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser menor, igual o mayor que la cantidad de oxalato producida de forma constitutiva y/o ingerida por el individuo, siendo administrada la dosis reductora de oxalato en una cantidad eficaz a lo largo de un período de tiempo determinado. Para algunos estados relacionados con el oxalato, la cantidad de actividad reductora de oxalato administrada mediante los métodos y composiciones de la presente invención puede ser menor que la cantidad de oxalato ingerida o producida de forma constitutiva, y puede ser solo necesario complementar o suplementar un nivel bajo de capacidad de reducción de oxalato en el paciente. Para otros estados puede ser necesario proporcionar más actividad reductora de oxalato.

Por ejemplo, en la hiperoxaluria primaria (HP), que es una enfermedad genética y una de las formas más graves de hiperoxaluria, los pacientes producen aproximadamente 100-300 mg de oxalato al día. Los métodos para tratar la HP y prevenir las secuelas de la HP comprenden la administración de una cantidad de una composición reductora de oxalato eficaz para reducir al menos 100-300 mg de oxalato al día, o al menos 200 mg al día, o 300 mg al día, o más de 300 mg al día, o 400 mg al día. Este régimen de administración puede tener lugar a través de una vía de administración oral. Por ejemplo, si se proporciona mediante un vehículo de administración oral aquí descrito, tal como una cápsula con revestimiento entérico que comprende una composición de bacterias reductoras de oxalato liofilizadas, la cápsula puede ser proporcionada al menos una vez al día, al menos dos veces al día, al menos tres veces al día, al menos cuatro veces al día, o las veces necesarias para suministrar una cantidad eficaz de actividad reductora de oxalato. Para la comodidad del paciente, una pauta posológica puede comprender la administración oral de una cápsula con revestimiento entérico que incluye una composición que comprende bacterias reductoras de oxalato liofilizadas que incluyen de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^7$  ufc/cápsula, y esta dosis se administra dos o tres veces al día con una comida. Cada cápsula tiene una actividad reductora de oxalato de al menos 6,5-10 mg de oxalato/h o de 120-240 mg/día, y dos o tres de estas cápsulas pueden proporcionar la cantidad máxima de oxalato producido por un paciente de HP/día.

Los soportes pueden ser materiales secos basados en sólidos para formulaciones en forma de comprimido, cápsula o en polvo, y pueden ser materiales líquidos o basados en gel para formulaciones en formas líquidas o de gel, dependiendo estas formas, en parte, de las vías de administración.

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

Los soportes líquidos o basados en gel adecuados son muy conocidos en la técnica, tales como agua y soluciones salinas fisiológicas, urea, alcoholes y glicoles tales como metanol, etanol, propanol, butanol, etilenglicol y propilenglicol, y similares. Preferiblemente, los soportes basados en agua tienen un pH aproximadamente neutro.

Los soportes adecuados incluyen soportes acuosos y oleaginosos tales como, por ejemplo, vaselina blanca, miristato de isopropilo, lanolina o alcoholes de lanolina, aceite mineral, mono-oleato de sorbitano, propilenglicol, alcohol cetilestearílico (juntos o en diversas combinaciones), hidroxipropil celulosa (PM = 100.000 a 1.000.000), detergentes (por ejemplo estearato de polioxilo o lauril sulfato de sodio) y mezclados con agua para formar una loción, gel, crema o composición semisólida. Otros soportes 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, éter polioxipropileno-15-estearílico y agua. Por ejemplo, existen emulsiones que contienen agua, estearato de glicerol, glicerina, aceite mineral, espermaceti sintético, alcohol cetílico, butilparabeno, propilparabeno y metilparabeno comercialmente disponibles. También se pueden incluir conservantes en el soporte, incluyendo metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico y sales de tetraacetato de etileno diamina. El soporte también puede incluir saborizantes y/o colorantes conocidos. La composición también puede incluir un plastificante tal como glicerol o polietilenglicol (PM = 800 a 20.000). La composición del soporte puede variar siempre que no interfiera de forma significativa en la viabilidad de las bacterias reductoras de oxalato o en las enzimas reductoras de oxalato en la composición.

Una composición típica de esta invención puede contener además cualquiera de los siguientes ingredientes inactivos: goma arábiga, aspartamo, ácido cítrico, D&C Yellow nº 10, FD&C Yellow nº 6, saborizante (natural y/o artificial), polisorbato 80, alginato de propilenglicol, dióxido de sílice coloidal y sacarosa y goma xantana.

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

Los métodos aquí descritos para producir composiciones farmacéuticas de *O. formigenes* para administración oral al tracto gastrointestinal comprenden cultivar las bacterias utilizando métodos de 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, y después tamizar la células liofilizadas en un polvo y proporcionar el polvo en un vehículo de administración para una formulación farmacéutica.

La invención también está relacionada con la administración al tracto gastrointestinal humano o animal de enzimas o productos degradadores de oxalato preparados a partir de organismos reductores de oxalato tales como células de *O. formigenes*.

Las enzimas se revisten o se formulan o modifican de otro modo para protegerlas de forma que no sean inactivadas en el estómago y estén disponibles para ejercer su actividad degradadora de oxalato en el intestino delgado. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de estas formulaciones, que están descritas, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. nº 5,286,495.

Las enzimas degradadoras de oxalato tal como se utilizan aquí comprenden todas las enzimas que intervienen en rutas de oxalato e incluyen, pero no se limitan a, oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa, formil CoA transferasa y oxalil-CoA descarboxilasa. La oxalato oxidasa es expresada en plantas superiores y cataliza la oxidación dependiente del oxígeno de oxalato en CO<sub>2</sub> con formación concomitante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las oxalato oxidasas han sido purificadas a partir de muchas fuentes, por ejemplo raíces y hojas de plántulas de cebada; tallos y hojas de remolacha; germen de trigo; hojas de sorgo; y piel de plátano. Se ha desarrollado un procedimiento de purificación rápida en tres etapas para obtener oxalato oxidasa a partir de raíces de cebada. El gen codificador de la oxalato oxidasa de raíz de cebada ha sido clonado, secuenciado y expresado.

La oxalato descarboxilasa está presente principalmente en hongos. Recientemente se ha informado sobre una oxalato descarboxilasa bacteriana en *B. subtilis* que es codificada por el gen *yvrk*. Las oxalato descarboxilasas catalizan la degradación de oxalato libre en CO<sub>2</sub> y formato. Se ha informado de la presencia de esta enzima en varios hongos, incluyendo *Myrothecium*, *verrucaria*, determinadas cepas de *Aspergillus niger*, y hongo de la pudrición blanca, *Coriolus versicolor*. El gen codificador de la oxalato descarboxilasa de *Flammulina velutipes* ha sido clonado y secuenciado; véase el documento WO 98/42827.

La oxalil-CoA descarboxilasa es activa sobre un sustrato activado con CoA y lo convierte en formil-CoA. Después, una formil-CoA transferasa actúa intercambiando formato y oxalato sobre CoA. Estas enzimas han sido estudiadas en las bacterias degradadoras de oxalato *Pseudomonas oxalaticus*, presentes en el suelo, y en *Oxalobacter formigenes*, que residen en el tracto gastrointestinal de vertebrados, incluyendo humanos. Se ha comprobado que las *O. formigenes* desarrollan una relación simbiótica con su huésped 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 descubierto que la ausencia de estas bacterias es un factor de riesgo en estados relacionados con el oxalato, como la urolitiasis de oxalato de calcio idiopática recurrente y la hiperoxaluria entérica secundarias a cirugía de derivación yeyunoileal, la fibrosis quística y la enfermedad intestinal inflamatoria.

Las patentes que describen diversas enzimas degradadoras de oxalato y los genes que codifican estas enzimas incluyen las patentes de los EE.UU. n° 5,912,125; 6,090,628; y 6,214,980. El concepto "enzima degradadora de oxalato" incluye, pero no se limita a, oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa, oxalil-CoA descarboxilasa y formil-CoA transferasa, e incluye enzimas que pueden interactuar con oxalato o ácido oxálico. Estas enzimas se pueden derivar 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 que pueden interactuar con oxalato o ácido oxálico. Dicho concepto también incluye, pero no se limita a, todos los cofactores necesarios, coenzimas, metales, o materiales de unión o de sustrato que son necesarios para que la enzima interactúe con oxalato o ácido oxálico.

El uso de *O. formigenes* es particularmente ventajoso porque es un anaerobio que no se desarrolla en entornos de tejido aerobios y no produce ningún compuesto que sea tóxico para humanos o animales inferiores. Se pueden administrar enzimas degradadoras de oxalato preparadas a partir de estas bacterias, o se puede administrar el microbio completo.

Además, todas las realizaciones arriba mencionadas son aplicables a animales domesticados, agrícolas o mantenidos en instalaciones zoológicas que padezcan de cantidades deficientes de bacterias degradadoras de oxalato, así como a humanos. Por ejemplo, se pueden administrar enzimas y/o microbios degradadores de oxalato a mascotas domésticas tales como perros, gatos, conejos, hurones, cobayas, hámsteres y jerbos, así como a animales agrícolas tales como caballos, ovejas, vacas y cerdos, o a animales salvajes mantenidos para reproducción, tales como nutrias de río. Muchos animales que son capaces de reducir el oxalato pierden esta capacidad cuando son capturados. La presente invención comprende métodos y composiciones para restaurar la actividad reductora de oxalato perdida o reducida. Un aspecto de la presente invención comprende tratar animales recuperados de la naturaleza cuya actividad reductora de oxalato se ha perdido o ha disminuido, con las composiciones aquí descritas.

La presente invención comprende composiciones y métodos para la administración de composiciones que comprenden una o más bacterias degradadoras de oxalato, o combinaciones de bacterias y enzimas, al interior del tracto gastrointestinal de un humano o un animal inferior. Dichas composiciones y métodos son eficaces para reducir la cantidad y/o la concentración de oxalato presente. Estos métodos y composiciones son eficaces para tratar y prevenir estados relacionados con el oxalato. La presente invención comprende métodos para suministrar una o más enzimas degradadoras de oxalato al tracto gastrointestinal de un humano o un animal inferior como composiciones de soporte farmacéuticas y/o nutracéuticas. Dichas enzimas incluyen, pero no se limitan a, oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa, oxalil-CoA descarboxilasa y formil-CoA transferasa. Estas enzimas se pueden derivar 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 degradadoras de oxalato se pueden derivar por medios recombinantes. Por ejemplo, se pueden utilizar medios recombinantes tales como clonación, expresión y purificación para obtener enzimas reductoras de oxalato, por ejemplo la enzima oxalato descarboxilasa de *B. subtilis*. Los expertos en la técnica

conocen estos métodos recombinantes. Por ejemplo se describe en general la clonación y expresión del gen de oxalato descarboxilasa (*YvrK*) de *B. subtilis*: El gen para la proteína de oxalato descarboxilasa (*YvrK*) ha sido clonado en el plásmido pET-9a y pET-14b (Novagen, WI), bajo el control de un promotor del bacteriófago T7, para sobreexpresión como proteína citosólica soluble. El huésped de expresión fue la cepa *E. coli* BL 21(DE3) pLysS, un lisógeno  $\lambda$ DE3 deficiente en proteasas y que contiene una copia cromosómica del gen de T7-ARN polimerasa bajo el control de lacUV5. Además, esta cepa porta un plásmido compatible con pET que codifica lisozima T7, una enzima bifuncional que corta un enlace en la capa de peptidoglicano de la pared celular e inhibe la T7 ARN polimerasa. Esto posibilita un mayor control de la expresión basal no inducida y posibilita el uso de métodos que rompen la membrana interior, tal como congelación-descongelación, o detergentes suaves, etc., para lograr una lisis eficiente de la célula. La expresión del producto genético se induce mediante la adición de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende métodos que incluyen la administración de enzimas degradadoras de oxalato que han sido producidas por un microbio recombinante. Diversos vectores de expresión y huéspedes pueden ser utilizados para producir enzimas degradadoras de oxalato como proteínas recombinantes, y dichos métodos son conocidos por los expertos en la técnica.

Otro aspecto de la presente invención comprende métodos para reducir la absorción de oxalato mediante el suministro de bacterias degradadoras de oxalato al tracto gastrointestinal de un humano o un animal inferior. Estas bacterias incluyen *Oxalobacter formigenes*. La *O. formigenes* ha sido aislada de especímenes fecales humanos y clonada a través de la selección de colonias individuales. Esto incluye la cepa clínica HC-1, que fue obtenida originalmente por Ixion Biotechnology en 1996 del Dr. Milton Alliston. Por ejemplo, se pueden utilizar existencias congeladas de cepa HC-1 humana. Algunos métodos de la presente invención comprenden enriquecer los intestinos con una o más especies de bacterias degradadoras de oxalato, reducir en conjunto el oxalato del contenido intestinal, reducir la absorción de oxalato en los intestinos, reducir la concentración de oxalato en la sangre y los fluidos renales, y reducir los efectos perjudiciales en el cuerpo debido a la presencia de oxalato.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende composiciones y métodos para suministrar bacterias reductoras de oxalato y enzimas degradadoras de oxalato que pueden reducir oxalato a los tractos gastrointestinales de personas que tienen un riesgo elevado de enfermedades y/o estados relacionados con el oxalato. Estas enfermedades y estados incluyen, pero no se limitan a, hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática por cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, personas que han sido sometidas a cirugía de derivación yeyunoileal, personas que tienen concentraciones insuficientes de bacterias degradadoras de oxalato, y otros estados patológicos entéricos. Humanos y animales inferiores que han sido sometidos a tratamiento con antibióticos, tratamiento quimioterapéutico u otros tratamientos que modifican la flora intestinal son tratados con las composiciones y métodos de la presente invención. La presente invención se utiliza para restaurar la capacidad de reducción de oxalato de humanos o animales inferiores con la flora intestinal modificada. Unos niveles elevados de excreción de oxalato urinario promueven la formación de cálculos renales, contribuyen a la formación de cicatrices renales e incluso pueden conducir resultar a insuficiencia renal. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende composiciones y métodos para reducir la formación de cálculos renales.

Una reducción en las concentraciones globales de oxalato en los intestinos también puede conducir a una eliminación de oxalato de las células y la circulación general. Más específicamente, una reducción de la concentración de oxalato en los intestinos también pueden conducir a una mayor secreción de oxalato al interior del intestino desde la sangre. Aunque sin ánimo de apoyar 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 de oxalato en la sangre y aumentar la excreción de oxalato promoviendo la excreción de oxalato desde la sangre a través de un gradiente transepitelial de oxalato para la excreción de oxalato del colon. Un método de la presente invención comprende proporcionar a los intestinos de un humano o un animal inferior una composición para reducir la concentración o el nivel de oxalato de un humano o un animal inferior. Dicha reducción puede comprender una reducción 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 administración oral. Para cada lote de pasta de *O. formigenes* se utiliza un solo vial de existencias de HC-1 para generar un cultivo simiente con el fin de iniciar el desarrollo en fermentación de producción a gran escala. Las bacterias de cada fermentación se recogen por centrifugación y se mezclan con excipientes crioprotectores, que proporcionan protección contra liofilización. La pasta celular también puede ser sometida a liofilización, o a secado por pulverización, o a secado al vacío, con lo que resulta un polvo fino que tiene una potencia dentro del intervalo de  $10^7$  a  $10^9$  UFC/gramo. El polvo resultante se introduce en cápsulas de gelatina, u otras cápsulas, tales como cápsulas de HPMC, que presentan un revestimiento entérico para un suministro seguro de las bacterias al intestino delgado.

