



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104013581 A

(43) 申请公布日 2014.09.03

(21) 申请号 201410277774.9

A61K 47/04 (2006.01)

(22) 申请日 2006.12.15

A61P 3/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 13/04 (2006.01)

60/750,896 2005.12.16 US

(62) 分案原申请数据

200680052904.2 2006.12.15

(71) 申请人 奥克斯赛拉公司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 李青山 H·赛德胡

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

(51) Int. Cl.

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

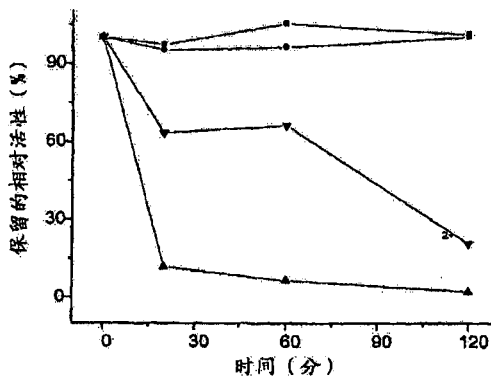
权利要求书1页 说明书27页 附图8页

(54) 发明名称

用于减少草酸和 / 或其盐的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于减少草酸和 / 或其盐的组合物和方法。例如, 本发明提供了用于递送一种或多种包埋于颗粒组合物中的减少草酸盐的酶的方法和组合物。本发明的组合物适合于治疗或预防草酸盐相关疾病的方法, 和接受了胃肠外科手术和肥胖病手术 (因肥胖而手术) 的患者和 / 或接受了抗生素治疗的患者, 所述草酸盐相关疾病包括 (但不限于) 高草酸盐尿、吸收性高草酸盐尿、肠源性高草酸盐尿、原发性高草酸盐尿、特发性草酸钙肾结石疾病 (尿石症)、外阴痛、与终末期肾病相关的草酸盐沉着症、心脏传导障碍、炎性肠病、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎。



1. 一种包含颗粒的组合物,所述颗粒包含草酸脱羧酶,该草酸脱羧酶均匀地分布在第一聚合物材料中,所述第一聚合物材料对草酸或其盐来说是可渗透的。
2. 根据权利要求1的组合物,其中所述第一聚合物材料选自自由壳聚糖、藻酸盐、三聚磷酸盐和角叉菜胶组成的组。
3. 根据权利要求1~2任意一项的组合物,其中所述颗粒被第二聚合物材料包被,所述第二聚合物材料对草酸或其盐来说是可渗透的。
4. 根据权利要求1~3任意一项的组合物,其中所述第二聚合物材料选自自由壳聚糖、藻酸盐、三聚磷酸盐和角叉菜胶组成的组。
5. 根据权利要求1~4任意一项的组合物,其中所述第一聚合物和/或第二聚合物材料自身交联和/或彼此交联和/或与所述草酸脱羧酶交联。
6. 根据权利要求1~5任意一项的组合物,其中所述交联是通过物理交联进行的。
7. 根据权利要求1~6任意一项的组合物,其中所述交联是通过利用化学交联剂进行的。
8. 根据权利要求7的组合物,其中所述化学交联剂选自二醛、1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺、辛酸二琥珀酰亚胺酯和N-[对马来酰亚氨基苯基]异氰酸酯。
9. 根据权利要求7或8的组合物,其中在所述化学交联剂和所述草酸脱羧酶和/或所述第一聚合物材料和/或所述第二聚合物材料之间的键已被还原剂还原。
10. 根据权利要求9的组合物,其中所述还原剂选自 NaBH_4 和 NaCNBH_3 。
11. 根据权利要求1~10任意一项的组合物,其中所述颗粒的直径是50纳米至1毫米。
12. 根据权利要求3~11任意一项的组合物,其中所述第一聚合物材料和第二聚合物材料相同或不同。
13. 根据权利要求1~12任意一项的组合物,其中所述第一聚合物材料和如果存在的话,第二聚合物材料的聚合物百分比是1%至10%。
14. 根据权利要求1~13任意一项的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于人或动物的胃中的草酸或其盐。
15. 根据权利要求14的用途,其中在摄入食物前、伴随食物一起或在摄入食物后立即给予所述组合物。

用于减少草酸和 / 或其盐的组合物和方法

[0001] 本申请是申请号为 200680052904.2、申请日为 2006 年 12 月 15 日、发明名称为“用于减少草酸盐的组合物和方法”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求享有于 2005 年 12 月 16 日提交的美国临时专利申请 No. 60/750,896 的优先权,将其全文并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及包含一种或多种草酸降解酶的组合物,该组合物用于将活性形式的酶递送至胃部,在那里所述一种或多种草酸降解酶发挥它们的作用。因而,本发明提供了用于减少胃中的草酸和 / 或其盐的手段。本发明的组合物包含颗粒,该颗粒含有一种或多种包埋于第一聚合物材料中的草酸降解酶,其中在相似的条件于 37°C 的美国药典 (USP) 模拟胃液中孵育至少 60 分钟时,所述包埋的酶保留的活性是从同一批次获得的所述一种或多种未包埋的游离酶的活性的至少两倍。

背景技术

[0005] 肾 / 尿路结石疾病 (尿石症) 是全世界范围的主要健康问题。大多数与尿石症有关的结石是由单独的草酸钙组成,或者由草酸钙加上磷酸钙组成。其它疾病状态也与过量的草酸和 / 或其盐有关。这些包括外阴痛、与终末期肾病有关的草酸和 / 或其盐沉着症、心脏传导障碍、局限性回肠炎以及其它肠道疾病状态。

[0006] 草酸和 / 或其盐,即 oxalate,发现于多种食物中,并因而是人和动物膳食的许多组分的成分。在食用了含有增加量的草酸的食物后可能会发生草酸和 / 或其盐吸收的增加。众所周知,诸如菠菜和食用大黄之类的食物含有高含量的草酸和 / 或其盐,但是大多数其它食物和饮料也含有草酸和 / 或其盐。因为草酸和 / 或其盐存在于如此多样的食物中,因此草酸和 / 或其盐含量低并且同时还可口的食物难以配制出来。此外,依从低草酸和 / 或其盐的膳食常常也是成问题的。

[0007] 形成肾结石的风险围绕着大量目前尚未完全明白的因素。在西方国家肾或尿路结石疾病发生多至 12% 的人群中,并且大约 70% 的这些结石由草酸钙或草酸钙加上磷酸钙组成。一些个体 (例如患有诸如局限性回肠炎、炎性肠病或脂肪痢之类的肠道疾病的患者以及已经接受了空肠回肠旁路术的患者) 在其膳食中吸收了比其它个体更多的草酸和 / 或其盐。对于这些个体,草酸和 / 或其盐尿石症的发病率显著增加。

[0008] 发病率的提高是由于肾和尿液中草酸和 / 或其盐水平的增加,并且这 (在人中最常见的高草酸和 / 或其盐尿综合征) 被称为肠源性高草酸和 / 或其盐尿。草酸和 / 或其盐也是患有终末期肾病的患者的难题,并且近来显示尿中的草酸和 / 或其盐升高也涉及到外阴前庭炎 (外阴痛)。

[0009] 已经建议将含有降解草酸和 / 或其盐的细菌的包肠溶衣的组合物用于降低草酸和 / 或其盐浓度。然而,包肠溶衣的组合物以完整的形式通过了胃 (即包衣是完整的),因

此在胃中没有降解草酸和 / 或其盐。因此, 仍然需要开发这样的组合物, 其能够降解已存在于胃中的草酸和 / 或其盐以便尤其能降解膳食中的草酸和 / 或其盐。此外, 这类组合物适用于治疗肠源性高草酸和 / 或其盐尿和吸收性高草酸和 / 或其盐尿, 例如导致复发性结石病的高草酸和 / 或其盐尿。该治疗的目的是使患者具有正常的尿草酸和 / 或其盐水平。

发明内容

[0010] 发明概述

[0011] 本发明包括用于治疗 and 预防草酸和 / 或其盐相关疾病的组合物和方法。本发明的组合物包含减少草酸和 / 或其盐的酶。本发明的方法包括施用该组合物来治疗或预防草酸和 / 或其盐相关疾病, 以及用于制备和使用这类组合物的方法。本发明的组合物在胃液条件下 (例如低的 pH 并且存在蛋白酶) 减少草酸和 / 或其盐。本发明的组合物减少人和其它动物胃中的草酸和 / 或其盐。该组合物减少非系统性的草酸和 / 或其盐, 如胃肠道 (特别是胃) 中的草酸和 / 或其盐, 并防止外源性草酸和 / 或其盐 (例如, 来自食物) 进入体循环中。

[0012] 根据本发明的组合物包含颗粒, 该颗粒含有一种或多种包埋于第一聚合物材料中的酶, 其中在将包埋的酶和未包埋的 (游离的) 酶两者在 37°C 下于模拟胃液 (84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶, pH 范围是 1.0 至 4.0) 中孵育至少 60 分钟时, 包埋的酶保留的活性是来自同一批次的所述一种或多种未包埋的酶的至少两倍。组合物包含可另外被第二聚合物材料包被的颗粒。组合物还可以包含可以交联的聚合物材料, 并且任选地, 该交联物可以被还原。在具体的实施方案中, 第一聚合物材料是壳聚糖、藻酸盐、果胶或透明质酸。除了一种或多种酶和第一聚合物材料, 颗粒组合物还可以包含一种或多种诸如 pH 调节剂、缓冲剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂、酶的辅助因子之类的添加剂或一种或多种可药用赋形剂例如充填剂、稀释剂、载体等。

[0013] 本发明的方法包括提供用于非系统治疗的组合物, 例如提供能够减少胃中的草酸和 / 或其盐以避免胃肠道吸收草酸和 / 或其盐的组合物。该组合物保护包埋于其中的减少草酸和 / 或其盐的酶不受胃中酸性和损害酶的环境的损害, 并在这样一种苛刻环境中维持酶活性。治疗和预防方法包括提供本文教导的组合物, 在该组合物中, 一种或多种草酸降解酶包埋于第一聚合物材料中, 任选用第二聚合物材料包被所获得的颗粒, 任选将第一聚合物材料和 / 或第二聚合物材料交联并且任选还原该交联物。

[0014] 本发明的组合物适用于治疗或预防草酸和 / 或其盐相关疾病的方法, 并且适用于已经经历了胃肠外科手术和肥胖手术 (针对肥胖症的手术) 的患者和 / 或已经经历了抗生素治疗的患者, 所述草酸和 / 或其盐相关疾病包括 (但不限于) 高草酸和 / 或其盐尿、吸收性高草酸和 / 或其盐尿、肠源性高草酸和 / 或其盐尿、原发性高草酸和 / 或其盐尿、特发性草酸钙肾结石疾病 (尿石症)、外阴痛、与终末期肾病相关的草酸和 / 或其盐沉着症、心脏传导障碍、炎性肠病、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎。治疗或预防方法包括将有效量的本发明组合物经口施用给受试者, 用以减少受试者胃中的草酸和 / 或其盐, 从而以高效率且有效的方式减少受试者的草酸和 / 或其盐总负荷。该组合物经口施用是药理学上可接受的。

[0015] 在本发明的组合物和方法中使用的酶是减少草酸和 / 或其盐的酶, 并且包括 (但不限于) 草酸氧化酶、草酸脱羧酶 (在本发明内容中缩写成 OxDc)、草酰辅酶 A 脱羧酶或甲

酰辅酶 A 转移酶或其组合。此外,作为草酸和 / 或其盐降解路径的取代物或参与草酸和 / 或其盐代谢路径 (尤其是草酸和 / 或其盐减少) 的其它酶、辅因子和辅酶也可以单独使用或者与一种或多种减少草酸和 / 或其盐的酶组合使用。在本发明中,不仅酶 (蛋白质) 被该定义所涵盖,而且编码减少草酸和 / 或其盐的基因和蛋白质的多核苷酸序列也被本发明所考虑。本发明还考虑这些酶的任何结合配偶体并且包括结合至所述酶或与所述酶相互作用的抗体和抗体片段。

[0016] 酶可以通过从生物中分离而产生,它们可以被纯化,它们可以通过合成制备、半合成制备或者通过重组手段制备,或者它们可以作为细胞溶解产物使用。在组合物中使用的酶可以是纯化的重组蛋白质,但是由于酶也可以在某些安全的细菌中产生,也考虑将那些细菌作为完整的细胞或作为细胞溶解产物使用。

[0017] 草酸降解酶通常以足以基本降解通常存在于标准膳食中的所有草酸和 / 或其盐的量存在于本发明的组合物中。取决于对食物的选择,平均西方饮食可以包含 100 至 300mg 草酸和 / 或其盐 / 天。一般而言,约 0.2g 含有酶的颗粒 (相当于 1mL 颗粒悬浮液中的 20mg OxDc) 可以在模拟胃液条件下在 30 分钟内除去 180mg 草酸和 / 或其盐。

[0018] 本发明的一方面包括组合物,该组合物包含颗粒,该颗粒包含一种或多种包埋于第一聚合物材料中的草酸降解酶,其中在 37°C 下于美国药典模拟胃液中孵育至少 60 分钟时,所述包埋的酶保留的活性是来自同一批次的所述一种或多种未包埋的游离酶的活性的至少两倍,所述美国药典模拟胃液在 pH>1 (例如 pH 约 1 至 pH 约 5 的范围,例如 pH 约 2 至 pH 约 5, pH 约 2.5 至 pH 约 4.5, pH 约 2.5 至 pH 约 3.5, 例如 pH 约 3) 时含有 84mM HCl 和 3.2mg/ml 的胃蛋白酶。

[0019] 发明详述

[0020] 本发明包括用于治疗 and 预防草酸和 / 或其盐相关疾病的组合物和方法。本发明的组合物包含减少草酸和 / 或其盐的酶。本发明的组合物经过设计,使得即使该组合物遭受胃环境,该酶也能保持它们的活性。本发明的方法包括施用该组合物以治疗或预防草酸和 / 或其盐相关疾病,以及用于制备和使用这种组合物的方法。更具体地说,本发明涉及经设计以能够在胃条件下减少草酸和 / 或其盐,由此能够减少已存在于胃中的草酸和 / 或其盐的组合物。这种组合物经特别设计以用于减少非系统性的草酸和 / 或其盐,如胃肠道 (尤其是胃) 中的草酸和 / 或其盐,并防止外源性草酸和 / 或其盐 (如来自食物) 进入体循环中。

[0021] 如上提及的,本发明背景是需要能够施用草酸降解酶至胃部以便降解膳食中的草酸和 / 或其盐并防止胃和肠道吸收草酸和 / 或其盐,这可预防草酸和 / 或其盐相关疾病和障碍,例如高草酸和 / 或其盐尿、原发性高草酸和 / 或其盐尿、特发性草酸钙肾结石病 (尿石症),并且特别是吸收性高草酸和 / 或其盐尿和肠源性高草酸和 / 或其盐尿。施用的酶受到保护而免于在胃的胃液条件 (即低 pH 和存在胃蛋白酶) 下发生的蛋白质降解和 / 或 pH 或酸性依赖性降解。

[0022] 因此,本发明涉及组合物,其中酶包埋于保护该酶在胃液条件下免受降解的聚合物材料中。可以设想这种组合物可包含任何酶,但是为本发明目的,本发明考虑的是草酸降解酶,例如草酸脱羧酶、草酸氧化酶或草酰辅酶 A 脱羧酶和甲酰辅酶 A 转移酶的组合,或任意这些酶的组合。

[0023] 根据本发明的组合物包含颗粒,该颗粒含有一种或多种包埋于第一聚合物材料中的酶,其中在将所述包埋的酶和未包埋(游离)的酶在 37℃ 下于模拟胃液(84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶, pH 范围是 1.0 至 4.0)中孵育至少 60 分钟时,该包埋的酶保留的活性是来自同一批次的所述一种或多种未包埋的酶的至少两倍。该颗粒可以另外用第二聚合物材料包被。如本文所用的,术语“来自同一批次的酶”表示在相同条件下分离或合成的酶,并且通常它们是在同一分离或合成程序中分离或合成的,其中所得的酶组合物通常称为一个批次。例如,将酶溶液分成两部分,其中将一部分酶包埋于颗粒中并可以进行进一步的处理,而将另一部分酶进行不同处理,则这些酶被认为是来自同一批次。

