

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 269**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 38/51 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2009** **E 09164430 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 2270138**

54 Título: **Purificación y aislamiento de enzimas de degradación de oxalato recombinantes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2018

73 Titular/es:
OXTHERA INTELLECTUAL PROPERTY AB
(100.0%)
Dragarbrunnsgatan 45
75320 Uppsala, SE

72 Inventor/es:
COWLEY, AARON BLAKE;
GÖLANDER, CARL-GUSTAF;
LI, QINGSHAN y
SIDHU, HARMEET

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

ES 2 673 269 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

Purificación y aislamiento de enzimas de degradación de oxalato recombinantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para aislar una proteína recombinante que es insoluble en el citoplasma de una célula hospedadora y que no se halla como un cuerpo de inclusión, que se considera un precipitado de proteínas inactivas mal plegadas, que comprende,

a) separar una proteína recombinante insoluble que no se halla como un cuerpo de inclusión de las proteínas solubles de la célula hospedadora; y

b) solubilizar la proteína recombinante separada.

10 Antecedentes de la invención

La litiasis renal/del tracto urinario (urolitiasis) es un problema sanitario importante en todo el mundo. La mayoría de cálculos asociados a urolitiasis están compuestos de oxalato cálcico solamente u oxalato cálcico más fosfato cálcico. También se han asociado otros estados patológicos al oxalato en exceso. Estos incluyen vulvodinia, oxalosis asociada a nefropatía terminal, trastornos de la conductancia cardiaca, enfermedad de Crohn, y otros estados patológicos entéricos.

20 El ácido oxálico, y/o sus sales, los oxalatos, se hallan en una amplia diversidad de alimentos, y, por lo tanto, son un componente de muchos constituyentes de las dietas humanas y animales. La absorción incrementada de oxalato se puede dar después de la ingestión de alimentos que contienen cantidades elevadas de ácido oxálico. Se sabe bien que alimentos tales como la espinaca y el ruibarbo contienen cantidades elevadas de oxalato, pero un gran número de otros alimentos y bebidas también contienen oxalato. Debido a que el oxalato se halla en una amplia diversidad de alimentos, es difícil formular dietas que sean bajas en oxalato y que también sean sabrosas. Además, el cumplimiento de una dieta baja en oxalato a menudo es problemático.

25 El riesgo de formación de cálculos renales se centra en varios factores que todavía no se comprenden completamente. La litiasis renal o del tracto urinario se da en hasta un 12% de la población en los países occidentales, y alrededor del 70% de estos cálculos están compuestos de oxalato cálcico o de oxalato cálcico más fosfato cálcico. Ciertos individuos (p.ej. los pacientes con una enfermedad intestinal tal como la enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, o esteatorrea, y también los pacientes que se han sometido a cirugía de derivación yeyunoileal) absorben más oxalato de sus dietas que los demás. Para estos individuos, la incidencia de la urolitiasis por oxalato se incrementa notablemente. La incidencia incrementada de la enfermedad se debe a los niveles incrementados de oxalato en los riñones y la orina, y esto, el síndrome hiperoxalúrico más frecuente en seres humanos, se conoce como hiperoxaluria entérica. El oxalato también es un problema en los pacientes con nefropatía terminal, y existen pruebas recientes de que el oxalato urinario elevado también está implicado en la vestibulitis vulvar (vulvodinia).

35 Se han propuesto composiciones con revestimiento entérico u otras composiciones que comprenden bacterias reductoras de oxalato para reducir las concentraciones de oxalato durante el paso a través del intestino antes de que sea absorbido de manera sistémica. Las composiciones con revestimiento entérico pasan a través del estómago en una forma intacta, es decir, el revestimiento está intacto y, por lo tanto, el oxalato no se degradará en el estómago. Una aproximación mejor es reducir el oxalato en el estómago antes de que se absorba en el intestino. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar composiciones que permitan la reducción del oxalato en el estómago para reducir, por ejemplo, el oxalato de la dieta. Además, tales composiciones son adecuadas para el uso en el tratamiento de hiperoxalurias entéricas y de absorción, tales como las hiperoxalurias que provocan litiasis recurrentes. Un objetivo de tal tratamiento es que los pacientes tengan niveles normales, o al menos reducidos, de oxalato urinario.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona un método para el aislamiento y la purificación de proteínas recombinantes que son insolubles o solamente ligeramente solubles en el citoplasma de una célula hospedadora, y que no se hallan como cuerpos de inclusión de la célula hospedadora. En particular, las proteínas recombinantes son enzimas de degradación de oxalato recombinantes.

Descripción de las figuras

50 La Fig. 1 es un cromatograma de OxDC de tipo natural eluida de una columna de Fenil-Sepharose mediante elución salina en gradiente segmentado. Los picos 1 y 2 contienen OxDC, pero el pico 1 contiene un 80-90% de OxDC con una actividad específica superior (50-60 U/mg de OxDC pura) y el pico 2 contiene un 30-70% de OxDC con una actividad específica inferior (30-50 U/mg de OxDC pura). Se propone la teoría de que la OxDC del pico 2 estuvo dañada o plegada de manera incorrecta. El pico 3 son impurezas.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la excreción urinaria media de oxalato en ratas alimentadas con 0 mg de oxalato (valor de referencia, sin ox), 2,3% de oxalato potásico (HOD) y partículas de oxalato descarboxilasa (Oxazyme) junto con un 2,3% de oxalato potásico. El oxalato urinario se normaliza respecto de creatinina, y es la acumulación de la orina recogida de los días 4 y 9. Ox/Cr es Oxalato/creatinina.

5 Descripción detallada de la invención

Como se deduce de lo anterior, la presente invención proporciona un método para el aislamiento y la purificación de proteínas recombinantes, en particular enzimas de degradación de oxalato.

En la presente memoria se describen además partículas secadas por atomización que comprenden una o más enzimas de degradación de oxalato, y las composiciones que comprenden tales partículas.

10 Así, en la presente memoria se describe un desarrollo adicional de composiciones previamente descritas y un método para tratar las enfermedades relacionadas con oxalato, véase p.ej. el documento WO 2007/075447 (del mismo solicitante). Además, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las mutaciones específicas de la oxalato descarboxilasa de tipo natural, en particular mediante la sustitución de un residuo de cisteína en la posición 383 con serina, alanina o arginina, confieren propiedades fisicoquímicas a la enzima que son especialmente ventajosas en el aislamiento y la purificación de la enzima. Así, el presente método de aislamiento y purificación implica menos etapas que las que se contemplan normalmente, y utiliza las variaciones de solubilidad de las enzimas en el citoplasma y en los medios de purificación.

Además, en la presente memoria se describe una solución más simple para administrar enzimas de degradación de oxalato activas en el estómago. En el documento WO 2007/075447 (del mismo solicitante) se describen composiciones que contienen partículas que tienen un contenido de enzimas de degradación de oxalato. Las partículas contienen una combinación de diversos polímeros, y se protegen del medio hostil del estómago mediante múltiples capas de polímeros y/o mediante la reticulación de los polímeros para fortalecer la resistencia hacia la pepsina y el pH del estómago. Sin embargo, se ha desarrollado una solución más simple que utiliza un grupo muy específico de polímeros, en particular poli(met)acrilatos, en combinación con una o más enzimas de degradación de oxalato. Las partículas se preparan mediante el uso de un proceso suave, concretamente secado por atomización. Incluso si las enzimas no se pueden proteger completamente del medio del estómago incorporándolas en partículas secadas por atomización, los ejemplos de la presente memoria muestran una actividad notable tras el método de secado por atomización y tras la exposición a un medio gástrico simulado.

Definiciones

30 La expresión "enzima reductora de oxalato", tal como se usa en la presente memoria, pretende indicar cualquier enzima que es capaz de reducir el oxalato. Puede reducir el oxalato por sí misma, y/o puede funcionar en una ruta de reducción de oxalato. En este contexto, el término "oxalato" abarca el ácido oxálico y/o cualquier sal del mismo (oxalato).

35 Las enzimas usadas en las partículas, composiciones y métodos incluyen, pero sin limitación, oxalato oxidasa, oxalato descarboxilasa (abreviada OxDc), oxalil-CoA descarboxilasa, o formil-CoA transferasa, o combinaciones de las mismas, ya sean nativas o mutadas. Además, otras enzimas, cofactores y coenzimas que son sustituyentes de las rutas de degradación de oxalato o que están implicadas en las rutas metabólicas de oxalato, en particular la reducción de oxalato, también tienen relevancia solas o en combinación con una o más de las enzimas anteriormente mencionadas. En el presente contexto esta definición no solamente abarca las enzimas, sino que también están contempladas por la presente invención las secuencias polinucleotídicas que codifican los genes y las proteínas reductoras de oxalato. También se describe en la presente memoria cualquier molécula de unión de estas enzimas, e incluye los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen o interaccionan con las enzimas.

45 Las enzimas se pueden obtener mediante aislamiento a partir de organismos, se pueden purificar, se pueden producir de manera sintética, semi-sintética o mediante medios recombinantes, o se pueden usar en forma de un lisado celular. Normalmente, las enzimas se emplearán en forma de proteínas recombinantes purificadas. Cuando se utilizan en un uso médico (como un fármaco) o en alimentos (como suplemento alimentario, alimento funcional o como una medida profiláctica), se prefiere que la o las enzimas usadas estén bien definidas con respecto a la pureza y actividad. En general se emplean una o más enzimas, mutadas o de tipo natural, de las tres clases principales de enzimas de degradación de oxalato. La oxalato oxidasa se expresa en las plantas superiores y cataliza la oxidación dependiente de oxígeno de oxalato a CO₂ con la formación concomitante de H₂O₂. Esta reacción es el fundamento de los ensayos actuales para la detección de los niveles de oxalato urinario. Se ha desarrollado un procedimiento de purificación de tres etapas rOxOx para obtener oxalato oxidasa a partir de raíces de cebada. Esta enzima también está presente en el tallo y la raíz de remolacha, hojas de amaranto, sorgo y otros muchos cereales.

55 La oxalato descarboxilasa (EC 4.1.1.2), la segunda clase de enzimas de metabolización de oxalato, está presente principalmente en hongos. Se ha informado y caracterizado en varios hongos tales como *Myrothecium verrucaria*, ciertas cepas de *Aspergillus niger*, hongo de pudrición blanca, *Coriolus versicolor* y *Collybia velutipes*. Esta enzima convierte el oxalato en formiato y dióxido de carbono en una reacción dependiente de oxígeno. Las oxalato descarboxilasas también se han usado en el ensayo clínico de oxalato en sangre y orina, y se pueden usar para

reducir los niveles de oxalato en los alimentos y el medio. La proteína YvrK (la oxalato descarboxilasa de *B. subtilis*) se ha expresado como una proteína recombinante funcional en *E. coli*, se ha purificado hasta homogeneidad y se ha caracterizado completamente.

5 La oxalil-CoA descarboxilasa es activa sobre el sustrato activado con CoA, y lo convierte en formil-CoA. Después actúa una formil-CoA transferasa para intercambiar el formiato y oxalato en la CoA. Estas enzimas se han estudiado en las bacterias reductoras de oxalato, *Pseudomonas oxalaticus* habitualmente hallada en la tierra, y en *Oxalobacter formigenes*, que reside en el tracto GI de vertebrados y seres humanos. Las enzimas se han revisado completamente en "The enzymes of oxalate metabolism: Unexpected structures and metabolism" Svedruzic D. et al. Arch Biochem Biophys. 1 de enero de 2005;433(1): 176-92, que se incorpora en la presente memoria en su totalidad.

10 Las enzimas, ya sean enzimas nativas, proteínas aisladas o las producidas mediante técnicas recombinantes, se pueden modificar por medios recombinantes o químicos, y pueden contener grupos laterales u otras moléculas unidas. Por ejemplo, las enzimas se pueden modificar para que tengan moléculas ligadoras para la unión a otras moléculas o compuestos químicos.

15 Como se observa a partir de los ejemplos de la presente memoria, las mutaciones específicas de la oxalato descarboxilasa que conducen a una sustitución de aminoácido para la cisteína 383 son ventajosas (p.ej. C383S, C383A, C383R). Por lo tanto, tales enzimas recombinantes tienen un interés específico en los diversos aspectos de la presente invención.

Tal como se usa en la presente memoria, el singular de la expresión "una enzima" se refiere a múltiples copias de la molécula de enzima, como se entiende habitualmente con respecto a las moléculas de proteínas.

20 Tal como se usa en la presente memoria, enzima incluye las proteínas de enzimas recombinantes.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "una o más enzimas" significa que puede haber presente un tipo de enzima, tal como formil-CoA transferasa, o más de un tipo de enzima, tal como una composición que comprende, por ejemplo, oxalil CoA descarboxilasa y formil CoA transferasa; en la composición hay presente oxalato descarboxilasa y oxalato oxidasa, o una combinación de enzimas de tipo natural y enzimas mutantes.

25 La expresión "cuerpo de inclusión" (que también se podría denominar "cuerpo de inclusión de proteínas" o "cuerpo de inclusión citoplasmático") significa un cuerpo formado por la agregación de cadenas polipeptídicas insolubles que se halla en el citoplasma de las células. Tales cuerpos de inclusión se observan en las células procarióticas que sirven como hospedadores para las proteínas exógenas producidas de manera recombinante. Actualmente se cree que la mayoría de las proteínas recombinantes en los cuerpos de inclusión están mal plegadas o son biológicamente inactivas, aunque se ha observado cierta actividad en proteínas fluorescentes producidas de manera recombinante.

30 Como es evidente a partir de lo anterior, la invención no se refiere a las proteínas recombinantes halladas en forma de cuerpos de inclusión inactivos cuando se expresan en un hospedador tal como, p.ej., *E. Coli* y, por lo tanto, la invención se refiere a enzimas recombinantes que se expresan y dan como resultado un estado plegado que posibilita la existencia de formas enzimáticamente activas.

35 El término "partículas" se usa en la presente memoria para describir las composiciones que contienen uno o más tipos de una enzima reductora de oxalato combinada con un polímero. En general, el término "partículas" se usa como el término más amplio, es decir, sin ningún tamaño específico o atributo de forma.

El término "partículas secadas por atomización" significa partículas que se obtienen mediante un método de secado por atomización.

40 Se debe indicar que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una", "uno" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

Método para el aislamiento y la purificación de proteínas recombinantes, en particular enzimas de degradación de oxalato

45 La presente invención proporciona un método para el aislamiento y la purificación de proteínas recombinantes a partir de células hospedadoras. El método comprende purificar enzimas reductoras de oxalato mediante el uso de etapas eficaces y simplificadas que dan como resultado rendimientos mejorados de proteína.

