

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 793**

51 Int. Cl.:

A61K 38/44 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2022** **PCT/EP2022/055727**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2022** **WO22189344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2022** **E 22711023 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 4304631**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades oculares con fructosil-aminoácido oxidasa**

30 Prioridad:

08.03.2021 EP 21161313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2025

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT GENT (100.00%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE

72 Inventor/es:

DELANGHE, JORIS y
VAN AKEN, ELISABETH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 994 793 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

Tratamiento de enfermedades oculares con fructosil-aminoácido oxidasa

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a la aplicación de la enzima fructosil-aminoácido oxidasa (FAOD) – sin la adición de proteasas – en afecciones médicas que se caracterizan por la presencia de productos finales de glucación avanzada (AGE).

Más específicamente, la presente divulgación se refiere al tratamiento de enfermedades oculares en seres humanos o animales. Los AGE se acumulan en el ojo envejecido provocando presbicia, cataratas, ojo seco, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y retinopatía diabética.

10 De ahí que la divulgación se refiera a la aplicación *in vivo* de FAOD a fin de desglucar e inactivar dichos AGE. La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

15 La glucación de proteínas es un proceso de envejecimiento, donde azúcares metabólicamente importantes reaccionan con grupos amina primaria, formando aductos que pueden reordenarse y reaccionar adicionalmente, conduciendo finalmente a reticulaciones entre proteínas (reacción de Maillard) (1). Este proceso de envejecimiento de glucación de proteínas se produce específicamente en órganos con proteínas de vida prolongada tales como el ojo y la piel.

20 Las cristalinas del cristalino, las células retinianas, las células corneales, la malla trabecular y el nervio óptico del ojo no se renuevan durante la vida y son propensos a la glucación. Como resultado, el cristalino envejecido se vuelve rígido, haciendo que las personas mayores usen gafas de lectura (presbicia). Además, el cristalino se vuelve turbio, y se produce ceguera debida a cataratas para la que no hay disponible más tratamiento que la cirugía (2). Una cantidad creciente de AGE en la película lagrimal altera la biomecánica corneal y puede inducir el síndrome del ojo seco (3). Con la edad, los AGE también se acumulan en y bajo la retina, provocando degeneración macular asociada a la edad (AMD) y ceguera en el 25% de las personas de más de 75 años (2). Además, la matriz colagenosa envejecida de la malla trabecular y la lámina cribrosa del nervio óptico provoca ceguera debida a glaucoma, una enfermedad caracterizada por una alta presión intraocular (4, 5). En pacientes diabéticos, la edad y la hiperglucemia son los factores de riesgo más importantes para desarrollar ceguera debida a retinopatía diabética (5, 6).

25 Se ha descrito el tratamiento no quirúrgico de enfermedades oculares dependientes de AGE mediante la enzima fructosamina-3-cinasa (F3K o FN3K): el documento WO2019149648 divulga un método para tratar las cataratas al administrar al ojo F3K recombinante y su cofactor o cofactores para desglucar las cristalinas del cristalino, y el documento WO2020053188 divulga un método para tratar enfermedades oculares dependientes de productos finales de glucación avanzada al administrar al ojo F3K recombinante y su cofactor o cofactores.

30 La fructosil-aminoácido oxidasa (FAOD; fructosil- α -L-aminoácido: oxígeno oxidoreductasa (desfructosilante), es una enzima encontrada en muchas bacterias y levaduras (7,8). La FAOD cataliza la oxidación del enlace C-N que conecta el C1 del resto fructosilo y el nitrógeno del grupo amino de los fructosil-aminoácidos. El dinucleótido de flavina y adenina (FAD) actúa como su cofactor. Es activo tanto sobre fructosil-lisina como sobre fructosil-valina. Métodos de detección basados en FAOD para proteínas glucadas – como por ejemplo los descritos por Shen y cols. (Compendio B44 del Congreso Anual de 2013 de la AACC) (9) y en el documento US2005/0014935 han estado disponibles comercialmente desde 1999. Sin embargo, la FAOD es incapaz de reaccionar con la mayoría de las proteínas glucadas intactas, y las muestras requieren así una etapa de digestión proteolítica inicial para liberar aminoácidos glucados o dipéptidos glucados. Capuano y cols. (J. Agric. Food Chem 2007:4189) muestran unos efectos de desglucación de FAOD sobre algunas proteínas de bajo peso molecular tales como insulina y concluyen que la FAOD podría usarse como una herramienta para inhibir la glucación de proteínas en sistemas alimentarios (10). Sin embargo, nunca se ha considerado un uso terapéutico *in vivo* de FAOD en afecciones inducidas por AGE en un ser humano o un animal.

Breve descripción de las figuras

45 **Figura 1. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de retina porcina tratada con FAOD sola o en combinación con FN3K.**

50 Valores medios de autofluorescencia y desviación estándar de 3 mediciones de espectros de emisión (400 - 600 nm) de retinas porcinas (n=40) glucadas con glucolaldehído (GA) y a continuación tratadas con FN3K + ATP + MgCl₂ (fig 1A), FAOD (Fig 1B), una combinación de FN3K + ATP + MgCl₂ y FAOD (fig 1C). Para el control negativo, se usó PBS + ATP + MgCl₂ (fig 1D). Se realizaron mediciones espectroscópicas de autofluorescencia basales para todas las retinas antes de la glucación (base, primera barra negra), después de 3 h de glucación con 25 mmol/l de glucolaldehído (GA, segunda barra gris claro) y después de 3 h del tratamiento (tratamiento, tercera barra gris oscuro).

Figura 2. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de fragmentos de cristalino humano con FAOD sola o en combinación con FN3K.

Valores medios de autofluorescencia y desviación estándar de 3 mediciones de espectros de emisión (400 - 600 nm) de tres mezclas similares de fragmentos de cristalino con cataratas (n=30) antes del tratamiento (líneas negras) y después del tratamiento (líneas grises). Las mezclas se trataron bien con FAOD (línea de puntos gris), bien con FN3K + ATP + MgCl₂ (línea continua gris) o bien con la combinación tanto de FAOD como de FN3K + ATP + MgCl₂ (línea discontinua gris).

Figura 3. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de córnea humana tratada con FAOD sola o en combinación con FN3K.

Valores medios de autofluorescencia y desviación estándar de 3 mediciones de espectros de emisión (400 - 600 nm) de fragmentos de córnea humana glucados con glucolaldehído (GA) y a continuación tratados con FN3K + ATP + MgCl₂ (fig 3A), FAOD (Fig 3B), o una combinación de FN3K + ATP + MgCl₂ y FAOD (fig 3C). Para el control negativo, se usó PBS + ATP + MgCl₂ (fig 3D). Se realizaron mediciones espectroscópicas de autofluorescencia de referencia para todos los fragmentos de córnea antes de la glucación (curva negra), después de 3 h de glucación con 25 mmol/l de GA (curva discontinua) y después de 3 h de tratamiento (curva de puntos).

Figura 4. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de retina porcina tratada con FAOD y peroxidasa.

Valores medios de autofluorescencia y desviación estándar de 3 mediciones de espectros de emisión (400 - 600 nm) de retinas porcinas (n=40) antes de la glucación (barras negras pequeñas) y después de 3 h de glucación con 25 mmol/l de glucolaldehído (barras grandes gris oscuro). A continuación, las retinas porcinas se trataron con FAOD bien sola o bien en combinación con 473 U/ml de peroxidasa durante 1 h (barras grises claro), 2 h (barras blancas) o durante 3 h (barras grises).

Figura 5. Cambio de fluorometría de fragmentos de cristalino con cataratas tratados con FAOD o con FN3K.

Fragmentos de cristalino humano derivados de una mezcla de pacientes seniles y diabéticos se trataron durante 3 horas con diferentes enzimas desglucantes. Valores medios de autofluorescencia de 3 experimentos de espectros de emisión (400 - 600 nm) de tres mezclas similares de fragmentos de cristalino humano con cataratas (n=30) antes del tratamiento (líneas discontinuas) y después del tratamiento (líneas enteras). Las mezclas se trataron bien con FN3K + ATP + MgCl₂ (fig 5A) o bien con FAOD + FAD (fig 5B).

Figura 6. Patrones de filtración en gel (resina Sephadex® G-25 Fine) de fracciones de cristalino solubles en urea antes y después del tratamiento con FAOD. Se presenta la absorbancia a 488 nm (reacción de Seliwanoff) de compuestos que contenían fructosa de alta masa molecular (AGE) en función del tiempo de elución. V₀ (>5 kDa) indica el volumen de huecos, V_t (<500 Da) el volumen terminal. Un pico agudo después de 165 min y un pico menor después de 235 min de elución representan la presencia de AGE que contienen fructosa en el cristalino antes del tratamiento con FAOD. Los puntos en las abscisas muestran la pérdida total de AGE que contienen fructosa en cada punto temporal de elución.

Figura 7. Aumento de potencia del cristalino humano después del tratamiento con FAOD.

