

(11) Número de Publicação: **PT 983076 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 35/74** (2007.10) **A61K 38/51** (2007.10)  
**A61K 38/45** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

|                                                                    |                                                                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (22) Data de pedido: <b>1998.05.22</b>                             | (73) Titular(es):<br><b>OXTHERA, INC.,</b><br><b>13709 PROGRESS BOULEVARD, SUITE 17</b><br><b>ALACHUA, FL 32615</b> <b>US</b>         |
| (30) Prioridade(s): <b>1997.05.23 US 47473 P</b>                   |                                                                                                                                       |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2000.03.08</b>               |                                                                                                                                       |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2009.09.30</b><br><b>002/2010</b> | (72) Inventor(es):<br><b>HARMEET SIDHU</b> <b>US</b><br><b>MILTON J. ALLISON</b> <b>US</b>                                            |
|                                                                    | (74) Mandatário:<br><b>MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA</b><br><b>RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA</b> <b>PT</b> |

(54) Epígrafe: **MICROORGANISMOS DE DEGRADAÇÃO DE OXALATO OU ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DE OXALATO PARA PREVENIR DOENÇAS RELACIONADAS COM OXALATO**

(57) Resumo:

## **RESUMO**

### **"MICRORGANISMOS DE DEGRADAÇÃO DE OXALATO OU ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DE OXALATO PARA PREVENIR DOENÇAS RELACIONADAS COM OXALATO"**

Esta invenção proporciona materiais e procedimentos para o fornecimento de estirpes seleccionadas de bactérias e/ou enzimas de degradação de oxalato para os tratos intestinais de pessoas que estão em elevado risco para contrair a doença relacionada com oxalato porque perderam ou possuem concentrações inadequadas desta bactéria. A administração desta bactéria e/ou de enzima relevante remove oxalato do trato intestinal e reduz assim a quantidade de oxalato disponível para absorção reduzindo o risco para contrair a doença relacionada com oxalato.

**DESCRIÇÃO**  
**"MICRORGANISMOS DE DEGRADAÇÃO DE OXALATO OU ENZIMAS DE**  
**DEGRADAÇÃO DE OXALATO PARA PREVENIR DOENÇAS RELACIONADAS**  
**COM OXALATO"**

**Antecedentes da invenção**

A doença dos cálculos do trato urinário de kidney (urolitíase) é o maior problema de saúde do mundo. A maior parte dos cálculos associadas à urolitíase é composta só por oxalato de cálcio ou por oxalato de cálcio mais fosfato de cálcio. Outros estados de doenças foram também associados ao excesso de oxalato. Estes incluem a vulvodínia, a oxalose associada à doença renal crónica e à doença de Crohn e a outros estados de doença entérica.

O ácido oxálico (e/ou os seus sais de oxalato) encontra-se numa larga diversidade de alimentos e, em consequência, um componente de muitos constituintes em dietas humanas. Pode ocorrer o aumento da absorção de oxalato após a ingestão de alimentos contendo elevadas quantidades de ácido oxálico. Alimentos tais como espinafres e ruibarbo são bem conhecidos por conterem elevadas quantidades de oxalato mas uma multidão de outros alimentos e bebidas também contém oxalato. Porque o oxalato é encontrado numa tal gama de alimentos, as dietas que são baixas em oxalatos e que são também saborosas são difíceis de formular.

O oxalato é também produzido metabolicamente por enzimas de tecido normal. O oxalato (oxalato dietético que é absorvido bem como oxalato que é produzido metabolicamente) não é adicionalmente metabolizado pelas enzimas de tecido e pode, em consequência ser expelido. Esta excreção ocorre

principalmente via Kidneys. A concentração de oxalato em fluidos Kidney é crítica com aumento de concentrações de oxalato provocando aumento de risco pela formação de cristais de oxalato de cálcio e deste modo a subsequente formação de cálculos Kidney.

O risco para a formação de cálculos Kidney gira à volta de um número de factores que não estão ainda completamente compreendidos. A doença do cálculo do trato urinário Kidney ocorre em cerca de 2% da população dos países ocidentais e cerca de 70% destes cálculos são compostos por oxalato de cálcio ou oxalato de cálcio mais fosfato de cálcio. Alguns indivíduos (p.ex. doentes com doença intestinal tal como doença de Crohn, doença dos intestinos inflamatória ou esteatorréia e também doentes que possuem jejunoileal cirurgia de bypass) absorvem mais oxalato nas suas dietas do que outros. Para estes indivíduos a incidência de oxalato urolitíase aumenta acentuadamente. A incidência do aumento da doença é devida aos níveis de aumento de oxalato em Kidneys e urina; o síndrome hiperoxalúrico mais comum no homem é conhecido como hiperoxalúria entérica. O oxalato é também um problema em doentes com insuficiência renal crónica e há uma evidência recente (Solomons et al. [1991] "Citrato de Cálcio para vestibulítese vulvar (vulvodínia)).

As bactérias que degradam o oxalato foram isoladas das fezes humanas (Allison et al. [1986] "Degradação do oxalato por bactérias gastrointestinais de seres humanos" J.Nutr. 116:455-460). Estas bactérias parecem ser semelhantes às bactérias de degradação de oxalato que foram isoladas a partir do conteúdo intestinal de um número de espécies animais (Dawson et al. [1980] "Isolation and some

characteristics of anaerobic oxalate-degrading bacteria the rumen" Appl. Environ. Microbiol. 40:833-839; Allison and Cook [1981] "Oxalate degradation by microbes of the large bowel of herbivores: the effect of dietary oxalate" Science 212:675-676; Daniel et al. [1987] "Microbial degradation of oxalate in the gastrointestinal tracts of rats" Appl. Environ. Microbiol. 53:1793-1797). Estas bactérias são diferentes de quaisquer organismos descritos previamente e foi dada a ambas um novo nome de espécie e de género, *formigenes* (Allison et al. [1985] "Oxalabacter formigenes gen.nov., sp. Nov.: anaeróbios de degradação de oxalato que habitam no trato intestinal" Arch. Microbiol. 141:1-7).

