



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109641019 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780036943.1

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2017.06.13

代理人 初明明 黄希贵

(30)优先权数据

1650828-5 2016.06.13 SE

(51)Int.Cl.

A61K 35/74(2015.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.13

A61P 1/16(2006.01)

A61P 13/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/064422 2017.06.13

A61P 13/12(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/216165 EN 2017.12.21

(71)申请人 奥克斯泰拉知识产权公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72)发明人 E.林德内 M.阿克曼 A.斯约格林

O.麦克里昂

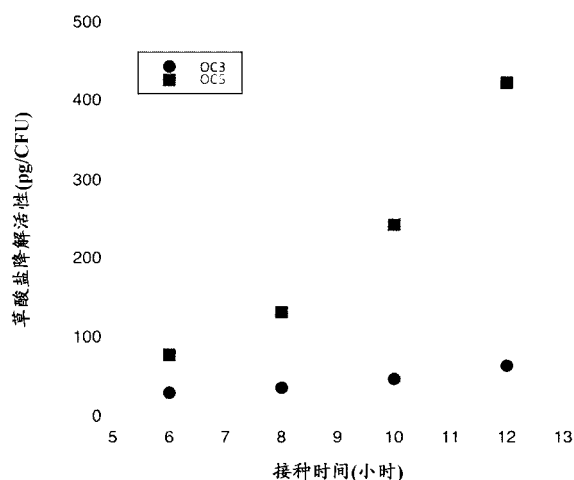
权利要求书3页 说明书25页 附图3页

(54)发明名称

用于治疗或预防草酸盐相关病症的组合物和方法

(57)摘要

本公开内容涉及用于治疗 and/或预防草酸盐相关病症的药物组合物和方法。更具体地,本公开内容涉及包含草酸盐降解细菌产甲酸草酸杆菌(*Oxalobacter formigenes*)的组合物,所述细菌特别适合于治疗和/或预防以高血浆草酸盐水平和肾功能进行性降低为特征的晚期高草酸尿症。



1. 一种药物组合物, 包含:
 - (i) 约10%–约25%干重的产甲酸草酸杆菌 (*Oxalobacter formigenes*),
 - (ii) 约50%–约65%干重的蔗糖,
 - (iii) 约10%–约30%干重的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂。
2. 权利要求1的药物组合物, 包含约15%–约25%, 例如约15%–20%干重的产甲酸草酸杆菌。
3. 权利要求2的药物组合物, 包含约17%–约22%干重的产甲酸草酸杆菌。
4. 权利要求1–3中任一项的药物组合物, 其中 (iii) 中的赋形剂和/或冷冻保存剂选自麦芽糊精、低聚果糖和藻酸盐。
5. 权利要求1–4中任一项的药物组合物, 包含约15%–约21%干重的麦芽糊精。
6. 权利要求5的药物组合物, 包含约16%–约19%干重的麦芽糊精。
7. 权利要求1–6中任一项的药物组合物, 包含
 - i) 约1%–约5%干重的低聚果糖;
 - ii) 约0.5%–约2%干重的藻酸盐。
8. 权利要求7的药物组合物, 所述组合物进一步包含约1%–约5%重量的水, 例如约3%的水。
9. 权利要求1–8中任一项的药物组合物, 包含约0.5%–约1.5%干重的藻酸盐。
10. 权利要求1–9中任一项的药物组合物, 其中所述组合物包含:
约17%–约22%干重的产甲酸草酸杆菌;
约52%–约62%干重的蔗糖;
约17%–约25%干重的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂。
11. 权利要求1–10中任一项的药物组合物, 其中所述组合物包含:
约19%干重的产甲酸草酸杆菌;
约57%干重的蔗糖;
约21%干重的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂, 和其余的水。
12. 权利要求11的药物组合物, 其中所述组合物进一步包含以干重计:
约1%的藻酸盐、约17%的麦芽糊精和约3%的低聚果糖。
13. 用于口服给予有需要的受试者的肠溶包衣胶囊, 其包含权利要求1–12中任一项的药物组合物, 其中所述肠溶包衣胶囊用于递送产甲酸草酸杆菌至所述受试者的小肠和/或回肠。
14. 权利要求13的肠溶包衣胶囊, 其中所述肠溶包衣胶囊显示在具有约 1.2 ± 0.1 的pH和包含约3.2 mg/ml胃蛋白酶的模拟胃液 (SGF) 中在约37°C的温度下孵育1小时内基本无崩解, 但其中在具有约 6.8 ± 0.1 的pH和包含约10 mg/ml胰酶的模拟肠液 (SIF) 中在约37°C下约1小时内检测到所述胶囊开始崩解。
15. 权利要求13或14中任一项的肠溶包衣明胶胶囊, 其中所述胶囊包含约 10^9 –约 10^{10} CFU的量的产甲酸草酸杆菌。
16. 权利要求12–15中任一项的肠溶包衣明胶胶囊, 其中当存在于所述肠溶包衣明胶胶囊中时产甲酸草酸杆菌的体外草酸盐降解活性不少于 (NLT) 约100 mmol/胶囊/约19小

时。

17. 用于口服给予受试者的肠溶包衣胶囊,所述胶囊包含约 10^9 -约 10^{10} CFU的量的产甲酸草酸杆菌,和赋形剂和/或冷冻保存剂,其中所述肠溶包衣胶囊用于递送产甲酸草酸杆菌至所述受试者的小肠和/或回肠,所述胶囊显示在具有约 1.2 ± 0.1 的pH和包含约3.2 mg/ml胃蛋白酶的模拟胃液(SGF)中在约37°C的温度下孵育1小时内基本无崩解,但其中在具有约 6.8 ± 0.1 的pH和包含约10 mg/ml胰酶的模拟肠液(SIF)中在约37°C下约1小时内检测到所述胶囊开始崩解。

18. 权利要求17的肠溶包衣明胶胶囊,其中当存在于所述胶囊中时产甲酸草酸杆菌的体外草酸盐降解活性不少于(NLT) 100 mmol/胶囊/约19小时。

19. 权利要求1-12中任一项的药物组合物,或权利要求13-18中任一项的肠溶包衣胶囊,用作药剂。

20. 权利要求19的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述用途为用于治疗和/或预防草酸盐相关病症。

21. 权利要求19的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述用途为用于治疗和/或预防草酸钙沉积相关病症,例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症。

22. 权利要求19的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述用途为用于治疗和/或预防草酸盐相关炎症。

23. 权利要求20-21中任一项的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述病症选自高草酸尿症、原发性高草酸尿症和继发性高草酸尿症。

24. 权利要求20-21中任一项的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述病症选自高草酸血症、血浆中草酸盐累积、与慢性肾疾病(CKD)和终末期肾脏疾病(ESRD)相关的草酸盐沉着症,例如在短肠综合征(SBS)、具有空肠/回肠切除或Roux-en-Y程序的肥胖病手术、Zellweger疾病、具有空肠/回肠切除的癌症和肾脏被黑曲霉(*Aspergillus niger*)感染和透析的ESRD患者中。

25. 权利要求24的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述组合物能够在受试者中溶解草酸钙晶体和/或增加尿草酸盐排泄和减慢或停止CKD进展。

26. 权利要求20或22的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述病症选自肠源性高草酸尿症、肠或小管上皮炎症、心脏传导病症、外阴痛、特发性草酸钙肾结石疾病(尿石症)、炎症肠病(IBS)、小肠细菌过度生长(SIBS)、胃肠炎、胃炎、肠炎、小肠结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和用胃肠脂肪酶抑制剂治疗的患者中的草酸盐相关病症。

27. 权利要求19-26中任一项的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述药物组合物以约 10^9 -约 10^{10} CFU的量每天至少两次给予有需要的受试者,持续一段时间,例如持续至少数月或数年的时间。

28. 用于制备权利要求1-12中任一项的药物组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

- a) 混合产甲酸草酸杆菌的细胞糊与赋形剂和/或冷冻保存剂和任选的水;和
- b) 冻干步骤a)中获得的组合物。

29. 包含产甲酸草酸杆菌的组合物,其用于治疗 and/或预防草酸钙沉积相关病症,例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症。

30. 包含产甲酸草酸杆菌的组合物,其用于治疗 and/或预防草酸盐相关炎症。

31. 用于治疗或预防草酸盐相关病症的方法,所述方法包括给予有需要的受试者药理学上有效量的权利要求1-18中任一项的药物组合物或肠溶包衣胶囊。

32. 权利要求31的方法,其中所述草酸盐相关病症包括草酸钙沉积相关病症,例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症。

33. 权利要求31-32中任一项的方法,其中所述方法包括治疗或预防伴随高草酸血症的高草酸尿症、原发性高草酸尿症和继发性高草酸尿症。

34. 权利要求31-33中任一项的方法,其中所述方法进一步涉及治疗和/或预防高草酸血症、血浆中草酸盐累积、与慢性肾疾病 (CKD) 和终末期肾脏疾病 (ESRD) 相关的草酸盐沉着症,例如在短肠综合征 (SBS)、具有空肠/回肠切除或Roux-en-Y程序的肥胖病手术、Zellweger疾病、具有空肠/回肠切除的癌症、肾脏被黑曲霉感染、透析的ESRD患者中。

35. 权利要求31-32中任一项的方法,其中所述草酸盐相关病症为草酸盐相关炎症,例如来自高草酸尿症的肠炎症、肠或小管上皮炎症、心脏传导病症、外阴痛、特发性草酸钙肾结石疾病(尿石症)、炎性肠病 (IBS)、小肠细菌过度生长 (SIBS)、胃肠炎、胃炎、肠炎、小肠结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和用胃肠脂肪酶抑制剂治疗的患者中的草酸盐相关病症。

36. 权利要求31-35中任一项的方法,其中当将所述组合物给予所述有需要的受试者时所述受试者中的全身性草酸盐排泄增加。

37. 权利要求31-36中任一项的方法,其中所述药理学上有效量包括约 10^9 -约 10^{10} CFU的量的产甲酸草酸杆菌,每天至少两次,持续一段时间。

38. 权利要求37的方法,其中所述时间持续数月或数年,例如1、2、3、4、5、6或直至12个月,或1、2、3、4或5或甚至更多年,或直至血浆草酸盐水平降低,并且维持在较健康的较低水平,例如约1-3 $\mu\text{mol/L}$ 。

用于治疗或预防草酸盐相关病症的组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开内容涉及草酸盐相关病症领域和涉及用于治疗或预防草酸盐相关病症的组合物和方法。更特别地,本公开内容涉及治疗或预防草酸钙沉积相关病症,例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症,和例如慢性肾疾病(CKD)。其还涉及预防或治疗草酸盐相关炎症。

[0002] 发明背景

草酸盐为人不能分解的代谢终产物。人体具有两个主要的草酸盐排泄器官途径:肾和肠。两种途径均受小管和肠上皮中丰富的转运蛋白控制。草酸盐通过尿和通过肠腔的排泄得以维持是极其重要的。

[0003] 原发性和继发性高草酸尿症为两种不同的临床表述,特征在于例如尿中草酸盐异常排泄。原发性高草酸尿症为伴有缺陷的酶活性的遗传性的遗传病症。相反,继发性高草酸尿症可由于许多因素引起,包括增加的草酸盐或草酸盐前体膳食摄入,或草酸盐或脂肪的肠吸收或排泄变更,和肠微生物群变更或肠或小管草酸盐转运蛋白表达的遗传变更。高草酸尿症为炎性肠病(IBD)的已知的并发症,伴随高草酸血症的高草酸尿症为切除部分小肠和Roux-en-Y胃旁路手术的常见后果。这些疾病的症状范围从单一性肾结石、复发性肾结石和肾钙沉着症到慢性肾疾病(CKD)和终末期肾脏疾病(ESRD)。

[0004] 继发性高草酸尿症

继发性高草酸尿症引起的草酸盐相关CKD为遍及全世界的健康问题。其特征在于例如尿中逐渐增加的草酸盐浓度,导致肾结石。

[0005] 继发性高草酸尿症正常不导致ESRD,除非高草酸血症已经发生。这在切除小肠的患者例如SBS-患者和肥胖病手术患者中最常见。

[0006] 肝(身体中的主要代谢器官)为主要的草酸盐产生位点。然而草酸盐不进一步被代谢,因此必须被排泄。该排泄通过两种途径发生:通过肾小管排泄和通过肠排泄;两种排泄途径均通过SLC26家族的主动转运蛋白介导。血浆中和因此小管液中的草酸盐浓度是关键性的,例如在肾排泄期间,其中增加的草酸盐浓度引起远端小管和连接管中形成草酸钙晶体的风险,其随后形成草酸钙沉积或肾的钙化。肠排泄途径在预防涉及提高的血浆草酸盐浓度和软组织钙化的病理学病况中特别重要。