[0024] 通常,可以采用两种不同的治疗草酸和/或其盐相关疾病的途径,这取决于治疗目标是系统性的还是非系统性的。本发明的方法提供了用于非系统性治疗的组合物,即提供了能减小胃中的草酸和/或其盐以避免胃肠道吸收草酸和/或其盐的组合物。据本发明者所知,这种组合物是新的并且是基于这样的新原理:一方面保护酶免受胃中酸性环境和损害酶的环境的损害,另一方面,即使在酸性环境中也可维持酶活性。这一目标可以通过如下方案实现:将一种或多种草酸降解酶包埋于第一聚合物材料中,任选用第二聚合物材料包被所得的颗粒,任选使第二聚合物材料交联并任选还原交联的包被的颗粒。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,降低草酸和/或其盐吸收是通过提供草酸降解酶给胃肠道(尤其是胃)来实现的。本发明的组合物包含减少草酸和/或其盐的酶,其包括(但不限于)草酸氧化酶、草酸脱羧酶、草酰辅酶 A 脱羧酶、甲酰辅酶 A 转移酶或其组合。这些酶将草酸和/或其盐用作底物。本发明的方法包括提供酶组合物,其用于在胃中降解膳食中的草酸和/或其盐,从而降低胃中可用于吸收的草酸和/或其盐的浓度。这也将减少进入肠中而在胃肠道的这一段吸收的草酸和/或其盐的量。除了吸收途径,最近还在人的胃中鉴定了草酸和/或其盐分泌途径。本发明的组合物也可用于降解从循环系统分泌到胃中的草酸和/或其盐,因此本发明的方法期望总体减轻个体中的草酸和/或其盐负荷。

[0026] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于递送有效量的减少草酸和/或其盐的酶至人或动物(尤其是患草酸和/或其盐相关疾病的风险增加的那些人或动物)的胃部的组合物和方法。酶活性用于降解胃中的草酸和/或其盐并减少胃和肠道中存在的草酸和/或其盐的量,由此减少可用于吸收的草酸和/或其盐的量。胃肠道中的草酸和/或其盐水平较低也可以导致通过草酸和/或其盐分泌途径从血液分泌到肠道中的草酸和/或其盐增加。

[0027] 本发明的组合物适用于草酸和/或其盐相关疾病并且适用于已经接受了胃肠外科手术和肥胖手术(针对肥胖症的手术)的患者和/或已经接受了抗菌素治疗的患者,草酸和/或其盐相关疾病包括(但不限于)高草酸和/或其盐尿、吸收性高草酸和/或其盐尿、肠源性高草酸和/或其盐尿、原发性高草酸和/或其盐尿、特发性草酸钙肾结石疾病(尿石症)、外阴痛、与终末期肾病相关的草酸和/或其盐沉着症、心脏传导障碍、炎性肠病、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎。

[0028] 本发明组合物的一个特征是颗粒保护草酸降解酶免于降解的能力,所述降解是由例如在胃环境中发现的那些条件造成的,包括(但不限于)由蛋白酶例如胃蛋白酶引起的降解或由于酸性环境引起的降解。

[0029] 如本文所用的,术语“草酸降解酶”旨在表示能够减少草酸和/或其盐的任何酶。其本身可以减少草酸和/或其盐和/或其可以在减少草酸和/或其盐的途径中起作用。本

发明考虑使用任意已知的减少或降解草酸和 / 或其盐的酶, 并且“减少草酸和 / 或其盐的”和“降解草酸和 / 或其盐的”这样的术语在本文中可以交换使用。

[0030] 在本发明的组合物和方法中使用的酶包括 (但不限于) 草酸氧化酶、草酸脱羧酶 (在本文中缩写为 OxDc)、草酰辅酶 A 脱羧酶或甲酰辅酶 A 转移酶, 或其组合。而且, 作为草酸和 / 或其盐降解途径的取代物或参与草酸和 / 或其盐代谢途径 (尤其是草酸和 / 或其盐减少) 的其它酶、辅因子和辅酶也可以单独使用或与一种或多种上述酶组合使用。在本发明中, 不仅酶由该定义所涵盖, 而且编码减少草酸和 / 或其盐的基因和蛋白质的多核苷酸序列也为本发明所考虑。本发明还考虑这些酶的任何结合配偶体并且包括结合至所述酶或与所述酶相互作用的抗体和抗体片段。

[0031] 酶可以从生物分离产生, 它们可以被纯化, 它们可以通过合成制备、半合成制备或者通过重组手段制备, 或者它们可以作为细胞溶解产物使用。通常, 酶将作为纯化的重组蛋白质使用, 但是由于酶也可以在某些安全的细菌中产生, 也考虑将那些细菌作为完整的细胞或作为细胞溶解产物使用。由于本发明组合物的医学应用, 优选充分确定一种或多种所使用的酶的纯度和活性。细胞溶解产物 (如果使用的话) 可以从任何具有减少草酸和 / 或其盐的功能的微生物 (例如产甲酸草酸杆菌 (*O. formigenes*)) 制备。

[0032] 本发明的组合物还可以包含可提高酶活性的一种或多种另外的因子。这些另外的因子可以是 (例如) 草酰辅酶 A、 $MgCl_2$ 和 / 或二磷酸硫胺 (活性形式的维生素 B_1)。

[0033] 在具体的实施方案中, 采用了来自三种主要类型的草酸降解酶的一种或多种酶。

[0034] 这三种主要类型的草酸降解酶包括如下酶。第一类酶 (草酸氧化酶), 在高等植物中表达并且催化草酸和 / 或其盐氧依赖性氧化成 CO_2 , 伴随 H_2O_2 形成。该反应形成了目前用于测定尿中草酸和 / 或其盐水平的测定法的基础。已经开发了一种快速的三步纯化法用以从大麦根获得草酸氧化酶。该酶也存在于甜菜的茎和根、苋属植物的叶、高粱和许多其它谷物中。

[0035] 草酸脱羧酶 (EC4. 1. 1. 2) 是第二种类型的草酸和 / 或其盐代谢酶, 主要存在于多种真菌中。这已经有报道并且在多种真菌, 例如疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的某些菌株、白腐真菌、杂色革盖菌 (*Coriolus versicolor*) 和金针菇 (*Collybia velutipes*) 中被表征。这种酶在氧依赖性反应中将草酸和 / 或其盐转化成甲酸盐和二氧化碳。草酸脱羧酶也已经用于血液和尿液的草酸和 / 或其盐的临床测定, 并且可用于降低食物和环境中的草酸和 / 或其盐水平。最近, 第一种细菌的草酸脱羧酶已经被描述为 YvrK 基因的产物, YvrK 基因在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中表达为胞质蛋白。已经将该 YvrK 蛋白 (枯草芽孢杆菌草酸脱羧酶) 在大肠杆菌中表达为功能性重组蛋白质, 纯化至均质并被完全表征。

[0036] 第三种类型是细菌酶 (草酰辅酶 A 脱羧酶), 其作用于辅酶 A- 活化底物上并将其转化成甲酰辅酶 A。甲酰辅酶 A 转移酶随后作用以交换辅酶 A 上的甲酸盐和草酸和 / 或其盐。已经在草酸和 / 或其盐降解细菌 (通常存在于土壤中的草酸假单胞菌 (*Pseudomonas oxalaticus*) 和存在于脊椎动物和人胃肠道中的产甲酸草酸杆菌) 中研究了这些酶。

[0037] 这些酶已经在“The enzymes of oxalate metabolism: Unexpected structures and metabolism”, Svedruzic D. 等, Arch Biochem Biophys. 2005 Jan 1 ; 433 (1) : 176-92 中进行了充分的综述, 将其全文并入本文。酶 (不管是天然的酶、分离的蛋白质还是通过重组技术制

备的那些酶)可以通过重组手段或化学手段修饰并且可以包含侧基或其它悬垂的分子。例如,可以将酶修饰成具有用于连接其它分子或化合物的连接分子。

[0038] 在本发明的具体实施方案中,草酸和/或其盐水平降低是通过使用草酸降解酶实现的,所述酶通过重组手段,例如已转化以表达草酸降解酶的大肠杆菌或其它生物来产生。

[0039] 本发明中相关的重组酶的实例是:

[0040] i) 草酰辅酶 A 脱羧酶,例如具有下列序列之一的草酰辅酶 A 脱羧酶:

[0041] <http://www.expasy.org/uniprot/P40149>

[0042] UniProtKB/TrEMBL 登录号为 P40149

[0043] SEQ. ID 1

[0044] 1 msnddnvelt dgfhvlidal kmndidtnyg vvgipitnla rmwqddgqrf ysfrheqhag

[0045] 61 yaasiagyie gkpgvcltvs apgflngvts lahattncfp millsgsser eivdlqqgdy

[0046] 121 eemdqmvar phckasfrin sikdipigia ravrtavsgp pggvyvdlpa klfgqtisve

[0047] 181 eankllfkpi dpapaqipae daiaraadli knakrpviml gkgaayaqcd deiralveet

[0048] 241 gipflpmgma kgllpdnhpq saaatrafal aqcdvcvlig arlnwlmqhg kgktwgdelk

[0049] 301 kyvqidiqan emdsnqpiiaa pvvgdiksav slrkalkga pkadaewtga lkakvdgnka

[0050] 361 klagkmtaet psgmmnysns lgvvrdfmla npdislvneg analdntrmi vdmkprkrl

[0051] 421 dsgtwgvmgi gmgycvaaaa vtgkpviaave gdsafgfgsm eleticrynl pvtviimng

[0052] 481 giykgnadp qpgvisctrl trgrydmme afggkgyvan tpaelkaale eavasgkpc1

[0053] 541 inamidpdag vesgriksln vsvskvgkk

[0054] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=M77128&doptcmdl=GenBank>

[0055] GenBank 登记号为 M77128

[0056] SEQ ID 2

[0057] 1 gagcaagatg agatgtcctt cctctgtggc aatcaggaat atattgacgg cacgtgtttt

[0058] 61 ccctacttcc ggtgtgccag acatctccaa agatctcatg tggttttgga atccattttt

[0059] 121 gccggtatcc cggctattcc ttacttttcc aaattgggtg taatgcaatg aatctatggt

[0060] 181 ttttaatatg gtatggacaa ttttccggca gtgaaatttt cagatgcatt tcatttgtat

[0061] 241 tcaggcggat ttgtttaaat tgacctgaat caatattgcc ggattgatct aggtcaatga

[0062] 301 agtcaaattg acttatgtca atggtgccaa attgacctag gtcaacggga tttttaaagg

[0063] 361 gtatgcgga tactcggaat tgacgttaaa caacgtttat caaaaccaac caaagaaagg

[0064] 421 tattactcat gagtaacgac gacaatgtag agttgactga tggctttcat gttttgatcg

[0065] 481 atgccctgaa aatgaatgac atcgatacca tgtatggtgt tgcggcatt cctatcacga

[0066] 541 acctggctcg tatgtggcaa gatgacggtc agcgttttta cagcttccgt cacgaacaac

[0067] 601 acgcagggtta tgcagcttct atcgccggtt acatcgaagg aaaacctggc gtttgcttga

[0068] 661 ccgtttccgc ccctggcttc ctgaacggcg tgacttccct ggctcatgca accaccaact

[0069] 721 gcttcccaat gatcctgttg agcggttcca gtgaacgtga aatcgctgat ttgcaacagg

[0070] 781 gcgattacga agaaatggat cagatgaatg ttgcacgtcc acactgcaa gcttctttcc

[0071] 841 gtatcaacag catcaaagac attccaatcg gtatcgctcg tgcagttcgc accgctgtat

[0072] 901 ccggacgtcc aggtggtgtt tacgttgact tgccagcaaa actgttcggt cagaccattt

[0073] 961 ctgtagaaga agctaacaaa ctgctcttca aaccaatcga tccagctccg gcacagattc
[0074] 1021 ctgctgaaga cgctatcgct cgcgctgctg acctgatcaa gaacgccaaa cgtccagtta
[0075] 1081 tcatgctggg taaaggcgct gcatacgac aatgcgacga cgaaatccgc gcactgggtg
[0076] 1141 aagaaaccgg catcccatc ctgccaatgg gtatggctaa aggcctgctg cctgacaacc
[0077] 1201 atccacaate cgctgctgca acccgtgctt tcgactggc acagtgtgac gtttgctac
[0078] 1261 tgatcggcgc tcgtctgaac tggctgatgc agcacggtaa aggcaaaacc tggggcgacg
[0079] 1321 aactgaagaa atacgttcag atcgacatcc aggctaacga aatggacagc aaccagccta
[0080] 1381 tcgctgcacc agttgttggt gacatcaagt ccgccgttcc cctgctccgc aaagcactga
[0081] 1441aaggcgctcc aaaagctgac gctgaatgga cggcgctct gaaagccaaa gttgacggca
[0082] 1501 acaaagccaa actggctggc aagatgactg ccgaaacccc atccggaatg atgaactact
[0083] 1561 ccaattccct gggcggtgtt cgtgacttca tgctggcaaa tccggatatt tccctgggta
[0084] 1621 acgaaggcgc taatgcactc gacaacactc gtatgattgt tgacatgctg aaaccacgca
[0085] 1681 aacgtcttga ctccggtacc tggggtgtta tgggtattgg tatgggctac tgcgttgctg
[0086] 1741 cagctgctgt taccggcaaa ccggttatcg ctgttgagg cgatagcgca ttcggtttct
[0087] 1801 ccggtatgga actggaaacc atctgccgtt acaacctgcc agttaccgtt atcatcatga
[0088] 1861 acaatggtgg tatctataaa ggtaacgaag cagatccaca accaggcggt atctcctgta
[0089] 1921 cccgtctgac ccgtggctgt tacgacatga tgatggaagc atttggcggt aaaggttatg
[0090] 1981 ttgccaatac tccagcagaa ctgaaagctg ctctggaaga agctgttgct tccggcaaac
[0091] 2041 catgcctgat caacgcgatg atcgatccag acgctgggtg cgaatctggc cgtatcaaga
[0092] 2101 gctgaacgt tgtaagtaaa gttggcaaga aataattagc ccaactttga tgaccgggta
[0093] 2161 cgaccggtca cataaagtgt tcgaatgccc ttcaagttta cttgaagggc atttttttac
[0094] 2221 cttgcagttt ataaacagga aaaattgaag tattcagagc ggaagagcag atttaagcca
[0095] 2281 cgagaaacat tcttttttat tgaaaattgc cataaacaca tttttaagc tggctttttt
[0096] ii). 例如具有下列序列的甲酰辅酶 A 转移酶：
[0097] <http://www.expasy.org/uniprot/006644>
[0098] UniProtKB/TrEMBL 登录号为 006644
[0099] SEQ ID 3
[0100] 1 mtkpldginv ldfthvqagp actqmmgflg anvikierg sgdmtgrwlq dkpnvdslyf
[0101] 61 tmfnckrsi eldmktpegk elleqmikka dvmvenfgpg aldrmgftwe yiqelnprvi
[0102] 121 lasvkgayeg hanehlkvy nvaqcsaggaa attgfdgpp tvsgaalgds nsgmhlmigi
[0103] 181 laalemrhkt grgqkvavam qdavlhlvri klrdqqrler tgilaeyppa qpnfafdrdg
[0104] 241 nplsfdnits vprggnagg gqpgwmlkck gwetdadsyv yftiaanmwp qicdmidkpe
[0105] 301 wkddpayntf egrvdklmdi fsfietkfad kdkfevteawa aqygipcgy msmkelahdp
[0106] 361 slqkvgtvve vvdeirgnhl tvgapfkfsg fqpeitrapl lgehtdevlk elglldakik
[0107] 421 elhakqv
[0108] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=U82167&doptcmdl=GenBank>
[0109] GenBank 登记号为 U82167
[0110] SEQ ID 4

