

DESCRIPCIÓN

**DISMINUCIÓN DE HOMOCISTEÍNA MEDIADA POR ENZIMAS HUMANAS PARA EL
TRATAMIENTO DE PACIENTES CON HIPERHOMOCISTEINEMIA Y
HOMOCISTINURIA**

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/505.493, presentada el 12 de mayo de 2017, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en la presente por referencia.

**DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN CON PATROCINIO
FEDERAL**

[0002] La presente invención se llevó a cabo con apoyo gubernamental de acuerdo con la subvención N.º R01 CA139059 otorgada por los Institutos Nacionales de la Salud. El Gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0003] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias, que se presentó en formato ASCII a través de la web de EFSy se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. La copia ASCII, creada el martes 24 de abril de 2018, se denomina UTFBP1138WO_ST25.txt, y su tamaño es de 230 *kilobytes*.

ANTECEDENTES

1. Campo

[0004] Se divulgan variantes de enzimas de primate modificadas por ingeniería genética de manera recombinante que tienen actividad de degradación de homocisteína y estabilidad adecuada para el uso en tratamiento humano. También se proporcionan composiciones y métodos para el tratamiento contra la homocistinuria e hiperhomocisteinemia con enzimas que disminuyen la homocisteína y homocistina.

2. Descripción del estado de la técnica relacionado

[0005] La homocistinuria es una enfermedad poco común que resulta de un error congénito del metabolismo que involucra aminoácidos azufrados. La homocistinuria clásica, la forma más común, es causada por defectos en la enzima cistationina β -sintasa (CBS) (Mudd *et al.*, 1964), mientras que la homocistinuria no clásica se asocia habitualmente a defectos en diversas enzimas (por ejemplo, MTHFR, MTRR, o MTR) implicadas en metabolismo de folato (Kang *et al.*, 1987). Los pacientes con homocistinuria a menudo exhiben tromboembolismos, deficiencia cognitiva, osteoporosis, y luxación del cristalino (Kruger *et al.*, 2003). Los pacientes también tienen

hiperhomocisteinemia, una afección en la que las concentraciones de homocisteína (Hcy) en suero superan los 15 μ M. A menudo, los pacientes con homocistinuria clásica, así como con unas pocas formas no clásicas, muestran niveles elevados de metionina (Met) en suero, mientras que tienen niveles disminuidos de cistationina (Cth) y cisteína (Cys) (Kruger *et al.*, 2003). Se estimó que impacta en hasta 1 de cada 344.000 personas en todo el mundo; sin embargo, su prevalencia es considerablemente mayor en algunos países. Las afecciones médicas más comunes asociadas a la homocistinuria clásica son las complicaciones cardiovasculares que incluyen un riesgo aumentado de coágulos sanguíneos. Otros síntomas incluyen anormalidades esqueléticas, luxación del cristalino, y defectos del desarrollo y el aprendizaje.

[0006] Los tratamientos disponibles en la actualidad para la homocistinuria clásica incluyen dietas con restricción de metionina así como altas dosis de vitamina B6 y betaína (N,N,N-trimetilglicina), en donde la última reduce los niveles de homocisteína. Estos tratamientos se enfocan en la prevención de la acumulación de Hcy y muestran eficacia moderada a limitada (Walter *et al.*, 1998). Aunque estos tratamientos pueden ser eficaces para algunos pacientes, las respuestas fluctúan considerablemente debido a las variaciones de las mutaciones genéticas que generan la enfermedad. Como resultado, existe una oportunidad de desarrollar un tratamiento que aborda la necesidad de todos los pacientes mediante la reducción de los niveles de homocistina en sangre hasta el rango normal. Por ende, se necesitan nuevos métodos y composiciones para tratar a estos pacientes.

RESUMEN

[0007] Se divulgan métodos para utilizar un modificado por ingeniería genética enzima cistationina-gamma-liasa (CGL) humana que de manera eficaz degrada la homocist(e)ína, de modo que es un tratamiento adecuado para tratar pacientes con homocistinuria e hiperhomocisteinemia mediante la degradación del exceso de homocist(e)ína en suero y proporcionar un sumidero para la homocist(e)ína intracelular. El método puede reducir el nivel de homocisteína en suero (tHcy) a un nivel de menos de 25 μ M.

[0008] Se proporcionan métodos de tratamiento que comprenden administrar una enzima CGL modificada, un ácido nucleico que codifica una enzima CGL modificada en un vector de tratamiento génico, o una formulación que comprende la enzima CGL modificada, y en particular métodos para tratar sujetos con homocistinuria o hiperhomocisteinemia. El sujeto puede ser cualquier animal, tal como un ratón. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero, un roedor, un primate o un paciente humano.

El método puede comprender seleccionar un paciente con homocistinuria o hiperhomocisteinemia. El sujeto o paciente se puede mantener en una dieta con restricción de metionina o una dieta normal en combinación con el tratamiento con las composiciones descritas.

[0009] Se proporcionan en la presente mutantes de cistationina-γ-liasa humana (hCGL) con actividad catalítica hacia la homocist(e)ína para el uso en el método de tratamiento. Por ejemplo, la variante de enzima puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-6 y 37-39. En particular, la variante se puede derivar de enzimas humanas, tales como cistationina-γ-liasa (CGL) humana. Se proporcionan polipéptidos que comprenden una CGL humana modificada capaz de degradar homocist(e)ína. El polipéptido puede ser capaz de degradar homocist(e)ína en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el polipéptido puede mostrar una actividad catalítica hacia L-homocistina hasta k_{cat}/K_M de 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ o cualquier rango que se puede derivar de estos.

[0010] Estas enzimas se modificaron por ingeniería genética mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos en la enzima humana cistationina-γ-liasa (CGL). Las variantes que tienen sustituciones de aminoácidos incluyen SEQ ID NO: 2, hCGL-E59N-R119L-E339V (hCGL-NLV); SEQ ID NO: 3, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-1); SEQ ID NO: 4, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-2); SEQ ID NO: 5, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-3); SEQ ID NO: 6, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-4); SEQ ID NO: 27, hCGL-E59N-R119L-T336D-E339V (hCGL-NLDV); SEQ ID NO: 28, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-1); SEQ ID NO: 29, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-2); SEQ ID NO: 30, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-3); SEQ ID NO: 31, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-4); SEQ ID NO: 32, hCGL-E59N-R119L-T336E-E339V (hCGL-NLEV); SEQ ID NO: 33, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-1); SEQ ID NO: 34, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-2); SEQ ID NO: 35, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-3); SEQ ID NO: 36, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-

4); SEQ ID NO: 37, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119D-K268R-T311G-E339V-I353S (Mutante 3); SEQ ID NO: 38, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119H-K268R-T311G-E339V-I353S (Mutante 4); y SEQ ID NO: 39, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119G-K268R-T311G-E339V-I353S (Mutante 5).

[0011] Una enzima CGL modificada como se analizó en la presente se puede caracterizar por tener determinado porcentaje de identidad en comparación con una enzima CGL no modificada (por ejemplo, una enzima CGL nativa). Por ejemplo, la enzima CGL no modificada puede ser una cistationasa nativa de primate (es decir, cistationina-γ-liasa). El porcentaje de identidad puede ser al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (o cualquier rango que se puede derivar de allí) entre las porciones no modificadas de una enzima CGL modificada (es decir, la secuencia de la enzima CGL modificada que no incluye cualquier substitución en las posiciones de aminoácidos 59, 63, 91, 119, 268, 311, 336, 339 y/o 353 de SEQ ID NO: 1 y sus posiciones cognadas en SEQ ID NO: 7-10, ver Figura 6) y la enzima CGL nativa. También se contempla que el porcentaje de identidad analizado anteriormente puede referirse a una región modificada particular de una enzima en comparación con una región no modificada de la enzima nativa correspondiente. Por ejemplo, una enzima CGL modificada puede contener un sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante que se puede caracterizar en función de la identidad de la secuencia de aminoácidos del sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante a la de una enzima CGL no modificada o nativa de la misma especie o entre especies. Por ejemplo, una enzima CGL humana modificada caracterizada por tener al menos 90 % de identidad con una enzima CGL humana no modificada significa que al menos 90 % de los aminoácidos de la enzima CGL humana modificada son idénticos a los aminoácidos de la enzima CGL humana no modificada.

[0012] Una enzima CGL no modificada puede ser una enzima CGL nativa, en particular, una isoforma humana u otras isoformas de primate. Por ejemplo, la enzima CGL humana nativa puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 1. Los ejemplos no limitativos de otras enzimas CGL de primate nativas incluyen CGL de *Pongo abelii* (Genbank ID: NP_001124635.1; SEQ ID NO: 7), CGL de *Macaca fascicularis* (Genbank ID: AAW71993.1; SEQ ID NO: 8), CGL de *Pan troglodytes* (Genbank ID: XP_513486.2; SEQ ID NO: 9), y CGL de *Pan paniscus* (Genbank ID: XP_003830652.1; SEQ ID NO: 10). Las enzimas CGL nativas de ejemplo incluyen una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad (o cualquier rango que se pueda derivar de estos) de SEQ ID NO: 1 o 7-10.

[0013] Una CGL nativa se puede modificar mediante una o más modificaciones diferentes, tales como modificaciones químicas, sustituciones, inserciones, eliminaciones y/o truncamientos. Las modificaciones pueden ser en un sitio de reconocimiento de sustrato de la enzima nativa. Una CGL nativa se puede modificar mediante sustituciones. Por ejemplo, la cantidad de sustituciones puede ser 4, 5, 6, 7 o más. Una CGL nativa se puede modificar en el sitio de reconocimiento de sustrato o cualquier ubicación que pueda afectar la especificidad de sustrato. Un polipéptido modificado puede tener al menos una sustitución de aminoácido en posiciones de aminoácidos que corresponden a E59, S63, L91, R119, K268, T311, T336, E339, y/o I353 de SEQ ID NO: 1 o posiciones de aminoácidos de 59, 63, 91, 119, 268, 311, 336, 339, y/o 353 de una CGL de primate. Por ejemplo, el primate puede ser un ser humano, *Pongo abelii*, *Macaca fascicularis*, *Pan troglodyte*, o *Pan paniscus*. Por ejemplo, una sustitución equivalente de E59 en SEQ ID NO: 1 para SEQ ID NO: 7 modificaría una valina y no ácido glutámico como en SEQ ID NO: 1. Otra sustitución contemplada en SEQ ID NO: 7 es de V353, que es una isoleucina en la posición equivalente en SEQ ID NO: 1 como se ilustra en la Figura 6.

[0014] Las sustituciones en una enzima CGL modificada pueden ocurrir en las posiciones de aminoácidos 59, 63, 91, 119, 268, 311, 339, y/o 353, y pueden ser un ácido aspártico (N), una valina (V), una leucina (L), una metionina (M), una arginina (R), una glicina (G), una alanina (A) o una serina (S). Las modificaciones pueden ser una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en E/V59N, E59I, S63L, L91M, R119L, R119A, R119D, R119H, R119G, K268R, T311G, T336D, T336E, E339V y I/V353S. Las sustituciones pueden comprender sustituciones S63L, L91M, K268R, T311G, E339V, y I/V353S. Las sustituciones pueden comprender sustituciones adicionales de E/V59N o E/V59I; cualquiera de R119L, R119A, R119D, R119H, y R119G; y/o T336D o T336E.

[0015] Las sustituciones pueden ser una combinación de E59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, I353S, y E339V de CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, un fragmento u homólogo de esta), una combinación de E59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, E339V, y I353S de CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, un fragmento u homólogo de esta), una combinación de E59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, E339V, y I353S de CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, un fragmento u homólogo de esta), una combinación de E59I, S63L,

L91M, R119A, K268R, T311G, E339V, y I353S de CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, un fragmento u homólogo de esta), una combinación de E59I, S63L, L91M, R119D, K268R, T311G, E339V, y I353S (por ejemplo, el polipéptido modificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, un fragmento u homólogo de esta), una combinación de E59I, S63L, L91M, R119H, K268R, T311G, E339V, y I353S (por ejemplo, el polipéptido modificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, un fragmento u homólogo de esta), una combinación de E59I, S63L, L91M, R119G, K268R, T311G, E339V, y I353S (por ejemplo, el polipéptido modificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, un fragmento u homólogo de esta), o cualquiera de estas modificaciones de SEQ ID NO: 2-6 y 37-39 en combinación con T336D o T336E. La enzima CGL modificada puede ser un mutante CGL-NLMLRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 11), mutante CGL-ILMLRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 12), mutante CGL-NLMARGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 13), mutante CGL-ILMARGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 14), mutante CGL-ILMDRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 40), mutante CGL-ILMHRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 41), mutante CGL-ILMGRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 42), mutante CGL-NLMDRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 52), mutante CGL-NLMHRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 53), mutante CGL-NLMGRGVS de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 54), mutante CGL-NLMLRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 15), mutante CGL-ILMLRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 16), mutante CGL-NLMARGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 17), mutante CGL-ILMARGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 18), mutante CGL-ILMDRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 43), mutante CGL-ILMHRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 44), mutante CGL-ILMGRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 45), mutante CGL-NLMDRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 55), mutante CGL-NLMHRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 56), mutante CGL-NLMGRGVS de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 57), mutante CGL-NLMLRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 19), mutante CGL-ILMLRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 20), mutante CGL-NLMARGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 21), mutante CGL-ILMARGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 22), mutante CGL-ILMDRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 46), mutante CGL-ILMHRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 47), mutante CGL-ILMGRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 48), mutante CGL-NLMDRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 58), mutante CGL-NLMHRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 59), mutante CGL-NLMGRGVS de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 60), mutante CGL-NLMLRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO:

23), mutante CGL-ILMLRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 24), mutante CGL-NLMARGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 25), mutante CGL-ILMARGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 26), mutante CGL-ILMDRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 49), mutante CGL-ILMHRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 50), o mutante CGL-ILMGRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 51), mutante CGL-NLMDRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 61), mutante CGL-NLMHRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 62), o mutante CGL-NLMGRGVS de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 63).