50 Las proteínas recombinantes pueden incluir enzimas reductoras de oxalato mutadas. Los métodos de la presente invención se dirigen a las proteínas recombinantes que están presentes en el citoplasma de una célula hospedadora en forma de enzimas activas, que no son solubles en el citoplasma y parecen estar precipitadas, pero que no se hallan en forma de cuerpos de inclusión. Se cree que tales proteínas son insolubles o solamente ligeramente solubles en el citoplasma de la célula hospedadora. Un aspecto de la presente invención comprende la lisis de la célula hospedadora y la separación facilitada de la proteína recombinante a partir de las proteínas citoplasmáticas solubles. La separación se puede llevar a cabo fácilmente mediante centrifugación o filtración del citoplasma.

55 Tras la separación, la proteína recombinante se solubiliza preferentemente mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, la adición de ligandos de unión o la alteración del pH. Una vez soluble, la proteína se puede retirar de la

disolución, por ejemplo, mediante precipitación, y se puede almacenar o usar, tal como en las partículas descritas en la presente memoria.

Los métodos de la presente invención comprenden métodos para el aislamiento y la purificación de enzimas reductoras de oxalato recombinantes, tales como enzimas reductoras de oxalato recombinantes mutadas. La expresión de proteínas recombinantes a menudo da como resultado la reclusión de las proteínas en cuerpos de inclusión en *E. coli*, ya que las proteínas en los cuerpos de inclusión plantean mucha menos carga tóxica para las células hospedadoras que las proteínas recombinantes solubles. Las proteínas de los cuerpos de inclusión también son menos accesibles para la degradación mediante las proteasas de *E. coli* debido a la forma insoluble. Sin embargo, el replegamiento de las proteínas de los cuerpos de inclusión para producir enzimas activas es bastante difícil. Si una proteína se puede expresar en una forma activa, pero insoluble o solamente ligeramente soluble en células de *E. coli* durante la expresión, y no se halla en forma de cuerpos de inclusión, la expresión de la proteína podría darse a niveles similares a los observados cuando se forman cuerpos de inclusión.

Las proteínas que tienen una solubilidad limitada en el citoplasma y, así, que precipitan en el citoplasma de las células, no requerirían una etapa de replegamiento.

Por ejemplo, la proteína recombinante de tipo natural de oxalato descarboxilasa (OxDC) tiene un cierto nivel de solubilidad en el citoplasma de *E. coli*, con una porción más pequeña (5%, Tabla 1) hallada en forma de proteína soluble en el lisado celular y una porción mayor (95%, Tabla 1) hallada en forma de proteína insoluble en el sedimento de células fragmentadas. La porción insoluble se puede disolver a concentraciones salinas elevadas tales como NaCl 1 M o $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 0,75 M, y la OxDC disuelta contiene dos formas principales que se pueden separar mediante una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (Fig. 1). Ambos picos de OxDC son activos, pero la OxDC del pico eluido a concentraciones salinas superiores (pico 1, Fig. 1) muestra alrededor de un 20% más de actividad específica. Parece que la OxDC del pico eluido a concentraciones salinas inferiores (pico 2, véase la Fig. 1) está dañada. Esta fracción de proteína es más hidrófoba y menos activa. Las proteínas solubles del citoplasma son más accesibles al daño por la hidrólisis por proteasas, otras enzimas que catalizan reacciones, reacciones químicas y modificaciones físicas.

Se ha informado ampliamente de proteínas expresadas como cuerpos de inclusión, pero no existen informes sobre cómo expresar una proteína en un estado insoluble o ligeramente insoluble, tal como un precipitado, y en una forma activa. El tener una proteína recombinante hecha menos soluble en el citoplasma del hospedador conduce a un método simplificado de purificación para la proteína. Debido a que la proteína recombinante es insoluble o tiene una solubilidad inferior, las proteínas solubles del organismo hospedador, tal como *E. coli*, se separan fácilmente mediante centrifugación o filtración, en general como una primera etapa tras la lisis de la célula hospedadora. La proteína recombinante insoluble o ligeramente soluble, hallada en el sedimento de centrifugación o el resto tras la filtración, se puede tratar, tal como mediante solubilización con un tampón selectivo. Se halla un tampón selectivo mediante la selección del pH y/o mediante el cribado de los ligandos de unión específica. Muchas proteínas tienen una solubilidad muy limitada cuando el pH está cerca del pI, pero tienen una solubilidad incrementada cuando el pH está más de 2 unidades de pH por encima o por debajo del pI. La solubilidad de la proteína se puede cambiar también suspendiendo el sedimento en disoluciones que contienen ligandos de unión. Por ejemplo, OxDC tiene una solubilidad limitada a pH 4,5-7,8 para la proteína recombinante de tipo natural y a pH 4,0-8,0 para la proteína mutante C383S. C383 indica la cisteína del aminoácido 383 en la secuencia de aminoácidos de la oxalato descarboxilasa. La S indica que la cisteína se ha sustituido con una serina. La solubilidad de OxDC se incrementa si el pH es mayor de 8,5 para la OxDC de tipo natural y 9,0 para el mutante C383S. Tris y arginina son ligandos de unión selectiva a OxDC, y el uso de cualquiera de ellos incrementará la solubilidad de OxDC. Los métodos de la presente invención comprenden etapas de purificación que comprenden añadir ligandos de unión o cambiar el pH de los medios para favorecer la solubilidad de las enzimas o proteínas halladas en un sedimento tras la centrifugación, o la fracción retenida tras la filtración, de la proteína soluble de una célula hospedadora.

Además, tales métodos de aislamiento de una enzima reductora de oxalato recombinante mutada pueden dar como resultado cantidades incrementadas de la proteína recuperada, y cantidades mayores que las observadas con la enzima reductora de oxalato recombinante de tipo natural. Los métodos también tienen normalmente menos etapas, de forma que es posible un proceso de purificación más simple. Por ejemplo, las proteínas solubles del organismo hospedador, tal como *E. coli*, se separan, tal como mediante centrifugación o filtración, de la proteína recombinante que es insoluble o tiene una solubilidad inferior que las proteínas del hospedador en el citoplasma de la célula hospedadora. Las proteínas recombinantes mutadas reductoras de oxalato pueden no ser como la proteína recombinante de tipo natural en otros aspectos, tales como que las proteínas mutadas pueden no formar interacciones proteína-proteína que conduzcan a la formación de agregados. Por ejemplo, la sustitución del aminoácido de cisteína en la oxalato descarboxilasa da como resultado una proteína mutada que no puede formar enlaces disulfuro, lo que conduce a menos agregados de proteínas, o a ninguno.

Un ejemplo de un método de la presente invención comprende la lisis de las células hospedadoras que están produciendo la enzima o enzimas reductoras de oxalato mutadas recombinantes. Tras la lisis de las células hospedadoras, por ejemplo, células de *E. coli*, se eliminan todas las proteínas solubles del hospedador, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. La proteína recombinante, tal como una enzima reductora de oxalato recombinante mutante, que no es soluble o es solamente ligeramente soluble en el citoplasma de la célula

hospedadora, y que no se halla en forma de un cuerpo de inclusión, se halla en el sedimento de centrifugación o como la fracción retenida en la filtración. La proteína mutante se solubiliza después, tal como mediante solubilización con un tampón selectivo o un ligando de unión, u otros métodos conocidos para los expertos en la técnica. Se puede determinar un tampón selectivo, por ejemplo, mediante los parámetros de pH. Muchas proteínas tienen una solubilidad limitada cuando el pH está cerca del pI, pero tendrán una solubilidad incrementada cuando el pH esté más de 2 unidades de pH por encima o por debajo del pI. Por ejemplo, OxDC tiene una solubilidad limitada a pH 4,5-7,8 para la proteína recombinante de tipo natural y a pH 4,0-8,0 para la proteína recombinante mutante C383S.

La solubilización se puede ver afectada también por los ligandos de unión de proteínas. La solubilidad de la proteína puede cambiar cuando hay ligandos de unión en disolución. Esta propiedad se puede aplicar a la purificación de proteínas por medio de precipitación selectiva y disolución. Los ligandos de unión para una proteína particular se pueden hallar mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, tales como calorimetría de barrido diferencial, espectroscopía UV, espectroscopía infrarroja, espectroscopía de fluorescencia y otros métodos que detectan las interacciones de ligandos y proteínas. Por ejemplo, existen varios compuestos químicos e iones que se pueden unir a OxDC e influir en la solubilidad tales como Tris, arginina, Mn^{2+} , Mg^{2+} , y Ca^{2+} . Es preferible usar compuestos o iones que no inhiban la actividad de la enzima o, si los compuestos o iones inhiben la actividad, es preferible que los compuestos o iones se eliminen fácilmente para recuperar las enzimas activas. Por ejemplo, Tris y arginina no inhiben la actividad de OxDC e incrementan la solubilidad de OxDC cuando el pH es mayor de 8,0 para la OxDC de tipo natural y 8,5 para el mutante C383S de OxDC.

Los métodos de la presente invención para el aislamiento y la purificación de una enzima reductora de oxalato recombinante mutante pueden comprender uno o ambos de solubilidad baja de la proteína mutante recombinante en el citoplasma del hospedador, y solubilidad elevada de la enzima reductora de oxalato recombinante mutante tras cambiar las condiciones de solubilización, tal como añadiendo ligandos de unión y ajustando el pH.

En los procesos usados actualmente para aislar y purificar proteínas recombinantes, a menudo surgen problemas con el uso de grandes columnas de cromatografía que son difíciles de construir y utilizar a la escala que es necesaria para el aislamiento y purificación a gran escala. Este proceso se demuestra en el Ejemplo 1. La eliminación de tales etapas conduciría a un coste inferior para la purificación y a un proceso más simple, que se demuestra en el Ejemplo 4.

Los métodos de la presente invención comprenden la purificación o el aislamiento de una proteína recombinante a partir de células hospedadoras. Los métodos de aislamiento comprenden aislar una proteína recombinante que es ligeramente insoluble a insoluble en el citoplasma del organismo hospedador. Las etapas de aislamiento comprenden obtener un lisado de las células hospedadoras, lavar el lisado, tal como mediante la resuspensión del lisado y la centrifugación para formar un sedimento de lisado; suspender el sedimento de lisado en un medio de solubilización de proteínas, tal como un medio que contiene ligandos de unión u otros compuestos que alteran la respuesta al pH de la proteína (p.ej., incrementan la solubilidad de la proteína); centrifugar la mezcla y actuar sobre la fase líquida, no el sedimento insoluble. La proteína recombinante se retira de la fase líquida. Por ejemplo, se ajusta el pH de la fase líquida y la proteína recombinante precipita de la disolución. El sedimento insoluble se puede re-extraer varias veces para formar fases líquidas de las que se retira la proteína recombinante, tal como mediante precipitación. La proteína retirada se puede lavar una o más veces y almacenarla o usarla según sea necesario.

Las enzimas que son insolubles o solamente ligeramente solubles en el citoplasma y que no se hallan en forma de un cuerpo de inclusión de las células hospedadoras, tales como *E. coli*, y se aíslan mediante los métodos enseñados en la presente memoria, pueden comprender enzimas reductoras de oxalato no nativas o mutadas recombinantes que comprenden modificaciones o mutaciones, que incluyen, pero sin limitación, las quimeras formadas mediante el uso de dominios que comprenden el sitio activo reductor de oxalato de una enzima reductora de oxalato, o fragmentos de péptidos, en particular los que comprenden o consisten en los sitios activos; modificaciones o mutaciones que incluyen, pero sin limitación, deleciones, inserciones, sustituciones, inversiones, mutaciones para una actividad incrementada, sustitución de aminoácidos naturales con aminoácidos no naturales, u otras modificaciones conocidas para los expertos en la técnica. Tales enzimas modificadas pueden tener más, menos o la misma actividad que las enzimas nativas, o pueden tener características que son iguales o diferentes de las enzimas nativas o sin modificar. La presente invención contempla métodos y composiciones que comprenden enzimas completas, fragmentos, péptidos, regiones de unión, sitios activos u otras regiones funcionales, segmentos, secuencias y promotores y secuencias de control de enzimas reductoras de oxalato.

La presente invención comprende proteínas recombinantes mutadas para provocar que las proteínas sean insolubles o solamente ligeramente solubles en el citoplasma del hospedador en tasas mayores que las observadas en las proteínas recombinantes de tipo natural o sin mutar. Además, estas proteínas recombinantes no se hallan como cuerpos de inclusión en la célula hospedadora. Existen varios métodos para modificar la solubilidad de las proteínas, tales como la sustitución de residuo(s) hidrófilo(s) con residuo(s) menos hidrófilo(s), la sustitución de aminoácido(s) cargado(s) con aminoácido(s) no cargado(s), y/o la adición de cola(s) de péptidos hidrófobos en el extremo C- y/o N-terminal. Las modificaciones no deberían inactivar la proteína, y la proteína modificada con una solubilidad baja se debería expresar en una forma activa por parte de la célula hospedadora, tal como mediante *E. coli*. En la presente memoria se describen métodos para la mutación de enzimas reductoras de oxalato, y las enzimas mutantes, que incluyen, pero sin limitación, oxalato descarboxilasa, oxalato oxidasa, oxalil Co-A

descarboxilasa y formil CoA transferasa. Las mutaciones preferiblemente no disminuirían o inactivarían la funcionalidad de la enzima.

5 En la presente memoria se describen ejemplos de mutaciones. Los extremos N- y C-terminales de OxDC están lejos de los sitios catalíticos, y son bastante flexibles. La flexibilidad de los dos extremos, tal como se determina a partir de la cristalografía de rayos X, revela que los primeros 7 aminoácidos de la cola N-terminal y los últimos 6 aminoácidos del extremo C-terminal no dieron difracción debido a la heterogeneidad conformacional. Entre los 6 residuos del extremo C-terminal se eligió C383 para la mutación, ya que hay muchos aminoácidos más hidrófobos o hidrófilos que Cys que se pueden seleccionar para sustituirla. C383 representa la cisteína de la posición 383 en la secuencia de aminoácidos de la oxalato descarboxilasa. Además, C383 es la única Cys de OxDC, pero se ha demostrado que forma fácilmente enlaces disulfuro entre los hexámeros de OxDC, y además genera agregados. La sustitución de C383 puede eliminar la formación de tales agregados, y así incrementa la estabilidad de OxDC en disolución. Las mutaciones se introdujeron en la región del extremo C-terminal.

