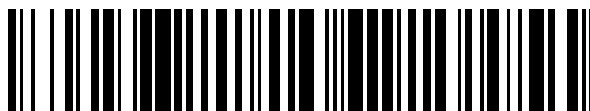


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 917 628**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2019 PCT/EP2019/051961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2019 WO19149648**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2019 E 19702553 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2022 EP 3746114**

54 Título: **Composiciones a utilizar para tratar cataratas**

30 Prioridad:

30.01.2018 EP 18154064

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.07.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT GENT (50.0%)

Sint-Pietersnieuwstraat 25

9000 Gent, BE y

VIB VZW (50.0%)

72 Inventor/es:

VAN AKEN, ELISABETH;

DELANGHE, JORIS;

CALLEWAERT, NICO y

VAN SCHIE, LOES

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 917 628 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones a utilizar para tratar cataratas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un tratamiento no quirúrgico de cataratas en un ser humano o animal. La invención se refiere específicamente a la administración de una enzima desglucante y su o sus cofactores que da como resultado la desglucación de las cristalinas del cristalino. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un tipo de tratamiento de cataratas mínimamente invasivo que es más fácil y económico en comparación con los métodos quirúrgicos existentes.

Antecedentes de la invención

10 Las cataratas son un problema de salud pública mundial. Debido al aumento global de la esperanza de vida, la prevalencia de cataratas está aumentando tanto en los países industrializados como en los del tercer mundo. Se estima que 95 millones de personas en todo el mundo están afectadas por cataratas (1). Las cataratas siguen siendo la principal causa de ceguera en el mundo (en desarrollo) (20 millones de personas afectadas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS)) (2). En 2012 se realizaron más de 120 000 operaciones de cataratas solo en Bélgica y este número sigue aumentando cada año. Dado que el tratamiento quirúrgico de cataratas actual es relativamente caro y el número de oftalmólogos practicantes es pequeño en muchos países en desarrollo, existe una demanda creciente de prevención o tratamiento de cataratas asequible, que sea accesible a una mayor cantidad de pacientes. En el mundo occidental, las cataratas se tratan mediante una intervención quirúrgica realizada por un oftalmólogo capacitado, denominada facoemulsificación (3). Este método consiste en la fragmentación del cristalino intraocular con cataratas mediante ondas de ultrasonido y la sustitución de este último por un nuevo implante de cristalino de silicona o acrílico. Sin embargo, los principales inconvenientes de esta técnica quirúrgica son los elevados costes económicos (maquinaria quirúrgica (coste 40 000-50 000 euros), microscopio quirúrgico (coste 50 000-70 000 euros), maquinaria para calcular el implante del cristalino (15 000-20 000 euros), reembolso por seguro nacional de salud entre 1.500 y 2.500 euros por cirugía por ojo en cirugía de un día), una larga curva de aprendizaje de varios años para el cirujano oftálmico, el riesgo de endoftalmitis postoperatoria que amenaza la visión, y aún la necesidad de gafas para leer después (a menos que se implantan lentes multifocales) que cuestan entre 1.000 y 1.500 euros y no son asequibles para la mayoría de los pacientes). Por el momento, el margen de mejora de las estrategias de tratamiento actuales es marginal y se centra principalmente en mejorar la calidad de las lentes implantadas.

30 El cristalino de cristalinas es una estructura biconvexa transparente en el ojo. Las cristalinas α , β y γ constituyen > 90% de la masa seca total de la lente (4). Debido a un recambio de proteínas muy bajo, las cristalinas pertenecen a las proteínas más longevas del cuerpo y, por lo tanto, son propensas a la glicación progresiva con la edad. En el proceso de glicación de proteínas, los azúcares metabólicamente importantes, tales como glucosa y fructosa, reaccionan con los grupos de amina primaria (amino terminal y grupo ϵ -amino de la lisina), formando aductos que luego pueden reorganizarse y reaccionar adicionalmente, lo que finalmente conduce a enlaces cruzados entre proteínas, que a menudo inactiva estas proteínas o las hace resistentes a la maquinaria natural de degradación celular. Este proceso en el que se forman estos productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) también se conoce más generalmente como la reacción de 'Maillard', que de hecho es un conjunto de reacciones muy complejo y aún bastante incomprensible. La glicación no enzimática y el daño oxidativo de las proteínas del cristalino son los principales factores responsables de la formación de cataratas, al alterar la estructura y la estabilidad de la proteína del cristalino e inducir la reticulación, la agregación y la insolubilización de las proteínas. Dillon et al. (5) destacó el posible papel de la reacción de Maillard en la glicación de proteínas lenticulares. Debido a la larga semivida, la α -cristalina sufre modificaciones postraduccionales irreversibles, de las cuales la glicación es prominente, especialmente en el envejecimiento y la diabetes mellitus. Recientemente, se cuantificó un amplio espectro de AGEs con cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Los AGEs inducen cambios estructurales que afectan a la transparencia del cristalino. En los cristalinos de pacientes jóvenes, solo el 1,3% de los residuos de lisina de los cristalinos están glicosados, mientras que a los 50 años este valor aumenta al 2,7% hasta aproximadamente al 4,2% en personas de edad. En etapas avanzadas de la reacción de Maillard, los residuos de azúcar pueden reticularse adicionalmente con otras proteínas del cristalino. De hecho, pigmentos marrones aislados de cataratas después de la digestión proteolítica tienen un espectro de absorción de rayos UV, un espectro de excitación de fluorescencia y un tiempo de retención cromatográfica similar a los productos de la reacción de Maillard (6). La proporción de AGE es incluso más importante en pacientes diabéticos, ya que la concentración de glucosa crónicamente elevada en la hiperglucemia acelera la producción de AGEs. Al mismo tiempo, la prevalencia de cataratas en pacientes diabéticos es cinco veces mayor que entre los no diabéticos. De hecho, las cataratas son la principal complicación en pacientes diabéticos, incluso en personas jóvenes: el 23-26 % de los pacientes diabéticos < 54 años presentan cataratas, en comparación con el 4-7 % en individuos no diabéticos del mismo grupo de edad. Este porcentaje aumenta con la edad: en el grupo de edad de 55-64 años, las cataratas se pueden detectar en el 54-70 % de los pacientes diabéticos y en el 31-45 % de los no diabéticos (7).

Se sabe desde hace tiempo que la enzima fructosamina-3-quinasa constituye parte de la capacidad de reparación celular natural para el producto de condensación inicial de glucosa con grupos amino primarios de proteínas (8). Su

requerimiento de ATP como co-sustrato significa que requiere un contexto celular para funcionar, y esto ha desalentado las investigaciones con respecto al uso terapéutico potencial. Más importante aún, se desconoce la acción de las enzimas sobre los productos finales de glicación avanzada (AGEs).

5 El cuerpo vítreo del ojo es un depósito perfecto para contener agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades de la retina, como ya se ha demostrado ampliamente durante los últimos 10 años. Los anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (ranibizumab, bevacizumab), los receptores señuelo del factor de crecimiento del endotelio vascular (aflibercept), se han inyectado rutinariamente en el humor vítreo para el tratamiento del edema macular y las hemorragias debidas a la retinopatía diabética, la oclusión de la vena retiniana, degeneración macular relacionada con la edad, miopía patológica desde 2006 (9). El cuerpo vítreo se encuentra localizado entre el cristalino y la retina y consiste en un gel viscoelástico esencialmente acelular que contiene más del 98 % de agua y 2 % de ácido hialurónico, colágenos tipo II y IX, fibronectina, fibrilina y optina (10).

15 Sin embargo, se desconoce por completo si la aplicación local - a través de una única inyección intravítrea - de una enzima desglicante tal como fructosamina-3-quinasa y el o los cofactores necesarios daría como resultado la interrupción de los productos finales de glicación avanzada y estructuras reticuladas que conducen a la limpieza y el ablandamiento de la lente y, por lo tanto, al tratamiento de cataratas.

Breve descripción de las figuras.

La **Figura 1** ilustra un sistema para la inyección intravítrea de enzimas desglicantes de acuerdo con una realización de la presente invención.

20 La **Figura 2a** muestra los cambios macroscópicos de cristalinos ovino, porcino y equino observados después del tratamiento nocturno con inyección intravítrea de fructosamina-3 quinasa y cloruro de magnesio/trifosfato de adenosina. Se muestran cristalinos del ojo sin tratar (figura de la izquierda) y tratados con fructosamina-3-quinasa (figura de la derecha).

25 La **Figura 2b** muestra los cambios macroscópicos en cristalinos de ratones. Después del tratamiento con fructosamina-3-quinasa, se observa un cambio notable en la geometría del cristalino (representado por la relación del eje x/y). Después del tratamiento, se restablece la geometría esférica.

La **Figura 3** ilustra el cambio en las propiedades mecánicas de un cristalino del ojo equino tras el tratamiento enzimático con fructosamina-3 quinasa, de acuerdo con una realización de la presente invención. Se muestra la tasa de extensión de un cristalino del ojo equino sin tratar (línea discontinua) y tratado (línea completa).