[0016] Una enzima CGL modificada se puede unir a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, una enzima CGL modificada se puede unir a la secuencia de aminoácidos heteróloga como una proteína de fusión. La enzima CGL modificada se puede unir a secuencias de aminoácidos, tales como un IgG Fc, albúmina, un péptido de fijación a albúmina, ácido polisiálico de extensión de tiempo, o un polipéptido XTEN para aumentar la semivida *in vivo*.

[0017] Para aumentar la estabilidad en suero, la enzima CGL modificada se puede unir a una o más moléculas de poliéter. El poliéter puede ser polietilenglicol (PEG). La enzima CGL modificada se puede unir a PEG mediante residuos de aminoácidos específicos, tales como lisina o cisteína. Para la administración terapéutica, tal polipéptido que comprende la enzima CGL modificada se puede dispersar en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0018] Se contempla un ácido nucleico que codifica una enzima CGL modificada. El ácido nucleico se puede optimizar por codones para la expresión en bacterias, tales como para *E. coli*. Los ácidos nucleicos que se optimizan por codones para la expresión de las enzimas CGL modificadas proporcionadas en SEQ ID NO: 37-39 en *E. coli* se proporcionan en SEQ ID NO: 64-66, respectivamente. Las secuencias proporcionadas en SED ID NO: 64-66 codifican una etiqueta de histidina 6x de terminal N. Por lo tanto, el decimosegundo aminoácido y los que le siguen codificados mediante SEQ ID NO: 64-66 corresponden al segundo aminoácido y los que le siguen de SEQ ID NO: 37-39, respectivamente. De manera alternativa, el ácido nucleico se puede optimizar por codones para la expresión en hongos (por ejemplo, levadura), insectos o mamíferos. También se contemplan vectores, tales como vectores de expresión, que contienen tales ácidos nucleicos. Un ácido nucleico que codifica la enzima CGL modificada puede estar ligado operativamente a un promotor, que incluye, entre otros, promotores heterólogos. Una enzima CGL modificada se puede administrar a una célula diana mediante un vector (por ejemplo, un vector de tratamiento génico). Tales vectores pueden haberse modificado mediante tecnología de ADN recombinante para permitir la

expresión de la CGL modificada que codifica ácido nucleico en la célula diana. Estos vectores se pueden derivar de vectores de origen no viral (por ejemplo, plásmidos) o viral (por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus, lentivirus, virus del herpes, o virus vaccinia). Los vectores no virales se pueden unir en complejos con agentes para facilitar la entrada del ADN a través de la membrana celular. Los ejemplos de tales complejos de vectores no virales incluyen la formulación con agentes policationicos, que facilitan la condensación del ADN, y sistemas de administración a base de lípidos. Los sistemas de administración a base de lípidos incluyen la administración a base de liposomas de ácidos nucleicos.

[0019] Se proporcionan células huésped que comprenden tales vectores. Las células huésped pueden ser bacterias (por ejemplo, *E. coli*), células fúngicas (por ejemplo, levadura), células de insecto o células de mamífero.

[0020] Un vector se puede introducir en células huésped para expresar la enzima CGL modificada. Las proteínas se pueden expresar de cualquier manera adecuada. Las proteínas se pueden expresar en una célula huésped de modo que la proteína sea glucosilada. De manera alternativa, las proteínas se pueden expresar en una célula huésped de modo que la proteína sea aglucosilada.

[0021] Las formulaciones terapéuticas que contienen la enzima CGL modificada se pueden administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante un catéter, en composiciones de lípidos (por ejemplo, liposomas). El sujeto puede haber recibido tratamientos anteriormente para homocistinuria o hiperhomocisteinemia. La enzima se administra para tratar o disminuir la reaparición de la homocistinuria o hiperhomocisteinemia; la administración del compuesto o composiciones descritos en la presente puede aliviar una o más afecciones y/o síntomas asociados a la homocistinuria e hiperhomocisteinemia. Los síntomas conocidos de la homocistinuria incluyen luxación del cristalino, miopía, coágulos sanguíneos anormales, osteoporosis, dificultades en el aprendizaje, defectos del desarrollo, deformidades del pecho, escoliosis, anemia megaloblástica y convulsiones. Los síntomas conocidos de la hiperhomocisteinemia incluyen coágulos sanguíneos, daño al revestimiento de los vasos sanguíneos, demencia (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) y fracturas óseas.

[0022] El método también puede comprender administrar al menos un segundo tratamiento al sujeto, tal como un segundo tratamiento para la homocistinuria o hiperhomocisteinemia. El segundo tratamiento contra la homocistinuria o hiperhomocisteinemia puede ser un tratamiento con dosis alta de vitamina B6 o betaína

(N,N,N-trimetilglicina).

[0023] Se proporciona una composición que comprende una enzima CGL modificada o un ácido nucleico que codifica una enzima CGL modificada para el uso en el tratamiento contra la homocistinuria o hiperhomocisteinemia en un sujeto. Se proporciona el uso de una enzima CGL modificada o un ácido nucleico que codifica una enzima CGL modificada en la elaboración de un medicamento para el tratamiento contra la homocistinuria o hiperhomocisteinemia. La enzima CGL modificada puede ser cualquier enzima CGL modificada divulgada en la presente.

[0024] También se proporciona en la presente lo siguiente:

1. Una enzima cistationina-γ-liasa (CGL) de primate aislada y modificada que comprende al menos las siguientes sustituciones en relación con una secuencia de aminoácidos de CGL humana nativa (SEQ ID NO: 1), en donde la enzima modificada tiene actividad de homocistinasa y homocisteinasa, y dichas sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en:

- (a) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, ácido aspártico en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;
- (b) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 119, ácido aspártico en la posición 336, y valina en la posición 339;
- (c) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, leucina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido aspártico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;
- (d) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, leucina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido aspártico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;
- (e) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, alanina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido aspártico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;
- (f) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, alanina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido aspártico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;

(g) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 119, ácido glutámico en la posición 336, y valina en la posición 339;

(h) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, leucina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido glutámico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;

(i) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, leucina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido glutámico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;

(j) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, leucina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido glutámico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;

(i) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, alanina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido glutámico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;

(k) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, alanina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, ácido glutámico en la posición 336, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;

(l) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, histidina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353; y

(m) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, glicina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353.

2. La enzima de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las sustituciones comprenden asparagina en la posición 59, leucina en la posición 119, ácido aspártico en la posición 336, y valina en la posición 339.

3. La enzima de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las sustituciones también comprenden leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, y serina en la posición 353.

4. La enzima de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las sustituciones

comprenden asparagina en la posición 59, leucina en la posición 119, ácido glutámico en la posición 336, y valina en la posición 339.

5. La enzima de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las sustituciones también comprenden leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, y serina en la posición 353.

6. La enzima de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las sustituciones comprenden isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, ácido aspártico en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353.

7. La enzima de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las sustituciones comprenden isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, histidina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353.

8. La enzima de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las sustituciones comprenden isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, glicina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353.

9. La enzima de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enzima CGL modificada es una enzima CGL de *Pongo abelii* modificada.

10. La enzima de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la enzima CGL de *Pongo abelii* modificada comprende sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) V59I, S63L, L91M, R119D, K268R, T311G, E339V, y V353S;
- (b) V59N, R119L, T336D, y E339V;
- (c) V59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336D, E339V, y V353S;
- (d) V59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336D, E339V, y V353S;
- (e) V59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336D, E339V, y V353S;
- (f) V59I, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336D, E339V, y V353S;
- (g) V59N, R119L, T336E, y E339V;
- (h) V59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336E, E339V, y V353S;
- (i) V59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336E, E339V, y V353S;
- (j) V59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336E, E339V, y V353S;
- (k) V59I, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336E, E339V, y V353S;
- (l) V59I, S63L, L91M, R119H, K268R, T311G, E339V, y V353S; y
- (m) V59I, S63L, L91M, R119G, K268R, T311G, E339V, y V353S.

11. La enzima de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enzima CGL

modificada es una enzima CGL humana modificada, una enzima CGL de *Macaca fascicularis* modificada, una enzima CGL de *Pan troglodytes* modificada, o una enzima CGL de *Pan paniscus* modificada.

12. La enzima de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enzima CGL humana modificada, la enzima CGL de *Macaca fascicularis* modificada, la enzima CGL de *Pan troglodytes* modificada, o la enzima CGL de *Pan paniscus* modificada comprende sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) E59I, S63L, L91M, R119D, K268R, T311G, E339V, y I353S;
- (b) E59N, R119L, T336D, y E339V;
- (c) E59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336D, E339V, y I353S;
- (d) E59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336D, E339V, y I353S;
- (e) E59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336D, E339V, y I353S;
- (f) E59I, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336D, E339V, y I353S;
- (g) E59N, R119L, T336E, y E339V;
- (h) E59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336E, E339V, y I353S;
- (i) E59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, T336E, E339V, y I353S;
- (j) E59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336E, E339V, y I353S;
- (k) E59I, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, T336E, E339V, y I353S;
- (l) E59I, S63L, L91M, R119H, K268R, T311G, E339V, y I353S; y
- (m) E59I, S63L, L91M, R119G, K268R, T311G, E339V, y I353S.

13. La enzima de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que también comprende un segmento de péptido heterólogo o un polisacárido.

14. La enzima de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el segmento de péptido heterólogo es un polipéptido XTEN, un IgG Fc, una albúmina, o un péptido de fijación a albúmina.

15. La enzima de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el polisacárido comprende polímeros de ácido polisilícico.

16. La enzima de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la enzima se acopla a un polietilenglicol (PEG).

17. La enzima de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la enzima se acopla a PEG mediante uno o más residuos de lisina.

18. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

19. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el ácido nucleico se optimiza por codones para la expresión en bacterias, hongos, insectos, o mamíferos.

20. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 19, en donde las bacterias son *E. coli*.
21. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el ácido nucleico comprende una de las SEQ ID NO: 64-66.
22. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18 o 19.
23. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18 o 19.
24. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la célula huésped es una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de insectos o una célula de mamíferos.
25. Una formulación terapéutica que comprende una enzima de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
26. Un método para tratar un sujeto que tiene o que tiene riesgo de desarrollar homocistinuria o hiperhomocisteinemia que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación de acuerdo con la reivindicación 25.
27. Un método para tratar un sujeto que tiene o que tiene riesgo de desarrollar homocistinuria o hiperhomocisteinemia, en donde el método comprende:
- administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de acuerdo con la reivindicación 25 o de una formulación que comprende una enzima cistationina-γ-liasa (CGL) de primate aislada y modificada que tiene sustituciones en relación con una secuencia de aminoácidos de CGL humana nativa (SEQ ID NO: 1) o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima modificada, en donde dichas sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en:
- (a) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 119, y valina en la posición 339;
 - (b) valina en la posición 59, leucina en la posición 119, y valina en la posición 339;
 - (c) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, leucina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;
 - (d) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, leucina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353;

- (e) asparagina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, alanina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353; y
- (f) isoleucina en la posición 59, leucina en la posición 63, metionina en la posición 91, alanina en la posición 119, arginina en la posición 268, glicina en la posición 311, valina en la posición 339, y serina en la posición 353.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la enzima CGL modificada es una enzima CGL de *Pongo abelii* modificada.
29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde la enzima CGL de *Pongo abelii* modificada comprende sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) V59N, R119L, y E339V;
 - (b) R119L, y E339V;
 - (c) V59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, E339V, y V353S;
 - (d) V59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, E339V, y V353S;
 - (e) V59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, E339V, y V353S; y
 - (f) V59I, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, E339V, y V353S.
30. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la enzima CGL modificada es una enzima CGL humana modificada, una enzima CGL de *Macaca fascicularis* modificada, una enzima CGL de *Pan troglodytes* modificada, o una enzima CGL de *Pan paniscus* modificada.
31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la enzima CGL humana modificada, la enzima CGL de *Macaca fascicularis* modificada, la enzima CGL de *Pan troglodytes* modificada, o la enzima CGL de *Pan paniscus* modificada comprende sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) E59N, R119L, y E339V;
 - (b) E59V, R119L, y E339V;
 - (c) E59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, E339V, y I353S;
 - (d) E59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, E339V, y I353S;
 - (e) E59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, E339V, y I353S; y
 - (f) E59I, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, E339V, y I353S.
32. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en donde la enzima también comprende un segmento de péptido heterólogo.
33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el segmento de péptido heterólogo es un polipéptido XTEN, un IgG Fc, una albúmina, un péptido de fijación a

albúmina, o ácido polisiálico de extensión de tiempo.

34. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en donde la enzima se acopla a polietilenglicol (PEG).

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la enzima se acopla a PEG mediante uno o más residuos de lisina o cisteína.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el sujeto se mantiene en una dieta con restricción de metionina.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el sujeto se mantiene en una dieta normal.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el sujeto es un paciente humano.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la formulación se administra por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intravítrea, intramuscular, intravesicular, intraumbilical, mediante inyección, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada que baña directamente las células diana, o mediante un catéter.

40. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el sujeto se ha tratado anteriormente contra la homocistinuria o hiperhomocisteinemia y la enzima se administra para prevenir la reaparición de la homocistinuria o hiperhomocisteinemia.

41. El método de acuerdo con la reivindicación 27, que también comprende administrar al sujeto al menos un segundo tratamiento contra la homocistinuria o hiperhomocisteinemia.

42. El método de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el segundo tratamiento contra la homocistinuria o hiperhomocisteinemia es un tratamiento con dosis alta de vitamina B6 o betaína (N,N,N-trimetilglicina).

43. La formulación terapéutica de acuerdo con la reivindicación 25 para el uso como un medicamento en el tratamiento de un sujeto que tiene homocistinuria o hiperhomocisteinemia.

44. La enzima de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para el uso en el tratamiento contra la homocistinuria o hiperhomocisteinemia en un sujeto.

[0025] Como se usa en la presente, las expresiones “codificar” o “que codifica”, en referencia a un ácido nucleico, se usan para lograr que la invención sea comprendida con facilidad por la persona del oficio de nivel medio; sin embargo, estas expresiones se pueden usar de manera indistinta con “comprender” o “que comprende”,

respectivamente.

[0026] Como se usa en la presente, “esencialmente libre”, en relación con un componente especificado, significa que ninguna cantidad del componente especificado se formuló intencionalmente en una composición y/o que está presente solo como un contaminante o en cantidades mínimas. Por lo tanto, la cantidad total del componente especificado que resulta de cualquier contaminación involuntaria de una composición está muy por debajo del 0,05 %, preferentemente, debajo del 0,01 %. Es de máxima preferencia una composición en la que no se puede detectar ninguna cantidad del componente especificado con métodos analíticos estándares.

[0027] Como se usa en la presente memoria descriptiva, “un” o “una” puede significar uno o más. Como se usa en la presente en las reivindicaciones, cuando se usa junto con la expresión “que comprende”, las palabras “un” o “una” pueden significar uno o más de uno.

[0028] El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa con el significado “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación permite una definición que se refiere solo a alternativas e “y/o.” Como se usa en la presente, “otro” puede significar al menos un segundo o más.

[0029] Como se usa en la presente, la expresión “alrededor de” es comprendida por las personas del oficio de nivel medio y puede variar en cierta medida en el contexto en el que se usa. En general, “alrededor de” abarca un rango de valores de más/menos 10 % de un valor referenciado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0030] Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para ejemplificar adicionalmente los métodos, compuestos, y composición descritos.

[0031] Figura 1 – Evaluación de CGL modificada *in vivo*. La enzima se dosificó una única vez a 50 mg/kg (i.p.). El Mutante 1 corresponde a hCGL-NLV (SEQ ID NO: 2) y el Mutante 2 corresponde a hCGL-8mut-4 (SEQ ID NO: 6). Se recolectó suero antes de la inyección y cada 24 horas luego de la inyección durante una semana.

[0032] Figura 2 – Farmacodinámica de dosis múltiples. La enzima (hCGL-8mut-4; SEQ ID NO: 6) se dosificó cada 5 días a 50 mg/kg (i.p.). Se recolectó suero antes de cada inyección y 24 horas luego de la inyección.

[0033] Figura 3 – Efecto terapéutico de CGL modificada *in vivo*. La enzima (hCGL-8mut-4; SEQ ID NO: 6) se inyectó dos veces por semana desde el día 10

después de nacer. La línea superior representa la CGL modificada. La línea inferior representa la enzima inactiva.

[0034] Figura 4 – Evaluación del Mutante 3 *in vivo*. La enzima (Mutante 3; SEQ ID NO: 37) se dosificó una única vez a 50 mg/kg (i.p.). Se recolectó suero antes de la inyección y cada 24 horas luego de la inyección durante una semana. La línea superior representa la enzima inactivada. La línea inferior representa el Mutante 3 (SEQ ID NO: 37).

[0035] Figura 5 – Efecto terapéutico del Mutante 3 *in vivo*. La enzima (Mutante 3; SEQ ID NO: 37) se inyectó dos veces por semana desde el día 10 después de nacer.

[0036] Figura 6 – Alineación de secuencia de SEQ ID NO: 1 y 7-10. Los asteriscos indican posiciones modificadas por ingeniería genética en diversas enzimas CGL modificadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0037] Se proporcionan métodos para usar enzimas terapéuticas modificadas que degradan la homocisteína y homocistina para tratar enfermedades, tales como la homocistinuria e hiperhomocisteinemia. Las enzimas terapéuticas incluyen el mutante hCGL-NLV (E59N, R119L, E339V) así como enzimas cistationina-γ-liasas (hCGL) humanas modificadas por ingeniería genética de manera recombinante con actividad de homocist(e)inasa mejorada en relación con el mutante hCGL-NLV. Los mutantes que muestran mayor actividad catalítica requieren menores concentraciones de agentes terapéuticos para la dosis a pacientes.

I. Definiciones

[0038] Como se usa en la presente los términos “enzima” y “proteína” y “polipéptido” se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y se usan de manera intercambiable.

[0039] Como se usa en la presente, la expresión “proteína de fusión” se refiere a una proteína quimérica que contiene proteínas o fragmentos de proteínas ligados operativamente de una manera no nativa.

[0040] Como se usa en la presente, la expresión “semivida” ($\frac{1}{2}$ vida) se refiere al tiempo que se requeriría para que la concentración de un polipéptido disminuya a la mitad *in vitro* (por ejemplo, según se mide en medio de cultivo celular) o *in vivo* (por ejemplo, según se mide en suero), por ejemplo, luego de la inyección en un mamífero. Los métodos para medir la “semivida” incluyen el uso de anticuerpos específicos para CGL o PEG usados en un formato ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) de modo que la cantidad física de proteína se mide como una función de tiempo. Otros

métodos relacionados con la medición de la semivida incluyen determinar la actividad catalítica del fármaco de enzimas como una función de tiempo mediante cualquier ensayo que detecte la producción de cualquier sustrato que resulte de la conversión de la homocist(e)ína, en productos tales como alfa-cetobutirato, metanotiol, y/o amoníaco.

[0041] Las expresiones “en combinación operable”, “en orden operable”, y “ligado operativamente” se refieren a un enlace en donde los componentes descritos de esta manera tienen una relación que les permite funcionar de la manera deseada, por ejemplo, un enlace de secuencias de ácido nucleico de manera que una molécula de ácido nucleico sea capaz de dirigir la transcripción de un determinado gen y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada, o un enlace de secuencias de aminoácido de manera que se produzca una proteína de fusión.

[0042] El término “ligador” se refiere a un compuesto o porción que actúa como un puente molecular para ligar operativamente dos moléculas diferentes, en donde una porción del ligador está ligada operativamente a una primera molécula, y en donde otra porción del ligador está ligada operativamente a una segunda molécula.

[0043] La expresión “PEGilado” se refiere a la conjugación con polietilenglicol (PEG), que se ha usado ampliamente como un portador de fármacos, debido a su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. PEG se puede acoplar (por ejemplo, ligarse de manera covalente) a agentes activos a través de los grupos hidroxilo al extremo de la cadena de PEG mediante métodos químicos; sin embargo, PEG en sí está limitado a, como máximo, dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, los copolímeros de PEG y aminoácidos se han analizado como biomaterial novedoso que mantendría la biocompatibilidad de PEG, pero que tendría la ventaja adicional de numerosos puntos de unión por molécula (por ende, proporciona mayor carga de fármaco), y que se puede diseñar sintéticamente para adecuarse a una variedad de aplicaciones.

[0044] El término “gen” se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias de control y codificación necesarias para la producción de un polipéptido o un precursor de este. El polipéptido se puede codificar mediante una secuencia de codificación de longitud completa o mediante cualquier porción de la secuencia de codificación de manera que se mantiene la actividad enzimática deseada.

[0045] El término “nativo” se refiere a la forma típica o de tipo silvestre de un gen, un producto génico o una característica de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente natural. En contraste, los términos “modificado”, “variante”, “mutéina”, o “mutante” se refieren a un gen o producto génico que muestra

modificaciones en la secuencia y las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen o producto génico nativo, en donde el gen o producto génico modificado se modifica por ingeniería genética y no está presente de manera natural.

[0046] El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para introducción en una célula en donde se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser “exógena”, lo que significa que es extraña a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia no se encuentra generalmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus de plantas), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). La persona del oficio de nivel medio estará preparada para construir un vector por medio de técnicas recombinantes estándar (ver, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994, que se incorporan en la presente por referencia).

[0047] El término “vector de expresión” se refiere a cualquier tipo de constructo genético que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN que se puede transcribir. En algunos casos, las moléculas de ARN luego se traducen en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de “secuencias de control”, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia de codificación ligada operativamente en una célula huésped particular. Además de las secuencias de control que manejan la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones.

[0048] La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en la presente se refiere a una cantidad de una composición terapéutica (es decir, una enzima CGL modificada o un ácido nucleico que codifica tal enzima) que se utiliza en métodos para lograr un efecto terapéutico, es decir, para disminuir la homocist(e)ína en la circulación de un paciente a un nivel que está en un valor de referencia normal o por debajo de este. La expresión “beneficio terapéutico” o “terapéuticamente eficaz” como se usa en esta solicitud se refiere a aquello que promueva o mejore el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de esta afección. Esto incluye, entre otros, una reducción de la frecuencia o gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad,

tales como niveles elevados (por ejemplo, más de 15 $\mu\text{mol/l}$) en suero de homocisteína total. Los rangos de dosis para la administración de composiciones terapéuticas son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que se reducen los síntomas de la homocistinuria. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición terapéutica puede ser una cantidad tal que, cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable, es suficiente para lograr una concentración intravascular (plasmática) de alrededor de 0,001 a alrededor de 100 unidades (U) por ml, preferentemente, más de alrededor de 0,1 U, y con mayor preferencia, más de 1,0 U de enzimas CGL modificadas por ml. Las dosis típicas se pueden administrar en función de peso corporal, y están en el rango de alrededor de 1-100 U/kilogramo (kg)/día, alrededor de 2-25 U/kg/día, y con mayor preferencia alrededor de 2,0-8,0 U/kg/día. Una cantidad de ejemplo puede ser de 5,0 U/kg/día o 35 U/kg/semana. La dosis no debe ser tan grande para causar efectos secundarios adversos, tales como síndrome de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, y similares. En general, la dosis varía según la edad, la afección y el sexo del paciente y el alcance de la enfermedad en el paciente, y puede ser determinada por la persona del oficio de nivel medio. El médico particular puede ajustar la dosis en caso de cualquier complicación. La dosis debe dar como resultado la reducción del contenido de tHcy en suero de un sujeto en al menos un 50 %, al menos un 60 %, y al menos un 70 % dentro de alrededor de 12 a 24 horas. La dosis puede dar como resultado la reducción del contenido de tHcy en el suero de un sujeto en al menos un 50 % a 70 % dentro de 6 horas. La dosis que genera una respuesta estadísticamente significativa debe dar como resultado la reducción del contenido de tHcy en el suero del sujeto a un nivel dentro de dos desviaciones estándar del nivel de referencia divulgado en Nygard et al. (1998). De este modo, la dosis puede dar como resultado la reducción del contenido de tHcy en el suero del sujeto a un nivel de menos de 20-25 μM .

[0049] La expresión " K_M " como se usa en la presente se refiere a la constante de Michaelis-Menten para una enzima y se define como la concentración del sustrato específico en el que una determinada enzima produce la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por enzima. La expresión " k_{cat} " como se usa en la presente se refiere a la cantidad de recambio o la cantidad de moléculas de sustrato que cada sitio de enzima convierte en producto por unidad de tiempo, y con la que la enzima trabaja con máxima eficacia. La expresión " k_{cat}/K_M " como se usa en la presente es la constante de especificidad, que es una medida de qué tan eficazmente una enzima convierte un sustrato en un producto.