Potencia de la lente de cristalinos humanos en (D, agua) en función del tiempo de tratamiento presentado (horas) con solución salina (Fig 7A). Aumento de potencia del cristalino (D, agua) en función del tiempo de tratamiento con FAOD (Fig 7B)

Figura 8. La microespectroscopía de infrarrojo cercano sobre secciones tisulares teñidas de retina humana con AGE descifra diferentes cambios bioquímicos después del tratamiento con FN3K en comparación con el tratamiento con FAOD. Gráfico de Hotelling de datos espectrales, analizados mediante análisis de los componentes principales y análisis discriminatorio de mínimos cuadrados parciales, que muestra una clara distinción entre drusas tratadas con FN3K (cuadrados) y drusas tratadas con FAOD (puntos).

Figura 9. Estructura propuesta para el compuesto con m/z 133,09695 a RT 0,82 (Compuesto nº A1), detectado en muestras que contienen arginina.

Figura 10. Estructura propuesta para el compuesto con m/z 337,17098 a RT 0,88 (Compuesto nº A3), detectado en muestras que contienen arginina.

Figura 11. Estructura propuesta para el compuesto con m/z 319,16064 a RT 0,88 (Compuesto nº A4), detectado en muestras que contienen arginina

Figura 12. Estructura propuesta para el compuesto con m/z 309,16554 a RT 0,85 (Compuesto nº L1), detectado en muestras que contienen lisina.

Figura 13 Estructura propuesta para el compuesto con m/z 219,13387 a RT 0,89 (Compuesto nº L2), detectado en muestras que contienen lisina.

Figura 14. Estructura propuesta para el compuesto con m/z 205,11825 a RT 0,91 (Compuesto nº L3), detectado en muestras que contienen lisina.

Figure 15. Estructura propuesta para el compuesto con m/z 351,15047 a RT 0,95 (Compuesto nº A9), detectado en

muestras que contienen arginina.

Figure 16. Estructura propuesta para el compuesto con m/z 131,12904 a RT 0,83 (Compuesto nº A2), detectado en muestras que contienen arginina.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención se refiere en primer lugar a una composición que comprende una fructosil-aminoxidasa para el uso para tratar presbicia, cataratas, síndrome del ojo seco, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética y/o glaucoma
- La presente invención se refiere además a una composición para el uso que se describe anteriormente que comprende además dinucleótido de flavina y adenina (FAD).
- 10 La presente invención también se refiere a una composición para el uso que se describe anteriormente que comprende además una fructosamina-3-cinasa y trifosfato de adenosina (ATP).
- La presente invención también se refiere a una composición para el uso que se describe anteriormente que comprende además iones magnesio.
- 15 La presente invención se refiere además a una composición para el uso que se describe anteriormente que comprende además una peroxidasa.
- La presente invención se refiere además a una composición como la descrita anteriormente, donde dicha composición se administra como gotas o como cualquier otra aplicación externa o aplicación interna.

Descripción detallada de la invención

- 20 La presente invención se refiere al hallazgo sorprendente de que la FAOD – que se muestra que no es capaz de revertir la glucación de proteínas sin el uso precedente de proteinasas – es capaz de desglucar proteínas dentro de los tejidos oculares *in vivo* y tiene – como tal – un efecto terapéutico. Por otra parte, la presente invención divulga además que la FAOD desgluca proteínas diferentes que F3K, de modo que usar ambas enzimas simultáneamente sobre los mismos tejidos tiene un efecto terapéutico mejorado (aditivo).
- 25 La presente invención se refiere en primer lugar a una composición que comprende una fructosil-aminoxidasa para el uso para tratar enfermedades específicas del ojo tales como glaucoma, degeneración macular del ojo asociada a la edad, retinopatía diabética, síndrome del ojo seco, presbicia y cataratas, y aspectos de la piel relacionados con AGE.
- En una realización, la presente invención se refiere a los hallazgos sorprendentes de que la aplicación de fructosil-aminoácido oxidasa sola o en combinación con fructosamina-3-cinasa y su cofactor o cofactores da como resultado menos fluorescencia y una presión intraocular baja en tejidos oculares. En otras palabras, los últimos tratamientos reducen la presión intraocular y mejoran la visión en pacientes con enfermedades inducidas por AGE tales como el glaucoma.
- 30 En otra realización, la presente invención se refiere al hecho sorprendente de que la administración de fructosil-aminoácido oxidasa sola o en combinación con fructosamina-3-cinasa y su cofactor o cofactores da como resultado menos fluorescencia inducida por AGE en la retina. En otras palabras, la última administración restaura la transmisión de luz y así la visión en pacientes con retinopatía ocular inducida por AGE, tal como degeneración macular asociada a la edad y retinopatía diabética.
- 35 En otra realización, la presente invención se refiere al hecho sorprendente de que la administración de fructosil-aminoácido oxidasa sola o en combinación con fructosamina-3-cinasa y su cofactor o cofactores da como resultado menos fluorescencia inducida por AGE en la córnea. En otras palabras, la última administración restaura la transmisión de luz y así la visión en pacientes con queratopatía ocular inducida por AGE tal como el síndrome del ojo seco.
- 40 En otra realización más, la presente invención se refiere al hecho sorprendente de que el tratamiento con fructosil-aminoácido oxidasa sola o en combinación con fructosamina-3-cinasa y su cofactor o cofactores reduce la fluorescencia inducida por AGE en el cristalino y así restaura la transmisión de luz y la visión en pacientes con enfermedades oculares del cristalino inducidas por AGE tales como presbicia y cataratas.
- 45 Varias realizaciones de la presente invención se refieren así a una composición que comprende una fructosil-aminoácido oxidasa sola o en combinación con una fructosamina-3-cinasa y su cofactor o cofactores, para el uso para el tratamiento de enfermedades oculares inducidas por AGE tales como degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, presbicia, cataratas, síndrome del ojo seco, glaucoma en un ser humano o un animal.
- 50 Por de término 'fluorescencia en tejidos oculares' se entiende la señal de fluorescencia UV observada después de iluminar el tejido ocular con luz UV. Los AGE se cuantifican basándose en mediciones de autofluorescencia de tipo Maillard (longitud de onda de excitación de luz UV 365 nm, longitud de onda de emisión 390-700 nm).

Por el término 'presión intraocular baja' se entiende la presión en el ojo medida por cualquier medio de oftalmotonómetro (oftalmotonómetro de contacto u oftalmotonómetro sin contacto).

Por el término 'tejidos oculares' se entiende todos los tejidos oculares en los que se acumulen AGE, tales como el cristalino, la retina, la córnea, la malla trabecular, el humor vítreo, el nervio óptico.

- 5 Por el término 'mejora de la visión' se entiende que la visión es mejor en pruebas clínicas después de la aplicación al ojo de fructosil-aminoácido oxidasa sola o en combinación con fructosamina-3-cinasa y su cofactor o cofactores, o en combinación con peroxidasa.

10 Por el término 'enfermedades inducidas por AGE' se entiende – con respecto a las realizaciones de la presente invención relacionadas con la visión – todas las enfermedades que amenacen la visión en las que estén implicados AGE, tales como presbicia, cataratas, síndrome del ojo seco, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética o glaucoma.

15 La presente invención se refiere así a una composición que comprende una fructosil-aminoácido oxidasa. El término 'una fructosil-aminoácido oxidasa (FAOD; fructosil- α -L-aminoácido: oxígeno oxidoreductasa (desfructosilante)' se refiere a cualquier enzima clasificada como catalizador de la oxidación del enlace C-N que conecta el C1 del resto fructosilo y el nitrógeno del grupo amino de fructosil-aminoácidos. La reacción avanza hasta un producto intermedio inestable de base de Schiff, que se hidroliza para producir glucosona y un aminoácido. El cofactor de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) reducido de la enzima se reoxida a continuación mediante oxígeno molecular con la liberación de peróxido de hidrógeno.

20 Más específicamente, el término 'una fructosil-aminoácido oxidasa (FAOD; fructosil- α -L-aminoácido: oxígeno oxidoreductasa (desfructosilante)' se refiere a la enzima codificada por el gen que codifica la fructosil-aminoácido oxidasa (fructosil- α -L-aminoácido: oxígeno oxidoreductasa (desfructosilante); EC 1.5.3) de *Corynebacterium* sp. 2-4-1 que se clonaba y expresaba en *Escherichia coli* según se describe por Sakaue y cols. (11). La última enzima – como un ejemplo no limitativo de una enzima que puede usarse en la presente invención – se puede adquirir - por ejemplo – de Creative Enzymes, Shirley, NY, o se puede elaborar usando métodos recombinantes bien conocidos según se describe, por ejemplo, por Sakaue y cols. (11)

30 El término 'una fructosamina-3-cinasa' se refiere a enzimas clasificadas como enzimas 2.7.1.171 en - por ejemplo - la base de datos de enzimas de Brenda (www.brenda-enzymes.org). Las últimas enzimas son parte de un sistema dependiente de ATP para retirar carbohidratos de proteínas glucadas no enzimáticamente y catalizar la siguiente reacción: $ATP + [proteína]\text{-N6-D-fructosil-L-lisina} = ADP + [proteína]\text{-N6-(3-O-fosfo-D-fructosil)-L-lisina}$. Más específicamente, el término 'una fructosamina-3-cinasa' se refiere a – como un ejemplo no limitativo – la fructosamina-3-cinasa humana que tiene el número de registro o el número de secuencia de referencia del National Center for Biotechnology Information (NCBI): NP_071441.1 (véase https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_071441). Tanto WO2019149648 como WO2020053188 describen - por ejemplo – la producción recombinante de F3K en *Pichia pastoris*.