30 La **Figura 4** muestra el análisis de componentes principales basado en cambios espectrales infrarrojos de cristalinos de ratones ob/ob después del tratamiento intravítreo con fructosamina-3 quinasa recombinante *in vivo*. Se inyectó una mezcla de 12,5 µg/mL de fructosamina-3 quinasa recombinante, ATP 2,5 mM y MgCl₂ 0,5 mM en el ojo derecho (R) de cada uno de los ratones, mientras que en el ojo izquierdo (L) se inyectó solución salina. Después de 24 h de incubación, se sacrificaron los ratones y se enuclearon los ojos. Los cristalinos se diseccionaron y analizaron en busca de cambios espectrales con espectroscopia de infrarrojo cercano. Las flechas indican la diferencia entre los ojos tratados con solución salina (C, gris claro) y los tratados con fructosamina-3 quinasa contralateral (T, gris oscuro) de cada uno de los ratones. Todos los ratones utilizados en este experimento eran ratones ob/ob.

40 La **Figura 5** muestra el análisis de los componentes principales basado en cambios espectrales infrarrojos de cristalinos de ratones después de la glicación *in vitro* y el tratamiento con fructosamina-3 quinasa recombinante. Para este experimento se utilizaron ratones wt/wt. Se inyectó una mezcla de 8,33 µg/mL de fructosamina-3 quinasa recombinante, ATP 3,33 mM y MgCl₂ 1,33 mM en el ojo derecho (R) de cada uno de los ratones, mientras que en el ojo izquierdo (L) se inyectó solución salina. Después de 24 h de incubación, se sacrificaron los ratones y se enuclearon los ojos. Los cristalinos se diseccionaron y se trataron como sigue: C (círculo): no glicosados *in vitro* (control); GL (cuadrado): glicosados *in vitro* en una solución de glucosa al 10 % durante 48 h a 37 °C; dGL (triángulo): desglicosados por tratamiento *in vitro* con 50 µl de una solución que contenía 8,33 µg/ml de fructosamina-3 quinasa recombinante, ATP 3,33 mM y MgCl₂ 1,33 mM durante 2 h a 37 °C; dGL16 (rombo): desglicosados por tratamiento *in vitro* con 50 µl de una solución que contenía 8,33 µg/ml de fructosamina-3 quinasa recombinante, ATP 3,33 mM y MgCl₂ 1,33 mM durante 16 h a 37 °C. L: ojo izquierdo; R: ojo derecho. Se fusionaron los espectros a 1375-1515 nm (7272-6600 cm⁻¹) y 1650-1730 nm (6060-5780 cm⁻¹).

50 La **Figura 6** muestra la desglicación tras el tratamiento con fructosamina-3 quinasa de fragmentos de cristalinos humanos. Se tomaron partes alícuotas de un conjunto de fragmentos de cristalino humano de 7 pacientes con cataratas y se trataron con agua desionizada (control) o una solución que contenía 8,33 µg/ml de fructosamina-3 quinasa recombinante, ATP 3,33 mM y MgCl₂ 1,33 mM (tratamiento con FN3K) durante 2

horas a 37 °C. El contenido de fructosamina del tejido del cristalino se sometió a ensayo utilizando un reactivo de nitro azul tetrazolio. Se registró la absorbancia a 510, 530 y 550 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

La **Figura 7** muestra muestras de un conjunto de fragmentos de cristalinos de cataratas humanos tratados con una solución de 16 µg/ml de FN3K, MgCl₂ 4 mM y ATP 0, 0,125, 0,25 o 2,5 mM en solución salina, ya sea como tal o complementado con un sistema de regeneración de ATP que consiste en fosfocreatina 20 µM (Sigma) y 0,5 mg/ml de creatina quinasa de músculo de conejo (Sigma). Los espectros de fluorescencia se registraron con la intensidad de excitación de 365 nm establecida de tal manera que el pico de 365 nm detectado (haz de excitación) fue igualmente alto en cada afección medida, lo que permitió la comparación de espectros. La **Figura 7A** muestra la disminución de los compuestos glicosilados fluorescentes tras el tratamiento con FN3K complementado con ATP suficiente (0,25-2,5 mM) o limitante (0,125 mM).

La **Figura 7B** muestra una disminución en la fluorescencia de las muestras tratadas con FN3K complementadas con ATP limitante (0,125 mM) en ausencia o presencia de un sistema de regeneración de ATP (CK-PC), en dos experimentos independientes.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al hallazgo sorprendente de que la administración, tal como una única inyección intravítrea, de una fructosamina-3-quinasa y su o sus cofactores da como resultado una "limpieza" de cristalinos altamente glicosilados y reticulados y afecta a sus propiedades mecánicas. En otras palabras, la última administración/inyección restablece la transmisión de luz de los cristalinos y, por lo tanto, puede utilizarse para tratar cataratas o prevenir el desarrollo de cataratas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere, en primer lugar, a una composición que comprende una fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina para uso en el tratamiento de cataratas en un ser humano o animal.

La presente invención se refiere, además, a una composición que comprende una fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina para uso en el tratamiento de cataratas en un ser humano o un animal, en donde dicha composición se administra mediante inyección intravítrea.

La presente invención se refiere, además, a una composición para uso como se ha descrito arriba que comprende, además, iones magnesio y/o un sistema de regeneración de trifosfato de adenosina.

La presente invención se refiere, además, a una composición que comprende un sistema regenerador de fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina para uso en el tratamiento de cataratas en un ser humano o un animal.

La presente invención se refiere, además, a una composición que comprende un sistema de regeneración de fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina para uso en el tratamiento de cataratas en un ser humano o un animal, en donde dicha composición se administra mediante inyección intravítrea.

La invención se refiere, además, a una composición que comprende un sistema de regeneración de fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina para uso como se ha descrito arriba que comprende, además, iones magnesio.

La expresión 'una fructosamina-3-quinasa' se refiere a enzimas clasificadas como enzimas 2.7.1.171 en - por ejemplo- la base de datos de enzimas Brenda (www.brenda-enzymes.org). Estas últimas enzimas son parte de un sistema dependiente de ATP para eliminar hidratos de carbono de proteínas glicosiladas no enzimáticamente y catalizar la siguiente reacción: ATP + [proteína]-N6-D-fructosil-L-lisina = ADP + [proteína]-N6-(3-O-fosfo-D-fructosil)-L-lisina. Más específicamente, la expresión 'una fructosamina-3-quinasa' se refiere - como un ejemplo no limitativo - a la fructosamina-3-quinasa humana que tiene el número de acceso o el número de secuencia de referencia del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI): NP_071441.1 (véase https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_071441). Debe quedar claro, además, que la expresión 'una fructosamina-quinasa' se refiere a las enzimas como se describe arriba, pero también a fragmentos y variantes funcionales de las mismas. La expresión "fragmentos y variantes funcionales" se refiere a fragmentos y variantes de las enzimas que se producen de forma natural. De hecho, para muchas aplicaciones de enzimas, parte de la proteína puede ser suficiente para lograr un efecto enzimático. Esto mismo se aplica a las variantes (es decir, proteínas en las que uno o más aminoácidos han sido sustituidos por otros aminoácidos, pero que conservan la funcionalidad o incluso muestran una funcionalidad mejorada), en particular para variantes de las enzimas optimizadas para la actividad enzimática (como también se describe adicionalmente con respecto a las enzimas recombinantes). El término 'fragmento' se refiere, por lo tanto, a una enzima que contiene menos aminoácidos que la secuencia de 309 aminoácidos de la fructosamina-3-quinasa humana que tiene el número de secuencia de referencia NCBI: NP_071441.1 y que conserva dicha actividad enzimática. Un fragmento de este tipo puede ser, por ejemplo, una proteína con una delección del 10 % o menos del número total de aminoácidos en el

extremo C y/o N. Por lo tanto, el término "variante" se refiere a una proteína que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia, preferiblemente que tiene al menos un 51-70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente que tiene al menos un 71-90 % de identidad de secuencia o lo más preferiblemente que tiene al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de 309 aminoácidos de la fructosamina-3-quinasa humana que tiene el número de secuencia de referencia NCBI: NP_071441.1 y que conserva dicha actividad enzimática.

Por lo tanto, ortólogos, o genes en otros géneros y especies (aparte de la fructosamina-3-quinasa humana que tiene el número de secuencia de referencia NCBI: NP_071441.1) con al menos un 50 % de identidad al nivel de aminoácidos, y que tienen dicha actividad enzimática son parte de la presente invención. El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina mediante el alineamiento de las dos secuencias y la identificación del número de posiciones con aminoácidos idénticos dividido por el número de aminoácidos en la secuencia más corta x 100. La última 'variante' también puede diferir de la proteína que tiene el número de secuencia de referencia NCBI: NP_071441.1 solo en sustituciones y/o modificaciones conservadoras, de manera que se conserva la capacidad de la proteína de tener actividad enzimática. Una "sustitución conservadora" es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la técnica de la química de proteínas esperaría que la naturaleza de la proteína no cambiara sustancialmente. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his.

Las variantes también (o alternativamente) pueden ser proteínas como se describe en esta memoria, modificadas, por ejemplo, por la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima en la actividad enzimática como se definió arriba, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática de la enzima.

Las expresiones 'trifosfato de adenosina' (ATP) e 'iones magnesio' se refieren a cofactores bien conocidos de estas últimas enzimas.