Las composiciones de la presente invención comprenden composiciones preparadas a partir de extractos de una o más bacterias reductoras de oxalato dentro del intervalo de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^{12}$  ufc/gramo, de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^{10}$  ufc/gramo, de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{12}$  ufc/gramo, de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  ufc/gramo, de

aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^9$  ufc/gramo, de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^8$  ufc/gramo y todos los intervalos intermedios.

5 Las composiciones de la presente invención también comprenden composiciones que incluyen una o más enzimas que tienen actividad en la reducción de oxalato. Una cantidad eficaz de una composición enzimática puede reducir una parte del oxalato en los intestinos o disminuir la concentración de oxalato en un humano o un animal inferior desde el nivel medido antes de la administración de la composición. Dicha medición puede ser una medición del oxalato presente en el intestino procedente de fuentes de alimento o puede ser un nivel medido en un fluido corporal tal como sangre u orina.

10 La presente invención comprende métodos para tratar o prevenir estados relacionados con el oxalato mediante la administración de composiciones que contienen *O. formigenes* al tracto gastrointestinal de un humano o un animal inferior. A los individuos se les pueden dosificar cápsulas entéricas que contienen  $\geq 10^3$  ufc/g de células de *O. formigenes* viables. Dicha dosificación puede tener lugar al menos dos veces al día con las comidas. La presente invención también comprende métodos para administrar composiciones reductoras de oxalato que incluyen uno o más microorganismos reductores de oxalato, una o más enzimas reductoras de oxalato o combinaciones de las mismas. Un método de la presente invención comprende la administración al menos una vez al día de una cantidad eficaz de una composición reductora de oxalato, en donde la composición reductora de oxalato comprende una o más enzimas reductoras de oxalato. Los métodos también incluyen la administración de dichas 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. Dichas administraciones pueden ser continuas, como cada día durante un período de días, semanas, meses o años, o pueden tener lugar en momentos específicos para tratar estados relacionados con el oxalato. Por ejemplo, a una persona o a un animal se le pueden administrar composiciones reductoras de oxalato al menos una vez al día durante años para tratar o prevenir estados relacionados con el oxalato, o a una persona o a un animal se le pueden administrar composiciones reductoras de oxalato al menos una vez al día únicamente en momentos en los que se ingieren alimentos que contienen oxalato, o durante un período de tiempo limitado, tal como días o semanas, después de procedimientos o tratamientos que interfieren en la flora bacteriana normal. Dicha administración puede tener lugar a través de vías conocidas para la administración de productos farmacéuticos. La presente invención prevé la administración a través de vías orales o intestinales, o en combinación con productos alimenticios.

20 La invención también prevé un sistema terapéutico para reducir oxalato que comprende un recipiente que incluye una etiqueta y una composición de acuerdo con la presente invención, en donde dicha etiqueta incluye instrucciones para el uso de la composición para la reducción de oxalato.

25 Normalmente, el sistema está presente en forma de un envase que contiene una composición terapéutica de esta invención, o en combinación con material de envase. El material de envase incluye una etiqueta o instrucciones para el uso de los componentes del envase. Las instrucciones indican el uso previsto del componente de envase aquí descrito 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 el uso de la composición terapéutica en forma de dosis unitarias o a granel del modo apropiado, y puede incluir información referente al almacenamiento de la composición, indicaciones de enfermedades, dosis, vías de administración e información similar.

30 La presente invención comprende composiciones farmacéuticas y métodos para reducir oxalato en humanos y animales inferiores. La composición puede comprender un vehículo de administración oral que incluye una cápsula, una píldora, un gránulo o un comprimido. La composición puede comprender además un revestimiento entérico sobre el vehículo de administración oral. El revestimiento entérico puede ser un material polimérico. Dichos materiales poliméricos pueden ser uno de muchos Eudragit diferentes u otros materiales poliméricos conocidos por los expertos en la técnica para utilizarlos como revestimientos entéricos.

35 Las composiciones pueden comprender bacterias reductoras de oxalato consistentes en *Oxalobacter formigenes*, o composiciones en las que la bacteria reductora de oxalato es *Oxalobacter formigenes* de la cepa HC1. Las composiciones reductoras de oxalato pueden comprender un polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 2.000 micras, o de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 1.000 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.500 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.000 micras, de 500 a aproximadamente 1.500 micras, o cualquier intervalo dentro de éstos o alrededor de los mismos.

40 La composición puede comprender el disacárido, trehalosa, o en donde el alginato es alginato de sodio. La composición reductora de oxalato puede tener un valor ufc/g de al menos aproximadamente  $1E+03$  a aproximadamente  $1E+13$  de bacterias reductoras de oxalato. La composición reductora de oxalato puede tener una actividad reductora de enzima de oxalato/g de al menos aproximadamente 2 mg de oxalato degradado/h a aproximadamente 2.500 mg de oxalato degradado /h.

45 Una composición para reducir una concentración de oxalato en un humano o un animal inferior comprende un vehículo de administración oral que incluye una composición reductora de oxalato que comprende una composición

que incluye un vehículo de administración que comprende una composición que incluye a) de aproximadamente un 3% a aproximadamente un 25% de una bacteria reductora de oxalato; b) de aproximadamente un 1,5% a aproximadamente un 6% de un disacárido; c) de aproximadamente un 45% a aproximadamente un 60% de una maltodextrina; d) de aproximadamente un 4% a aproximadamente un 6% de un alginato; y e) de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 35% de una oligofructosa.

Una composición para la reducción de oxalato comprende una cantidad eficaz de actividad reductora de oxalato que reducirá una parte del oxalato presente y además comprende un vehículo de administración farmacéutica. El vehículo de administración farmacéutica puede comprender un polvo, una píldora, un gránulo, un supositorio o un comprimido. Opcionalmente está previsto un revestimiento entérico sobre el vehículo de administración, y el revestimiento entérico es generalmente un material polimérico. Una cantidad eficaz de actividad reductora de oxalato puede ser proporcionada por bacterias reductoras de oxalato que pueden ser *Oxalobacter formigenes*, o pueden ser *Oxalobacter formigenes* de la cepa HC1. La composición se puede proporcionar en forma de un polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 2.000 micras, o de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 1.000 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.500 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.000 micras, de 500 a aproximadamente 1.500 micras, o cualquier intervalo dentro de éstos o alrededor de los mismos. La composición reductora de oxalato puede tener un valor ufc/g de al menos aproximadamente  $1E+03$  a aproximadamente  $1E+13$  de bacterias reductoras de oxalato. La composición reductora de oxalato puede tener una actividad reductora de enzima de oxalato/g de al menos aproximadamente 2 mg de oxalato degradado/h a aproximadamente 2.500 mg de oxalato degradado/h.

Los métodos de la presente invención comprenden métodos para reducir concentraciones de oxalato en humanos y animales inferiores, métodos para tratar estados relacionados con el oxalato en humanos y animales inferiores, métodos para prevenir estados relacionados con el oxalato en humanos y animales inferiores, y métodos para preparar composiciones reductoras de oxalato. La presente invención también comprende sistemas para la reducción de oxalato. Un método para reducir una concentración de oxalato en un humano o un animal inferior comprende la administración a un humano o a un animal inferior de una cantidad eficaz de una composición que incluye un vehículo de administración que comprende una composición reductora de oxalato que incluye a) de un 3% a un 25% de bacterias degradadoras de oxalato; b) de un 1,5% a un 6% de un disacárido; c) de un 45% a un 60% de una maltodextrina; d) de un 4% a un 6% de un alginato; y e) de un 20% a un 35% de una oligofructosa. El vehículo de administración puede comprender un supositorio, un polvo, una píldora, un gránulo o un comprimido, que pueden comprender además un revestimiento entérico sobre el vehículo de administración. El revestimiento entérico puede ser un material polimérico. Las bacterias reductoras de oxalato pueden ser *Oxalobacter formigenes*, o pueden ser *Oxalobacter formigenes* de la cepa HC1. La composición se puede proporcionar en forma de un polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 2.000 micras, o de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 1.000 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.500 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.000 micras, de 500 a aproximadamente 1.500 micras, o cualquier intervalo dentro de éstos o alrededor de los mismos. La composición puede comprender el disacárido, trehalosa, o en donde el alginato es alginato de sodio. La composición reductora de oxalato puede tener un valor ufc/g de al menos aproximadamente  $1E+03$  a aproximadamente  $1E+13$  de bacterias reductoras de oxalato, la composición reductora de oxalato puede tener una actividad reductora de enzima de oxalato/g de al menos aproximadamente 2 mg de oxalato degradado/h a aproximadamente 2.500 mg de oxalato degradado /h. El método puede administrar por vías de administración orales.

Los métodos también pueden comprender la prevención de un estado relacionado con el oxalato, que incluye la administración de las composiciones aquí descritas. Dichos métodos también pueden comprender el tratamiento de un estado relacionado con el oxalato, que incluye la administración de las composiciones aquí descritas. Los estados relacionados con el oxalato incluyen, pero no se limitan a, hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática por cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esteatorrea, pacientes que han sido sometidos a cirugía gastrointestinal, tal como cirugía de derivación yeyunoileal, o que han sido sometidos a tratamiento con antibióticos. Los métodos incluyen la administración de las composiciones aquí descritas más de una vez al día durante un período de tiempo hasta que se haya reducido un nivel suficiente de oxalato o indefinidamente para un control continuo de los niveles de oxalato. Un método comprende un método para prevenir un estado relacionado con el oxalato que comprende la administración a un humano o a un animal inferior de una cantidad eficaz de actividad reductora de oxalato que reducirá una parte del oxalato presente, que incluye a) de un 3% a un 25% de bacterias degradadoras de oxalato; b) de un 1,5% a un 6% de un disacárido; c) de un 45% a un 60% de una maltodextrina; d) de un 4% a un 6% de un alginato; y e) de un 20% a un 35% de una oligofructosa, y que además incluye un vehículo de administración farmacéutica. El vehículo de administración farmacéutica puede comprender un polvo, una píldora, un gránulo, un supositorio o un comprimido. El vehículo de administración farmacéutica puede comprender una cápsula. Cualquiera de estos vehículos de administración puede comprender un revestimiento entérico. Estos revestimientos entéricos pueden ser de un material polimérico. Las bacterias reductoras de oxalato pueden ser *Oxalobacter formigenes*, o pueden ser *Oxalobacter formigenes* de la cepa HC1. La composición se puede proporcionar en forma de un polvo liofilizado. El polvo puede tener un tamaño de partícula de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 2.000

micras, o de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 1.000 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.500 micras, o de aproximadamente 500 micras a aproximadamente 1.000 micras, de 500 a aproximadamente 1.500 micras, o cualquier intervalo dentro de éstos o alrededor de los mismos. La composición puede comprender el disacárido, trehalosa, o en donde el alginato es alginato de sodio. La composición reductora de oxalato puede tener un valor ufc/g de al menos aproximadamente  $1E+03$  a aproximadamente  $1E+13$  de bacterias reductoras de oxalato, la composición reductora de oxalato puede tener una actividad reductora de enzima de oxalato/g de al menos aproximadamente 2 mg de oxalato degradado/h a aproximadamente 2.500 mg de oxalato degradado /h. El método puede administrar por vías de administración orales. Los estados relacionados con el oxalato que pueden ser tratados o prevenidos incluyen hiperoxaluria, hiperoxaluria primaria, enfermedad idiopática por cálculos renales de oxalato de calcio (urolitiasis), hiperoxaluria entérica, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esteatorrea, pacientes que han sido sometidos a cirugía gastrointestinal, tal como cirugía de derivación yeyunoileal, o que han sido sometidos a tratamiento con antibióticos.

Los métodos para preparar una composición farmacéutica reductora de oxalato comprenden proporcionar bacterias reductoras de oxalato en una concentración de al menos aproximadamente  $1E+03$  a aproximadamente  $1E+13$ ; opcionalmente mezclar las bacterias reductoras de oxalato con uno o más excipiente farmacéuticamente aceptables; liofilizar las bacterias, y cargar o proporcionar las bacterias en un vehículo de administración farmacéutica. Estos excipientes pueden comprender uno o más de: disacárido, maltodextrina, alguicida u oligofruktosa. Las bacterias reductoras de oxalato pueden ser *Oxalobacter formigenes*, o pueden ser *Oxalobacter formigenes* de la cepa HC1. El vehículo de administración farmacéutica puede comprender un polvo, una píldora, un gránulo, un supositorio o un comprimido. Sobre el vehículo de administración puede haber un revestimiento entérico. El revestimiento entérico puede ser un revestimiento polimérico, tal como un revestimiento que comprende Eudragit.

Se ha de señalar que, tal como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones anexadas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

A continuación se dan ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no han de ser interpretados en modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

Los ejemplos 1 a 9 no forman parte de la invención.

### Ejemplo 1

Tratamiento de pacientes de alto riesgo

A pacientes de hiperoxaluria primaria se les administraron dos veces al día cápsulas con revestimiento entérico que contenían polvo liofilizado de *O. formigenes*, preferiblemente con sus dos comidas principales del día. Cada cápsula de tamaño 2 contenía aproximadamente 137 mg de polvo a granel liofilizado, que contenía al menos  $10^8$  unidades formadoras de colonias (ufc)/gramo.

Para los individuos de alto riesgo, se puede tratar de un tratamiento para toda la vida. En estudios clínicos, los individuos mostraron que la colonización bajaba cuando se interrumpía el tratamiento. En el estudio clínico, el tratamiento se realizó durante 4 semanas y después se hizo un seguimiento de dos semanas. Las 4 semanas de tratamiento resultaron en una disminución significativa de los niveles de oxalato en sangre y orina en comparación con los niveles de línea de base. Pero durante el período de seguimiento, los recuentos de *Oxalobacter* en heces bajaron y los valores de oxalato en plasma y orina comenzaron a aumentar. Por lo tanto, se considera que será necesaria una administración continua de composiciones reductoras de oxalato para proporcionar los estados de oxalato reducido. Unas composiciones que comprendan bacterias que puedan colonizar y establecerse de forma continua en el intestino podrían conducir a una necesidad de menos administraciones de composiciones reductoras de oxalato.