35 Se debe aclarar además que el término 'una fructosamina-3-cinasa' y 'una fructosil-aminoácido oxidasa' se refiere a las enzimas que se describen anteriormente, pero también a fragmentos y variantes funcionales de las mismas. El término "fragmentos y variantes funcionales" se refiere a fragmentos y variantes de las enzimas presentes en la naturaleza. En efecto, para muchas aplicaciones de enzimas, parte de la proteína puede ser suficiente para conseguir un efecto enzimático. Lo mismo se aplica a las variantes (es decir proteínas en las que uno o más aminoácidos se han sustituido por otros aminoácidos, pero que retienen la funcionalidad o incluso muestran una funcionalidad mejorada), en particular para variantes de las enzimas optimizadas con respecto a la actividad enzimática (como también se describe adicionalmente con respecto a las enzimas recombinantes). El término 'fragmento' se refiere así a una enzima que contiene menos aminoácidos que la secuencia de 309 aminoácidos de la fructosamina-3-cinasa humana que tiene el número de secuencia de referencia del NCBI: NP_071441.1 o la secuencia de 372 aminoácidos de la fructosil-aminoácido oxidasa divulgada por Sakaue y cols. (11) y que retiene dicha actividad enzimática. Este fragmento puede ser - por ejemplo – una proteína con una eliminación de 10% o menos del número total de aminoácidos en el extremo C y/o N. El término "variante" se refiere así a una proteína que tiene al menos 50% de identidad de secuencia, preferiblemente que tiene al menos 51-70% de identidad de secuencia, más preferiblemente que tiene al menos 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-cinasa humana que tiene el número de secuencia de referencia del NCBI: NP_071441.1 o con o la secuencia de 372 aminoácidos de la fructosil-aminoácido oxidasa divulgada por Sakaue y cols. (11) y que retiene dicha actividad enzimática.

55 De ahí que los ortólogos, o genes de otros géneros y especies (distintos de la fructosamina-3-cinasa humana que tiene el número de secuencia de referencia del NCBI: NP_071441.1 o de la fructosil-aminoácido oxidasa divulgada por Sakaue y cols. (11) con al menos 50% de identidad a nivel de aminoácidos, y que tienen dicha actividad enzimática sean parte de la presente divulgación. El porcentaje de identidad de 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 más corta de las secuencias x 100. La última 'variante' también puede diferir de la proteína que tiene el número de secuencia de referencia del NCBI: NP_071441.1 o la proteína divulgada por Sakaue

y cols. (11) solo en sustituciones y/o modificaciones conservativas, de modo que se retenga la capacidad de la proteína para tener actividad enzimática. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la técnica espere que la naturaleza de la proteína esté sustancialmente inalterada. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservativos: (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 las descritas en el presente documento modificadas, por ejemplo, mediante la eliminación o adición de aminoácidos que tengan una influencia mínima sobre la actividad de las enzimas según se define anteriormente, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática de la enzima.

Los términos 'trifosfato de adenosina' (ATP), dinucleótido de flavina y adenina (FAD) e 'iones magnesio' se refieren a cofactores bien conocidos de las últimas enzimas.

La presente invención se refiere además a una composición para el uso que se describe anteriormente que comprende además una peroxidasa. El término 'peroxidasa' se refiere a cualquier enzima bien conocida que tenga un número EC 1.11.1.x y sea capaz de descomponer peróxidos, más específicamente que sea capaz de descomponer peróxidos de hidrógeno que se liberan durante la oxidación del FAD reducido que es el cofactor de FAOD.

El término 'animal' se puede referir a cualquier animal tal como mamíferos (perros, gatos, caballos,...), aves y reptiles.

La presente divulgación se refiere así – en otras palabras – a un método para tratar (o prevenir) presbicia asociada a la edad, cataratas, síndrome del ojo seco, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, glaucoma en un sujeto que lo necesite, donde dicho método comprende administrar al ojo de dicho sujeto gotas de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende una fructosil-aminoácido oxidasa sola o en combinación con una fructosamina-3-cinasa y trifosfato de adenosina, y – en ciertas realizaciones de la presente invención – iones magnesio y/o peroxidasa. Los métodos de tratamiento no están cubiertos por la invención reivindicada.

El término 'una cantidad terapéuticamente eficaz' se refiere a una cantidad tomada de una dosis terapéutica que varía entre 1 U/ml y 100 U/ml de fructosil-aminoácido oxidasa sola, o en combinación con peroxidasa entre 10 y 946 U/ml, o en combinación con fructosamina-3-cinasa entre 4,17 y 12,5 mg/ml, ATP entre 2,50 y 4,17 mM y MgCl₂ entre 1,00 y 1,67 mM. Las últimas dosis terapéuticas se pueden obtener mezclando 1:1, 1:2, 1:3 o 1:5 una solución de 25 mg/ml de fructosamina-3-cinasa con una solución reciente de ATP 5 mM/MgCl₂ 2 mM.

Se debe aclarar que además de 'administrar gotas' de dichas cantidades terapéuticamente eficaces – que es un modo de administración – también se prevén otros medios de administración tales como – entre otros – aplicación externa tal como a través de geles, y otras aplicaciones internas tales como inyecciones supracoroideas o inyecciones intravítreas o inyecciones subretinianas o implantes en cualquier otro lugar dentro o alrededor del ojo. De ahí que, y por ejemplo, la presente invención se refiera por lo tanto a una composición que comprende una fructosil-aminooxidasa sola o en combinación con una fructosamina-3-cinasa y ATP (y que podría comprender además iones magnesio) para el uso para el tratamiento de enfermedades oculares inducidas por AGE como degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, presbicia, cataratas, ojo seco, glaucoma, donde dicha composición se administra mediante gotas o como cualquier otra aplicación externa o aplicación interna (tal como inyecciones o implantes) o cualquier otro modo de aporte ocular de fármacos (12).

El término 'una cantidad terapéuticamente eficaz' – con respecto a F3K - se refiere a una cantidad que varía de 10 µl a 100 µl tomada de una dosis terapéutica que varía entre aproximadamente 4,17 y 12,5 µg/ml de fructosamina-3-cinasa, 2,50 y 4,17 mM de ATP y 1,00 y 1,67 mM de MgCl₂. Las últimas dosis terapéuticas se pueden obtener mezclando 1:1, 1:2, 1:3 o 1:5 una solución de 25 µg/ml de fructosamina-3-cinasa con una solución reciente de ATP 5 mM/MgCl₂ 2 mM.

El término 'una cantidad terapéuticamente eficaz' – con respecto a la FAOD - se refiere a una cantidad que varía de 10 µl a 100 µl tomada de una dosis terapéutica que varía entre 1 U/ml y 100 U/ml de fructosil-aminoácido oxidasa. Se pueden usar concentraciones de FAD de 2 mmol de FAD/mol de FAOD para el funcionamiento óptimo de la enzima. El tampón de la solución debe tener valores de pH entre 6,8 y 7,7.

La presente invención se refiere además a una composición como la indicada anteriormente en la que dicha fructosamina-3-cinasa y dicha fructosil-aminoácido oxidasa es una enzima recombinante. El término 'recombinante' se refiere a fructosamina-3-cinasa o fructosil-aminoácido oxidasa obtenida como resultado de la expresión del ADN recombinante que codifica una fructosamina-3-cinasa o fructosil-aminoácido oxidasa dentro de células vivas tales como células de bacteria o levadura. Los profesionales sanitarios son dirigidos además a Sambrook y cols. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 4ª ed., Cold Spring Harbor press, Plainview, Nueva York (2012) y Ausubel y cols. Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 114), John Wiley & Sons, Nueva York (2016).

Más específicamente, la presente invención se refiere a una fructosamina-3-cinasa recombinante que puede obtenerse mediante producción recombinante en *Pichia pastoris* y, aún más específicamente, donde dicha fructosamina-3-cinasa recombinante obtenible mediante 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 cola de HIS escindible N-terminal y un conector de Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) escindible en 3 por caspasa entre la cola de His6 y la secuencia codificante de proteína que permite la retirada limpia de la cola. 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 N3 y SEQ ID N° 4, respectivas) se muestran como sigue:

SEQ ID N° 1:

Tipo: aminoácido 1 letra (subrayado: cola de His6, *cursiva: conector*, **negrita subrayada: sitio de escisión con caspasa**)

MHHHHHHVNGPGSDEVDEQLLRAELRTATLRAFGGPGAGCISEGRAYDTDAGPVFVKVNRRT
 QARQMFEGEVASLEALRSTGLVRVPRPMKVIDLPGGGAAFVMEHLKMKSLSSQASKLGEQMA
 DLHLYNQKLREKLKEEENTVGRRGEGAEPQYVDKFGFHTVTCCGFIPQVNEWQDDWPTFFAR
 HRLQAQLDLIEKDYADREARELWSRLQVKIPDLFCGLEIVPALLHGDLSGNVAEDDVGP I I
 YDPASFYGHSEFELAIALMFGGFPRSFFTAYHRKIPKAPGFDQRLLLYQLFNYLNHWNHFGR
 EYRSPSLGTMRRLLK*