[0050] La expresión “cistationina-γ-liasa” (CGL o cistationasa) se refiere a cualquier enzima que cataliza la hidrólisis de la cistationina a cisteína. Como se usan en la presente, las expresiones también contemplan formas de primato de cistationina-γ-liasa (o cistationina-gamma-liasa), que incluyen la forma humana de cistationina-γ-liasa.

[0051] “Tratamiento” y “tratar” se refieren a la administración o aplicación de un agente terapéutico a un sujeto o la realización de un procedimiento o modalidad en un sujeto con el fin de obtener un beneficio terapéutico de una enfermedad o afección relacionada con la salud. Por ejemplo, un tratamiento puede incluir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una homocist(e)inasa.

[0052] “Sujeto” y “paciente” se refieren a un ser humano o no humano, tales como primates, mamíferos y vertebrados. El sujeto puede ser un ser humano.

II. Cistationina-γ-liasa

[0053] Una liasa es una enzima que cataliza la rotura de diversos enlaces químicos y a menudo forma un nuevo enlace doble o una estructura de anillo. Por ejemplo, una enzima que cataliza esta reacción sería una liasa: $ATP \rightarrow cAMP + PPi$. Las liasa difieren de otras enzimas en que solo requieren un sustrato para la reacción en una dirección, pero dos sustratos para la reacción inversa.

[0054] Una cantidad de enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP) se involucran en el metabolismo de la cisteína, homocisteína, y metionina, y estas enzimas forman una familia relacionada en términos evolutivos, denominadas enzimas dependientes de PLP del metabolismo Cys/Met. Estas enzimas son proteínas de alrededor de 400 aminoácidos y el grupo PLP está unido a un residuo de lisina ubicado en la ubicación central del polipéptido. Los miembros de esta familia incluyen cistationina-γ-liasa (CGL), cistationina-γ-sintasa (CGS), cistationina-β-liasa (CBL), metionina-γ-liasa (MGL), y O-acetilhomoserina (OAH)/O-acetil-serina (OAS) sulfhidrilasa (OSHS). Es común a todos ellos la formación de un complejo de Michaelis que genera una aldimina de sustrato externo. El curso adicional de la reacción se determina mediante la especificidad de sustrato de la enzima particular.

[0055] Por ejemplo, los inventores introdujeron mutaciones específicas en un miembro de la familia de liasa dependiente de PLP, tal como la cistationina-γ-liasa humana, para cambiar su especificidad de sustrato. De esta forma, los inventores produjeron variantes novedosas con la habilidad *de novo* de degradar la homocist(e)ína como un sustrato con mayor actividad catalítica que hGGL-NLV. También se puede contemplar una modificación de otras enzimas dependientes de PLP para producir

actividad de degradación de homocist(e)ína novedosa.

[0056] La CGL es un tetrámero que cataliza la última etapa en la vía de transulfuración en mamíferos (Rao *et al.*, 1990). La CGL cataliza la conversión de L-cistationina en L-cisteína, alfa-cetobutirato, y amoníaco. El piridoxal fosfato es un grupo prostético de esta enzima. Se usó la modificación por ingeniería genética de proteínas para convertir la cistationasa, que solo tiene poca actividad para la degradación de la homocisteína y homocistina, en una enzima que puede degradar la homocisteína y homocistina a una velocidad elevada (patente estadounidense N.º 9.481.877, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

III. Modificación por ingeniería genética de homocist(e)inasa

[0057] Como los seres humanos no producen homocist(e)inasa es necesario modificar por ingeniería genética la homocist(e)inasa para el tratamiento en seres humanos que tienen alta actividad y especificidad para degradar homocist(e)ína en condiciones fisiológicas, así como alta estabilidad en fluidos fisiológicos, tales como suero, y también son no inmunógenas porque son proteínas nativas que en general provocan tolerancia inmunitaria.

[0058] Debido a los efectos inmunógenos no deseados que se observaron en estudios de animales con pMGL (MGL de *P. putida*), es deseable modificar por ingeniería genética la actividad de degradación de homocist(e)ína en una enzima humana. La tolerancia inmunitaria a proteínas humanas hace probable que tal enzima sea no inmunógena o mínimamente inmunógena y, por lo tanto, bien tolerada.

[0059] Si bien los mamíferos no tienen homocist(e)inasa, sí tienen cistationina-γ-liasa (CGL). La CGL es un tetrámero que cataliza la última etapa en la vía de transulfuración en mamíferos (Rao *et al.*, 1990). La CGL cataliza la conversión de L-cistationina en L-cisteína, alfa-cetobutirato, y amoníaco. Previamente, se había clonado y expresado cADN CGL humana (hCGL), pero con rendimientos relativamente bajos (~5 mg/l de cultivo) (Lu *et al.*, 1992; Steegborn *et al.*, 1999).

[0060] De este modo, se proporcionan métodos y composiciones relacionadas con una cistationina-γ-liasa (CGL o cistationasa) de primate (particularmente, ser humano) modificada por medio de mutagénesis para hidrolizar la homocist(e)ína con alta eficacia.

[0061] Se describen enzimas CGL modificadas que exhiben al menos una actividad funcional que es comparable a una enzima CGL no modificada. Una enzima CGL modificada puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad en suero. Las enzimas CGL modificadas incluyen, por ejemplo, una proteína que posee

una ventaja adicional, tal como la actividad de la enzima homocist(e)inasa, en comparación con la enzima CGL no modificada. La proteína o polipéptido no modificado puede ser una cistationina-γ-liasa nativa, tal como una cistationina-γ-liasa humana.

[0062] La determinación de la actividad se puede lograr usando ensayos familiares para las personas del oficio de nivel medio, en particular, con respecto a la actividad de la enzima, y puede incluir con fines comparativos, por ejemplo, el uso de versiones nativas y/o recombinantes de la enzima modificada o no modificada. Por ejemplo, la actividad de homocist(e)inasa se puede determinar mediante cualquier ensayo para detectar la producción de cualquier sustrato que deriva de la conversión de homocist(e)ína, tales como alfa-cetobutirato, metanetiol, y/o amoníaco.

[0063] Una enzima CGL modificada, se puede identificar en función de su aumento en la actividad de degradación de homocist(e)ína. Por ejemplo, se pueden identificar sitios de reconocimiento de sustrato del polipéptido no modificado. Esta identificación se puede basar en un análisis estructural o un análisis de homología. Se puede generar una población de mutantes que implique modificaciones de tales sitios de reconocimiento de sustrato. Los mutantes con mayor actividad de degradación de homocist(e)ína se pueden seleccionar de la población de mutantes. La selección de mutantes deseados puede incluir métodos, tales como detección de subproductos o productos de la degradación de homocist(e)ína.

[0064] Las enzimas CGL modificadas pueden tener eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos; de este modo, una enzima con una eliminación, una enzima con una sustitución, y una enzima con una eliminación y una sustitución son enzimas CGL modificadas. Estas enzimas CGL modificadas también puede incluir inserciones o aminoácidos agregados, tales como proteínas de fusión o proteínas con ligadores. Una “enzima CGL eliminada modificada” carece de uno o más residuos de la enzima nativa, pero puede poseer la especificidad y/o actividad de la enzima nativa. Una enzima CGL eliminada modificada también puede tener antigenicidad o inmunogenicidad reducida. Un ejemplo de una enzima CGL eliminada modificada es una en la que se elimina un residuo aminoácido de al menos una región antigénica, es decir, una región de la enzima que se determina que es antigénica en un organismo particular, tal como el tipo de organismo al que se le puede administrar la enzima CGL modificada.

[0065] Las variantes de sustitución y reemplazo pueden contener el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína y se puede diseñar para modular una o más propiedades del polipéptido, en particular, sus funciones

efectoras y/o biodisponibilidad. Las sustituciones pueden o no ser conservadoras, es decir, un aminoácido se reemplaza con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras son conocidas en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina, o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

[0066] Además de una eliminación o sustitución, una enzima CGL modificada puede poseer una inserción de residuos, que generalmente implica la adición de al menos un residuo en la enzima. Esto puede incluir la inserción de un péptido o polipéptido diana o simplemente un residuo único. Las adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión, se analizan más adelante.

[0067] La expresión “equivalente biológicamente funcional” es conocida en el estado de la técnica y se define en mayor detalle en la presente. En consecuencia, las secuencias de enzima CGL que tienen alrededor de 90 % o más de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 1, o incluso entre alrededor de 91 % y alrededor de 99 % de aminoácidos (que incluye 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, y 99 %) que son idénticos a, o una sustitución conservadora de, los aminoácidos de una enzima CGL modificada divulgada en la presente se incluyen, siempre que la actividad biológica de la enzima se mantenga de modo que un parámetro de actividad biológica medible (por ejemplo, conversión de homocist(e)ína a alfa-cetobutirato, metanetiol, y amoníaco) esté dentro de alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, o alrededor de 5 % de una enzima CGL modificada divulgada en la presente. Una enzima CGL modificada puede ser un equivalente biológicamente funcional a su equivalente no modificada.

[0068] Cabe destacar también que las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos adicionales del terminal N o C o secuencias 5' o 3', y aún así ser esencialmente como se indica en una de las secuencias divulgadas en la presente, siempre que la secuencia cumpla con los criterios indicados más arriba, que incluyen el mantenimiento de la actividad de las proteínas biológicas en lo que se refiere a la expresión de proteínas. La adición de secuencias terminales se aplica en particular a las secuencias de ácido nucleico que pueden incluir, por ejemplo, distintas secuencias no codificantes que flanquean las

porciones 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir distintas secuencias internas, es decir, intrones, que suelen ocurrir en los genes.

[0069] En particular, se descubrió que cinco posiciones además de los tres sitios de aminoácidos (es decir, E59N-R119L-E339V) confieren actividad mejorada en comparación con hCGL-NLV (SEQ ID NO: 2). Estas posiciones adicionales se ubican en los residuos hCGL (SEQ ID NO: 1) 63, 91, 268, 311, y 353 (ver, Figura 6). La mutación de una o más de estas posiciones a S63L, L91M, K268R, T311G, y I353S, en combinación con mutaciones de residuos en las posiciones 59, 119, y 339, dio como resultado una actividad mejorada en comparación con hCGL-NLV. En particular, las variantes contenían sustituciones de aminoácidos que correspondían a SEQ ID NO: 3, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-1); SEQ ID NO: 4, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-2); SEQ ID NO: 5, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-3); SEQ ID NO: 6, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-4); SEQ ID NO: 27, hCGL-E59N-R119L-T336D-E339V (hCGL-NLDV); SEQ ID NO: 28, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-1); SEQ ID NO: 29, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-2); SEQ ID NO: 30, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-3); SEQ ID NO: 31, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336D-E339V-I353S (hCGL-9mutD-4); SEQ ID NO: 32, hCGL-E59N-R119L-T336E-E339V (hCGL-NLEV); SEQ ID NO: 33, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-1); SEQ ID NO: 34, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-2); SEQ ID NO: 35, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-3); SEQ ID NO: 36, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-T336E-E339V-I353S (hCGL-9mutE-4); SEQ ID NO: 37, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119D-K268R-T311G-E339V-I353S (Mutante 3); SEQ ID NO: 38, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119H-K268R-T311G-E339V-I353S (Mutante 4); y SEQ ID NO: 39, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119G-K268R-T311G-E339V-I353S (Mutante 5).

IV. Disminución de homocist(e)ína enzimática para tratamiento

[0070] Los polipéptidos se pueden usar para el tratamiento de enfermedades, tales como homocistinuria, con nuevas enzimas que disminuyen la homocistina y/o homocisteína. Se divulgan métodos de tratamiento que usan CGL modificadas con actividad de degradación de L-cist(e)ína. Se proporcionan enzimas con actividad de degradación de homocist(e)ína para mayor eficacia terapéutica.

[0071] Se proporcionan enzimas CGL modificadas con actividad de degradación de homocist(e)ína para tratar enfermedades, tales como homocistinuria. En particular, el polipéptido modificado puede tener secuencias de polipéptidos humanos y así puede prevenir reacciones inmunógenas adversas cuando se administra a pacientes humanos, permitir dosis repetidas, y aumentar la eficacia terapéutica.

[0072] La disminución se puede llevar a cabo *in vivo* en la circulación de un mamífero, *in vitro* en casos en donde se desea la disminución de homocist(e)ína en cultivo de tejido u otro medio biológico, y en procedimientos *ex vivo* en donde los fluidos biológicos, células, o tejidos se manipulan fuera del cuerpo y luego se vuelven a colocar en el cuerpo del mamífero paciente. La disminución de homocist(e)ína de la circulación, medio de cultivo, fluidos biológicos, o células se lleva a cabo para reducir la cantidad de homocist(e)ína accesible al material que se trata y, por lo tanto, comprende poner en contacto el material que se desea disminuir con una cantidad de disminución de homocist(e)ína de la enzima modificada por ingeniería genética en condiciones de disminución de homocist(e)ína de modo de degradar la homocist(e)ína ambiente en el material que entra en contacto.