La expresión 'sistema de generación de trifosfato de adenosina' se refiere a varios métodos enzimáticos y basados en células enteras para regenerar ATP a partir de ADP o AMP como se describe - por ejemplo - por Woodyer R.D. et al. 2006 (11). En particular, la última expresión se refiere a las siguientes cuatro enzimas comúnmente utilizadas en la regeneración de ATP a partir de ADP: 1) el uso de fosfoenolpiruvato en una reacción acoplada catalizada por piruvato quinasa, 2) acetilfosfato acoplado con acetato quinasa, 3) fosfato de creatina acoplado con creatina quinasa y 4) polifosfato acoplado con polifosfato quinasa. Preferiblemente, la expresión 'sistema generador de ATP' se refiere al uso de fosfocreatina como fuente de energía secundaria y creatina quinasa para transferir su grupo fosfato a ADP para regenerar ATP. El uso de estos últimos sistemas generadores de ATP limita, por lo tanto, la concentración de ATP presente en la mezcla inyectada en el cuerpo vítreo como también se describe más adelante.

Las expresiones 'para tratar cataratas' se refieren a restablecer la transmisión de luz y/o mejorar las propiedades mecánicas tales como la elasticidad de los cristalinos para mejorar la visión del sujeto tratado. Esta última expresión también puede referirse a la prevención del deterioro adicional de la transmisión de luz y/o a las propiedades mecánicas de un cristalino. En otras palabras, la expresión tratamiento implica una desglucación de las proteínas del cristalino que da como resultado la limpieza y el ablandamiento de dicho cristalino.

El término 'animal' puede referirse a cualquier animal tal como un caballo, cerdo, oveja, perro, gato o ratón.

La expresión 'administración por inyección intravítrea' se refieren a la inyección de los compuestos de la presente invención en el cuerpo vítreo del ojo. La técnica de inyección intravítrea se utiliza en condiciones asépticas controladas. Se administra una anestesia adecuada antes de la inyección. Para el tratamiento de ojos de animales se utiliza anestesia general - por ejemplo - anestesia inhalatoria con isoflurano al 5 %. Para el tratamiento de seres humanos, se pueden utilizar gotas anestésicas locales. Se puede utilizar una aguja de calibre 32 para la inyección en ojos de animales más pequeños (como un pequeño roedor) y una aguja de calibre 30 en ojos humanos y ojos de animales más grandes como caballos y cerdos. En todas las especies, la esclerótica penetra en un ángulo de 45 ° - 90 °. En el ratón - por ejemplo - la esclerótica puede penetrar a 1 - 1,5 milímetros del limbo, y en los seres humanos, la esclerótica puede penetrar a 3 - 5 milímetros del limbo. La aguja atraviesa la esclerótica y la coroides hasta llegar al cuerpo vítreo. La aguja no toca el cristalino ni la retina. La composición de la presente invención puede administrarse como tal y la aguja se retira inmediatamente.

Sin embargo, debe quedar claro que además de inyectar dichas cantidades terapéuticamente efectivas por vía intravítrea -que es la forma preferida de administración - también podrían contemplarse otros medios de administración, tales como -pero no limitados a - la aplicación externa como gotas o geles, otras aplicaciones internas tales como suministro supracoroideo, suministro subretiniano, suministro mediante terapia génica mediante el uso de virus adeno-asociados u otros virus, o implantes con o sin posibilidad de rellenar el vítreo, en cualquier otra parte del ojo o anexos oculares.

Por lo tanto, la presente invención se refiere - en otras palabras - a un método para tratar (o prevenir) las cataratas en un sujeto que lo necesita, en donde dicho método comprende una inyección (o administración) de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que comprende una fructosamina-3-quinasa y adenosina trifosfato, o un sistema generador de fructosamina-3-quinasa y adenosina trifosfato, o una fructosamina-3-quinasa y adenosina trifosfato y un sistema generador de adenosina trifosfato, o una fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina e iones magnesio, o un sistema generador de fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina y un sistema generador de trifosfato de adenosina e iones magnesio, o un sistema generador de fructosamina-3-quinasa y un trifosfato de adenosina e iones magnesio en el cuerpo vítreo del ojo de dicho sujeto.

La expresión 'una cantidad terapéuticamente eficaz' se refiere a una cantidad que oscila entre 5 µl (para inyectar en un solo ojo de ratón) y 50 µl (para inyectar en un solo ojo de bovino) tomada de una dosis terapéutica que oscila entre aproximadamente 4,17 y 12,5 µg/ml de fructosamina-3-quinasa, ATP 2,50 y 4,17 mM y MgCl₂ 1,00 y 1,67 mM. Estas últimas dosis terapéuticas pueden obtenerse mezclando 1:1, 1:2, 1:3 o 1:5 una solución de 25 µg/ml de fructosamina-3-quinasa con una solución reciente de ATP 5 mM/MgCl₂ 2 mM.

La presente invención se refiere, además, a una composición como se indicó arriba, en donde dicha fructosamina-3-quinasa es una fructosamina-3-quinasa recombinante. El término 'recombinante' se refiere a fructosamina-3-quinasa obtenida como resultado de la expresión de ADN recombinante que codifica una fructosamina-3-quinasa dentro de células vivas tales como bacterias o células de levadura. Se dirige a los profesionales a Sambrook et al. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 4^a ed., Cold Spring Harbor press, Plainsview, Nueva York (2012) y Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 114), John Wiley & Sons, Nueva York (2016).

Más específicamente, la presente invención se refiere a una fructosamina-3-quinasa recombinante que se puede obtener por producción recombinante en *Pichia pastoris* e, incluso más específicamente, en donde dicha fructosamina-3-quinasa recombinante que se puede obtener por producción recombinante en *Pichia pastoris* tiene la secuencia de aminoácidos dada por SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2. SEQ ID N°1 es una construcción con una etiqueta HIS escindible N-terminal y un enlazador Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) escindible con caspasa 3 entre la etiqueta His6 y la secuencia codificante de la proteína que permite la eliminación limpia de la etiqueta. SEQ ID N° 2 es la versión escindida de SEQ ID N° 1.

Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2 (y sus secuencias de ácido nucleico codificantes SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, respectivamente) son las siguientes:

SEQ ID N° 1:

Tipo: aminoácido de 1 letra (subrayado: etiqueta His6, *cursiva: enlazador*, **negrita subrayada: sitio de escisión de caspasa**)

MHHHHHHVNGPGS**DEVD**EQLLRAELRTATLRAFGGPGAGCISEGRAYD TDAGPVFVKVNRRTQARQMF
 EGEVASLEALRSTGLVRVPRPMKVIDLPGGGA AFVMEHLKMKSLSSQASKLGEQMADLHLYNQKLREK
 LKEEENTVGRRGEGAEPQYVDKFGFHTVTCCGFIPQVNEWQDDWPTFFARHRLQAQLDLIEKDYADRE
 ARELWSRLQVKIPDLFCGLEI V PALLHGDLWSGNVAEDDVGPIIYDPASFYGHSEFELAIALMFGGFP
 RSFFTAYHRKIPKAPGFDQRLLLYQLFNLYLNHWNHFGREYRSPSLGTMRRLLK*

SEQ ID N° 3:

Tipo: ADN (subrayado: etiqueta His6, *cursiva: enlazador*, **negrita subrayada: sitio de escisión de caspasa**)

ATGCATCATCATCATCATCATGTTAACGGTCCAGGTTCTGATGAAGTTGATGAACAGTTGTTGAGAGC
TGAGTTGAGAAGTCTACTTTGAGAGCTTTTGGTGGTCCAGGTGCTGGTTGTATTTCTGAGGGTAGAG
CTTACGATACTGACGCTGGTCCAGTTTTTCGTTAAGGTTAACAGAAGAACTCAGGCTAGACAGATGTT
GAGGGTGAAGTTGCTTCTTTGGAGGCTTTGAGATCCACTGGTTTGGTTAGAGTTCCAAGACCAATGAA
GGTTATCGACTTGCCAGGTGGTGGTCTGCTTTTGTATGGAACACTTGAAGATGAAGTCCTTGTCTT
CCCAGGCTTCTAAGTTGGGTGAACAAATGGCTGACTTGCCTTGTACAACCAGAAGTTGAGAGAAAAA
TTGAAAGAGGAAGAGAACACTGTTGGTAGAAGAGGTGAAGGTGCTGAGCCACAATACGTTGACAAAGT
CGGTTTCCACACTGTTACTTGTGTGGTTTCATCCACAGGTTAACGAGTGGCAAGATGACTGGCCAA
CTTTCTTCGCTAGACACAGATTGCAAGCTCAGTTGGACTTGATCGAGAAGGACTACGCTGACAGAGAA
GCTAGAGAATTGTGGTCCAGATTGCAGGTTAAGATCCCAGACTTGTCTGTGGTTTGGAGATCGTTCC
AGCTTTGTTGCACGGTGATTTGTGGTCTGGTAACGTTGCTGAAGATGACGTTGGTCCAATTATCTACG
ACCCAGCTTCTTTCTACGGTCACTCTGAATTCGAGTTGGCTATCGCTTTGATGTTCCGGTGGTTCCCA
AGATCCTTCTTCACTGCTTACCACAGAAAGATCCCAAAGGCTCCAGGTTTTCGACCAGAGATTGTTGTT
GTACCAGTTGTTCAACTACTTGAACCATTGGAACCACTTCGGTAGAGAGTACAGATCTCCATCCTTGG
GTACTATGAGAAGATTGTTGAAGTAA

5 **SEQ ID N° 2 (= FN3K después de la eliminación de la etiqueta HIS N-terminal):**
Tipo: aminoácido de 1 letra