Las cápsulas de células de *O. formigenes* con revestimiento entérico pueden ser ingeridas por poblaciones de pacientes de alto riesgo de enfermedades relacionadas con el oxalato. Éstos incluyen:

1. Personas que producen demasiado oxalato endógeno, por ejemplo debido a un defecto genético como la Hiperoxaluria Primaria.
2. Personas con riesgo de urolitiasis con un alto nivel de oxalato urinario debido a una enfermedad entérica (hiperoxaluria entérica).
3. Personas que presentan un historial de urolitiasis con múltiples episodios de enfermedad idiopática por cálculos.
4. Personas con altos niveles de oxalato en suero debido a enfermedad renal en fase terminal.
5. Personas con vestibulitis vulvar.



6. Personas que tienen dietas con altos niveles de oxalato, tales como las que se encuentran en determinadas áreas y estaciones en la India y en Arabia Saudí. Esto también incluiría a individuos que prefieren alimentos tales como espinacas, que presentan altos niveles de oxalato.

- 5 A cualquiera de las personas o animales arriba descritos se les administra una composición de la presente invención. Por ejemplo, una persona con niveles de oxalato endógeno más altos de lo normal es tratada dos veces al día con una cápsula concebida para suministrar su contenido al intestino grueso, conteniendo la cápsula aproximadamente  $10^6$  ufc de *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con comida.

### Ejemplo 2

Tratamiento de pacientes de bajo riesgo

- 10 Los individuos de poblaciones de bajo riesgo de enfermedad relacionada con el oxalato también pueden ingerir células de *O. formigenes* con protección entérica, tales como las proporcionadas en cápsulas con revestimiento entérico. Sería deseable colonizar a estos pacientes con uno o dos tratamientos que comprenden composiciones de materiales reductores de oxalato, tales como bacterias reductoras de oxalato. Estos pacientes también podrían recibir rutinariamente tratamientos con materiales reductores de oxalato, bien como suplementos, bien como adiciones a alimentos tales como leche o yogur. Éstos incluyen:

1. Personas que han perdido poblaciones de bacterias degradadoras de oxalato normales debido a: tratamientos con antibióticos orales o con ataques de enfermedad diarreica.

2. Los niños pueden ser inoculados de tal modo que se establecerá más fácilmente una población protectora normal de *Oxalobacter* que más adelante en la vida, cuando actúan principios de exclusión competitiva.

- 20 Las personas o animales de bajo riesgo son tratados dos veces al día con una cápsula concebida para suministrar su contenido al intestino grueso, conteniendo la cápsula al menos  $10^7$  ufc de uno o más organismos reductores de oxalato, tales como *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con comida.

### Ejemplo 3

Uso de enzimas degradadoras de oxalato de *Oxalobacter formigenes* para controlar la hiperoxaluria

- 25 Se llevó a cabo un estudio para evaluar la eficacia de enzimas degradadoras de oxalato de *Oxalobacter formigenes* para el control de la hiperoxaluria.

Animales utilizados: ratas Sprague Dawley macho: peso corporal 250-300 g.

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

- 30 Fármaco utilizado: mezcla liofilizada de lisado de *Oxalobacter formigenes* (fuente de enzimas) con oxalil CoA, MgCl<sub>2</sub> y TPP.

Sistema de administración del fármaco (cápsulas): cápsulas de tamaño 9 para estudios preclínicos con ratas (Capsu-Gel). Revestimiento entérico Eudragit L-100-55 (Hulls America, Inc.). Recogida de orina basal durante 24 h. Análisis fecal de *Oxalobacter formigenes* - las ratas no estaban colonizadas con *Oxalobacter formigenes*.

Protocolo experimental:

- 35 A. Estudios a largo plazo:

Protocolo de animales:

Grupo I (n = 4): alimentado con dieta de oxalato con lisado. Las ratas recibieron dos cápsulas cada día a las 4:00 p.m. y dieta de oxalato durante la noche. La dieta se retiraba durante el día (de 8:00 a.m. a 4:00 p.m.).

Grupo II (N = 4): alimentado con dieta de oxalato tal como se ha descrito para el Grupo I (controles hiperoxalúricos).

- 40 El día 7 y el día 9 del tratamiento arriba indicado se recogieron muestras de orina durante 24 horas.

Los datos sobre la concentración de oxalato urinario medio de los dos grupos de ratas arriba mostrados indicaban que la alimentación con lisado de *Oxalobacter* hacía disminuir la concentración de oxalato urinario en las ratas del Grupo I en comparación con los controles hiperoxalúricos (Grupo II). Las enzimas no pueden estar activas durante mucho tiempo en el tracto gastrointestinal; por ello se realizaron estudios a corto plazo tal como se describe más abajo.

- 45 B. Estudios a corto plazo:

Protocolo de animales:

Grupo I (n = 4): alimentado con 1 cápsula a las 8:00 a.m.; dieta de oxalato durante dos horas (las ratas eran sometidas a ayuno durante la noche, de modo que comen bien durante este período) y 1 cápsula a las 10:00 a.m.

Grupo II (n = 4): dieta de oxalato durante dos horas como en el caso del Grupo I.

5 Durante el siguiente período de cinco horas se recogió la orina de todos los animales, que se analizó en cuanto a la concentración de oxalato.

Esto se llevó a cabo los días 11, 12 y 15 de este estudio.

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

C. Estudios de cruzamiento:

Protocolo de animales:

Grupo I: alimentado con dieta de oxalato dos veces al día a las 8:00-10:00 y las 3:00 p.m.-5:00 p.m.

Grupo II: alimentado con 1 cápsula dos veces al día antes de alimentarlo con la dieta de oxalato como en el Grupo I.

15 El día 2 y el día 5 después del cruzamiento se llevaron a cabo estudios a corto plazo del efecto de la alimentación con lisado de *Oxalobacter* en los niveles de oxalato urinario tal como se describe en la anterior Sección B.

Los estudios de cruzamiento mostraron que las ratas del Grupo II previamente hiperoxalúricas, que fueron alimentadas con el lisado de *Oxalobacter*, mostraban una disminución en los niveles de oxalato urinario. En cambio, las ratas del Grupo I revirtieron a la hiperoxaluria después de retirar el fármaco.

## 20 **Ejemplo 4**

Tratamiento de ratas con *Oxalobacter formigenes*

Se llevó a cabo un estudio para evaluar el destino del oxalato dietético cuando en la dieta se incluyen células de *Oxalobacter formigenes*.

25 Métodos: unas ratas Wistar macho fueron alimentadas con una dieta alta en oxalato (0,5%) y normal en calcio (1%), o con una dieta alta en oxalato (0,5%) y baja en calcio (0,02%) durante dos experimentos separados. El día 1 y de nuevo el día 7 del estudio se administró <sup>14</sup>C-oxalato (2,0 µCi). Los días 5-11 se administraron células de *Oxalobacter formigenes* (380 mg/d) en el agua de beber de las ratas. El destino del <sup>14</sup>C del oxalato se midió sobre la base del análisis de <sup>14</sup>C en heces, orina y aire espirado. Las ratas sirvieron como autocontroles y se realizaron mediciones durante el período de control (antes de la administración de células de *Oxalobacter*) durante los días 1-4; durante el período experimental (cuando se administraron células bacterianas) se realizaron mediciones los días 7-11.

30 Resultados:

1. Cuando las ratas fueron alimentadas con la dieta de calcio normal (1%), en el aire espirado se recuperó menos de un 1% de la dosis administrada de <sup>14</sup>C de oxalato (como dióxido de carbono producido a partir de <sup>14</sup>C oxalato en el intestino, absorbido en la sangre y después espirado), sin embargo en todos los casos se recuperó más del <sup>14</sup>C durante el período en el que a las ratas se les administraron células de *Oxalobacter* (FIGURA 1a). Esto contrasta con los resultados obtenidos cuando la dieta era baja en calcio (0,02%), cuando más de un 50% del <sup>14</sup>C de oxalato se recuperó como dióxido de carbono en el aire espirado durante el período experimental en el que a las ratas se les administraron células de *Oxalobacter* (FIGURA 1b). Estos resultados son sorprendentemente diferentes de las cantidades muy bajas de <sup>14</sup>C (menos de un 5%) recuperadas durante el período de control (antes de la administración de células de *Oxalobacter*). Por lo tanto, la administración de células de *Oxalobacter formigenes* a ratas aumentaba notablemente la cantidad de oxalato dietético degradado en el tracto intestinal.

2. La administración de células de *Oxalobacter* también redujo la cantidad de <sup>14</sup>C-oxalato excretado en la orina. Las Figuras 2a y 2b muestran valores de recogidas de 4 días tanto durante el período de control como durante el período experimental y de un día individual en cada uno de dichos períodos, respectivamente. Las cantidades de oxalato recuperado en heces de rata también eran menores durante el período experimental (cuando se administraron células de *Oxalobacter*) que las halladas durante el período de control (FIGURA 2c).

La mayor parte de las ratas de laboratorio no portan *Oxalobacter* en sus tractos intestinales (no están colonizadas). Los presentes resultados mostraron que la administración intencionada de estas bacterias degradadoras de oxalato a ratas provocaba que se degradara una gran parte del oxalato dietético y que, en consecuencia, en la orina se excretara una menor cantidad del oxalato de la dieta.

50

Los efectos del calcio dietético en la degradación de oxalato son notables. El calcio forma complejos con el oxalato, de modo que solubilidad y disponibilidad de éste para ser atacado por *Oxalobacter* es limitada y la cantidad que se degrada cuando las ratas son alimentadas con una dieta rica en calcio es mucho menor que las cantidades degradadas cuando la dieta es baja en calcio.

## 5 Ejemplo 5

Efecto de la administración de *O. formigenes* en la excreción de oxalato urinario en cerdos

Los cerdos están colonizados naturalmente por *Oxalobacter*. Mediante una complementación de la dieta con antibióticos se logró una descolonización en cerdos experimentales. A los cerdos se les administró *Oxalobacter* en caldo de cultivo, que consumieron rápidamente. Los cerdos fueron alimentados con un alimento a base de soja/cereales complementado con 1.300 mg de oxalato/kg. La dieta basal contenía 680 mg de oxalato/kg. En las FIGURAS 3a-c se muestran los resultados de 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 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 observado en humanos que toman dietas con fórmulas libres de oxalato. Este nivel equivale a la síntesis endógena en humanos cuando se ha eliminado la carga dietética. 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 las *Oxalobacter* ingeridas podía eliminar tanto el oxalato cristalino añadido como el oxalato procedente de los alimentos que estaba biodisponible.

En este experimento, a cada cerdo se le administraron 1,0 g de pasta celular con la comida de la mañana. Con O.D<sub>600</sub> de 0,6, el recuento de células viables es de  $2,1 \times 10^8$  células/ml, lo que por extrapolación da  $2,1 \times 10^{13}$  células por 100 litros. El lote en el fermentador de 100 litros proporciona de promedio 50-60 g de peso húmedo de células. Por lo tanto, 1 g de peso húmedo de células corresponde a aproximadamente  $3,5 \times 10^{11}$  células viables.

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

El peso corporal de los cerdos es de aproximadamente 90,72 kg (200 libras) y se considera que el sistema digestivo de los cerdos es muy similar al de los humanos. En los humanos, el consumo diario de oxalato es de aproximadamente 100-400 mg, dependiendo de la composición de la dieta, que además está dividida en tres comidas/día. Por lo tanto, de promedio, una dosis diaria de  $10^8$  a  $10^{10}$  células viables sería suficiente para prevenir la absorción dietética de oxalato.

## Ejemplo 6

Efecto de la complementación de *O. formigenes* en la excreción de oxalato urinario en ratas alimentadas con dieta alta en oxalato

Se llevó a cabo un estudio para determinar el efecto de la formulación IxOC-3 en el estado de colonización y los niveles de oxalato urinario después de una dieta alta 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/gramo por dosis. La formulación también comprende agentes criopreservantes tales como trehalosa y maltodextrina.

Métodos:

Unas ratas Harlan Sprague Dawley macho fueron asignadas aleatoriamente a 3 grupos (6 animales/grupo). Los animales del Grupo 1 sirvieron como el grupo de control y se les administró una formulación de placebo con revestimiento entérico de tamaño 9 dos veces al día por vía oral forzada con un nivel de dosis de 100 unidades formadoras de colonias (UFC). A los animales de los Grupos 2 y 3 se les administró una formulación IxOC-3 de *Oxalobacter formigenes* en forma de cápsulas con revestimiento entérico de tamaño 9 dos veces al día por vía oral forzada con un nivel de dosis de  $10^6$  y  $10^7$  UFC, respectivamente. En los tres grupos, después de la administración forzada de la cápsula se llevó a cabo un arrastre con agua de grifo pasada por autoclave. Después de un período de aclimatación inicial, todos los grupos fueron alimentados con una dieta normalizada complementada con un 1% de oxalato por gramo.

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, y para confirmar la ausencia de *Oxalobacter formigenes* en el material de control de placebo durante el período de dosificación.

La dieta se restringió a dos períodos diarios de 1 hora comenzando 15 minutos después de la madrugada y la alimentación forzada por la tarde para asegurar que las cápsulas se dosificaban en un estómago vacío. Se

proporcionó agua *ad libitum*. El consumo de alimento se registró dos veces al día. El Día 1 (antes de la dieta complementada con oxalato) y después semanalmente se recogieron muestras fecales y muestras de orina de 24 horas. Los datos de la orina se analizaron a través de análisis de medidas repetidas para comprobar las diferencias en los parámetros urinarios medios a través de los grupos y el tiempo. También se incluyó un término de interacción de grupo de dosificación por tiempo para evaluar cualquier interacción posible entre el grupo de dosificación y el tiempo.

Resultados:

Los resultados de los análisis indicaban que había una interacción estadísticamente significativa entre grupos de dosis y tiempo ( $p < 0,0001$ ) para todos los parámetros, indicando que el perfil de parámetros urinarios a lo largo del tiempo era diferente entre los grupos de dosificación. Para ayudar a la interpretación de esta interacción se llevó a cabo un análisis de los datos por punto temporal para cada parámetro con el fin de determinar si había una diferencia entre los grupos de dosificación con respecto a los parámetros urinarios medios. Este análisis reveló que en los grupos de dosis baja y dosis alta se producía un aumento del oxalato urinario desde la línea de base hasta 7 días ( $p < 0,0001$  ambos grupos), pero no se producía ningún aumento entre 7 días y 28 días ( $p = 0,1094$  dosis baja y  $p = 0,6910$  dosis alta). Sin embargo, en el grupo de placebo se produjo un aumento desde la línea de base hasta 28 días ( $p = 0,0010$ ). Además, el día 21 y el día 28, los niveles medios de oxalato urinario en el Grupo I de placebo eran considerablemente más altos que los de la dosis baja (Grupo II) y la dosis alta (Grupo III), pero no había ninguna diferencia significativa entre la dosis baja y la dosis alta. Por lo tanto se produjo una disminución global significativa en la excreción de oxalato urinario en ratas tratadas en comparación con ratas alimentadas con placebo.