[0073] La eficacia de disminución de homocist(e)ína puede variar ampliamente según la aplicación, y en general depende de la cantidad de homocist(e)ína presente en el material, la velocidad de disminución deseada, y la tolerancia del material para exposición a homocist(e)inasa. Los niveles de homocist(e)ína en un material y, por lo tanto, las velocidades de disminución de homocist(e)ína del material, se pueden monitorear fácilmente mediante una variedad de métodos químicos y bioquímicos conocidos en el estado de la técnica. Las cantidades de disminución de homocist(e)ína se describen en más detalle en la presente, y pueden variar de 0,001 a 100 unidades (U) de enzima modificada por ingeniería genética, preferentemente, alrededor de 0,01 a 10 U, y con mayor preferencia, de alrededor de 0,1 a 5 U de enzima modificada por ingeniería genética por mililitro (ml) de material a tratar.

[0074] Las condiciones de disminución de homocist(e)ína son condiciones de amortiguación y temperatura compatibles con la actividad biológica de una enzima de homocist(e)inasa, e incluyen temperatura moderada, sal, y condiciones de pH compatibles con la enzima, por ejemplo, condiciones fisiológicas. Las condiciones de ejemplo incluyen alrededor de 4-40 °C, intensidad iónica equivalente a alrededor de 0,05 a 0,2 M de NaCl, y un pH de alrededor de 5 a 9, mientras que se incluyen las condiciones fisiológicas.

[0075] El contacto *in vivo* se puede lograr al administrar, mediante inyección

intravenosa o intraperitoneal, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que comprende una enzima CGL modificada a un paciente, por lo que disminuye la homocist(e)ína en circulación presente en el paciente.

[0076] La enzima CGL modificada se puede administrar por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual en el tiempo. La enzima CGL modificada se puede administrar por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, se puede inyectar directamente en el tejido que contiene las células tumorales, o se puede administrar mediante una bomba conectada a un catéter que puede contener un biosensor potencial u homocist(e)ína.

[0077] Las composiciones terapéuticas que contienen enzima CGL modificada convencionalmente se administran por vía intravenosa, por ejemplo, mediante inyección de una dosis unitaria. La expresión “dosis unitaria” cuando se usa en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido, es decir, portador o vehículo.

[0078] Las composiciones se administran de manera compatible con la formulación de dosis, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se administrará depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades exactas de ingrediente activo que se necesitan administrar dependen del criterio del profesional y son particulares para cada individuo. Sin embargo, los rangos de dosis adecuados para aplicación sistémica se divulgan en la presente y dependen de la vía de administración. Asimismo, se contemplan los regímenes adecuados para la administración inicial e inyecciones de refuerzo y se tipifican por una administración inicial, seguida de dosis repetidas en uno o más intervalos de una hora y luego una inyección posterior u otro tipo de administración. Las administraciones múltiples de ejemplo se describen en la presente y se prefieren particularmente para mantener niveles constantemente altos de suero y tejido de la enzima CGL modificada y, por el contrario, niveles bajos de suero y tejido de homocist(e)ína. De manera alternativa, se contemplan la infusión intravenosa continua suficiente para mantener las concentraciones en sangre en los rangos especificados para los tratamientos *in vivo*. De manera notable, la dosis semanal de enzimas CGL modificadas para el tratamiento de homocistinuria e hiperhomocisteinemia es alrededor de un cuarto de la dosis semanal requerida para el tratamiento del cáncer. Patente estadounidense N.º

9.481.877.

V. Conjugados

[0079] Las composiciones y métodos proporcionados implican modificación adicional de la enzima CGL modificada para mejora, tal como mediante formación de conjugados con segmentos de péptidos heterólogos o polímeros, tal como polietilenglicol. La enzima CGL modificada puede unirse a PEG para aumentar el radio hidrodinámico de la enzima y, por consiguiente, aumentar la persistencia del suero. El polipéptido divulgado se puede conjugar con cualquier agente diana, tal como un ligando que tiene la capacidad de unirse en forma específica y estable a un receptor externo o sitio de fijación en una célula tumoral (publicación de patente estadounidense 2009/0304666). El PEG puede ser de alrededor de 3.000 a 20.000 daltones en tamaño, en donde el tamaño de ejemplo es 5.000 daltones.

A. Proteínas de fusión

[0080] Se proporcionan proteínas de fusión en las que la enzima CGL modificada se puede unir a un terminal N o C de un dominio heterólogo. Por ejemplo, las fusiones pueden usar también secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un huésped heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de etiqueta de afinidad de proteína, tal como una etiqueta de afinidad de albúmina de suero o seis residuos de histidina, o un dominio inmunológicamente activos, tal como un epítipo de anticuerpo, preferentemente, escindible, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. Las etiquetas de afinidad no limitativas incluyen polihistidina, proteína de fijación a quitina (CBP), proteína de fijación a maltosa (MBP), y glutatión-S-transferasa (GST).

[0081] La enzima CGL modificada se puede unir a un péptido que aumenta la semivida *in vivo*, tal como un polipéptido XTEN (Schellenberger *et al.*, 2009), dominio Fc de IgG, albúmina, o un péptido de fijación a albúmina.

[0082] Los métodos para generar proteínas de fusión son conocidos para las personas del oficio de nivel medio. Tales proteínas se pueden producir, por ejemplo, mediante síntesis *de novo* de la proteína de fusión completa, o mediante unión de la secuencia de ADN que codifica el dominio heterólogo, y luego la expresión de la proteína de fusión intacta.

[0083] La producción de proteínas de fusión que recuperan las actividades funcionales de las proteínas de origen se puede facilitar al poner en contacto los genes con un segmento de ADN en puente que codifica un ligador peptídico que se empalma entre los polipéptidos conectados en tándem. El ligador debería ser de la longitud

suficiente para permitir el plegamiento adecuado de la proteína de fusión resultante.

B. Ligadores

[0084] La enzima CGL modificada se puede conjugar químicamente usando reactivos de reticulación bifuncionales o fusionar al nivel de la proteína con ligadores peptídicos. Los reactivos de reticulación bifuncionales se usan en gran medida para una variedad de fines, que incluyen la preparación de matrices de afinidad, la modificación y estabilización de estructuras diversas, la identificación de sitios de fijación a receptores y ligandos, y estudios estructurales. Los ligadores peptídicos adecuados también se pueden usar para unir la enzima CGL modificada, tal como los ligadores Gly-Ser.

[0085] Los reactivos homobifuncionales que tienen dos grupos funcionales idénticos pueden inducir la reticulación entre macromoléculas idénticas y diferentes o subunidades de una macromolécula, y unir los ligandos de polipéptidos a sus sitios de fijación específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Al tomar ventaja de las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales diferentes, la reticulación se puede controlar tanto de manera selectiva como secuencial. Los reactivos de reticulación bifuncionales se pueden dividir de acuerdo con la especificidad de sus grupos funcionales, por ejemplo, grupos amino, sulfhidrilo, guanidina, indol y carboxilo específicos. De estos, los reactivos que actúan sobre grupos amino libres se volvieron populares debido a su disponibilidad en el comercio, facilidad de síntesis, y las condiciones de reacción leve en las que se pueden aplicar.

[0086] Algunos reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen un grupo reactivo con aminas y un grupo reactivo con tiol. En otro ejemplo, se describen reactivos de reticulación heterobifuncionales y métodos para usar los reactivos de reticulación (patente estadounidense N.º 5.889.155, que se incorpora específicamente en la presente por referencia en su totalidad). Los reactivos de reticulación combinan un residuo de hidrazida nucleófilo con un residuo de maleimida electrófilo, lo que permite el acoplamiento, en un ejemplo, de aldehídos a tioles libres. El reactivo de reticulación se puede modificar para reticular distintos grupos funcionales.

[0087] Adicionalmente, cualquier otro agente de unión/acoplamiento y/o mecanismo conocido para las personas del oficio de nivel medio se pueden usar para combinar enzimas CGL modificadas, tales como, por ejemplo, interacción anticuerpo-antígeno, enlaces avidina biotina, enlaces amida, enlaces éster, enlaces tioéster, enlaces éter, enlaces tioéter, enlaces fosfoéster, enlaces fosforamida, enlaces anhídridos, enlaces disulfuro, interacciones iónicas e hidrófobas, anticuerpos

biespecíficos y fragmentos de anticuerpo, o combinaciones de estos.

[0088] Se prefiere el uso de un reticulador que tenga estabilidad razonable en sangre. Se conocen numerosos tipos de enlaces que contienen puentes disulfuro que se pueden usar exitosamente para conjugar agentes dirigidos y terapéuticos/preventivos. Los ligadores que contienen un puente disulfuro con impedimento estérico pueden proporcionar mayor estabilidad *in vivo*. De este modo, tales ligadores son un grupo de agentes de unión.

[0089] Además de los reticuladores con impedimento, se pueden usar ligadores sin impedimento de acuerdo con la presente. Otros reticuladores útiles, que se considera no contienen ni generan un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP, y 2-iminotiolano (Wawrzynczak and Thorpe, 1987). El uso de tales reticuladores es conocido en el estado de la técnica. También se pueden usar ligadores flexibles.

[0090] En general, una vez que se conjuga químicamente, el péptido se purificará para separar el conjugado de agentes no conjugados y de otros contaminantes. Un gran número de técnicas de purificación están disponibles para proporcionarle a los conjugados un grado de pureza suficiente para que sean útiles clínicamente.

[0091] Los métodos de purificación con base en la separación de tamaño, tal como filtración en gel, permeación en gel, o cromatografía de líquidos de alta resolución, generalmente serán los más útiles. También se pueden usar otras técnicas cromatográficas, tales como separación con Blue-Sepharose. Los métodos convencionales para purificar las proteínas de fusión de cuerpos de inclusión pueden ser útiles, tal como usar detergentes débiles, tal como N-lauroil-sarcosina de sodio (SLS).

C. PEGilación

[0092] Se divulgan métodos y composiciones relacionadas con la PEGilación de la enzima CGL modificada. Por ejemplo, la enzima CGL modificada se puede PEGilar de acuerdo con los métodos divulgados en la presente.

[0093] La PEGilación es el proceso de unión covalente de cadenas de polímeros de poli(etilenglicol) a otra molécula, generalmente, un fármaco o proteína terapéutica. La PEGilación se logra rutinariamente mediante incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La fijación covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede “enmascarar” el agente del sistema inmunitario del huésped (inmunogenicidad reducida y antigenicidad) o aumentar el tamaño de hidrodinámica (tamaño en solución) del agente, que prolonga su tiempo circulatorio al reducir la

depuración renal. La PEGilación también puede proporcionar hidrosolubilidad a los fármacos y proteínas hidrófobos.

[0094] La primera etapa de la PEGilación es la funcionalización adecuada del polímero PEG en uno o ambos terminales. Los PEG que se activan en cada terminal con la misma porción reactiva son conocidos como “homobifuncionales”, mientras que si los grupos funcionales presentes son diferentes, entonces el derivado de PEG se menciona como “heterobifuncional” o “heterofuncional.” Los derivados químicamente activos o activados del polímero PEG se preparan para fijar el PEG a la molécula deseada.

[0095] La elección del grupo adecuado para el derivado de PEG se basa en el tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se acoplará al PEG. Para las proteínas, los aminoácidos reactivos típicos incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, y tirosina. También se pueden usar el grupo amino de terminal N y el ácido carboxílico de terminal C.

[0096] Las técnicas usadas para formar derivados de PEG de primera generación generalmente hacen reaccionar el polímero PEG con un grupo que es reactivo con grupos hidroxilo, en general, anhídridos, cloruros ácidos, cloroformatos, y carbonatos. En la química de PEGilación de segunda generación, grupos funcionales más eficaces, tal como aldehído, ésteres, amidas, etc., están disponibles para conjugación.

[0097] A medida que las aplicaciones de la PEGilación se vuelven cada vez más avanzadas y sofisticadas, hay un aumento en la necesidad de PEG heterobifuncionales para conjugación. Estos PEG heterobifuncionales son muy útiles para unir dos entidades, en donde se necesita un espaciador hidrófilo, flexible y biocompatible. Los grupos terminales preferidos para PEG heterobifuncionales son maleimida, sulfonas de vinilo, disulfuro de piridilo, amina, ácidos carboxílicos, y ésteres de NHS.

[0098] Los agentes de modificación, o ligadores, más comunes se basan en moléculas de metoxi PEG (mPEG). Su actividad depende de agregar un grupo que modifica proteínas al terminal alcohol. En algunos casos, se usa polietilenglicol (PEG diol) como molécula precursora. El diol se modifica posteriormente en ambos terminales para formar una molécula ligada a PEG hetero- u homodimérico.