[0007] 继发性高草酸尿症可由许多因素引起,包括增加的草酸盐或草酸盐前体膳食摄入,或草酸盐或脂肪的肠吸收或排泄变更,和肠微生物群变更或肠草酸盐转运蛋白遗传变更。高草酸尿症为炎性肠病的已知的并发症。疾病范围从复发性肾结石、肾钙沉着症和尿路感染延伸至慢性肾疾病和终末期肾脏疾病(Bhasin, 2015)。这通常在由于炎症引起的肠排泄受损的疾病中发生,所述疾病例如炎性肠病、外阴痛、小肠细菌过度生长(SIBS)、胃肠炎、胃炎、肠炎、小肠结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和用胃肠脂肪酶抑制剂治疗的患者中的草酸盐相关病症。

[0008] 当草酸钙负荷超过肾排泄能力时,草酸钙开始在所有体液和软组织中沉积。这在具有切除的小肠的患者例如短肠综合征(SBS)患者、一些IBD患者、肠癌患者和肥胖病手术

患者中最常见。

[0009] 由于肾衰竭,透析的ESRD患者也倾向于积累血浆草酸盐,并且还可能罹患草酸盐沉着症,这可影响肾移植中的移植物存活。

[0010] 原发性高草酸尿症

原发性高草酸尿症 (PH) 为儿科的严重虚弱和威胁生命的遗传疾病,具有高度未满足的医学需求。PH为乙醛酸盐代谢的罕见的常染色体隐性先天性缺陷,具有显著的发病率和死亡率,特别是在幼儿中。PH由于肝脏草酸盐产生增加而发生,特征在于广泛分布的草酸钙结晶,进行性高草酸血症,接着肾功能减退。由于肾草酸盐排泄,PH患者具有高水平的尿草酸盐 ($>0.5 \text{ mmol}/24 \text{ h}/1.73 \text{ m}^2$, 在健康患者中 $<0.5 \text{ mmol}/24 \text{ h}/1.73 \text{ m}^2$) [Hoppe, 2012]。PH患者具有宽范围的草酸盐产生,反映在范围从轻度到高度提高 ($>0.5 - 4.5 \text{ mmol}/\text{天}, 1.73 \text{ m}^2$) 的高草酸尿症。草酸盐过度产生的程度与特定基因型有部分联系,其中超过140个基因型已知。进展为ESRD已经显示与诊断时的年龄(暴露于高草酸盐的时间)、尿草酸盐排泄水平和诊断时的肾功能有关[Zhao等人, 2016]。在诊断时具有高尿草酸盐排泄和低估计的肾小球滤过率(eGFR)的患者倾向于更迅速进展为ESRD。在PH患者中,血浆草酸盐逐渐从早期阶段的 $1-3 \text{ } \mu\text{moles}/\text{L}$ 增加至早期ESRD的 $45-50 \text{ } \mu\text{moles}/\text{L}$ 。ESRD和透析治疗期间血浆草酸盐上升至高达 $150 - 300 \text{ } \mu\text{moles}/\text{L}$ 是常见的,导致全身性草酸盐累积和全身性草酸盐沉着症。

[0011] 通常,PH的第一个临床症状为肾小管病症,体现在胁腹痛和肾结石。症状主要由草酸钙晶体介导的小管上皮细胞炎症和成长的草酸钙晶体沉积导致,其逐渐引起肾钙化。进行性肾损伤由来自草酸盐的小管毒性、肾钙沉着症和结石性肾梗阻的组合,或结石移除程序导致[Cochat和Rumsby, 2013; Tang等人, 2015]。当前无批准的药物治疗用于治疗PH。最终唯一的治愈性治疗(仅对于1型PH)为在ESRD时组合的肾和肝移植(Cochat等人, 2012)。总体上,中位肾存活为24-33年[Lieske等人, 2005, Harambat等人, 2010]。

[0012] 存在三种已知的PH类型(1、2和3型),1型最严重和最广泛分布(70-80%的已知病例) [Hoppe等人, 2009]。三种PH类型由影响肝脏草酸盐产生的不同的酶的缺陷或错误定位引起:1型由肝特异性过氧化物酶体丙氨酸-乙醛酸氨基转移酶缺陷引起,2型由缺乏乙醛酸还原酶-羟基丙酮酸还原酶引起,3型由缺乏肝特异性线粒体酶4-羟基-2-酮戊二酸醛缩酶引起[Cochat和Rumsby 2013, Belostotsky等人, 2010]。在欧洲1型PH的估计发病率为每年每120,000例活产中1例,流行率为每百万群体1-3例[Cochat等人, 1995; Kopp和Leumann, 1995; van Woerden等人, 2003]。由于诊断不足,发病率和流行率可能被低估[Leumann和Hoppe, 2001, Hopp等人, 2015]。

[0013] 衰退的肾功能导致进行性高草酸血症和血浆草酸钙过饱和。增加的血浆草酸盐浓度引起草酸钙沉积以在体内积累。沉积可位于结石、软组织、动脉中层、周围神经、皮肤、眼睛和心脏中[Beck等人, 2013]。在疾病的早期阶段,高草酸血症已经损伤心脏中的细胞,引起钙化(僵硬)和引起心肌炎症,导致进行性减退的左心室应变,导致心律失常和心脏衰竭(Lagies等人, 2013, Lagies等人, 2014, Lagies等人, 2015)。

[0014] 生物学分子和晶体形成之间的互相作用为新出现的研究领域(参见例如Aggarwal等人, 2013)。在血浆中,草酸盐可以作为游离的草酸盐、二价金属结合的游离草酸盐、蛋白质和脂质缔合的草酸盐和作为固体二价金属草酸盐晶体存在。总草酸盐和游离草酸盐之间的

比率随时间和疾病进展而增加。

[0015] 组合的肝-肾移植(其中新肝产生正常的草酸盐水平)之后,观察到最初的游离草酸盐降低。然而,当血浆草酸盐浓度减少至饱和限度下时,蛋白和脂质中、血管壁和软组织中的草酸钙沉积开始溶解,这导致新的血浆草酸盐浓度增加。移植之后尿和血浆草酸盐可提高数月至数年,并且可再次导致新肾的衰退(Leumann和Hoppe, 2001)。因此,透析之前和期间草酸盐积累的预防和草酸盐通过小肠和通过尿排泄的增强对PH患者高度有益。同样对于具有维持的肾功能的患者,延迟或停止累积草酸钙沉积以预防肾衰退至关重要。

[0016] 具有高草酸血症的继发性高草酸尿症

Gregory等人, 1975显示空肠回肠旁路术(JIB)手术在其它方面健康的肥胖患者中引起肾衰竭。主要的肠排泄途径的消除引起高血浆草酸盐浓度,这继而导致肾衰竭。该程序在1979年中断。目前肥胖病手术的主导程序为Roux-en-Y,即,空肠/回肠的较小切除。尽管该程序与复发性肾结石相关联,但其不引起ESRD。

[0017] 短肠综合征,SBS,定义为其中患者切除小肠和留下小于200 cm肠的疾病状态。与JIB患者类似,SBS患者具有45%的由增加的血浆草酸盐浓度引起的肾衰竭(ESRD)风险。

[0018] Zellweger疾病或Zellweger谱系病症(ZDS)特征在于缺陷的过氧化物酶体装配引起的过氧化物酶体功能的全身损失。该疾病在其呈现和存活方面异种。尽管正常水平的酶AGT(丙氨酸:乙醛酸氨基转移酶,其在原发性高草酸尿症中缺陷),但严重的高草酸尿症已经在数个ZSD患者中报道(van Woerden等人, 2006)。

[0019] 黑曲霉(*Aspergillus niger*)感染为罕见的真菌感染。黑曲霉为产草酸盐的生物,可引起可导致ESRD的水平的血浆草酸盐。

[0020] 产甲酸草酸杆菌(*Oxalobacter formigenes*)

产甲酸草酸杆菌为严格厌氧细菌,其唯一地依赖草酸盐作为底物以获得能量用于其存活和生长。当前认为产甲酸草酸杆菌为最有效的在中性PH下起作用的减少草酸盐的酶促系统。并非所有的人在肠道中携带产甲酸草酸杆菌群体。例如,在具有空肠回肠旁路术手术的人的粪便样品中存在低的或完全缺乏草酸盐降解细菌。给予有需要的受试者产甲酸草酸杆菌已经显示对膳食草酸盐吸收具有作用,但其也显示对消除从血浆到肠的草酸盐具有作用,促进天然肠草酸盐排泄途径。产甲酸草酸杆菌此外显示促进草酸盐的主动消除,可能通过与SLC26转运蛋白相互作用进行,所述SLC26转运蛋白增强从血浆到小肠的草酸盐通量(Hatch等人, 2011; Hatch和Freel, 2013)。

[0021] 用在用于减少尿和血浆草酸盐以治疗草酸盐相关病症的方法中的包含草酸盐降解细菌例如产甲酸草酸杆菌的组合物先前已经在本领域,例如在US 6,200,562、US 6,355,242、W02007075447和W02005123114中公开。

[0022] 然而,对用于治疗草酸盐相关病症,特别是用于治疗或预防草酸钙沉积相关病症例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症以及治疗透析的ESRD患者的改进的组合物,仍存在需求。对可增强或增加草酸盐排泄以减少具有草酸钙沉积的患者中的全身性草酸盐负荷和相关炎症的药物组合物,也存在需求。

[0023] 发明概述

本领域中关于治疗和预防草酸盐相关病症或更特别地草酸钙沉积相关病症例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症的问题现在已经通过本文提供药物组合物和包含所述

药物组合物的药物产品(特别是呈新型肠溶包衣胶囊的形式)得到克服或至少减轻。持续的草酸盐排泄在罹患所述病症的患者中至关重要。

[0024] 令人惊讶地,本文所公开的药物组合物和药物产品被提出溶解草酸钙晶体和增加草酸盐从体液排泄,例如尿草酸盐,从而延迟或停止进行性肾功能衰退,特别是在具有慢性肾疾病的患者中。

[0025] 还提供包括本公开内容的药物组合物和药物产品的方法和用途。此外提供治疗或预防草酸盐相关炎症的方式。

[0026] 本文提供用于治疗草酸钙沉积相关病症的改进方法,所述病症通常与排泄草酸盐的能力逐渐降低相关,其导致肾功能衰退。提出的对全身性草酸钙沉积的溶解作用(归于本文所呈现的药物产品中所包含的新的组合物),向具有减退的肾功能的高草酸血症患者提供特别有益的作用;所述组合物增强草酸盐从体液排泄。还提供治疗或预防草酸盐相关炎症的方式。

[0027] 因此,为了至少减轻本领域一些剩余的问题,本文提供药物组合物和肠溶包衣胶囊,如下文所进一步描述的。

[0028] 在一个方面,提供包含以下的药物组合物:

- (i) 约10%-约25%干重的产甲酸草酸杆菌,
- (ii) 约50%-约65%干重的蔗糖;和
- (iii) 约10%-约30%干重的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂。

[0029] 自然地,本文所描述的组合物可包含一些水,例如约3%水。

[0030] 在另一个方面,提供用于口服给予有需要的受试者的肠溶包衣胶囊,其包含如本文所定义的药物组合物,其中所述肠溶包衣胶囊用于靶向递送产甲酸草酸杆菌至所述受试者的小肠和/或回肠。

[0031] 本文还提供用于口服给予受试者的肠溶包衣胶囊,所述胶囊包含约 10^9 -约 10^{10} CFU的量的产甲酸草酸杆菌,和赋形剂和/或冷冻保存剂,其中所述肠溶包衣胶囊靶向递送产甲酸草酸杆菌至所述受试者的小肠和/或回肠,所述胶囊显示在具有pH约 1.2 ± 0.1 和包含约3.2 mg/ml胃蛋白酶的模拟胃液(SGF)中在温度约37°C孵育1小时内基本无崩解,但其中所述胶囊在具有pH约 6.8 ± 0.1 和包含约10 mg/ml胰酶的模拟肠液(SIF)中在约37°C约1小时孵育后检测到开始崩解。

[0032] 还提供如本文所公开的药物组合物或包含如本文所公开的药物组合物的肠溶包衣胶囊,用作药剂。

[0033] 此外提供本文的药物组合物或肠溶包衣胶囊用于治疗 and/或预防草酸盐相关病症,或更特别地草酸钙沉积相关病症例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症的用途;所述组合物增加草酸盐从体液排泄。本文还提供药物组合物或肠溶包衣胶囊在治疗和/或预防草酸盐相关炎症中的用途。

[0034] 本公开内容在一般方面涉及:高草酸尿症、原发性高草酸尿症和继发性高草酸尿症;但更特别地涉及高草酸血症、血浆中草酸盐累积、与慢性肾疾病(CKD)和终末期肾脏疾病(ESRD)相关的草酸盐沉着症,例如在短肠综合征(SBS)、具有空肠/回肠切除或Roux-en-Y程序的肥胖病手术、Zellweger疾病、具有空肠/回肠切除的癌症、肾脏或其它被黑曲霉感染中;透析的ESRD患者中的高草酸血症,和此外在一些情况下涉及草酸盐相关炎症,例如肠源