SEQ ID N°3:

Tipo: ADN (subrayado: cola de His6, *cursiva: conector*, negrita subrayada: sitio de escisión con caspasa)

ATGCATCATCATCATCATCATCATGTTAACGGTCCAGGTTCT**GATGAAGTTGAT**GAACAGTTGTT
GAGAGCTGAGTTGAGAACTGCTACTTTTGAGAGCTTTTGGTGGTCCAGGTGCTGGTTGTATT
CTGAGGGTAGAGCTTACGATACTGACGCTGGTCCAGTTTTTCGTTAAGGTTAACAGAAGAACT
CAGGCTAGACAGATGTTTCGAGGGTGAAGTTGCTTCTTTGGAGGCTTTGAGATCCACTGGTTT
GGTTAGAGTTCCAAGACCAATGAAGGTTATCGACTTGCCAGGTGGTGGTGTCTGCTTTTTGTTA
TGGAACACTTGAAGATGAAGTCCTTGTCTCTCCAGGCTTCTAAGTTGGGTGAACAAATGGCT
GACTTGCACCTTGTACAACCAGAAGTTGAGAGAAAAGTTGAAAGAGGAAGAGAACACTGTTGG
TAGAAGAGGTGAAGGTGCTGAGCCACAATACGTTGACAAGTTTCGGTTTCCACACTGTTACTT
GTTGTGGTTTTCATCCACAGGTTAACGAGTGGAAGATGACTGGCCAACTTTTCTTCGCTAGA
CACAGATTGCAAGCTCAGTTGGACTTGATCGAGAAGGACTACGCTGACAGAGAAGCTAGAGA
ATTGTGGTCCAGATTGCAGGTTAAGATCCAGACTTGTTCTGTGGTTTGGAGATCGTTCAG
CTTTGTTGCACGGTGATTTGTGGTCTGGTAACGTTGCTGAAGATGACGTTGGTCCAATTATC
TACGACCCAGCTTCTTTCTACGGTCACTCTGAATTCGAGTTGGCTATCGCTTTGATGTTCCG
TGGTTTCCCAAGATCCTTCTTCACTGCTTACCACAGAAAGATCCCAAAGGCTCCAGGTTTCG
ACCAGAGATTGTTGTTGTACCAGTTGTTCAACTACTTGAACCATTGGAACCACTTCGGTAGA
GAGTACAGATCTCCATCCTTGGGTACTATGAGAAGATTGTTGAAGTAA

SEQ ID N° 2 (= FN3K después de la retirada de la cola de HIS N-terminal):

Tipo: aminoácido 1 letra

EQLLRAELRTATLRAFGGPGAGCISEGRAYD TDAGPVFVKVNRRTQARQMFEGEVASLEALR
STGLVRVPRPMKVIDLPGGGA AFVMEHLKMKSLSSQASKLGEQMADLHLYNQKLREKLKEEE
NTVGRRGEGAEPQYVDKFGFHTVTCCGFIPQVNEWQDDWPTFFARHRLQAQLDLIEKDYADR
EARELWSRLQVKIPDLFCGLEIVPALLHGD LWSGNVAEDDVGP I IYDPASFYGHSEFELAIA
IMFGGFPRSFETAYHRKIPKAPGFDORLLLYOLENYLNHNHNEGREYRSPSLGTMRRLLK*

SEQ ID N° 4:

Tipo: ADN

GAACAGTTGTTGAGAGCTGAGTTGAGAACTGCTACTTTGAGAGCTTTTGGTGGTCCAGGTGC
TGGTTGTATTTCTGAGGGTAGAGCTTACGATACTGACGCTGGTCCAGTTTTTCGTTAAGGTTA
ACAGAAGAAGCTCAGGCTAGACAGATGTTTCGAGGGTGAAGTTGCTTCTTTGGAGGCTTTGAGA
TCCACTGGTTTGGTTAGAGTTCCAAGACCAATGAAGGTTATCGACTTGCCAGGTGGTGGTGC
TGCTTTTGTATGGAACACTTGAAGATGAAGTCCTTGTCTCCAGGCTTCTAAGTTGGGTG
AACAAATGGCTGACTTGCACTTGTACAACCAGAAGTTGAGAGAAAAGTTGAAAGAGGAAGAG
AACACTGTTGGTAGAAGAGGTGAAGGTGCTGAGCCACAATACGTTGACAAGTTCGGTTTCCA
CACTGTTACTTGTGTGGTTTCATCCACAGGTTAACGAGTGGCAAGATGACTGGCCAACCTT
TCTTCGCTAGACACAGATTGCAAGCTCAGTTGGACTTGATCGAGAAGGACTACGCTGACAGA
GAAGCTAGAGAATTGTGGTCCAGATTGCAGGTTAAGATCCCAGACTTGTCTGTGGTTTGA
GATCGTTCAGCTTTGTTGCACGGTGATTGTGGTCTGGTAACGTTGCTGAAGATGACGTTG
GTCCAATTACTACGACCCAGCTTCTTTCTACGGTCACTCTGAATTCGAGTTGGCTATCGCT
TTGATGTTCCGGTGGTTTCCCAAGATCCTTCTTCACTGCTTACCACAGAAAGATCCCAAAGGC
TCCAGGTTTCGACCAGAGATTGTTGTTGTACCAGTTGTTCACTACTTGAACCATTGGAACC
ACTTCGGTAGAGAGTACAGATCTCCATCCTTGGGTACTATGAGAAGATTGTTGAAGTAA

La presente invención se refiere en efecto – además – al hallazgo de que la fructosamina-3-cinasa recombinante obtenible mediante producción recombinante en *Pichia pastoris* y que tiene la secuencia de aminoácidos dada por SEQ ID N° 1 y 2 son enzimas preferidas para tratar dichas afecciones relacionadas con AGE. En efecto, las últimas enzimas se prefieren ya que 1) su producción en *Pichia* daba como resultado rendimientos superiores de la enzima en comparación con la producción en - por ejemplo - *E. coli*, 2) las enzimas tenían una pureza superior cuando se analizaban en SDS page, y 3) se puede evitar la presencia de endotoxina, que se sabe que provoca inflamación después de la administración.

Ejemplos

Ejemplo 1. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de retina porcina tratada con FAOD sola o en combinación con FN3K. Se obtuvieron retinas porcinas (n=40) de un matadero local y se almacenaron a 4°C hasta el procesamiento. Un oftalmólogo capacitado aisló retinas neurales a través de disección en un plazo de 12 h después de la muerte, se transfirieron a una placa de 6 pocillos estéril (Thermo scientific, Roskilde, Dinamarca) y se congelaron a -20°C. Se cortó un fragmento retiniano de cada retina congelada y se añadió a una placa de 96 pocillos para mediciones de la fluorescencia (FluoroNunc PolySorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU. de A.). Posteriormente, se realizaron mediciones de la fluorescencia en el punto inicial para cada fragmento retiniano a una distancia fijada y un ángulo de 90°. La modificación con AGE se realizó mediante la incubación de los fragmentos retinianos con 200 µl de dímero de glucoaldehído 25 mM (forma cristalina, Sigma-Aldrich) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 3 h a 37°C. Después de la incubación, los agentes activos se retiraron por lavado cuidadosamente, y los fragmentos retinianos se almacenaron durante la noche (4°C) hasta que finalizaba la reacción química. Finalmente, se inició la desglucación *in vitro* usando una solución que contenía FN3K (documento WO2019149648) 250 µg/ml + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l (n=10), FAOD 10 U/ml (n=10) o la combinación FN3K 250 µg/ml + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l + FAOD 10 U/ml (n=10).

La FAOD se adquirió de Creative Enzymes, Shirley, NY. Se añadieron veinte microlitros de las soluciones a cada fragmento retiniano y se incubaron durante 3 h a 37°C. Se realizaron mediciones de fluorescencia antes de la adición de soluciones de desglucación y se repitieron después del período de incubación. Como experimento de control, 10 fragmentos retinianos se procesaron de modo similar. Sin embargo, los fragmentos se trataron como control con PBS + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l después de la modificación con AGE.

Los AGE se cuantificaron basándose en mediciones de autofluorescencia (AF) de tipo Maillard (excitación 365 nm, emisión 390-700 nm) usando un espectrómetro miniaturizado Flame (FLAME-S-VIS-NIR-ES, 350-1000 nm, Ocean Optics, Dunedin, FL, EE. UU. de A.) equipado con una fuente de luz de LED de alta potencia (365 nm, Ocean Optics) y una sonda de reflexión (QR400-7-VIS-BX, Ocean Optics). Los valores de AF se calcularon dividiendo la intensidad de luz promedio emitida por nm para el intervalo de 407 nm a 677 nm por la intensidad de luz promedio por nm a lo largo del intervalo de 342 nm a 407 nm.

Las mediciones medias de AF muestran un fuerte incremento después de la glucación con GA en todos los fragmentos retinianos. La AF en retinas neurales disminuía en 34% cuando se trataban con la solución de FN3K (fig 1A), en 38% cuando se trataban con la solución de FAOD (fig 1B) y en 62% cuando se trataban con una solución que contenía tanto FN3K como FAOD (fig 1C), mientras que las retinas tratadas con control permanecían estables (AF+ 4%) (fig 1D)

Ejemplo 2. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de fragmentos de cristalino humano tratados con FAOD sola o en combinación con FN3K.