[0099] Las proteínas generalmente se PEGilan en sitios nucleófilos, tales como tioles no protonados (residuos de cisteinilo) o grupos amino. Los ejemplos de reactivos de modificación específica de cisteinilo incluyen PEG maleimida, PEG yodoacetato, PEG tioles, y PEG vinilsulfona. Los cuatro son fuertemente específicos de cisteinilo en

condiciones leves y neutrales a pH ligeramente alcalino, pero cada uno tiene sus desventajas. El tioéter formado con las maleimidas pueden ser un poco inestable en condiciones alcalinas, por lo que puede haber algunas limitaciones a las opciones de formulación con este ligador. El enlace de carbamotioato formado con PEG yodo es más estable, pero el yoduro libre puede modificar los residuos de tirosina en algunas condiciones. Los PEG tioles forman puentes disulfuro con los tioles de proteína, pero este enlace también puede ser inestable en condiciones alcalinas. La reactividad de PEG-vinilsulfona es relativamente lenta en comparación con PEG maleimida y yodo; sin embargo, el enlace de tioéter formado es bastante estable. Su velocidad de reacción más lenta puede hacer que la reacción con PEG-vinilsulfona sea más fácil de controlar.

[00100] La PEGilación específica de sitio en los residuos de cisteinilo nativo raramente se lleva a cabo, dado que estos residuos generalmente están en forma de puentes disulfuro o requieren actividad biológica. Por otro lado, la mutagénesis dirigida al sitio se puede usar para incorporar sitios de PEGilación de cisteinilo para ligadores específicos de tiol. La mutación de cisteína se debe designar de manera que sea accesible al reactivo de PEGilación y sigue siendo biológicamente activo después de la PEGilación.

[00101] Los agentes de modificación específicos de amina incluyen PEG NHS éster, PEG tresilato, PEG aldehído, PEG isotiocianato, y varios otros. Todos reaccionan en condiciones leves y son muy específicos para grupos amino. El PEG NHS éster es probablemente uno de los agentes más reactivos; sin embargo, su alta reactividad puede hacer que la reacción de PEGilación sea difícil de controlar a gran escala. El PEG aldehído forma una imina con el grupo amino, que luego se reduce a una amina secundaria con cianoborohidruro de sodio. A diferencia del borohidruro de sodio, el cianoborohidruro no reducirá los puentes disulfuro. Sin embargo, este producto químico es altamente tóxico y se debe manipular con cuidado, en particular, a un pH menor porque se vuelve volátil.

[00102] Debido a los múltiples residuos de lisina en la mayoría de las proteínas, la PEGilación específica de sitio puede ser un desafío. Afortunadamente, debido a que estos reactivos reaccionan con grupos amino no protonados, es posible dirigir la PEGilación a los grupos amino de menor pK al llevar a cabo la reacción a un pH menor. En general, la pK del grupo alfa-amino es 1-2 unidades de pH menor que el grupo épsilon-amino de residuos de lisina. Al PEGilar la molécula a pH 7 o menor, frecuentemente se puede alcanzar una alta selectividad para el terminal N. Sin embargo, esto solo es posible si la porción terminal N de la proteína no se requiere para

actividad biológica. Además, los beneficios farmacocinéticos de la PEGilación con frecuencia superan una pérdida significativa de bioactividad *in vitro*, lo que da como resultado un producto con mucha más bioactividad *in vivo* independientemente de la química de PEGilación.

[00103] Hay varios parámetros para considerar al desarrollar un procedimiento de PEGilación. Afortunadamente, en general, no son más de cuatro o cinco parámetros. El enfoque de “diseño de los experimentos” para optimización de las condiciones de PEGilación puede ser muy útil. Para las reacciones de PEGilación específicas de tiol, los parámetros a considerar incluyen: concentración proteica, relación PEG-a-proteína (en moles), temperatura, pH, tiempo de reacción y, en algunos casos, la exclusión de oxígeno. (El oxígeno puede contribuir a la formación de disulfuro intermolecular mediante la proteína, que reducirá el rendimiento del producto PEGilado). Los mismos factores deberían considerarse (con excepción del oxígeno) para una modificación específica de amina excepto en que el pH puede ser aún más crucial, en particular, cuando se actúa sobre un grupo amino de terminal N.

[00104] Para las modificaciones específicas de amina y tiol, las condiciones de reacción pueden afectar la estabilidad de la proteína. Esto puede limitar la temperatura, la concentración proteica, y el pH. Además, la reactividad del ligador PEG debería conocerse antes de comenzar la reacción de PEGilación. Por ejemplo, si el agente de PEGilación es solo 70 % activo, la cantidad de PEG usada debería asegurar que solo las moléculas de PEG activas se cuentan en la estequiometría de reacción de proteína-a-PEG.

VI. Proteínas y péptidos

[00105] Se proporcionan composiciones que comprenden al menos una proteína o péptido, tal como una enzima CGL modificada. Estos péptidos pueden estar comprendidos en una proteína de fusión o conjugados con un agente como se describió anteriormente.

[00106] Como se usa en la presente, una proteína o péptido generalmente se refiere, entre otros, a una proteína mayor que alrededor de 200 aminoácidos, hasta una secuencia de longitud completa traducida de un gen; un polipéptido mayor que alrededor de 100 aminoácidos; y/o un péptido de alrededor de 3 a alrededor de 100 aminoácidos. Para facilitar la explicación, los términos “proteína”, “polipéptido”, y “péptido” se usan de manera intercambiable en la presente.

[00107] En consecuencia, la expresión “proteína o péptido” comprende secuencias de aminoácidos que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos

comunes encontrados en proteínas naturales, o al menos un aminoácido modificado o no natural.

[00108] Las proteínas o péptidos se pueden elaborar mediante cualquier técnica conocida por las personas del oficio de nivel medio, que incluyen la expresión de proteínas, polipéptidos, o péptidos a través de técnicas biológicas moleculares estándar, el aislamiento de proteínas o péptidos de fuentes naturales, o la síntesis química de proteínas o péptidos. Las regiones codificantes para genes conocidos se pueden amplificar y/o expresar usando las técnicas divulgadas en la presente o conocidas por las personas del oficio de nivel medio. De manera alternativa, distintas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos, y péptidos son conocidas para las personas del oficio de nivel medio.

VII. Ácidos nucleicos y vectores

[00109] Se divulgan secuencias de ácido nucleico que codifican una enzima CGL modificada o una proteína de fusión que contiene una enzima CGL modificada. Según el sistema de expresión usado, secuencias de ácido nucleico se pueden seleccionar en función de métodos convencionales. Por ejemplo, si la enzima CGL modificada se deriva de cistationasa humana y contiene codones múltiples que raramente se utilizan en *E. coli*, ello puede interferir con la expresión. Por lo tanto, los genes respectivos o variantes de estos se pueden optimizar por codones para la expresión de *E. coli* usando software gratuito (ver Hoover & Lubkowski, 2002) para diseñar secuencias de codificación libres de codones raros. Se pueden usar distintos vectores para expresar la proteína de interés, tal como una enzima CGL modificada. Los vectores de ejemplo incluyen, entre otros, vectores de plásmidos, vectores virales, transposón, o vectores a base de liposomas.

VIII. Células huésped

[00110] Las células huésped pueden ser cualquiera que se pueda transformar para permitir la expresión y secreción de enzima CGL modificada y conjugados de esta. Las células huésped pueden ser bacterias, células de mamíferos, levaduras, u hongos filamentosos. Las distintas bacterias incluyen *Escherichia* y *Bacillus*. Las levaduras que pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, o *Pichia* podrían ser útiles como células huésped apropiadas. Distintas especies de hongos filamentosos se pueden usar como huéspedes de expresión, lo que incluye los géneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus*, y *Pyricularia*.

[00111] Los ejemplos de organismos huésped útiles incluyen bacterias,

por ejemplo, *Escherichia coli* MC1061, derivados de *Bacillus subtilis* BRB1 (Sibakov *et al.*, 1984), *Staphylococcus aureus* SAI123 (Lordanescu, 1975) o *Streptococcus lividans* (Hopwood *et al.*, 1985); levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* AH 22 (Mellor *et al.*, 1983) o *Schizosaccharomyces pombe*; y hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori* (Ward, 1989), o *Trichoderma reesei* (Penttila *et al.*, 1987; Harkki *et al.*, 1989).

[00112] Los ejemplos de células huésped de mamíferos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO-K1; American Type Culture Collection (ATCC) N.º CCL61), células pituitarias de rata (GH1; ATCC N.º CCL82), células HeLa S3 (ATCC N.º CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC N.º CRL-1548), células de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-1; ATCC N.º CRL-1650), y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC N.º CRL-1658). Lo que antecede son ejemplos ilustrativos, y no limitativos, de los distintos organismos huésped posibles conocidos en el estado de la técnica. En principio, se pueden usar todos los huéspedes capaces de secreción, sean procariotas o eucariotas.

[00113] Las células huésped de mamíferos que expresan las enzimas CGL modificadas y/o sus proteínas de fusión se cultivan en condiciones comúnmente usadas para cultivar la línea celular de origen. En general, las células se cultivan en un medio estándar que contiene sales fisiológicas y nutrientes, tales como RPMI, MEM, IMEM, o DMEM estándar, generalmente enriquecido con 5 %-10 % de suero, tal como suero bovino fetal. Las condiciones de cultivo también son estándar, por ejemplo, los cultivos se incuban a 37 °C en cultivos estacionarios o rotatorios hasta alcanzar los niveles deseados de las proteínas.

IX. Purificación de proteínas

[00114] Las técnicas de purificación de proteínas son conocidas para las personas del oficio de nivel medio. Estas técnicas implican, en un nivel, la homogenización y fraccionamiento crudo de las células, tejidos u órganos a fracciones de polipéptido y no polipéptido. La proteína o polipéptido de interés se puede purificar adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para alcanzar una purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad), a menos que se especifique lo contrario. Los métodos analíticos adecuados particularmente a la preparación de péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutaoafinidad, e isoelectroenfoque. Un método particularmente eficaz de purificar péptidos es cromatografía de líquidos de rápida resolución (FPLC) o

incluso cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

[00115] Una proteína o péptido purificado se refiere a una composición, que se puede aislar de otros componentes, en donde la proteína o péptido se purifica a cualquier grado en relación con su estado que se puede obtener naturalmente. Una proteína o péptido aislado o purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o péptido libre del ambiente en el que puede ocurrir naturalmente. En general, “purificada” se referirá a una composición de proteínas o péptidos que se sometió a fraccionamiento para eliminar otros componentes, en donde dicha composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión “sustancialmente purificado”, esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, de manera de constituir alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, o más de las proteínas en la composición.

[00116] Las distintas técnicas adecuadas para usar en la purificación de proteínas son conocidas para las personas del oficio de nivel medio. Estas incluyen, por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o mediante desnaturalización térmica, y luego centrifugación; etapas de cromatografía, tal como intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxapatita, y cromatografía de afinidad; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como se conoce en el estado de la técnica, se cree que el orden para llevar a cabo las distintas etapas de purificación se puede cambiar, o que determinadas etapas se pueden omitir, y aún así generar un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificados.

[00117] Los distintos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido son conocidos en el estado de la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de polipéptidos en una fracción mediante análisis SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, para compararla a la actividad específica del extracto inicial, y así calcular el grado de pureza en esta, evaluada mediante un “número de veces de purificación”. Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para después de la purificación, y si la proteína o péptido expresado exhiben o no una actividad que se puede detectar.

[00118] No es requisito general que la proteína o péptido siempre se proporcionará en el estado más purificado. De hecho, se contempla que productos

menos sustancialmente purificados pueden ser de utilidad. La purificación parcial se puede llevar a cabo al usar menos etapas de purificación combinadas, o al utilizar diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, cabe destacar que una cromatografía en columna de intercambio catiónico llevada a cabo mediante un aparato de HPLC generalmente producirá una purificación mayor “en veces” que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que exhiben un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto de proteína o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

[00119] Una proteína o péptido se puede aislar o purificar, por ejemplo, una enzima CGL modificada, una proteína de fusión que contienen la enzima CGL modificada, o una enzima CGL modificada después de la PEGilación. Por ejemplo, una etiqueta His o un epítipo de afinidad puede estar comprendido en tal enzima CGL modificada para facilitar la purificación. La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que depende de la afinidad específica entre una sustancia a aislar y una molécula a la que se puede fijar específicamente. Este es un tipo de interacción receptor-ligando. El material en columna se sintetiza al acoplar de manera covalente uno de los componentes de fijación a una matriz insoluble. El material en columna luego puede adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución ocurre al cambiar las condiciones a aquellas en las que no ocurrirá fijación (por ejemplo, pH alterado, intensidad iónica, temperatura, etc.). La matriz debería ser una sustancia que no adsorbe moléculas en un grado significativo y que tiene un amplio rango de estabilidad química, física y térmica. El ligando debería acoplarse de modo de no afectar sus propiedades de fijación. El ligando también debería proporcionar una fijación relativamente firme. Debería ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.