### Ejemplo 7

Los efectos de la administración oral de *O. formigenes* en los niveles de oxalato urinario en pacientes que sufren hiperoxaluria primaria (HP)

En el estudio participaron nueve pacientes con hiperoxaluria primaria (HP) probada por biopsia. Después de recibir evaluaciones de línea de base iniciales, a todos los individuos se les administró 1 g de pasta celular de *Oxalobacter formigenes* ( $\geq 10^{10}$  ufc/gramo) con sus comidas principales durante 4 semanas. Durante este período de tiempo, todos los pacientes continuaron tomando su medicación normal y se les pidió que comieran su dieta normal y que mantuvieran la toma de líquidos en el nivel normal. Excepto las espinacas y el ruibarbo, no se prohibieron los alimentos con alto contenido de oxalato. En las semanas 5 y 6 se midió la colonización por *Oxalobacter* y su influencia en los niveles de oxalato en la orina y el plasma. La eficacia del tratamiento se siguió en términos de excreción de oxalato urinario en individuos con función renal normal y de oxalato en plasma en individuos con enfermedad renal en fase terminal (ERFT).

Resultados:

1. El tratamiento demostró una reducción significativa del oxalato urinario en individuos con función urinaria normal. El oxalato en plasma disminuyó considerablemente en siete de nueve individuos. En dos individuos con ERFT se produjo una reducción drástica del oxalato en plasma, demostrando una eliminación entérica de oxalato endógeno en el intestino contra un gradiente transepitelial.

El consumo de *O. formigenes* de cepa HC-1 en dosis dentro del intervalo de 0,25 g a 2,0 g en cada comida fue bien tolerado por voluntarios sanos normales que recibieron dietas que contenían niveles normales o altos de oxalato. Una dosis de 1,0 g de pasta celular dos veces al día durante 28 días fue bien tolerada por pacientes de HP.

### Ejemplo 8

Tratamiento de pacientes de alto riesgo con composiciones de enzimas reductoras de oxalato

A unos pacientes de hiperoxaluria primaria se les administran dos veces al día, preferiblemente con las dos comidas principales del día, una o más cápsulas con revestimiento entérico que contienen una composición de enzimas reductoras de oxalato liofilizadas, que comprende oxalato descarboxilasa y/u oxalato oxidasa. 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 de alto riesgo requieren una administración continua durante un período de tiempo prolongado, probablemente un tratamiento para toda la vida. La colonización caerá si se interrumpe el tratamiento.

Las cápsulas con revestimiento entérico de composiciones reductoras de oxalato que comprenden enzimas reductoras de oxalato pueden ser administradas a poblaciones de pacientes de alto riesgo de enfermedades relacionadas con el oxalato. Éstos incluyen:

1. Personas que producen demasiado oxalato endógeno, por ejemplo debido a un defecto genético como la Hiperoxaluria Primaria.

2. Personas con riesgo de urolitiasis con un alto nivel de oxalato urinario debido a una enfermedad entérica (hiperoxaluria entérica).

3. Personas que presentan un historial de urolitiasis con múltiples episodios de enfermedad idiopática por cálculos.

4. Personas con altos niveles de oxalato en suero debido a enfermedad renal en fase terminal.

5 5. Personas con vestibulitis vulvar.

6. Personas que tienen dietas con altos niveles de oxalato, tales como las que se encuentran en determinadas áreas y estaciones en la India y en Arabia Saudí. Esto también incluiría a individuos que prefieren alimentos tales como espinacas, que presentan altos niveles de oxalato.

10 A cualquiera de las personas o animales arriba descritos se les administra una composición de la presente invención. Por ejemplo, una persona con niveles de oxalato endógeno más altos de lo normal es tratada dos veces al día con una cápsula concebida para suministrar su contenido al intestino grueso, conteniendo la cápsula aproximadamente una cantidad efectiva equivalente de una composición enzimática que presenta una actividad enzimática similar a la proporcionada por  $10^7$  ufc de una bacteria reductora de oxalato, tal como *O. formigenes*. La cápsula se administra preferiblemente con comida.

### 15 **Ejemplo 9**

Tratamiento de pacientes de bajo riesgo con composiciones de enzimas reductoras de oxalato

20 Las composiciones reductoras de oxalato con revestimiento entérico que comprenden una mezcla de las enzimas reductoras de oxalato oxalato descarboxilasa y/u oxalato oxidasa, tales como las proporcionadas en cápsulas con revestimiento entérico, también pueden ser administradas a individuos de poblaciones de bajo riesgo de enfermedades relacionadas con el oxalato o con riesgo de enfermedades relacionadas con el oxalato. Una cantidad eficaz de la composición enzimática es administrada en el régimen de tratamiento deseado.

25 Sería deseable administrar las composiciones a estos pacientes bien durante períodos de tiempo más cortos cuando presentan un riesgo de estados relacionados con el oxalato, bien simultáneamente con materiales que contribuyen a estados relacionados con el oxalato. Estos pacientes también podrían recibir rutinariamente tratamientos con composiciones reductoras de oxalato, bien como suplementos, bien como adiciones a alimentos tales como leche o yogur. Éstos incluyen personas que han perdido poblaciones de bacterias degradadoras de oxalato normales debido a: tratamientos con antibióticos orales o con ataques de enfermedad diarreica, o niños.

30 Las personas o animales de bajo riesgo son tratadas dos veces al día con una cápsula concebida para suministrar su contenido al intestino grueso, conteniendo la cápsula 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 comida.

### **Ejemplo 10**

Un método para producir cápsulas con revestimiento entérico que contienen *Oxalobacter formigenes* liofilizada

35 Se utilizaron 200 gramos de una pasta celular de *Oxalobacter formigenes* (actividad enzimática degradadora de oxalato/g dentro de un intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 1.600 mg/g). La pasta celular puede ser reciente, procedente de fermentación, o puede proceder de existencias congeladas que se descongelan. Una solución criopreservante o crioprotectora de trehalosa 100 mM se mezcló con la pasta celular. La solución se agitó constantemente. Después, la combinación se mezcló con una mezcla de excipientes. La mezcla de excipientes consistía en Maltodextrina M500 y alginato de sodio mezclados entre sí y añadidos a una solución de Raftilose P95 al 79%. Después, la mezcla de pasta celular se vertió sobre bandeja(s) de liofilización. Las bandejas cargadas se liofilizaron después en un secador Edwards Lyofast S24 (se puede utilizar cualquier tipo de secador adecuado), durante 40-65 horas, que puede ser modificado para diferentes lotes de producción. Después de la liofilización, la torta seca se molió a mano y se pasó a través de un tamiz de malla 20 tamaño US. Esto proporcionó un polvo con un tamaño de partícula < 850 µm.

45 Una vez tamizado el polvo seco, éste estaba listo para introducirlo en cápsulas. Las cápsulas se rellenaron utilizando una máquina de rellenado de cápsulas manual, pero se puede utilizar cualquier método de rellenado de cápsulas, tal como máquinas de rellenado automático. En general se utilizaron cápsulas de tamaño 2. Las cápsulas se revistieron con polímeros de revestimiento entérico tal como Eudragit (obtenido comercialmente de Rhom Pharma (Degussa)) utilizando un proceso de revestimiento acuoso, alternativamente se puede utilizar un proceso de revestimiento con disolvente. Dicha compañía produce muchos tipos diferentes de polímeros Eudragit que se disuelven específicamente con pH diferentes.

El revestimiento se llevó a cabo utilizando técnicas normalizadas. Los polímeros Eudragit son polímeros y copolímeros de ácido metacrílico. Por ejemplo, Eudragit L100-55 es un copolímero de ácido metacrílico de tipo C,

Eudragit L30 es una dispersión de copolímero de ácido metacrílico, y Eudragit S100 es un copolímero de ácido metacrílico de tipo B. Estos y otros revestimientos entéricos son conocidos en la técnica.

Revestimiento acuoso

5 Se utilizaron Eudragit FS30D, un material filmógeno, y Eudragit L30D55, un material filmógeno, y otros materiales junto con plastificantes, antiadherentes y soportes, tales como agua y los conocidos en la técnica farmacéutica.

800 gramos de cápsulas se revistieron con una suspensión de revestimiento para obtener cápsulas revestidas uniformemente con perfil de desintegración USP. Perfil de desintegración: nada de desintegración en jugos gástricos simulados (pH 1,2) en una hora y desintegración completa en jugos intestinales simulados (pH 6,8) en un plazo de una hora.

10 Proceso de revestimiento con disolvente:

Se utilizaron Eudragit L100-55, un material filmógeno, y Eudragit S100, un material filmógeno, junto con otros materiales que pueden ser utilizados, tales como plastificantes, antiadherentes y soportes, tales como agua y los conocidos en la técnica farmacéutica.

15 800 gramos de cápsulas se revistieron con una suspensión de revestimiento que contenía para obtener cápsulas revestidas uniformemente con perfil de desintegración USP. Perfil de desintegración: nada de desintegración en jugos gástricos simulados (pH 1,2) en una hora y desintegración completa en jugos intestinales simulados (pH 6,8) en un plazo de una hora.

### Ejemplo 11

20 Con cápsulas de administración oral producidas con el método del Ejemplo 10 utilizadas en siete experimentos diferentes a lo largo de 1 año de ensayos se obtuvieron los siguientes datos. ¿Podemos añadir el contenido de las cápsulas? Las composiciones farmacéuticas así producidas se evaluaron en cuanto a la estabilidad en términos de viabilidad bacteriana y actividad degradadora de oxalato. La siguiente tabla, Tabla 1, muestra 7 lotes de producción y la estabilidad de composiciones farmacéuticas que comprenden cápsulas con revestimiento entérico que incluyen bacterias reductoras de oxalato viables, en particular *O. formigenes*.

25 Tabla 1

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

Los datos de la siguiente Tabla 2 muestran otro ejemplo.

Tabla 2

Tiempo en meses	act. degradadora de OX/cap. (mg/h/cápsula)
0	2,9
1	3,9

Tiempo en meses	act. degradadora de OX/cap. (mg/h/cápsula)
3	3,48
6	3,6
9	1,6
12	2,5

En otro lote de producción se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 3

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

- 5 La actividad está en mg de oxalato degradado por hora.

### Ejemplo 13

Formulaciones para administración oral de composiciones farmacéuticas de *Oxalobacter formigenes* viables

Formulación 1

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de <i>Ox. formigenes</i> (seco)	24,00	6%
D(+) Trehalosa (crioprotector)	11,34	3%
Maltodextrina QD M-500	240,00	57%
Alginato de sodio	16,00	4%
Raftilose P95 u oligofruetosa	126,24	30%

- 10 Por ejemplo, la trehalosa se puede obtener de Sigma Co. La trehalosa es un disacárido y, por lo tanto, una formulación de la presente invención comprendía un disacárido tal como maltosa, lactosa, celobiosa, sacarosa, diglucosa o trehalosa. La maltodextrina QD M-500 tiene un valor ED de 10 y es un polvo blanco o un polvo blanco granular. Es un polímero sacárido nutritivo, no dulce, compuesto por unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces alfa-1-4. ED es equivalentes de dextrosa, una medida cuantitativa del grado de hidrólisis de polímero de almidón. Cuanto mayor es el valor ED, mayor es el grado de la hidrólisis de almidón. Otros componentes de la formulación son estabilizadores, tales como alginato de sodio, que también se utiliza como estabilizador, espesante, agente gelificante, o emulsionante. El alginato de sodio es un carbohidrato de amilosa natural destilado a partir de algas. Se utiliza mucho en alimentación, medicina, textil, impresión y tinte, fabricación de papel y productos químicos
- 15

cotidianos como espesante, emulsionante, estabilizador y ligante, etc. La fórmula molecular es  $C_6H_7O_6Na)_n$  y es un polvo vagiforme blanco o amarillo claro, inodoro e insípido, que se disuelve en agua y es insoluble en etanol y éter. El Raftilose P95 es un polvo de un 95% de oligofructosa DP<sub>2</sub> a DP<sub>7</sub>, y los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa (5%).

## 5 Formulación 2

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

## Formulación 3

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

## Formulación 4

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de <i>Ox. formigenes</i> (seco)	83,4	20%
D(+) Disacárido	22,6	6%
Maltodextrina QD M-500	196,26	47%
Alginato de sodio	16,00	4%
Raftilose P95	95,91	23%

10

## Formulación 5

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de <i>Ox. formigenes</i> (seco)	62,64	15%
D(+) Disacárido	25,05	6%
Maltodextrina QD M-500	212,97	51%
Alginato de sodio	16,00	4%
Oligofructosa	100,22	24%



## Formulación 6

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

## Formulación 7

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de <i>Ox. formigenes</i> (seco)	104,40	25%
D(+) Disacárido	25,05	6%
Maltodextrina QD M-500	187,91	45%
Alginato de sodio	16,00	4%
Oligofructosa	83,52	20%

## Formulación 8

Componente	Cantidad (g)	%
Pasta celular de <i>Ox. formigenes</i> (seco)	396,04	95%
Excipiente de disacárido	8,34	2%
Mezcla de excipientes - maltodextrina, alginato de Na, oligofructosa	12,5	3%

5

**Ejemplo 14**

Prueba de estabilidad de composiciones de la invención

10 El material de 13 lotes de revestimiento diferentes (7 acuosos + 6 orgánicos; utilizando 8 cargas diferentes de la formulación del Ejemplo 10) se almacenaron bajo condiciones de almacenamiento refrigeradas ( $5 \pm 3$  °C) y a -20 °C. Seis de 13 lotes tienen datos incluidos hasta un tiempo de 36 semanas; 3 de 13 tienen datos hasta 24 semanas; 2 de 13 tienen datos hasta 12 semanas y los 2 restantes tienen datos hasta un tiempo de 4 semanas. Las únicas variables investigadas en estos estudios fueron:

Temperatura de almacenamiento (refrigerada y -20 °C).

Tipo de cápsula (gelatina frente a HPMC).

15

Tipo de revestimiento (acuoso frente a orgánico).

Con o sin estabilizador adicional ( $\pm$  Avicel en una concentración de un 1-5% p/p).

Envase (tubos de polipropileno (PP) frente a blíster).

Los resultados se muestran en las Figuras 5-12.

20 La Figura 5 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de las cápsulas con revestimiento entérico almacenadas a 4 °C y -20 °C, respectivamente. Los resultados muestran que el almacenamiento a -20 °C conduce a una menor disminución de ufc/cápsula que el almacenamiento a 4 °C. Los datos se presentan en la siguiente tabla. La Figura 5 es un gráfico que muestra el promedio ufc/cápsula en cápsulas revestidas, en el que los rombos son cápsulas guardadas a 4 °C y los cuadrados son cápsulas guardadas a -20 °C.