[0111] 1 aagcttgctt cattttgaga tgttatgcga agtgtagca acccaagtta gtaccttcag
[0112] 61 ccctttgggc gaagtttttc tttcttgga gttcctttcg gggaacagc cacagagaat
[0113] 121 aaaaacaaa agttgtacca acgacaagga aatgagaaat tatgactaaa ccattagatg
[0114] 181 gaattaatgt gcttgacttt acccacgtcc aggcaggtcc tgcctgtaca cagatgatgg
[0115] 241 gtttcttggg cgcaaacgtc atcaagattg aaagacgtgg ttccggagat atgactcgtg
[0116] 301 gatggctgca ggacaaacca aatgttgatt cctgtatgtt cacgatgttc aactgtaaca
[0117] 361 aacgttcgat tgaactggac atgaaaaccc cggaaggcaa agagcttctg gaacagatga
[0118] 421 tcaagaaagc cgacgtcatg gtcgaaaact tcggaccagg cgcactggac cgtatgggct
[0119] 481 ttacttggga atacattcag gaactgaatc cacgcgtcat tctggcttcc gttaaaggct
[0120] 541 atgcagaagg ccacgccaac gaacacctga aagtttatga aaacgttga cagtgttccg
[0121] 601 gcggtgctgc agctaccacc ggtttctggg atggctctcc aaccgttcc ggcgtgctc
[0122] 661 tgggtgactc caactccggt atgcacctga tgatcggtat tctggccgct ctggaaatgc
[0123] 721 gtcacaaaac cgcccggtg cagaaagttg ccgtcgtat gcaggacgt gttctgaatc
[0124] 781 tgggtcgtat caaactgctg gaccagcaac gtctggaaag aaccggcatt ctggctgaat
[0125] 841 acccacaggc tcagcctaac tttgccttcg acagagacgg taaccactg tccttcgaca
[0126] 901 acatcacttc cgttccacgt ggtgtaacg caggtggcgg cggccagcca ggctggatgc
[0127] 961 tgaaatgtaa aggttgggaa accgatgcgg actcctacgt ttacttcacc atcgtgcaa
[0128] 1021 acatgtggcc acagatctgc gacatgatcg acaagccaga atggaaagac gaccagcct
[0129] 1081 acaacacatt cgaaggtcgt gttgacaagc tgatggacat cttctccttc atcgaaacca
[0130] 1141 agttcgtga caaggacaaa ttcgaagtta ccgaatgggc tgcccagtac ggcattectt
[0131] 1201 gcggtccggt catgtccatg aaagaactgg ctcacgatcc ttccctgcag aaagttggta
[0132] 1261 ccgtcgttga agttgtcgac gaaattcgtg gtaaccacct gaccgttggc gcaccgttca
[0133] 1321 aattctccgg attccagccg gaaattaccc gtgctccgct gttgggcgaa cataccgacg
[0134] 1381 aagttctgaa agaactgggt cttgacgatg ccaagatcaa ggaactgcat gcaaacagg
[0135] 1441 tagtttgatc cgtcagactt tctgggcaaa acggcactct ccggagtgcc gttttttgt
[0136] 1501 cacacgaaac cctaatacaa caagcacgtg caatgattcc acatcattgc ggccacattc
[0137] 1561 atccttcggg tcattactg
[0138] iii) 草酸脱羧酶, 例如具有下列序列的草酸脱羧酶:
[0139] <http://www.expasy.org/uniprot/034714>
[0140] UniProtKB/TrEMBL 登录号为 034714
[0141] SEQ ID 5
[0142] 1 mkkqndipqp irgdkgatvk iprnierdrq npdmlvppet dhgtvsnmkf sfsdthnrle
[0143] 61 kgyarevtv relpisenla svnmrlkpga irelhwhkea ewaymiysa rvtivdekgr
[0144] 121 sfiddvgegd lwyfpglph siqaleegae fllvddgsf senstfqltd wlahtpkevi
[0145] 181 aanfgvtkee isnlpgkey ifenqlpgsl kddivepng evpypftyrl leqepieseg
[0146] 241 gkvyiadstn fkvsktiase lvtvepgamr elhwhpnthe wqyyisgkar mtvfasdgha
[0147] 301 rtfnyqagdv gyvpfamghy venigdeplv fleifkddhy advslnqlwa mlpetfvqah
[0148] 361 ldlgkdftdv lskekhpvkv kksk
[0149] <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/dbfetch?db=emblcds&id=CAA11727>

[0150] CoDing 序列登记号为 AJ223978

[0151] SEQ ID 6

[0152] 1 atgaaaaaac aaaatgacat tccgcagcca attagaggag acaaaggagc aacggtaaaa
[0153] 61 atccccgcga atattgaaag agaccggcaa aaccctgata tgctcgttcc gcctgaaacc
[0154] 121 gatcatggca ccgtcagcaa tatgaagttt tcattctctg atactcataa ccgattagaa
[0155] 181 aaaggcggat atgcccggga agtgacagta cgtgaattgc cgatttcaga aaaccttgca
[0156] 241 tccgtaaata tgcggctgaa gccaggcgcg attcgcgagc ttcactggca taaagaagct
[0157] 301 gaatgggctt atatgattta cggaagtgc aagtcacaa ttgtagatga aaaagggcgc
[0158] 361 agctttattg acgatgtagg tgaaggagac ctttgggtact tcccgtcagg cctgccgcac
[0159] 421 tccatccaag cgctggagga gggagctgag ttctgctcg tgtttgacga tggatcattc
[0160] 481 tctgaaaaca gcacgttcca gctgacagat tggctggccc aactccaaa agaagtcatt
[0161] 541 gctgcgaact tcggcgtgac aaaagaagag atttccaatt tgctggcaa agaaaaatat
[0162] 601 atatttgaac accaacttcc tggcagttta aaagatgata ttgtggaagg gccgaatggc
[0163] 661 gaagtgcctt atccatttac ttaccgcctt cttgaacaag agccgatcga atctgaggga
[0164] 721 ggaaaagtat acattgcaga ttcgacaaac ttcaaagtgt ctaaaacat cgcacagcg
[0165] 781 ctgtaacag tagaaccg cgccatgaga gaactgcact ggcacccgaa taccacgaa
[0166] 841 tggcaatact acatctccg taaagctaga atgaccgtt ttgcatctga cggccatgcc
[0167] 901 agaacgttta attaccaagc cggatgtat ggatgtatg catttgcaat gggtcattac
[0168] 961 gttgaaaaca tcgggatga accgcttgc ttttagaaa tctcaaaga cgaccattat
[0169] 1021 gctgatgtat ctttaaacca atggcttgc atgcttctg aaacatttgt tcaagcgac
[0170] 1081 cttgacttgg gcaaagactt tactgatgtg cttcaaaag aaaagcacc agtagtgaaa
[0171] 1141 aagaaatgca gtaaataa

[0172] 和 / 或

[0173] iv) 例如具有下列序列的草酸氧化酶：

[0174] <http://www.expasy.org/uniprot/024004>

[0175] UniProtKB/TreMBL 登录号为 024004

[0176] SEQ ID 7

[0177] 1 mgysknlgag lftmlllapa imatdpdplq dfcvadldgk avsvnghtck pmseagddfl
[0178] 61 fsskltkagn tstpngsavn eldvaewpgt ntlgvsmnr dfapggtnpp hihprateig
[0179] 121 mvmkgellvg ilgsfdsgnk lysrvvrage tfviprglmh fqfnvgktea ymvvsfnsqn
[0180] 181 pgivfvpltl fgsnppiptp vltkalrvea gvvelkkskf aggs
[0181] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/querf.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=Y14203&doptcmdl=GenBank>

[0182] GenBank 登记号为 Y14203

[0183] SEQ ID 8

[0184] 1 agcttagcag caaccaccag tagtgcctca aaggctcctg atcaacaaac tctagctcat
[0185] 61 cagtggtagc taagcttgct acatagcaag caatgggtta ctctaaaaac ctaggggctg
[0186] 121 gcctgttcac catgctgctc ctgctccg ccatcatggc taccgacct gacctctac
[0187] 181 aggacttctg cgtcgggac ctcgatggca aggcgtctc ggtgaacggg catacgtgta

[0188] 241 agcccatgtc ggaggccggc gacgacttcc tcttctcgtc caagctgacc aaggccggca
[0189] 301 acacgtccac cccgaacggc tcggccgtga cggagctcga cgtggccgag tggcccgta
[0190] 361 cgaacacgct gggcgtgtcc atgaaccgtg tggacttcgc gccgggccc accaaccgc
[0191] 421 cgcacatcca cccgctgca accgagatcg gcatggtgat gaaagtgag ctctcgttg
[0192] 481 gaatcctcgg cagctttgac tccgaaaca agctctactc cagggtggtg cgtgccggag
[0193] 541 agactttcgt catcccgcgc ggcctcatgc atttccagtt caacgttggt aagacggaag
[0194] 601 cctacatggt tgtgtccttc aacagccaga accctggcat cgtcttcgtg ccgtcacac
[0195] 661 tcttcggttc caaccgccc atccccacac cgggtctcac caaggtctt cgggtggagg
[0196] 721 ccggggtcgt ggaacttctc aagtccaagt tcgccggtgg gtcttaactt ccatgagccc
[0197] 781 caaatgatca atatgaatat gtaattctat atatccatgt atgctgcgaa ttaatatga
[0198] 841 ctcgacagga gactatattc aagcttctgg ataagctgc atttcatagt aataagattg
[0199] 901 aataagttat cctagcgggt cagccttcag aaccaatgcg aggacttaaa atgtattgct
[0200] 961 tcttattatt

[0201] 编码草酸降解酶的 DNA 序列是本领域技术人员已知的并且在例如 W098/16632 中有描述,将其全文并入本文。

[0202] 另外,根据本发明的组合物可以包含这样的酶,该酶含有修饰或突变,包括(但不限于)用含有减少草酸和/或其盐的酶的草酸和/或其盐降解活性位点的结构域形成的嵌合体,或肽片段,特别是包含活性位点或者由活性位点组成的那些肽片段;修饰或突变,包括(但不限于)用于增加活性缺失、插入、取代、反转、突变、用非天然氨基酸取代天然存在的氨基酸,或本领域技术人员已知的其它修饰。这类经修饰的酶可以具有比天然酶更大、更小或与之相等的活性,或者可以具有与天然酶或未经修饰的酶相同或不同的特性。本发明考虑的方法和组合物包含减少草酸和/或其盐的酶的整体酶、片段、肽、结合区、活性位点或其它功能区、区段、序列以及启动子序列和控制序列。

[0203] 在一个实例中,草酸脱羧酶进行了修饰。总共,从初始的 yvrk 基因序列(野生型 yvrk)产生了 7 个基因。初始基因来自枯草芽孢杆菌,该基因序列用 GenScript 公司(Piscataway,NJ)的算法进行了优化用于在大肠杆菌中表达。针对密码子使用、平衡 GC 含量、去除重复元件以及确保不含用于克隆的内部限制性位点,对该基因进行了优化。密码子优化的基因产生了具有与野生型 yvrk 相同的氨基酸序列的蛋白质。

[0204] 然后,对野生型 yvrk 基因和优化的 yvrk 基因两者的单个半胱氨酸密码子进行修饰,产生了 6 个另外的独特的基因序列。半胱氨酸密码子被修饰成了丝氨酸、精氨酸或丙氨酸密码子。进行该修饰的目的是为了除去二硫键并修饰酶的二级结构和三级结构。

[0205] 可以用相同的方法使野生型 yvrk 基因的基因序列优化以用于另外的表达系统,例如毕赤酵母属(Pichia)或酵母菌属(Saccharomyces)。而且,在芽孢杆菌表达系统中的表达可以通过优化基因的最佳密码子使用和 GC 含量以及去除重复元件来改良。密码子优化还可用于在不同于已修饰的半胱氨酸密码子的位置处(或者除了半胱氨酸修饰外)修饰蛋白质的二级结构,例如作为提高聚乙二醇化、微球结合或胶囊化的方法,或作为提高在低 pH 时的 pH 稳定性的方法,或作为提高蛋白质的活性的方法。

[0206] SEQ ID 9

[0207] 原始 yvrk 序列,半胱氨酸密码子用粗体标出。

[0208] AAAAAACAAATGACATTCCGCAGCCAATTAGAGGAGACAAAGGAGCAACGGTAAAAATC
[0209] CCGCGCAATATTGAAAGAGACCGGCAAAACCCTGATATGCTCGTTCCGCCTGAAACCGAT
[0210] CATGGCACCGTCAGCAATATGAAGTTTTCATTCTCTGATACTATAACCGATTAGAAAAA
[0211] GGCGGAT ATGCCCGGAAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATTCAGAAAAACCTTGCATCC
[0212] GTAAATATGCGGCTGAAGCCAGGCGCGATTCCGCGAGCTTCACTGGCATAAAGAAGCTGAA
[0213] TGGGCTTATATGATTTACGGAAGTGCAAGAGTCACAATTGTAGATGAAAAAGGGCGCAGC
[0214] TTTATTGACGATGTAGGTGAAGGAGACCTTTGGTACTTCCCGTCAGGCCTGCCGACTCC
[0215] ATCCAAGCGCTGGAGGAGGGAGCTGAGTTCCTGCTCGTGTGACGATGGATCATTCTCT
[0216] GAAAAACAGCACGTTCCAGCTGACAGATTGGCTGGCCCACTCCAAAAGAAGTCATTGCT
[0217] GCGAACTTCGGCGTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCTGGCAAAGAAAAATATATA
[0218] TTTGAAAACCAACTTCCTGGCAGTTTAAAAGATGATATTGTGGAAGGGCCGAATGGCGAA
[0219] GTGCCTTATCCATTTACTTACCGCCTTCTTGAACAAGAGCCGATCGAATCTGAGGGAGGA
[0220] AAAGTATACATTGCAGATTGCACAACTTCAAAGTGTCTAAAACCATCGCATCAGCGCTC
[0221] GTAACAGTAGAACCCGGCGCCATGAGAGAACTGCACTGGCACCCGAATACCCACGAATGG
[0222] CAATACTACATCTCCGGTAAAGCTAGAATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGCCAGA
[0223] ACGTTTAATTACCAAGCCGGTGATGTCGGATATGTACCATTTGCAATGGGTCAATTACGTT
[0224] GAAAAACATCGGGGATGAACCGCTTGCTTTTTAGAAATCTTCAAAGACGACCATTATGCT
[0225] GATGTATCTTTAAACCAATGGCTTGCCATGCTTCCTGAAACATTTGTTCAAGCGCACCTT
[0226] GACTTGGGCAAAGACTTTACTGATGTGCTTTCAAAGAAAAGCACCCAGTAGTAAAAAG
[0227] AAATGCAGTAAA
[0228] 针对大肠杆菌优化了 Yvrk 基因序列,在 5' 末端和 3' 末端具有限制性位点(下划线标出),并且半胱氨酸密码子用粗体标出。
[0229] SEQ ID 10
[0230] CATATGAAAAAACAGAATGACATTCCACAGCCGATTCCGGCGGATAAAGGCGCGACCGTC
[0231] AAAATTTCCTCGCAATATCGAACGCGACCGCCAGAATCCGGATATGCTGGTGCCGCGGAG
[0232] ACGGACCATGGCACGGTGTCTAACATGAAATTCTCTTTTAGCGATACCCACAACCGCCTG
[0233] GAAAAAGGTGGCTACGCGCGGAGGTTACCGTCCGTGAACTGCCAATTAGCGAAAAATCTG
[0234] GCTTCGGTTAACATGCGTCTGAAACCAGGTGCTATCCGTGAGCTGCACTGGCACAAGGAA
[0235] GCGGAATGGGCGTATATGATTTACGGTTCAGCACGTGTTACCATCGTAGACGAGAAAGGT
[0236] CGTAGCTTTATCGATGATGTTGGCGAAGGTGATCTGTGGTATTTCCCATCTGGCCTGCCG
[0237] CATTCGATTACGGCGCTGGAAGAAGGCGCTGAATTTCTGCTGGTGTTCGATGATGGTTCC
[0238] TTTTCTGAAAACAGCACGTTCCAGCTGACGGATTGGCTGGCGCACACGCCGAAAAGAAGTC
[0239] ATTGCGGCCAATTTTGGGGTAACCAAAGAAGAAATTTCCAACCTGCCGGGCAAAGAAAAG
[0240] TATATTTTTGAGAATCAGCTGCCGGGCTCTCTGAAGGACGATATTGTAGAAGGCCCTAAC
[0241] GGTGAGGTGCCGTATCCGTTACCTATCGTCTGCTGGAGCAGGAACCGATTGAAAGCGAA
[0242] GCGGTAAAGTTTATATCGCAGATTCCACTAACTTTAAAGTCTCCAAGACCATTGCCAGC
[0243] GCCCTGGTCACCGTGAACCGGGAGCGATGCGCGAGCTGCACTGGCATCCGAACACGCAC
[0244] GAATGGCAGTATTATATTTCCGGCAAAGCACGCATGACCGTTTTTGCCTCAGATGGACAC
[0245] GCTCGCACGTTTAATTATCAAGCGGGTGATGTTGGCTACGTTCTTTGCCATGGGCCAT