性高草酸尿症、肠或小管上皮炎症、心脏传导病症、外阴痛、特发性草酸钙肾结石疾病(尿石症)、炎性肠病(IBS)、小肠细菌过度生长(SIBS)、胃肠炎、胃炎、肠炎、小肠结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和用胃肠脂肪酶抑制剂治疗的患者中的草酸盐相关病症。

[0035] 本公开内容的组合物可能能够减缓、停止或逆转疾病进展以及高草酸血症和导致CKD的草酸钙沉积的进展。

[0036] 本公开内容的组合物此外能够增加草酸盐排泄,例如尿草酸盐排泄,从而减少全身性草酸盐沉积。

[0037] 本公开内容还提供用于治疗和/或预防草酸盐相关病症或如本文所描述的其它病症或疾病状态的方法,所述方法包括给予有需要的受试者药学上有效量的如本文所定义的药物组合物或如本文所定义的包含药学上有效量的药物组合物的肠溶包衣胶囊。

[0038] 此外提供用于制备药物组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

- a) 混合产甲酸草酸杆菌的细胞糊与赋形剂和/或冷冻保存剂和任选的水;和
- b) 冻干步骤a)中获得的组合物。

[0039] 鉴于本文所显示的改善的效果,本文还提供包含产甲酸草酸杆菌的组合物的新的医疗用途。

[0040] 本文另外提供包含产甲酸草酸杆菌的组合物,用于治疗和/或预防草酸钙沉积相关病症,例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症,例如其中所述用途为用于治疗和/或预防慢性肾疾病(CKD)。

[0041] 还提供包含产甲酸草酸杆菌的组合物,用于治疗和/或预防草酸盐相关炎症。

[0042] 附图简述

图1:从冻干状态的目前公开的新药物组合物(OC5)和先前的组合物(OC3)恢复。

[0043] 图2:与新药物组合物(OC5)相比,先前的组合物(OC3)的草酸盐降解活性。效力表示为每CFU降解的草酸盐的量。不同的混合制剂均包含蔗糖,而OC3不包含。

[0044] 图3:目前公开的药物组合物(OC5)胶囊在人类志愿者的胃肠道中释放的闪烁成像。

[0045] 发明详述

定义

本文所使用的所有单词和术语应被认为具有本领域技术人员所通常给予其的相同含义,除非另一种含义从上下文显而易见。

[0046] 如本文所提及的术语“干重”意在指其中大部分水已经例如通过干燥过程(例如冻干)从其移除的组合物的重量。

[0047] 术语“冷冻保存剂”和“赋形剂”有时在本文中可互换地使用。然而术语“冷冻保存剂”在本文中意在指用于在冷却至零下温度时保存细胞活力的试剂。冷冻保存为本领域所熟知的过程。本文中,组合物还包含一种或多种“赋形剂”,该术语主要用于描述组合物中存在的其它成分,例如向其加入以便以冷冻保存之外的方式保存稳定性或防止组合物降解以及吸收水分的成分。赋形剂的目的也可为实现所需的粉末性质(例如自由流动粉末)。

[0048] 如本文所定义的“肠溶包衣”胶囊指具有外表面包衣特性的胶囊,该特性使得它适合于将其中存在的药剂靶向递送至肠的肠部分的特定段。肠溶包衣也可描述为涂覆在口服药物上的屏障,防止其在胃肠环境中溶解或崩解。因此,这样的包衣允许药物在胃和十二指肠

肠的酸性和酶环境中幸存。本文中,术语“胶囊”可具有任何合适的形式,只要其以适合于在口服给予后转运和给予至受试者的小肠例如回肠的方式包封药物组合物。本文中肠溶包衣胶囊特异靶向小肠和/或回肠。这证明在本发明的背景下特别有效。

[0049] “包含”一种或多种所述的要素的组合物还可包含未明确描述的其它要素。

[0050] 单数“a”和“an”应被解释为也包含复数。

[0051] 详述

根据本公开内容,本文提供改进的药物组合物;包含产甲酸草酸杆菌的组合物以及包含所述药物组合物的肠溶包衣胶囊形式的药物产品,其对草酸盐相关病症、特别是草酸钙沉积相关病症例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症具有改善的效果。高草酸血症特征在于血浆中高草酸盐水平,例如导致体内形成和沉积草酸钙复合物。本领域已经显示难以鉴定对形成的草酸钙沉积本身和/或高草酸血症具有效果的药物组合物。如果这样的效果可能达到,其可帮助延迟或停止形成所述草酸盐沉积或帮助溶解所述草酸盐沉积和最终可能还逆转与其相关病症,例如肾功能病症。在本文中发现在本公开内容的组合物具有这样的效果,其在下文进一步描述。

[0052] 值得注意地,本文中术语“草酸盐晶体沉积”、“草酸盐沉积”、“沉积”等与也在本文中使用的术语“草酸钙沉积”和“草酸钙复合物”可互换或至少与其相关。

[0053] 因此,本文设想所述药物组合物特别地在治疗涉及提高的血浆草酸盐水平、频繁的全身性草酸盐晶体沉积和减退的肾功能的病症中的用途。由于用产甲酸草酸杆菌治疗之后可能需要时间来排泄溶解的草酸盐沉积,对于罹患这样的病症的受试者设想数月到头年的治疗期。

[0054] 如下文进一步呈现的,通过进行彻底的临床研究,申请人显示如本文所定义的包含产甲酸草酸杆菌的药物组合物以增加的尿草酸盐排泄作用的形式以及还与其更特定的医疗用途相关的改善效果。此外,当所述胶囊靶向特定肠部分时(如本文进一步解释的),肠溶包衣胶囊形式的药物媒介显示为包含所述药物组合物的最终药物产品提供甚至进一步的优点。临床研究中使用的药物产品,称为OC5,代表本文所定义的药物组合物和肠溶包衣胶囊。因此如以下公开内容中所呈现的其变化也包含在本公开内容内。

[0055] OC5中包含的和所进行的临床研究中使用的改进的药物组合物包含高度浓缩的干燥的(例如冻干的)产甲酸草酸杆菌细菌,其具有快速恢复时间、不少于(NLT) 10^9 CFU/胶囊(例如约 $10^9 - 10^{10}$ CFU/胶囊)的最小活细胞计数,和NLT约100 mmol草酸盐/胶囊/19小时,例如约200 mmol、约300 mmol、约400 mmol、约500 mmol或甚至高达约2 mol草酸盐/胶囊/19小时的草酸盐减少能力等。药物组合物在用于口服给予的肠溶包衣胶囊中呈现,特别配制为用于靶向递送至小肠和/或回肠。这在本文中显示为产甲酸草酸杆菌的特别有用的作用位点。这样的组合对于获得本文所公开的效果特别有用。

[0056] 意外地,用本文所呈现的组合物OC5治疗不减少而是增加治疗的患者中的尿草酸盐排泄,因此提示溶解患者中的草酸盐沉积,这继而提示用于治疗如本文更具体定义的草酸盐沉积相关病症的高度有效的组合物。产甲酸草酸杆菌被成功递送至胃肠道,更特别地至小肠和/或回肠,被接受组合物的受试者很好地耐受。本文讨论的分析显示对于获得组合物的组,对肌酐酞归一化的尿草酸盐的统计学显著的增加(表4),甚至更重要地,其还显示增加的尿钙排泄(表14)、减少的血液尿素氮(表19)、减少的尿体积(表10)和增加的尿柠檬

酸盐排泄(数据未示出)。这些均为增加的草酸钙沉积排泄和停止的肾退化进展的标志。因此,本组合物被设想用于这样的目的,和同样地包含产甲酸草酸杆菌的组合物用于新的医疗用途。

[0057] 在先前的标签公开的研究中(Hoppe等人, 2006),给予备选的组合物,称为OC3,导致在几乎所有患者中在4周内尿草酸盐排泄的统计学显著的减少,并且无安全性顾虑。然而,后续用改进的制剂(另一种备选的组合物,例如包含比本文所公开的药物组合物低的浓度的产甲酸草酸杆菌)的较大的双盲试验,证明对尿草酸盐排泄在24周内无效果[Hoppe等人, 2011]。为了改善包含产甲酸草酸杆菌的组合物的功效和克服先前的制剂的低活性和长恢复时间和药物递送问题,进行改进,这产生本文所呈现的药物组合物。

[0058] 此药物产品中包含的改进的药物组合物现在为说明其效果的安慰剂对照的临床试验的对象,其显示在草酸盐相关病症、或更特别地草酸钙沉积相关病症例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症的背景中特别有用。

[0059] 临床试验的分析惊人地显示与用安慰剂治疗的组相比,在用新的活性制剂(药物(OC5))治疗的组中对尿肌酸酐排泄归一化的尿草酸盐排泄的统计学显著的增加(表4)。

[0060] 如结果部分所提及的,对于所有患者,基线eGFR(估计的肾小球滤过率,肾功能的度量)和基线处的血浆草酸盐浓度之间存在负相关($p=0.007$),证明血浆草酸盐随着eGFR降低而逐渐增加。eGFR高度临床相关,因此血浆草酸盐将为PH疾病进展的良好指示物。在最近的出版物中,诊断时的eGFR显示与PH患者中易发的ESRD相关[Zhao等人, 2016]。在PH进展中,肾退化率与暴露于高草酸盐的时间(年龄)有关,和似乎随着下降的eGFR而加速。平行地,血浆草酸盐和草酸钙沉积逐渐增加。

[0061] 在实验部分所进一步解释的亚组分析中,OC5和安慰剂治疗的患者之间最显著的差异在较大的患者(≥ 18 岁)和具有减退的肾功能(< 90 mL/min/1.73 m²)的患者的亚组中观察到。考虑到其均长时间暴露于高草酸盐和因此积累草酸钙沉积(其引起减退的肾功能),这两个亚组相似不令人吃惊。

[0062] 重要地,用药物组合物治疗似乎在具有较晚期的PH的那些患者中具有更显著的效果。差异在于与预期相反;不是尿草酸盐排泄下降,而是给予组合物实际上导致排泄增加。此为高度相关的发现,通过使用本公开内容的组合物为具有遭受草酸钙沉积的高草酸血症的草酸盐相关病症打开了改进的治疗。

[0063] 产甲酸草酸杆菌可为基因型1或基因型2;两种类型均天然存在。OC5包含产甲酸草酸杆菌基因型1。活性组(即接受OC5的组)中血浆草酸盐浓度变化和产甲酸草酸杆菌基因型1的数目变化之间统计上显著的负相关提示引入的产甲酸草酸杆菌细菌能够代谢源自血浆的游离草酸盐(表8)。产甲酸草酸杆菌基因型2,在基线处的活性和安慰剂组中各自的3个患者中存在,仅在活性组中增加。产甲酸草酸杆菌基因型2在安慰剂组中不增加,表明药物将过量的草酸盐从血浆转运至肠,即其激活主动转运。这些发现支持本文所呈现的OC5形式的药物组合物创建从血浆到肠的草酸盐的主动通量。

[0064] 从正如PH患者具有增加的血浆草酸盐浓度,痛风患者具有增加的血浆尿酸盐浓度的意义上来说,类似可指引至痛风患者。适时地,这导致在关节中沉积尿酸单钠晶体。已经报道痛风的降尿酸治疗打破血浆尿酸盐和尿酸盐晶体之间的平衡,晶体然后在3-33个月内逐渐溶解[Pascual和Sivera, 2007]。

[0065] 磷酸钙沉积介导的软组织钙化为慢性肾疾病患者中的常见问题。几种方法对于减少钙或磷酸盐可得,两种方法均成功导致增加的磷酸钙沉积排泄和溶解。

[0066] 相似地,在OC5治疗的患者中,产甲酸草酸杆菌促进草酸盐的主动消除,介导游离草酸盐从血浆向肠转移。该过程破坏游离血浆草酸盐、蛋白缔合的草酸盐和沉积的草酸钙之间的平衡。破坏平衡可向游离草酸盐驱动和导致溶解沉积的草酸钙晶体。由于晶体溶解受各自的反荷离子的周围体积浓度控制,晶体可在饱和浓度下暂时溶解,和由于溶解导致血浆和尿中草酸盐脉冲增加。

[0067] 由于草酸钙沉积预期在具有减退的肾功能的患者中更明显,这可解释为何OC5治疗的效果在具有较晚期的肾疾病(eGFR <90 mL/min/1.73 m²)的患者中更大。具有eGFR <90 mL/min/1.73 m²的患者中增加的尿钙排泄为溶解草酸钙晶体的理论进一步增加了份量。

[0068] 因此,本文建议对草酸钙沉积本身的直接作用,实现其溶解,这为在治疗与体内草酸钙沉积相关的病症中和甚至在逆转或至少停止这样的病症进展中增强移除全身性草酸钙沉积提供了有效工具。