15 Se crearon múltiples genes a partir de la secuencia original del gen *yvrk* (el *yvrk* de tipo natural) de oxalato descarboxilasa. El gen original fue de *Bacillus subtilis*, y la secuencia del gen se optimizó para la expresión en *E. coli* mediante el uso de un algoritmo de GenScript Corporation, Piscataway, NJ. El gen se optimizó con respecto al uso de codones, se equilibró el contenido de GC, se eliminaron elementos repetitivos, y se aseguró la ausencia de sitios de restricción internos para la clonación. El gen con optimización de codones dio como resultado una proteína con la secuencia de aminoácidos idéntica al *yvrk* de tipo natural.

20 Después se hicieron modificaciones en el único codón de cisteína del gen *yvrk* de tipo natural y del gen *yvrk* optimizado, lo que dio como resultado secuencias génicas únicas adicionales. El codón de cisteína se sustituyó con un codón de serina, arginina, o alanina.

25 La secuencia génica del gen *yvrk* de tipo natural se puede optimizar para sistemas de expresión adicionales, tales como *Pichia* o *Saccharomyces*, mediante el uso de los mismos métodos. Además, la expresión en un sistema de expresión en *Bacillus* se puede mejorar optimizando el gen para un uso de codones y contenido de GC óptimos, y la eliminación de elementos repetitivos. La optimización de codones se puede usar también para la modificación de la estructura secundaria de la proteína en posiciones distintas del codón de cisteína ya modificado, o además de la modificación de cisteína, por ejemplo, como método para mejorar la pegilación, la unión a microesferas o la encapsulación, como método para mejorar la estabilidad a pHs bajos, o como método para mejorar la actividad de la proteína.

30 SEQ ID 1

Secuencia *yvrk* original con el codón de cisteína marcado en negrita.

```

AAAAACAAAATGACATTCCGCAGCCAATTAGAGGAGACAAAGGAGCAACGGTAA
AAATC
CCGCGCAATATTGAAAGAGACCGGCAAAACCCTGATATGCTCGTTCCGCCTGAAA
CCGAT
CATGGCACCGTCAGCAATATGAAGTTTTTCATTCTCTGATACTCATAACCGATTAGA
AAAA
    
```

ES 2 673 269 T3

GGCGGATATGCCCGGGAAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATTTAGAAAACCTTG
CATCC
GTAAATATGCGGCTGAAGCCAGGCGCGATTGCGGAGCTTCACTGGCATAAAGAA
GCTGAA
TGGGCTTATATGATTTACGGAAGTGCAAGAGTCACAATTGTAGATGAAAAAGGGC
GCAGC
TTTATTGACGATGTAGGTGAAGGAGACCTTTGGTACTTCCCGTCAGGCCTGCCGC
ACTCC
ATCCAAGCGCTGGAGGAGGGAGCTGAGTTCCTGCTCGTGTGTTGACGATGGATCAT
TCTCT
GAAAACAGCACGTTCCAGCTGACAGATTGGCTGGCCACACTCCAAAAGAAGTCA
TTGCT
GCGAACTTCGGCGTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCTGGCAAAGAAAAAT
ATATA
TTTGAAAACCAACTTCCTGGCAGTTTAAAAGATGATATTGTGGAAGGGCCGAATGG
CGAA
GTGCCTTATCCATTTACTTACCGCCTTCTTGAACAAGAGCCGATCGAATCTGAGGG
AGGA
AAAGTATACATTGCAGATTGACAACTTCAAAGTGTCTAAAACCATCGCATCAGC
GCTC
GTAACAGTAGAACCCGGCGCCATGAGAGAAGTGCCTGGCACCCGAATACCCAC
GAATGG
CAATACTACATCTCCGGTAAAGCTAGAATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGC
CAGA
ACGTTTAATTACCAAGCCGGTGATGTCGGATATGTACCATTTGCAATGGGTCATTA
CGTT
GAAAACATCGGGGATGAACCGCTTGTCTTTTTAGAAATCTTCAAAGACGACCATTA
TGCT
GATGTATCTTTAAACCAATGGCTTGCCATGCTTCTGAAACATTTGTTCAAGCGCA
CCTT
GACTTGGGCAAAGACTTTACTGATGTGCTTTCAAAGAAAAGCACCCAGTAGTGAA
AAAG
AAAT**GC**AGTAAA

Secuencia del gen *yvrk* optimizada para *E. coli*, con los sitios de restricción en los extremos 5' y 3' (subrayados), y el codón de cisteína indicado en negrita.

SEQ ID 2

ES 2 673 269 T3

CATATGAAAAACAGAATGACATTCCACAGCCGATTCGCGGCGATAAAGGCGCGA
CCGTC
AAAATTCCTCGCAATATCGAACGCGACCGCCAGAATCCGGATATGCTGGTGCCGC
CGGAG
ACGGACCATGGCACGGTGTCTAACATGAAATTCTCTTTTAGCGATACCCACAACC
GCCTG
GAAAAAGGTGGCTACGCGCGCGAGGTTACCGTCCGTGAACTGCCAATTAGCGAA
AATCTG
GCTTCGGTTAACATGCGTCTGAAACCAGGTGCTATCCGTGAGCTGCACTGGCACA
AGGAA
GCGGAATGGGCGTATATGATTTACGGTTCAGCACGTGTTACCATCGTAGACGAGA
AAGGT
CGTAGCTTTATCGATGATGTTGGCGAAGGTGATCTGTGGTATTTCCCATCTGGCCT
GCCG
CATTGATTCAGGCGCTGGAAGAAGGCGCTGAATTTCTGCTGGTGTTGATGATG
GTTCC
TTTTCTGAAAACAGCACGTTCCAGCTGACGGATTGGCTGGCGCACACGCCGAAAG
AAGTC
ATTGCGGCCAATTTTGGGGTAACCAAAGAAGAAATTTCCAACCTGCCGGGCAAAG
AAAAG
TATATTTTTGAGAATCAGCTGCCGGGCTCTCTGAAGGACGATATTGTAGAAGGCC
CTAAC
GGTGAGGTGCCGTATCCGTTACCTATCGTCTGCTGGAGCAGGAACCGATTGAAA
GCGAA
GGCGGTAAAGTTTATATCGCAGATTCCACTAACTTTAAAGTCTCCAAGACCATTGC
CAGC
GCCCTGGTCACCGTGAACCGGGAGCGATGCGCGAGCTGCACTGGCATCCGAA
CACGCAC
GAATGGCAGTATTATATTTCCGGCAAAGCACGCATGACCGTTTTTGCCTCAGATG
GACAC
GCTCGCACGTTTAATTATCAAGCGGGTGTGTTGGCTACGTTCTTTTCGCCATGG
GCCAT
TATGTAGAAAATATCGGCGATGAACCACTGGTGTCTGGAGATCTTTAAAGATGA
CCAC
TATGCCGATGTTTCACTGAATCAGTGGCTGGCCATGCTGCCGAAACTTTTGTTC
GGCG
CATCTGGACCTGGGTAAAGACTTTACGGATGTGCTGAGCAAAGAAAAACACCCGG
TAGTCAAGAAGAAATGCAGTAAAGGATCC

Otras secuencias de la presente invención comprenden el gen yvrk de SEQ ID 1 que comprende las bases 1142-1152 de SEQ ID 3-16. Los N°s 3-8 son serina, los N°s 9-14 son arginina, y los N°s 15-19 son alanina.

SEQ ID 3	ATCTAGTAAA	SEQ ID 12	ACGGAGTAAA
SEQ ID 4	ATCCAGTAAA	SEQ ID 13	AAGAAGTAAA
SEQ ID 5	ATCAAGTAAA	SEQ ID 14	AAGGAGTAAA
SEQ ID 6	ATCGAGTAAA	SEQ ID 15	AGCTAGTAAA
SEQ ID 7	AAGTAGTAAA	SEQ ID 16	AGCCAGTAAA
SEQ ID 8	AAGCAGTAAA	SEQ ID 17	AGCAAGTAAA
SEQ ID 9	ACGTAGTAAA	SEQ ID 18	AGCGAGTAAA
SEQ ID 10	ACGCAGTAAA	SEQ ID 19	AGGAAGTAAA
SEQ ID 11	ACGAAGTAAA		

Partículas que incluyen partículas secadas por atomización

En la presente memoria se describen partículas que comprenden enzimas reductoras de oxalato y un material polimérico. La enzima reductora de oxalato puede ser una enzima reductora de oxalato recombinante mutante.

- 5 Las partículas deberían ser capaces de degradar oxalato en el estómago de un ser humano o animal, es decir, la formación de las partículas puede no conducir a una pérdida notable de la actividad enzimática, y las propiedades de las partículas deben ser proteger a las enzimas contenidas en las partículas de la degradación y/o la inactivación. Así, la enzima debe ser activa a un pH que corresponde al pH hallado normalmente en el estómago (pH 2,5-5 tras una comida) o, de manera alternativa, también se puede incorporar un agente regulador del pH en las partículas o mezclarlo con las partículas antes de la administración. Los agentes reguladores del pH adecuados incluyen las sustancias tamponadoras tales como las conocidas para la persona experta.

10 La formación de partículas (en combinación con el uso de un método específico para preparar las partículas y polímeros o copolímeros específicos empleados) se contempla para proteger a la enzima de la digestión con pepsina, para asegurar la actividad de la enzima. La formación de partículas de proteínas y de material polimérico se describe en la presente memoria. Tal como se usa en la presente memoria, la formación de partículas significa la asociación de proteínas con una disolución polimérica o copolimérica para formar partículas pequeñas que comprenden enzimas activas y polímeros o copolímeros. Tales métodos de formación de partículas de enzima activa incrementan la cantidad de enzima activa en la partícula y pueden incrementar la eficacia de una forma farmacéutica que contenga las partículas al usarlas en un tratamiento o régimen de prevención. La formación de partículas ayuda en la protección de la enzima de la digestión con pepsina.

15 Es importante asegurar que el método empleado para la formación de partículas no implique reactivos, disolventes, temperaturas, aparatos, etc. que conduzca a un riesgo de inactivación de las enzimas. Así, se debería tener cuidado para evitar métodos que impliquen, p.ej., disolventes orgánicos, temperaturas altas y bajas o un pH alto.

20 Existen muchas aproximaciones para la formación de partículas, tales como la coacervación, la separación de fases, la polimerización, el secado por atomización, los métodos electrostáticos, y las aproximaciones de suspensión en aire. El secado por atomización es un método de microencapsulación mecánica desarrollado en la década de 1930. Esta técnica utiliza un fármaco o sustancia activa, mezclada con polímero(s) y/u otros excipientes para formar la alimentación, que puede ser una disolución, suspensión, dispersión, o emulsión. La alimentación se atomiza en gotículas y se introduce en la cámara de secado junto con un gas caliente y seco. Las gotículas pierden humedad en el gas caliente y seco, y se forman polvos secos.

25 Un método adecuado para producir partículas de enzima activa es el secado por atomización. En tal método, la(s) enzima(s) y polímero(s) se dispersan o se disuelven en un medio acuoso y se cargan por medio de un inyector en un aparato adecuado de secado por atomización. Las condiciones son suaves, incluso si se emplean temperaturas relativamente elevadas de entrada y de salida, y los ejemplos de la presente memoria muestran que la actividad de la(s) enzima(s) contenida(s) en las partículas permanece a un nivel elevado, e incluso se han observado niveles mayores. Otros métodos también pueden tener relevancia con tal de que la actividad de la(s) enzima(s) no se destruya gravemente (se debería mantener al menos un 80% de la actividad). Con respecto al secado por atomización, los ejemplos de la presente memoria muestran una actividad restante de al menos un 85%, y también se observan actividades restantes de al menos un 90% y al menos un 100%.

40

En muchos métodos de formación de partículas, la proteína se proporciona normalmente en una disolución. Normalmente, las proteínas de una partícula se distribuyen de manera homogénea, lo que conduce a dificultades para conseguir una concentración eficaz de la enzima dentro de las partículas para proporcionar un nivel adecuado o incrementado de actividad enzimática. En un método de secado por atomización, la proteína se puede proporcionar en disolución o en dispersión o suspensión, en las que la proteína está en un estado sólido, por ejemplo, en forma de una nano- o micro-aglomeración de proteína. Cuando las partículas se proporcionan en el sitio de administración deseado, la nano- o micro-aglomeración de enzima sólida de las partículas se solvata y forma una concentración eficaz de una disolución de enzima. La concentración de enzima puede estar a un nivel tal que se incrementa la actividad específica. Por ejemplo, el mutante C383S de OxDC se disuelve solamente mínimamente en tampones de un pH entre 4,5-7,8, y se puede preparar en forma de una nano- o micro-aglomeración de proteína en una suspensión en agua a pH 4,5-7,8. La suspensión de nano- o micro-aglomeración de C383S se mezcla después con una disolución o suspensión de polímero, y se forman partículas mediante secado por atomización u otras tecnologías de secado. La concentración de la OxDC mutante C383S en las partículas muestra una actividad específica del mutante C383S de hasta un 141% de su actividad específica original. Así, el secado por atomización es el método preferido para producir las partículas.

En los ejemplos no limitantes de la presente memoria se describen métodos de cómo combinar la enzima en un material polimérico. Una persona experta en la técnica puede hallar otros métodos adecuados para el uso para preparar una composición. Mediante la incorporación de la enzima en un material polimérico, la enzima obtiene una cierta protección contra las condiciones similares al jugo gástrico con respecto al pH y la pepsina. La composición resultante de enzima reductora de oxalato aparece en forma de partículas, es decir, unidades discretas de un tamaño de micro- o nanómetros.

Normalmente, las partículas de una composición de la invención tienen un diámetro medio de alrededor de 50 nm a alrededor de 1 mm, tal como, p.ej., de alrededor de 500 nm a alrededor de 500 μ m, de alrededor de 1 μ m a alrededor de 500 μ m, de alrededor de 2 μ m a alrededor de 100 μ m, de alrededor de 4 μ m a alrededor de 80 μ m, de alrededor de 6 μ m a alrededor de 60 μ m, de alrededor de 8 μ m a alrededor de 40 μ m, de alrededor de 10 μ m a alrededor de 20 μ m.

Pueden ser adecuados muchos polímeros y copolímeros diferentes para la formación de partículas, tales como polímeros naturales o sintéticos que incluyen, pero sin limitación, alginato, dextrano, celulosa, colágeno, quitosano, alginato, pectina, ácido hialurónico, PLGA, poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico), poli(ácido láctico), poli(etilen glicol), poli(ésteres), etc.

Sin embargo, en el presente contexto, se ha descubierto que los polímeros Eudragit® conducen al resultado deseado, es decir, al mantenimiento de una actividad adecuada de la enzima y a una protección suficiente de la enzima hacia la pepsina u otras enzimas presentes en el estómago, así como del pH bajo del contenido del estómago.