[0246] TATGTAGAAAATATCGGCGATGAACCACTGGTGTCTTCTGGAGATCTTTAAAGATGACCAC

[0247] TATGCCGATGTTTCACTGAATCAGTGGCTGGCCATGCTGCCGAACTTTTGTTTCAGGCG

[0248] CATCTGGACCTGGGTAAAGACTTTACGGATGTGCTGAGCAAAGAAAAACACCCGGTAGTC

[0249] AAGAAGAAATGCAGTAAAGGATCC

[0250] 草酸降解酶通常以足以基本降解通常存在于标准膳食中的所有草酸和 / 或其盐的量存在于本发明的组合物中。取决于对食物的选择, 平均西方饮食可以含有 100 至 300mg 草酸和 / 或其盐 / 天。一般而言, 约 0.2g 含有酶的颗粒 (相当于 1mL 颗粒悬浮液中的 20mg OxDc) 可以在模拟胃液条件下 30 分钟内除去 180mg 草酸和 / 或其盐。

[0251] 有效量包括将减少一部分存在的草酸和 / 或其盐的减少草酸和 / 或其盐的酶活性的活性单位的量, 或与施用组合物之前存在的草酸和 / 或其盐的量比较, 将使个体中的草酸和 / 或其盐量开始减少或者维持减少量的草酸和 / 或其盐的减少草酸和 / 或其盐的酶活性的活性单位的水平。可用于单剂量组合物中的减少草酸和 / 或其盐的酶活性的活性单位的数量范围可以是约 0.0001 单位至约 5,000 单位、约 5 单位至 100 单位、0.05 单位至 50 单位、0.5 单位至 500 单位、约 0.01 单位至约 50 单位、约 0.01 单位至约 5 单位、约 1 单位至约 100 单位、约 25 单位至约 50 单位、约 30 单位至约 100 单位、约 40 单位至约 120 单位、约 60 单位至约 15 单位约 50 单位至约 100 单位、约 100 单位至约 500 单位、约 100 单位至约 300 单位、约 100 单位至约 400 单位、约 100 单位至约 5,000 单位、约 1,000 单位至约 5,000 单位、约 2,500 单位至约 5,000 单位、约 0.001 单位至约 2,000 单位以及其中涵盖的所有范围。一个酶单位是在 37°C 下每分钟降解一微摩尔草酸和 / 或其盐的酶的量。

[0252] 本发明的组合物包含颗粒, 该颗粒含有包埋于第一聚合物材料中的草酸降解酶。在本文的非限制性实施例中, 描述了如何将所述酶包埋于第一聚合物材料中的方法。本领域中的技术人员可找到适用于制备根据本发明的组合物的其它方法。通过将酶掺入第一聚合物材料中, 所述酶得到了某种保护来对抗在 pH 和胃蛋白酶方面与胃液相似的条件。所得的包埋的酶组合物表现为颗粒, 即微米或纳米尺寸的离散单元。因此, 术语“颗粒”、“微粒”和“纳米粒”在本文中用于描述含有包埋于第一聚合物或第一聚合物和第二聚合物中的一种或多种减少草酸和 / 或其盐的酶的组合物。一般而言, 术语“颗粒”作为最广泛的术语使用, 即没有任何具体的粒度或形状属性, 而术语“微粒”是在所得颗粒的平均粒度范围是 1 μm 至 1000 μm 时使用。同样, 术语“纳米粒”是在所得颗粒的平均粒度范围是 1nm 至 1000nm 时在本文中使用。如本文使用的, 单数的术语“酶”指多个拷贝的酶分子, 如通常对蛋白质分子所理解的那样。如本文使用的, 术语“一种或多种酶”表示可存在一种类型的酶, 例如甲酰辅酶 A 转移酶是期望的, 或者多种类型的酶, 例如包含 (例如) 草酰辅酶 A 脱羧酶和甲酰辅酶 A 转移酶; 草酸脱羧酶和草酸氧化酶的组合物, 或者野生型酶和突变型酶的组合物可存在于组合物中。

[0253] 通常, 本发明的组合物颗粒的平均直径是约 50nm 至约 1mm, 例如约 500nm 至约 500 μm 、约 1 μm 至约 500 μm 、约 2 μm 至约 100 μm 、约 4 μm 至约 80 μm 、约 6 μm 至约 60 μm 、约 8 μm 至约 40 μm 、约 10 μm 至约 20 μm 。

[0254] 如本文使用的, 术语“包埋的”旨在表示酶以如下方式与第一聚合物材料混合或接触:

[0255] i) 第一聚合物材料基本包被了酶, 即颗粒可以认为是被第一聚合物材料包围的含

酶的核；该核可以包含所述酶以外的其它物质，例如也是一部分聚合物材料，或者

[0256] ii) 将酶以这样一种方式掺入第一聚合物材料中，该方式使得颗粒表面的主要部分是由第一聚合物材料组成，但是较小部分的酶也可出现在颗粒表面上。一般来说，考虑颗粒的至少 50% 的外表面是由第一聚合物材料组成并且至多约 20 重量% 的存在于颗粒中的酶可以存在于颗粒的外表面上，和 / 或

[0257] iii) 所述酶基本上均匀分布于第一聚合物材料中。

[0258] 因而，在本发明的组合物中，草酸降解酶受到保护而免受（胃）环境损害。此外，本发明的组合物基本上不会将酶释放进（胃）环境中。换言之，在经口施用后，酶在足以能够使胃中的草酸和 / 或其盐降解的时间内保留在组合物中。在组合物中，第一聚合物材料可以作为酶的保护载体起作用并且同时可以允许底物，即草酸和 / 或其盐，扩散进组合物中或者以别的方式运输进组合物中，以使得能原位降解草酸和 / 或其盐。本发明组合物的一个特征是，与未包埋于聚合基质中的酶所观察到的结果相比，该组合物能更长时间维持酶活性（特别是在酸性条件下）。因此，本发明的一个方面包括组合物，该组合物包含颗粒，该颗粒包含一种或多种包埋于第一聚合物材料中的草酸降解酶，其中在 37℃ 下于美国药典模拟胃液中孵育至少 60 分钟时，所述包埋的酶保留的活性是来自同一批次的所述一种或多种未包埋的游离酶的活性的至少两倍，所述美国药典模拟胃液在 pH > 1（如 pH 约 1 至 pH 约 5 的范围，例如 pH 约 2 至 pH 约 5，pH 约 2.5 至 pH 约 4.5，pH 约 2.5 至 pH 约 3.5，例如 pH 约 3）时含有 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶。重要的是，用于根据本发明的组合物和游离酶的测试条件是相同的，例如酶的性质和纯度、酶的起始浓度、测试体积、孵育介质（例如模拟胃液或流体）的组成、温度等都相同。

[0259] 通常，在 37℃ 下于美国药典模拟胃液中孵育至少 30 分钟，至少 45 分钟，至少 60 分钟，至少 75 分钟，至少 90 分钟，至少 105 分钟或至少 120 分钟时，包埋的酶保留的活性是获自同一批次的所述一种或多种未包埋的游离酶的活性的至少三倍，至少四倍或至少五倍，所述美国药典模拟胃液在 pH > 1（例如 pH 的范围是 pH 约 1 至 pH 约 5、pH 约 2 至 pH 约 5、pH 约 2.5 至 pH 约 4.5、pH 约 2.5 至 pH 约 3.5，例如 pH 约 3）时包含 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶。

[0260] 在一个具体的实施方案中，在 37℃ 下于 pH > 1（例如 pH 的范围是 pH 约 1 至 pH 约 5，pH 约 2 至 pH 约 5，pH 约 2.5 至 pH 约 4.5、pH 约 2.5 至 pH 约 3.5，例如 pH 约 3）的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟时，本发明组合物中的一种或多种包埋的草酸降解酶保留的活性是获自同一批次的所述一种或多种未包埋的游离酶的活性的至少两倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。

[0261] 上面提及的模拟胃液（胃流体）在美国药典中描述并且含有胃蛋白酶以及具有特定比例的浓盐酸。1L 体积的美国药典模拟胃液含有 2g NaCl、3.2g 胃蛋白酶和 7mL 浓盐酸。该溶液的 pH 的范围通常是 1.2-1.5，这取决于使用的 HCl 的浓度。在本文的一些实例中，pH 被调节至 2 以上。在采用无任何包衣的微粒时，可以是这种情况。为本发明目的，pH 应该在酸性范围内，即至多约 7，至多为 6 并且 pH 范围应该通常是约 1 至约 5，约 2 至约 5。在本文的实验部分是有关上述测试和酶活性测定的更多细节。

[0262] 在人胃中的滞留时间平均是约 120 分钟。期望本发明组合物的酶活性在 120 分钟或更长的时间内保持在足够的水平、有效的水平上。从本文的实施例发现，根据本发明的组

合物在暴露于酸性环境中 120 分钟后,有可能保留至少 50% 的酶活性。如果所使用的酶未包埋于聚合物中(如未包埋的酶),则在酸性环境中活性下降非常迅速,并且 60 分钟后活性丧失。

[0263] 通常,当在含水缓冲溶液中孵育约 60 分钟,约 90 分钟,约 105 分钟或约 120 分钟,并且初始活性被设置为 100% 时,根据本发明的组合物中的一种或多种草酸降解酶的活性至多降低至约 30%,至多降低至 40% 例如至多降低至约 50%,至多降低至约 60% 或至多降低至约 70%,所述的含水缓冲液的 pH 的范围是约 1.0 至约 5,约 1.0 至约 4.5,约 1.5 至约 4.5,约 2.0 至约 4.0 或约 2.2 至约 4.0。

[0264] 在特定的实施方案中,当在约 2.0 至约 4.0 的 pH 下试验 60 分钟时,本发明组合物中的草酸降解酶的活性至多降低至 80%,初始活性被设置为 100%。

[0265] 在另外的具体实施方案中,当在 pH 范围为约 2 至约 4.5 的含水缓冲溶液中孵育 2 小时,并且初始活性被设置为 100% 时,本发明组合物中的一种或多种草酸降解酶的活性至多降低至约 20%。值得注意的是,活性至多降低至 30%,并且初始活性被设置为 100%。

[0266] 用于提供具有特定 pH 的缓冲液的合适缓冲物质是本领域技术人员已知的。实例是甘氨酸缓冲液 (pH2-3)、醋酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液等。缓冲液可以包含另外的成分,例如无机盐以便调节该缓冲液的离子强度,或者可包含一种或多种蛋白酶(如胃蛋白酶)以便确保缓冲液中的条件能测试出是否包埋的酶可以经受住这样苛刻的条件。如果包含一种或多种蛋白酶,则它的浓度通常与美国药典模拟胃液中使用的水平相同。

[0267] 如本文先前提及的,草酸降解酶可以具有多种类别、类型、特征和性质。在一个优选的方面,本发明的组合物包含一种或多种草酸降解酶,所述酶包括草酸脱羧酶、草酸氧化酶或草酰辅酶 A 脱羧酶和甲酰辅酶 A 转移酶的组合,或者它们的组合。

[0268] 用作本发明组合物中的第一聚合物材料的合适的聚合物材料包括(但不限于)人造聚合物或天然聚合物,包括(但不限于):i) 多糖:alginate(藻酸盐)包括藻酸、藻酸盐或酯(例如藻酸钠、藻酸钾、藻酸铵、藻酸钙、丙-1,2-二醇藻酸酯)、阿拉伯胶、角叉菜胶、壳聚糖及其衍生物、硫酸软骨素、葡聚糖衍生物、肝素、透明质酸、菊粉、纤维素或纤维素衍生物(包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基甲基纤维素等)等等,或其它它们的组合;ii) 粘多糖;iii) 树胶,包括豆角胶、瓜尔胶、黄芪胶、琼脂、阿拉伯胶、黄原胶、刺梧桐树胶、他拉胶、胶凝糖胶等或其组合;iv) 胶凝剂或溶胀剂,包括水胶体和水胶凝剂例如琼脂、角叉菜胶、明胶、聚乙烯吡咯烷酮等或其组合;v) 其它材料,例如蛋白质和聚酰胺:胶原蛋白、白蛋白、精蛋白、精胺;合成聚合物:聚(丙烯酸)、多聚氨基酸(多聚赖氨酸等)、聚磷酸、三聚磷酸盐、聚(L-乳酸)、聚(乙烯醇)、聚(DL-乳酸共乙醇酸)或它们的混合物和组合。

[0269] 在具体的实施方案中,第一聚合物材料是壳聚糖、藻酸盐、果胶或透明质酸。在更具体的实施方案中,第一聚合物材料是壳聚糖或藻酸盐。

[0270] 其它聚合物材料可以是生物聚合物或合成聚合物。生物聚合物的实例包括(但不限于)蛋白质、多糖、粘多糖、肝素、硫酸肝素、类肝素、硫酸皮肤素、戊聚糖聚硫酸酯、硫酸软骨素、纤维素、琼脂糖、甲壳质、角叉菜胶、亚油酸,以及尿囊素、交联胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白、交联弹性蛋白、胶原、明胶、透明质酸、壳聚糖藻酸盐、葡聚糖、甲基纤维素、多聚赖氨酸和天然橡胶。在形成聚合基质的本发明组合物中,这些基质是多孔的,这样

小的水溶性分子可以进出该聚合基质,所述分子包括(但不限于)例如草酸和/或其盐、甲酸、甲酸盐、二氧化碳、氧或草酰辅酶A。在本发明组合中第一聚合物材料的浓度范围通常是总干物质的20%至70%。

[0271] 除了一种或多种酶和第一聚合物材料之外,颗粒也可以包含一种或多种添加剂,例如pH调节剂、缓冲剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂、酶的辅因子或一种或多种可药用赋形剂,例如填充剂、稀释剂、载体等。

[0272] 此外,当生理条件导致pH大大高于合理的酶工作范围时,在蛋白质周围产生局部的酸性pH环境是有利的。例如,在较高pH的区域,在pH3具有最大活性的草酸和/或其盐降解蛋白质将受益于能够将酶附近的局部pH降低至约3的递送载体。

[0273] 一种用于降低局部pH的方法是掺入可在生理条件下经历水解降解而产生降低局部pH的酸性产物的聚合物。例如, α 聚酯(例如PLA、PGA和PLGA)通过体内水解生物降解形成有机酸(乳酸和乙醇酸),所述有机酸可以将pH局部降低至酶在功能上合乎需要的范围内。聚(dl-丙交酯)(DLPLA)是表现出乳酸的两种同分异构形式的随机分布的无定形聚合物,其能迅速降解。

[0274] 另外,期望递送载体中包含碱形式、含有碱或产生碱的物质形式的缓冲液,所述缓冲液与体内的pH或局部pH或两者的组合共同作用以优化/控制酶周围的局部pH。这些缓冲液可包含有机化合物或无机化合物的盐或许多其它缓冲液。应该理解,与缓冲物质相关/产生缓冲物质的共轭酸的pKa可用于适当地选择缓冲物质。

[0275] 可以使颗粒接受交联程序。这种交联程序可以加强颗粒的性质,例如用于避免在存储过程中或在经口施用后由环境中的pH或胃蛋白酶的负面影响引起的酶活性丧失,或者用于减少酶从颗粒中释放,或用以减少或防止酶迁移至颗粒表面。本文描述了交联程序和在该程序中使用的合适材料。

[0276] 本发明的颗粒可以由通过物理或化学交联而发生交联的聚合物构建。物理交联可以包括带相反电荷的聚合物通过盐键彼此交联(例如,带正电荷的壳聚糖与作为带负电荷聚合物的三聚磷酸盐或肝素交联)、带电荷的聚合物与带相反电荷的离子交联(例如:藻酸盐与 Ca^{2+} 交联、羧甲基纤维素与 Al^{3+} 交联)。在本发明中使用的术语“物理交联”还包括非共价结合和/或相互作用。

[0277] 化学交联通常包括通过具有两个活性官能团的交联剂进行的交联,例如通过具有胺基团的聚合物进行的交联,例如蛋白质、聚酰胺、壳聚糖及其衍生物进行的交联,可以通过戊二醛或京尼平交联。可以使用UV辐射来诱导具有光敏基团的聚合物形成共价交联。

[0278] 用于制备纳米粒和微粒的方法是本领域已知的并且包括乳化法、凝聚/沉淀法、喷雾干燥技术等。纳米粒或微粒的性质(例如:微环境缓冲能力、机械强度、粒度、草酸和/或其盐扩散速率、与酶相互作用)很大程度上取决于所选择的聚合物、聚合物组分和比率、交联方法和制备工艺。可以将多于一种类型的交联应用于本发明的微粒(例如化学交联以及物理交联,参见本文的实施例)。

[0279] 在一个具体的实施方案中,第一聚合物材料自身交联和/或与一种或多种包埋于第一聚合物材料中的酶交联。

[0280] 在本发明的组合中,例如其中第一聚合物材料自身交联和/或与包埋在其中的酶交联的组合中,在37°C下在84mM HCl和3.2mg/ml胃蛋白酶,pH>1(例如范围是pH约