[0069] 进一步的分析还表明OC5治疗导致临床实践中使用的额外益处;OC5组中减少的BUN和下降的尿输出提示肾脏水重吸收和尿浓缩能力(二者均为肾退化的标志)在这些患者中改善(表9和表10);Zhao等人,2016最近的出版物得出结论,尿体积一般在PH患者中增加和诊断时的尿体积与eGFR负相关(p=0.001)。作者提示在已确认小管间质损伤的PH患者中增加的尿体积反映下降的尿浓缩能力和脱水。这些观察支持本文所呈现的发现,其中减少的尿体积在OC5治疗后见到,因此将会表明对肾的有益治疗效果。血液尿素氮(BUN)为小管损伤的标志,其在PH患者中高度提高。OC5治疗倾向于减少BUN和减少尿体积这一发现可表明改善的尿浓缩能力和减少的脱水,这是例如对于肾的有益治疗效果。惊人地,这样的效果在进展数年的肾退化的仅8周治疗后已经显示。

[0070] 已知草酸钙晶体引起炎症反应(Worcester等人,2013)。嗜酸细胞的显著下降以及白细胞和淋巴细胞计数在8周内OC5治疗的患者中下降和在安慰剂治疗的患者中增加的趋势(如结果部分所显示的)表明产甲酸草酸杆菌治疗通过潜在地减少草酸钙晶体可能对PH相关的炎症具有有益效果(表9和11)。因此,本文呈现如本文所定义的药物组合物对于草酸盐相关炎症(可为继发性高草酸尿症的结果)的进一步的医疗用途。

[0071] 草酸盐晶体相关炎症在暴露于所述晶体的所有软组织(包括肾和心脏)中发生。在肾中,炎症引起晶体的吞噬和沉积在细胞中内化(肾钙沉着症)。在心脏中,炎症引起沉积在心肌中内化,导致心脏僵硬和收缩性减少。

[0072] 用药物组合物治疗还显著增加肠中产甲酸草酸杆菌细胞的数目并且很好地耐受(表5)。与研究前的预期相反,治疗显著增加尿草酸盐/肌酸酐排泄。

[0073] 预期为草酸杆菌属将代谢游离草酸盐,因此减少体内的草酸盐负荷,引起较低的排泄。该假说依赖于假设草酸钙沉积不可溶。相反,草酸杆菌属推测通过溶解晶体和可能还通过增加肠和小管上皮中转运蛋白的活性,增加草酸盐排泄。

[0074] 分析的结果与产甲酸草酸杆菌促进草酸盐从血浆到回肠(肠)的主动消除,随后扰乱游离血浆草酸盐、蛋白缔合的草酸盐和沉积的草酸钙之间的平衡这一新假说一致。这导致增加的草酸钙沉积溶解和随后增加的(尿)草酸盐排泄。由于血浆草酸盐在PH患者中逐渐

增加,该假说提示,与痛风模型一致,与安慰剂相比血浆草酸盐浓度随时间稳定或减少将为OC5治疗的效力的优选度量。

[0075] 由于临床研究的结果,本文建议包含产甲酸草酸杆菌的改进的药物组合物,以及包含所述药物组合物的肠溶包衣胶囊。

[0076] 因此,本文提供包含以下的药物组合物:

- (i) 约10%-约25%干重的产甲酸草酸杆菌,
- (ii) 约50%-约65%干重的蔗糖;和
- (iii) 约10%-约30%干重的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂。

[0077] 自然,所述药物组合物可还包含水,例如约1-5%,例如约3%的量。

[0078] 药物组合物也可由上述成分和任选的水组成。

[0079] 本文所提及的药物组合物的含量以百分比和以干重描述。该干燥组合物通过干燥过程,例如冷冻干燥获得,在这样的情况下也可称为粉末组合物或冻干的/冷冻干燥的(粉末)组合物。当干燥组合物时,可能有一些水剩余,这通过包含一定量的水的组合物说明。

[0080] 更具体地,提供在所述组合物中包含约10%-约20%、约10%-约25%、约15%-约20%、约15%-约25%、约17%-约21%、约18 %-约22%或约18%-约20%,例如约15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%或22%干重的产甲酸草酸杆菌的药物组合物。产甲酸草酸杆菌的量也可轻微变化(主要向更高的百分比),或如本文所进一步例示的。如所指出的,本文公开的药物组合物包含高的、合适的浓度的细菌。更高的细菌浓度为组合物提供改善的效果或恢复速率,如本文所进一步说明的。

[0081] 此外,本文的药物组合物可包含约50%-约65%干重的蔗糖,例如约52%-约62%、约54%-约60%或约56%-约58%,例如约54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%或65%。该量也可轻微变化,或可如本文所进一步例示的。药物组合物中蔗糖的使用被证明为其它二糖提供良好的备选,因为其提供增加的组合物稳定性。高浓度的产甲酸草酸杆菌和作为药物组合物的主要赋形剂的蔗糖的组合被证明是实现本文所呈现的改善的医疗效果的成功组合。包含蔗糖作为主要赋形剂的组合物的改善的恢复和草酸盐降解活性还在图2中示出。混合组合物代表不同的蔗糖含量百分比,说明改善的组合物。混合物1:1包含最高量的蔗糖(混合物:细胞糊:包含蔗糖的赋形剂溶液)。

[0082] 一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂的量可为约10%-约30%干重,例如约15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27 %、28%、29%或30%的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂。

[0083] 值得注意地,本文提及的所有%量一般可至少变化约1-3%,即 $\pm 1-3\%$,取决于用于制备药物组合物的精确制造过程和细胞密度。组合物从细胞糊和赋形剂溶液制备,然后通过本领域已知的程序冷冻和冻干。

[0084] 在本文所呈现的药物组合物中,(iii)中的赋形剂和/或冷冻保存剂可选自麦芽糊精、低聚果糖和藻酸盐。其它等同功能和结构相似的试剂也可使用。

[0085] 在如本文所公开的药物组合物中,可使用约15%-约21%,例如约16%-约19%,例如约15%、16%、17%、18%或19%干重的麦芽糊精。

[0086] 本文进一步提供包含以下的药物组合物:

- i) 约1%-约5%干重的低聚果糖;和

ii) 约0.5%-约2%干重的藻酸盐。所述药物组合物可还包含水,例如按重量计所述组合物的约1%-约5%的量。

[0087] 本文所呈现的药物组合物可还包含约0.5%-约1.5%干重的藻酸盐,或与藻酸盐相似的试剂,例如约1%。低聚果糖可为约1%、2%、3%、4%或5%干重。

[0088] 本文进一步提供包含以下的药物组合物:

约17%-约22%干重的产甲酸草酸杆菌,

约52%-约62%干重的蔗糖;

约17%-约25%干重的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂。

[0089] 此外,提供包含以下的药物组合物:

约19%干重的产甲酸草酸杆菌,

约57%干重的蔗糖;

约21%干重的一种或多种冷冻保存剂和/或赋形剂,和剩余的水。冷冻保存剂和/或赋形剂可为藻酸盐、麦芽糊精和/或低聚果糖,并且可以以按干重计约1%藻酸盐、约17%麦芽糊精和约3%低聚果糖的量存在。

[0090] 本公开内容的另一个方面提供用于口服给予有需要的受试者的肠溶包衣胶囊,其中所述胶囊包含如本文所定义的药物组合物。进一步提供胶囊,其包含结构包衣特性以靶向递送产甲酸草酸杆菌至所述受试者的小肠,或更特别地至小肠和/或回肠。有利的医疗效果已经通过靶向递送产甲酸草酸杆菌至小肠的这些部分显示。

[0091] 所使用的肠溶包衣胶囊的结构特性可以以功能方式通过例如涉及其在模拟身体的胃肠部分中的条件的体外条件下抵抗崩解的能力描述。本文中,胶囊关于其在胃环境中抵抗崩解和关于其还在肠环境中抵抗崩解有限的时期二者描述。因此,本文中,肠溶包衣胶囊的特性主要关于其在“模拟胃液”(SGF)和在“模拟肠液”(SIF)中孵育期间抵抗崩解的能力描述。

[0092] “模拟胃液”(SGF)为意在代表胃酸的人工溶解介质。其可通过在盐酸中溶解氯化钠接着加入纯化的胃蛋白酶(例如衍生自猪胃粘膜,活性为每mg蛋白约800-2500个单位)制备。测试溶液具有约 1.2 ± 0.1 的pH。SGF的温度保持在约37°C,液体中的酶的浓度为约3.2 mg/ml。

[0093] “模拟肠液”(SIF)为意在代表肠液的人工溶解介质。其可通过在水中溶解磷酸钾和加入氢氧化钠,和调节pH至 $\text{pH } 6.8 \pm 0.1$,然后加入纯化的胰酶制备。SIF的温度保持在约37°C,液体中的酶的浓度为约10 mg/ml。

[0094] 6个胶囊可同时检测。完全崩解被定义为其中除了不溶的包衣或胶囊壳的片段,残留在测试装置的筛子上或粘附到盘的下表面的任何残余单元为没有可触知地坚固的核心软块的状态。如果所有6个胶囊不显示允许逸出内含物的崩解或破裂的证据,则满足SGF的接受标准。如果所有6个胶囊在60分钟内显示开始崩解的证据,则满足SIF的接受标准。片剂和胶囊崩解的程序还在欧洲药典5.0, 2.9.1 (试验A)中描述。

[0095] 据此,肠溶包衣胶囊可被定义为显示在具有 $\text{pH } 1.2 \pm 0.1$ 和包含约3.2 mg/ml胃蛋白酶的模拟胃液(SGF)中在温度约37°C孵育1小时内基本无崩解,但其中所述胶囊在具有 $\text{pH } 6.8 \pm 0.1$ 和包含约10 mg/ml胰酶的模拟肠液(SIF)中在约37°C约1小时内检测到开始崩解。肠溶包衣胶囊的这些特性解释其将会在胃的酸性环境中幸存,和其也将会在肠

环境中持续一些时间,从而有效靶向递送草酸杆菌属至小肠和/或回肠。这显示为用于递送和开始释放该药物组合物的最有效的靶。本文中,还显示体外崩解定义确实对应于临床受试者的小肠中和/或至上部大肠的体内崩解。这例如在图3中可视化。

[0096] 值得注意地,本文中具有在具有pH约 6.8 ± 0.1 和包含约10 mg/ml胰酶的模拟肠液(SIF)中在约37°C约1小时内开始崩解的特性的胶囊被证明特别有用。因此,这意味着胶囊在肠道中保留相当一些时间,导致药物组合物的缓慢释放。此为与其它胶囊相比的差异,例如其中完全崩解(或崩塌)在具有pH约 6.8 ± 0.1 和包含约10 mg/ml胰酶的模拟肠液(SIF)中在约37°C约1小时内见到。如本文先前所提及的,胶囊可为明胶胶囊,例如硬明胶胶囊或提供相似性质的其它相似的胶囊,因此导致优选的药物释放概况。

[0097] 可用于制备用于包含本公开内容的药物组合物的胶囊(其在上文所定义的限制内抵抗崩解)的包衣的聚合物包衣的实例为例如,甲基丙烯酸聚合物,包括甲基丙烯酸共聚物和阴离子甲基丙烯酸共聚物例如由Eudragit®的包衣所提供的。这些可例如购自Evonik Industries (<http://eudragit.evonik.com>),也可由本领域技术人员制备,进一步任选考虑技术人员可得的额外的可用信息,例如Remington's Pharmaceutical Sciences。选择适当的聚合物以产生或包覆胶囊可由技术人员通过考虑本文所呈现的关于靶向胶囊至小肠和/或回肠的细节进行。

[0098] 胶囊可为明胶胶囊,例如硬明胶胶囊或提供相似性质的其它相似的胶囊。

[0099] 还提供如本文所公开的肠溶包衣胶囊,其中所述胶囊包含约 10^9 -约 10^{10} CFU(菌落形成单位)的量的产甲酸草酸杆菌。产甲酸草酸杆菌的量也可更高,但提及的每胶囊的量显示在本组合物的背景下关于与其相关的效果特别好地发挥功能,其还致使组合物的制备更有效。每胶囊更高的量的实例为 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 和 10^{15} CFU/胶囊。

[0100] 还提供肠溶包衣胶囊,其中当存在于所述肠溶包衣胶囊中时,产甲酸草酸杆菌的体外草酸盐降解活性不少于(NLT)约100 mmol/胶囊/19小时,例如约200 mmol、约300 mmol、约400 mmol、约500 mmol或甚至高达约2摩尔,如本文先前所提及的。代替每胶囊,也可称为每剂量。这定义了选择用于制备药物组合物的细菌的活性,即其允许在制备组合物时忽视可能包含较少活性细胞的某些细胞批次。本文显示通过使用具有这样的草酸盐降解活性的细菌获得非常有效的药学产品是可能的。鉴定具有这样的特性的细菌可在测量草酸盐降解活性的测定中进行,如实验部分所说明的。