Nem todos os humanos carregam populações de *O. Formigenes* nos seus tratos intestinais (Allison et al. [1995] "Oxalate-degrading bacteria" in Khan, S.R. (ed.), Calcium Oxalate in Biological Systems CRC Press; Doane et al. [1989] "Microbial oxalate degradation: effects on oxalate and calcium balance in humans" Nutrition Research 9:957-964). Há concentrações muito baixas ou uma completa falta de bactéria de degradação nas amostras fecais das pessoas que tinham tido jejunoileal cirurgia de bypass (Allison et al. [1986] "Oxalate degradation bacteria from humans" J. Nutr. 116:455-460).

### **Breve Resumo da Invenção**

O assunto da invenção refere-se a materiais e métodos que reduzem o risco para desenvolvimento de urolithiasis limitando a quantidade de oxalato dietético absorvido do trato intestinal. Numa forma de realização da invenção, uma redução na absorção de oxalato é atingida através do fornecimento de bactérias de degradação de oxalato ao trato intestinal. Numa forma de realização preferida estas

bactérias são *Oxalobacter formigenes*. Estas bactérias usam apenas oxalato como um substrato de crescimento. Esta utilização reduz a concentração de oxalato solúvel no intestino e assim a quantidade de oxalato disponível para absorção.

Numa forma de realização específica, a matéria da invenção proporciona materiais e procedimentos para o fornecimento de *O. Formigenes* aos tratos intestinais de pessoas que estão em risco crescente para doenças relacionadas com oxalato. Estas bactérias e a sua prole replicam no intestino e removem oxalato do trato intestinal, reduzindo, desse modo, a quantidade de oxalato disponível para absorção e o risco para a doença relacionada com oxalato.

Ainda numa outra forma de realização da matéria da invenção, a redução na absorção de oxalato é atingida pela administração de enzimas que actuam para degradar o oxalato. Estas enzimas podem ser isoladas e purificadas ou podem ser administradas como um lisato de célula de *Oxalobacter formigenes*. Numa forma de realização específica, as enzimas que são administradas são formil-CoA transferase e oxalil-CoA descarboxilase. Numa forma de realização preferida, podem ser administrados factores adicionais que melhoram a actividade da enzima. Estes factores adicionais podem ser, por exemplo, oxalil CoA,  $MgCl_2$  e TPP (difosfato de tiamina uma forma activa de vitamina B<sub>1</sub>.)

Ainda um outro aspecto da invenção refere-se a composições farmacêuticas para administração oral. Estas composições libertam o oxalato degradando micróbios, ou oxalato degradando enzimas no intestino delgado dos seres humanos.

Preferencialmente os microrganismos e/ou enzimas são encapsuladas num sistema de libertação de dose que diminui a probabilidade de libertar os materiais no estômago humano mas aumenta a probabilidade de libertar no intestino delgado.

### **Breve Descrição das Figuras**

**Figura 1a** mostra os resultados de uma avaliação do estudo da gordura do oxalato dietético quando as células de *Oxalobacter formigenes* são incluídas na dieta.

**Figura 1b** mostra os resultados de uma avaliação do estudo da gordura quando as células de *Oxalobacter formigenes* estão incluídas na dieta.

**Figura 2a** mostra os resultados de uma avaliação do estudo da gordura quando as células de *Oxalobacter formigenes* estão incluídas na dieta.

**Figura 2b** mostra os resultados de uma avaliação do estudo da gordura quando as células de *Oxalobacter formigenes* estão incluídas na dieta.

**Figura 2c** mostra os resultados de uma avaliação do estudo da gordura quando as células de *Oxalobacter formigenes* estão incluídas na dieta.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

A matéria da invenção refere-se a introdução de bactérias e/ou enzimas de degradação de oxalato no trato intestinal humano onde a actividade destes materiais reduz a absorção de oxalato e reduz o risco de doença devido ao oxalato.

Numa forma de realização específica, a invenção refere-se à preparação e administração de células de bactérias de degradação de oxalato das espécies, *Oxalobacter formigenes*, ao trato intestinal humano onde as suas actividades

metabólicas reduzem a quantidade de oxalato disponível para absorção do intestino e assim reduzem as concentrações de oxalato em Kidney e outros fluidos celulares. As células introduzidas degradam o oxalato e replicam no habitat intestinal de tal forma que a prole das células iniciais colonizam o intestino e continuam a remover oxalato. Esta actividade reduz o risco de formação de cálculos Kidney bem como outras complicações de doenças provocadas pelo ácido oxálico. Numa forma de realização preferida, as estirpes específicas de *O. Formigenes* usadas são estirpes isoladas de amostras de intestino humano. As estirpes são assim parte normal da flora bacterial do intestino humano. Porém, visto que não estão presentes em todas as pessoas, a introdução destes organismos corrige uma deficiência que existe em alguns seres humanos.

O enriquecimento dos conteúdos do intestino delgado com uma ou mais espécies de bactérias de degradação de oxalato provoca a redução de oxalato nos conteúdos do intestino. Algumas destas bactérias realizam a degradação do oxalato no ou perto do local de absorção. A actividade das bactérias decresce o nível de absorção de oxalato dietético.

As composições farmacêuticas para a introdução de bactérias e/ou enzimas de degradação de oxalato no intestino delgado incluem bactérias e/ou enzimas que foram liofilizadas ou congeladas na forma líquida ou de pasta e encapsuladas numa cápsula de gel. O material de capa de gel é, de preferência, um material polimérico que forma um comprimido ou cápsula de libertação que é resistente à degradação pela acidez gástrica e pepsina do estômago mas é degradado com libertação concomitante de materiais de degradação de

oxalato devido ao pH mais elevado e conteúdo de bÍlis na proximidade do intestino delgado. O material de libertação cobre, então, o oxalato presente no intestino delgado em produtos inofensivos. Os veÍculos farmacÊuticos também podem ser combinados com as bactÉrias ou enzimas. Estes poderiam incluir tampão de fosfato salino.