1 至 pH 约 5、pH 约 2 至 pH 约 5、pH 约 2.5 至 pH 约 4.5、pH 约 2.5 至 pH 约 3.5 如 pH 约 3) 中孵育至少 30 分钟、至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时,与包埋在聚合物(但该聚合物未交联或者酶和聚合物未交联)中的同一批次酶的组合物比较或者与同一批次的游离酶比较,保留的酶活性水平增加了至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。

[0281] 也可以为颗粒,任选其中至少一部分第一聚合物材料交联了的颗粒提供包衣。这样一种包衣通常具有与第一聚合物相同的功能,即用于避免包埋于第一聚合物中的酶的酶活性在存储过程中和/或在经口施用后大量减降。

[0282] 因此,在一个具体的实施方案中,将颗粒用第二聚合物材料包被。合适的包衣材料是这类材料,该材料允许含有草酸和/或其盐的含水组合物扩散进入(或以别的方式进入)本发明颗粒中的材料。如上面提及的,底物(即含草酸和/或其盐的介质)进入本发明的颗粒组合物中,使得可以发生草酸和/或其盐的酶促降解。因而,可以采用产生扩散包衣或其它可渗透包衣(例如,含有基本上是水溶性的成孔物质的包衣)的包衣材料。

[0283] 合适的包衣材料的实例包括(但不限于)考虑作为第一聚合物材料的材料。可以选择不同于用作第一聚合物材料的包衣材料,但是第一聚合物材料和包衣材料也可以是相同的。包衣材料的具体实例是成膜剂例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、聚葡萄糖、麦芽糖糊精或其它多糖(包括壳聚糖、藻酸盐和透明质酸)。在一个具体的实施方案中,包衣材料(如果存在的话)是可以接受交联的包衣材料,例如壳聚糖和藻酸盐。

[0284] 在一个具体的实施方案中,第一聚合物材料和/或第二聚合物材料是多糖,例如壳聚糖、藻酸盐、果胶或透明质酸。第一聚合物材料和第二聚合物材料可以相同或不同。

[0285] 通常,第一聚合物材料和第二聚合物材料(如果存在的话)的聚合物百分比是总干颗粒材料的约 10%至约 80%,约 60%至约 80%。

[0286] 如果存在的话,包衣材料通常以这样的量应用,该量使颗粒的重量增加至多约 40%。如在本文实施例中所观察到的,颗粒组合物中的包衣材料的浓度通常至多为 25% w/w,例如至多约 20% w/w,至多约 15% w/w 或至多约 10%。具有包衣的颗粒在本文中称作被包被的组合物。

[0287] 在本发明的组合物中,例如在本发明被包被的组合物中,在 37°C 下于 pH>1(例如范围是 pH 约 1 至 pH 约 5,pH 约 2 至 pH 约 5,pH 约 2.5 至 pH 约 4.5,pH 约 2.5 至 pH 约 3.5,例如 pH 约 3 的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时,与包埋于无包衣的颗粒中的同一批次酶的组合物比较,或者与同一批次的游离酶比较,保留的酶活性水平增加了至少 2 倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。

[0288] 如上提及且如本文实施例中显示的,本发明组合物中草酸降解酶的酶活性的稳定性可以通过采用带包被的颗粒来提高,其中包衣已经接受了交联。聚合物材料的交联是本领域所熟知的,并且可以通过物理交联或者通过利用化学交联剂来完成。

[0289] 用于本发明的合适的化学交联剂包括(但不限于)二醛、1-乙基-3-[3-二甲氨基

基丙基] 碳二亚胺 (EDC)、辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS) 或 (N-[对马来酰亚氨基苯基] 异氰酸酯 (PMPI)。在一个具体的实施方案中, 交联剂是二醛, 特别是戊二醛或乙二醛。在一个实施方案中, 交联剂是戊二醛。交联通常是在 37°C 下于 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 中的 1-5% 戊二醛中摇动进行 1-2 小时。

[0290] 如上提及的, 本发明组合物的一个特征是, 第一聚合物材料和第二聚合物材料 (如果存在的话) 是小分子可渗透的, 以允许由一种或多种酶催化的反应的底物和产物扩散通过所述聚合物材料。此外, 在 37°C, 在 pH>1, 例如范围是 pH 约 1 至 pH 约 5、pH 约 2 至 pH 约 5、pH 约 2.5 至 pH 约 4.5、pH 约 2.5 至 pH 约 3.5 如 pH 约 3 的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时, 第一聚合物材料和 / 或第二聚合物材料能基本上保持完整。

[0291] 在另一个实施方案中, 第一聚合物材料和 / 或第二聚合物材料自身交联和 / 或互相交联和 / 或与一种或多种酶交联。

[0292] 在本发明的组合物中, 例如在本发明的被包被或被包被且交联了的包衣组合物中, 在 37°C 下于 pH>1 例如范围是 pH 约 1 至 pH 约 5, pH 约 2 至 pH 约 5, pH 约 2.5 至 pH 约 4.5, pH 约 2.5 至 pH 约 3.5, 例如 pH 约 3 的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时, 与包埋于颗粒中 (但其中颗粒没有第二层聚合物材料 (包衣) 或没有交联的第二层) 的同一批次酶的组合物比较, 或者与同一批次的游离酶比较, 保留的酶活性水平增加了至少 2 倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。

[0293] 如在本文实施例中所观察到的, 其中化学交联剂和一种或多种酶和 / 或第一聚合物材料和 / 或第二聚合物材料之间的键已经由还原剂还原的本发明组合物可导致在保留组合物的酶活性方面的进一步改善。这样的还原剂可以是本领域中熟知的还原剂, 例如诸如 NaBH_4 或 NaCNBH_3 之类的还原剂。

[0294] 在本发明的组合物中, 特别是在被包被的、具有交联包衣和还原了交联物的本发明的组合物中 (其中第一聚合物材料和 / 或第二聚合物材料可以被交联并且这种交联的物质可以或可以不被还原), 在 37°C 下于 pH>1 例如范围是 pH 约 1 至 pH 约 5, pH 约 2 至 pH 约 5, pH 约 2.5 至 pH 约 4.5, pH 约 2.5 至 pH 约 3.5, 例如 pH 约 3 的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时, 与尚未经受还原剂的颗粒中的同一批次酶的组合物比较, 或者与同一批次的游离酶比较, 保留的酶活性水平增加了至少 2 倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。

[0295] 在本发明的一个具体的实施方案中, 在 37°C 下于 pH>1 例如范围是 pH 约 1 至 pH 约 5, pH 约 2 至 pH 约 5, pH 约 2.5 至 pH 约 4.5, pH 约 2.5 至 pH 约 3.5, 例如 pH 约 3 的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时, 一种或多种包埋的酶保留的活性是获自同一批次酶的所述一种或多种未包埋的游离酶的活性的至少 2 倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。

[0296] 在本发明的另一个具体的实施方案中,在 37°C 下于 pH>1 例如范围是 pH 约 1 至 pH 约 5, pH 约 2 至 pH 约 5, pH 约 2.5 至 pH 约 4.5, pH 约 2.5 至 pH 约 3.5, 例如 pH 约 3 的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时,一种或多种包埋的酶保留的活性是该包埋的酶的初始活性的至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%。

[0297] 在本发明的另外的具体的实施方案中,在 37°C,在 pH>1,例如范围是 pH 约 1 至 pH 约 5、pH 约 2 至 pH 约 5、pH 约 2.5 至 pH 约 4.5、pH 约 2.5 至 pH 约 3.5 如 pH 约 3 的 84mM HCl 和 3.2mg/ml 胃蛋白酶中孵育至少 60 分钟、至少 80 分钟、至少 100 分钟、至少 120 分钟、至少 140 分钟、至少 160 分钟、至少 180 分钟、至少 200 分钟、至少 220 分钟或至少 240 分钟时,所述一种或多种酶保留的活性是该包埋的酶的初始活性的约 95% 至约 100%。

[0298] 包埋于本发明颗粒中的酶能够降低食物的草酸和 / 或其盐含量。如在本文的实施例中证实的,含有 20 毫克所述一种或多种草酸降解酶的本发明组合物在 pH = 2.5 时在 1 小时内降解 200 克菠菜中存在的草酸和 / 或其盐的至少 40%,例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 95% 或至少 99%。

[0299] 本发明的组合物可以通过采用多种聚合物材料制备。在本文的实施例中使用了下列符号:

[0300] OxDc XX 纳米粒 (例如壳聚糖纳米粒) 表示其中将壳聚糖用作包埋了 OxDc 的第一聚合物材料的纳米粒。

[0301] YY 包被的 OxDc XX 微粒 (例如藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖纳米粒) 表示这样一种纳米粒:在所述纳米粒中,将壳聚糖用作包埋了 OxDc 的第一聚合物材料并且将该纳米粒用藻酸盐包被。

[0302] ZZ 交联的 YY 包被的 OxDc XX 微粒 (例如戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖微粒) 表示这样一种微粒,在所述微粒中,将壳聚糖用作包埋了 OxDc 的第一聚合物材料并且将纳米粒用藻酸盐包被以形成微粒,并且随后将该微粒与戊二醛交联。

[0303] 还原的 ZZ 交联的 YY 包被的 OxDc XX 微粒 (例如还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖微粒) 表示这样一种微粒,在所述微粒中,将壳聚糖用作包埋了 OxDc 的第一聚合物材料并且将形成的纳米粒用藻酸盐包被而形成微粒,然后将该微粒与戊二醛交联并让其接受到还原。

[0304] 因此,OxDc 壳聚糖 /TPP 纳米粒是由壳聚糖制成的纳米粒,所述壳聚糖包含 TPP 并且在其中包埋了 OxDc。

[0305] 藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒是基于由壳聚糖和 TPP 及包埋的 OxDc 形成的纳米粒的微粒,该纳米粒用藻酸盐包被而形成微粒。

[0306] 戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒对应于上面提及的微粒,但是该微粒已经接受了戊二醛处理而建立交联。

[0307] 还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒对应于进一步接受了还原处理的上面提及的微粒。

[0308] 本发明的组合物适用于经口施用给受试者。将组合物作为口服药物制剂提供,其可以在摄入食物前或在摄入食物后立即,以缓释液体剂、口或胃中的快速释放片剂 (涂覆

在食道上的)、伴随食物的液体或固体形式递送至口腔、口(颊贴剂)、胃(附在胃粘膜上)。

[0309] 施用的组合物通常是固体形式,如以颗粒形式或以固体剂型,例如小药袋剂、胶囊剂或片剂形式(例如将颗粒剂可通过本领域技术人员熟知的方法进一步加工成合适的剂型)。为此,可以加入合适的可药用赋形剂,例如填充剂、粘合剂、崩解剂、着色剂、调味剂、pH 调节剂、稳定剂等。而且,可以加入一种或多种其它治疗和/或预防性物质和/或其它酶、辅因子、底物、辅酶、矿物质和有助于减少草酸和/或其盐的其它物质。

[0310] 合适的可药用赋形剂的实例包括:糊精、麦芽糖糊精、右旋糖、果糖、葡萄糖、乳糖、纤维素衍生物(包括羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、微晶纤维素(例如多种等级的 **Avicel**[®]))、淀粉或改性淀粉(例如马铃薯淀粉、玉米淀粉、米淀粉、预胶化淀粉)、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸钠、交联羧甲基纤维素钠、磷酸氢钙、磷酸钙(例如碱性磷酸钙、磷酸氢钙)、硫酸钙、羧烷基纤维素、葡萄糖结合剂、磷酸氢钙、明胶、阿拉伯胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙二醇、聚氧化乙烯、以及润滑剂:滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、氢化植物油等。

[0311] 本发明的方法包括通过施用有效量的减少草酸和/或其盐的组合物来治疗或预防人和动物中的草酸和/或其盐相关疾病,所述组合物包含本文教导的颗粒组合物中的一种或多种减少草酸和/或其盐的微生物、一种或多种减少草酸和/或其盐的酶或它们的组合和混合物。方法包括提供含有本文教导的包埋了酶的颗粒的组合物给受试者、人或动物,并减少存在于受试者中的草酸和/或其盐,治疗或预防草酸和/或其盐相关疾病和/或减少一部分摄入的草酸和/或其盐。用于减少人或动物中的草酸和/或其盐的方法包括施用有效量的组合物给受试者、人或动物,并减少存在的草酸和/或其盐,所述组合物包含本发明包埋了酶的颗粒组合物中具有草酸和/或其盐减少活性的一种或多种减少草酸和/或其盐的酶或片段。减少可以在受试者的任何组织或体液环境中发生。体液包括身体的分泌物如鼻分泌物或胃分泌物、唾液、血液、血清、尿液、食糜或消化物、组织液和人或动物产生的其它流体或半固体物质。例如,可以将包埋了酶的颗粒组合物经口施用给人或动物并且减少草酸和/或其盐的酶活性可减少人或动物胃中存在的草酸和/或其盐。可以将本发明的包埋了酶的颗粒组合物混合进液体、食物或其它膳食材料中并将其提供给人或动物,使得颗粒的减少草酸和/或其盐的酶活性在胃环境中是有效的。本发明的包埋了酶的颗粒组合物也可以与其中发现有草酸和/或其盐的食品或其它物质混合,并且该颗粒的减少草酸和/或其盐的酶活性减少了存在于该食品或其它物质中的草酸和/或其盐。

[0312] 用于治疗 and 预防草酸和/或其盐相关疾病的方法包括施用包含颗粒的组合物,该颗粒包含有效量的减少草酸和/或其盐的酶。有效量包括将减少一部分存在的草酸和/或其盐的减少草酸和/或其盐的酶活性的活性单位的量,或与施用组合物之前存在的草酸和/或其盐的量比较,将使个体中的草酸和/或其盐量开始减少或者维持降低量的草酸和/或其盐的减少草酸和/或其盐的酶活性的活性单位的水平。可以在单剂量组合物中使用的减少草酸和/或其盐的酶活性的活性单位的数量的范围可以是约 0.0001 单位至约 5,000 单位、约 5 单位至 100 单位、0.05 单位至 50 单位、0.5 单位至 500 单位、约 0.01 单位至约 50 单位、约 0.01 单位至约 5 单位、约 1 单位至约 100 单位、约 25 单位至约 50 单位、约 30 单位至约 100 单位、约 40 单位至约 120 单位、约 60 单位至约 150 单位至约 100 单位、约 100 单位至约 500 单位、约 100 单位至约 300 单位、约 100 单位至约 400 单位、约 100 单位至约

5,000 单位、约 1,000 单位至约 5,000 单位、约 2,500 单位至约 5,000 单位、约 0.001 单位至约 2,000 单位以及其中涵盖的所有范围。组合物可以另外包含其它酶、辅因子、底物、辅酶、矿物质和有助于减少草酸和 / 或其盐的其它物质。一个酶单位是将在 37℃ 下每分钟降解一微摩尔草酸和 / 或其盐的酶的量。

[0313] 在治疗方法中,将有效量的如本文教导的颗粒组合物经口施用给受试者,让受试者每天摄入至少 1 次,每天至少 2 次,每天至少 3 次,每天至少 4 或更多次(如果需要的话),并且这样的施用可以进行 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天或 1 周、2 周、3 周或 1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月、超过 6 个月、1 年、2 年或多年或者在患者的一生中持续施用。可以持续这样的治疗来在受试者中维持想要的草酸和 / 或其盐水平。

[0314] 必需注意的是,如在本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“a, 一个”、“一种, an”和“该, the”包括复数指代,除非上下文另外清楚明确地指明。

[0315] 本文所包括的所有专利、专利申请和参考文献特别以引用的方式全文并入本文。

[0316] 当然,应该理解的是,上述内容只涉及本发明的示例性实施方案并且在这里可以进行多种修改或改变而不会背离如在本公开内容中所阐明的本发明的精神和范围。

附图说明

[0317] 图 1 是显示在具有胃蛋白酶 pH3 下微粒 I(在 pH3.9 制备)和微粒 II(在 pH8 制备)中 OxDc 的稳定性的图。

[0318] 图 2 是显示在具有胃蛋白酶 pH3 时,用于形成藻酸盐微粒的藻酸盐浓度对壳聚糖包被的 OxDc 藻酸盐微粒中 OxDc 稳定性的影响的图。

[0319] 图 3 是显示根据本文实施例 2 制备的颗粒的粒度分布的图。图 3. 体积统计 (Arithmetic) 17795s3_07_01. \$1s, 从 0.040 μm 至 2000 μm 进行计算。体积: 100%; 平均值: 48.53 μm ; 中值: 29.10 μm ; 平均值 / 中值比率: 1.668; 众数: 28.70 μm ; S. D.: 65.43 μm ; CV: 135%; 偏度: 4.384 右偏斜; 峰度: 26.90; 尖顶峰度: d_{10} 8.814 μm ; d_{50} 29.10 μm ; d_{90} 109.9 μm 。