[0101] 新的药物组合物的效力(草酸盐降解活性)也在图1中说明,显示新的组合物比先前使用的制剂更迅速地开始复制。这说明本组合物的改善的特性。

[0102] 本文此外提供用于口服给予受试者的肠溶包衣胶囊,所述胶囊包含约 10^9 -约 10^{10} CFU的量的产甲酸草酸杆菌和赋形剂和/或冷冻保存剂,其中所述肠溶包衣胶囊靶向递送产甲酸草酸杆菌至所述受试者的小肠和/或回肠。此外提供此胶囊,其显示在具有pH约 1.2 ± 0.1 和包含约3.2 mg/ml胃蛋白酶的模拟胃液(SGF)中在温度约37°C孵育1小时内基本无崩解,但其中所述胶囊在具有pH约 6.8 ± 0.1 和包含约10 mg/ml胰酶的模拟肠液(SIF)中在约37°C约1小时内检测到开始崩解。当存在于所述胶囊中时,产甲酸草酸杆菌的体外草酸盐降解活性可为不少于(NLT)约100 mmoles/胶囊/19小时,或如本文先前所定义的。胶囊和聚合物包衣的实例在本文中提供。

[0103] 此外提供用作药剂的如本文所定义的药物组合物或肠溶包衣胶囊。所述用途可为

用于治疗 and/或预防草酸盐相关病症,或更特别地草酸钙沉积相关病症,例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症。

[0104] 本文中,每逢提及所述药物组合物或所述肠溶包衣胶囊的医疗用途,也意在指其在制造用于治疗或预防本文提及的医学病况的药剂中的用途。

[0105] 还提供用于治疗 and/或预防草酸盐相关病症的药物组合物或肠溶包衣胶囊,其中所述病症选自高草酸尿症、原发性高草酸尿症和继发性高草酸尿症。

[0106] 本文还提供药物组合物或肠溶包衣胶囊用于治疗 and/或预防草酸盐相关炎症的用途。

[0107] 本公开内容涉及高草酸尿症、原发性高草酸尿症和继发性高草酸尿症。在进一步的背景中,其涉及高草酸血症、血浆中草酸盐累积、与慢性肾疾病 (CKD) 和终末期肾脏疾病 (ESRD) 相关的草酸盐沉着症,例如在短肠综合征 (SBS)、具有空肠/回肠切除或Roux-en-Y程序的肥胖病手术、Zellweger疾病、具有空肠/回肠切除的癌症、肾脏被黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 感染和透析的ESRD患者中。其进一步涉及肠源性高草酸尿症、肠或小管上皮炎症、心脏传导病症、外阴痛、特发性草酸钙肾结石疾病 (尿石症)、炎性肠病 (IBS)、小肠细菌过度生长 (SIBS)、胃肠炎、胃炎、肠炎、小肠结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和用胃肠脂肪酶抑制剂治疗的患者中的草酸盐相关病症。

[0108] 在进一步的方面,本文还提供用于治疗 and/或预防草酸盐相关炎症的产甲酸草酸杆菌。

[0109] 本文所定义的药物组合物或肠溶包衣胶囊可以以包含约 10^9 -约 10^{10} CFU产甲酸草酸杆菌的量每天至少两次给予有需要的受试者,持续一段时间,例如持续至少数月或数年的时间。这样的时间可持续1、2、3、4、5、6或高达12个月,1、2、3、4或5或甚至更多年,直至增加的血浆草酸盐水平的进展已经减缓、停止或降低,和维持在较健康的、较低的水平,例如1-3 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0110] 如本文先前所提及的,本组合物尤其可用于治疗和/或预防与高草酸血症有关的草酸盐相关病症和全身性草酸钙沉积的形成。

[0111] 本文还提供药物组合物或肠溶包衣胶囊在治疗和/或预防草酸盐相关炎症中的用途。

[0112] 此外提供用于治疗 and/或预防草酸盐相关病症或更特别地草酸钙沉积相关病症例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症的方法,所述方法包括给予有需要的受试者药理学上有效量的如本文所定义的药物组合物或如本文所定义的包含药理学上有效量的如本文所定义的药物组合物的肠溶包衣胶囊。

[0113] 所述受试者可为哺乳动物,例如人。

[0114] 所述方法包括治疗和/或预防伴随高草酸血症的高草酸尿症、原发性高草酸尿症和继发性高草酸尿症。所述方法进一步涉及治疗和/或预防高草酸血症、血浆中草酸盐累积、与慢性肾疾病 (CKD) 和终末期肾脏疾病 (ESRD) 相关的草酸盐沉着症,例如在短肠综合征 (SBS)、具有空肠/回肠切除或Roux-en-Y程序的肥胖病手术、Zellweger疾病、具有空肠/回肠切除的癌症、肾脏被黑曲霉感染、透析的ESRD患者中。所述方法进一步涉及草酸盐相关炎症和更特别地治疗和/或预防来自高草酸尿症的肠炎、肠或小管上皮炎症、心脏传导病症、外阴痛、特发性草酸钙肾结石疾病 (尿石症)、炎性肠病 (IBS)、小肠细菌过度生长 (SIBS)、胃

肠炎、胃炎、肠炎、小肠结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和用胃肠脂肪酶抑制剂治疗的患者中的草酸盐相关病症。

[0115] 所述方法还涉及当将所述组合物给予有需要的受试者时进一步增加全身性草酸盐排泄。有需要的受试者在本文中被鉴定为患有的一种或多种本公开内容的病症。

[0116] 还提供一种方法,其中所述药理学上有效量包括给予有需要的受试者约 10^9 -约 10^{10} CFU的量的产甲酸草酸杆菌,每天至少两次,持续一段时间,例如持续至少数月或数年的时间。这样的时间可持续1、2、3、4、5、6或高达12个月,1、2、3、4或5或甚至更多年,直至血浆草酸盐水平已经降低,和维持在较健康的、较低的水平,例如1-3 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0117] 还提供用于制备如本文所定义的药物组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

- a) 混合产甲酸草酸杆菌细胞糊与赋形剂和/或冷冻保存剂和任选的水;和
- b) 冻干步骤a)中获得的组合物。

[0118] 在其它方面,本文提供以下:

还提供用于治疗 and/或预防肾脏被黑曲霉感染的产甲酸草酸杆菌。

[0119] 本文还提供用于治疗 and/或预防草酸钙沉积相关病症例如涉及高草酸血症的草酸钙沉积相关病症的产甲酸草酸杆菌,如本文在其它背景中所更特别定义的。

[0120] 本文还提供用于治疗 and/或预防慢性肾疾病 (CKD) 的产甲酸草酸杆菌。

[0121] 本文还提供用于治疗 and/或预防草酸盐相关炎症的产甲酸草酸杆菌,如本文在其它背景中所更特别定义的。

[0122] 产甲酸草酸杆菌在药物组合物中以其治疗有效量提供,如本文所例示的。

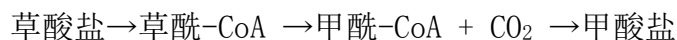
[0123] 本公开内容现在将通过下列实验部分说明,但其不意在限制于此。

[0124] 实验部分

新制剂的内容物、活性和崩解

草酸盐降解活性

产甲酸草酸杆菌的效力(即草酸盐降解活性)的检测通过测量在包含草酸盐的培养基(60 mM草酸盐“OxB”培养基, Allison等人, 1985, Medium B)中培养细胞期间从草酸盐降解活性产生的甲酸盐的量间接进行。在37°C孵育之后,将样品取出和过滤。甲酸盐的浓度通过高效液相色谱(HPLC)使用阳离子交换柱,针对甲酸盐标准曲线测定。化学计量上,对于每摩尔消耗的草酸盐产生1摩尔甲酸盐(Steward等人, 2004):



本制剂,例如OC5的测定测量在约19小时(其中观察到样品稀释度之间的线性和细胞已经达到指数期的时间点)累积的草酸盐降解。

[0125] 通过该途径,允许测定区别有效的草酸盐降解活性与背景代谢活性。

[0126] 图1中的图显示本发明的药物组合物比先前使用的材料更迅速地开始复制。由于一旦胶囊崩解,产甲酸草酸杆菌细胞在体内具有有限的时间来恢复和开始降解草酸盐,细胞的短恢复时间很重要。如果恢复不够迅速,细胞将会在它们有机会发挥其作用之前穿过胃肠道。因此,优选使用如本文所公开的具有特定生长速率和草酸盐降解活性的材料以得到改进的药学制剂。

[0127] 因此,改进的药学制剂导致i) 与先前的产品冻干粉相比更迅速的(OC5)冻干粉恢复,如通过上文描述的体外草酸盐降解活性测量所定义的,和ii) 更高的活细胞计数浓度。

本组合物中每剂量产品的草酸盐降解活性大约高100倍。

[0128] 本制剂还比先前的物质更浓缩(如本文所呈现的)。因此,每克材料的总细胞计数和活细胞计数二者均更高。

[0129] 表1:OC3和OC5制剂中冻干粉的内容物

	冻干粉	
	OC5	OC3
细胞糊	19%	1%
低聚果糖	3%	31%
麦芽糊精	17%	58%
藻酸盐	1%	4%
海藻糖	NA	3%
蔗糖	57%	NA
水	3%	3%

上表中列出的含量为近似的,可在本文例示的范围内变动。旧和新制剂之间的一个差异为赋形剂蔗糖。图2中的恢复迹线显示包含蔗糖的不同制剂的恢复速率,而OC3制剂不含蔗糖(即图2显示与OC3相比,混合制剂的改善的恢复和草酸盐降解)。

[0130] 包覆聚合物的OC5胶囊的崩解

本文所呈现的和由OC5例示的药物组合物的释放靶位点为在小肠内,特别地,制剂中草酸杆菌属释放的优选开始靶向十二指肠之后,至空肠或回肠,这是因为发现草酸盐流入肠腔的身体部位发生在回肠中以及在盲肠和末端结肠中(Hatch和Freel, 2008, 2013)。

[0131] OC5冻干粉包含具有快速生长特性的产甲酸草酸杆菌细胞。在开发OC5中决定使用肠溶包衣胶囊靶向释放细菌,细节在以下呈现。OC5胶囊可包含Eudragit聚合物FS30D和L30D55包衣,但本文呈现的组合物不限于此。

[0132] 表2:OC5胶囊的描述

药物产品	胶囊	每剂量的草酸盐降解活性	每剂量的含量(CFU*)	OC5胶囊的崩解时间规范
OC5	4号肠溶包衣硬胶囊	≥ 100 mmol/剂量, 19h	$10^9 - 10^{10}$	在SGF中第一个小时内无崩解的证据;在SIF中第一个小时内开始崩解的证据

*CFU: 菌落形成单位

包覆聚合物的OC5胶囊在体内的评估

目标为评估配制为在小肠内崩解的肠溶包衣胶囊的体内行为。胶囊用聚合物包覆,设计为经得起在模拟胃液(SGF)中1小时和在模拟肠液(SIF)中1小时内显示胶囊崩裂迹象。

[0133] 胶囊的崩解过程和运送通过胃肠道使用闪烁方法表征。 γ 闪烁技术已经成为评估药学剂量形式的体内表现的越来越有用的工具。闪烁为非侵袭性的,提供制剂的沉积、分散和移动的信息。放射性负载最小,所有程序建立完善和一般认为安全。

[0134] 进行闪烁研究以评估靶向的肠溶包衣胶囊在男性人类志愿者中的体内行为。设计为在SIF中在1 h内崩解的胶囊,在体内胃排空之后 91.6 ± 30.6 min的平均时间时开始崩解。基于获得的闪烁图像和胃肠运送时间的评估,可总结多数胶囊在小肠,特别是回肠中开

始释放。因此本文中首次开发能够在回肠中释放草酸杆菌属的产品。

[0135] 图3显示代表研究中获得结果的图像,即说明胶囊的胃肠运送中发生的关键事件。

[0136] 图3 (a) - (d) 中说明的关键事件为口服摄入后不同时间,受试者006中OC5胶囊的胃肠运送的前闪烁图像:(a) $t = 0$ min时,口服摄入之后,胶囊为完整的和位于胃中,如胶囊的清楚痕迹所显示的。(b) $t = 100$ min时,确认胶囊胃排空;即胶囊已离开胃。胶囊的痕迹仍然清楚。(c) $t = 170$ min时,在小肠中开始崩解和胶囊内含物释放,如通过胶囊周围较大的痕迹所可视化的。(d) $t = 260$ min时,在升结肠中完全崩解和胶囊内含物释放,如更大的痕迹展开所证明的。图像(a) - (d)各自中的白色箭头指出胶囊的放射性痕迹。胃和结肠轮廓仅为了可视化目的绘出。位于胃左侧的白色实心圆用作位置标志。