As bactÉrias e/ou enzimas para ser administradas podem ser fornecidas como cápsulas ou microcápsulas designadas para proteger o material dos efeitos adversos do estômago ácido. Podem ser usados um ou mais dos vários métodos de revestimento protectores entÉricos. As descrições desses revestimentos entÉricos incluem o uso de ftalato de acetato de celulose (CAP) (Yacobi, A., E.H. Walega, 1988, formulações de libertação controlada oral: Doseamento e avaliação, Pergammon Press). Outras descrições da tecnologia de encapsulação incluem U.S. Patent N° 5,286,495.

As estirpes de bactÉrias (*O. formigenes*) usadas de acordo com a matéria da invenção são preferencialmente culturas puras que estão isoladas das culturas anaeróbicas que foram inoculadas com diluições de conteúdos de intestinos de seres humanos normais. Pode ser usado um oxalato de cálcio especial contendo um meio que permite a detecção de colónias de degradação de oxalato. A pureza de cada estirpe pode ser assegurada através do uso de, pelo menos, dois passos de clonagem repetitiva subsequente.

As estirpes de *O. formigenes* Úteis de acordo com a matéria da invenção têm sido caracterizadas com base em vários testes, que incluem: padrões de ácidos gordos celulares, padrões de proteínas celulares, ADN e ARN (Jensen and

Allison, 1995), e respostas de sondas oligonucleótidas (Sidhu *et al.* 1996). Dois grupos destas bactérias (Grupos I e II, existindo ambos dentro da presente descrição das espécies) foram descritos. As estirpes usadas foram seleccionadas com base na capacidade de degradação e na evidência da habilidade para colonizar o trato intestinal humano. As estirpes seleccionadas incluem representantes de ambos os Grupos I e II das espécies.

A divulgação é procedimentos para selecção, preparação e administração das bactérias de degradação de oxalato para uma diversidade de matérias. De modo proeminente mas não exclusivamente, estas são pessoas que não acolhem estas bactérias nos seus intestinos. Estas pessoas não colonizadas estão identificadas usando testes que permitem rápida e definitiva detecção de *O. Formigenes* mesmo quando os organismos estão em concentrações relativamente baixas nas populações bacteriais tal como se encontram nos conteúdos intestinais. As composições da invenção também podem ser usadas para tratar indivíduos cujas bactérias de degradação de oxalato tenham sido esgotadas devido a, por exemplo, tratamento antibiótico ou situações pós-operatórias. As bactérias que podem ser usadas de acordo com a invenção podem ser identificadas por, pelo menos, dois métodos:

- 1)Sondas oligonucleótidas específicas para estas bactérias podem ser usadas; e/ou
- 2)Uma cultura teste em que um meio anaeróbico com 10 mM de oxalato é inoculado e após incubação a 37°C durante 1 a 7 dias, determina-se a perda de oxalato.

Culturas puras de estirpes de *O. formigenes* podem ser desenvolvidas num fermentador grande de culturas a granel e as células podem ser colhidas usando técnicas conhecidas dos técnicos da especialidade. As células de uma única estirpe ou misturas de estirpes conhecidas podem ser tratadas como necessário (p. ex. glicerol ou trehalose seco congelado) para preservar a viabilidade e são depois colocadas em cápsulas designadas para proteger as células através da sua passagem pelo estômago ácido (cápsulas entéricas revestidas).

As células são ingeridas em quantidades e em intervalos determinados pelas necessidades individuais. Nalguns casos o uso simples ou periódico pode ser tudo o que é necessário e noutros casos pode ser necessária a ingestão regular.

A invenção refere-se ainda à administração ao trato intestinal de produtos ou enzimas de degradação de oxalato preparados a partir de células de *O. Formigenes*. Numa forma de realização, as enzimas de degradação de oxalato podem ser purificadas e preparadas como uma composição farmacêutica para consumo oral. Numa forma de realização preferida, estas enzimas são produzidas de forma recombinante. As sequências de ADN que codificam estas enzimas são conhecidas dos peritos da especialidade e são descritas em, por exemplo, WO 98/16632. Estas sequências ou outras sequências que codificam proteínas de degradação de oxalato podem ser expressas num hospedeiro apropriado. O hospedeiro pode ser, por exemplo, *E. coli*. A proteína expressa pode ser isolada, purificada e administrada como descrito aqui. Alternativamente, o hospedeiro recombinante expressando as proteínas de degradação de oxalato pode ser administrado. O hospedeiro recombinante pode ser

administrado tanto numa forma viável como não viável. Numa outra forma de realização preferida, as enzimas são revestidas ou, por outro lado, formuladas ou modificadas para proteger as enzimas de forma que não são inactivadas no estômago e estão disponíveis para exercer a sua actividade de degradação de oxalato no intestino delgado. Exemplos dessas formulações são conhecidos dos peritos da especialidade e estão descritos em, por exemplo, U.S. Patent N° 5,286,495.

Os exemplos seguintes ilustram procedimentos para a prática da invenção. Estes exemplos não podem ser considerados como limitativos.

#### **Exemplo 1 - Tratamento de Doentes de Risco**

Células de *O. Formigenes* revestidas entéricas podem ser ingeridas por populações doentes de elevado risco para doenças relacionadas com oxalato. Estas incluem:

1. Pessoas que possuem perda de bactérias de degradação de oxalato normal devido a: tratamentos com antibióticos de via oral ou ataques de diarreias.
1. Pessoas que possuem uma história de urolithiasis com múltiplos episódios de doença de cálculos idiopáticos.
2. Pessoas em risco para urolithiasis com elevado oxalato urinário devido a doença entérica (hiperoxaluria entérica).
3. Pessoas com elevados níveis de oxalato de soro devido ao fim da doença renal crónica.
4. Pessoas com vestibulitis vulvar.