[0320] 图 4 是显示在具有胃蛋白酶 pH3 时,用藻酸盐或角叉菜胶包被对壳聚糖 /TPP 纳米粒中 OxDc 稳定性的影响的图。

[0321] 图 5 是显示在具有胃蛋白酶 pH2.4 的情况下时,用于交联的戊二醛浓度对戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒中 OxDc 稳定性的影响的图。

[0322] 图 6 是显示在 pH2.2 和 pH1.85 下,两种交联并还原的微粒中 OxDc 的稳定性的图。

[0323] 图 7 是显示在施用本发明组合物后草酸和 / 或其盐(可溶性部分)的生物利用度的图。

[0324] 图 8 是说明在三种不同的模拟条件下,微粒除去的菠菜中总可溶性草酸和 / 或其盐的时间过程的图。

[0325] 图 9 是显示在 pH2.4 并存在胃蛋白酶时,在壳聚糖微粒中用戊二醛(1-5%)交联的影响的图。

[0326] 图 10 是说明在不同的 pH 下并存在胃蛋白酶时,戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TTP 微粒中的希夫碱的还原的图。

[0327] 图 11A 和图 11B 是显示在 pH3 时,由还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚

糖 / TPP 微粒除去的草酸和 / 或其盐的图。

[0328] 图 12A 是显示在施用本发明组合物后草酸和 / 或其盐（可溶性部分）的生物利用度的图；图 12B 是说明除去的总草酸和 / 或其盐的百分比的图。

具体实施方式

[0329] 尽管在这里提供了本发明的示例性实施方案，但是本发明不受限于这些实施方案。存在本领域技术人员理解的许多修饰或改变。

[0330] 通过本文包含的实施例来进一步说明本发明，提供所述实施例以便理解清楚。示例性的实施方案不应该以任何方式解释为限定它们的范围。相反，应该清楚地了解，可以采用其它实施方案、修改形式和其等价方案，在阅读了这里的说明书后，本领域技术人员将理解它们而不会背离本发明的精神和 / 或所附权利要求书的范围。

[0331] 实施例

[0332] 方法

[0333] 酶活性测定法

[0334] 将样品用 Tris 缓冲液适当地稀释（通常 5 或 10 倍稀释）至 0.5-1mg/ml，将 10 μ L 该溶液等分放入 1.5mL 的埃彭道夫管中。将 390 μ L 温的底物缓冲液（通常为 20mM 柠檬酸盐缓冲液，pH4 中的 20mM 草酸和 / 或其盐）加至每支管中，并立即将管置于恒温混匀器上整 10 分钟，在达到 10 分钟时加入 100 μ L 0.5M H_2SO_4 。通过 HPLC 直接测量产生的总甲酸盐。用离子交换柱（Aminex HPX-87H, BioRad）和 20mM H_2SO_4 的等度梯度，在 210nm 处通过 UV 检测甲酸盐，通常在 14.3 分钟时出现洗脱峰。

[0335] 稳定性试验

[0336] 在 pH 约 2 至约 3 的缓冲液中孵育

[0337] 在将 OxDc 游离酶或所考虑的含包埋于聚合物材料中的 OxDc 酶的组合物在 pH 范围为 2 至 3 的 100mM 甘氨酸缓冲液中孵育一段时间后，分析剩余的 OxDc 活性。

[0338] 在模拟胃液中孵育

[0339] 将含有约 2mg OxDc 至约 20mg OxDc 的颗粒组合物置于含有 100mL 模拟胃液的容器中，该模拟胃液根据美国药典制备，即通过溶解 2g NaCl、3.2g 胃蛋白酶和 7mL 浓盐酸至终体积 1L 而制备。以合适的时间间隔，吸出样品并如上所述的测定 OxDc 活性。

[0340] 在缓冲液中孵育

[0341] 与上面描述的程序（用于模拟胃液的程序）相同。但是，采用了不同的缓冲液，这取决于目标 pH 值。合适的缓冲液包括甘氨酸缓冲液（pH2-3）、醋酸盐缓冲液（pH3-6）、磷酸盐缓冲液（pH5-8）、硼酸盐缓冲液（pH8-9）等。可以将蛋白酶（例如胃蛋白酶）以通常与美国药典模拟胃液中发现的浓度相当的浓度加入。

[0342] 实施例 1

[0343] OxDc 藻酸盐微粒的制备以及各种工艺参数对稳定性的影响

[0344] 该实施例阐明了 OxDc 藻酸盐微粒的制备和稳定性，而且还阐明了各种工艺参数对包埋于微粒中的 OxDc 的稳定性的影响。

[0345] OxDc 藻酸盐微粒的制备

[0346] 微粒 I- 乳化 1：

[0347] 将 11ml 在 50mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH3.9) 中的藻酸盐 (1.8%, w/v) 和 OxDc (10:1v/v; OxDc, 20mg/ml, 于 10mM TrisHCl, pH3.9 中) 的混合物与 20ml 含 0.5% triton x-100 的矿物油在 600rpm 下通过磁力搅拌混合 10 分钟以达到稳定的乳化状态, 然后加入 4ml CaCl_2 矿物油乳剂 (2ml 0.2M CaCl_2 + 2ml 矿物油) 并继续搅拌 30 分钟。然后加入 8ml 壳聚糖矿物油乳剂 (4ml 0.8% 壳聚糖和 4ml 矿物油) 并另外搅拌 30 分钟。通过离心收集微粒。在下文中, 这些微粒被称为微粒 I。

[0348] 微粒 II- 乳化 2:

[0349] 全部与“乳化 1”相同, 除了藻酸盐和 OxDc 的混合物是在 10mM 的 TrisHCl 缓冲液, pH8 中。在下文中, 这些微粒称为微粒 II。

[0350] 壳聚糖包被的 OxDc 藻酸盐微粒 - 不同浓度的藻酸盐凝胶化 (乳化) 和用壳聚糖进一步包被微粒:

[0351] 将 8ml 藻酸盐 (1.2% 或 3%; w/v) 与 50mM TrisHCl 缓冲液, pH9 中的 0.5ml OxDc (16mg/ml) 混合, 然后将其与 15ml 含 0.8% tritonx-100 的矿物油在 600rpm 下通过磁力搅拌混合 10 分钟以达到稳定的乳化状态, 然后加入 8ml CaCl_2 矿物油乳剂 (4ml 1M CaCl_2 + 4ml 矿物油) 并继续搅拌 30 分钟, 随后在搅拌下加入 50ml 的 1M CaCl_2 。通过离心收集微粒并用水洗涤两次。将所有微粒 (约 4ml) 合并到 36ml 0.4% 壳聚糖 (pH5.45) 和 4ml 14M CaCl_2 的混合物中并在 200rpm 下摇动 1 小时。在下文中, 这些微粒称为壳聚糖包被的 OxDc 藻酸盐微粒。

[0352] 在该实施例中获得的所有微粒的粒度分布的范围估计为约 1-100 μm 。

[0353] 如上描述测定所得微粒的酶活性。总的酶活性是在将酶包埋于聚合基质之前所述酶的酶活性, 并且将该量设置为 100%。得到了下列结果:

[0354] 在 pH3.9 制备的微粒 (微粒 I) 和在 pH8 制备的微粒 (微粒 II) 分别发现总酶活性的约 40% 和 48%。在 pH3 用 3.2mg/ml 的胃蛋白酶检测这两种微粒的稳定性。在用 1.2% 的藻酸盐和 3% 的藻酸盐制备的壳聚糖包被的 OxDc 藻酸盐微粒中分别发现总酶活性的约 42% 和 60%。在 pH3 用 3.2mg/ml 的胃蛋白酶检测这两种壳聚糖包被的 OxDc 藻酸盐微粒的稳定性 (图 2)。

[0355] 图 1 是在 pH3 下用胃蛋白酶测得的微粒 I (在 pH3.9 制备) 和微粒 II (在 pH8 制备) 中的 OxDc 稳定性的图。正方形是微粒 I, 三角形是微粒 II。图 2 是显示在 pH3 用胃蛋白酶测得的用于形成藻酸盐微粒的藻酸盐浓度对壳聚糖包被的 OxDc 藻酸盐微粒中的 OxDc 稳定性的影响的图。正方形是用 3% 藻酸盐形成的微粒, 实心圆是用 1.2% 藻酸盐形成的微粒。

[0356] 因此, 在制备微粒过程中存在的 pH 似乎影响了孵育过程中 OxDc 的稳定性, 即 pH 的增加促使更稳定, 并且藻酸盐浓度的增加似乎也对稳定性具有积极的影响。

[0357] 实施例 2

[0358] OxDc 纳米粒及其包衣的制备

[0359] 该实施例阐明了含 OxDc 的纳米粒及其不同包衣的制备。

[0360] OxDc 壳聚糖 / 三聚磷酸盐纳米粒:

[0361] 将含有 0.5mg/ml OxDc 的 40ml 0.15% (w/v) 的三聚磷酸盐 (TPP), pH8.1 (在加入 OxDc 前用 HCl 调节) 滴加至 0.13% (w/v) 乙酸 (pH3.92) 中的 120ml 0.18% (w/v) 壳聚糖

中。将纳米粒通过离心收集并用水洗涤两次。该工艺产生了约 4ml 的纳米粒混悬液。

[0362] 用藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 纳米粒：

[0363] 将 0.8ml 所述纳米粒混悬液搅拌稀释于 10ml 水中，然后滴加 5ml 1.2% 的藻酸盐溶液（在 25mM TrisHCl 缓冲液中，pH8.6）。持续搅拌该混合物 5 分钟。有包衣的纳米粒的大小由于纳米粒的聚集和通过藻酸盐交联而增加至 2-400 μm ，大多数纳米粒在 30 μm 左右（参见图 3）。通过在 3000g 下离心 3 分钟收集微粒。将微粒用水洗涤两次并再次悬浮。在图 3 中，体积统计 (Arithmetic) 17795s3_07_01. \$1s。从 0.040 μm 至 2000 μm 进行计算。体积：100%；平均值：48.53 μm ；中值：29.10 μm ；平均值 / 中值比率：1.668；众数：28.70 μm ；S.D.：65.43 μm ；CV：135%；偏度：4.384，右偏斜；峰度：26.90；尖顶峰度： d_{10} 8.814 μm ； d_{50} 29.10 μm ； d_{90} 109.9 μm 。

[0364] 用角叉菜胶包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 纳米粒：

[0365] 将 0.8ml 纳米粒混悬液搅拌稀释于 10ml 水中，然后滴加 5ml 0.5% 角叉菜胶溶液（自然的 pH 为 8.9）。继续搅拌该混合物 5 分钟。有包衣的纳米粒应该会形成微粒并具有与用藻酸盐包被的那些（见上）相似的分布。通过离心收集微粒并用水洗涤两次，并再次悬浮。

[0366] 用藻酸盐或角叉菜胶包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒与不同戊二醛浓度的戊二醛交联

[0367] 将 0.2ml 微粒混悬液搅拌稀释于 0.8ml 水中，然后加入 2ml 0.15-7.5% 的戊二醛溶液（在 50mM KPB, pH7.5 中）并将其混合。保持搅拌该混合物 15-40 分钟并通过离心收集微粒，并且用水洗涤两次。

[0368] 戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒的还原

[0369] 制备了两种不同类型的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒：一种微粒进行交联而未加入 CaCl_2 ，另一种微粒在交联反应（1% 的戊二醛）开始后 10 分钟加入 1.2M CaCl_2 。在交联反应进行了 1 小时后，通过离心收集微粒并用水洗涤两次。将这两种微粒另外悬浮于 100mM KPB, pH7.5 中。将一定量的 NaBH_4 粉末加至该混悬液中以获得 20mM NaBH_4 的终浓度，将其保持在黑暗中并摇动 14 小时。

[0370] 得到下列结果：

[0371] OxDc 壳聚糖 /TPP 纳米粒：

[0372] 纳米粒太小而不能在光学显微镜下用肉眼观察到。在当前条件下 OxDc 几乎 100% 被纳米粒包埋。在这些条件下，用高 pH(8.6) 的 TPP 溶解 OxDc，然后滴加入低 pH(3.92) 的壳聚糖溶液中。相对于低 pH 充分优先将酶溶解于高 pH 中是在纳米粒形成阶段能将酶维持在纳米粒中的一个因素。在 pH3.0 在 OxDc 壳聚糖 /TPP 纳米粒中 OxDc 的稳定性位于实施例 1 和图 1 中的微粒 I 和微粒 II 的稳定性之间。

[0373] 藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒：

[0374] 当应用藻酸盐包衣时，与未包被的纳米粒比较，在 pH3.0 下 OxDc 的稳定性得到进一步提高，参见图 4，其中正方形是没有包衣的纳米粒，闭合圆环是具有藻酸盐包衣的微粒，而三角形是具有角叉菜胶包衣的微粒。

[0375] 角叉菜胶包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒：

[0376] 当应用角叉菜胶包衣时，在 pH3.0 下 OxDc 的稳定性得到进一步提高（与未包被的

纳米粒比较)(图4)。

[0377] 其中整个颗粒与不同戊二醛浓度的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒：

[0378] (尽管不希望受任何理论束缚,但据信戊二醛交联主要发生在壳聚糖分子中,(壳聚糖分子与其自身交联和互相之间交联),以及在壳聚糖分子和酶分子之间交联)。

[0379] 附加了交联的藻酸盐包被的微粒在低 pH 下显示出比没有藻酸盐包衣的纳米粒更高的稳定性。高水平的交联提高了在低 pH 下 OxDc 在藻酸盐包被的微粒中的稳定性(图5)。最稳定的微粒可浸没在具有胃蛋白酶的 pH 为 2.6 的溶液中 4 小时而不会丧失活性。在 pH2.4 下用胃蛋白酶孵育 3.5 小时后活性为约 30%。参见图 5,其显示了在具有胃蛋白酶(pH2.4)的情况下,用于交联的戊二醛浓度对戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒中的 OxDc 稳定性的影响。正方形是无藻酸盐包衣的 1%的戊二醛,实心圆是 0.5%的戊二醛,朝上的三角形是 1%的戊二醛,而朝下的三角形是 2%的戊二醛,并且菱形是 5%的戊二醛。

[0380] 戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒的还原：

[0381] 在还原希夫双键后在低 pH 下戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒的稳定性得到了显著提高。在交联过程中加入 CaCl_2 ,戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒在 120 分钟后丧失了 80%的 OxDc 活性,然而在约 2.0 的 pH 下没有加入 CaCl_2 的微粒在非常短的时间内就丧失了 80%的活性。对于详细情况,参见图 6,其是显示两种类型的交联且还原了的微粒在 pH2.2 和 pH1.85 下的 OxDc 稳定性的图,其中正方形是 pH2.2(无 Ca^{+2}),实心圆是 pH2.2(添加了 Ca^{+2}),朝上的三角形指代 pH1.85(无 Ca^{+2}),而朝下的三角形是 pH1.85(具有 Ca^{+2})。

[0382] 从上面的一系列试验中,选择还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒制剂用于进一步开发。

[0383] 实施例 3

[0384] 在模拟的胃条件下除去来自食物的草酸和 / 或其盐的体外测试实验

[0385] 还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒的体外试验

[0386] 分别将 10g、20g 和 40g 菠菜与 12ml 模拟胃液(胃流体)(具有 3.2mg/ml 胃蛋白酶的 84mM HCl)混合。然后加入水使得终体积分别为 40、80 和 160ml。在将菠菜、模拟胃液和水均质化后,加入还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒用以降解从菠菜释放出的草酸和 / 或其盐。对于所有这三种情形,菠菜 / 微粒的(剂量)比例都是 200(200g 菠菜与 1g 微粒混合)。选择菠菜用于该试验是因为它含有大量的草酸和 / 或其盐(冷冻的菠菜叶中含有约 200mM 草酸和 / 或其盐)。