[0137] 使用新制剂的临床双盲研究

研究设计

OC5研究为随机化的安慰剂对照的双盲研究(OC5-DB-01),在德国、英国和法国进行。

[0138] 一个OC5剂量由包含不少于 10^9 菌落形成单位(CFU)的产甲酸草酸杆菌的一个胶囊组成,具有代谢不少于100 mmol每剂量(胶囊)(在19小时时读取)的能力。安慰剂产品与活性产品具有相同的外观和释放性质,由微晶纤维素填充的肠溶包衣4号胶囊组成。治疗期间,患者在第2、4、6、8和10治疗周(若需要)提供24-h尿样品。粪便样品和血浆样品在第4和8治疗周收集。为了确保在治疗期结束时存在合格的尿收集,如果认为第8治疗周的尿收集不合格,则将治疗扩展到10周以获得额外的收集。

[0139] 纳入标准

有资格的男性或女性患者年龄 ≥ 2 岁(在英国 ≥ 5 岁),具有1、2或3型PH诊断(如通过标准诊断方法所确定的)和基于基线期间(开始治疗之前第1-4基线周)进行的至少3次合格的尿收集的平均尿草酸盐(Uox)排泄 ≥ 1.0 mmol/24 h/1.73 m²。为纳入研究,患者需要具有基线时估计的肾小球滤过率(eGFR) ≥ 40 mL/min/1.73 m²或肌酸酐清除率 ≥ 40 mL/min/1.73 m²。

[0140] 服用维生素B6(吡多醇)的患者需要在筛查之前服用稳定剂量至少3个月和在研究期间不改变剂量。在研究进入时未接受微生物B6的患者需要在研究的持续时间内克制开始吡多醇。

[0141] 统计方法

主要终点(尿草酸盐排泄从基线到治疗第8周的变化)的统计分析用混合模型重复测量(MMRM)协方差分析进行,其包括下列固定效果:治疗组、基线尿草酸盐值、就诊和就诊治疗相互作用。该变化在治疗8周之后在OC5和安慰剂之间比较。基于从基线到治疗结束的变化所有次要终点(受试者亚集中尿草酸盐水平的变化、血浆草酸盐水平的变化、粪便中产甲酸草酸杆菌数目的变化)使用与主要终点相同的方法学分析。从基线到治疗第8周在粪便中产甲酸草酸杆菌数目的变化使用描述统计学评估。

[0142] 所有功效分析均在接受至少一次剂量的研究药物和在用OC5/安慰剂治疗期间提供至少1个合格的尿草酸盐测量的随机化患者上进行。

[0143] 结果

研究群体

筛查了44名患者。筛查失败的主要原因为基线期间尿草酸盐排泄低于1 mmol/24 h/

1.73 m²。将28名患者随机化；14名患者接受OC5和14名患者接受安慰剂，所有患者完成了研究。

[0144] 患者年龄和肾功能之间存在清楚的关系，与疾病进展一致。横跨两组，18岁年龄以下多数患者(19个中的15个)具有正常肾功能(eGFR ≥90 mL/min/1.73 m²)，而9个年龄≥18岁的患者中的仅3个具有正常的肾功能。

[0145] 小组组成的差异显示OC5组(97.47 mL/min/1.73 m²)具有比安慰剂组(123.11 mL/min/1.73 m²)更低的平均eGFR。

[0146] 肾和尿病症历史在OC5组中(11名患者,79%)比安慰剂组(8名患者,57%)更高,这可由基线时小组之间的肾功能差异解释。

[0147] 表3:全身和肾医疗历史概述

	OC5 (N=14) n (%)	安慰剂 (N=14) n (%)	总计(N=28) n (%)
任何其它医疗历史	12 (85.7)	11 (78.6)	23 (82.1)
肾和尿病症	11 (78.6)	8 (57.1)	19 (67.9)
尿结石	6 (42.9)	2 (14.3)	8 (28.6)
排尿困难	0	1 (7.1)	1 (3.6)
血尿	2 (14.3)	0	2 (7.1)
肾积水	1 (7.1)	0	1 (3.6)
高钙尿症	0	1 (7.1)	1 (3.6)
高草酸尿症	1 (7.1)	1 (7.1)	2 (7.1)
肾钙沉着症	5 (35.7)	5 (35.7)	10 (35.7)
肾结石	7 (50.0)	4 (28.6)	11 (39.3)
蛋白尿	2 (14.3)	1 (7.1)	3 (10.7)
肾绞痛	2 (14.3)	0	2 (7.1)
肾衰竭	0	1 (7.1)	1 (3.6)
慢性肾衰竭	4 (28.6)	0	4 (14.3)
肾损伤	2 (14.3)	1 (7.1)	3 (10.7)
肾痛	1 (7.1)	0	1 (3.6)

医疗历史按照 MedDRA 版本 16.1 编码

尿草酸盐排泄的变化

当研究下列结果中的安慰剂组对治疗组时，可以看到与先前的OC3制剂相比OC5药物组合物提供改善的效果。

[0148] 预期OC5治疗组的尿草酸盐/尿肌酸酐将会比安慰剂组下降更多。然而，替代地，OC5组增加尿草酸盐排泄/尿肌酸酐排泄，而安慰剂组减少。在第8治疗周，OC5和安慰剂组之间的差异达到统计学显著(p=0.030)。OC5组出乎意料的增加表明增强的草酸盐排泄和草酸盐沉积的松动(表4)，这未在先前的OC3制剂的研究中发生。沉积的松动还形成一系列事件的部分，其中血浆中游离草酸盐浓度的减少使PH患者中的草酸盐平衡向沉积的松动移动。这在具有低肾功能(低eGFR)的PH患者中特别明显。

[0149] 表4:按周数和治疗分析尿草酸盐排泄与尿肌酸酐排泄的比率从基线的变化

OC5-DB-01				
治疗周	参数 ¹	尿草酸盐排泄与尿肌酸酐排泄的比率(mg/g)从基线的变化		
		OC5 (N=14)	安慰剂(N=14)	OC5 - 安慰剂
第2周 (第8研究周)	LS均值 (SE)	-6.61 (6.721)	-8.35 (6.981)	+1.74
	p-值	0.859	-	
第4周 (第10研究周)	LS均值 (SE)	-5.39 (6.443)	-9.07 (6.273)	+3.68
	p-值	0.686	-	
第6周 (第12研究周)	LS均值 (SE)	-1.96 (5.625)	-8.14 (5.780)	+6.18
	p-值	0.451	-	
第8周 (第14研究周)	LS均值 (SE)	5.41 (6.092)	-15.96 (7.010)	+21.37
	p-值	0.030	-	
OC3-DB-02				
	参数 ²	尿草酸盐排泄与尿肌酸酐排泄的比率(mmol/mol)从基线的变化		
		OC3 (N=21)	安慰剂(N=13)	OC3 - 安慰剂
第8周	均值(SD)	4.74 (38.20)	-1.67 (31.79)	+6.41
	p-值	0.607	-	

¹重复测量分析; ²Wilcoxon-Mann-Whitney分析

LS: 最小二乘方; SE: 标准误差; SD: 标准偏差

该表显示在OC5-DB-01研究中尿草酸盐排泄与尿肌酸酐排泄的比率在OC5和安慰剂之间的差异从基线随时间增加,对于OC5在第8治疗周统计上显著(p=0.030,使用重复测量分析)。对于OC3,在OC3-DB-02研究中在第8治疗周时尿草酸盐排泄与尿肌酸酐排泄的比率从基线的变化在OC3和安慰剂之间的差异统计上不显著(p= 0.607,使用Wilcoxon-Mann-Whitney分析)。

[0150] 草酸杆菌属计数变化

产甲酸草酸杆菌为天然存在的细菌类型。存在两种已知的草酸杆菌属基因型,1型和2型。OC5中的菌株HC-1为产甲酸草酸杆菌基因型1。两种基因型的产甲酸草酸杆菌的数目使用定量实时聚合酶链反应方法测量。仅一名患者(在OC5治疗组中)在研究开始时具有可检测的产甲酸草酸杆菌基因型1。在第8治疗周,OC5组的14名患者中的13名显示显著水平的产甲酸草酸杆菌基因型1计数。然而在第8治疗周1型产甲酸草酸杆菌未增加的患者在第4治疗周具有增加的水平。基因型1细菌在研究期间的任何时间在安慰剂组的任何患者中未检测到。

[0151] OC5组中的三名患者和安慰剂组中的三名患者在基线期间具有可检测的产甲酸草酸杆菌基因型2水平。产甲酸草酸杆菌基因型2在OC5组中开始生长但在安慰剂组中不生长,表明OC5介导从血浆转移过量草酸盐至肠,从而也饲喂基因型2的产甲酸草酸杆菌。

[0152] 粪便中产甲酸草酸杆菌数目从基线到第8周的变化之间的最小二乘方(LS)均值差异为在OC5组中比在安慰剂组中大 1.27×10^7 个细胞/g (95% CI: $4.79 \times 10^6 - 2.07 \times 10^7$; $p < 0.0002$) (表5)。

[0153] 表5:8周治疗后粪便中产甲酸草酸杆菌总数的变化(细胞/g)

治疗	产甲酸草酸杆菌数目的变化		与安慰剂的差异		p-值
	LS 均值	95% CI	LS 均值	95% CI	
OC5	13,814,394	7,992,437-19,636,352	12,723,497	4,788,219-20,658,775	0.00023
安慰剂	1,090,897	-4,293,285-6,475,081	-	-	-

CI: 置信区间, LS: 最小二乘方

基于包括治疗、就诊和就诊治疗相互作用和产甲酸草酸杆菌的基线数目作为协变量的混合模型重复测量方差分析

产甲酸草酸杆菌的基线水平定义为第一次剂量的研究药物之前最后的非遗漏和有效评估。

血浆草酸盐浓度的变化和与肾功能的相关性

基线处血浆草酸盐和肾功能之间的相关性高度统计上显著(表6)。

[0154] 表6:基线处血浆草酸盐浓度和肾功能(eGFR)之间的相关性

血浆草酸盐和 eGFR 之间的相关性		
研究	#患者	p-值
OC5-DB-01	28	0.007

对于全部研究群体,基线血浆草酸盐和eGFR之间存在负相关($r=-0.508$, $p<0.007$)。对于全部研究群体,平均血浆草酸盐浓度为 $14.7 \mu\text{mol/L}$ 。eGFR $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 的患者具有平均血浆草酸盐浓度 $10.2 \mu\text{mol/L}$,而eGFR $<90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 的患者具有平均血浆草酸盐浓度 $23.7 \mu\text{mol/L}$ 。在OC5-DB-01研究中,具有晚期疾病(eGFR $<95 \text{ mL/min/1.73 m}^2$)的安慰剂组在8周内血浆草酸盐浓度增加 $+2.95 \mu\text{mol/L}$,而OC5组在8周后未增加相同程度。血浆草酸盐浓度与肾功能负相关(上表6)。由于肾功能下降指示PH进展,血浆草酸盐的变化也为疾病进展的度量。血浆草酸盐累积接着草酸钙结晶最终为疾病的驱动力。通过影响血浆草酸盐浓度随时间的增加,OC5可延迟或停止疾病进展(表7)。

[0155] 表7:OC5-DB-01研究和具有低肾功能的亚组中血浆草酸盐浓度($\mu\text{mol/L}$)从基线变化的重复测量分析的概述

研究	持续周	安慰剂	OC5	安慰剂-OC5
		血浆草酸盐变化, $\mu\text{mol/L}$	血浆草酸盐变化, $\mu\text{mol/L}$	
OC5-DB-01	8	$<+1$	$<+1$	
- 患者 eGFR $<95 \text{ mL/min/1.73 m}^2$	8	+2.95	+0.66	+2.29
- 患者 eGFR $<65 \text{ mL/min/1.73 m}^2$	4	$<+1$	$<+1$	+7.18
	8	+8.7	+1.52	

血浆草酸盐浓度的变化和与草酸杆菌属计数的相关性

血浆草酸盐浓度的变化和产甲酸草酸杆菌基因型1的变化之间存在负相关,以致于血浆草酸盐浓度随着增加的草酸杆菌属基因型1计数而降低。该相关性在第4治疗周达到统计上显著(max. $r=0.624$; $p=0.040$) (表8)。此发现提示引入的产甲酸草酸杆菌细菌能够代谢源自血浆的游离草酸盐。

[0156] 表8:血浆草酸盐浓度从基线的变化($\mu\text{mol/L}$)和产甲酸草酸杆菌基因型1从基线的变化之间的相关性

治疗周	OC5 (N=14)		
	N	R	P
第 4 周	11	-0.624	0.040
第 8 周	10	-0.148	0.684

变化计算为基线后的值减去基线值。相关性为 Pearson r 值。

对肾功能的影响

在具有基线eGFR <90 mL/min/1.73 m²的患者中,存在血液尿素氮(BUN)浓度在OC5组中从基线下降和在安慰剂组中增加的趋势(8周后从基线的LS均值差异,OC5:-3.95 mg/dL;安慰剂:5.24 mg/dL;p=0.085) (表9)。

[0157] 表9:具有基线eGFR <90 mL/min/1.73 m²的患者中血液尿素氮(mg/dL)从基线变化的重复测量分析

治疗周	参数	血液尿素氮(mg/dL)从基线的变化	
		OC5	安慰剂
第 4 周	N	6	3
	LS 均值 (SE)	-3.19 (2.202)	4.29 (3.278)
	p-值	0.095	-
第 8 周	N	7	3
	LS 均值 (SE)	-3.95 (2.566)	5.24 (3.920)
	p-值	0.085	-