Los polímeros Eudragit® son polímeros basados en poli(met)acrilatos, y están disponibles en diversas variedades, p.ej. para la gastrorresistencia y selección GI, para la protección de la humedad y el enmascaramiento del olor/sabor, para la liberación de fármaco controlada a lo largo del tiempo. Algunos polímeros de Eudragit® (Eudragit® serie L, S y FS) tienen una solubilidad diferente en medios ácidos y neutros/alcalinos y el umbral de pH (es decir, el valor en el que el polímero se hace soluble) varía de 5,5 a >7. Otros polímeros Eudragit® (serie E y EPO) son solubles en jugo gástrico hasta pH 5 y son hinchables a valores mayores de pH. Algunos polímeros Eudragit® (serie RL, RS, NE y NM) son insolubles y tienen un hinchamiento independiente del pH.

Como se observa a partir de los ejemplos de la presente memoria, los polímeros Eudragit® del primer y tercer grupos mencionados anteriormente son adecuados para el uso en las partículas de la presente invención. En el primer grupo, que incluye Eudragit® L100-55, L30-55, L100, L12.5, S100, S12.5, y FS30D, los polímeros son copolímeros metacrílicos con un ácido carboxílico como grupo funcional, es decir el polímero es un polímero aniónico. En el segundo grupo, que incluye Eudragit® E100, E12.5 y EPO, los polímeros son copolímeros de metacrilato de aminoalquilo con dimetil aminoetilo como grupo funcional. En el último grupo, que incluye Eudragit® RL30, RL PO, RL100, RL12.5, RS30D, RS PO, RS100, RS12.5, NE 30D, NE40D, NM30D, los polímeros son copolímeros de metacrilato de aminoalquilo con metacrilatos de trimetil-amonioetilo como grupo funcional (serie RL y RS), o los polímeros son polímeros neutros de metacrilatos (serie NE y NM). Los polímeros están disponibles de Evonik Industries.

La concentración del polímero en las partículas es de alrededor del 5 a alrededor del 80% p/p, tal como de alrededor del 5 a alrededor del 70% p/p, de alrededor del 5 a alrededor del 60% p/p, de alrededor del 5 a alrededor del 50% p/p, de alrededor del 10 a alrededor del 50% p/p o de alrededor del 10 a alrededor del 40% p/p.

En los ejemplos de la presente memoria, se han formado partículas adecuadas mediante el uso de Eudragit® L-100, L-100-55, RS, RL, es decir, que representan los grupos primero y tercero anteriores.

La composición que se seca por atomización puede contener también, aparte de la enzima y del material polimérico, uno o más excipientes o aditivos. Los excipientes pueden ser cualquier molécula que proteja a la enzima del calor, la deshidratación y el almacenamiento, tales como carbohidratos, aminoácidos, tensioactivos, sales, etc. También se pueden emplear excipientes farmacéuticamente aceptables como los descritos en la presente memoria.

5 Las partículas se pueden formar mediante métodos conocidos, preferiblemente mediante secado por atomización. Después de formar las partículas que comprenden una o más enzimas y un material polimérico, las partículas se pueden tratar adicionalmente, tal como mediante secado o liofilización. Aunque la liofilización no genera una formación de partículas, puede secar partículas ya formadas que comprenden enzimas y un material polimérico. Las partículas pueden estar en un estado de suspensión, dispersión, o emulsión, que se somete después a condiciones de liofilización. La liofilización evita el calentamiento de las enzimas y hace que el proceso de secado sea adecuado para las proteínas termosensibles. La liofilización u otros métodos (p.ej. el revestimiento) se pueden omitir, y así las partículas de polímero y enzimas reductoras de oxalato se forman únicamente mediante secado por atomización. Tales partículas se pueden formular después en formulaciones farmacéuticas orales o alimentarias, tal como mezclándolas con un agente de carga y, p.ej., introduciéndolas en sobres, añadiendo las partículas a cápsulas, comprimiendo las partículas en comprimidos, incorporando las partículas en comprimidos masticables, incorporando las partículas en comprimidos de disolución rápida o disolución oral, o añadiendo las partículas a líquidos, jarabes, elixires o producto alimentarios.

20 Por ejemplo, se hicieron partículas combinando oxalato descarboxilasa (OxDC) con un material polimérico, Eudragit L100. Como comparación, se liofilizó OxDC con tampón de arginina solamente. Tanto la enzima liofilizada, sin material polimérico, como las partículas formadas mediante secado por atomización de la combinación de OxDC con Eudragit L100, seguido de liofilización, dieron como resultado rendimientos de recuperación del 100% sin pérdida de actividad. Las partículas que comprendieron OxDC con Eudragit L100 estuvieron protegidas contra la degradación con pepsina en disoluciones de pH 3,25 a pH 5,0 durante al menos 40 minutos, durante al menos 60 minutos, durante al menos 90 minutos, durante al menos 120 minutos.

25 En la presente memoria se describen partículas de enzimas reductoras de oxalato, de tipo natural o mutadas, y un material polimérico que protege a las enzimas de la degradación en condiciones gástricas (pepsina). Se puede prever que las partículas puedan comprender cualquier enzima reductora de oxalato o cofactor, y en la presente memoria se describen composiciones que comprenden enzimas reductoras de oxalato, tales como oxalato descarboxilasa, oxalato oxidasa, oxalil-CoA descarboxilasa o formil CoA transferasa; o una combinación de oxalil-CoA descarboxilasa y formil CoA transferasa, o una combinación de cualquiera de estas, y tales enzimas pueden ser enzimas nativas o de tipo natural o pueden ser enzimas no nativas o mutadas que tienen mutaciones, modificaciones o alteraciones de la secuencia de ácido nucleico, la secuencia de aminoácidos, grupos de unión, carbohidratos, o lípidos. Estas enzimas usan oxalato como sustrato o son activas en una etapa del metabolismo o catabolismo del oxalato.

35 Así, las partículas protegen a la enzima de degradación de oxalato del medio gastrointestinal. Además, las partículas no liberan sustancialmente la enzima al medio gastrointestinal. En otras palabras, la enzima permanece en la partícula tras la administración oral durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el oxalato del estómago se degrade o reduzca. Las enzimas se pueden liberar de las partículas mientras están en el estómago o tras abandonar el estómago, dependiendo del tipo de polímero usado para hacer la partícula o de los tratamientos de la partícula, tales como el revestimiento o la reticulación. En las partículas, el material polimérico puede funcionar como un vehículo protector para la enzima, y al mismo tiempo puede permitir que el sustrato, es decir oxalato, se difunda o transporte de otra manera a la composición para permitir la degradación *in situ* de oxalato. Una característica de las partículas es su capacidad de conservar la actividad enzimática durante un periodo de tiempo más largo que el observado para una enzima que no está en forma de tales partículas, especialmente en presencia de pepsina. Por lo tanto, se describen partículas que comprenden una o más enzimas reductoras de oxalato y un material polimérico, en las que la enzima conserva al menos el doble de la actividad de una o más enzimas libres (es decir, que no están en forma de tales partículas), obtenidas del mismo lote, tras la incubación en un tampón que contiene 3,2 mg/ml de pepsina a pH 3,25 a 37 °C durante al menos 60 minutos. Es importante que las condiciones de ensayo para las partículas según la invención y las enzimas libres sean las mismas, por ejemplo, con respecto a la naturaleza y pureza de la enzima, la concentración inicial de la enzima, el volumen de ensayo, la composición del medio de incubación (p.ej. el tampón), la temperatura, etc.

55 Normalmente, la enzima contenida en las partículas conserva al menos el triple de la actividad, al menos el cuádruple de la actividad, o al menos el quíntuple de la actividad de una o más enzimas libres obtenidas del mismo lote tras la incubación en un tampón que contiene 3,2 mg/ml de pepsina a pH 3,25 a 37 °C durante al menos 30 minutos, al menos 45 min, al menos 60 minutos, al menos 75 minutos, al menos 90 minutos, al menos 105 minutos o al menos 120 minutos.

60 De manera específica, una o más enzimas reductoras de oxalato de las partículas de la invención conservan al menos dos veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces, la actividad de una o más enzimas libres, obtenidas del mismo lote, tras la incubación en un tampón que contiene 3,2 mg/ml de pepsina a pH 3,25 a 37 °C durante al menos 60 minutos.

Las sustancias tamponadoras adecuadas para proporcionar una disolución tampón que tenga un pH específico son conocidas para las personas expertas en la técnica. Los ejemplos son los tampones glicina, tampones acetato, tampones fosfato, tampones borato y similares. La disolución tampón puede contener ingredientes adicionales tales como, p.ej., una sal inorgánica para ajustar la fuerza iónica de la disolución tampón, o una o más proteasas como, p.ej., pepsina para asegurar que las condiciones de las disoluciones tampón pongan a prueba si la enzima insertada puede soportar tales condiciones hostiles.

También puede haber presentes otros polímeros en las partículas junto con uno o más polímeros de poli(met)acrilato. Tales polímeros incluyen, pero sin limitación, polímeros artificiales o naturales, que incluyen, pero sin limitación, i) un polisacárido: alginato que incluye ácido algínico, alginato, p.ej. alginato sódico, alginato potásico, alginato amónico, alginato cálcico, alginato de propano-1,2-diol, goma arábica, carragenano, quitosano y sus derivados, sulfato de condroitina, derivados de dextrano, heparina, ácido hialurónico, inulina, una celulosa o un derivado de celulosa que incluye metilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilmetilcelulosa, o similares, o combinaciones de las mismas; ii) un mucopolisacárido, iii) una goma que incluye goma de algarroba, goma guar, tragacanto, agar, goma arábica, goma de xantano, goma karaya, goma tara, goma de gelano, o similares, o combinaciones de las mismas; iv) un agente gelificante o de hinchamiento que incluye hidrocoloides y agentes hidrogelificantes tales como agar, carragenano, gelatina, polivinilpirrolidona, o similares, o combinaciones de los mismos; v) otros como, p.ej., proteínas y poliamidas: colágeno, albúmina, protamina, espermina, polímero sintético: poli (ácido acrílico), poli (ácido fosfórico), tripolifosfato, poli (ácido L-láctico), poli (alcohol vinílico), poli (ácido DL-láctico-co-ácido glicólico), polímeros Eudragit, que incluyen, pero sin limitación, L-100, L-100-55, RS, RL, o copolímeros o mezclas y combinaciones de los mismos. De manera específica, el material polimérico puede ser los polímeros Eudragit, que incluyen, pero sin limitación, L-100, L-100-55, RS o RL.

Otros materiales poliméricos que se pueden añadir a la formulación de polímero de poli(met)acrilato pueden ser biopolímeros o polímeros sintéticos. Los ejemplos de biopolímeros incluyen, pero sin limitación, proteínas, polisacáridos, mucopolisacáridos, heparina, sulfato de heparina, heparinoides, sulfato de dermatano, polisulfato de pentosano, sulfato de condroitina, celulosa, agarosa, quitina, carragenina, ácido linoleico, y alantoína, colágeno reticulado, fibronectina, laminina, elastina, elastina reticulada, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, alginato de quitosano, dextrano, metilcelulosa, polilisina, y caucho natural. En las composiciones en las que se forman matrices poliméricas, estas matrices son porosas, de forma que las moléculas pequeñas hidrosolubles pueden entrar y salir de la matriz polimérica, lo que incluye, pero sin limitación, moléculas tales como oxalato, ácido fórmico, formiato, dióxido de carbono, oxígeno, u oxalil-CoA. La concentración del material polimérico en una composición está normalmente en un intervalo del 10% al 90% de los materiales secos totales.

Además de una o más enzimas y un material polimérico, las partículas pueden contener además uno o más aditivos tales como, p.ej., agentes de ajuste del pH, agentes tamponadores, agentes solubilizantes, estabilizantes, conservantes, cofactores para las enzimas o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables tales como, p.ej., rellenos, agentes de carga, diluyentes, vehículos o similares.

Además, puede ser ventajoso crear un medio de pH ácido localizado alrededor de una proteína cuando las condiciones fisiológicas dan como resultado un pH muy por debajo del intervalo de trabajo razonable de la enzima. Por ejemplo, en una localización de pH inferior, una proteína reductora de oxalato con actividad máxima a pH 4 se beneficiaría de un vehículo de administración capaz de incrementar el pH local alrededor de la enzima hasta alrededor de un pH 4.

Además, puede ser deseable incluir un tampón en el vehículo de administración en forma de una base, material que contiene una base o que genera una base que funciona junto con el pH in vivo, o el pH localizado, o una combinación de ambos para optimizar/controlar el pH local alrededor de la enzima. Estos tampones pueden incluir sales de compuestos orgánicos o inorgánicos u otros diversos tampones. Se entiende que el pKa de los ácidos conjugados a los que están asociados/de los que proceden los materiales tamponadores se puede utilizar en la selección adecuada de los materiales tamponadores.

En algún caso se puede aplicar un material polimérico a las partículas (p.ej. como un revestimiento) para incrementar la estabilidad de almacenamiento de las partículas o para inhibir la degradación de la enzima. Además, tal material polimérico, si es relevante, puede estar reticulado. La reticulación puede ser mediante reticulación física o química. La reticulación física puede comprender polímeros cargados de manera opuesta reticulados entre sí mediante enlaces iónicos (por ejemplo: quitosano, que está cargado positivamente, se reticula con tripolifosfato o heparina, que son polímeros cargados negativamente), polímeros cargados reticulados con iones cargados de manera opuesta (por ejemplo: alginato con Ca^{2+} , carboximetil-celulosa con Al^{3+}). La expresión "reticulación física" usada en el presente contexto también incluye las uniones y/o interacciones no covalentes.

La reticulación química comprende en general la reticulación mediante reticuladores con dos grupos funcionales reactivos, tales como polímeros que albergan grupos amina tales como proteínas, poliamida, quitosano y sus derivados, que se pueden reticular por medio de glutaraldehído o genipina. Se puede usar irradiación UV para inducir la formación de reticulaciones covalentes en polímeros que albergan grupos sensibles a la luz.

Las propiedades de las partículas, por ejemplo: la capacidad de tamponamiento micro-ambiental, la fuerza mecánica, el tamaño de partícula, la velocidad de difusión de oxalato, las interacciones con enzimas, en gran medida dependen de el/los polímero(s) seleccionado(s), la composición y proporción de el/los polímero(s), los métodos opcionales de reticulación y los procedimientos de preparación.

