

REIVINDICACIONES

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 polisialico.
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.