Fragmentos de cristalino humano con cataratas (n=30) obtenidos después de cirugía de facoemulsificación se lavaron varias veces con PBS, se mezclaron y se almacenaron a 4°C. La fluorescencia UV se midió en tres mezclas de fragmentos de cristalino (fig 2). Los AGE se cuantificaron basándose en mediciones de autofluorescencia (AF) de tipo Maillard (excitación 365 nm, emisión 390-700 nm) usando un espectrómetro miniaturizado Flame (FLAME-S-VIS-NIR-ES, 350-1000 nm, Ocean Optics, Dunedin, FL, EE. UU. de A.) equipado con una fuente de luz de LED de alta potencia (365 nm, Ocean Optics) y una sonda de reflexión (QR400-7-VIS-BX, Ocean Optics). A continuación, los fragmentos de cristalino mezclados se trataron durante 3 h a 37°C con FN3K (documento WO2019149648) 250 µg/ml + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l (n=10), FAOD 10 U/ml (n=10) o la combinación FN3K 250 µg/ml + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l + FAOD 10 U/ml (n=10). La FAOD se adquirió de Creative Enzymes, Shirley, NY. El tratamiento con FN3K daba como resultado una disminución en 68,85% para mediciones de fluorescencia UV a 450 nm y en 69,71% a 490 nm. El tratamiento con FAOD daba como resultado una disminución en 90% para mediciones de fluorescencia UV a 450 nm y en 90,57% a 490 nm. El tratamiento con una combinación tanto de FN3K como de FAOD daba como resultado una disminución en 93,68% para mediciones de fluorescencia UV a 450 nm y en 93,77% de disminución a 490 nm (fig 2).

Ejemplo 3. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de córnea humana tratada con FAOD sola o en combinación con FN3K.

Se obtuvieron corneas humanas (n=3) de ojos de cadáveres y se almacenaron a 4°C hasta el procesamiento. Un oftalmólogo capacitado aisló corneas humanas a través de disección en un plazo de 12 h después de la muerte, se transfirieron a una placa de 6 pocillos estéril (Thermo scientific, Roskilde, Dinamarca) y se congelaron a -20°C. Se cortaron fragmentos corneales de cada cornea congelada y se añadieron a una placa de 96 pocillos para mediciones de la fluorescencia (FluoroNunc PolySorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU. de A.). Posteriormente, se realizaron mediciones de la fluorescencia en el punto inicial para cada fragmento corneal a una distancia fijada y un ángulo de 90°. La modificación con AGE se realizó mediante la incubación de los fragmentos corneales con 200 µl de dímero de glucoaldehído (GA) 25 mM (forma cristalina, Sigma-Aldrich) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 3 h a 37°C. Después de la incubación, los agentes activos se retiraron por lavado cuidadosamente, y los fragmentos corneales se almacenaron durante la noche (4°C) hasta que finalizaba la reacción química. Finalmente, se inició la desglucación *in vitro* usando una solución que contenía FN3K (documento WO2019149648) 250 µg/ml + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l, FAOD 10 U/ml (n=10) o la combinación FN3K 250 µg/ml + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l + FAOD 10 U/ml. La FAOD se adquirió de Creative Enzymes, Shirley, NY. Se añadieron veinte microlitros de las soluciones a cada fragmento corneal y se incubaron durante 3 h a 37°C. Se realizaron mediciones de fluorescencia antes de la adición de soluciones de desglucación y se repitieron después del período de incubación. Como experimento de control, se procesaron fragmentos corneales de modo similar. Sin embargo, los fragmentos se trataron como control con PBS + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l después de la modificación con AGE.

Los AGE se cuantificaron basándose en mediciones autofluorescencia (AF) de tipo Maillard (excitación 365 nm, emisión 390-700 nm) usando un espectrómetro miniaturizado Flame (FLAME-S-VIS-NIR-ES, 350-1000 nm, Ocean Optics, Dunedin, FL, EE. UU. de A.) equipado con una fuente de luz de LED de alta potencia (365 nm, Ocean Optics) y una sonda de reflexión (QR400-7-VIS-BX, Ocean Optics). Los valores de AF se calcularon dividiendo la intensidad de luz promedio emitida por nm para el intervalo de 407 nm a 677 nm por la intensidad de luz promedio por nm a lo largo del intervalo de 342 nm a 407 nm.

Las mediciones medias de AF muestran un fuerte incremento después de la glucación con GA en todos los fragmentos corneales. La AF en los fragmentos corneales disminuía en 3% cuando se trataban con la solución de FN3K (fig 3A), en 12% cuando se trataban con la solución de FAOD (fig 3B) y en 27% cuando se trataban con una solución que contenía tanto FN3K como FAOD (fig 3C), mientras que las retinas tratadas con control mostraban un ligero incremento en la AF (fig 3D).

Ejemplo 4. Mediciones espectroscópicas de fluorescencia de retina humana tratada con FAOD y peroxidasa.

Se obtuvieron retinas porcinas (n=40) de un matadero local y se almacenaron a 4°C hasta el procesamiento. Un oftalmólogo capacitado aisló retinas neurales a través de disección en menos de 12 h después de la muerte, se transfirieron a una placa de 6 pocillos estéril (Thermo scientific, Roskilde, Dinamarca) y se congelaron a -20°C. Se cortó un fragmento retiniano de cada retina congelada y se añadió a una placa de 96 pocillos para mediciones de la fluorescencia (FluoroNunc PolySorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU. de A.). Posteriormente, se realizaron mediciones de la fluorescencia en el punto inicial para cada fragmento retiniano a una distancia fijada y un ángulo de 90°. La modificación con AGE se realizó mediante la incubación de los fragmentos retinianos con 200 µl de dímero de glucoaldehído 25 mM (forma cristalina, Sigma-Aldrich) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 3 h a 37°C. Después de la incubación, los agentes activos se retiraron por lavado cuidadosamente, y los fragmentos retinianos se almacenaron durante la noche (4°C) hasta que finalizaba la reacción química. Finalmente, se inició la desglucación *in vitro* usando una solución que contenía FAOD 10 U/ml sola o en combinación con peroxidasa 473 U/ml. La FAOD se adquirió de Creative Enzymes, Shirley, NY. Se añadieron veinte microlitros de las soluciones a cada fragmento retiniano y se incubaron durante 1 h, 2 h o 3 h, respectivamente, a 37°C. Las enzimas desglucantes se retiraron por lavado cuidadosamente con PBS y los AGE se cuantificaron basándose en mediciones de autofluorescencia (AF) de tipo Maillard (excitación 365 nm, emisión 390-700 nm) usando un espectrómetro miniaturizado Flame (FLAME-S-VIS-NIR-ES, 350-1000 nm, Ocean Optics, Dunedin, FL, EE. UU. de A.) equipado con

una fuente de luz de LED de alta potencia (365 nm, Ocean Optics) y una sonda de reflexión (QR400-7-VIS-BX, Ocean Optics). Los valores de AF se calcularon dividiendo la intensidad de luz promedio emitida por nm para el intervalo de 407 nm a 677 nm por la intensidad de luz promedio por nm a lo largo del intervalo de 342 nm a 407 nm.

Las mediciones medias de AF muestran un fuerte incremento después de la glucación con GA en todos los fragmentos retinianos (fig. 4). La AF en las retinas neurales disminuía de forma similar con 47% cuando se trataban durante 1 h con solución de FAOD sola o en combinación con peroxidasa. Sin embargo, después de 2 h de incubación con soluciones desglucantes, la AF en retinas neurales disminuía otro 40% cuando se trataban con solución de FAOD en combinación con peroxidasa en comparación con 29% cuando se usaba solamente solución de FAOD. Después de una incubación de 3 h, la AF en retinas neurales disminuía adicionalmente en 5% cuando se trataban con solución de FAOD en combinación con peroxidasa en comparación con 26% cuando se usaba solamente solución de FAOD, sugiriendo un proceso de desglucación más rápido cuando se usa solución de FAOD desglucante con peroxidasa.

Ejemplo 5. Medida de la función visual y la presión intraocular en perros *in vivo* después del tratamiento con FAOD en combinación con FN3K. 4 perros (un chihuahua de 11 años, un caniche de 8 años, un bichón maltés de 8 años y un perro pastor de 7 años) con cataratas cegadora en ambos ojos se trataron con gotas que contenían una combinación de FAOD y FN3K durante 4 semanas en el ojo derecho y con una enzima FNK3 inactiva mutante en el ojo izquierdo (documento WO20200053188). 2 de los 4 perros, el chihuahua y el perro pastor, habían desarrollado cataratas recientemente en un plazo de 3 semanas. Los otros 2 perros tenían una catarata más antigua (más de 3 meses). El tratamiento consistía en 6 gotas con un intervalo de 5 minutos el día 1, y a continuación semanalmente durante 4 semanas (4 tratamientos en total). Las gotas del ojo derecho (OD) contenían 100 U/ml de FAOD y 70 µg/ml de FN3K, 5 mmol/l de ATP y 2 mmol/l de MgCl₂. La FAOD se adquirió de Creative Enzymes, Shirley, NY. Como control, las gotas del ojo izquierdo (OI) contenían 70 µg/ml de FN3K mutante, 5 mmol/l de ATP y 2 mmol/l de MgCl₂. La función visual (VF) se probó en tres pruebas visuales diferentes antes del tratamiento (punto inicial) y posteriormente semanalmente durante el tratamiento. Todas las pruebas se realizaron para el OD y el OI separadamente. En la prueba de la mesa, el perro puntuaba positivo (+) si el perro extendía las patas al acercarse a una mesa, en la prueba de la bola de algodón el perro puntuaba positivo (+) si buscaba la bola de algodón tirada sobre una mesa, en la prueba del camino el perro puntuaba positivo (+) si andaba desde la entrada hasta la salida sin chocarse con sillas y cajas puestas aleatoriamente en el camino.