- 5 También se puede proporcionar un revestimiento a las partículas. Tal revestimiento tiene en general la misma función que el material polimérico, es decir, evitar una disminución sustancial de la actividad de la enzima insertada en el polímero durante el almacenamiento y/o tras la administración oral.

10 Los materiales de revestimiento adecuados son materiales tales que permiten que una composición acuosa que contiene oxalato difunda, o de otra manera entre, en la partícula de la invención. Como se mencionó anteriormente, el sustrato (es decir, el medio que contiene oxalato) entra en la composición de la partícula de la invención, de forma que se puede dar la degradación enzimática del oxalato. Por lo tanto, se pueden aplicar materiales de revestimiento que dan como resultado un revestimiento con difusión o revestimientos permeables de otra manera (p.ej. revestimientos que contienen sustancias que forman poros que son sustancialmente hidrosolubles).

15 Los ejemplos de materiales de revestimiento adecuados incluyen, pero sin limitación, los materiales considerados como materiales poliméricos. Se puede elegir un material de revestimiento que sea diferente del usado como material polimérico, pero el material polimérico y el material de revestimiento también pueden ser el mismo. Los ejemplos específicos de materiales de revestimiento son los agentes formadores de películas tales como, p.ej. polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polidextrosa, maltodextrina, u otros polisacáridos que incluyen quitosano, alginatos y ácido hialurónico. Si está presente, el material de revestimiento se aplica normalmente en tal cantidad que el incremento de peso de las partículas es como máximo de alrededor del 40%.

Composiciones

Para administrar las partículas como se describió anteriormente en el estómago de un ser humano o un animal, se pueden formular las partículas en una forma farmacéutica adecuada para la administración oral.

- 25 Las formulaciones orales incluyen, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos de disolución rápida, comprimidos de disolución oral, líquidos, y otras formulaciones orales conocidas adecuadas para el uso farmacéutico o alimentario.

30 Una composición descrita en la presente memoria es adecuada para el uso para administración oral a un sujeto. Se proporciona una composición en forma de formulaciones farmacéuticas orales, que se pueden administrar en la cavidad oral, la boca, un parche bucal, en el estómago, unidas a la mucosa del estómago, en un líquido de liberación lenta, en un comprimido de liberación rápida en la boca o el estómago, revistiendo el esófago, en una forma líquida o sólida acompañando los alimentos, antes de ingerir alimentos, o inmediatamente tras ingerir alimentos.

35 Las composiciones descritas en la presente memoria reducen el oxalato de la dieta en condiciones gástricas, tales como las halladas tras el consumo de alimentos, tal como en presencia de proteasas. Las composiciones reducen el oxalato en el estómago de seres humanos y otros animales. Las composiciones reducen el oxalato, p.ej. el oxalato en el tracto gastrointestinal, en particular en el estómago, e impiden que al menos una porción de oxalato exógeno (p.ej. de los alimentos) pase a la circulación sistémica.

40 Una composición descrita en la presente memoria comprende partículas como se describieron anteriormente. Las partículas comprenden una o más enzimas reductoras de oxalato y un material polimérico; o las partículas comprenden otras enzimas, cofactores y coenzimas relacionadas con las rutas de degradación de oxalato combinadas con un material polimérico, o ambas partículas, proporcionadas por separado o juntas en una forma farmacéutica oral.

45 Tales composiciones que comprenden partículas que comprenden otras enzimas, cofactores, o coenzimas solas se pueden administrar de manera simultánea, de manera secuencial, o antes o después de la administración de las composiciones de partículas que comprenden enzimas reductoras de oxalato. Las composiciones que comprenden partículas que comprenden otras enzimas, cofactores, o coenzimas solas se pueden combinar con composiciones que comprenden partículas que comprenden enzimas reductoras de oxalato para formar una única dosis de administración para proporcionar una cantidad eficaz de reducción de oxalato en el tracto gástrico.

50 Las composiciones pueden comprender enzimas reductoras de oxalato que son proteínas recombinantes que tienen una secuencia nativa, es decir, que tienen la secuencia del gen y de la proteína de las enzimas reductoras de oxalato tal como se hallan en la naturaleza, o pueden ser proteínas recombinantes que no son nativas, enzimas reductoras de oxalato mutadas que tienen mutaciones del ácido nucleico o de la proteína, o que están alteradas de cierta manera. Por ejemplo, una enzima reductora de oxalato no nativa, tal como la oxalato descarboxilasa, puede tener una o más sustituciones de aminoácidos. Las enzimas se describen con detalle en la presente memoria.

55 Una composición descrita en la presente memoria comprende partículas que comprenden enzimas reductoras de oxalato recombinantes mutadas y un material polimérico, en las que la actividad específica de la enzima reductora

de oxalato recombinante mutada es mayor en la partícula que la actividad específica de la proteína libre en disolución. Tales partículas se pueden administrar en composiciones tales como formulaciones orales, p.ej. formulaciones farmacéuticas o alimentarias.

- 5 Las formulaciones incluyen, pero sin limitación, sobres, comprimidos, cápsulas, comprimidos de disolución rápida, comprimidos de disolución oral, comprimidos masticables, polvos, gránulos, esferas, líquidos, jarabes, elixires, u otras formulaciones farmacéuticas orales conocidas para los expertos en la técnica farmacéutica. Las formulaciones orales pueden comprender opcionalmente capacidades de tamponamiento. Por ejemplo, una composición puede comprender compuestos tamponadores que ajustan el pH de la composición y así el medio circundante, tal como el estómago una vez que se ingiere la composición, a alrededor de pH 4. Con el medio de la enzima a pH 4, las
- 10 enzimas de la presente invención son activas y reducen oxalato. Tales compuestos tamponadores pueden ser acetato, citrato, fosfato u otros compuestos tamponadores. Una característica de una composición es la capacidad de la partícula de proteger a las enzimas de degradación de oxalato contra la degradación por condiciones tales como las halladas en el medio gástrico que incluyen, pero sin limitación, la degradación mediante una proteasa tal como pepsina.
- 15 Las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender además uno o más factores adicionales que pueden mejorar la actividad de la enzima. Estos factores adicionales pueden ser, p.ej., oxalil CoA, $MgCl_2$, y/o difosfato de tiamina (una forma activa de la vitamina B1), o compuestos tamponadores del pH.

La composición administrada normalmente está en forma sólida, p.ej. en forma de polvos o en una forma farmacéutica sólida, p.ej. en forma de sobres, cápsulas o comprimidos (p.ej. las partículas se procesan

20 adicionalmente en una forma farmacéutica adecuada mediante métodos muy conocidos para una persona experta en la técnica). Para este fin, se pueden añadir excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tales como, p.ej., rellenos, aglutinantes, disgregantes, colorantes, aromas, agentes de ajuste del pH, estabilizantes, etc. Además, se puede añadir una o más sustancias terapéuticas y/o profilácticas adicionales y/u otras enzimas, cofactores, sustratos, coenzimas, minerales y otros agentes que ayudan en la reducción de oxalato.

25 Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen: dextrinas, maltodextrinas, dextrosa, fructosa, glucosa, lactosa, derivados de celulosa que incluyen carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), celulosa microcristalina (p.ej., diversos grados de Avicel®), almidones o almidones modificados (p.ej. almidón de patata, almidón de maíz, almidón de arroz, almidón pregelatinizado), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, agar, alginato sódico, croscarmelosa sódica, fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico (p.ej. fosfato cálcico monobásico, fosfato cálcico dibásico), sulfato cálcico,

30 carboxialquilcelulosa, dextratos, fosfato cálcico dibásico, gelatina, goma arábiga, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, polietilen glicol, poli(óxido de etileno), y como lubricantes: talco, estearato magnésico, estearato cálcico, ácido esteárico, aceites vegetales hidrogenados y similares.

Las composiciones descritas en la presente memoria son adecuadas para el uso en la reducción de los niveles de oxalato en seres humanos o animales. También pueden ser adecuados para tratar o prevenir afecciones

35 relacionadas con el oxalato que incluyen, pero sin limitación, hiperoxaluria, hiperoxaluria de absorción, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria primaria, litiasis renal idiopática por oxalato cálcico (urolitiasis), vulvodinia, oxalosis asociada a nefropatía terminal, trastornos de la conductancia cardiaca, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y pacientes que se han sometido a cirugía gastrointestinal y cirugía bariátrica (cirugía de la

40 obesidad), y/o que se han sometido a tratamiento con antibióticos.

En la presente memoria se describe el tratamiento y la prevención de afecciones relacionadas con el oxalato en seres humanos y animales.

Se administra una partícula o composición de degradación de oxalato en una cantidad deseada, tal como una

45 cantidad que es suficiente para degradar sustancialmente todo el oxalato presente normalmente en una comida normal. Dependiendo de las elecciones de alimentos, una dieta occidental media puede contener de 100 a 300 mg de oxalato/día. En general, alrededor de 0,2 g de las partículas que comprenden una enzima reductora de oxalato (igual a 50 mg de OxDC en 1 ml de suspensión de partículas) pueden degradar alrededor de 300 mg de oxalato en menos de 30 min en las condiciones gástricas simuladas. Las condiciones gástricas simuladas típicas se generaron como: 100 ml de mezcla de jugo gástrico simulado USP con 400 gramos de comida de estilo occidental equilibrada

50 (fragmentada en trozos pequeños) y 500 gramos de agua, lo que produjo un pH en el intervalo de 3,5-4,5. La reducción de la absorción de oxalato se puede demostrar mediante una reducción de los niveles de oxalato hallados en la sangre, suero u orina, o en otros fluidos corporales.

Una cantidad eficaz comprende una cantidad de unidades de actividad de la actividad de la enzima reductora de oxalato que reducirá una porción del oxalato presente, o un nivel de unidades de actividad de la actividad de la

55 enzima reductora de oxalato que iniciará una reducción de la cantidad de oxalato o mantendrá una cantidad reducida de oxalato en el individuo, en comparación con la cantidad de oxalato presente antes de la administración de la composición. El número de unidades de actividad de la actividad de la enzima reductora de oxalato que se puede usar en una composición de dosis individual oscila normalmente de alrededor de 0,001 unidades a alrededor de 20.000 unidades, de 0,01 a 15.000 unidades, de 0,1 a 10.000 unidades, de 1 a 5000 unidades, de 10 a 4000

unidades, de 50 a 3.000 unidades o de 100 a 2.500 unidades. En los casos en los que son necesarias dosis bajas, el intervalo puede ser de alrededor de 5 unidades a 100 unidades, de 0,05 a 50 unidades, a 0,5 a 500, de alrededor de 0,01 unidades a alrededor de 50 unidades, de alrededor de 0,01 unidades a alrededor de 5 unidades, de alrededor de 1 unidades a alrededor de 100 unidades, de alrededor de 25 unidades a alrededor de 50 unidades, de alrededor de 30 unidades a alrededor de 100 unidades, de alrededor de 40 unidades a alrededor de 120 unidades, de alrededor de 60 unidades a alrededor de 15 de alrededor de 50 unidades a alrededor de 100 unidades, de alrededor de 100 unidades a alrededor de 500 unidades, de alrededor de 100 unidades a alrededor de 300 unidades, de alrededor de 100 unidades a alrededor de 400 unidades, de alrededor de 100 unidades a alrededor de 5.000 unidades, de alrededor de 1.000 unidades a alrededor de 5.000 unidades, de alrededor de 2.500 unidades a alrededor de 5.000 unidades, de alrededor de 0,001 unidades a alrededor de 2.000 unidades y todos los intervalos incluidos en ellos. Una unidad de la enzima es la cantidad de la enzima que degradará un micromol de oxalato por minuto a 37 °C.

Uso de las partículas y composiciones - método de tratamiento

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden proporcionar composiciones de partículas, preferiblemente partículas secadas por atomización, en el estómago de un ser humano o animal, por ejemplo, proporcionar una composición que permite la reducción del oxalato en el estómago para reducir la absorción de oxalato desde el tracto gastrointestinal. La composición de partículas puede proteger a las enzimas reductoras de oxalato del medio dañino para las enzimas del estómago, y permitir que las enzimas mantengan la actividad enzimática en tal medio hostil.

Los métodos de tratamiento y prevención comprenden proporcionar las composiciones enseñadas en la presente memoria, en las que las enzimas reductoras de oxalato están contenidas en partículas junto con un material polimérico.

Las partículas y composiciones descritas en la presente memoria son adecuadas en los métodos de reducción de la absorción de oxalato en el organismo, y se usan en el tratamiento o la prevención de afecciones relacionadas con el oxalato que incluyen, pero sin limitación, hiperoxaluria, hiperoxaluria de absorción, hiperoxaluria entérica, hiperoxaluria primaria, litiasis renal idiopática por oxalato cálcico (urolitiasis), vulvodinia, oxalosis asociada a nefropatía terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y pacientes que se han sometido a cirugía gastrointestinal y cirugía bariátrica (cirugía para la obesidad), y/o que se han sometido a tratamiento con antibióticos.

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar una composición que permite la reducción del oxalato en el estómago para evitar la absorción de oxalato por el organismo de un ser humano o animal, por ejemplo, reduciendo el oxalato de las fuentes alimentarias. Un método para proporcionar enzimas reductoras de oxalato en el estómago es proporcionar enzimas reductoras de oxalato en un material polimérico en una formulación farmacéutica oral.

Se puede conseguir una reducción de la absorción de oxalato proporcionando enzimas de degradación de oxalato en el tracto gastrointestinal, en particular en el estómago, por lo que se reduce la concentración de oxalato disponible para la absorción. La reducción del oxalato en el estómago reducirá también la cantidad de oxalato que se dirige al intestino para la absorción en este segmento del tracto gastrointestinal. Además de las rutas de absorción, recientemente se han identificado rutas secretoras de oxalato en el estómago humano. Las composiciones también serían útiles en la degradación del oxalato secretado en el estómago desde el sistema circulatorio, y así los métodos contemplan una reducción total de la carga de oxalato en un individuo.

Los métodos para reducir el oxalato en un ser humano o animal comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una o más enzimas reductoras de oxalato o fragmentos que tienen actividad reductora de oxalato en las composiciones de partículas descritas en la presente memoria a un sujeto, humano o animal, y reducir el oxalato presente. La reducción se puede medir en cualquier tejido o medio de fluido corporal del sujeto. Los fluidos corporales incluyen las secreciones del organismo tales como las secreciones nasales o gástricas, saliva, sangre, suero, orina, quimo o materia digestiva, fluido tisular, y otros fluidos o materiales semisólidos producidos por los seres humanos o animales. Por ejemplo, las composiciones de partículas de enzimas reductoras de oxalato se pueden administrar de manera oral a un ser humano o animal, y la actividad de la enzima reductora de oxalato reduce el oxalato presente en el estómago del ser humano o animal. Las composiciones de partículas se pueden mezclar en líquidos, alimentos u otros materiales de la dieta y proporcionarlos a un ser humano o animal de forma que la actividad de la enzima reductora de oxalato de las partículas sea eficaz en el medio del estómago. Las composiciones de partículas también se pueden mezclar con productos alimentarios u otros materiales en los que se halla oxalato, y la actividad de la enzima reductora de oxalato de las partículas reduce el oxalato presente en el producto alimentario o en otros materiales.