EQLLRAELRTATLRAFGGPGAGCISEGRAYDTDAGPVFVKVNRRTQARQMFEGEVASLEALRSTGLVR
VPRPMKVIDLPGGGAAFVMEHLKMKSLSSQASKLGEQMADLHLYNQKLREKLKEEENTVGRREGAEP
QYVDKFGFHTVTCCGFIPQVNEWQDDWPTFFARHRLQAQLDLIEKDYADREARELWSRLQVKIPDLFC
GLEIVPALLHGDLWSGNVAEDDVGPIIYDPASFYGHSEFELAIALMFGGFPRSFFTAYHRKIPKAPGF
DQRLLLYQLFNLYLNHWNHFGREYRSPSLGTMRRLLK*

10 **SEQ ID N° 4:**
Tipo: ADN

GAACAGTTGTTGAGAGCTGAGTTGAGAAGTCTACTTTGAGAGCTTTTGGTGGTCCAGGTGCTGGTTG
TATTTCTGAGGGTAGAGCTTACGATACTGACGCTGGTCCAGTTTTTCGTTAAGGTTAACAGAAGAACTC
AGGCTAGACAGATGTTTCGAGGGTGAAGTTGCTTCTTTGGAGGCTTTGAGATCCACTGGTTTGGTTAGA
GTTCCAAGACCAATGAAGTTATCGACTTGCCAGGTGGTGGTCTGCTTTTGTATGGAACACTTGA
GATGAAGTCCTTGTCTCCAGGCTTCTAAGTTGGGTGAACAAATGGCTGACTTGCCTTGTACAACC
AGAAGTTGAGAGAAAAGTTGAAAGAGGAAGAGAACACTGTTGGTAGAAGAGGTGAAGGTGCTGAGCCA
CAATACGTTGACAAGTTGCGTTTCCACACTGTTACTTGTGTGGTTTCATCCACAGGTTAACGAGTG
GCAAGATGACTGGCCAACTTTCTTCGCTAGACACAGATTGCAAGCTCAGTTGGACTTGATCGAGAAGG
ACTACGCTGACAGAGAAGCTAGAGAATTGTGGTCCAGATTGCAGGTTAAGATCCCAGACTTGTCTGT
GGTTTGGAGATCGTTCCAGCTTTGTTGCACGGTGATTTGTGGTCTGGTAACGTTGCTGAAGATGACGT
TGGTCCAATTATCTACGACCCAGCTTCTTTCTACGGTCACTCTGAATTCGAGTTGGCTATCGCTTTGA
TGTTCCGGTGGTTTCCCAAGATCCTTCTTCACTGCTTACCACAGAAAGATCCCAAAGGCTCCAGGTTT
GACCAGAGATTGTTGTTGTACCAGTTGTTCAACTACTTGAACCATTGGAACCACTTCGGTAGAGAGTA
CAGATCTCCATCCTTGGGTACTATGAGAAGATTGTTGAAGTAA

15 De hecho, la presente invención se refiere -además- al hallazgo de que la fructosamina-3-quinasa recombinante obtenible por producción recombinante en *Pichia pastoris* y que tiene la secuencia de aminoácidos dada por SEQ ID N° 1 y 2 son enzimas preferidas para el tratamiento de cataratas. De hecho, se prefieren las últimas enzimas, porque 1) su producción en *Pichia* resultó en mayores rendimientos de la enzima en comparación con la producción en - por

ejemplo - E. coli, 2) las enzimas tenían una mayor pureza cuando se analizaron en la página SDS y 3) se puede evitar la presencia de endotoxina, que se sabe que provoca una inflamación ocular durante la inyección intravítrea (ref).

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la presente invención y no deben considerarse como limitativos del alcance de la invención.

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Producción recombinante de fructosamina-3-quinasa

Un gen que codifica fructosamina-3-quinasa humana (que tiene el número de acceso o el número de secuencia de referencia del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI): NP_071441.1 (véase <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP071441>), con codones optimizados para la expresión de *Pichia pastoris* (SEQ ID N° 1), se clonó en el vector de expresión pKai61 de *P. pastoris* de acuerdo con Claes, K. et al. ("Modular Integrated Secretary System Engineering in Pichia Pastoris To Enhance G-Protein Coupled Receptor Expression," ACS Synthetic Biology 5, n° 10 (21 de octubre, 2016): 1070-75). El gen codificado contiene una etiqueta His6 N-terminal (MHHHHHH) en marco con un sitio de escisión de caspasa-3 (DEVD) y la expresión está bajo el control del promotor AOX1 inducible por metanol. El plásmido contiene un marcador de resistencia a zeocina para la selección en células bacterianas así como de levadura. Los vectores se linealizaron en el promotor AOX1 antes de la transformación en *P. pastoris* (cepa NRRL Y-11430) para fomentar la recombinación homóloga en el locus AOX1 endógeno para una integración estable en el genoma.

Integrantes estables se cultivaron con agitación a 28 °C en medio complejo tamponado con BMY (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, 13,4 g/L de YNB sin aminoácidos) complementado con glicerol al 1 %. Después de 48 horas de crecimiento, se indujo la expresión recombinante mediante transferencia a medio BMY complementado con metanol al 1%. Después de 48 horas de expresión, los cultivos se centrifugaron, se desechó el sobrenadante y los sedimentos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C.

Los sedimentos se descongelaron y se resuspendieron en tampón de lavado para la extracción de proteínas. Células de *Pichia pastoris* se rompieron mecánicamente utilizando perlas de vidrio o de sílice/zirconio de 0,5 mm. El sobrenadante aclarado se purificó mediante cromatografía de afinidad con Ni²⁺ para la fructosamina-3-quinasa etiquetada con His6, seguido de filtración en gel. La proteína eluida en tampón de muestra FN3K (Tris- HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, DTT 1 mM) se identificó como fructosamina-3-quinasa humana recombinante mediante SDS-PAGE y transferencia Western con anticuerpos contra la etiqueta His6 y la proteína humana FN3K (ThermoFisher). La actividad enzimática se confirmó en un ensayo de actividad quinasa con un sustrato de 1 desoxi 1 morfolino D fructosa (R&D Systems). Se congelaron instantáneamente partes alícuotas de fructosamina-3-quinasa en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C.

Ejemplo 2: Cambios macroscópicos de cristalinos de cerdo, oveja y caballo observados después de un tratamiento nocturno con inyección intravítrea de fructosamina-3 quinasa

Los dos ojos del mismo animal fueron eviscerados y comparados para tener el mejor material comparable posible. Se evisceraron ojos de cerdo, oveja y caballo de cadáveres recientes y se transportaron al laboratorio en hielo antes de la inyección. En un ojo se inyectaron 50 µl de una solución que contenía 8,33 µg/ml de fructosamina-3-quinasa recombinante, ATP 3,33 mM y MgCl₂ 1,33 mM y en el otro ojo se inyectaron 50 µl de solución salina. A continuación, los ojos completos se almacenaron a 37 °C durante 24 horas en NaCl al 0,9 % y los cristalinos se diseccionaron bajo el microscopio. Durante la disección, se extrajo la cápsula del cristalino, así como las fibras de la zónula, y los cristalinos se enjuagaron con NaCl al 0,9 % para eliminar las células pigmentarias negras, las células de la sangre y los desechos, para permitir la máxima comparación en la apreciación del color del cristalino y las mediciones por espectroscopia de infrarrojo cercano. También se prepararon cristalinos para estudios histológicos. Como se muestra en la Figura 2a, se produjo una decoloración y una transición de turbia a transparente en el ojo tratado. La Figura 3 demuestra, además, que la tasa de extensión con la misma fuerza es mayor para el cristalino tratado en comparación con el cristalino no tratado.

Ejemplo 3: Control de la desglicación tras el tratamiento en ratones

Se anestesiaron ratones wt/wt y ob/ob de 36-38 semanas de edad durante el procedimiento quirúrgico con anestesia inhalatoria (isoflurano al 5 %). Se inyectó a ambos ojos del mismo animal, uno con 5 microlitros de fructosamina-3 quinasa (misma preparación que el experimento en el ejemplo 2) y otro con 5 microlitros de NaCl al 0,9 %. 24 horas más tarde, se sacrificaron los ratones y se enuclearon ambos ojos. Como se muestra en la figura 2b, el tratamiento con fructosamina-3 quinasa resultó en una normalización de la geometría del cristalino (se restableció la forma esférica fisiológica). Los espectros de infrarrojo cercano (NIR) de los cristalinos completos tratados y de control se registraron fuera de línea utilizando un espectrómetro NIR equipado con una sonda de reflexión inmovilizada de siete fibras de

400 μm , un detector de InGaAs y una lámpara halógena (AvaSpecNIR256-2.5-HSC con una sonda de reflexión FCR-7UVIR400-2-BX, Avantes). Dado que la glicación da como resultado un desplazamiento espectral en el espectro infrarrojo cercano de las proteínas, es posible observar picos específicos y variaciones espectrales en los espectros NIR debido a la desglucación de los cristalinos. Esto permitió a los autores de la invención distinguir los cristalinos diabéticos tratados con fructosamina-3-quinasa de los no tratados. En la FIG. 4 se muestran los resultados del cristalino de control contralateral (C) y el cristalino tratado (T). Este gráfico ilustra muy bien que el uso de la monitorización NIR no invasiva permitió a los autores de la invención evaluar el tratamiento de forma no destructiva.