5. Pessoas que têm diabetes com elevados níveis de oxalato tal como encontrado em certas áreas e estações da Índia e da Arábia Saudita.

#### **Exemplo 2-Tratamento de Doentes de Baixo Risco**

1. Pessoas que possuem perda de bactérias de degradação de oxalato normal devido a: tratamentos com antibióticos de via oral ou ataques de diarreias.

2. As crianças serão inoculadas de modo que uma população protectora normal de *Oxalobacter* será mais facilmente estabelecida do que no caso de mais tarde na vida quando operam os princípios de exclusão de competitividade.

3. Outros como pessoas ainda não especificadas que podem beneficiar.

#### **Exemplo 3- Uso de enzimas de degradação de oxalato de *Oxalobacter formigenes* para controlar hiperoxaluria**

Conduziu-se um estudo para avaliar a eficácia das enzimas de degradação de oxalato a partir de *Oxalobacter formigenes* para controlar hiperoxaluria.

|                                            |                                                                                                                           |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Animais usados:                            | Male Sprague Dawley Rats: BW 250-300g                                                                                     |
| Dietas usadas:                             | Dieta normal (N.D.): Harlan Teklad TD 89222; 0,5% Ca, 0,4% P                                                              |
| Drogas usadas:                             | Mistura liofilizada de lisato de <i>Oxalobacter formigenes</i> (fonte de enzimas) com Oxalil CoA, MgCl <sub>2</sub> e TPP |
| Sistema de libertação de drogas(cápsulas): | cápsulas de tamanho 9 para estudos preclínicos de ratos (Capsu-Gel).                                                      |

Revestimento entérico Eudragit L-100-55 (Hulls América, Inc.). Coleccção básica de urina 24 horas. Análise fecal

para *Oxalobacter formigenes* -os ratos não foram colonizados com *Oxalobacter formigenes*.

### **Protocolo Experimental:**

#### **A. Estudos a longo prazo:**

##### **Protocolo animal:**

Grupo I (n=4): Alimentação de dieta de oxalato com lisato. Aos ratos deram-se duas cápsulas todos os dias às 4:00 p.m. e dieta de oxalato todas as noites. A dieta foi removida durante o dia (8:00 a.m. a 4:00 p.m)

Grupo II (n=4): Alimentação de dieta de oxalato como descrito para o Grupo I (Controlos hiperoxalúrico). Foram colhidas 24 horas de amostras de urina no dia 7 e no dia 9 do tratamento acima descrito.

Os dados sobre a concentração do meio oxalato urinário para os dois grupos de ratos mostrados atrás indicaram que a alimentação de lisato de *Oxalobacter* baixou a concentração de oxalato urinário nos ratos do Grupo I quando comparados com os controlos hiperoxalúrico (Grupo II). As enzimas não podem ser activas durante uma longa duração no trato gastrointestinal; consequentemente, estudos a curto prazo foram realizados como se descreve abaixo.

#### **B. Estudos a curto prazo:**

##### **Protocolo animal:**

Grupo I (n=4): Alimentação de 1 cápsula às 8:00 a.m; dieta de oxalato durante duas horas (os ratos foram jejuados durante a noite de modo que

comeram bem durante este período) e 1 cápsula às 10:00 a.m.

Grupo II (n=4): dieta de oxalato durante duas horas como para o Grupo I.

A urina foi colhida de todos os animais durante as cinco horas seguintes e analisada para a concentração de oxalato. Isto realizou-se nos dias 11,12 e 15 deste estudo.

Os resultados deste estudo mostraram que a alimentação de lisato de *Oxalobacter* produz um decréscimo significativo nos níveis de oxalato urinário num período de 5 horas após a administração de oxalato e droga nos ratos do Grupo I quando comparado com o grupo de controlo hiperoxalúrico (Grupo II). Neste ponto, realizou-se um estudo cruzado entre os dois grupos de ratos.

### **C. Estudos Cruzados:**

#### **Protocolo Animal:**

Grupo I: a alimentação de dieta de oxalato duas vezes por dia das 8:00-10:00 a.m. e das 3:00 p.m. -5:00 p.m.

Grupo II: alimentação de 1 cápsula duas vezes por dia antes da alimentação da dieta de oxalato como para o grupo I.

Estudos a curto prazo para o efeito da alimentação de lisato de *oxalobacter* nos níveis de oxalato urinário foram realizados como descrito na Secção B atrás nos dias 2 e 5 após ligação cruzada.

Estudos cruzados mostram que os ratos do grupo II previamente hiperoxalúricos que estão agora a alimentar o lisato de *Oxalobacter*, mostram uma diminuição nos níveis de oxalato urinário. Em contraste, os ratos do Grupo I reverterem para hiperoxalúria na retirada da droga.

#### **Exemplo 4- Tratamento de ratos com células de *Oxalobacter formigenes***

##### **Métodos:**

Ratos machos Wistar foram alimentados com cálcio normal (1%), dieta elevada de oxalato (0,5%) ou cálcio baixo (0,02%), dieta de oxalato elevada (0,5%) durante duas experiências separadas. Deu-se durante 1 dia  $^{14}\text{C}$ -oxalato (2,0uCi) e novamente no dia 7 do estudo. As células de *Oxalobacter formigenes* (380mg/d) foram administradas em ratos bebendo água nos dias 5-11. A gordura de  $^{14}\text{C}$  de oxalato foi medida com base na análise de  $^{14}\text{C}$  nas fezes, urina e ar expirado. Os ratos serviram como auto controles e fizeram-se medições durante o período de controlo (antes das células *Oxalobacter* serem alimentadas) e durante os dias 1-4; durante o período experimental (quando as células bacteriais foram alimentadas) fizeram-se medições nos dias 7-11.