Los métodos para reducir la absorción de oxalato por parte de un ser humano o animal y tratar y prevenir las afecciones relacionadas con el oxalato comprenden administrar una composición que comprende partículas que comprenden una cantidad eficaz de enzimas reductoras de oxalato. Una cantidad eficaz comprende una cantidad de unidades de actividad de la actividad de la enzima reductora de oxalato que reducirá una porción del oxalato

presente, o un nivel de unidades de actividad de la actividad de la enzima reductora de oxalato que iniciará una reducción de la cantidad de oxalato presente en una comida o presente en los tejidos o fluidos corporales del sujeto o mantendrá una cantidad reducida de oxalato en el sujeto en comparación con la cantidad de oxalato presente antes de la administración de la composición.

- 5 En un método de tratamiento, se administra de manera oral una cantidad eficaz de una composición de partículas como se enseña en la presente memoria, a ser ingerida por un sujeto al menos una vez al día, al menos dos veces al día, al menos tres veces al día, al menos cuatro veces al día o más si es necesario, y tal administración puede ser durante un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, o una semana, dos semanas, tres semanas, o un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, más de seis meses, un año, dos años, o durante años o continuamente durante toda la vida del paciente. Tal tratamiento puede continuar para mantener los niveles deseados de oxalato en un sujeto.

Se debería entender, por supuesto, que lo anterior se refiere solamente a las realizaciones ejemplares de la presente invención, y que se pueden hacer numerosas modificaciones o alteraciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se expone en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas.

- 15 Aunque las realizaciones ejemplares de la presente invención se proporcionan en la presente memoria, la presente invención no se limita a estas realizaciones. Existen numerosas modificaciones o alteraciones que se les pueden ocurrir a los expertos en la técnica.

- 20 La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los ejemplos contenidos en la presente memoria, que se proporcionan para aclarar su comprensión. No se debería considerar de ninguna manera que las realizaciones ejemplares impongan limitaciones al alcance de la misma. Al contrario, se debe entender claramente que se pueden hacer cambios en otras diversas realizaciones, modificaciones, y equivalentes de las mismas que, tras la lectura de la descripción de la presente memoria, se les pueden ocurrir a los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

- 25 Métodos

Ensayo de la actividad enzimática

- 30 La actividad de la oxalato descarboxilasa se cuantifica determinando la velocidad de formación de formiato. Una mezcla de actividad (390 μ l) que contiene oxalato 40 mM en ácido cítrico 40 mM, pH 4,0, se incuba a 37 °C durante 5 min, y se inicia la reacción mediante la adición de 10 μ l de una disolución de OxDC que contiene 0,2-1 mg/ml de OxDC. Después de 10 minutos de tiempo de reacción, se añaden 100 μ l de H₂SO₄ 0,5 M para detener la reacción. Tras la centrifugación a 14000 g durante 10 min, se analiza el sobrenadante mediante HPLC.

- 35 Todos los análisis mediante HPLC se llevan a cabo mediante el uso de un sistema Agilent de la Serie 1100. Las separaciones son a 40 °C en una columna de intercambio iónico fuerte Aminex HPX-87H (Bio-Rad) (300 x 7,8 mm de D.I.), protegida con un cartucho Aminex Cation H Micro-Guard (Bio-Rad) colocado fuera del calentador. La fase móvil para todos los análisis es H₂SO₄ 5 mM (grado reactivo (Sigma)) con un caudal de 0,6 ml/min. El volumen de inyección es 40 μ l. La detección es a 210 nm y la cuantificación es mediante el área del pico de formiato.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de OxDC que produce un micromol de formiato a partir de oxalato en un minuto en las condiciones anteriores, o una unidad de la enzima es la cantidad de enzima que degradará un micromol de oxalato por minuto a 37 °C.

- 40 Ensayo de estabilidad

Tras la incubación de la enzima libre OxDC o la composición en cuestión que contiene la enzima OxDC incrustada en un material polimérico en tampón glicina 100 mM a pH 3,25 que contiene 3,2 mg/ml de pepsina durante un cierto periodo, se analizó la actividad de OxDC restante.

Ejemplo 1

- 45 Un proceso para la producción de oxalato descarboxilasa de *Bacillus subtilis* mediante *E. coli*

Clonación del gen *YvrK* y optimización de los codones del gen para una expresión superior

- 50 La OxDC de *Bacillus subtilis* es una enzima homohexamérica. Cada monómero contiene 385 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 44 kDa. El gen de OxDC, conocido como *YvrK*, se amplificó mediante PCR a partir del ADN genómico de *B. subtilis* y se insertó en el plásmido pET9a (Novagen, nº de catálogo 69431-3) por medio de los sitios de restricción NdeI y BamHI.

Los codones del gen *YvrK* fueron optimizados por Genscript Corp (Boston, MA). Algunos codones de la secuencia original del gen se cambiaron por los codones preferidos en *E. coli* para incrementar la expresión de la proteína. El

gen optimizado para *E. coli* se insertó de nuevo en un vector pET-9a por medio de los sitios de restricción Ndel y BamHI para generar *pET-9a:YvrK* y la secuencia del gen con optimización de codones para *E. coli* se confirmó mediante secuenciación de ADN. El plásmido con el gen con optimización de codones se transformó después en *E. coli* BL21(DE3) para la producción de OxDC mediante inducción con Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

5 Expresión de oxalato descarboxilasa (OxDC) en *E. coli* (fermentación)

La expresión de OxDC en *E. coli* BL21(DE3) se llevó a cabo a 3 escalas de fermentación diferentes: 0,4, 50 y 1000 L (litros) de medio. En general, el proceso de fermentación se inició inoculando los medios de cultivo con un cultivo de siembra (inóculo del 0,1%) de bacterias a 37 °C con agitación. Se añadió IPTG al cultivo para inducir la expresión de OxDC cuando la $DO_{600} = 1,0-2,0$. Tras la inducción, se recogieron las células de *E. coli* mediante centrifugación (menor de la escala de 1000 L) o filtración mediante el uso de filtros de fibra hueca aproximadamente 8-10 horas tras la inducción (1000 L).

Purificación de la oxalato descarboxilasa (OxDC) de células de *E. coli*

Lisis de las células de *E. coli* y recogida de restos celulares insolubles que contienen OxDC. Las células de *E. coli* recogidas se lisaron mediante homogeneización, y los restos celulares que contenían OxDC se recogieron mediante centrifugación. El sedimento de restos celulares se suspendió primero en H₂O desionizada (DI) con una proporción en peso de H₂O respecto del sedimento de 3:1 para eliminar cualquier proteína hidrosoluble restante y otros componentes de las células de *E. coli*. Los restos celulares lavados se recogieron de nuevo mediante centrifugación. Se obtuvieron aproximadamente 10 gramos de sedimento de restos celulares a partir de 1,0 L de cultivo, que contuvo 40-200 mg de OxDC.

Extracción de OxDC mediante una concentración elevada de (NH₄)₂SO₄. Los restos celulares lavados se resuspendieron en el triple en peso de tampón Tris HCl 50 mM, pH 8,0 que contenía (NH₄)₂SO₄ 0,75 M para la extracción de OxDC. La suspensión se agitó a 20-25 °C durante 30 minutos, y la OxDC extraída se recogió mediante centrifugación. Aproximadamente un 60% de la OxDC expresada se extrajo normalmente del sedimento mediante este método.

Columna de cromatografía de intercambio aniónico. El extracto se diluyó 3 veces con Tris HCl 50 mM, pH 8,0, y después se hizo pasar a través de una columna de Q-Sepharose que se preequilibró con Tris HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía (NH₄)₂SO₄ 0,25 M. El ADN y otras impurezas se unieron a la columna, mientras OxDC pasa a través de ella y se recoge.

Columna de cromatografía de interacción hidrófoba con un desarrollo en gradiente. La concentración de (NH₄)₂SO₄ en la disolución de OxDC recogida de la columna de Q-Sepharose se ajustó a 2,0 M mediante la adición de (NH₄)₂SO₄ sólido, y se cargó en una columna pre-equilibrada de fenil-Sepharose. Se eluyó OxDC por medio de un gradiente de (NH₄)₂SO₄. Se eluyó OxDC en dos picos principales a 1,3 M y 0,9 M de (NH₄)₂SO₄, respectivamente (Fig. 1). El pico a 1,3 M de (NH₄)₂SO₄ contuvo aproximadamente un 70% de la OxDC total y tuvo una pureza mayor (>95%). La OxDC de este pico se seleccionó normalmente para la etapa siguiente.

Columna G-25 para desalación. La OxDC recogida del pico a 1,3 M de (NH₄)₂SO₄ se cargó en una columna que contenía Sepharose G-25 para la desalación. Se obtuvieron normalmente aproximadamente 30 mg de OxDC purificada a partir de 10 gramos de restos celulares.

Ejemplo 2

Modificación de la solubilidad de OxDC para incrementar el nivel de expresión

OxDC tiene una solubilidad limitada a pH 4,5-7,8. El pH del citoplasma de *E. coli* está cerca de 7,6; así, la solubilidad de OxDC en el citoplasma de *E. coli* es muy limitada. De hecho, se observa que la mayoría de la OxDC expresada por *E. coli* se halla en el sedimento lisado más que en el sobrenadante.

Entre los últimos 6 residuos de aminoácidos (residuos 380-385) de la cola C-terminal de OxDC, hay cuatro lisinas cargadas positivamente, y dos aminoácidos polares: serina y cisteína (Cys383). Hay numerosos aminoácidos que se pueden elegir para sustituir selectivamente la cisteína o serina con cadenas laterales más o menos polares. Sin embargo, se seleccionó Cys383, que es el único residuo de cisteína que hay en OxDC. Los tres aminoácidos seleccionados para sustituir la cisteína fueron: arginina (R), serina (S) y alanina (A). Los mutantes C383R, C383S y C383A se crearon mediante mutagénesis dirigida estándar, y se confirmaron las secuencias de cada gen mediante secuenciación de ADN. Los mutantes C383R, C383S y C383A se expresaron como se describió en el Ejemplo 1 en matraces de agitación a una escala de 0,4 L. Las células de *E. coli* se recogieron mediante centrifugación y se lisaron mediante un protocolo estándar: Las células de *E. coli* se suspendieron en una disolución de lisozima, y se aplicaron dos ciclos de congelación/descongelación. La lisis completa de las células de *E. coli* se confirmó mediante análisis en un microscopio. Las partes solubles e insolubles de estas enzimas mutantes se separaron mediante centrifugación. Las enzimas mutantes de los sedimentos insolubles se extrajeron según el método descrito en el Ejemplo 1. Se determinó la cantidad de enzimas mutantes totales en la parte soluble y en la parte insoluble (las enzimas extraídas) mediante un ensayo de actividad y la concentración de proteínas. La pureza de las enzimas

mutantes extraídas se estimó a partir de una SDS-PAGE. Los resultados de los 3 mutantes y de la enzima de tipo natural se muestran en la Tabla 1.

Los niveles de expresión de OxDC de tipo natural (C383C), de los mutantes C383R, C383S, y C383A de OxDC y sus distribuciones en el lisado (forma soluble) y en el sedimento de restos celulares (formas insolubles, pero extraídas) se muestran más adelante. Los datos se obtuvieron a partir de 6 gramos de pasta de células de *E. coli*, que es igual a aproximadamente 4 gramos de sedimento celular lisado, o 0,4 L de cultivo.

TABLA 1. Niveles de expresión de OxDC de tipo natural (C383), de los mutantes C383R, C383S, y C383A de OxDC y sus distribuciones en el lisado (forma soluble) y en el sedimento de restos celulares (forma insoluble, pero extraída).

	OxDC en el lisado (mg)	OxDC en el sedimento (mg)	Proporción de Soluble frente a Insoluble	OxDC Total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad específica relativa
C383R	12	62	0,19	74	72	1,06
C383 (Tipo natural)	6,3	108	0,05	114	68	1
C383S	3,2	510	0,006	513	61	0,90
C383A	0	530	0	530	28	0,41

Como se muestra en la Tabla 1, la mutación de C383 alteró la distribución de OxDC entre las fracciones solubles e insolubles, y la cadena lateral más polar generó mutantes con una proporción mayor de proteínas solubles en el lisado. Las proporciones mayores de proteínas solubles en el lisado se correlacionaron con un nivel de expresión inferior, pero con una actividad específica mayor. El mutante C383R mostró un 6% más de actividad específica que el de tipo natural, pero el nivel de expresión fue mucho menor. Aunque la OxDC mutante C383A mostró una expresión ligeramente mayor que la del mutante C383S, la actividad específica fue menos de la mitad de la del mutante C383S. El nivel de expresión del mutante C383S fue aproximadamente 5 veces mayor que el nivel de expresión de la OxDC de tipo natural, y su actividad específica fue un 90% en comparación con la de tipo natural. Las otras propiedades de la enzima mutante C383S se caracterizaron adicionalmente, y se compararon con la de tipo natural. Tanto la proteína de tipo natural como el mutante C383S de OxDC son activas a un pH entre 3,5 y 5,5, con una actividad óptima a pH 4,0. Ambas enzimas son estables a un pH entre 3,5 y 9,5, y a temperaturas que se aproximan a 60 °C durante al menos 1 hr. Además, la proteína de tipo natural mostró al menos dos picos importantes en una columna de fenil-Sepharose, lo que indica más de una isoforma de OxDC, mientras el mutante C383S mostró un único pico en la misma columna y en condiciones idénticas (Fig. 1). Las dos isoformas de OxDC de tipo natural introducen más obstáculos en cuanto a la purificación debido a la separación de dos isoformas similares. Por ejemplo, puede requerir una elución en gradiente en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba para separar las dos isoformas. Las dos isoformas pueden disminuir también el rendimiento final de la enzima purificada, porque son necesarias más etapas de purificación y cada etapa de purificación adicional da como resultado pérdidas de rendimiento. Además, una de las dos isoformas puede ser inútil.