Ejemplo 4: Desglucación de fragmentos de cristalino humano

Se obtuvieron fragmentos de cristalino humano después de la facoemulsificación durante la cirugía de cataratas. Después de la cirugía, el fluido de conservación que contenía los fragmentos de cristalino se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante. Los nódulos de 7 pacientes de cataratas se agruparon para obtener una cantidad considerable de fragmentos de cristalino, que luego pudieron dividirse en partes alícuotas. A partes alícuotas de suspensión de cristalinos de 150 μl los autores de la invención añadieron 100 μl de agua desionizada (control) o 100 μl de una solución que contenía 8,33 $\mu\text{g/ml}$ de fructosamina-3 quinasa recombinante, ATP 3,33 mM y MgCl_2 1,33 mM (tratamiento) durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se añadió 1 ml de reactivo nitro azul de tetrazolio para someter a ensayo el contenido de fructosamina del tejido del cristalino y las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C en cubetas de 10 mm. Se registró la absorbancia a 510, 530 y 550 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Después de la corrección del valor de referencia basado en la absorbancia a 510 nm y 550 nm, la absorbancia a 530 nm mostró una reducción del 30 % del contenido de fructosamina después de 2 horas de tratamiento con fructosamina-3 quinasa a 37 °C.

Ejemplo 5: Control de la glicación y desglucación *in vitro* de cristalinos de ratón

Se observan cambios en el espectro infrarrojo cercano de los cristalinos de ratón tras la glicación *in vitro* y el tratamiento con fructosamina-3 quinasa recombinante. Se evisceraron y enuclearon ambos ojos de ratones wt. Los cristalinos de los ratones se glicaron *in vitro* en una solución de glucosa al 10 % durante 48 h a 37 °C y luego se desglucaron por inmersión en 50 μl de una solución que contenía 8,33 $\mu\text{g/ml}$ de fructosamina-3 quinasa recombinante, ATP 3,33 mM y MgCl_2 1,33 mM durante 16 horas a 37 °C. La glicación se controló mediante el registro de espectros de infrarrojo cercano antes y después de la glicación y después de 2 y 16 horas de tratamiento. El análisis de componentes principales de los espectros fusionados a 1375-1515 nm ($7272\text{-}6600\text{ cm}^{-1}$) y 1650-1730 nm ($6060\text{-}5780\text{ cm}^{-1}$) muestra un desplazamiento de la población hacia la izquierda tras la glicación *in vitro* (Figura 5) y un desplazamiento en la dirección opuesta tras el tratamiento con fructosamina-3 quinasa. El desplazamiento depende del tiempo de incubación con la enzima, lo que además indica su posible efecto desglucante.

Ejemplo 6: Cambios macroscópicos del cristalino de cerdos, ovejas y caballos observados después de un tratamiento nocturno con inyección intravítrea de fructosamina-3 quinasa y un sistema generador de ATP

Para limitar la concentración de ATP presente en la mezcla inyectada, se emplea un sistema de regeneración de ATP utilizando - por ejemplo - fosfocreatina como fuente de energía secundaria y creatina quinasa para transferir su grupo fosfato a ADP para regenerar ATP (11, 12, 13).

La actividad de la fructosamina-3-quinasa se mide en presencia de un intervalo de 0,1 a 1000 μM de ATP y con o sin un exceso de fosfocreatina diez veces mayor (Sigma-Aldrich, Países Bajos). Para regenerar ATP, se añaden 500 $\mu\text{g/ml}$ de creatina quinasa (tal como creatina quinasa humana recombinante BB (Biotechne R&D Systems Europe, Reino Unido) o creatina quinasa de músculo de conejo (Sigma)). En un ensayo de actividad de quinasa de microtitulación *in vitro* (R&D Systems) con un sustrato de 1-desoxi-1-morfolino-D-fructosa (DMF, Biotechne R&D Systems Europe, Reino Unido), el ADP liberado después de que la actividad FN3K se convirtió en fosfato libre por una fosfatasa y se midió la liberación de fosfato. En presencia de 4 $\mu\text{g/ml}$ de FN3K, la liberación de fosfato dependía de la concentración de ATP (0,04-2,4 mM) añadido. Sin embargo, si se añadía a la mezcla un sistema de regeneración de ATP consistente en fosfocreatina 20 μM (Sigma) y 0,5 mg/ml de creatina quinasa de músculo de conejo (Sigma), la liberación de fosfato disminuía, lo que indicaba la actividad del sistema de regeneración de ATP. Un ensayo de actividad basado en HPLC para FN3K con el sustrato N- α -hipuril-N- ϵ - psicosisilina (14) demuestra que la concentración de ATP requerida para la actividad de FN3K disminuye al añadir un sistema de regeneración de ATP.

Para demostrar el uso de un sistema de regeneración de ATP para potenciar el tratamiento con FN3K en cristalinos humanos, se fragmentaron veinte cristalinos de cataratas humanas mediante facoemulsificación y se agruparon. Las muestras del grupo de fragmentos de cristalinos de cataratas humanas se trataron con una solución de 16 $\mu\text{g/ml}$ de FN3K, MgCl_2 4 mM y ATP 0, 0,125, 0,25 o 2,5 mM en solución salina, ya sea como tal o complementada con un sistema de regeneración de ATP que consiste en fosfocreatina 20 μM (Sigma) y 0,5 mg/ml de creatina quinasa de músculo de conejo (Sigma), que se activó en DTT 20 mM antes de su uso de acuerdo con Favre et al (15). Los espectros fluorescentes se registraron fuera de línea utilizando un espectrómetro Flame-S-VIS-NIR-ES equipado con una sonda de reflexión inmovilizada de siete fibras de 400 μm y una fuente de luz LED de alta potencia LLS-365 (Flame-S-VIS-NIR-ES con sonda de reflexión QR400-7-VIS-BX Premium, OceanOptics). La intensidad de excitación

se fijó de tal manera que el pico de 365 nm detectado (haz de excitación) fuera igualmente alto en cada condición medida, lo que permitió la comparación de espectros. Los picos de fluorescencia a 455 nm y 490 nm disminuyeron con el tratamiento con FN3K (Figura 7A), lo que indica una disminución en los compuestos glicosados. Sin embargo, si la concentración de ATP era limitante (0,125 mM), la disminución de la fluorescencia era limitada. Tras la adición de un sistema de regeneración de ATP (Figura 7B izquierda), este efecto se revirtió y la fluorescencia a 455 nm y 490 nm disminuyó a niveles similares a los de las muestras tratadas con FN3K con suficiente ATP (0,25 - 2,5 mM) añadido, mientras que los niveles de fluorescencia del último no cambió con la adición del sistema de regeneración de ATP. En un experimento repetido independiente (Figura 7B derecha), se observó una disminución similar de la fluorescencia inducida por el sistema de regeneración de ATP tras el tratamiento con FN3K con una concentración límite de ATP (0,125 mM). Estos resultados indican que si las concentraciones de ATP son limitantes, el tratamiento con FN3K de fragmentos de cristalino humano con cataratas puede potenciarse mediante la adición de un sistema de regeneración de ATP que consiste, por ejemplo, en fosfocreatina (Sigma) 20 µM y 0,5 mg/ml de creatina quinasa.

Teniendo en cuenta que la K_M de la fructosamina-3-quinasa para ATP puede variar con el sustrato utilizado (DMF frente a sustratos naturales tales como fructosamina (16, 17)) y el requisito de difusión desde el espacio intravítreo al cristalino, se inyectaron por vía intravítrea 12,5 µg/ml de fructosamina-3-quinasa en una mezcla de reacción que contenía 1 a 1000 µM de ATP y un exceso de diez veces de fosfocreatina, 50 µg/ml de creatina quinasa y $MgCl_2$ 1 mM en solución salina tamponada con HEPES pH 8,0.

Se observan cambios macroscópicos en cristalinos del ganado después del tratamiento durante la noche con la mezcla de tratamiento arriba mencionada. Se evisceran dos ojos del mismo animal y se comparan para tener el mejor material equiparable posible. Los ojos se evisceran de cadáveres recientes y se transportan al laboratorio en hielo antes de la inyección. En un ojo se inyecta una concentración final de 12,5 µg/ml de fructosamina-3-quinasa en una mezcla de reacción como se ha descrito arriba, mientras que en el segundo ojo se inyecta la misma mezcla de reacción, pero se omite la fructosamina-3-quinasa. Los ojos completos se incuban a 37 °C durante 24 horas en NaCl estéril al 0,9 % y los cristalinos se diseccionan bajo el microscopio. Durante la disección, se extrae la cápsula del cristalino, así como las fibras en la zónula y los cristalinos se enjuagan con NaCl estéril al 0,9 % para eliminar las células pigmentarias negras, células de la sangre y los desechos, de modo que se obtenga una comparación máxima en la apreciación del color de los cristalinos y fueron posibles mediciones por espectroscopía de infrarrojo cercano. También se preparan cristalinos para estudios histológicos.