##### **Resultados:**

1. Quando os ratos foram alimentados (1%) com a dieta de cálcio normal, menos do que 1% da dose administrada de  $^{14}\text{C}$  de oxalato foi recuperada no ar expirado (como dióxido de carbono produzido de  $^{14}\text{C}$  oxalato no intestino, absorvido no sangue e depois expirado) porém em todos os casos mais do que  $^{14}\text{C}$  foi recuperado durante o período em que os ratos foram alimentados com células *Oxalobacter* (Fig.1a). Isto

está em contraste com os resultados obtidos quando a dieta foi baixa em cálcio (0,02%) quando mais do que 50% do  $^{14}\text{C}$  do oxalato foi recuperado como dióxido de carbono no ar expirado durante o período experimental quando os ratos foram alimentados pelas células de *Oxalobacter* (Fig.1b). Estes resultados são muito diferentes dos de muito baixa quantidade de  $^{14}\text{C}$  (menos do que 5%) recuperados durante o período de controlo (antes da alimentação das células *Oxalobacter*). Assim a alimentação das células *Oxalobacter* formigenes a ratos aumentou marcadamente a quantidade de oxalato dietético que foi degradado no trato intestinal.

2. A alimentação das células *Oxalobacter* também diminuiu a quantidade de  $^{14}\text{C}$ -oxalato que foi expelida na urina. Os valores durante 4 dias de colheitas durante ambos os períodos de controlo e experimental e para um dia simples em cada um destes períodos são mostrados nas figuras 2a e 2b respectivamente. As quantidades de oxalato recuperadas nas fezes dos ratos foram também mais baixas durante o período experimental (quando as células *Oxalobacter* foram alimentadas) do que as encontradas durante o período de controlo (Fig. 2c).

A maior parte dos ratos laboratoriais não possuem *Oxalobacter* nos tratos intestinais (eles não são colonizados). Os resultados presentes mostram que aquela administração decidida destas bactérias de degradação do oxalato a ratos provoca uma grande porção do oxalato dietético a ser degradado e consequentemente menos oxalato da dieta é expelido na urina.

Os efeitos do cálcio dietético sobre a degradação do oxalato são grandes. O cálcio forma complexo com oxalato de

tal forma que a sua solubilidade e disponibilidade para ataque por *Oxalobacter* é limitado e a quantidade que é degradada quando os ratos são alimentados com dieta de cálcio elevada é muito menor do que as quantidades degradadas quando o cálcio na dieta é baixo.

Deve-se entender que os exemplos e formas de realização descritos aqui são apenas com o propósito ilustrativo e que várias modificações ou alterações serão submetidas a peritos da especialidade e são para serem incluídas no âmbito das reivindicações apensas.

Lisboa, 28 de Dezembro de 2009

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição para o tratamento de oxalato relacionado com doenças nos seres humanos pela redução de oxalato nos intestinos e consequente redução da concentração de oxalato no fluido de Kidney, caracterizada por a referida composição compreender um material seleccionado de entre os grupos que consistem em micróbios e enzimas que degradam o oxalato em que a composição é formulada para reduzir desactivação no estômago e em que a referida composição é revestida com um material que degrada no intestino delgado.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a composição compreender bactérias de degradação de oxalato viável.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que as bactérias são *Oxalobacter formigenes*.
4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por as enzimas de degradação do oxalato estarem presentes na forma de um lisato de célula liofilizada de bactérias de degradação de oxalato.
5. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 4, caracterizado por a enzima ser formil-CoA transferase ou oxalil CoA descarboxilase.
6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por a composição compreender um composto seleccionado de entre oxalil CoA,  $MgCl_2$  e difosfato de tiamina.