Ejemplo 3

Sistema de expresión alternativo para el mutante C383S

Construcción de vectores de expresión. La inducción con IPTG se comparó con otros dos métodos de inducción: ramnosa y temperatura mediante el uso de un vector Lybradyn patentado incorporado con los promotores correspondientes. Los resultados de los experimentos de fermentación a pequeña escala indicaron que todos los métodos expresaron OxDC de manera eficaz.

Los vectores se construyeron mediante métodos biológicos moleculares habituales. El fragmento NdeI/BamHI que albergaba el gen *YvrK* optimizado de *E. coli* se insertó en el sitio NdeI/BamHI de un vector Labradyn N°101 bajo control del promotor inducible por ramnosa para crear el plásmido pOTrhamC383S, que se transformó en *E. coli* BW25113 para la producción de OxDC. El vector inducible por la temperatura pOTIprC383S se generó sustituyendo el promotor inducido por ramnosa de pOTrhamC383S con un promotor λ_{PR} inducido por la temperatura de fago lambda (Ipr) portado por un vector Lybradyn N° 102 por medio de los sitios de restricción MunI y AflII. Los vectores de expresión se transformaron más tarde en *E. coli* BW25113 para la producción de OxDC. Otros elementos hallados en el vector incluyen secuencias promotoras y reguladoras, un sitio de unión al ribosoma, resistencia a kanamicina/neomicina, elemento de estabilidad segregacional *cer*, y secuencias reguladoras del número de copias del plásmido, *Rop*.

Comparación del nivel de expresión de los tres vectores de expresión. La fermentación se llevó a cabo en matraces de 200 mL. La fermentación de OxDC mediante la inducción con ramnosa fue idéntica a la inducción con IPTG como se describió en el Ejemplo 1, excepto porque se añadió un 0,2% de ramnosa en la inducción en vez de IPTG 1,0 mM. La fermentación de OxDC mediante la inducción por la temperatura fue igual que la inducción con IPTG y ramnosa, excepto por dos diferencias: se cultivó *E. coli* a 30 °C en vez de a 37 °C, y la inducción se realizó incrementando la temperatura del cultivo hasta 42 °C.

Las células de *E. coli* se recogieron y se lisaron, y se extrajo OxDC de los restos celulares según los métodos descritos en el Ejemplo 1. Los sistemas de expresión de inducción con ramnosa y por la temperatura produjeron 400-600 mg de OxDC C383S activa por litro de cultivo, un nivel cercano a la expresión con IPTG (500 mg de OxDC por litro de cultivo). Por lo tanto, se seleccionó el sistema de expresión inducible por la temperatura.

Ejemplo 4

Un proceso de purificación simple con ajuste de la solubilidad mediante el pH

Antecedentes. La OxDC tiene una solubilidad limitada a pH 4,5-7,8 para la proteína de tipo natural y a pH 4,0-8,0 para el mutante C383S. La solubilidad de OxDC se incrementa si el pH es mayor de 8,5 para la OxDC de tipo natural y pH 9,0 para el mutante C383S. Tris y arginina son ligandos de unión selectivos para OxDC; por lo tanto, ambos pueden incrementar enormemente la solubilidad de OxDC. El proceso de purificación es aplicable a la proteína de tipo natural y al mutante C383S; sin embargo, solamente se usa el mutante C383S para ilustrar el método de purificación.

Etapa 1: extracción de C383S del sedimento de restos celulares. Todas las etapas de purificación se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Antes de la extracción de C383S, las células de *E. coli* se lisaron, se recogieron los restos celulares y se lavaron con agua para eliminar cualquier componente celular soluble según los métodos descritos en el Ejemplo 1. Sin embargo, la extracción de la OxDC de los restos celulares en este caso fue diferente de la del Ejemplo 1. En el Ejemplo 1, se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,75 M en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) para extraer OxDC del sedimento. En este método, el tampón de extracción fue arginina o Tris HCl 50 mM (pH 9,5) sin la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El método fue capaz de extraer más de la enzima mutante C383S (> 90% del C383S total en el sedimento) que el método descrito en el Ejemplo 1 (75% del mutante C383S total que se expresó) con mucho menos ADN de las células hospedadoras y otras impurezas. La pureza de C383S fue normalmente mayor del 99% (Tabla 2). Además, la concentración de la OxDC mutante C383S en el extracto alcanzó 120 g/L, lo cual redujo el uso de agua y también redujo la escala de la etapa siguiente (Etapa 2).

Etapa 2: filtración. La mayoría de las impurezas halladas en el extracto fueron endotoxinas que se pueden eliminar mediante dos o tres filtros de profundidad tras la adición de NaCl 0,6 M: el primer filtro fue de 3 micras, el segundo de 1,2 micras y finalmente el tercer filtro de profundidad fue de 0,2 o 0,1 micras. Tras la filtración, el extracto contuvo niveles reducidos de endotoxina (Tabla 2) y estuvo preparado para la precipitación. Si fue necesaria una pureza mayor, se introdujo una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para el procesamiento adicional antes de la precipitación.

Etapa 3 (opcional): Columna de HIC. La disolución de OxDC mutante C383S filtrada se cargó en una columna de HIC pre-equilibrada con NaCl 0,6 M en Arg o Tris 50 mM, pH 9,5. La OxDC fluyó a través de la columna mientras las impurezas se unieron a la columna, que eliminó las impurezas de la disolución de C383S. El flujo del mutante C383S se recogió para la precipitación.

Etapa 3: precipitación mediante ajuste del pH. Para el ajuste del pH, se añadió gota a gota tampón citrato 0,2 M, pH 3,0 a la disolución de C383S mientras se agitaba hasta que el pH alcanzó 7,0. La solubilidad del mutante C383S cayó hasta menos de 1 g/L a pH 7,0; así, precipitó un 99% de C383S (si la concentración inicial del mutante C383S fue 100 g/L) y se recogió mediante centrifugación. El sedimento del mutante C383S recogido se puede lavar 2-3 veces para eliminar el NaCl, arginina o Tris restantes con tampón citrato 50 mM, pH 6,0. El sedimento de C383S lavado estuvo en forma muy pura (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de un proceso de purificación típico partiendo de 5 kg de sedimento celular lisado. Los datos de esta tabla son los resultados del análisis de los materiales de OxDC obtenidos al final de cada etapa.

	Concentración de proteína (g/L)	Actividad específica (U/mg de proteína)	Cantidad total de proteína (g)	Pureza (SDS-PAGE)	ADN (ng/mg de proteína)	Endotoxina (EU/mg de proteína)
Extracción	99	45,4	440	100	3,4	22000
Filtración	90	44,0	420	100	4,0	4000
HIC	60	44,3	360	100	4,1	< 0,5

	Concentración de proteína (g/L)	Actividad específica (U/mg de proteína)	Cantidad total de proteína (g)	Pureza (SDS-PAGE)	ADN (ng/mg de proteína)	Endotoxina (EU/mg de proteína)
Precipitación	50-100	44,6	350	100	3,7	< 0,5

Ejemplo 5

Formulaciones de dosis secadas por atomización (formación de partículas)

5 Proceso. Todos los experimentos de secado por atomización se llevaron a cabo con un aparato Niro Mobile Minor. Las condiciones de funcionamiento típicas del secado por atomización son las siguientes: temperatura de entrada: 180-220 °C, temperatura de salida: 85-95 °C, caudal de aire seco: 60-90 kg/h, caudal de aire de atomización: 8-15 kg/h, diámetro del orificio del inyector: 1-2 mm, caudal de alimentación: 1-4 kg/h. La Tabla 3 resume las composiciones de las diferentes formulaciones de partículas según esta invención.

10 Resultados. La Tabla 4 resume la actividad específica de los mutantes C383S en las diferentes formulaciones de partículas secadas por atomización y en disolución después de redisolver las partículas en tampón fosfato, pH 7,5. El polímero L 100-55 se disolvió en agua cuando el pH fue mayor de 5,5. El control fue el mutante C383S suspendido en tampón citrato 50 mM sin protección con polímeros, que perdió un 39% de actividad debido a la temperatura elevada y a la deshidratación experimentada durante el proceso de secado por atomización. El mutante C383S de las formulaciones 1 y 2 estuvo en disolución y distribuido uniformemente. La distribución del mutante C383S en la capa exterior de las microgotas del secado por atomización se podrían haber inactivado durante el proceso de secado por atomización, y así dieron como resultado una pérdida de actividad del 13% y 7%, respectivamente. En contraste, la actividad específica del mutante C383S en las formulaciones 3 a 8 fue mayor que la de la formulación 1. Cuando la estructura de estas partículas se destruye, por ejemplo, al disolver las formulaciones 4-7 en fosfato 50 mM, pH 7,5, la actividad específica vuelve a la normalidad o incluso a niveles reducidos en comparación con el C383S libre, debido a una inactivación parcial durante el secado por atomización.

La Tabla 5 resume los datos de estabilidad generados a partir de estas partículas secas. La incubación a 45 °C durante periodos especificados de tiempo mostró una estabilidad excelente de las formulaciones 1, 4 y 5.

25 La Tabla 6 resume los resultados del ensayo de protección hacia pepsina in vitro. Las partículas se suspendieron en pepsina (3,2 g/L)/tampón acetato. El pH fue 3,25 durante 40 minutos a 37 °C mientras se agitaba a 1100 rpm. Se midió la actividad restante tras el tratamiento mediante un ensayo de actividad. La Formulación 1 no proporcionó una protección significativa porque se disolvió en agua y destruyó la estructura de las partículas. Las formulaciones 2 a 8 mostraron una protección hacia pepsina.

Tabla 3. Formulaciones que se ensayaron mediante secado por atomización

	Formulación
1	0,6% de OxDC, 6% de trehalosa, 1,2% de PVA y 1,2% de Eudragit L100 en arginina 12 mM, pH 8,5
2	2% de OxDC, 2% de trehalosa, 2% de arginina y 3,9% de Eudragit L100-55, pH 9,0
3	3% de OxDC, 2% de trehalosa, 2,6% de arginina y 4,5% de Eudragit L100-55, pH 5,4
4	Igual que 2, excepto por la adición de un 0,3% de TEC
5	Igual que 3, excepto porque no se añadió arginina
6	3% de OxDC, 2% de trehalosa, 2,6% de arginina, 0,3% de TEC y 4,5% de Eudragit FS30D, pH 5,4
7	3% de OxDC, 2% de trehalosa, 2,6% de arginina, 0,3% de TEC y 4,5% de Eudragit RS, pH 5,4
8	3% de OxDC, 2% de trehalosa, 2,6% de arginina, 0,3% de TEC y 2,25% de Eudragit RL y 2,25% de Eudragit RS, pH 5,4

30 Tabla 4. Actividad específica de C383S en las partículas secadas por atomización y en las disoluciones después de destruir estas partículas disolviéndolas en tampón fosfato a pH 7,5.

ES 2 673 269 T3

Ensayo	Actividad específica de C383S en las partículas (U/mg de proteína) ^B	Cambio de la actividad específica de C383S (%)	Actividad específica de C383S después de disolver las partículas (U/mg de proteína)
C383S libre	45	100	--
Control ^A	27,5	61	27,0
1	39,2	87	39,4
2	48,9	93	48,5
3	57,2	127	--
4	63,5	141	44,3
5	55,8	124	42,6
6	46,8	104	41,7
7	57,2	127	43,0
8	57,2	127	--

^A Control: C383S suspendido en tampón citrato 50 mM, pH 6,0, y secado por atomización en las mismas condiciones.

^B Cálculo de la actividad específica de C383S: B/A. Aquí, A = la cantidad de C383S (mg) en 1 gramo de masa sólida de la alimentación; B = la actividad total (U) en un gramo de partículas secas obtenidas del secado por atomización.

5 Tabla 5. Actividad restante después de un cierto periodo de incubación a 45 °C.

Ensayo	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 12
Control						
1	36,1	--	37,6	40,0	--	41,6
2	42	35,9				
3	57,2	44,2				
4	63,5	52,2	--	65,3		
5	54,9	--	51,4	47,2		
6	46,8	29,1				
7	57,1	3,2				
8	57,1	42,5				

Tabla 6. Actividad después de 40 min tratado con disolución de pepsina de 3,2 mg/ml a pH 3,25.

Ensayo	Actividad de C383S restante (%)
Control	22
1	30
2	72

Ensayo	Actividad de C383S restante (%)
3	75
4	82
5	80
6	89
7	77
8	79

Ejemplo 6

Dosis in vivo de partículas reductoras de oxalato

5 Se llevó a cabo un estudio de 10 días en ratas Sprague-Dawley macho. El propósito de este estudio fue determinar los efectos de la administración de la formulación 5 de la Tabla 2 sobre la respuesta urinaria a la carga de oxalato en ratas Sprague-Dawley macho.

10 El estudio usó 18 ratas Sprague-Dawley macho que se dividieron en 3 grupos como se muestra en la Tabla 7, a las que se administraron dosis orales de la formulación 5 (Grupo 3) o vehículo (Grupo 2, control, citrato sódico 50 mM, pH 4,49) junto con una dieta elevada en oxalato. El grupo 1 fue otro grupo de control, y a las 6 ratas de este grupo no se les administró una dieta elevada en oxalato ni la formulación 5. Las ratas se sometieron a alimentación mediante sonda oral dos veces al día (BID). Las ratas del Grupo 3 recibieron 500 U de la formulación 5. Después de administrar las dosis a las ratas, 30 minutos después del inicio de la alimentación, se dio acceso libre a las ratas a alimentos durante otras 1,5 horas por la mañana (7:00-9:00 AM) y por la noche (3:30-5:30 PM). El alimento se pesó antes de la alimentación de la mañana y después de las alimentaciones de la mañana y de la tarde. Las ratas se alimentaron en sus jaulas normales, y se transfirieron inmediatamente a jaulas metabólicas tras la administración de las dosis en los días -1, 4 y 9 para captar las excreciones urinarias y fecales.

Determinación de oxalato

20 La determinación cuantitativa de oxalato de la orina se realizó mediante el kit colorimétrico adquirido de Trinity Biotech USA (St. Louis, MO). El ensayo se compone de dos reacciones enzimáticas como sigue: (1) el oxalato se oxida hasta CO₂ y H₂O₂ mediante la oxalato oxidasa y (2) el H₂O₂ reacciona con 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) y ácido 3-(dimetilamino) benzoico (DMAB) en presencia de peroxidasa para producir el colorante indamina que se puede detectar a 590 nm. El oxalato urinario se calcula a partir de una curva patrón.