[00120] La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método cromatográfico en el que las moléculas en solución se separan en función de su tamaño, o en términos más técnicos, su volumen hidrodinámico. Se aplica usualmente a grandes moléculas o complejos macromoleculares, tales como proteínas y polímeros industriales. En general, cuando la solución acuosa se usa para transportar la muestra a través de la columna, la técnica se conoce como cromatografía de filtración en gel, en comparación con la denominación cromatografía de permeación en gel, utilizada cuando se usa un solvente orgánico como fase móvil.

[00121] El principio subyacente de SEC es que partículas de diferentes

tamaños se eluirán (filtrarán) a través de una fase estacionaria a distintas velocidades. Esto da como resultado la separación de una solución de partículas en función del tamaño. Siempre que todas las partículas se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las partículas del mismo tamaño deberían eluirse juntas. Cada columna de exclusión por tamaño tiene un rango de pesos moleculares que se pueden separar. El límite de exclusión define el peso molecular en el extremo superior de este rango y está en donde las moléculas son muy grandes para quedar atrapadas en la fase estacionaria. El límite de permeación define el peso molecular en el extremo inferior del rango de separación y está en donde las moléculas de un tamaño suficientemente pequeño pueden penetrar en los poros de la fase estacionaria completamente y todas las moléculas por debajo de esta masa molecular son tan pequeñas que se eluyen como una sola banda.

[00122] La cromatografía de líquidos de alta resolución (o cromatografía líquida de alta presión, HPLC) es una forma de cromatografía en columna usada frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar, identificar, y cuantificar compuestos. La HPLC utiliza una columna que contiene material de empaque cromatográfico (fase estacionaria), una bomba que mueve las fases móviles a través de una columna, y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas. Los tiempos de retención varían según las interacciones entre la fase estacionaria, las moléculas que se analizan, y los solventes usados.

X. Composiciones terapéuticas

[00123] El gen de cistationina-γ-liasa humano contiene múltiples codones que raramente se utilizan en *E. coli* y pueden interferir con la expresión. De este modo, con el fin de optimizar la expresión de la proteína en *E. coli*, los genes respectivos se pueden ensamblar con oligonucleótidos optimizados por codones diseñados usando el *software* DNA-Works (Hoover *et al.*, 2002). Cada constructo puede contener un sitio de restricción *NcoI* del terminal N, una etiqueta His₆ del terminal N en marco, y un sitio *EcoRI* del terminal C para simplificar la clonación. Después de clonarse en un vecotr pET28a (Novagen), *E. coli* (BL21) que contiene un vector de expresión de cistationasa apropiado se puede cultivar a 37 °C usando medio Terrific Broth (TB) que contiene 50 µg/ml de kanamicina en matraces de agitación a 250 rpm hasta alcanzar un OD₆₀₀ de ~ 0,5-0,6. A esta altura, los cultivos se pueden cambiar a un agitador a 25 °C, inducirse con 0,5 mM de IPTG, y expresar proteína durante 12 h adicionales. Los pelets celulares luego se pueden recolectar mediante centrifugación y volver a suspenderse en un amortiguador IMAC (10 mM de NaPO₄/10 mM de imidazol/300 mM de NaCl, pH 8).

Después de la lisis mediante una célula de presión francesa, los lisados se pueden centrifugar a 20.000 x g durante 20 min a 4 °C, y el sobrenadante resultante puede aplicarse a una columna IMAC níquel, lavarse exhaustivamente (90-100 volúmenes de columna) con un amortiguador IMAC que contiene 0,1 % de TRITON® 114, lavado con 10-20 volúmenes de columna de amortiguador IMAC, y luego eluirse con un amortiguador de elución IMAC (50 mM de NaPO₄/250 mM de imidazol/300 mM de NaCl, pH 8). La proteína purificada se sometió a intercambio de amortiguadores en un amortiguador de 100 mM de NaPO₄ a pH 8,3 usando un dispositivo de filtración de 10.000 MWCO (corte de peso molecular) (Amicon). Luego, las fracciones que contienen enzimas se pueden incubar con 10 mM de piridoxal-5'-fosfato (PLP) durante una hora a 25 °C. Luego se agregó metoxi PEG succinimidil carboximetil éster 5000 MW (JenKem Technology) a hCGL-8mut-1 a una relación molar de 80:1 y se hizo reaccionar durante 1 h a 25 °C con agitación continua. La mezcla resultante se intercambió en gran medida en amortiguador (PBS con 10 % de glicerol) usando un dispositivo de filtración de 100.000 MWCO (Amicon), y se esterilizó con un filtro de jeringa de 0,2 micrómetros (VWR). Las alícuotas de enzimas luego pueden ultracongelarse en nitrógeno líquido y almacenarse a -80 °C. CGL y variantes de CGL purificadas de esta manera deberían ser >95 % homogéneas como se evaluó mediante SDS-PAGE y tinción Coomassie. El rendimiento se puede calcular en función del coeficiente de extinción calculado, $\lambda_{280} = 29.870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en una concentración final de amortiguador de 6 M de clorhidrato de guanidinio, 20 mM de amortiguador de fosfato, pH 6,5 (Gill and von Hippel, 1989).

[00124] A modo de ejemplo, la estabilidad del suero de hCGL-8mut-1 PEGilado se evaluó mediante incubación de la enzima en una mezcla de suero humano a 37 °C a una concentración final de 10 µM. En diferentes puntos temporales, las alícuotas se retiraron y se evaluaron por actividad usando el ensayo DTNB (reactivo de Ellman; ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)) como se describió en la publicación de patente estadounidense 2011/0200576, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Se calculó que hCGL-8mut-1 PEGilado tenía una semivida ($T_{0,5}$) de $101 \pm 4 \text{ h}$.

[00125] No se pretende establecer ninguna limitación respecto a la naturaleza particular de la preparación terapéutica. Por ejemplo, tales composiciones se pueden proporcionar en formulaciones junto con portadores, diluyentes y excipientes sólidos, en gel o líquidos fisiológicamente tolerables. Estas preparaciones terapéuticas se pueden administrar a mamíferos para uso veterinario, tal como animales domésticos, y para uso clínico en seres humanos de manera similar a otros agentes terapéuticos.

En general, la dosis requerida para eficacia terapéutica variará de acuerdo al tipo de uso y modo de administración, así como los requisitos particularizados de los sujetos individuales.

[00126] Tales composiciones generalmente se preparan como soluciones o suspensiones líquidas, para usarse como inyectables. Los diluyentes y excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, o similares, y combinaciones de estos. Además, si se desea, las composiciones pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, agentes estabilizantes o agentes amortiguadores de pH.

[00127] Cuando se contemplan las aplicaciones clínicas, puede ser necesario preparar composiciones terapéuticas que comprenden proteínas, anticuerpos, y fármacos en una forma apropiada para la aplicación deseada. En general, las composiciones terapéuticas pueden comprender una cantidad eficaz de una o más enzimas CGL modificadas o agentes adicionales disueltos o dispersos en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Las frases "terapéutico" o "aceptable desde el punto de vista terapéutico" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inesperada cuando se las administra a un animal, tal como un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición terapéutica que contiene al menos una enzima CGL modificada aislada mediante el método divulgado en la presente, o un ingrediente activo adicional será conocida para las personas del oficio de nivel medio, como se ejemplificó en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., 1990, incorporada en la presente por referencia. Además, para la administración animal (por ejemplo, a seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general, y pureza que requiere la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

[00128] Como se usa en la presente, "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye cualquier solvente, medio de dispersión, tensioactivo, antioxidante, conservante (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agente isotónico, agente retardante de la absorción, sal, conservante, estabilizante de fármacos, gel, aglutinante, excipiente, material de este tipo, y combinaciones de estos, conocidos por las personas del oficio de nivel medio (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., 1990, que se incorpora en la presente por referencia). Excepto en la medida que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

[00129] Las composiciones se pueden administrar por vía subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, por inyección, por infusión, por infusión continua, por medio de un catéter, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otros métodos o cualquier combinación de los anteriores conocida por las personas del oficio de nivel medio (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., 1990, que se incorpora en la presente por referencia).

[00130] Los polipéptidos modificados se pueden formular en una composición en forma de base libre, neutra, o de sal. Las sales aceptables desde el punto de vista terapéutico incluyen las sales de adición ácida, por ejemplo, aquellas que se forman con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilos libre también se pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos; o bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, o procaina. Luego de la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosis y en tal cantidad como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se pueden administrar en una variedad de formas de dosis, por ejemplo, pueden formularse para administración parenteral, tal como soluciones inyectables, o aerosoles para administración a los pulmones, o formularse para administración alimentaria, tal como cápsulas de liberación de fármacos y similares.

[00131] Las composiciones divulgadas adecuadas para administración se pueden proporcionar en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico con o sin un diluyente inerte. Excepto en la medida que algún medio, agente, diluyente, o portador convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición contenida en estos, su uso en una composición administrable para usar en la práctica de los métodos es adecuado. Los ejemplos de portadores o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, y similares, o combinaciones de estos. La composición también puede comprender distintos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos se puede lograr con conservantes, tal como distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, entre otros, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de estos.

[00132] Las composiciones divulgadas se pueden combinar con el

portador de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, mediante solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción, y similares.

[00133] Se proporciona el uso de una composición terapéutica de vehículo de lípidos que incluye una enzima CGL modificada, uno o más lípidos, y un solvente acuoso. Como se usa en la presente, el término “lípidos” se definirá para incluir cualquiera de un rango amplio de sustancias que es característicamente insoluble en agua y extraíble con un solvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es conocida por las personas del oficio de nivel medio, y como se usa el término “lípidos” en la presente, no se limita a ninguna estructura en particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido generalmente es una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucosfingolípidos, glucolípidos, sulfatidas, lípidos con ácidos grasos ligados a éter y éster, lípidos polimerizables, y combinaciones de estos. Por supuesto, los compuestos distintos de aquellos descritos específicamente en la presente que la persona del oficio de nivel medio entiende como lípidos también están comprendidos por las composiciones y métodos.

[00134] La persona del oficio de nivel medio está familiarizada con la variedad de técnicas que se pueden emplear para dispersar una composición en un vehículo de lípidos. Por ejemplo, la enzima CGL modificada o una proteína de fusión de esta puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, ligarse de manera covalente a un lípido, contenerse como suspensión en un lípido, contenerse o formar un complejo con una micela o liposoma, o asociarse de otro modo con un lípido o estructura lipídica mediante cualquier medio conocido por las personas del oficio de nivel medio. La dispersión puede o no tener como resultado la formación de liposomas.

[00135] La cantidad de dosis real de una composición administrada a un paciente animal se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos, tal como peso corporal, gravedad de la afección, tipo de enfermedad tratada, intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, idiopatía del paciente, y vía de administración. Según la dosis y la vía de administración, la cantidad de administraciones de una dosis preferida y/o una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con la

respuesta del sujeto. El profesional responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingredientes activos en una composición y las dosis apropiadas para el sujeto individual.

[00136] Las composiciones terapéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos alrededor de 0,1 % de un compuesto activo. Un compuesto activo puede comprender entre alrededor de 2 % a alrededor de 75 % del peso de la unidad, o entre alrededor de 25 % a alrededor de 60 %, por ejemplo, y cualquier rango derivable de estos. Naturalmente, la cantidad de compuestos activos en cada composición útil desde el punto de vista terapéutico se puede preparar de manera que se obtenga una dosis adecuada en cualquier unidad de dosis dada del compuesto. Factores, tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, serán contemplados por la persona del oficio de nivel medio para preparar dichas formulaciones terapéuticas, y como tal, una variedad de dosis y regímenes de tratamiento puede ser deseable.

[00137] Una dosis puede comprender también de alrededor de 500 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 1 miligramo/kg de peso corporal, alrededor de 5 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 10 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 50 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 100 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 750 miligramos/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier rango derivable de estos. Si la dosis se administra semanalmente, la dosis podría ser en la cantidad de 5 mg/kg de peso corporal, o por ejemplo, 350 mg de proteína para un sujeto de 70 kg.

XI. Kits

[00138] Se proporcionan kits, tal como kits terapéuticos. Por ejemplo, un kit puede comprender una o más composiciones terapéuticas como se describió en la presente y, opcionalmente, instrucciones para su uso. Los kits también pueden comprender uno o más dispositivos para lograr la administración de dichas composiciones. Por ejemplo, un kit del sujeto puede comprender una composición terapéutica y un catéter para lograr la inyección intravenosa directa de la composición en un tejido diana. Un kit puede comprender ampollas precargadas de una enzima CGL modificada, opcionalmente formuladas como una composición terapéutica, o liofilizadas, para usar con un dispositivo de administración.

[00139] Los kits pueden comprender un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

El recipiente puede mantener una composición que incluye una enzima CGL modificada que es eficaz para las aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, como se describió anteriormente. La etiqueta en el recipiente puede indicar que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y puede también indicar direcciones para uso *in vivo* o *in vitro*, tal como aquellos descritos más arriba. Los kits generalmente comprenden el recipiente descrito más arriba y uno o más recipientes que comprenden materiales deseables desde el punto de vista del comercio y del usuario, que incluye amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones de uso.