Los datos de la siguiente tabla están presentados en la Figura 6, que muestra las pérdidas log en función del tiempo de almacenamiento. La Figura 6 es un gráfico que muestra las pérdidas log medias en cápsulas revestidas, en el que los rombos son cápsulas guardadas a 4 °C y los cuadrados son cápsulas guardadas a -20 °C.

Tabla 4

Pérdidas log medias en cápsulas revestidas						
Tiempo en semanas	1	4	8	12	24	36
Pérdidas log a 4 °C	0,43	0,62	0,96	1,25	1,81	2,25
Pérdidas log a -20 °C	0,33	0,25	0,30	0,37	0,75	0,77
Pérdidas log a 4 °C Valores (+ DE)	0,26	0,28	0,37	0,40	0,48	0,64
Pérdidas log a -20 °C Valores (+ DE)	0,31	0,31	0,56	0,33	0,40	0,32

5

La Figura 7 muestra la diferencia en las pérdidas medias de cápsulas de gelatina y de HPMC (hidroxipropilmetil celulosa) con revestimiento entérico. Durante un tiempo de hasta aproximadamente 36 semanas de almacenamiento, parecía que la composición contenida en las cápsulas de gelatina con revestimiento entérico era más estable que la composición contenida en las cápsulas de HPMC con revestimiento entérico. La Figura 7 es un gráfico que muestra las pérdidas log en función del tiempo, en el que los rombos son cápsulas de gelatina revestidas y los cuadrados son cápsulas de HPMC revestidas.

10

Las cápsulas de gelatina o de HPMC se pueden revestir utilizando una composición de revestimiento bien basada en agua, bien basada en disolvente orgánico. La Figura 8 muestra el impacto en la pérdida media dependiendo de la composición de revestimiento y la Figura 9 muestra los resultados de los diferentes tipos de cápsulas. La Figura 8 es un gráfico que muestra las pérdidas log medias en cápsulas con revestimiento acuoso frente a cápsulas con revestimiento orgánico. Los rombos son cápsulas con revestimiento acuoso almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los cuadrados son cápsulas con revestimiento basado en disolvente orgánico almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los triángulos son cápsulas con revestimiento acuoso almacenadas a -20 °C; y las líneas cruzadas (x) son cápsulas con revestimiento basado en disolvente orgánico almacenadas a -20 °C. La Figura 9 es un gráfico que muestra las pérdidas log con diferentes revestimientos sobre diferentes tipos de cápsula. Los rombos son cápsulas de gelatina con revestimiento acuoso; los cuadrados son cápsulas de HPMC con revestimiento acuoso; los triángulos son cápsulas de gelatina con revestimiento basado en disolvente orgánico; y las líneas cruzadas (x) son cápsulas de HPMC con revestimiento basado en disolvente orgánico, todas almacenadas a  $5 \pm 3$  °C.

15

20

Se puede añadir Avicel® como un deshumectador o como un agente estabilizador. La Figura 10 muestra el impacto del Avicel® en la pérdida media. La Figura 10 es un gráfico que muestra las pérdidas log medias en cápsulas revestidas con y sin Avicel®. Los rombos son cápsulas revestidas con Avicel®, almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los cuadrados son cápsulas revestidas sin Avicel®, almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los triángulos son cápsulas revestidas con Avicel®, almacenadas a -20 °C; y las líneas cruzadas (x) son cápsulas revestidas sin Avicel®, almacenadas a -20 °C.

25

30

Las Figuras 11 y 12 se refieren al envase de las cápsulas. Las cápsulas se envasaron bien en tubos de polipropileno, bien en envases blíster. Sin embargo, los resultados no simulaban exactamente una situación de usuario debido al hecho de que los tubos solo se abrían cuando se sacaba una muestra. La situación en la vida real es diferente a esta situación, ya que el paciente normalmente abrirá el tubo cada vez que tenga que sacar una nueva dosis, es decir, las cápsulas restantes están mucho más expuestas al entorno que durante el experimento aquí descrito. La Figura 11 es un gráfico que muestra la pérdida log media de la actividad de cápsulas revestidas, envasadas en tubos de polipropileno y en envases blíster. Los rombos son cápsulas revestidas envasadas en polipropileno, almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los cuadrados son cápsulas revestidas envasadas en envases blíster, almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los triángulos son cápsulas revestidas envasadas en polipropileno, almacenadas a -20 °C; y las líneas cruzadas (x) son cápsulas revestidas envasadas en envases blíster, almacenadas a -20 °C. La Figura 12 es un gráfico que muestra la pérdida log media de la actividad de cápsulas revestidas, envasadas en tubos de polipropileno y en envases blíster, y es idéntica a la Figura 11 menos las barras de error. Los rombos son cápsulas revestidas envasadas en polipropileno, almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los cuadrados son cápsulas revestidas envasadas en envases blíster, almacenadas a  $5 \pm 3$  °C; los triángulos son cápsulas revestidas envasadas en polipropileno, almacenadas a -20 °C; y las líneas cruzadas (x) son cápsulas revestidas envasadas en envases blíster, almacenadas a -20 °C.

35

40

45

**Ejemplo 15**

Variación en el proceso de revestimiento

5 Unas cápsulas (tamaño 2) que contenían el polvo liofilizado que comprendía bacterias y excipientes del Ejemplo se dotaron de una composición de revestimiento tal como se describe en la siguiente tabla. El revestimiento se realizó utilizando una composición de revestimiento acuoso tal como se describe más abajo en la Tabla 4. Para la formulación de revestimiento se utilizó lo siguiente: Eudragit® 30 D-55 (Röhm America, Piscataway NJ), citrato de trietilo (Morflex Inc., Greensboro, NC), monoestearato de glicerol (Imwitor 900K, Sasol, Alemania) y polisorbato 80 (Merck KGaA, Alemania).

10 El aumento de peso teórico final del polímero Eudragit L30 D-55 en cada uno de los experimentos era de 14 mg/cm<sup>2</sup>. Esto corresponde a un aumento de peso de cápsula total de un 31,1% p/p.

Tabla 5

Excipiente	Función	Cantidad (g)	Sustancia seca (g)	% de sustancia polimérica seca
Eudragit® L30 D-55	Polímero	804,9	241,5	--
Citrato de trietilo	Plastificante	48,3	48,3	20%
Monoestearato de glicerol	Agente deslizante	16,9	16,9	7%
Polisorbato 80	Emulsionante	6,8	6,8	40% de GMS
Agua desionizada	Medio	376,8	--	
TOTAL		1.253,7	313,4	

Total sólidos 25,0% p/p.

Procedimiento de preparación de dispersión de revestimiento

- 15 1. Añadir un 45% del agua a un recipiente limpio y calentar a 70 °C.
2. Añadir el polisorbato 80, el citrato de trietilo y el monoestearato de glicerol al agua calentada en el paso 1.
3. Retirar la dispersión del paso 2 del calor y homogeneizar con una mezcladora de cizalladura alta durante 10 minutos.
4. Añadir la parte restante del agua a la emulsión del paso 3 y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 20 5. En un segundo recipiente limpio, añadir Eudragit®L 30 D-55 y comenzar a mezclar suavemente con una mezcladora de cizalladura baja.
6. Añadir lentamente la emulsión del paso 4 a Eudragit® L 30 D-55 del paso 5 y continuar mezclando durante 30 minutos.
7. Tamizar la dispersión del paso 6 a través de una rejilla de malla 60 (250 µm).
- 25 8. Continuar mezclando la dispersión del paso 7 con una mezcladora de cizalladura baja a lo largo de la duración del proceso de revestimiento.
- Las dispersiones de revestimiento pelicular se aplicaron (cubierta pelicular) sobre:
- a. Un tamaño de carga total de 600 g de cápsulas en una bandeja de revestimiento perforada de 15 pulgadas Compu-Lab (Thomas engineering, IL).
- 30 b. Un tamaño de carga total de 800 g de cápsulas en un sistema de lecho fluidizado GPCG 1 (Glatt air Techniques, NJ) equipado con un Wurster de 6 pulgadas y un placa de distribución de aire de tipo D. La altura de división era de 25 mm.

Los parámetros de proceso eran tal como se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6

Sistema de revestimiento	Bandeja	Lecho fluidizado
Boquilla de fluido (mm)	1,0	1,2
Caudal de aire	305,8 m <sup>3</sup> /h (180 pies cúbicos por minuto)	150 m <sup>3</sup> /h
Velocidad de bandeja (rpm)	15-16	
Presión de atomización	1,79 bar (26 libras por pulgada cuadrada)	2 bar
Temp. de aire de entrada (°C)	28-40	30-34
Temp. de salida (°C)	25-28	26-28
Temp. de producto (°C)	21-28	25-28
Régimen de pulverización (g/min/kg)	6	3-10
Tiempo de proceso (min)	180	146

Las muestras se dispusieron en recipientes adecuados para el envasado y se etiquetaron correspondientemente.

#### Conclusión

- 5 La formulación entérica se aplicó a las cápsulas tanto en sistemas de revestimiento de bandeja como en sistemas de revestimiento de lecho fluidizado sin ningún problema de procesamiento.

#### Ejemplo 16

##### Precintado de cápsulas con revestimiento entérico

- 10 Para evitar fugas de las cápsulas y la entrada de cualquier medio ácido (jugos gástricos) después de la administración oral, se llevaron a cabo los siguientes experimentos con el precintado de las cápsulas. El precintado denota la aplicación de un sellado en los bordes en los que las dos vainas de cápsula se solapan y dejan un espacio (la costura de cápsula). Tal como se ha señalado más arriba en esta memoria, en determinadas circunstancias esta transición de una vaina de cápsula a la otra puede conducir a la difusión de jugos gástricos dentro de la cápsula, un proceso nada deseable debido a la inestabilidad de las bacterias en un entorno ácido.

Además se llevaron a cabo ensayos de desintegración.

- 15 Materiales:

Pharmacoat 606 (HPMC (Shin Etsu).

Etanol (Spectrum).

Red 40 Dye (Sensient).

Polisorbato 80 (PS-80) (Qualicaps).

- 20 Gelatina, NF (Qualicaps).

Eudragit L100 (Degussa).

Citrato de trietilo (TEC) (Morflex).

Talco (Whittaker).

Alcohol isopropílico (AIP) (Univar).

- 25 Eudragit L100-55 (Degussa).

Eudragit S100 (Degussa).

#### Ensayos

5 El aparato de desintegración era conforme a USP. La cantidad apropiada de recipientes se rellenó con aproximadamente 900 ml de tampón pH 1,2 y se mantuvo a 37 °C. En cada uno de los tubos del cesto para cada lote se dispuso una cápsula y se cubrió con una rejilla de alambre. La máquina estuvo en funcionamiento durante una hora y se registró la cantidad de cápsulas restantes. Después, los cestos fueron transferidos a nuevos recipientes rellenos con aproximadamente 900 ml de tampón pH 6,8 mantenido a 37 °C. Una hora después se registró la cantidad de cápsulas desintegradas.

Desarrollo de formulaciones

Precintado

10 Cápsulas de HPMC y cápsulas de gelatina se precintaron de acuerdo con las fórmulas indicadas en la tabla siguiente utilizando una precintadora de cápsulas modelo de laboratorio de Schaefer Technologies STI.

A)

Tabla 7

Ingrediente	Lote n°	% p/p	g/carga
PS-80	N0601316	1,20%	4,6
Gelatina, NF	N0602132	28,31%	108,5
Agua desionizada	NA	70,23%	269,2
Tinte B-1	AM9123	0,26%	1
Total		100,00%	383,3

1) Mezclar suavemente el agua y el agente tensioactivo.

15 2) Añadir el tinte B-1. Mezclar suavemente a mano.

3) Mezclar suavemente en gelatina, NF. Dejar hinchar durante 1-2 horas.

4) Cubrir firmemente. Disponer en un horno o baño a 55 °C para fundir la gelatina.

B)

Tabla 8

Ingrediente	Lote n°	% p/p	g/carga
Pharmacoat 606 (HPMC)	5106041	16,0%	80
Etanol	VN0458	50,4%	252
Agua desionizada	NA	33,1%	165,5
Tinte Red-40	AM8564	0,5%	2,5
Total	--	100,00%	500,0

20

1) Añadir HPMC al etanol y agitar.

2) Añadir tinte al agua desionizada y agitar.

3) Añadir (2) a (1) y agitar.

25 Tabla. A) Fórmula de precintado de cápsulas para precintado de gelatina. B) Fórmula de precintado de cápsulas para precintado de HPMC.

Normalmente, las cápsulas de gelatina se precintaron con una composición que contenía gelatina y las cápsulas de HPMC se precintaron con una composición que contenía HPMC. El precintado se realizó antes de someter las cápsulas a revestimiento entérico. Aparte de reforzar la costura de la cápsula, el precintado también parecía posibilitar un revestimiento entérico mejor y más uniforme.

## Experimentos de revestimiento

5 Se llevaron a cabo varios experimentos de revestimiento en las cápsulas precintadas con gelatina y HPMC. El revestimiento se investigó tanto en un secador de lecho fluidizado como en dispositivos de revestimiento de bandeja perforada. Para los experimentos de revestimiento en bandeja se investigaron dos formulaciones de revestimiento orgánico diferentes.

## Revestimiento en bandeja - Experimento 1

El Experimento 1 se llevó a cabo para evaluar la viabilidad de una nueva fórmula disolvente y para determinar parámetros de procesamiento. La fórmula de revestimiento y los parámetros utilizados son los siguientes:

Tabla 9

Fórmula de revestimiento					
Ingrediente	Lote nº	% p/p	g/carga	g sólidos/carga	% sólidos/carga
Eudragit L 100	B040503013	6,00%	600	600	6,00%
Trietilo	000006306	0,60%	60	60	0,60%
Citrato (TEC)					
Talco	H05015	1,80%	180	180	1,80%
Alcohol isopropílico (AIP)	MV016821523	86,54%	8654	0	0,00%
Agua		5,06%	506	0	0,00%
Total	--	100,00%	10.000	840	8,40%

10

## Procedimiento:

- 1) Dispersar Eudragit en 6.000 g de AIP.
- 2) Añadir agua a (1).
- 3) Mezclar TEC, talco y el AIP restante (2.654 g).

15 4) Combinar (2) y (3) y mezclar durante 1 hora.

## Parámetros de revestimiento:

Temperatura de producto = 23-27 °C

Aire de atomización = 1,72-1,86 bar (25-27 libras por pulgada cuadrada) aire

Caudal = 424,75 m<sup>3</sup>/h (250 pies cúbicos por minuto)

20 Velocidad de pulverización = 52-56 g/min

Velocidad de bandeja = 15 rpm

25 La bandeja de revestimiento de 38,1 cm (15") se cargó con aproximadamente 800 g de cápsulas. Después se puso en marcha la bandeja y se ajustaron las condiciones de procesamiento. Casi inmediatamente después de la puesta en marcha, la temperatura del producto llegó al intervalo deseado y se inició la pulverización a una velocidad de aproximadamente 52 g/min. La liberación brusca de pulverización inicial, probablemente debida al aumento de presión en las líneas, parecía provocar una ligera pegajosidad, no obstante, en todo el resto del lote no se observó pegajosidad ni aglutinación. Se recogieron muestras al llegar a los aumentos de peso teóricos del 8, 12, 15 y 20%.