[0387] 结果和讨论：

[0388] 可溶性草酸和 / 或其盐的量受到 pH 的显著影响。对于 10g、20g 和 40g 菠菜的情况,pH 值分别为 2.5、3.5 和 4.2。对于 10g、20g 和 40g 菠菜的情况,初始的可溶性草酸和 / 或其盐的浓度分别是 30.0mM、22.8mM 和 14.7mM(图 7)。如果所有的草酸和 / 或其盐都是可溶性的,则它的浓度应该是大约 48mM。因此,在所有这三种情形中都存在不溶性草酸和 / 或其盐。图 7 显示,初始的可溶性草酸和 / 或其盐在数分钟内几乎被完全除去。剩余的可溶性草酸和 / 或其盐没有降低至 0,而是在一段时间内保持在低的水平,因为不溶性草酸和

/ 或其盐在更多的可溶性草酸和 / 或其盐被除去时开始溶解。图 7 显示了在所有这三种情况下草酸和 / 或其盐（可溶部分）的生物利用度都迅速降低。正方形是具有 0.05g 洗涤过的微粒的 10g 菠菜，菱形是具有 0.1g 洗涤过的微粒的 20g 菠菜，朝上的三角形是具有 0.2g 微粒的 40g 菠菜。

[0389] OxDc 微粒持续去除越来越多的可溶草酸和 / 或其盐（图 8）。在 1 小时后，在第一种情况下（正方形）菠菜中几乎所有的草酸和 / 或其盐都被除去，而在第二种情况下（菱形），约 90% 的草酸和 / 或其盐被除去。对于第三种情况（三角形），仅除去了 50% 的草酸和 / 或其盐，但是可溶部分接近于 0。因此，在所有这三种情况下，草酸和 / 或其盐的吸收也可以在胃肠道中得到有效限制，因为可溶性草酸和 / 或其盐的浓度非常低而且大部分的草酸和 / 或其盐被减少。图 8 是在三种不同的模拟条件下，菠菜中总的可溶性草酸和 / 或其盐被微粒除去的时间进程图。每种菠菜样品中的总草酸和 / 或其盐浓度是约 50mM。正方形是具有 0.05g 微粒的 10g 菠菜，菱形是具有 0.1g 微粒的 20g 菠菜，朝上的三角形是具有 0.2g 微粒的 40g 菠菜。

[0390] 如果用这些结果来模拟体内处理，则假设胃中含有 120ml 胃液的人开始摄入总量为 400g 的菠菜。在摄入 100g 菠菜后，服用 4g 微粒。在 2 分钟内除去了几乎所有的可溶性草酸和 / 或其盐。虽然继续摄入菠菜直到吃进了 400g，但可溶性草酸和 / 或其盐在摄入过程中维持低于 3mM 并且在摄入后迅速降低至 0。

[0391] 实施例 4

[0392] 根据本发明配制的 OxDc

[0393] I. 制备配制的 OxDc（微粒）并测试它在低 pH 下的稳定性

[0394] 如下制备了还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒：

[0395] 1. 通过将三聚磷酸盐（TPP）溶液滴加至壳聚糖和 OxDc 的混合物中，制备 OxDc 壳聚糖 /TPP 纳米粒。

[0396] 2. 通过加入藻酸盐溶液至上述混悬液中，用藻酸盐包被上述纳米粒。由于在这一过程中发生了纳米粒的聚集和通过藻酸盐的物理交联，纳米粒形成了微粒。

[0397] 3. 用戊二醛使上述微粒交联

[0398] 4. 用 NaBH_4 还原希夫碱

[0399] 按照实施例 2 中的描述制备该制剂。

[0400] 测试游离的 OxDc 或配制的 OxDc 在低 pH 下的稳定性：

[0401] 在将作为游离酶的 OxDc 或所述微粒中的 OxDc 在 pH 范围为 2 至 3 的 100mM 甘氨酸缓冲液中孵育一段时间后，分析剩余的 OxDc 活性。图 9 是显示在 pH2.4 并存在胃蛋白酶时，与戊二醛（0.5–5%）交联提高了藻酸盐包被的壳聚糖 /TPP 微粒中 OxDc 的稳定性的图。正方形是 0% 的戊二醛，实心圆是 0.5% 的戊二醛，朝上的三角形是 1% 的戊二醛而菱形是 5% 的戊二醛。

[0402] 如图 9 中显示的，在 pH2.4 下，未交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒（对照）的活性（用正方形点表示）在少于 15 分钟内被彻底破坏。相比之下，与 0.5–5% 戊二醛交联使藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒的酶活性稳定直到 2 小时。已知天然的（未配制的、游离的、未包埋的）OxDc 在 $\text{pH} < 3.0$ 时将不可逆地失活。戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TPP 微粒的稳定性在这些微粒中的希夫碱还原后得到了进一步提高（图 10）。

[0403] 图 10 是显示在 pH2.2 并存在胃蛋白酶时(正方形点),希夫碱的还原提高了戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TTP 微粒中的 OxDc 稳定性的图。微粒在 pH<2.0 时迅速失活(三角形点)。

[0404] 还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TTP 微粒可在 pH 低至 2.2 时保持稳定。这是显著的提高,因为未配制的酶(游离的,未包埋的)在 pH<3.0 时不可逆地失活。

[0405] II. 对 OxDc 微粒降解草酸和 / 或其盐的研究

[0406] A. 低浓度范围的草酸和 / 或其盐(草酸钠)的降解:

[0407] 在 37°C 下 pH 为 3 时,将含有 2mg OxDc 或 20mg OxDc 的 OxDc 微粒(按照上述实施例 4 的 I 中的描述制备)与浓度为 0.05 至 2mM 的 100ml 草酸和 / 或其盐溶液混合。在一段时间内测量所产生的甲酸盐。

[0408] 如图 11A 和 B 中显示的,还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TTP 微粒可以降解至少浓度范围是 0.05mM 至 2.0mM 的草酸和 / 或其盐。

[0409] 在人的胃中,0.05mM 至 2.0mM 的草酸和 / 或其盐浓度相当于膳食摄入了 5mg 至 180mg 的草酸和 / 或其盐并且假定胃的容积为 1L。据报道在西方饮食中草酸和 / 或其盐的平均日摄入量是 100-500mg/天(在所有膳食中)。如果进食了一些高草酸和 / 或其盐含量的食物像菠菜,则摄入量会高很多。来自菠菜的范围为 15 至 30mM 的草酸和 / 或其盐的降解也已经进行了研究并在下面描述。

[0410] 图 11A 和图 11B 是显示还原的戊二醛交联的藻酸盐包被的 OxDc 壳聚糖 /TTP 微粒在 pH3 去除草酸和 / 或其盐的图。A,相当于 100ml 草酸和 / 或其盐溶液中 20mg OxDc 的微粒;B,相当于 100ml 草酸和 / 或其盐溶液中 2mg OxDc 的微粒。正方形是 0.05mM 的草酸和 / 或其盐浓度,实心圆是 0.2mM 的草酸和 / 或其盐浓度,朝上的三角形是 1.0mM 的草酸和 / 或其盐浓度,而朝下的三角形是 2.0mM 的草酸和 / 或其盐浓度。

[0411] 20mg OxDc(1.0ml 微粒制剂中酶蛋白的估计量)在 2 分钟内几乎完全降解了 0.05mM 至 2mM 的草酸和 / 或其盐。

[0412] 菠菜草酸和 / 或其盐在模拟胃液条件下的降解:

[0413] 菠菜与模拟胃液混合:将 10g、20g 和 40g 菠菜与 12ml 模拟胃液(具有 3.2mg/ml 胃蛋白酶的 84mM HCl)混合,然后加入水使得终体积分别为 40ml、80ml 和 160ml。

[0414] 通过 OxDc 除去草酸和 / 或其盐:在将菠菜、胃液和水的混悬液均质化后,加入 OxDc 微粒用以降解从菠菜中释放的草酸和 / 或其盐。对于所有这三种情况,菠菜 /OxDc 的(剂量)比例都是大约 2000(2000g 菠菜与具有 1g OxDc 活性的微粒混合)。

[0415] 计算出所有上述制剂中的总草酸和 / 或其盐是 50mM(据报道菠菜每 kg 含有 18g 量的总草酸和 / 或其盐)。由于菠菜的存在导致对胃液的不同水平的缓冲作用,三种菠菜混悬液的最终 pH 分别为 2.5、3.5 和 4.2。已知介质的 pH 可影响可溶性草酸和 / 或其盐的可利用度,因而在试验的三种制剂中可生物利用的草酸和 / 或其盐的浓度分别是 30mM(正方形点)、22mM(菱形点)和 15mM(三角形点)(图 12)。

[0416] 表 1

[0417]

菠菜制剂	pH	总草酸和 / 或其盐浓度	可溶性草酸和 / 或其盐浓度
10g/40ml 胃液	2.5	50mM	30mM
20g/80ml 胃液	3.5	50mM	22mM
40g/160ml 胃液	4.2	50mM	15mM

[0418] 图 12A 是显示草酸和 / 或其盐 (可溶性部分) 的生物利用度的图, 在所有这三种情况中所述草酸和 / 或其盐都迅速减少; 图 12B 是显示除去的总草酸和 / 或其盐的百分比的图。正方形是具有相当于 5mgOxDc 量 (根据酶活性) 的微粒的 10g 菠菜; 菱形是具有相当于 10mgOxDc 量的微粒的 20g 菠菜; 朝上的三角形是具有相当于 20mg OxDc 量的微粒的 40g 菠菜。

[0419] 具有 OxDc 的微粒能够在 pH 范围为 2.5 至 4.2 的模拟胃液条件下 (参见图 12A 和 12B) 或在 pH3 的缓冲液中 (图 11A 和 11B) 降解浓度从 0.05mM 至 30mM 的草酸和 / 或其盐。根据这组试验, 可估计具有 OxDc 的 20mg 微粒 (在 1.0ml 混悬液中) 在 30 分钟内可降解 180mg 草酸和 / 或其盐。