La Tabla 1 muestra la mejora en la función visual en el OD tratado de 2 de 4 perros (chihuahua y perro pastor) ya después de 2 semanas de tratamiento. Los perros que mostraban una mejora rápida eran los perros que habían desarrollado cataratas recientemente en un plazo de 3 semanas.

	VF	VF	VF	VF	VF
	punto inicial	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
OD del chihuahua	-/-	-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+
OI del chihuahua	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
OD del perro pastor	-/-	-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+
OI del perro pastor	—	-/-	-/-	-/-	-/-

En segundo lugar, se evaluó el efecto del tratamiento con enzimas desglucantes sobre la presión intraocular (IOP) en 4 perros (un chihuahua de 11 años, un caniche de 8 años, un bichón maltés de 8 años y un perro pastor de 7 años). Antes de medir la IOP, se añadió una gota de anestésico a la córnea (oxibuprocaina) y a continuación se midió la IOP mediante tonometría de aplanamiento con el Tono-pen vet (Reichert, NY, EE. UU. de A.). La IOP se midió antes y 30 minutos después del tratamiento del OD (combinación de enzimas FAOD y FN3K) y el OI (enzima FN3K inactiva mutante). El tratamiento consistía en 6 gotas con un intervalo de 5 minutos. Las gotas del ojo derecho (OD) contenían 100 U/ml de FAOD y 70 µg/ml de FN3K, 5 mmol/l de ATP y 2 mmol/l de MgCl₂. La FAOD se adquirió de Creative Enzymes, Shirley, NY, EE. UU. de A. Como control, las gotas del ojo izquierdo (OI) contenían 70 µg/ml de FN3K inactiva mutante (documento WO20200053188), 5 mmol/l de ATP y 2 mmol/l de MgCl₂. En el OD, podía apuntarse una IOP alta (> 13 mm Hg) antes del tratamiento en 2 perros: en el bichón maltés hasta 22 mm Hg y en el perro pastor hasta 14 mm Hg. Después del tratamiento con la combinación de enzimas desglucantes (combinación de FAOD y FN3K) la IOP caía en 54% en el bichón maltés y en 29% en el perro pastor. En los otros 2 perros, la IOP del OD era baja (< 13 mm Hg) antes del tratamiento y permanecía baja (< 13 mm Hg) después del tratamiento con enzimas desglucantes. En los 4 perros, la IOP en el OI era baja (< 13 mm Hg) antes del tratamiento y permanecía baja (< 13 mm Hg) después del tratamiento con enzima FN3K inactiva mutante.

Ejemplo 6 (fig 5) Diferentes patrones de fluorescencia muestran diferente especificidad de sustrato para FN3K y FAOD.

Fragmentos de cristalino humano con cataratas (n=30) obtenidos después de cirugía de facoemulsificación se lavaron varias veces con PBS, se mezclaron y se almacenaron a 4°C. Como el incremento relacionado con la edad no es completamente similar para todos los AGE en pacientes diabéticos en comparación con pacientes no diabéticos, la mezcla de fragmentos de cristalino se extendió y también se incluyeron pacientes seniles con diabetes (13). Los AGE se cuantificaron basándose en mediciones de autofluorescencia (AF) de tipo Maillard (excitación 365 nm, emisión 390-700 nm) usando un espectrómetro miniaturizado Flame (FLAME-S-VIS-NIR-ES, 350-1000 nm, Ocean Optics, Dunedin, FL, EE. UU. de A.) equipado con una fuente de luz de LED de alta potencia (365 nm, Ocean Optics) y una sonda de reflexión (QR400-7-VIS-BX, Ocean Optics). Dos mezclas similares de fragmentos de cristalino se trataron a continuación durante 3 h a 37°C bien con FN3K (documento WO2019149648) 250 µg/ml + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l (n=15) o bien con FAOD 10 U/ml (n=15). La FAOD se adquirió de Creative Enzymes, Shirley, NY. Después de la incubación con tratamiento con FN3K, se observa una disminución importante en la autofluorescencia en el espectro de AGE (450-500 nm). Como resultado, se pueden observar dos máximos después del tratamiento con FN3K, uno grande a 500 nm y un segundo pico más pequeño de autofluorescencia a 450 nm con una disminución importante de la autofluorescencia a 450 nm. En contraste, el patrón de fluorescencia después del tratamiento con FAOD es diferente con una pérdida completa de señal de autofluorescencia a 450 nm pero con un nuevo pico más pequeño observado a 520 nm que representa productos fluorescentes secundarios de AGE anteriores (14). Así, después del tratamiento con FAOD pero no el tratamiento con FN3K, la cantidad relativa de pérdida de autofluorescencia después del tratamiento con FAOD se cambia con un nuevo pico de autofluorescencia a 520 nm.

Ejemplo 7 (fig 6) Diferente patrón de filtración en gel de fragmentos de cristalino humano con cataratas mezclados solubles en urea muestran diferente especificidad de sustrato para FN3K y FAOD

Se obtuvieron fragmentos de cristalino humano después de facoemulsificación durante la cirugía de cataratas de 10 pacientes. Se incluían pacientes no diabéticos y diabéticos. Después de la cirugía, el líquido de conservación que contenía los fragmentos de cristalino se centrifugó (1902 × g, 5 min, 21°C) y el sobrenadante se retiró. Posteriormente, los fragmentos mezclados (20 mg) se incubaron durante 3 h a 37°C en 200 µl de una solución que contenía FAOD (3,83 U/ml). Fragmentos mezclados no tratados (20 mg) se almacenaron bajo las mismas condiciones. Puesto que se sabe bien que las cataratas están asociadas con fuertes incrementos en proteínas insolubles en agua, las proteínas solubles en urea (insolubles en agua) procedentes de fragmentos de cristalino tanto no tratados como tratados se extrajeron en urea 6 M en PBS durante 4 h a 4°C en tubos de Eppendorf con SafeLock (Hamburgo, Alemania). Después de la centrifugación (16.000× g, 10 min, 21°C), el sobrenadante se retuvo para la filtración en gel. La filtración en gel de fragmentos de cristalino no tratados y tratados con FAOD se llevó a cabo en una columna cromatográfica (longitud: 60 cm, diámetro: 15 mm) rellena con resina Sephadex G-25® Fine (Sigma-Aldrich) a fin de determinar la masa molecular de compuestos del cristalino que contienen fructosa tales como AGE. Después del fraccionamiento, la presencia de AGE se comprobó en primer lugar basándose en mediciones de autofluorescencia (AF) de tipo Maillard (excitación 365 nm, emisión 390-700 nm) usando un espectrómetro miniaturizado Flame (FLAME-S-VIS-NIR-ES, 350-1000 nm, Ocean Optics, Dunedin, FL, EE. UU. de A.) equipado con una fuente de luz de LED de alta potencia (365 nm, Ocean Optics) y una sonda de reflexión (QR400-7-VIS-BX, Ocean Optics). Se detectaron picos de autofluorescencia para fragmentos de cristalino tratados con FAOD a 520 nm, mientras que los picos de autofluorescencia para fragmentos de cristalino tratados con FN3K se detectaron a 450 nm y 500 nm (15). Posteriormente, todas las fracciones individuales se probaron fotométricamente usando la reacción de resorcinol-HCl (Seliwanoff), una reacción cromática muy conocida para las cetosas (16). En esta reacción, una muestra de 50 µl se añadió a 100 µl de resorcinol (9 mM, Sigma-Aldrich) y 1 ml de ácido clorhídrico (9 M, Sigma-Aldrich). Después de la incubación en un baño de agua a ebullición durante 5 min el color desarrollado se leyó fotométricamente en una cubeta de 10 mm estándar a 488 nm. La filtración en gel de fragmentos de cristalino no tratados mostraba un pico agudo a los 165 min de tiempo de elución correspondiente a una masa molecular de ± 2500 Da y un segundo pico menor a los 235 min de tiempo de elución correspondiente a 1660 Da antes del tratamiento, lo que indica la presencia de estructuras de alta masa molecular tales como AGE reticulados. En las fracciones de cristalino tratadas con FN3K, se detectó una serie de cetosas (AGE derivados de fructosa) con una masa molecular que variaba entre 1500 y 2500 Da (15). En contraste, los AGE que contienen fructosa estaban completamente ausentes en fragmentos de cristalino humano con cataratas después del tratamiento con FAOD, y ya no se detectaba ningún pico en ningún punto temporal de elución. Así, el tratamiento con FAOD no solo da como resultado componentes con diferente masa molecular, sino también con una estructura diferente en comparación con el tratamiento con FN3K.