LS: 最小二乘方; eGFR: 估计的肾小球滤过率; SE: 标准误差

OC5和安慰剂组之间在第2治疗周的尿输出体积从基线的最小二乘方平均差异为在OC5组中-235.2 mL和在安慰剂组中+242.3 mL;该差异达到统计上显著(p=0.039)。在第6治疗周,OC5和安慰剂组之间的尿输出从基线的LS平均差异为在OC5组中-453.7 mL和在安慰剂组中+375.4 mL,这也达到统计上显著(p=0.001) (表10)。在第8周,差异为强趋势,但未达到统计上显著(p=0.141)。研究中的所有患者,用活性剂(OC5)治疗的患者和用安慰剂治疗的患者二者,关于流体摄入具有相同指令。

[0158] 表10:尿体积(mL)从基线变化的重复测量分析

治疗周	参数	尿体积(mL)从基线的变化	
		OC5 (N=14)	安慰剂(N=14)
第 2 周	LS 均值 (SE)	-235.2 (149.93)	242.3 (160.16)
	p-值	0.039	-
第 4 周	LS 均值 (SE)	-246.0 (176.66)	-163.0 (172.71)
	p-值	0.739	-
第 6 周	LS 均值 (SE)	-453.7 (160.23)	375.4 (165.13)
	p-值	0.001	-
第 8 周	LS 均值 (SE)	-392.2 (139.72)	-82.7 (148.25)
	p-值	0.141	-

LS: 最小二乘方; SE: 标准误差

尿体积为在 1 个 24-h 周期内收集的尿的体积。

这些事后分析表明OC5治疗具有可能的临床益处。OC5组中减少的BUN和下降的尿输出提示肾脏水重吸收和尿浓缩能力在这些患者中改善。Zhao等人, 2016最近的出版物得出结

论,尿体积一般在PH患者中增加和诊断时的尿体积与eGFR负相关($p=0.001$)。尽管对于PH患者较高的体积可能反映推荐增加流体摄入,但作者建议一种备选的解释,即在已经确认小管间质性损伤的PH患者中,增加的尿体积反映降低的尿浓缩能力。我们的发现支持这些观察,OC5治疗将会表明对肾的水重吸收能力的有益治疗效果。血液尿素氮(BUN)为小管损伤的标志,其在PH患者中高度提高。OC5治疗倾向于减少BUN这一发现也可表明对肾的有益治疗效果。

[0159] 对炎症标志的影响

已知草酸钙晶体引起炎症反应[Worcester等人, 2013; Anders等人, 2013]。存在总白细胞数目从基线在OC5治疗的患者中下降和在安慰剂治疗的患者中增加的趋势(在第8周 $p=0.067$)。嗜酸细胞从基线变化的差异在第8治疗周统计上显著($p=0.044$)。对于淋巴细胞的数目也存在在OC5治疗的患者中下降和在安慰剂治疗的患者中增加的趋势(表11)。在8周内嗜酸细胞的显著下降以及白细胞和淋巴细胞计数在OC治疗的患者中下降和在安慰剂治疗的患者中增加的趋势表明产甲酸草酸杆菌治疗对PH相关炎症具有作用。然而,当比较两种制剂OC3和OC5的效果时,很清楚OC5在8周治疗后已经具有改善的效果。此外,如表11中所表明的,对于OC3没有正趋势。

[0160] 表11:白血细胞数目从基线变化的重复测量分析的概述(OC5-DB-01)

总白细胞($10^9/L$)					
治疗周	参数	OC5 (N=14)	安慰剂(N=14)	OC5- 安慰剂	OC3- 安慰剂 OC3-DB-02 (参见表 15)
第 4 周	LS 均值 (SE)	-0.23 (0.389)	0.49 (0.375)	-0.72	
	P-值	0.196	-		
第 8 周	LS 均值 (SE)	-0.28 (0.565)	1.26 (0.565)	-1.54	-0.45
	P-值	0.067	-		0.338
淋巴细胞($10^9/L$)					
治疗周	参数	OC5 (N=14)	安慰剂(N=14)	OC5- 安慰剂	
第 4 周	LS 均值 (SE)	-0.15 (0.132)	0.19 (0.128)	-0.34	
	P-值	0.071	-		
第 8 周	LS 均值 (SE)	-0.20 (0.187)	0.27 (0.187)	-0.47	
	P-值	0.089	-		
嗜酸细胞($10^9/L$)					
治疗周	参数	OC5 (N=14)	安慰剂(N=14)	OC5- 安慰剂	
第 4 周	LS 均值 (SE)	-0.06 (0.036)	0.00 (0.036)	-0.06	
	P-值	0.267	-		
第 8 周	LS 均值 (SE)	-0.06 (0.042)	0.07 (0.042)	-0.13	
	P-值	0.044	-		

LS: 最小二乘方; SE: 标准误差

使用新制剂的标签公开临床研究

OC5的临床开发计划还包括2期、标签公开、多中心研究以评估OC5在透析的具有原发性高草酸尿症的受试者中减少血浆草酸盐的功效。将患者用研究药物治疗6周,具有在开始研究药物前的4周基线测量和药物给予后的4周测量。其后,治疗的延伸按年继续。

[0161] 一名患者为具有非常高的基线血浆草酸盐的59岁男性。研究的第一年延伸期间，总的和可溶的血浆草酸盐之间的比率从2.5下降至1.9。游离血浆草酸盐的量几次在草酸钙饱和极限 (50-60 $\mu\text{mol/L}$) 附近达到稳定，每次随后为下一次测量中总血浆草酸盐浓度的增加 (即从第4周到第5周，第16-20周到第24周，第32周到第36周和第40周到第44周) (表12)。这些发现提示随着不同隔室的草酸盐组织沉积溶解，草酸盐首先饱和血浆蛋白，然后转移至游离血浆草酸盐。随着草酸杆菌属将游离血浆草酸盐移入到肠中，更多的草酸盐从血浆蛋白释放。

[0162] 表12: 用产甲酸草酸杆菌治疗期间随时间总的和可溶的 (游离) 血浆草酸盐 (Pox; $\mu\text{mol/L}$)

周	总的 Pox ($\mu\text{mol/L}$)	游离 Pox ($\mu\text{mol/L}$)	比率
0	162	64	2,5
4	134	55	2,4
8	155	78	2,0
12	125	68	1,8
16	124	45	2,8
20	112	50	2,2
24	137	59	2,3
28	138	60	2,3
32	126	57	2,2
36	137	67	2,0
40	121	60	2,0
44	154	79	1,9
48	164	86	1,9
52	144	74,3	1,9

先前的临床研究的分析和使用先前的和本发明的药物制剂的研究的整合分析
使用先前的OC3制剂的血浆草酸盐浓度的变化

在先前用OC3的研究中，显示对于安慰剂组在24周内血浆草酸盐的自然进展对于具有基线eGFR<90 mL/min/1.73 m²的患者为+3.25 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0163] OC3治疗组血浆草酸盐浓度稳定或减少，表明较慢的或停止的疾病进展 (表13)。

[0164] 表13: 使用先前的OC3制剂，血浆草酸盐浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 从基线变化的重复测量分析的概述 (研究OC3-DB-02和具有低肾功能的亚组)

研究	持续周	安慰剂	OC3
		血浆草酸盐变化, $\mu\text{mol/L}$	血浆草酸盐变化, $\mu\text{mol/L}$
OC3-DB-02	24	+0.14	-1.54
- 患者 eGFR<90 mL/min/1.73 m ²	8	+1.80	+0.50
	24	+3.25	-1.71
- 患者 eGFR<60 mL/min/1.73 m ²	8	+13.10	+1.28
	24	+15.00	-2.58

在进行的所有双盲研究的整合分析中钙排泄的变化

关于OC5组的尿草酸盐排泄/尿肌酸酐排泄增加而安慰剂组下降和OC5可能影响血浆草酸盐浓度随时间的积累速率的意外发现，对用产甲酸草酸杆菌治疗的所有双盲研究进行整合分析。我们用OC3和OC5对比安慰剂的双盲研究的整合分析中的数据显示尿钙排泄在具有低肾功能的患者，即可能具有累积的草酸盐沉积 (eGFR<90 mL/min/1.73 m²) 的患者中随时

间增加。该发现统计上显著 ($p=0.007$) (表14)。

[0165] 表14: 响应于用产甲酸草酸杆菌治疗的钙排泄的变化 ($\mu\text{mol}/24\text{ h}$)

	Ca ²⁺ 排泄的变化, $\mu\text{mol}/24\text{ h}$		p-值	N 活性剂(OC3 或 OC5)/安慰剂
	活性剂 (OC3 或 OC5)	安慰剂		
具有 eGFR<90 mL/min/1.73 m ² 的患者	+30	-70	0.007	19/11

不希望受理论束缚, 假设草酸杆菌属治疗通过从血浆移除游离草酸盐的机制, 松动草酸钙沉积。在临床研究中草酸盐排泄和钙排泄增加的发现支持该假说。

[0166] 对炎症标志的影响

与对于OC5治疗的发现相似, OC3治疗影响炎症标志。在OC3-DB-02研究中(表15), 在24周治疗之后在OC3治疗组中存在显著的白细胞减少。与安慰剂的差异在治疗停止后4周仍显著。然而, 当比较两种制剂OC3和OC5的效果时, 很清楚OC5在治疗8周后已经具有改善的效果。

[0167] 表15: 响应于OC3治疗, 对炎症标志的影响

OC3-DB-02 研究周	OC3 平均变化 10 ⁹ 个细胞/L (N=21)	安慰剂平均变化 10 ⁹ 个细胞/L (N=13)	OC3- 安慰 剂	p-值	OC5-安慰剂 (参见表 11)
白细胞 第 8 周	-0.34	+0.11	-0.45	0.338	-1.54
白细胞 第 24 周	-0.85	+1.05	-1.90	0.013	
白细胞 第 28 周(停止 治疗 4 周后)	-0.66	+0.75	-1.41	0.045	

参考资料

Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M和Tandon C. Nephrolithiasis: Molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. BioMed Res Int Vol 2013, Article ID 292953, 21 pages, 2013.

Beck BB, Hoyer-Kuhn H, Göbel H, Habbig S, Hoppe B (2014) Hyperoxaluria and systemic oxalosis: an update on current therapy and future directions. Expert opin. Investig Drugs, Jan 22(1): 117-29.

Belostotsky R, Seboun E, Idelson Milliner DS, Becker-Cohen R, Rinat C, Monico CG, Feinstein S, Ben-Shalom E, Magen D, Weissman I, Charon C和Frishberg Y (2010) Mutations in DHDPSL Are Responsible For Primary Hyperoxaluria Type III. Am J Hum Gen 87, 392-399.

Bhasin B, Ürelkli HM, Atta MG. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. World J Nephrol 2015 May 6;4(2):235-44. doi: 10.5527/wjn.v4.i2.235.

Cochat P, Deloraine A, Rotily M, Olive F, Liponski I, Deries N (1995) Epidemiology of primary hyperoxaluria type 1. *Nephrol Dial Transplant* 10:Suppl 8:3-7.

Cochat P, Hulton SA, Acquaviva C, Danpure CJ, Daudon M, De Marchi M, Fargue S, Groothoff J, Harambat J, Hoppe B, Jamieson NV, Kemper MJ, Mandrile G, Marangella M, Picca S, Rumsby G, Salido E, Straub M, van Woerden CS (2012) Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant* 27:1729-1736.

Cochat P, Rumsby G (2013) Primary Hyperoxaluria. *N Engl J Med* 369:649-658.

Gregory JG, Starkloff EB, Miyai K, Schoenberg HW. Urological complications of ileal bypass operation for morbid obesity. *J Urology* 1975; 113: 521-524.

Harambat J, Fargue S, Acquaviva C, Gagnadoux MF, Janssen F, Liutkus A, Mourani C, Macher MA, Abramowicz D, Legendre C, Durrbach A, Tsimaratos M, Nivet H, Girardin E, Schott AM, Rolland MO, Cochat P (2010) Genotype-phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1: the p.Gly170Arg AGXT mutation is associated with a better outcome. *Kidney Int* 77:443-449.

Hatch M和Freel RW. The Roles and Mechanisms of Intestinal Oxalate Transport in Oxalate Homeostasis. *Semin Nephrol.* 2008 March ; 28(2): 143-151.

Hatch M, Gjymishka A, Salido EC, Allison MJ, Freel RW. Enteric oxalate elimination is induced and oxalate is normalized in a mouse model of PH following intestinal colonization with *Oxalobacter*. *AJPGLP*, 2011; 300 G461-G469.

Hatch M和Freel R, A human strain of *Oxalobacter* (HC-1) promotes enteric oxalate secretion in the small intestine of mice and reduces urinary oxalate excretion. *Urolithiasis*, 2013; August 20 (E publication).