Referencias

1. Liu YC, Wilkins M, Kim T, Malyugin B, Mehta JS. Cataracts. *Lancet* 2017; S0140-6736(17)30544-5.
2. <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index1.html>
3. Agarwal A, Jacob S. Current and effective advantages of femto phacoemulsification. *Curr Opin Ophthalmol* 2017;28:49-5.
4. Shiels A, Hejtmancik JF. Genetics of human cataract. *Clin Genet* 2013;84:120-127.
5. Dillon J, Skonieczna M, Mandal K, Paik D. The photochemical attachment of the O-glucoside of 3-hydroxykynurenine to alpha-crystallin: a model for lenticular aging. *Photochem Photobiol* 1999;69:248-53.
6. Avila F, Sebastian T, Baraibar MA, Friguet B, Silva E. Photosensitized reactions mediated by the major chromophore arising from glucose decomposition, result in oxidation and cross-linking of lens proteins and activation of the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1822:564-572.
7. Pescosolido N, Barbato A, Giannotti R, Komaiha C, Lenarduzzi F. Age-related changes in the kinetics of human lenses: prevention of the cataract. *Int J Ophthalmol* 2016;9:1506-1517.
8. Delpierre G, Collard F, Fortpied J, Van Schaftingen E. Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem J* 2002;365:801-8.
9. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY, para el Grupo de Estudio MARINA. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1419-31.
10. Halfter W, Dong S, Schurer B, Ring C, Cole GJ, Eller A. Embryonic synthesis of the inner limiting membrane and vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2202-9.
11. Ryan D, Woodyer, Tyler Johannes y Huimin Zhao, "Regeneration of Cofactors for Enzyme Biocatalysis in Enzyme Technology," in *Enzyme Technology* (Springer Science+Business Media, Inc. and Asiatech Publishers, Inc., 2006).

12. Andexer JN & Richter M (2015) Emerging Enzymes for ATP Regeneration in Biocatalytic Processes. *ChemBioChem* 16: 380-386.

5 13. Hayer-Hartl M (2000) Assay of Malate Dehydrogenase. En *Chaperonin Protocols* pp 127-132. Springer, Totowa, NJ Disponible en: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-061-6:127> [Accedido el 26 de noviembre de 2017].

14. Hellwig, A., Scherber, A., Koehler, C., Hanefeld, M. y Henle, T. (2014). A new HPLC-based assay for the measurement of fructosamine-3-kinase (FN3K) and FN3K-related protein activity in human erythrocytes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 52, 93-101.

10 15. Favre, D., and Muellhaupt, B. (2005). Reactivation of creatine kinase by dithiothreitol prior to use in an in vitro translation extract. *ALTEX* 22, 259-264.

16. Delpierre G, Rider MH, Collard F, Stroobant V, Vanstapel H y Santos E (2000) Identification, cloning, and heterologous expression of a mammalian fructosamine-3-kinase. *Diabetes* 49: 1627-1634.

17. Szwegold BS, Howell S y Beisswenger PJ (2001) Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. *Diabetes* 50: 2139-2147.

15 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Universidad de Gante

<120> Composiciones a utilizar para tratar cataratas

<130> P2017/085 PCT seq.list

20 <150> EP18154064.2
<151> 30-01-2018

<160> 4
<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 325
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 917 628 T3

Met His His His His His His Val Asn Gly Pro Gly Ser Asp Glu Val
 1 5 10 15

Asp Glu Gln Leu Leu Arg Ala Glu Leu Arg Thr Ala Thr Leu Arg Ala
 20 25 30

Phe Gly Gly Pro Gly Ala Gly Cys Ile Ser Glu Gly Arg Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Asp Ala Gly Pro Val Phe Val Lys Val Asn Arg Arg Thr Gln Ala
 50 55 60

Arg Gln Met Phe Glu Gly Glu Val Ala Ser Leu Glu Ala Leu Arg Ser
 65 70 75 80

Thr Gly Leu Val Arg Val Pro Arg Pro Met Lys Val Ile Asp Leu Pro
 85 90 95

Gly Gly Gly Ala Ala Phe Val Met Glu His Leu Lys Met Lys Ser Leu
 100 105 110

Ser Ser Gln Ala Ser Lys Leu Gly Glu Gln Met Ala Asp Leu His Leu
 115 120 125

Tyr Asn Gln Lys Leu Arg Glu Lys Leu Lys Glu Glu Glu Asn Thr Val
 130 135 140

Gly Arg Arg Gly Glu Gly Ala Glu Pro Gln Tyr Val Asp Lys Phe Gly
 145 150 155 160

Phe His Thr Val Thr Cys Cys Gly Phe Ile Pro Gln Val Asn Glu Trp

ES 2 917 628 T3

165 170 175

Gln Asp Asp Trp Pro Thr Phe Phe Ala Arg His Arg Leu Gln Ala Gln
180 185 190

Leu Asp Leu Ile Glu Lys Asp Tyr Ala Asp Arg Glu Ala Arg Glu Leu
195 200 205

Trp Ser Arg Leu Gln Val Lys Ile Pro Asp Leu Phe Cys Gly Leu Glu
210 215 220

Ile Val Pro Ala Leu Leu His Gly Asp Leu Trp Ser Gly Asn Val Ala
225 230 235 240

Glu Asp Asp Val Gly Pro Ile Ile Tyr Asp Pro Ala Ser Phe Tyr Gly
245 250 255

His Ser Glu Phe Glu Leu Ala Ile Ala Leu Met Phe Gly Gly Phe Pro
260 265 270

Arg Ser Phe Phe Thr Ala Tyr His Arg Lys Ile Pro Lys Ala Pro Gly
275 280 285

Phe Asp Gln Arg Leu Leu Leu Tyr Gln Leu Phe Asn Tyr Leu Asn His
290 295 300

Trp Asn His Phe Gly Arg Glu Tyr Arg Ser Pro Ser Leu Gly Thr Met
305 310 315 320

Arg Arg Leu Leu Lys
325

<210> 2
<211> 308
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Gln Leu Leu Arg Ala Glu Leu Arg Thr Ala Thr Leu Arg Ala Phe
1 5 10 15

Gly Gly Pro Gly Ala Gly Cys Ile Ser Glu Gly Arg Ala Tyr Asp Thr
20 25 30

Asp Ala Gly Pro Val Phe Val Lys Val Asn Arg Arg Thr Gln Ala Arg
35 40 45

Gln Met Phe Glu Gly Glu Val Ala Ser Leu Glu Ala Leu Arg Ser Thr

5

10

ES 2 917 628 T3

atgcatcatc atcatcatca tgtaaacggt ccaggttctg atgaagttga tgaacagttg 60
 ttgagagctg agttgagaac tgctactttg agagcttttg gtggtccagg tgctggttgt 120
 atttctgagg gtagagctta cgatactgac gctggtccag ttttcgtaa ggtaacaga 180
 agaactcagg ctagacagat gttcgagggt gaagttgctt ctttgaggc tttgagatcc 240
 actggtttg ttagagttcc aagaccaatg aagttatcg acttgccagg tgggtggct 300
 gcttttgta tggaacactt gaagatgaag tccttgctc cccaggctc taagttgggt 360
 gaacaaatg ctgacttgca cttgtacaac cagaagttga gagaaaagt gaaagaggaa 420
 gagaacactg ttggtagaag aggtgaaggt gctgagccac aatacgttga caagttcgg 480
 ttccacactg ttacttggtg tggtttcac ccacaggta acgagtggca agatgactgg 540
 ccaactttct tcgctagaca cagattgcaa gctcagttg acttgatcga gaaggactac 600
 gctgacagag aagctagaga attgtggtcc agattgcagg ttaagatccc agacttgctc 660
 tgtggtttg agatcgttcc agctttggtg cacgggtgatt tgtggtctgg taacgttgct 720
 gaagatgacg ttggtccaat tatctacgac ccagcttctt tctacggta ctctgaattc 780
 gagttggcta tcgctttgat gttcggtggt ttccaagat ccttcttcac tgcttaccac 840
 agaaagatcc caaaggctcc aggtttcgac cagagattgt tgtgtacca gttgttcaac 900
 tacttgaacc attggaacca cttcggtaga gagtacagat ctccatcctt gggactatg 960
 agaagattgt tgaagtaa 978

5

<210> 4
 <211> 927
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 4
 gaacagttgt tgagagctga gttgagaact gctactttga gagcttttg tgggtccagg 60
 gctggttgta tttctgagg tagagcttac gatactgacg ctggtccagt tttcgtaaag 120
 gtaacagaa gaactcaggc tagacagatg ttcgagggtg aagttgctc tttggaggct 180
 ttgagatcca ctggtttggt tagagttcca agaccaatga aggttatcga cttgccagg 240
 ggtgggtgctg cttttgttat ggaacacttg aagatgaagt ccttgctcctc ccaggcttct 300
 aagttgggtg aacaaatggc tgacttgcac ttgtacaacc agaagttgag agaaaagttg 360
 aaagaggaag agaacactgt tggtagaaga ggtgaaggtg ctgagccaca atacgttgac 420
 aagttcgggt tccacactgt tacttggtgt ggtttcatcc cacaggtaa cgagtggcaa 480
 gatgactggc caactttctt cgctagacac agattgcaag ctgagttgga cttgatcgag 540
 aaggactacg ctgacagaga agctagagaa ttgtggtcca gattgcagg taagatccca 600
 gacttgttct gtggtttgga gatcgttcca gctttgtgc acggtgattt gtggtctggt 660
 aacgttgctg aagatgacgt tgggtccaatt atctacgacc cagcttctt ctacggctc 720
 tctgaattcg agttggctat cgctttgatg ttcggtggtt tccaagatc cttcttact 780
 gcttaccaca gaaagatccc aaaggctcca ggtttcgacc agagattgt gttgtaccag 840
 ttgttcaact acttgaacca ttggaaccac ttcggtagag agtacagatc tccatcctt 900
 ggtactatga gaagattgt gaagtaa 927

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una fructosamina-3-quinasa y trifosfato de adenosina (ATP) para uso en el tratamiento de cataratas en un ser humano o un animal.
- 5 2. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición se administra mediante inyección intravítrea.
3. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende, además, iones magnesio.
4. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3 que comprende, además, un sistema de regeneración de trifosfato de adenosina.
- 10 5. Una composición que comprende una fructosamina-3-quinasa y un sistema de regeneración de trifosfato de adenosina para uso en el tratamiento de cataratas en un ser humano o un animal.
6. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha composición se administra mediante inyección intravítrea.
7. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 que comprende, además, iones magnesio.
- 15 8. Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha fructosamina-3-quinasa es una fructosamina-3-quinasa recombinante.
9. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha fructosamina-3-quinasa recombinante se puede obtener mediante producción recombinante en *Pichia pastoris*.
- 20 10. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha fructosamina-3-quinasa recombinante que se puede obtener mediante producción recombinante en *Pichia pastoris* tiene la secuencia de aminoácidos dada por SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2.
11. Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho tratamiento de cataratas implica una desglicación de las proteínas del cristalino que da como resultado la limpieza y el ablandamiento de dicho cristalino.