Ejemplo 8 (Figura 7). Aumento de potencia del cristalino humano después del tratamiento con FAOD

Se obtuvieron cristalinolitos humanos de ojos de cadáveres que eran rechazados para el trasplante de córnea (Biobank Antwerpen, Antwerpen Bélgica, ID71030031000). Los ojos se diseccionaron y los cristalinolitos fueron extirpados por un cirujano oftálmico experto. Los cristalinolitos se incubaron con FAOD o PBS. La potencia del cristalino se midió antes del tratamiento y cada hora consecutiva hasta 4 h. La medición de la distancia focal se basa en la fórmula de la lente

delgada $\frac{1}{f} = \frac{1}{S_1} + \frac{1}{S_2}$ que se refiere a la distancia focal de la lente f con la distancia al objeto desde la lente S_1 y la distancia a la imagen desde la lente S_2 . Un objeto aparecerá enfocado cuando las tres cantidades cumplan la fórmula

$$M = \frac{S_2}{S_1}$$

de la lente delgada. Por otra parte, la amplificación M de un sistema óptico se puede expresar como

la distancia total entre el objeto y el plano de la imagen $L = S_1 + S_2$ y la amplificación M , la distancia focal de la lente bajo prueba se puede obtener fácilmente usando la ecuación $L/f = (1 + M)(1 + \frac{1}{M})$. Puesto que la distancia focal de la lente bajo prueba es bastante pequeña (aproximadamente 8 mm), es poco práctico formar imágenes directamente sobre un sensor de CMOS y se usa una lente de formación de imágenes adicional. Se usa un sensor de CMOS de alta resolución (Basler ace - acA2000-165uc, 2040 x 1086 píxeles y tamaño del píxel 5,5 μm) en combinación con una lente de formación de imágenes de longitud focal fija (25 mm/F1.4 59871 Edmund optics, New Jersey). El objeto consiste en un patrón periódico de líneas oscuras y blancas. En primer lugar, se toma una imagen de referencia con la lente bajo prueba poniendo la cámara en la posición en la que la imagen está enfocada. A continuación, la lente bajo prueba se coloca en una posición aleatoria desde el objeto y la distancia de la cámara se recoloca de modo que la imagen del objeto esté enfocada. Midiendo el período de las líneas formadas como imágenes por la cámara, se puede calcular la amplificación y con la posición de la cámara, finalmente se puede calcular la distancia focal. El método de medición se verificó realizando el procedimiento para una lente esférica conocida con una distancia focal 4,03 mm (Thorlabs C340TMD-A) que daba como resultado un error de menos de 1% en la longitud focal. Como la calidad de la lente bajo prueba (debido a turbidez y aberraciones) es considerablemente peor que una lente de vidrio, pueden tratarse posibles problemas con el enfoque de la imagen repitiendo el procedimiento para diferentes distancias entre el objeto y la lente bajo prueba y promediando el resultado.

La potencia del cristalino en el punto inicial (fig 7A) era $17 \pm 0,95$ D y no cambiaba cuando se trataba con solución salina. La potencia del cristalino se midió en aire y se convirtió en potencia del cristalino en agua (el índice de refracción del cristalino en aire es 1,5, el índice de refracción del cristalino en agua es 1,13). La potencia del cristalino se incrementaba después de 2 horas de tratamiento con FAOD en $0,45 \pm 0,35$ D, después de 3 horas de tratamiento con FAOD en $0,96 \pm 0,96$ D y después de 5 horas (máximo) en $2,11 \pm 0,67$ (fig 7B). El tratamiento con FAOD de cristalinios humanos daba como resultado así un incremento en la potencia del cristalino, que se refleja en una relación directa con las propiedades mecánicas del cristalino (17).

Ejemplo 9 (figura 8) La microespectroscopia de infrarrojo cercano sobre secciones tisulares teñidas de retina humana con AGE descifra diferentes cambios bioquímicos después del tratamiento con FN3K en comparación con el tratamiento con FAOD.

Se obtuvieron ojos de donantes de 2 pacientes de AMD en fase 3 (edad > 70 años). Después del seccionamiento del tejido, las muestras se desparafinaron antes del tratamiento mediante inmersión consecutiva en xileno ($3 \times 1,5$ min), alcohol (90% 2×1 min; 75% 1×1 min) y enjuague en agua. Los portaobjetos se secaron durante 10 min a 60°C. Para el tratamiento de control, una sección se cubrió con 1 ml de solución de ATP/MgCl₂. Para el tratamiento con FN3K, una sección adyacente se trató usando 1 ml de solución de FN3K (FN3K (documento WO2019149648) 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + ATP 5 mmol/l + MgCl₂ 2 mmol/l. Para el tratamiento con FAOD, una sección adyacente se trató usando 1 ml de solución de FAOD 3,83 U/ml. Las secciones se incubaron a 37°C durante 24 h. Después de la incubación, las secciones tisulares se lavaron cuidadosamente con agua destilada y se secaron durante la noche a 37°C. A continuación, las secciones se tiñeron y se cubrieron con cubreobjetos. La microespectroscopia infrarroja (IR) combina microscopía óptica con espectroscopia IR y es una poderosa técnica analítica para obtener visualizaciones bioquímicamente selectivas de secciones tisulares (18,19). La espectroscopia IR se basa en el principio de que diferentes regiones de luz IR son absorbidas por diversas moléculas dentro de los tejidos (p. ej., carbohidratos, proteínas y lípidos) (19, 20). En un sistema microespectroscópico IR típico, se emplea luz visible para visualizar y localizar zonas de interés sobre secciones tisulares. Una vez que se encuentra una región particular (p. ej., una drusa específica), el sistema cambia a la configuración IR y se irradia luz IR sobre el objetivo predefinido (19). Para obtener una huella química de lesiones drusenoides sobre las mismas secciones tisulares usadas para el examen microscópico óptico, se registraron microespectros de transmisión del infrarrojo cercano con transformada de Fourier (FT-NIR) con un microscopio Bruker Hyperion 2000 acoplado a un espectrómetro de FTIR Bruker Vertex 80v (Bruker, MA, EE. UU. de A.) que funciona con una fuente de luz halógena, un divisor de haces de CaF₂ y un detector de InGaAs. La amplificación del objetivo del microscopio se ajustó a $15 \times$ y la apertura a $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. El fondo se recogió con 800 coadiciones. Los espectros se registraron a una resolución de 16 cm⁻¹ en el intervalo de 12.000 a 4000 cm⁻¹ (800 escaneos). El análisis de datos espectrales se realizó usando el programa SIMCA versión 15.0 (MKS Data Analytics Solutions, Malmö, Suecia). Se realizaron diferentes etapas de preprocesamiento para minimizar la dispersión irrelevante de luz y estandarizar las señales espectroscópicas. La diferenciación se realizó para acentuar pequeñas diferencias estructurales y reducir efectos basales (21). La normalización de la variable normal estándar (SNV) se realizó para eliminar efectos de gradación a escala multiplicativos y variaciones por desviaciones basales aditivas. Después del preprocesamiento, los datos espectrales se analizaron mediante métodos de reconocimiento de patrones no supervisados, tales como análisis de componentes principales (PCA), y métodos de reconocimiento de patrones supervisados, tales como análisis discriminador por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), un método útil para ilustrar qué variables son responsables de la discriminación entre 2 grupos distintos. El gráfico de Hotelling resultante muestra una distinción clara entre drusas tratadas con FN3K y drusas tratadas con FAOD.

Ejemplo 10

Se incubaron mezclas de fructosa y lisina así como una mezcla de fructosa y arginina, así como glucosa y arginina y glucosa-lisina. Después de una incubación a 37°C durante una semana, una porción de la mezcla se digirió, respectivamente, mediante fructosil-aminoxidasa (FAOD, 38,3 U/ml) y fructosamina-3-cinasa (F3K, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ATP,

5 mmol/l; MgCl₂, 2 mmol/l). Se aplicó un enfoque de perfilado de metabolitos no dirigido basado en cromatografía de líquidos de rendimiento ultraalto (UHPLC) acoplada con espectrometría de masas de alta resolución (HRMS).

Material y métodos

Muestras

5 Mezclas antes del tratamiento enzimático (grupo 1):

- Mezcla de glucosa (100 mg/ml) y arginina (100 mg/ml) en agua, incubada a 37°C durante una semana.
- Mezcla de fructosa (100 mg/ml) y arginina (100 mg/ml) en agua, incubada a 37°C durante una semana.
- Mezcla de glucosa (100 mg/ml) y lisina (100 mg/ml) en agua, incubada a 37°C durante una semana.
- Mezcla de fructosa (100 mg/ml) y lisina (100 mg/ml) en agua, incubada a 37°C durante una semana.

10 • Mezclas después del tratamiento enzimático (grupo 2):

- Mezcla Glu-Arg tratada con FAOD,
- Mezcla Glu-Arg tratada con FN3K,
- Mezcla Fru-Arg tratada con FAOD,
- Mezcla Fru-Arg tratada con FN3K,
- 15 • Mezcla Glu-Lys tratada con FAOD,
- Mezcla Glu-Lys tratada con FN3K, .
- Mezcla Fru-Lys tratada con FN3K,

Además, también se proporcionaron soluciones de glucosa, fructosa, arginina y lisina con propósitos de optimización y el estudio del patrón de fragmentación de MS de estos compuestos.