Hopp K, Cogal AG, Bergstralh EJ, Seide BM, Olson JB, Meek AM, Lieske JC, Milliner DS, Harris PC Rare Kidney Stone Consortium (2015) Phenotype-Genotype Correlations and Estimated Carrier Frequencies of Primary Hyperoxaluria. *J Am Soc Nephrol* 26:2559-2570.

Hoppe B, Beck B, Gatter N, von Unruh G, Tischer A, Hesse A, Laube N, Kaul P, Sidhu H (2006) *Oxalobacter formigenes*: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int* 70:1305-1311.

Hoppe B, Beck B和Milliner D (2009) The Primary Hyperoxalurias. *Kidney Int* 75:1264-1271.

Hoppe B, Groothoff JW, Hulton SA, Cochat P, Niaudet P, Kemper MJ, Deschênes G, Unwin R, Milliner D (2011) Efficacy and safety of *Oxalobacter formigenes* to reduce urinary oxalate in primary hyperoxaluria. *Nephrol Dial*

Transplant 26:3609–3615.

Kopp N, Leumann E (1995) Changing pattern of primary hyperoxaluria in Switzerland. *Nephrol Dial Transplant* 10:2224–2227.

Lagies R, Beck B, Hoppe B, Sreeram N, Udink ten Cate F, Apical sparing of longitudinal strain, left ventricular rotational abnormalities and short-axis dysfunction in primary hyperoxaluria type 1. *Circ. Heart Failure*, 6, e45–e47, 2013.

Lagies R, Udink ten Cate F, Hoppe B, Feldkötter M, Beck B, Herberg U, Speckle tracking echocardiography detects impaired systolic function in patients with primary hyperoxaluria Type 1, (Poster from PH Workshop, Chicago, 2014).

Lagies R, Beck B, Hoppe B, Sheta S, Weiss V, Sreeram N和Udink ten Cate F. Inhomogenous longitudinal cardiac rotation and impaired left ventricular longitudinal strain in children and young adults with end stage renal failure undergoing hemodialysis. *Echocardiography*, 32(8), 1250–1260, 2015.

Leumann E和Hoppe B (2001) The Primary hyperoxalurias, *J Am Soc Nephrol* 12:1986–1993.

Lieske JC, Monico CG, Holmes WS, Bergstralh EJ, Slezak JM, Rohlinger AL, Olson JB, Milliner DS (2005) International registry for Primary Hyperoxaluria, *Am J Nephrol* 25:290–296.

Pascual E, Sivera F. Time required for disappearance of urate crystals from synovial fluid after successful hypouricaemic treatment relates to the duration of gout. *Ann Rheum Dis*. 2007 Aug;66(8):1056–8. Epub 2007 Jan 12.

Stewart CS, Duncan SH, Cave DR. Oxalobacter formigenes and its role in oxalate metabolism in the human gut. *FEMS Microbiology Letters* 230 (2004) 1–7

Tang X, Bergstralh EJ, Mehta RA, Vrtiska TJ, Milliner DS, Lieske JC (2015) Nephrocalcinosis is a risk factor for kidney failure in primary hyperoxaluria. *Kidney Int* 87:623–631.

van Woerden CS, Groothoff JW, Wanders RJ, Davin JC, Wijburg FA (2003) Primary hyperoxaluria type 1 in the Netherlands: prevalence and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18:273–279.

van Woerden CS, Groothoff JW, Wijburg FA, Duran M, Wanders RJ, Barth PG, Poll-The BT. High incidence of hyperoxaluria in generalized peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab* 2006 Aug;88(4):346–50. Epub 2006 Apr 18.

Worcester E, Evan A, Coe F, Lingeman J, Krambeck A, Sommers A, Phillips C和Milliner D (2013) A test of the hypothesis that oxalate secretion produces proximal tubule crystallization in primary hyperoxaluria type 1. *Am J Physiol Renal Physiol* 305, F1574–584.

Zhao F, Bergstralh EJ, Mehta RA, Vaughan LE, Olson JB, Seide BM, Meek AM,

Cogal AG, Lieske JC, Milliner DS, Investigators of the Rare Kidney Stone Consortium (2016) Predictors of incident ESRD among patients with primary hyperoxaluria presenting prior to kidney failure. Clin J Am Soc Nephrol 11: 119-126.

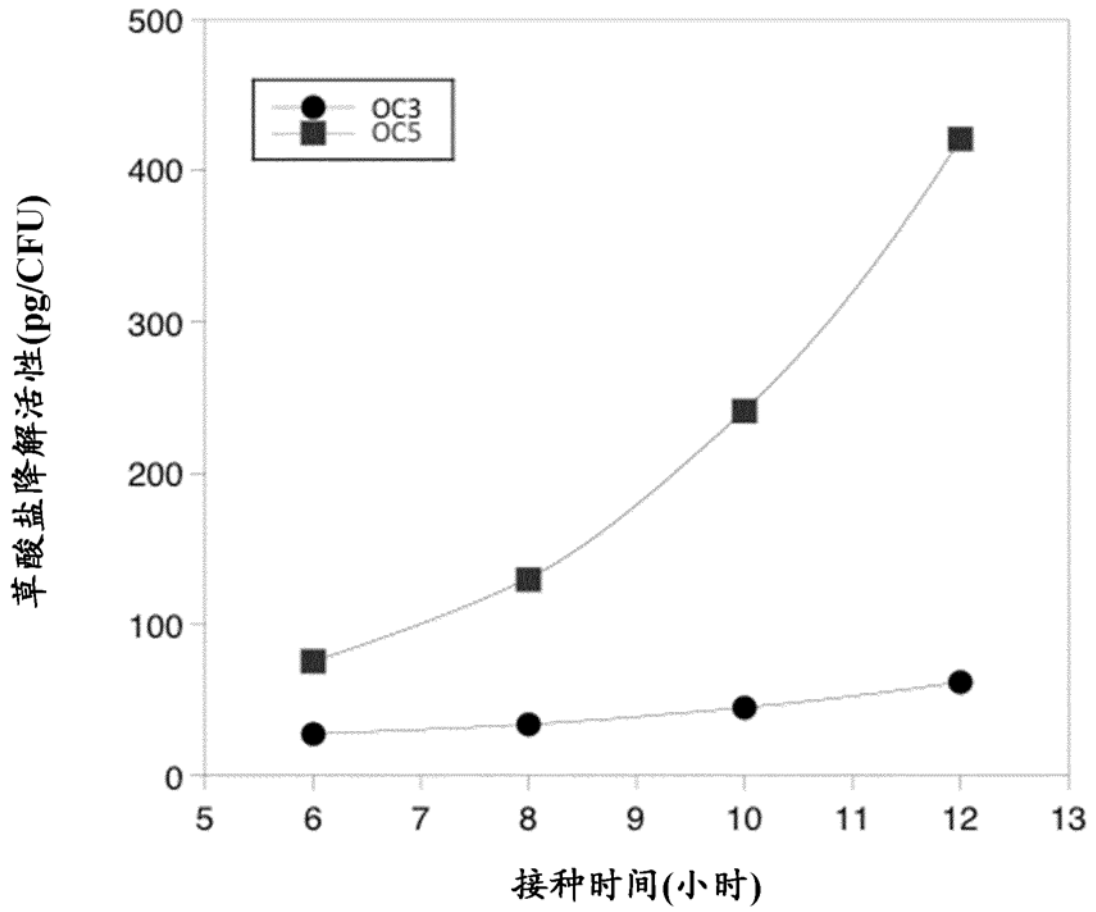


图 1

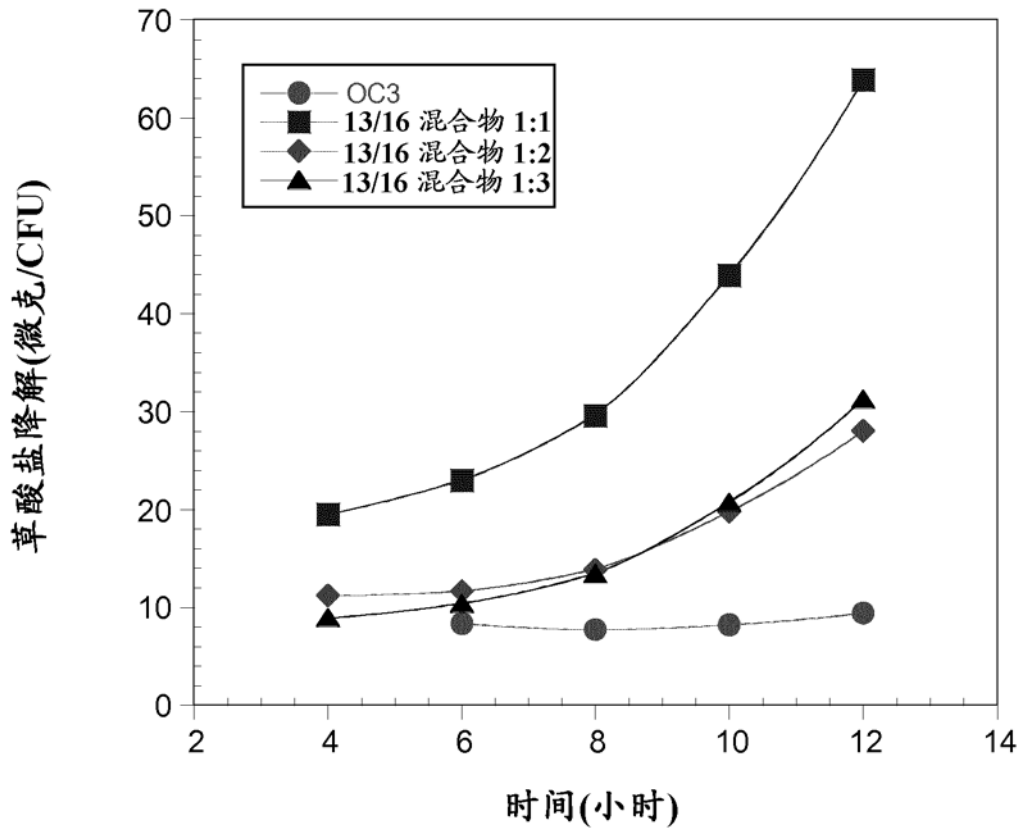


图 2

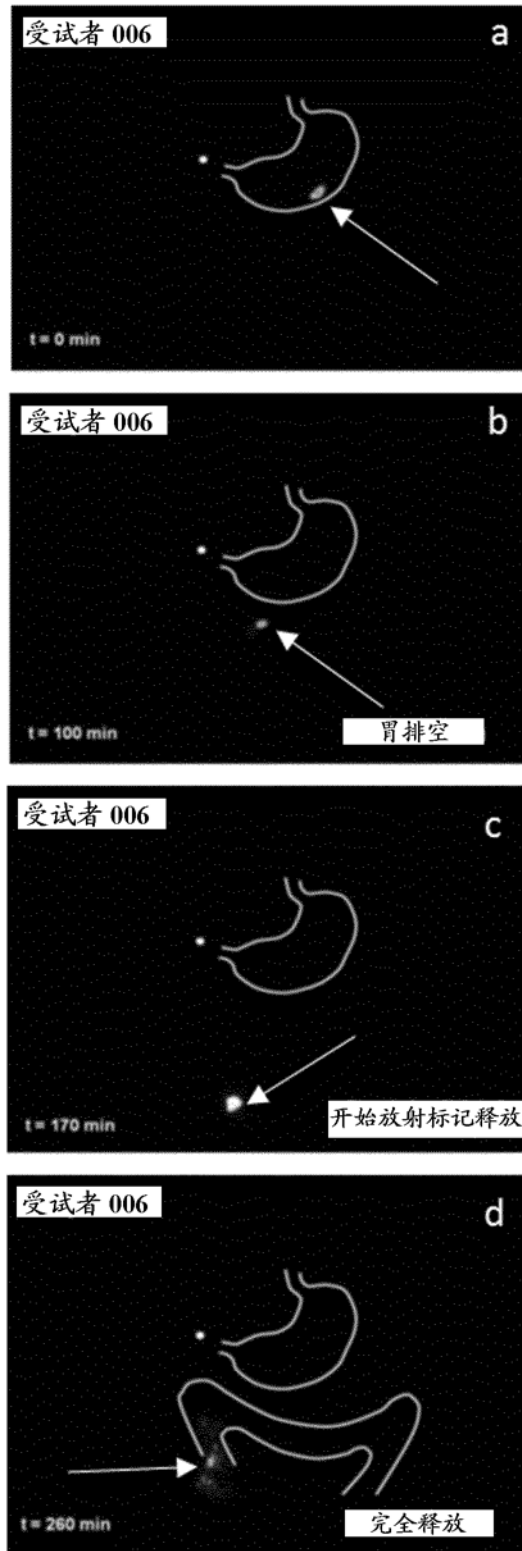


图 3