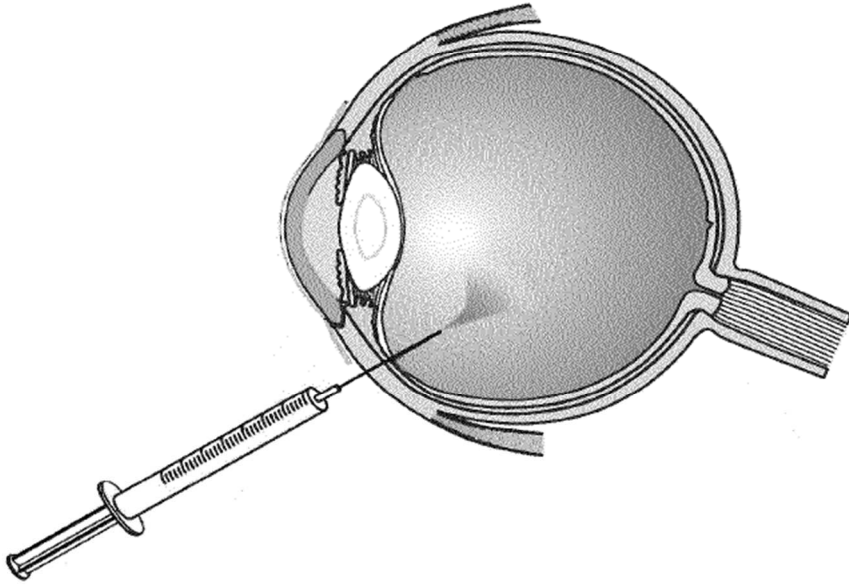


Figura 1

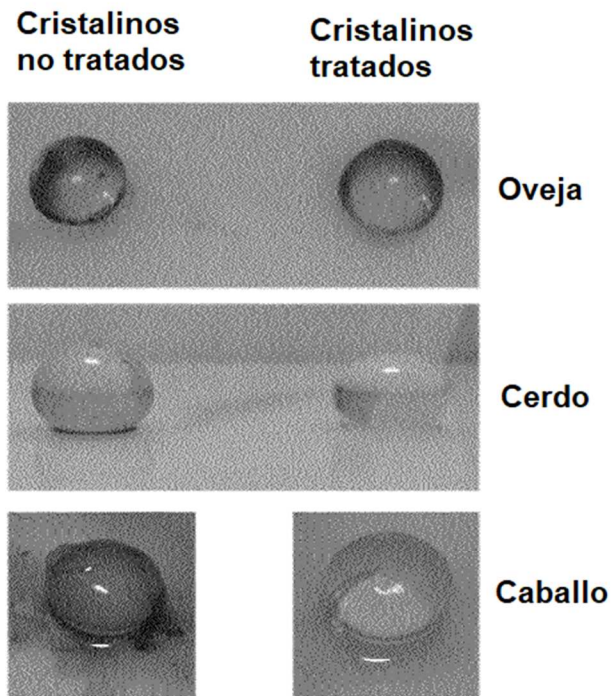
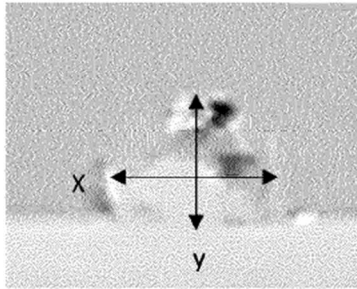


Figura 2a

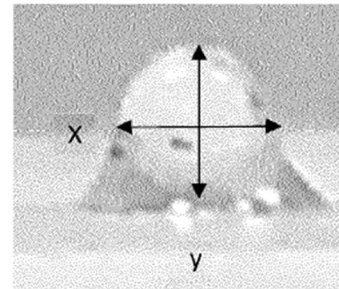
Ratón 832 ob/ob

No tratado (agua salina)



Relación $x/y = 0,6$

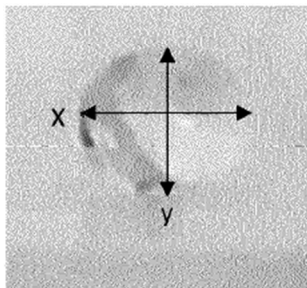
Tratado (FN3K)



Relación $x/y = 1,0$

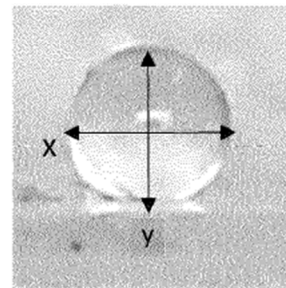
Ratón 814 ob/ob

No tratado (ATP-MgCl₂)



Relación $x/y = 0,9$

Tratado (FN3K)