Lisboa, 28 de Dezembro de 2009

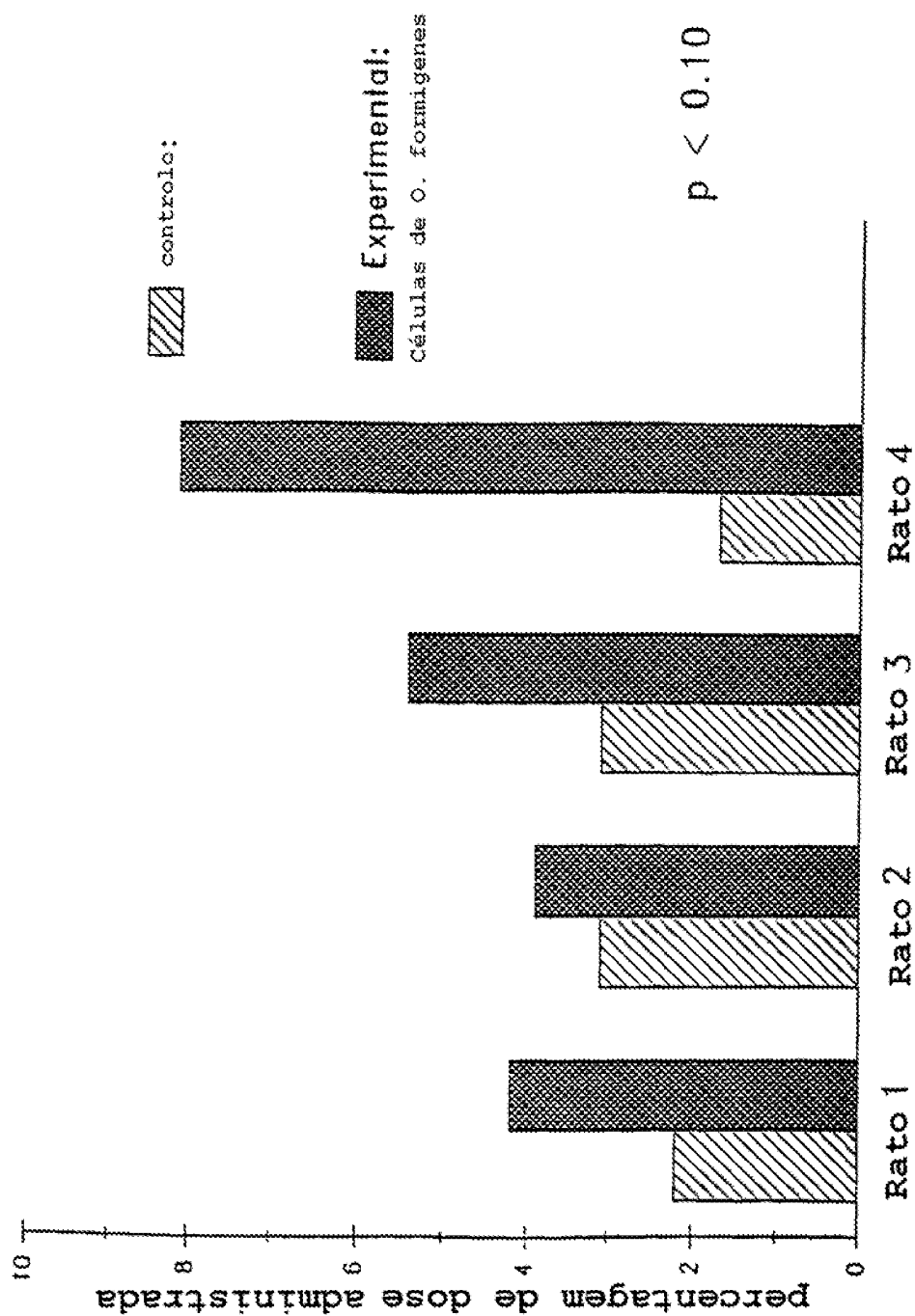


FIG. 1A

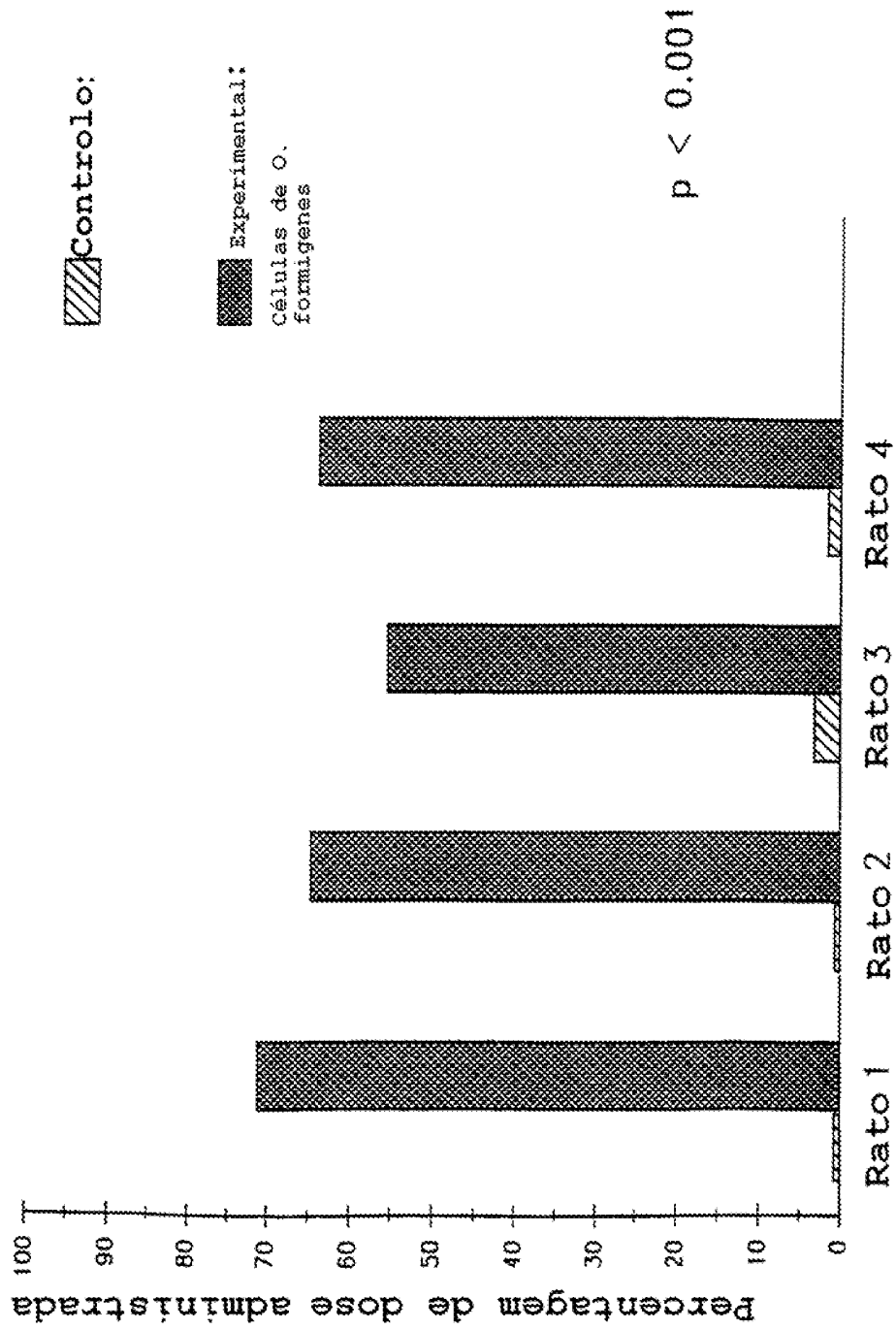