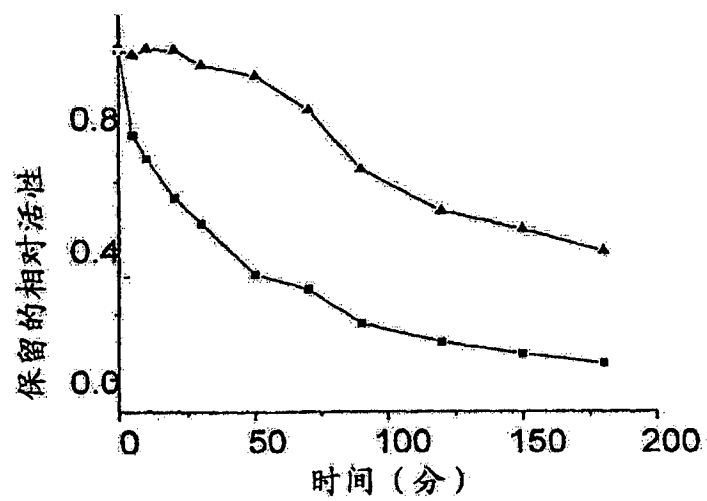


图 1

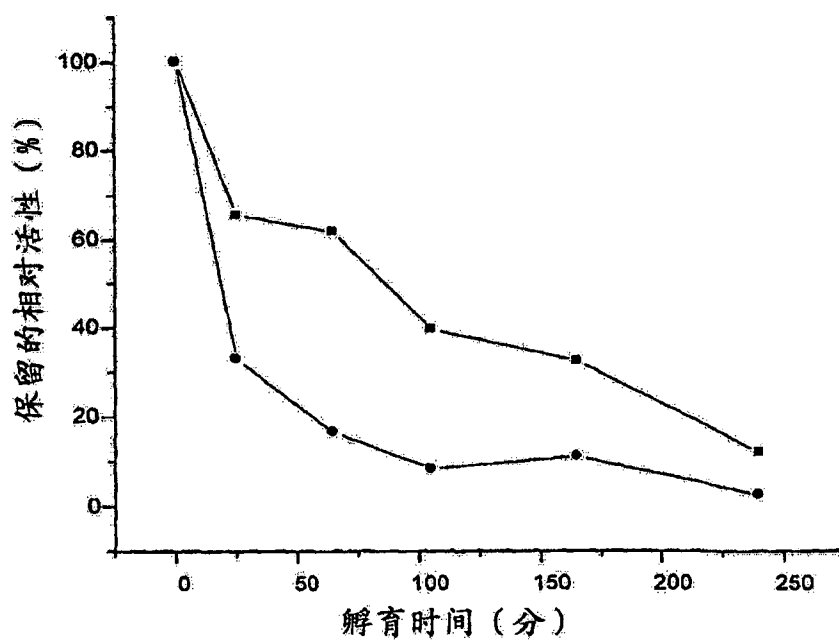


图 2

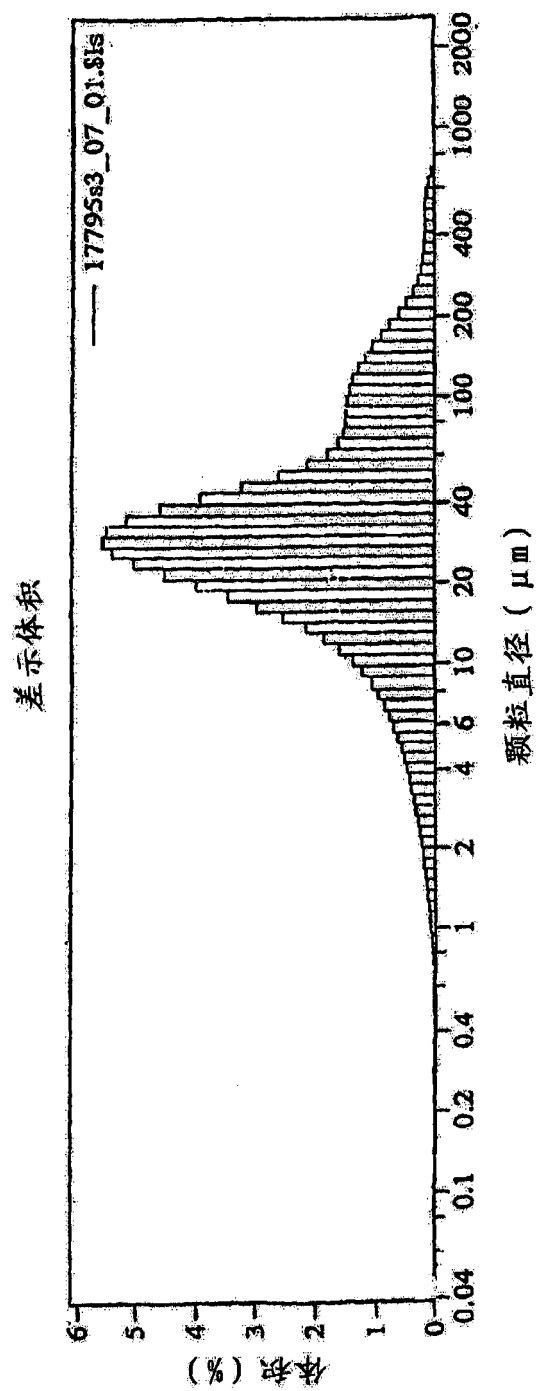


图 3

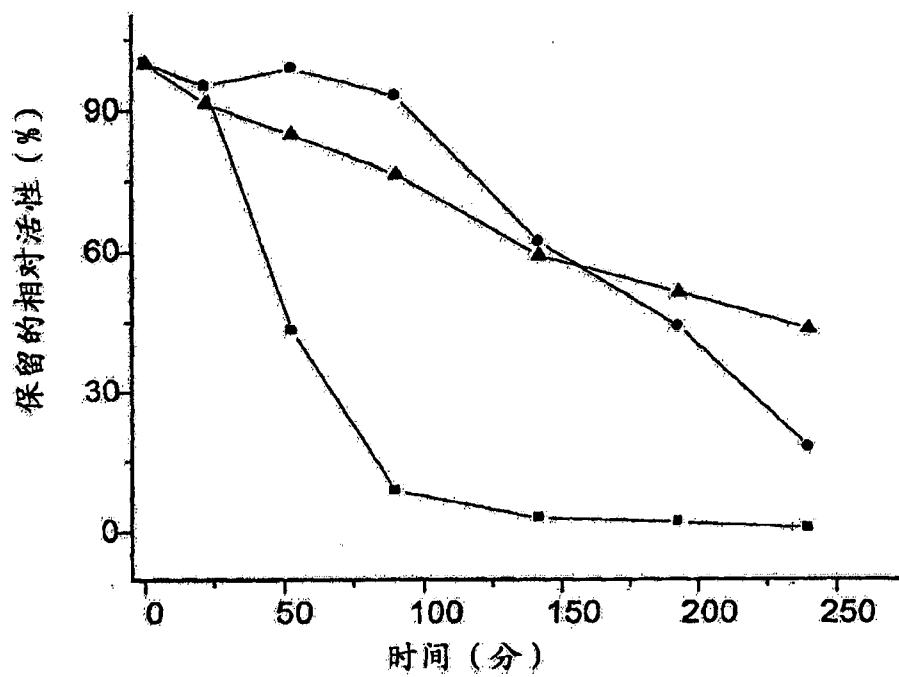


图 4

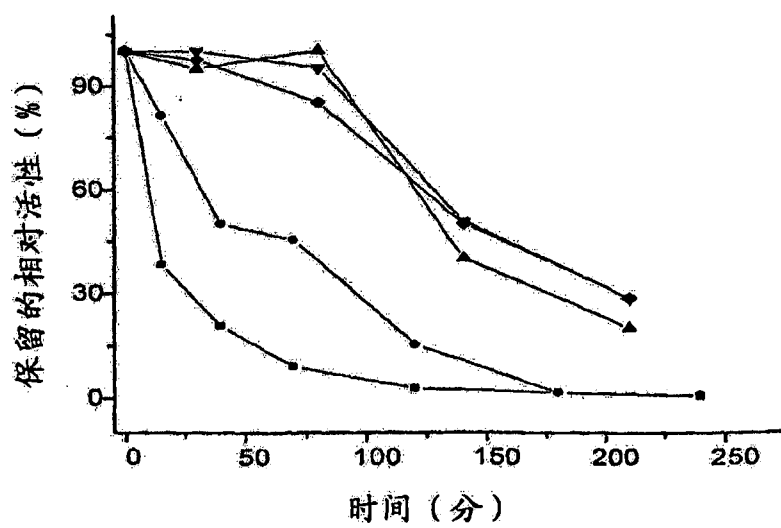


图 5

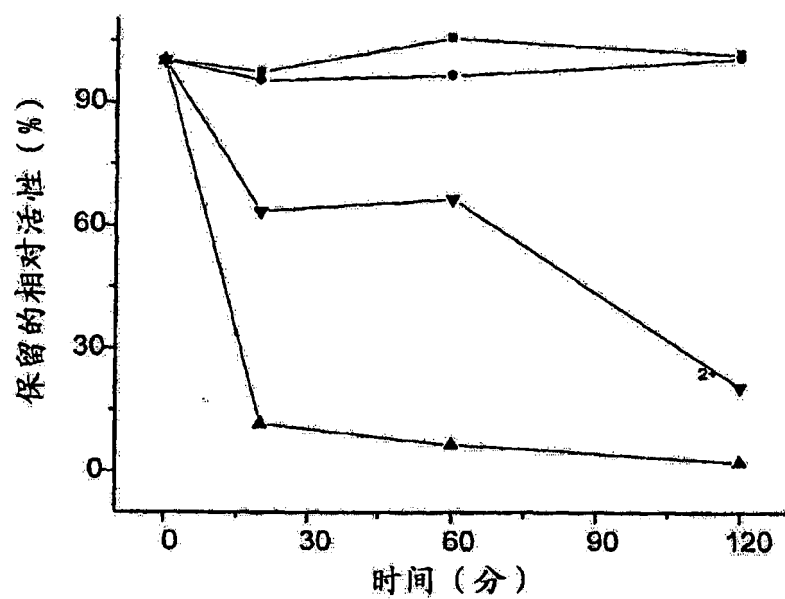


图 6

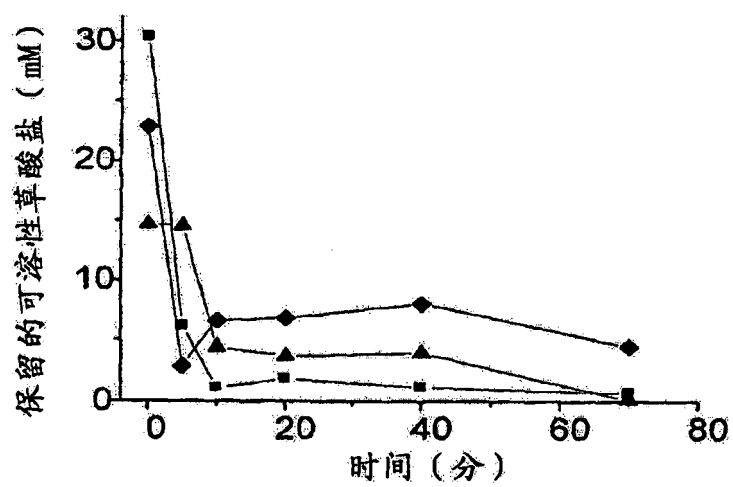


图 7

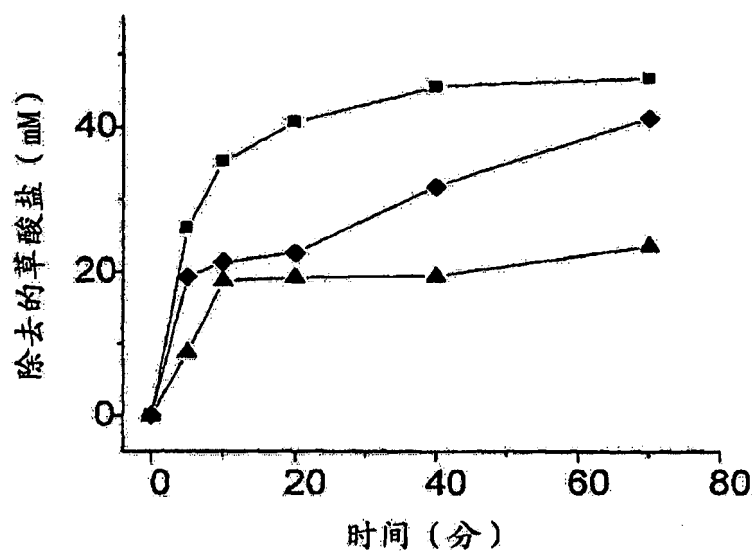


图 8

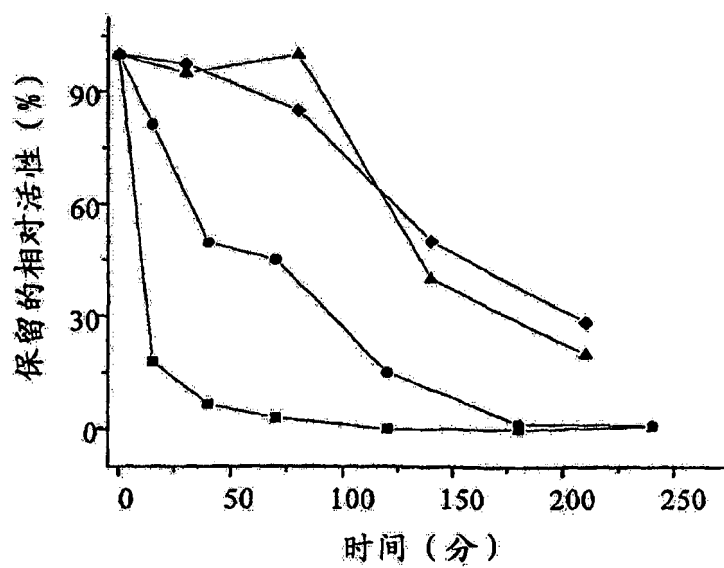


图 9

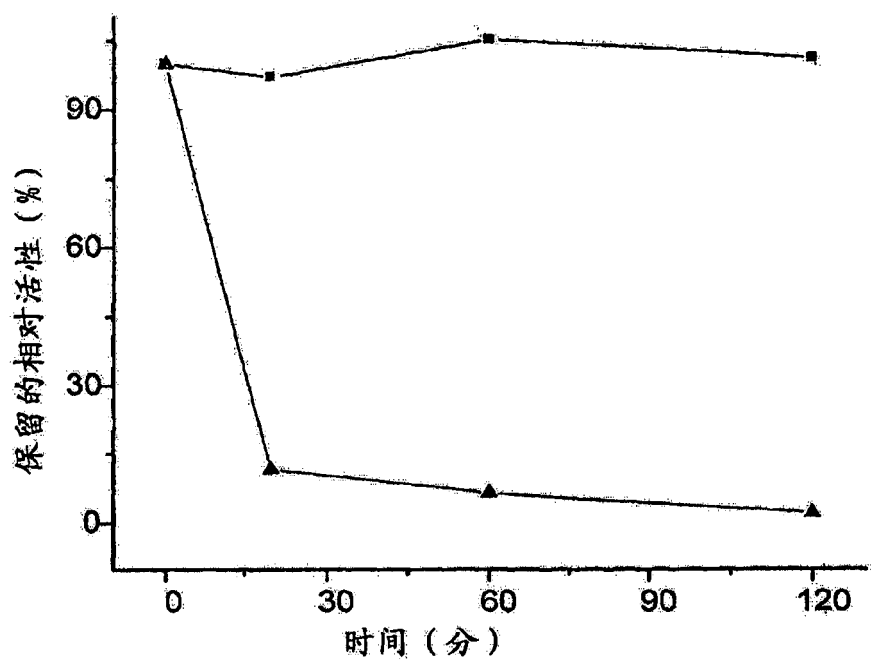


图 10

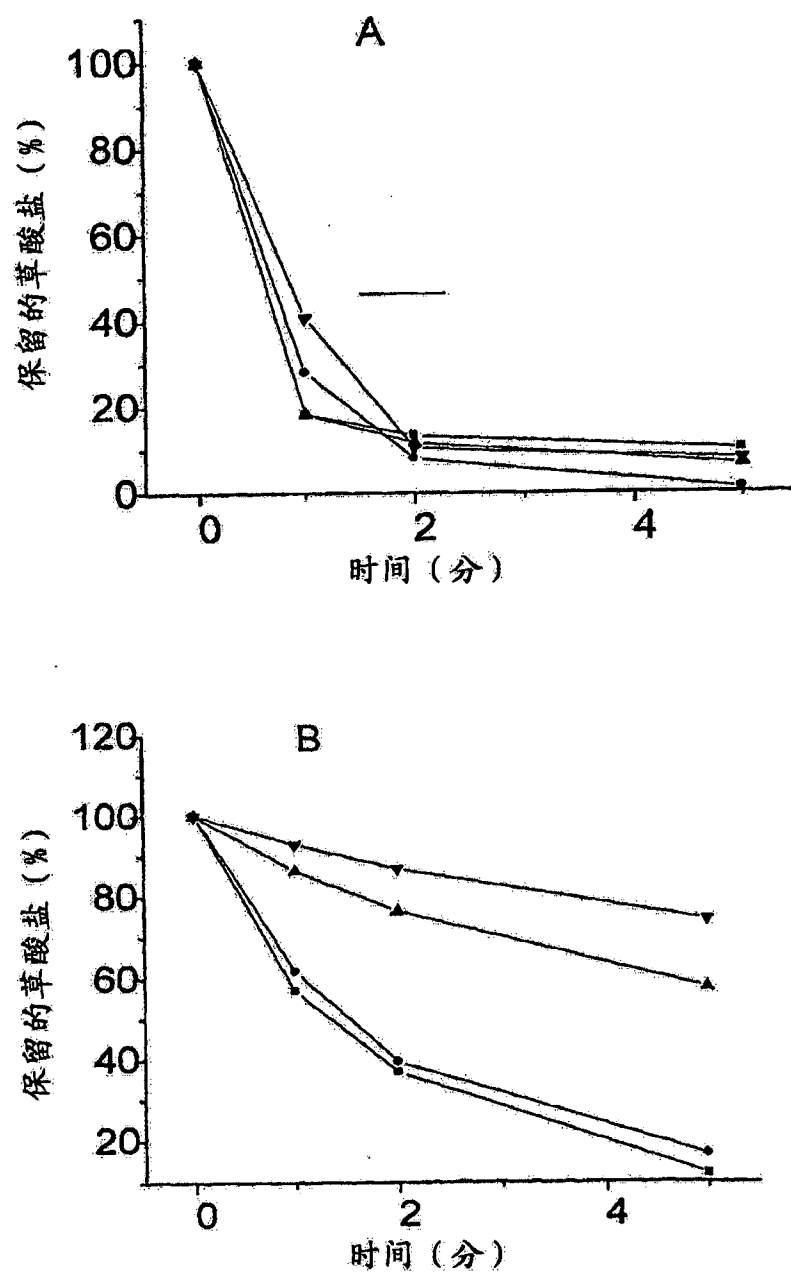


图 11

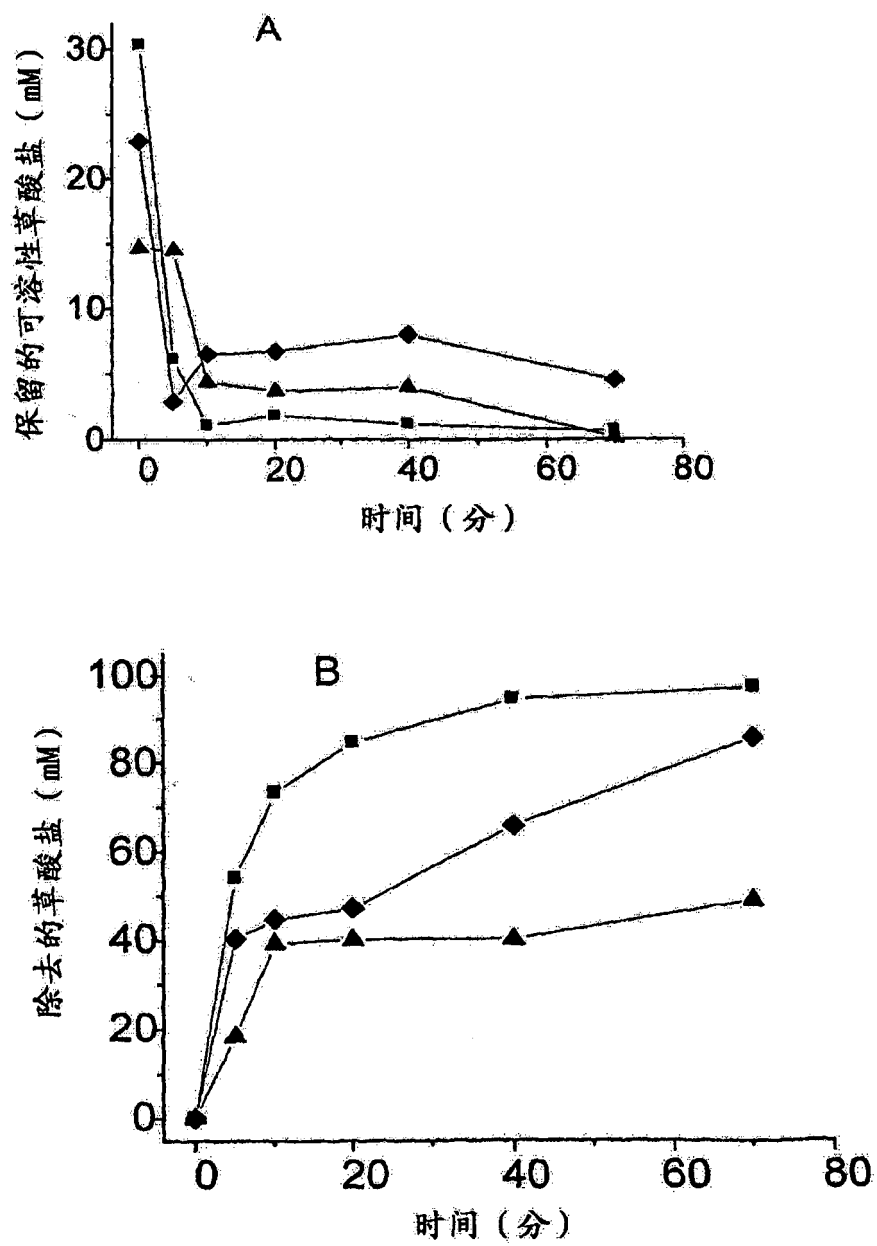


图 12

IHC150023 ABSTRACT

The present invention relates to compositions and methods for oxalate reduction. For example, the invention provides methods and compositions for the delivery of one or more oxalate-reducing enzymes embedded in particle compositions. The compositions of the present invention are suitable in methods of treatment or prevention of oxalate-related conditions including, but not limited to, hyperoxaluria, absorptive hyperoxaluria, enteric hyperoxaluria, primary hyperoxaluria, idiopathic calcium oxalate kidney stone disease (urolithiasis), vulvodynia, oxalosis associated with end-stage renal disease, cardiac conductance disorders, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, and patients who have undergone gastrointestinal surgery and bariatric surgery (surgery for obesity), and/or who have undergone antibiotic treatment