## Experimento 2

El Experimento 2 se llevó a cabo tal como se describe más abajo.

30

Tabla 10

Cápsulas con revestimiento entérico					
Ingrediente	Lote nº	% p/p	g/carga	g sólidos/carga	% sólidos/carga
Eudragit L 100-55	B041004023	7,18%	107,7	107,7	7,18%
Eudragit S100	B03005052	5,85%	87,75	87,75	5,85%
Talco	H05015	5,00%	75	75	5,00%
TEC	000006306	1,30%	19,5	19,5	1,30%
Agua		5,00%	75	0	0,00%
AIP	MV016821523	75,70%	1135,5	0	0,00%
Total	--	100,03%	1.500	289,95	19,33%

1) Procedimiento:

2) Mezclar el talco y 200 g de AIP.

3) Combinar en bolsa Eudragit L100-55 y Eudragit S100.

5 4) Mezclar el AIP restante (935,5 g) y agua.

5) Añadir (2) a (3).

6) Añadir TEC y (1) a (4).

Parámetros de revestimiento:

Temperatura de producto = 25-28 °C

10 Aire de atomización = 2,62-2,90 bar (38-42 libras por pulgada cuadrada) aire

Caudal = 424,75 m<sup>3</sup>/h (250 pies cúbicos por minuto)

Velocidad de pulverización = 17-20 g/min

Velocidad de bandeja = 15-16 rpm

15 El Experimento 2 se llevó a cabo de modo similar al Experimento 1, no obstante se observó pegajosidad después de la puesta en marcha. La velocidad de pulverización se disminuyó drásticamente para prevenir más pegajosidad y el experimento de revestimiento continuó sin más contratiempos. Las cápsulas se revistieron hasta un aumento de peso de un 20%.

Resultados

20 Se llevó a cabo una prueba de desintegración en las cápsulas de los Experimentos 1 y 2. Los resultados son los siguientes:

Tabla 11 - Resultados de desintegración de cápsulas del Experimento 1 y el Experimento 2

Tipo de cápsula	Experimento nº	Nº cápsulas desintegradas en 1 hora	
		Tampón 1,2	Tampón 6,8
Placebo precintado con gelatina, 20% p.g.	Experimento 2	0	6
Placebo precintado con HPMC, 20% p.g.	Experimento 2	0	6
Placebo precintado con gelatina, 20% p.g.	Experimento 1	0	4
Placebo precintado con HPMC, 20% p.g.	Experimento 1	0	6

Tipo de cápsula	Experimento nº	Nº cápsulas desintegradas en 1 hora	
		Tampón 1,2	Tampón 6,8
Placebo precintado con gelatina, 15% p.g.	Experimento 1	0	6
Placebo precintado con HPMC, 15% p.g.	Experimento 1	0	6
Placebo precintado con gelatina, 8% p.g.	Experimento 1	0	6
Placebo precintado con HPMC, 8% p.g.	Experimento 1	0	6

Conclusión

5 En los dos Experimentos 1 y 2 se creó con éxito un revestimiento de cápsula entérico bajo condiciones de baja temperatura y baja humedad. No obstante es recomendable el Experimento 1, ya que parecía ser mejor por una serie de razones. Dado que esta fórmula tenía un menor contenido de sólidos, la uniformidad del revestimiento mejoró teóricamente debido a la mayor duración del período de revestimiento. Adicionalmente, el menor contenido de sólidos reduce las posibilidades de que una cápsula se pegue con otra. Además, la fórmula del Experimento 1 solo utiliza un tipo de Eudragit, lo que simplifica la preparación de la solución. Por último, la fórmula y el proceso utilizados para el Experimento 1 producen cápsulas que superan la desintegración entérica con un aumento de peso de tan solo un 8%.

10 El Experimento 1 se considera el experimento más eficaz por una serie de razones. Dado que esta fórmula tenía un menor contenido de sólidos, la uniformidad del revestimiento mejoró teóricamente debido a la mayor duración del período de revestimiento. Adicionalmente, el menor contenido de sólidos reduce las posibilidades de que una cápsula se pegue con otra. Además, la fórmula del Experimento 1 solo utiliza un tipo de Eudragit, lo que simplifica la preparación de la solución. Por último, la fórmula y el proceso utilizados para el experimento uno producen cápsulas que superan la desintegración entérica con un aumento de peso de tan solo un 8%.



**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para administración oral a un humano o un animal inferior, que comprende un vehículo de administración oral que incluye una composición degradadora de oxalato que comprende:
- a) de un 3% a un 25% de bacterias degradadoras de oxalato,
  - b) de un 1,5% a un 6% de un disacárido,
  - c) de un 45% a un 60% de una maltodextrina,
  - d) de un 4% a un 6% de un alginato, y
  - e) de un 20% a un 35% de una oligofruktosa,
- 5
- 10 para suministrar bacterias degradadoras de oxalato a los intestinos de un humano o un animal inferior después de la administración oral, en donde las bacterias degradadoras de oxalato son *Oxalobacter formigenes*.
2. Una composición según la reivindicación 1, que además comprende uno o más deshumectadores, en donde los uno o más deshumectadores se seleccionan entre el grupo consistente en celulosas, derivados de celulosas, sílice y derivados de sílice.
- 15 3. Una composición según la reivindicación 1 o 2, en donde el vehículo de administración oral comprende un polvo, una cápsula, una píldora o un comprimido.
4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la bacteria degradadora de oxalato es *Oxalobacter formigenes* de la cepa HC1.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición degradadora de oxalato tiene un valor ufc/g de al menos  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^{13}$ .
- 20 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde una sola dosis de la composición degradadora de oxalato tiene una actividad enzimática reductora de oxalato de 5 unidades a 5.000 unidades.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición degradadora de oxalato comprende un polvo liofilizado.
- 25 8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el disacárido es trehalosa.