FIG. 1B

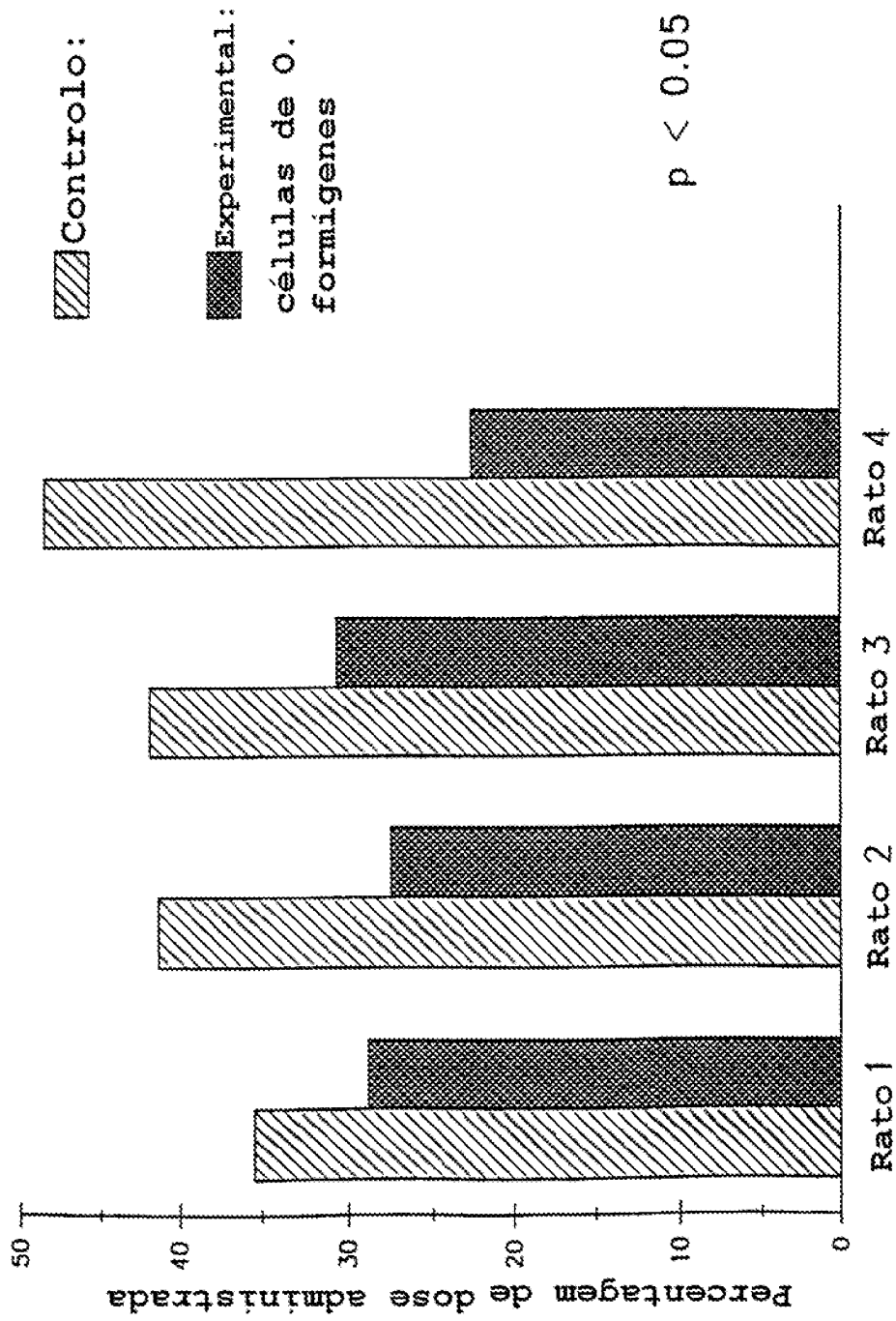
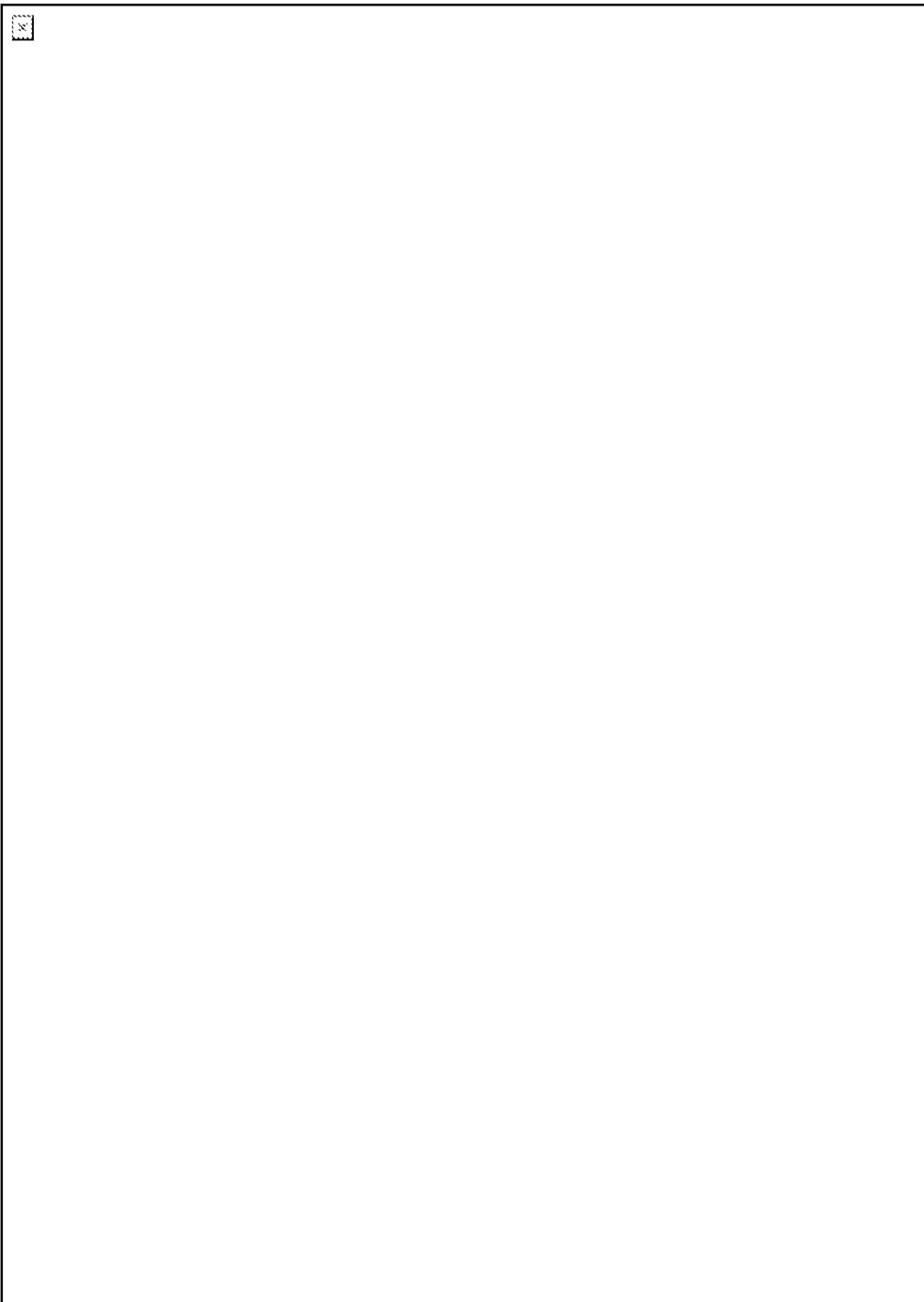