Determinación de creatinina

25 Determinación de creatinina mediante el procedimiento LiquiColor® N° 0420. El kit colorimétrico de creatinina para la determinación cuantitativa de creatinina en orina se adquirió de StanBio Laboratory (Bocrne, Texas). El ensayo se basa en una modificación del método de la velocidad de reacción automatizada de Fabinay y Eringshausen, en el que la creatinina reacciona con ácido pícrico en condiciones alcalinas para formar un complejo coloreado a 510 nm. El desarrollo de color es directamente proporcional a la concentración de creatinina. La creatinina urinaria se calcula a partir de una curva patrón.

30 Tabla 7 Diseño del Estudio

Grupo	Dieta	Dosis	n° de Ratas	Días de dosificación	Excreción urinaria de oxalato (Ox/Cr)
1	Sin Ox	Citrato 50 mM	6	10	
2	HOD	Citrato 50 mM	6	10	
3	HOD	Formulación 5	6	10	

HOD = Dieta Elevada en Oxalato (Harlan Teklad TD04493)

Sin Ox= Harlan Teklad TD89222

Grupos 1 y 2: citrato sódico 50 mM, pH 4,49

Grupo 3: formulación 5

Resultados

5 La dosificación de la formulación 5 con una dieta elevada en oxalato disminuyó significativamente la excreción urinaria de oxalato de las seis ratas del grupo 3. Como media, se descubrió que 500 U de la formulación 5 alimentada con oxalato de la dieta redujo la excreción urinaria de oxalato en un 49-59% (Fig. 2).

Organismo del solicitante

5 Calle : Dragarbrunnsgatan 45
Ciudad : Uppsala
Estado :
País : Suecia
Código Postal : SE-75320
Número de teléfono :
10 Número de fax :
Dirección de email :

<110> Nombre de la organización : Oxthera Intellectual Property AB

Solicitante individual

15 Calle :
Ciudad :
Estado :
País :
Código Postal :
20 Número de teléfono :
Número de fax :
Dirección de email :

<110>Apellido: Li
25 <110>Nombre: Qingshan
<110> Inicial del segundo nombre :
<110> Sufijo :

Solicitante individual

30 Calle :
Ciudad :
Estado :
País :
Código Postal :
35 Número de teléfono :
Número de fax :
Dirección de email :

<110>Apellido: Cowley
40 <110>Nombre: Aaron
<110> Inicial del segundo nombre : B
<110> Sufijo :

Solicitante individual

45 Calle :
Ciudad :
Estado :
País :
Código Postal :
50 Número de teléfono :
Número de fax :
Dirección de email :

<110>Apellido: Gölander
55 <110>Nombre: Carl-Gustaf
<110> Inicial del segundo nombre :
<110> Sufijo :

Solicitante individual

60 Calle :
Ciudad :
Estado :
País :
Código Postal :
65 Número de teléfono :

Número de fax :
Dirección de email :

5 <110>Apellido: Sidhu
<110>Nombre: Harmmeet
<110> Inicial del segundo nombre :
<110> Sufijo :

Proyecto de la solicitud

10 <120> Título: PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DE OXALATO RECOMBINANTES Y PARTÍCULAS SECADAS POR ATOMIZACIÓN QUE CONTIENEN ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DE OXALATO.
<130> Referencia de la solicitud : P13530 EP / P13530
<140> Número de la solicitud actual :
15 <141> Fecha de presentación actual: _-_-

Secuencia

20 <213> Nombre del organismo: recombinante

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc
60 ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaacccgat
120 catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa
180 ggcggatatg ccgggaagt gacagtaagt gaattgcoga tttcagaaaa ccttgcattc
240 gtaaataatg ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa
300 tgggcttata tgattacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgagc
360 tttattgacg atgtaggaga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcaactc
420 atccaagcgc tggaggagg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct
480 gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct
540 gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatataa
600 tttgaaaacc aacttctctg cagtttaaaa gatgatattg tggaggggcc gaatggcgaa
660 gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgagggagga
720 aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgtc
780 gtaacagtag aaccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg
840 caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga
900 acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt
960 gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct
1020 gatgtatctt taaccaatg gcttgcctatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt
1080 gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccaccgt agtgaaaaag
1140 aatgcagta aa
1152
    
```

25 <212> Tipo : ADN
<211> Longitud : 1152
Nombre de la secuencia : SEC ID1
Descripción de la secuencia :

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo :

<400> Cadena de presecuencia:
35 catatgaaaa aacagaatga cattccacag ccgattcgcg gcgataaagg cgcgaccgtc 60

```

aaaattcctc gcaatatcga acgcgaccgc cagaatccgg atatgctggt gccgccggag 120
acggaccatg gcacgggtgc taacatgaaa ttctctttta gcgataccca caaccgcctg 180
gaaaaagggtg gctacgcgcg cgaggttacc gtccgtgaac tgccaattag cgaaaatctg 240
gcttcgggta acatgcgctc gaaaccaggt gctatccgtg agctgcaactg gcacaaggaa 300
gcggaatggg cgtatatgat ttacggttca gcacgtgta ccatcgtaga cgagaaagggt 360
cgtagcttta tcgatgatgt tggcgaagggt gatctgtggt atttcccatc tggcctgccc 420
cattcgattc aggcgctgga agaaggcgct gaatttctgc tgggtttcga tgatggttcc 480
ttttctgaaa acagcacgtt ccagctgacg gattggctgg cgcacacgcc gaaagaagtc 540
attgcgcca attttggggt aaccaaagaa gaaatttcca acctgccggg caaagaaaag 600
tatattttg agaatcagct gccgggctct ctgaaggacg atattgtaga aggccctaac 660
ggtgagggtc cgtatccgtt cacctatcgt ctgctggagc aggaaccgat tgaaagcgaa 720
ggcggtaaa tttatatcgc agattccact aactttaaag tctccaagac cattgccagc 780
gccctggta cgtggaacc gggagcgtg cgcgagctgc actggcatcc gaacacgcac 840
gaatggcagt attatattc cggcaaagca cgcatgacc tttttgcctc agatggacac 900
gctcgacgt ttaattatca agcgggtgat gttggctacg ttcctttcgc catgggccat 960
tatgtagaaa atatcggcga tgaaccactg gtgtttctgg agatctttaa agatgaccac 1020
tatgccgatg tttcactgaa tcagtggctg gccatgctgc cggaaacttt tgttcaggcg 1080
catctggacc tgggtaaaga ctttacggat gtgctgagca aagaaaaaca cccggtagtc 1140
aagaagaaat gcagtaaagg atcc 1164

```

<212> Tipo : ADN

<211> Longitud : 1164

5 Nombre de la secuencia: SEC ID2

Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

10

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcattc 240
gtaaatatgc ggctgaagc aggcgcgatt cgcgagctc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggactctcc cgtcaggcct gccgactcc 420
atccaagcgc tggaggagg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
ggaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaga aaaaatata 600
tttgaaaacc aacttctgag cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa 660
gtaccctatc catttaacta ccgccttctt gaacaagagc cgtatgaaatc tgaggaggaa 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgtc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccattgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacat ttgcaatggg tcattacggt 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttgaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgcctatg cttcctgaaa ctttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagc agtgaaaaag 1140
aaatctagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN

15

<211> Longitud : 1152

Nombre de la secuencia: SEC ID3

Descripción de la secuencia :

Secuencia

20 <213> Nombre del organismo :

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaacccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtagacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaagggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacggt 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccctgt agtgaaaaag 1140
aatccagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID4
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

10

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaacccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtagacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaagggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacggt 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccctgt agtgaaaaag 1140
aatcaagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 15 Nombre de la secuencia: SEC ID5
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

20

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

ES 2 673 269 T3

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggatga aggagacctt tggactctcc cgtcaggcct gccgactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgaggaggga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag 1140
aatcagagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID6
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggatga aggagacctt tggactctcc cgtcaggcct gccgactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgaggaggga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag 1140
aaaagtagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 15 Nombre de la secuencia: SEC ID7
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaacccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcaactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gccaacttcg gcgtagacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaagggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccctgt agtgaaaaag 1140
aaaagcagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID8
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

10

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaacccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcaactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gccaacttcg gcgtagacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaagggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccctgt agtgaaaaag 1140
aaacgtagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 15 <211> Longitud : 1152
 Nombre de la secuencia: SEC ID9
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

20

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

ES 2 673 269 T3

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgaggaggga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aaccggcgc catgagagaa ctgactggc accggaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacat ttgcaatggg tcattacggt 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagt agtgaaaaag 1140
aaacgcagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID10
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgaggaggga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aaccggcgc catgagagaa ctgactggc accggaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacat ttgcaatggg tcattacggt 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagt agtgaaaaag 1140
aaacgaagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 15 Nombre de la secuencia: SEC ID11
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

ES 2 673 269 T3

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggatga aggagacctt tggacttcc cgtcaggcct gccgcactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata ctttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa ctttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagc agtgaaaaag 1140
aaacggagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID12
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

10

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggatga aggagacctt tggacttcc cgtcaggcct gccgcactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata ctttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa ctttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagc agtgaaaaag 1140
aaaagaagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 15 Nombre de la secuencia: SEC ID13
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

20

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgaggaggga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aaccggcgc catgagagaa ctgcactggc accgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacggt 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccctgt agtgaaaaag 1140
aaaaggagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID14
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

10

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgaggaggga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aaccggcgc catgagagaa ctgcactggc accgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacggt 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccctgt agtgaaaaag 1140
aaagctagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 15 <211> Longitud : 1152
 Nombre de la secuencia: SEC ID15
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

20

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

ES 2 673 269 T3

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggatga aggagacctt tggactctcc cgtcaggcct gccgcactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gccaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag 1140
aaagccaagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID16
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

10

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaaccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtaggatga aggagacctt tggactctcc cgtcaggcct gccgcactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gccaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tgggaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cगतcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgccttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag 1140
aaagccaagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 15 Nombre de la secuencia: SEC ID17
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

20

```

<400> Cadena de presecuencia:
aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60

```

ES 2 673 269 T3

```

ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaacccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcaactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgcctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag 1140
aaagcagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 5 Nombre de la secuencia: SEC ID18
 Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo :

<400> Cadena de presecuencia:

```

aaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc 60
ccgcgcaata ttgaaagaga cgggcaaac cctgatatgc tggttccgcc tgaaacccgat 120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa 180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc 240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa 300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc 360
tttattgacg atgtagggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcaactcc 420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct 480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct 540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata 600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaaaggcc gaatggcgaa 660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgagggagga 720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgcctc 780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg 840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga 900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacatc ttgcaatggg tcattacgct 960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct 1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgttca agcgcacctt 1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag 1140
aaaggaagta aa 1152

```

<212> Tipo : ADN
 <211> Longitud : 1152
 15 Nombre de la secuencia: SEC ID19
 Descripción de la secuencia :

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar una proteína recombinante que es insoluble en el citoplasma de una célula hospedadora y que no se halla como un cuerpo de inclusión, que comprende,
- a) separar dicha proteína recombinante insoluble de las proteínas solubles de la célula hospedadora; y
- 5 b) solubilizar la proteína recombinante separada mediante el uso de un ligando de unión de proteínas seleccionado del grupo que consiste en arginina, Tris, Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} , en el que la proteína recombinante es el mutante C383S, C383A de la proteína oxalato descarboxilasa (OxDC) de tipo natural según SEQ. ID N°. 1 o SEQ. ID N°. 2, o la proteína OxDC codificada por una secuencia seleccionada de SEQ. ID N°. 3, SEQ. ID N°. 4, SEQ. ID N°. 5, SEQ. ID N°. 6, SEQ. ID N°. 7, SEQ. ID N°. 8, SEQ. ID N°. 15, SEQ. ID N°. 16, SEQ. ID N°. 17, SEQ. ID N°. 18, o SEQ. ID N°. 19.
- 10
2. Un método según la reivindicación 1, que comprende además, c) aislar la proteína recombinante solubilizada de la disolución solubilizante.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que la separación de la proteína recombinante comprende la centrifugación o filtración.
- 15 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solubilización de la proteína recombinante comprende proporcionar un pH en el que la proteína es soluble.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el aislamiento comprende precipitar la proteína recombinante de la disolución solubilizante.
6. Un método según la reivindicación 5, que comprende además lavar la proteína recombinante precipitada.
- 20 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proteína recombinante es el mutante C383S de la proteína OxDC de tipo natural según SEQ. ID N°. 1 o SEQ. ID N°. 2, o la proteína OxDC codificada por una secuencia seleccionada de SEQ. ID N°. 3, SEQ. ID N°. 4, SEQ. ID N°. 5, SEQ. ID N°. 6, SEQ. ID N°. 7, o SEQ. ID N°. 8.
- 25 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proteína recombinante es el mutante C383A de la proteína OxDC de tipo natural según SEQ. ID N°. 1 o SEQ. ID N°. 2, o la proteína OxDC codificada por una secuencia seleccionada de SEQ. ID N°. 15, SEQ. ID N°. 16, SEQ. ID N°. 17, SEQ. ID N°. 18, o SEQ. ID N°. 19.

FIGURA 1

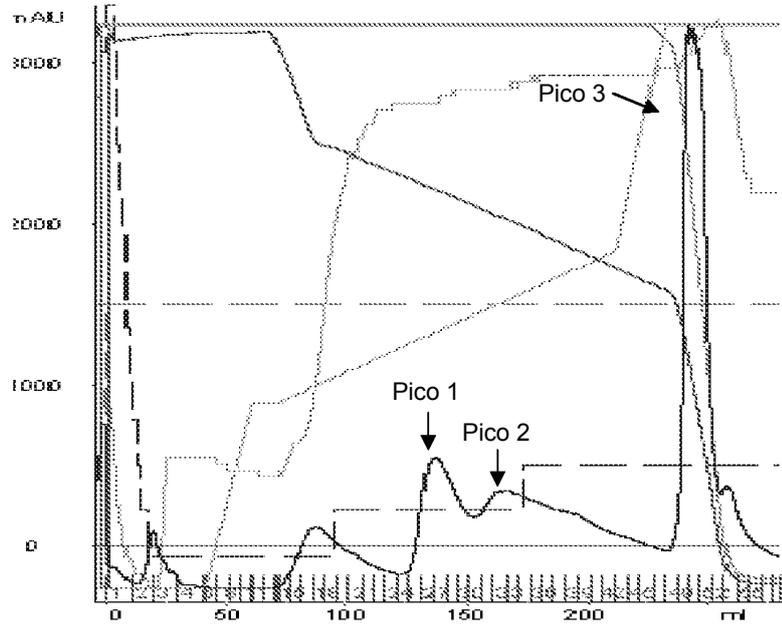


FIGURA 2