XII. Ejemplos

[00140] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar formas de realización preferidas de la invención. La persona del oficio de nivel medio debe comprender que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas que, según descubrió el inventor, funcionan bien al poner en práctica la invención, y por eso se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, las personas del oficio de nivel medio deben comprender, a la luz de la presente divulgación, que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que se divulgan y aún así obtener un resultado similar sin apartarse del espíritu ni del alcance de la invención.

Ejemplo 1 – Tratamiento de un modelo de ratón de hiperhomocisteinamia con una variante de enzima cistationina-gamma-Liasa humana

[00141] La homocistinuria clásica es causada por un defecto genético en el gen cistationina- β -sintasa. La alteración de esta vía metabólica deriva en hiperhomocisteinamia, una afección en la que los niveles en suero de homocisteína total (tHcy) se elevan gravemente. Los indicios de homocistinuria incluyen problemas con los sistemas esquelético, ocular, vascular y nervioso. Estos síntomas probablemente son el resultado de la acumulación de homocisteína en suero así como de manera intracelular.

[00142] El objetivo de este trabajo es desarrollar un producto terapéutico enzimático novedoso capaz de degradar el exceso de homocisteína en suero, proporcionando un sumidero para la homocisteína intracelular, y crear un tratamiento nuevo para homocistinuria. La enzima cistationina- γ -liasa (CGL) humana se modificó por ingeniería genética para degradar homocisteína y homocistina. Mediante el uso de mutagénesis aleatoria y racional, se generaron colecciones de variantes de CGL, y se identificaron clones a través de una selección genética en donde la degradación de homocisteína a α -cetobutirato confiere una ventaja de crecimiento a una cepa de *E.coli*

modificada por ingeniería genética. Se evaluó la cinética de las variantes de CGL y se muestra en la Tabla 1.

[00143] Mediante el uso de una dieta con metionina alta (2,5 % p/p de metionina en comparación con 0,6 % p/p de metionina presente en una dieta de roedor normal), se indujo la hiperhomocisteínamia en ratones, y así se creó un modelo murino para evaluar la eficacia de las enzimas desarrolladas. La administración de una dosis única de 50 mg/kg (i.p.) de la CGL modificada en el modelo de ratón con dieta de alta metionina redujo significativamente tHcy de $380 \pm 13 \mu\text{M}$ a $44,7 \pm 4,8 \mu\text{M}$ dentro de las 24 horas (Figura 1). Cabe destacar que el nivel de tHcy en un ratón normal es de alrededor de $4 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Las dosis cada 5 días durante 30 días a 50 mg/kg (i.p.) dio como resultado una reducción prolongada en tHcy como se muestra en la Figura 2. Adicionalmente, la dosis frecuente prolongada no produjo pérdida de peso ni otros signos de toxicidad. La administración de la enzima disminuyó la tHcy exitosamente en el modelo murino inducido por dieta sin efectos adversos. Una dieta de metionina alta es una dieta de roedor normal pero con un contenido de metionina 4 veces mayor.

[00144] Con el fin de evaluar el efecto terapéutico de la CGL modificada (hCGL-8mut-4; Mutante 2; SEQ ID NO: 6), se usó una cepa murina *cbs*^{-/-}, que produjo mortalidad neonatal. La CGL modificada y la enzima inactiva (20 mg/kg IP, dos veces por semana) se inyectaron desde el día 10 hasta el día 50. Se esperaba una ventaja de supervivencia en los ratones tratados. Tanto la dieta de las madres como de las crías incluía betaína, un aditivo dietario agregado para mejorar la supervivencia a la enfermedad. Como se muestra en la Figura 3, el tratamiento con CGL modificada (Mutante 2) mejoró la supervivencia de las crías, lo que indicó que controlar los niveles de Hcy es importante para mejorar la enfermedad.

Ejemplo 2 – Diseño y caracterización cinética de variantes de degradación de homocisteína/homocistina de mayor especificidad

[00145] La codificación génica para la enzima Mutante 2 (SEQ ID NO: 6) se usó como punto de partida para generar otras variantes con mejoras en la actividad enzimática o la selectividad de homocisteína u homocistina. Los residuos de los sitios activos que se hipotetizaron para coordinar la fijación al sustrato se seleccionaron para mutagénesis de saturación y se generaron colecciones posteriores mediante PCR de extensión solapada (reacción en cadena de polimerasa). Los productos de PCR ensamblados finales se digirieron con *Nco*I y *Eco*RI y se ligaron a un vector pET28a usando T4 ADN ligasa. Las ligaduras resultantes se transformaron directamente en *E. coli* (BL21) y se colocaron en placas de LB-kanamicina para cribado posterior (como se

describe en la patente estadounidense N.º 9.481.877, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Se cribó el doble de colonias que la diversidad teórica de las colecciones. Los clones que mostraron actividad significativa se aislaron y se secuenciaron para identificar mutaciones que confieren actividad mejorada. Se identificaron tres variantes que contenían mutaciones en la posición R119 (Mutante 3: R119D, SEQ ID NO: 37; Mutante 4: R119H, SEQ ID NO: 38; Mutante 5: R119G, SEQ ID NO: 39) y se purificaron a una homogeneidad mayor de 95 % como se evaluó mediante SDS-PAGE y se caracterizó cinéticamente según su capacidad de degradar metionina, cisteína, cistina, homocisteína, y homocistina en 100 mM de amortiguador de PBS (solución salina amortiguada con fosfato) a pH 7,3 y 37 °C (Tabla 1) (como se describió en la patente estadounidense N.º 9.481.877, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

Tabla 1. Cinética de mutantes de CGL

	K_{cat}/k_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)				
	Metionina	Cisteína	Cistina	Homocisteína	Homocistina
Tipo silvestre	ND*	0,2	0,85	0,2	ND*
Mutante 1	0,75	2,7	2,6	8,0	7,6
Mutante 2	5,3	8,5	2,1	12	21,6
Mutante 3	1,1	3,6	2,3	11,9	18,8
Mutante 4	2,7	4,7	1,9	11,7	17,7
Mutante 5	1,7	5,4	2,1	13,1	20,7

*ND = sin datos

Ejemplo 3 – Farmacodinámica de homocisteína de Mutante 3 en ratones con un modelo de ratón de hiperhomocisteinamia inducida por dieta

[00146] Se usó una dieta de metionina alta (2,5 % p/p en comparación con el 0,6 % p/p normal descrito en el Ejemplo 1) para inducir hiperhomocisteinamia en ratones. A tales ratones se les administró una dosis única de 50 mg/kg de peso animal (i.p.) ya sea del Mutante 3 (SEQ ID NO: 37) o enzima inactivada. El Mutante 3 en el modelo de ratón de dieta de metionina alta produjo una reducción estadísticamente significativa de tHcy de 335 ± 37 µM a un nadir de 42 ± 20 µM dentro de las 48 horas (Figura 4).

Ejemplo 4 – Tratamiento de modelo de ratón de hiperhomocisteinamia con Mutante 3

[00147] Con el fin de evaluar el efecto terapéutico del Mutante 3 (R119D;

SEQ ID NO: 37), que exhibe la mayor selectividad de sustrato para homocisteína/homocistina en comparación con su actividad de degradación de metionina, cisteína, o cistina, las crías de ratón *cbs*^{-/-} se trataron con el Mutante 3 o enzima Mutante 3 que se inactivó con calor al colocar la muestra en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Las crías se inyectaron desde el día 10 después de nacer a una dosis de 25 mg/kg de peso animal (i.p., dos veces por semana) hasta el tratamiento final el día 50. Tanto la dieta de las madres como de las crías incluía betaína, un aditivo dietario agregado para mejorar la supervivencia a la enfermedad. Como se puede observar en la Figura 5, el tratamiento con Mutante 3 activo rescató completamente a las crías de ratón *cbs*^{-/-} de la mortalidad neonatal en contraposición con animales a los que se les administró una cantidad equivalente de enzima inactivada.

* * *

[00148] Todos los métodos divulgados y reivindicados en la presente se pueden llevar a cabo y ejecutarse sin experimentación indebida considerando la presente divulgación. Si bien las composiciones y métodos de la presente invención se describieron en término de formas de realización preferidas, será evidente para las personas del oficio de nivel medio que se pueden aplicar variaciones a los métodos y a las etapas o a la secuencia de etapas del método descrito en la presente sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que determinados agentes que se relacionan química y fisiológicamente pueden sustituir a los agentes descritos en la presente mientras que se alcancen resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos similares y modificaciones evidentes para las personas del oficio de nivel medio se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

Las siguientes referencias, en la medida que proporcionen ejemplos de detalles procedimentales u otro tipo de detalles complementarios de los que se indican en la presente, se incorporan específicamente en la presente por referencia.

Patente estadounidense N.º 4.870.287

Patente estadounidense N.º 5.739.169

Patente estadounidense N.º 5.760.395

Patente estadounidense N.º 5.801.005

Patente estadounidense N.º 5.824.344

Patente estadounidense N.º 5.830.880

Patente estadounidense N.º 5.846.945

Patente estadounidense N.º 5.889.155

Patente estadounidense N.º 8.709.407

Patente estadounidense N.º 9.481.877

Publicación de patente estadounidense 2009/0304666

Publicación de patente estadounidense 2011/0200576

Ashe *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57:417, 1974.

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1994.

Breillout *et al.*, In: *Methionine dependency of malignant tumors: a possible approach for therapy*, Oxford University Press, 1628-1632, 1990.

Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Esaki and Soda, *Methods Enzymol.*, 143: 459, 1987.

Gill and von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182(2):319-326, 1989.

Halpern *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71:1133-1136, 1974.

Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Harkki *et al.*, *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.

Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hoover & Lubkowski, DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 30:e43-e, 2002.
- Hopwood et al., In: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.
- Hori et al., *Cancer Res.*, 56:2116-2122, 1996.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Ito et al., *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.
- Kang et al. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism*, 36:458-62, 1987.
- Kreis and Goodenow, *Cancer Res.*, 38:2259-2262, 1978.
- Kreis et al., *Cancer Res.*, 40:634-641, 1980.
- Kreis, *Cancer Treatment Rpts.*, 63:1069, 1979.
- Kruger et al. Cystathionine beta-synthase deficiency in Georgia (USA): correlation of clinical and biochemical phenotype with genotype. *Human Mutation*, 22:434-41, 2003.
- Kudou et al., *J. Biochem.*, 141:535, 2007.
- Lishko et al., *Anticancer Res.*, 13:1465-1468, 1993.
- Lordanescu, *J. Bacteriol.*, 12:597 601, 1975.
- Lu et al., Cloning and nucleotide sequence of human liver cDNA encoding for cystathionine gamma-lyase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 189(2): 749-758, 1992.
- Maniatis et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Mellor et al., *Gene*, 24:1-14, 1983.
- Mudd et al., Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science*, 143:1443-45, 1964.
- Nakamura et al., *Anal. Biochem.*, 138:421-424, 1984.
- Nygård et al., Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67:263-70, 1998.
- Penttila et al., *Gene*, 61:155-164, 1987.
- Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Rao et al., Role of the Transsulfuration Pathway and of {gamma}-Cystathionase Activity in the Formation of Cysteine and Sulfate from Methionine in Rat Hepatocytes. *Journal of Nutrition*, 120(8):837, 1990.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329,

- 1990.
- Sibakov *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 145:567-572, 1984.
- Sridhar *et al.*, *Acta Crystall. Section D: Biolog. Crystall.*, 56:1665-1667, 2000.
- Steegborn *et al.*, Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase. Toward the rational control of transsulfuration. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18):12675, 1999.
- Stone *et al.*, De novo engineering of a human cystathionine- γ -lyase for systemic L-methionine depletion cancer therapy. *ACS Chemical Biology*, 7(11):1822-1829, 2012.
- Takakura *et al.*, Assay method for antitumor L-methionine -lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine. *Analytical Biochemistry*, 327(2):233-240, 2004.
- Tan *et al.*, *Anticancer Res.*, 16:3937-3942, 1996a.
- Tan *et al.*, *Anticancer Res.*, 16:3931-3936, 1996b.
- Tan *et al.*, *Protein Express. Purif.*, 9:233-245, 1997a.
- Tan *et al.*, *Anticancer Res.*, 17:3857-3860, 1997b.
- Walter *et al.* Strategies for the treatment of cystathionine beta-synthase deficiency: the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. *European Journal of Pediatrics*, 157:S71-S76, 1998.
- Ward, Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.
- Wawrzynczak and Thorpe, en: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.
- Yang *et al.*, In: *PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates*, AACR, 6673-6678, 2004a.
- Yang *et al.*, In: *Pharmacokinetics, methionine depletion, and antigenicity of recombinant methioninase in primates*, AACR, 2131-2138, 2004b.
- Yoshioka *et al.*, *Cancer Res.*, 58:2583-2587, 1998.