FIG. 2A



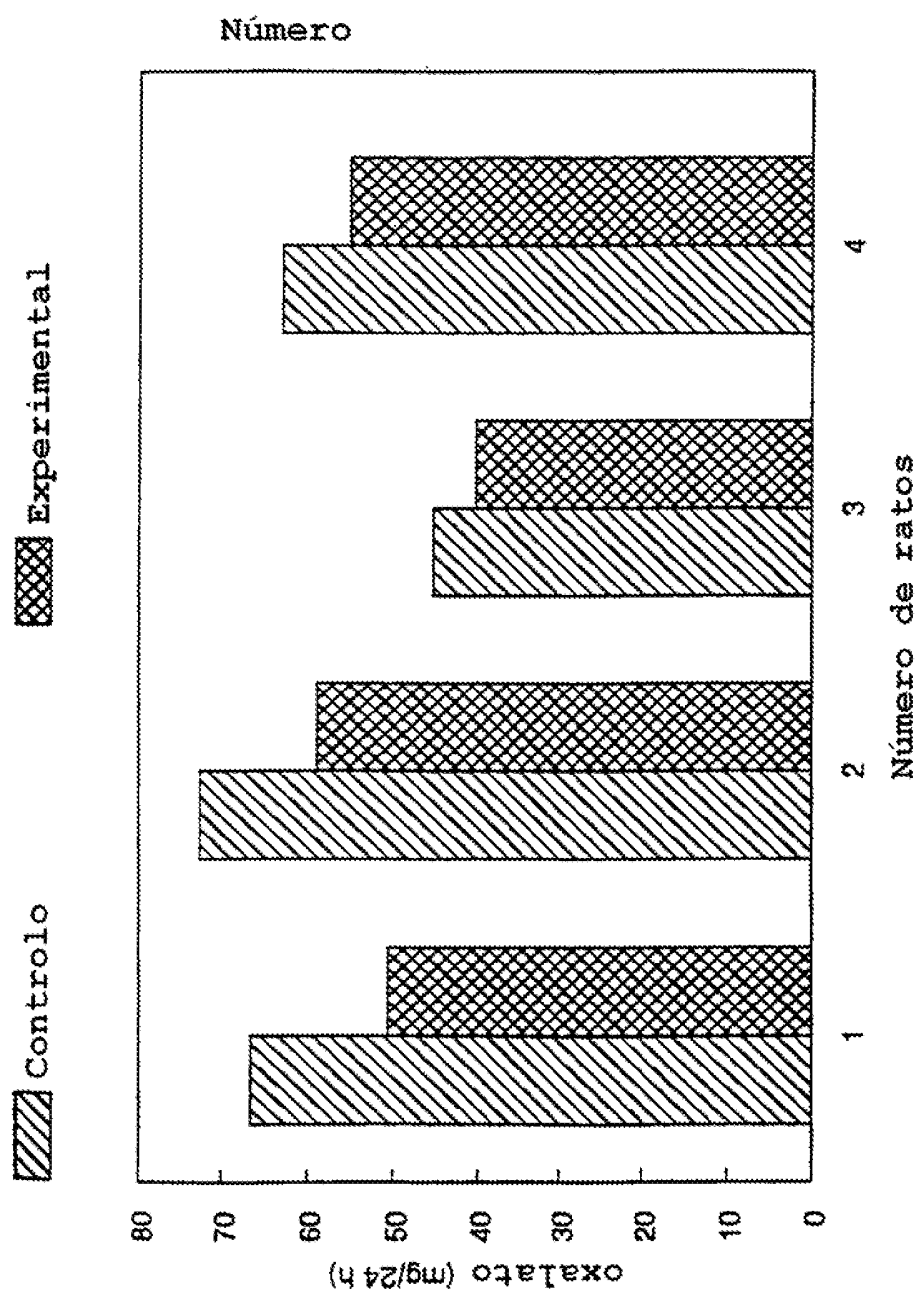


FIG. 2C