Relación $x/y = 1,0$

Figura 2b

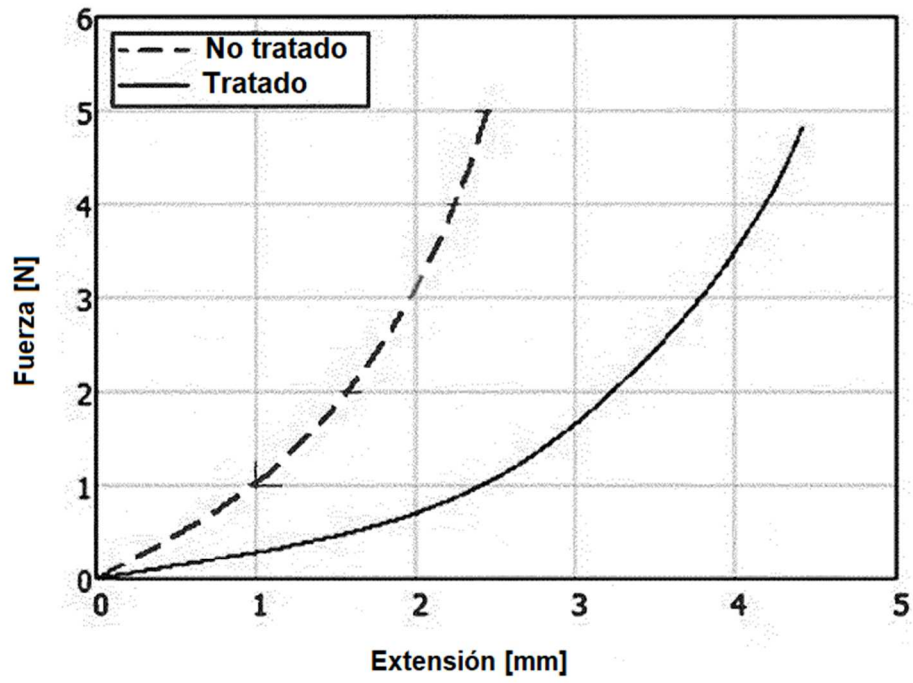


Figura 3

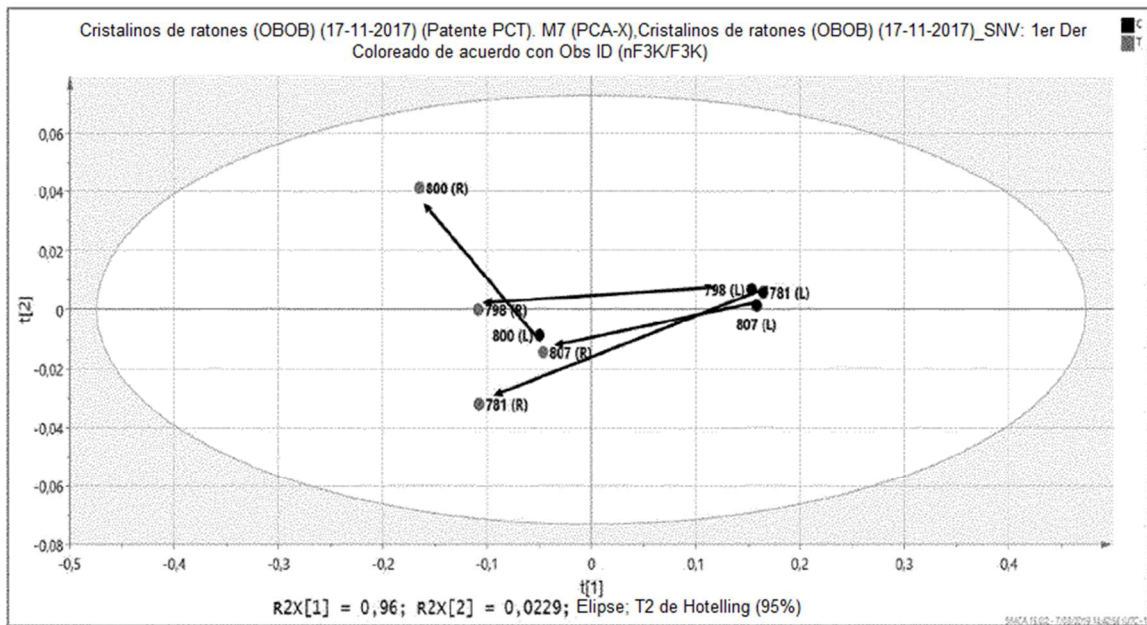


Figura 4

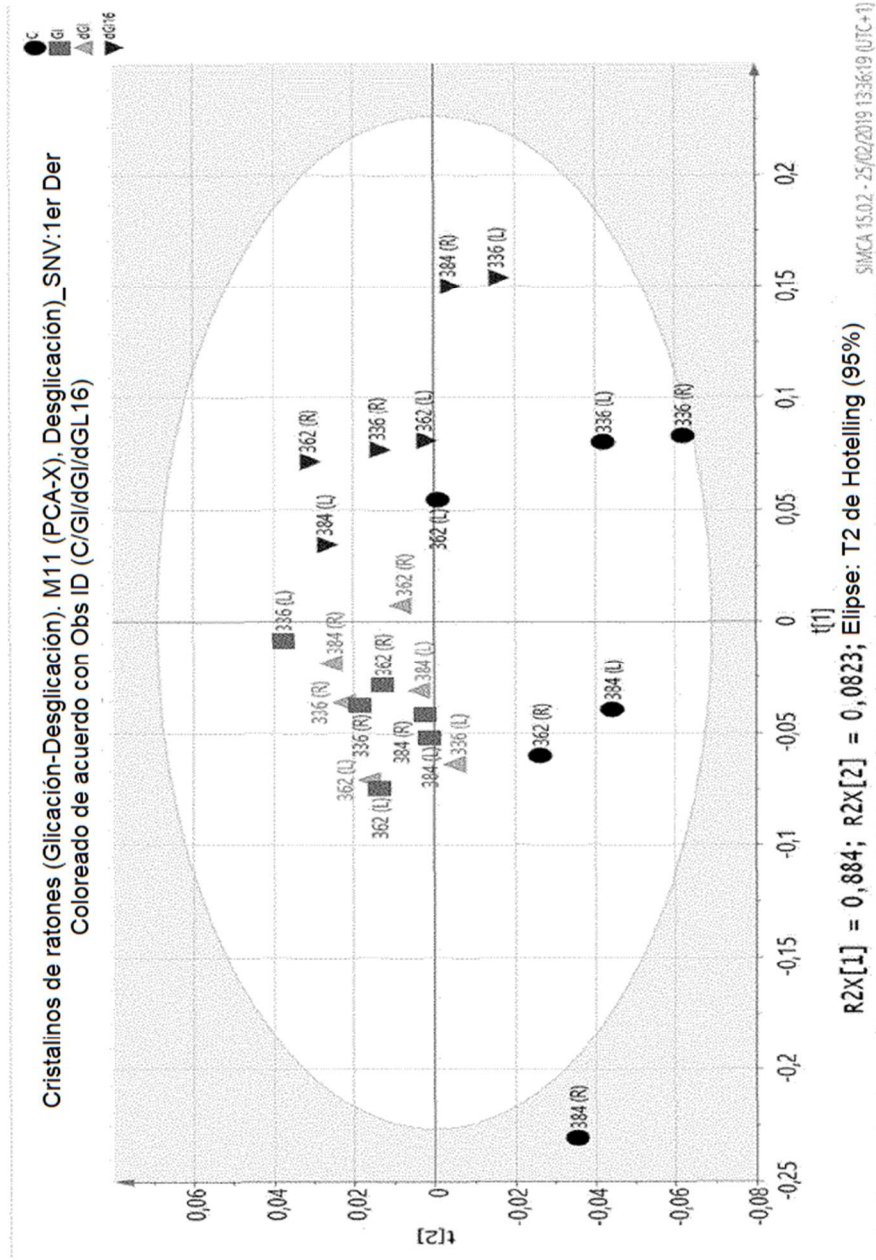


Figura 5

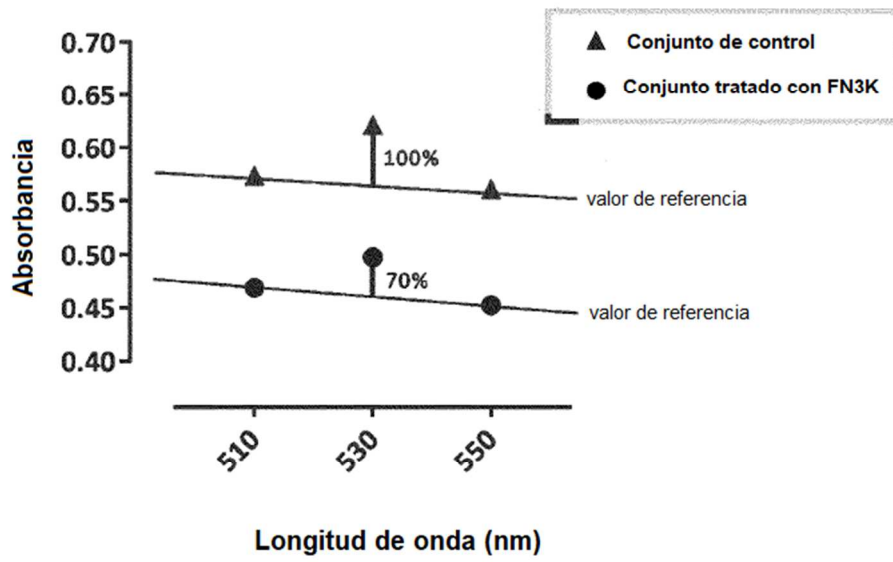


Figura 6

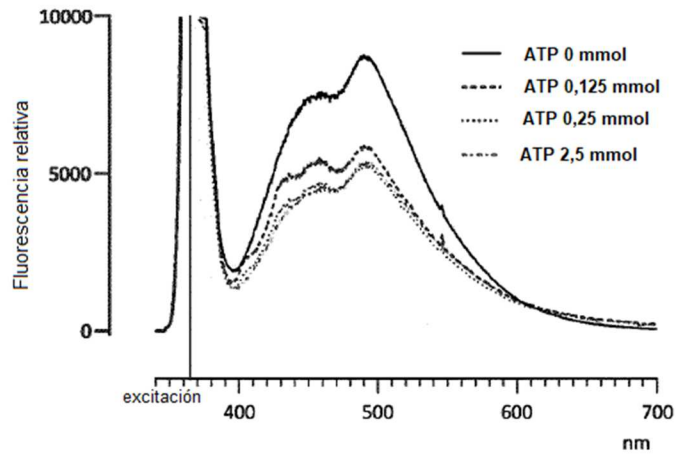


Figura 7a

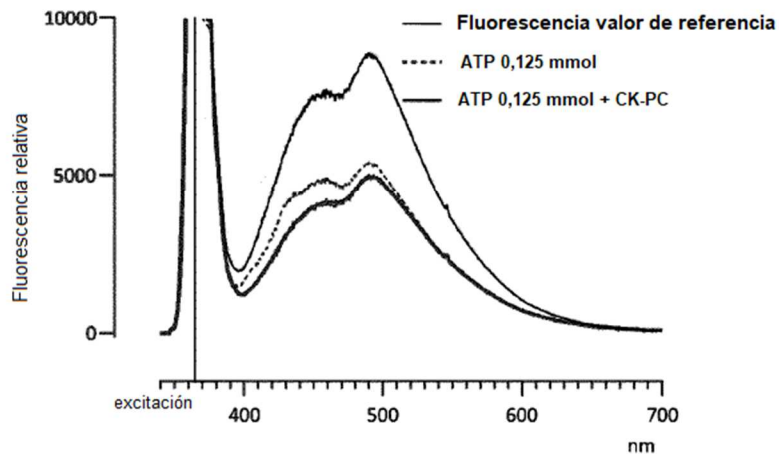
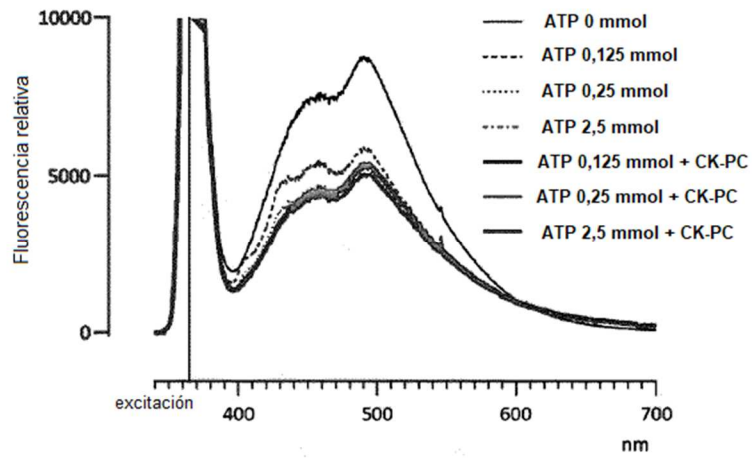


Figura 7b