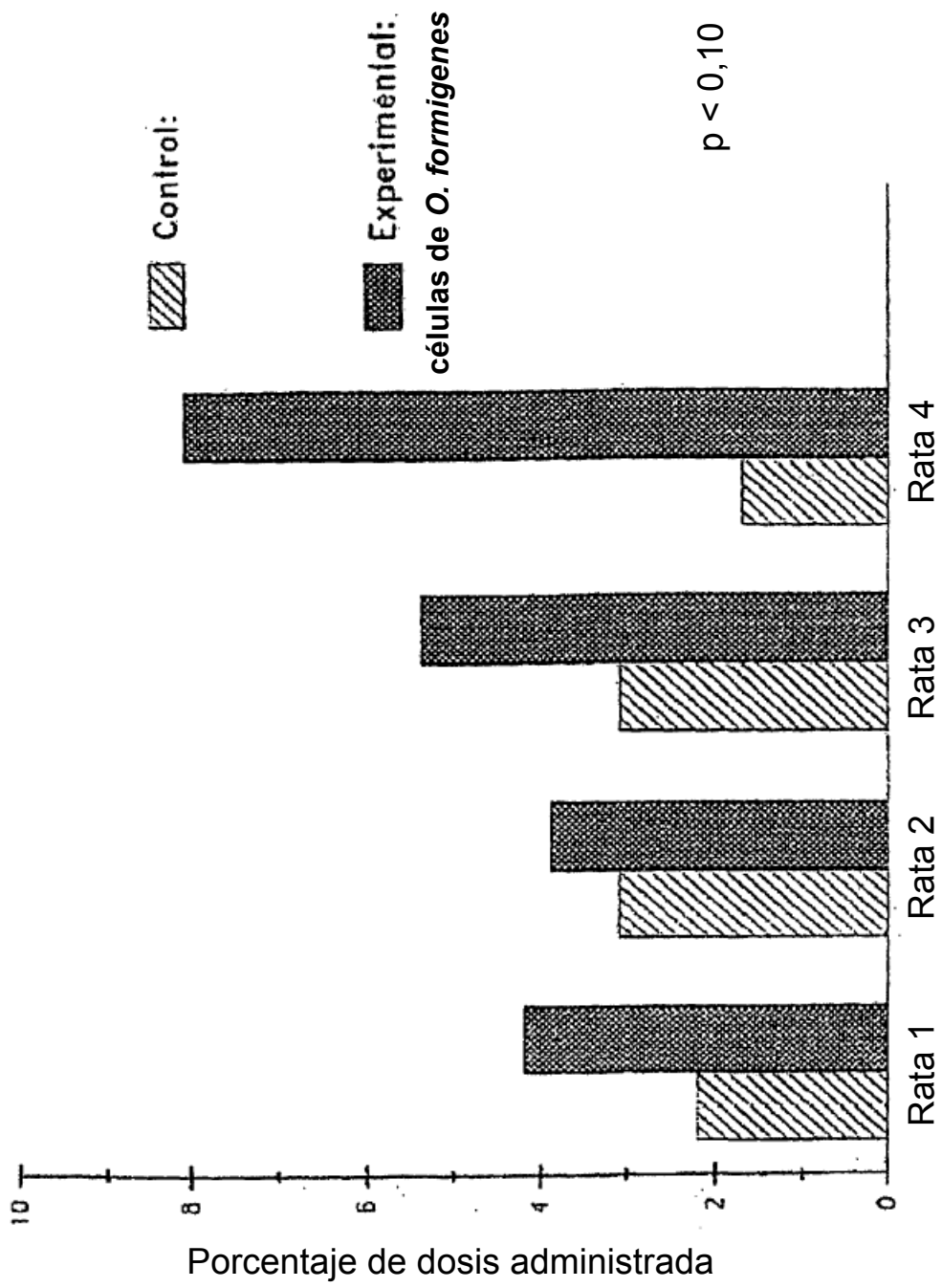


FIG. 1A

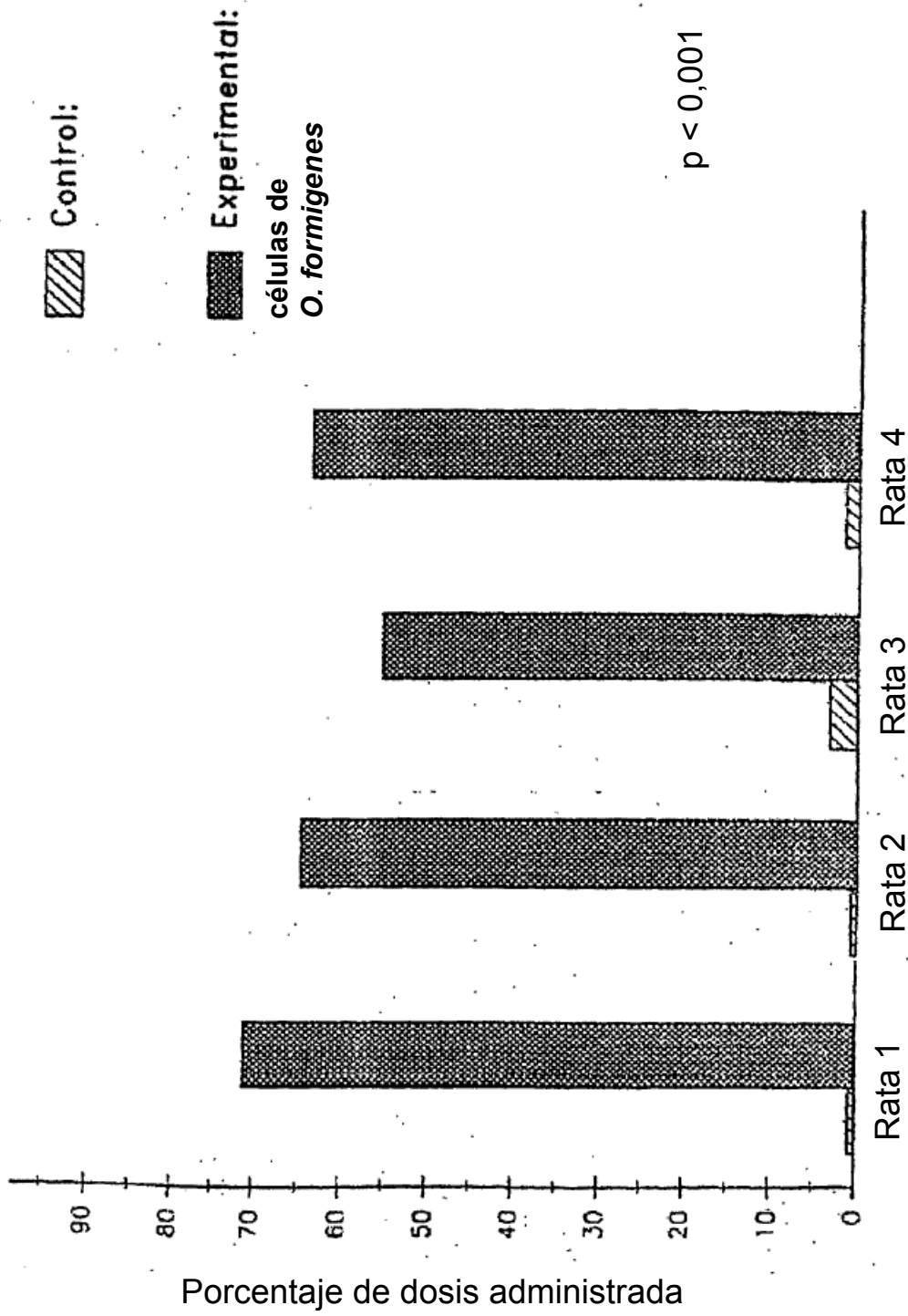


FIG. 1B

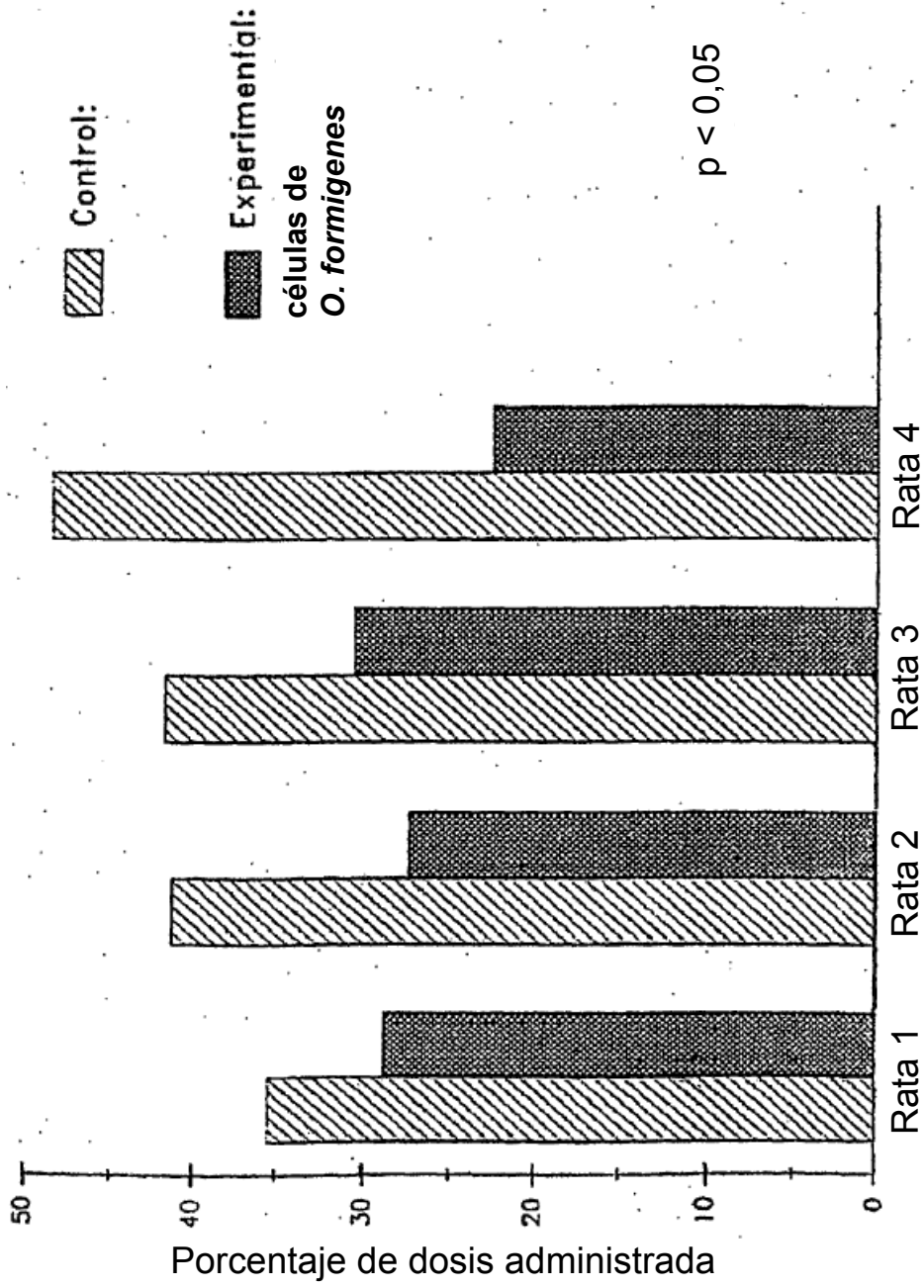


FIG. 2A

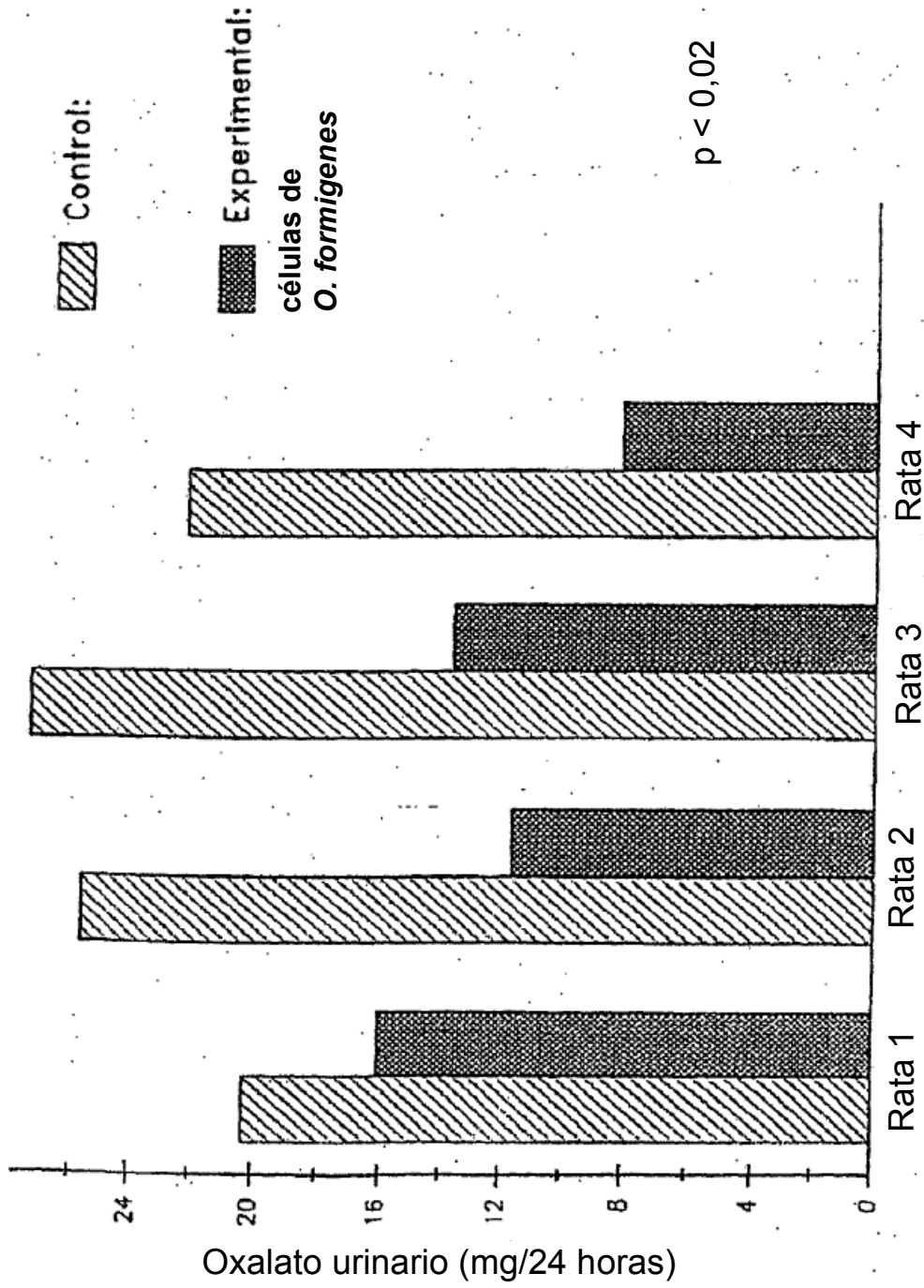


FIG. 2B

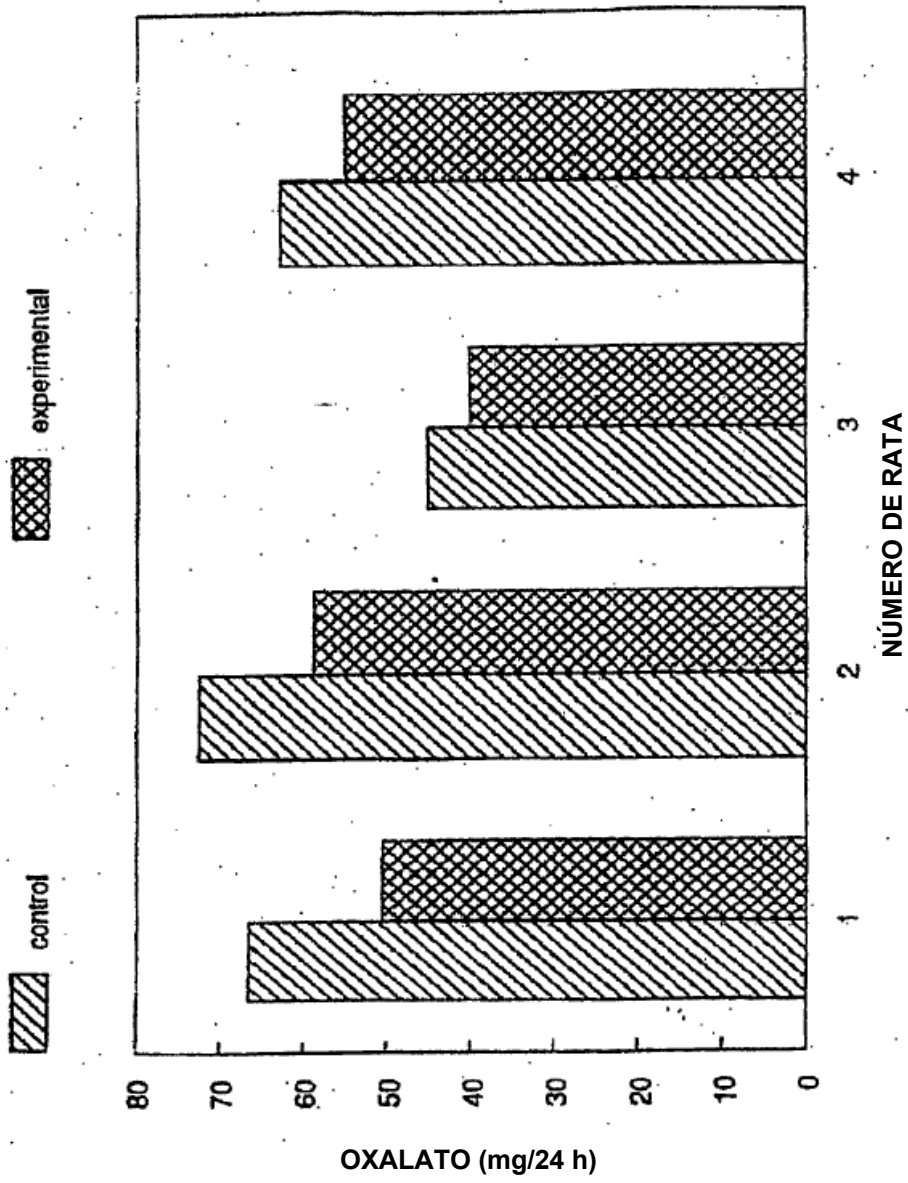


FIG. 2C

FIG. 3A

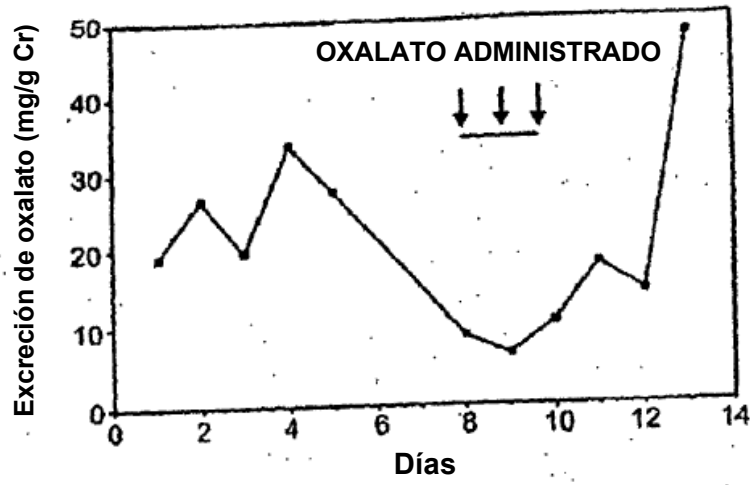


FIG. 3B

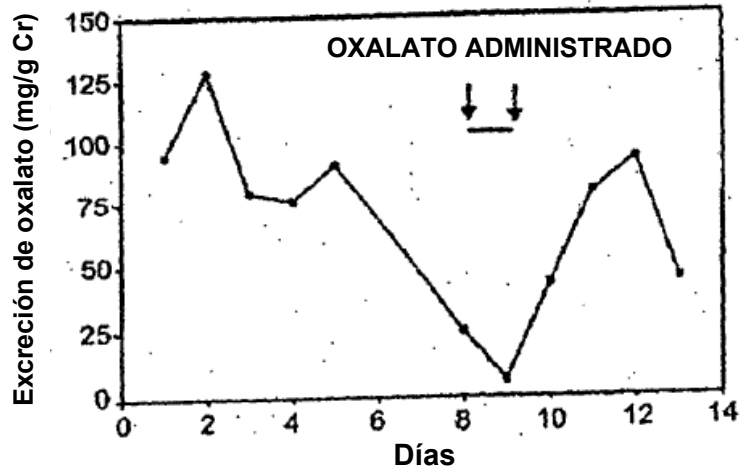


FIG. 3C

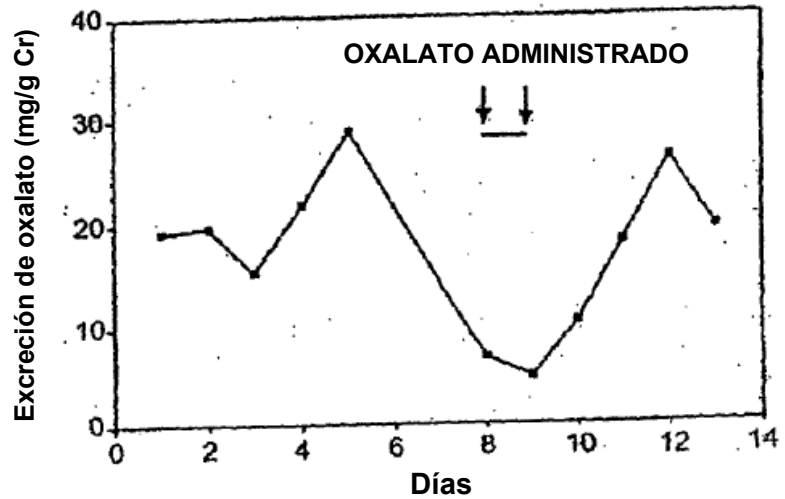


FIG. 4

Tabla 1: EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DE <i>O. FORMIGENES</i> (FORMULACIÓN IxOC-3) EN LA EXCRECIÓN DE OXALATO URINARIO (MICROMOLES/DÍA) EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ALTA 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 <sup>a</sup>	13,63 ± 2,53 <sup>b</sup>
III (Dosis alta)	4,04 ± 1,27	14,22 ± 3,00	12,74 ± 2,69	13,60 ± 3,29 <sup>a</sup>	14,57 ± 4,64 <sup>c</sup>
Grupo I = 1% oxalato (HOD) + 0 ufc			<sup>a</sup> p < 0,0001 en comparación con el Grupo I		
Grupo II = HOD + 10 <sup>6</sup> ufc de <i>O. formigenes</i>			<sup>b</sup> p < 0,0022 en comparación con el Grupo I		
Grupo III = HOD + 10 <sup>7</sup> ufc de <i>O. formigenes</i>			<sup>c</sup> p < 0,0041 en comparación con el Grupo I		

FIG. 5

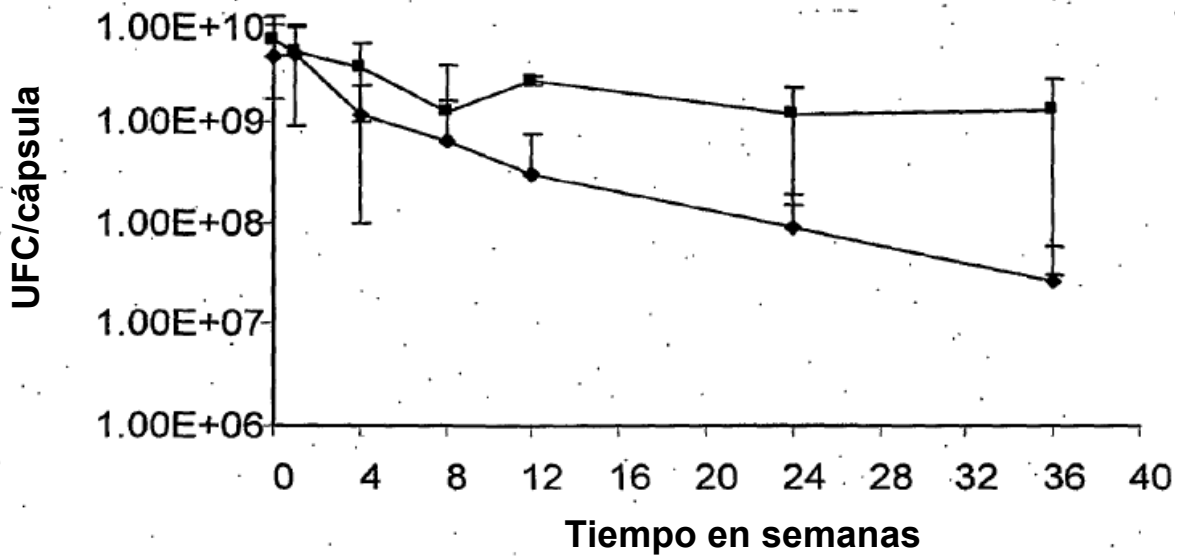




FIG. 6

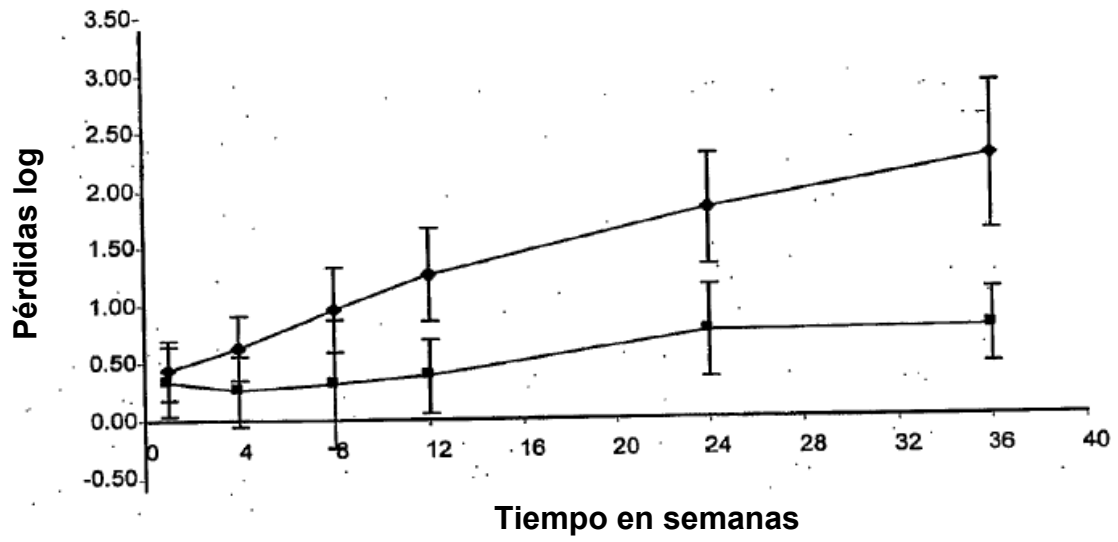


FIG.7

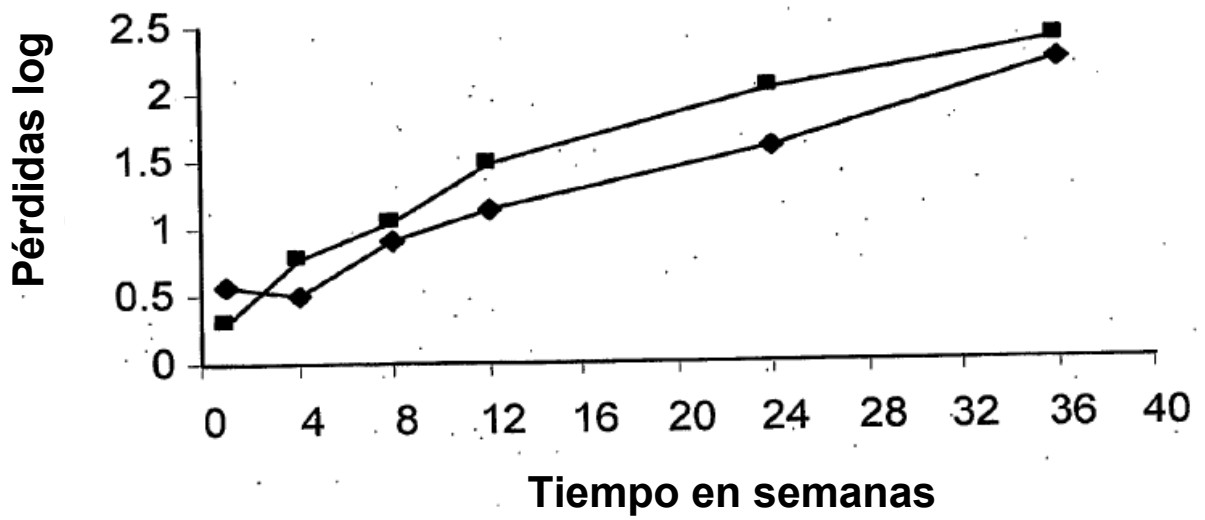


FIG. 8

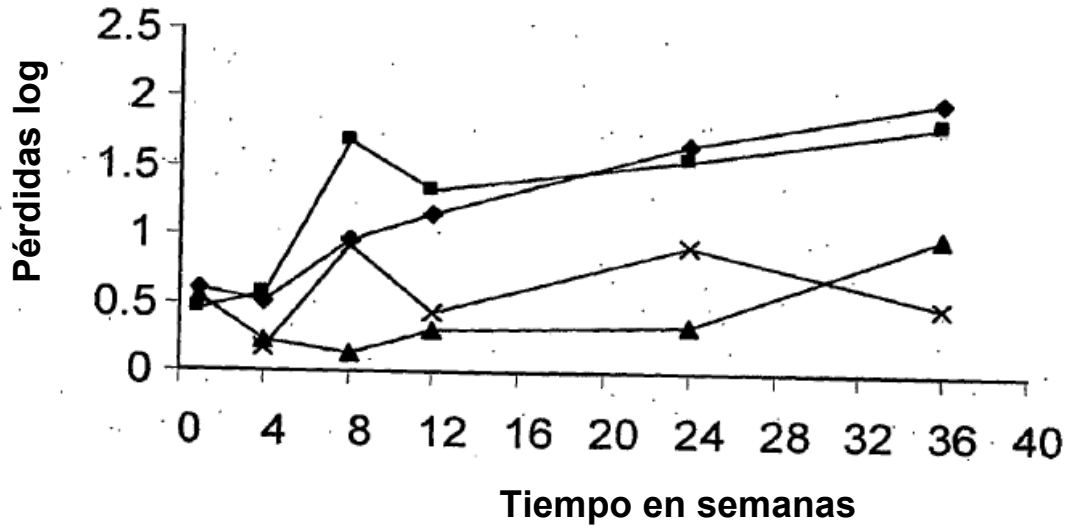


FIG. 9

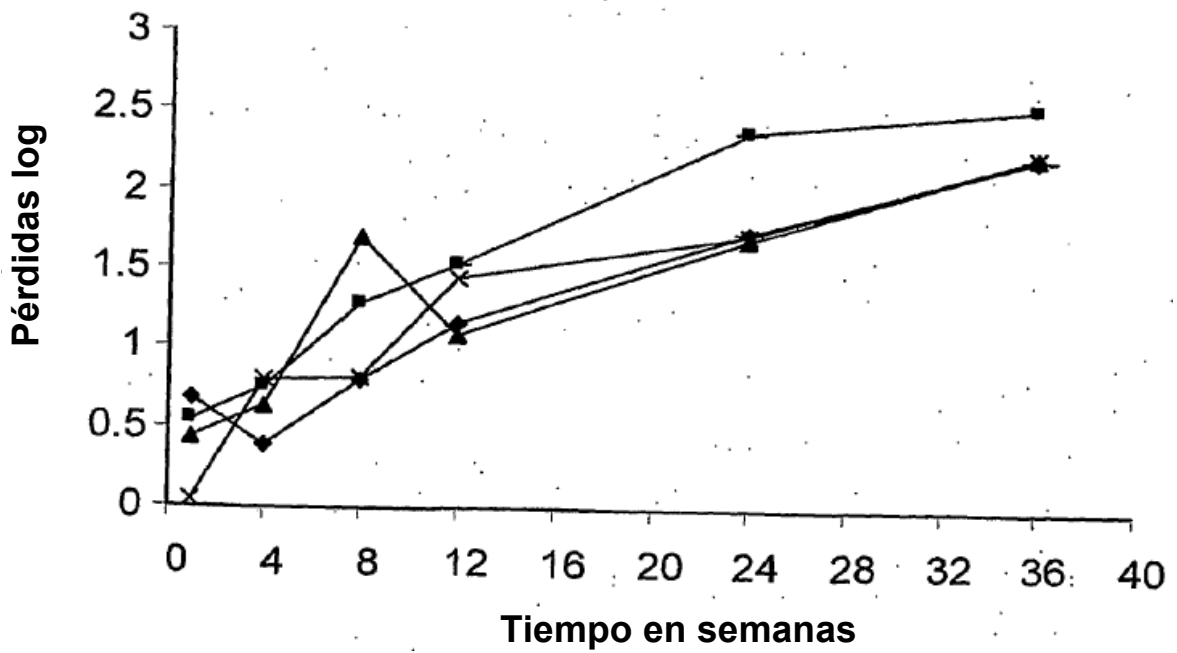


FIG. 10

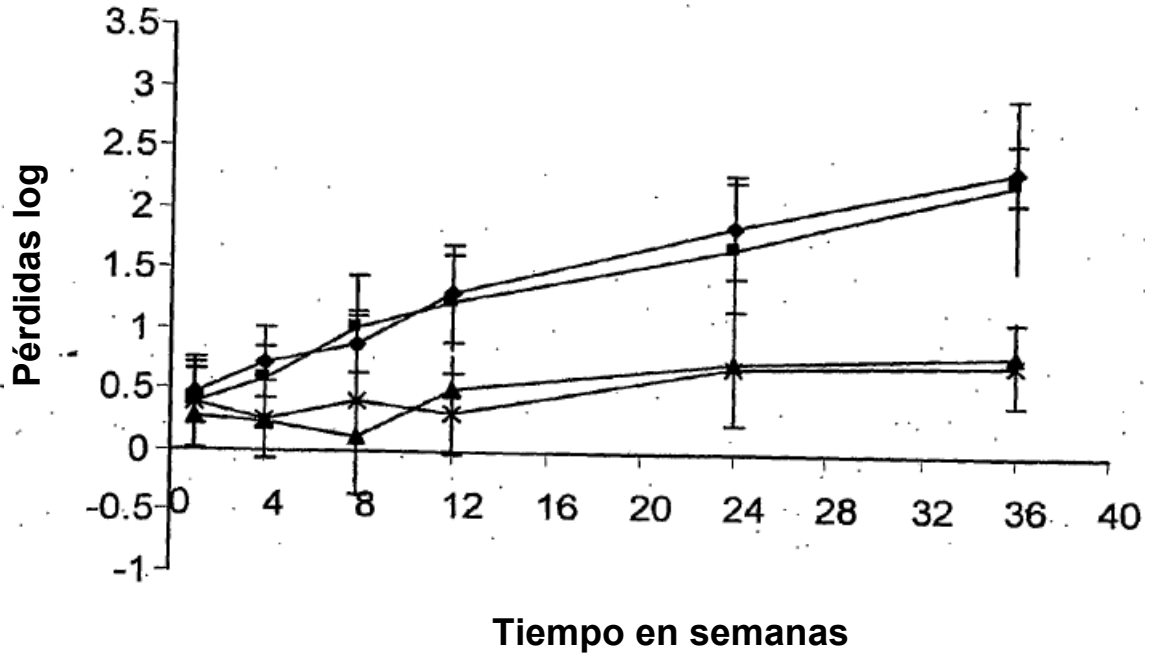


FIG. 11

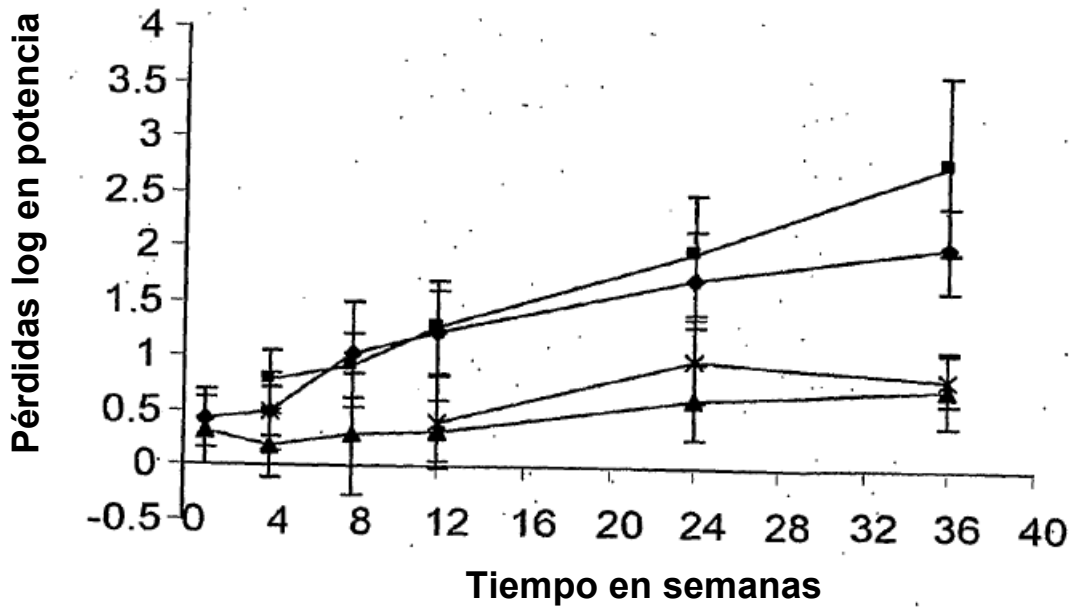


FIG. 12