20 *Condiciones de UHPLC-HRMS*

La separación cromatográfica se alcanzó en una bomba Accela 1250 (Thermo Fisher Scientific), usando una columna C18 en fase inversa Zorbax RRHD Eclipse Plus (100 Å, 1,8 µm, 100 mm × 2,1 mm). La fase móvil consistía en ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua (eluyente A) y ácido fórmico al 0,1% (v/v) en metanol (eluyente B). Se aplicó un programa de elución en gradiente como sigue: 0 – 0,5 min: B al 5%, 0,5 – 20,0 min: B al 5 - 99%, 20,0 – 21,0 min: B al 99%, 21,0 – 24,0 min: B al 99 - 5% B, 24,0 – 28,0 min: al 5% B. El caudal de la fase móvil era 0,3 ml/min. La temperatura de la columna se ajustó a 40°C y la temperatura del automuestreador era 10°C. El volumen de inyección era 5 µl.

Se obtuvieron datos precisos de alta resolución de fragmentación de espectroscopía de masas y de masas en tándem (MS/MS) usando un espectrómetro Q-Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipado con una interfaz de ionización de electropulverización calentada (HESI-II). El instrumento se hizo funcionar en el modo de ionización positiva. La adquisición de datos incluía escaneos de MS completos y de MS/MS dependientes de datos. Los parámetros de la fuente de ionización eran los siguientes: un voltaje de pulverización de 3,0 kV, una temperatura capilar de 350°C, una temperatura del calentador de 375°C, un caudal de gas de envuelta de 45 unidades arbitrarias (u. a.), un caudal de gas auxiliar de 10 u. a. Se realizó una calibración externa diaria del HRMS usando la solución Calmix de Thermo Scientific a lo largo de un intervalo de masa de 138-1721 Da. Se permitía la calibración de masa en línea usando ftalato de diisooctilo (C₂₄H₃₈O₄) como masa de bloqueo.

El control del instrumento se llevó a cabo mediante el programa Xcalibur 4.2 (Thermo Fisher Scientific). Para el procesamiento de datos, se usaron los programas tanto Xcalibur como Compound Discoverer 3.3 (Thermo Fisher Scientific).

Resultados

40 *Detección de compuestos pertinentes en las muestras investigadas*

El procesamiento de datos generados mediante el análisis de UHPLC-HRMS/MS revelaba la presencia de un gran número de compuestos en las muestras investigadas (se detectaron ± 800 compuestos distintos en cada muestra). La mayoría de los compuestos que se detectaban en una muestra dada procedente del grupo 2 (es decir, mezcla de un aminoácido y un azúcar específicos incubada a 37°C, y posteriormente tratada mediante una enzima) también estaban presentes en la muestra correspondiente procedente del grupo 1 (es decir mezcla de esos aminoácido y azúcar específicos incubada a 37°C, pero no tratada enzimáticamente). Por lo tanto, se consideraba que un pico de MS detectado era pertinente (es decir, un producto final de glucación avanzada (AGE) potencial) cuando se cumplían los

siguientes criterios:

- El compuesto no está presente en el blanco (agua).
 - Para una muestra dada procedente del grupo 1, el compuesto detectado no está presente en la muestra obtenida usando el mismo azúcar y un aminoácido diferente.
- 5
- Para una muestra dada procedente del grupo 2, el compuesto detectado no está presente en la muestra obtenida usando los mismos azúcares y enzima pero un aminoácido diferente.

Se seleccionaron 40 y 19 compuestos pertinentes (que posiblemente podrían ser AGE) para muestras que contenían arginina y muestras que contenían lisina, respectivamente.

MS DE ANÁLISIS COMPARATIVO Digestión con FAOD Y F3K

10 **AGE que desaparecen (A = basados en arginina, L = basados en lisina)**

FUERTE =: más de 80% de reducción (frente a la muestra no tratada)

DÉBIL: entre 20 y 40% de reducción

NO ACTIVO: menos de 20% de diferencia

nº	[M=H] m/z	Fórmula molecular	anotación	Efecto de FAOD	Efecto de F3K
A1	133,09695	C5H12N2O2	ornitina	FUERTE	DÉBIL
A3	337,17098	C12H24N4O7	Fructosil-arginina/glucosilarginina	FUERTE	NO ACTIVO
A4	319,16064	C12H22N4O6	Imidazolona A	FUERTE	NO ACTIVO
L1	309,16554	C12H24N2O7	Frictosil-lisina/glucosil-lisina	FUERTE	DÉBIL
L2	219,13387	C9H18N2O4	carboxietil-lisina	FUERTE	DÉBIL
L3	205,11825	C8H16N2O4	carboximetil-lisina	FUERTE	DÉBIL

15

Productos formados

nº	[M=H] m/z	Fórmula molecular	anotación	Efecto de FAOD	Efecto de F3K
A9	351,15047	C12H22N4O8	Producto de arginina, 3-desoxiglucosona y glioxal	MUY FUERTE (> 100 veces de incremento)	No detectado
A2	131,12904	C5H14N4	agmatina	FUERTE (1,8 (glu-Arg) – 9,6 veces (Fru-Arg) de incremento)	Variable (dependiendo de la mezcla de partida)

CONCLUSIÓN: Tanto F3K como FAOD pueden descomponer una variedad de productos finales de glucación avanzada. La FAOD reconoce sustratos que no son reconocidos por F3K (compuestos nºA3 y nºA4). El efecto de FAOD sobre la degradación de AGE es generalmente más pronunciado que el de F3K

20

Referencias

1. Avery NC y cols. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. Pathologic Biologic 2006 54:387-95

2. Nagaraj RH, Linetsky M, Stitt AW. The pathogenic role of Maillard reaction in the eye. *Amino acids*. 2012 42:1205-1220.
3. Alves M, Calegari VC, Cunha DA, Saas MJA, Velloso LA, Rocha EM. Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor, and activation of nuclear factor kappa-B in lacrimal glands of diabetic rats. *Diabetologia* 2005 48:2675-2681.
4. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of glycation inhibitors on aging and age-related diseases. 2016 160:1-18
5. Bejarano E, Taylor A. Too sweet: Problems of protein glycation in the eye. *Exp Eye Res*. 2019 178:255-262.
6. Cheloni R, Gandolfi SA, Signorelli C, Odone A. Global prevalence of diabetic retinopathy: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2019 9:e022188. doi:10.1136/bmjopen-2018-022188
7. Ferri S, Kim S, Tsugawa W, Sode K. Review of fructosil amino acid oxidase engineering research; a glimpse into the future of hemoglobin A1c biosensing. *J Diabetes science and technology* 2009 3:585-592.
8. Lin Z, Zheng J. Occurrence, characteristics, and applications of fructosil amine oxidases (amaduriases). *Appl Microbiol Biotechnol* 2010 86:1613-1619
9. Shen y cols. (Compendio B44 del Congreso Anual de 2013 de la AACC)
10. Capuano y cols. (J. Agric. Food Chem 2007:4189)
11. Sakaue R, Hiruma M, Kajiyama N, Koyama Y. Cloning and expression of fructosil-amino acid oxidase gene from *Corynebacterium* sp. 2-4-1 in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002 66:1256-61
12. Gote V, Sikder S, Sicotte J, Pal D. Ocular drug delivery: present innovations and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther* 2019 370:602-624
13. Tessier F, Obrenovich M, Monnier VM. Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes and cataractogenesis. *J Biol Chem* 1999 274:20796-20804
14. Rajan M y Beedu SR. Spectroscopic and biochemical correlations during the course of human lens aging. *BMC Ophthalmology* 2006 6:10
15. De Bruyne S, Loes van Schie L, Jonas Himpe J, Filip De Somer F, Inge Everaert I, Wim Derave W, Caroline Van den Broecke C, Manon Huizing M, Nezahat Bostan N, Marijn Speeckaert M, Nico Callewaert N, Elisabeth Van Aken E, y Joris R. Delanghe JR. A Potential Role for Fructosamina-3-Kinase in Cataract Treatment Sander De Bruyne *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3841. <https://doi.org/10.3390/ijms22083841>
16. Roe, J.H. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J. Biol. Chem.* 1934 107:15-22
17. Wang K, Pierscionek BK. Biomechanics of the human lens and accommodative system: Functional relevance to physiological states. *Prog Ret Eye Res* 2019 71:114-131
18. Fernández, D.C.; Bhargava, R.; Hewitt, S.M.; Levin, I.W. Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 469-474
19. Varma, V.K.; Kajdacsy-Balla, A.; Akkina, S.K.; Setty, S.; Walsh, M.J. A label-free approach by infrared spectroscopic imaging for interrogating the biochemistry of diabetic nephropathy progression. *Kidney Int.* 2016, 89, 1153-1159
20. De Bruyne, S.; Speeckaert, M.M.; Delanghe, J.R. Applications of mid-infrared spectroscopy in the clinical laboratory setting. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2018, 55, 1-20
21. De Bruyne, S.; Speeckaert, R.; Boelens, J.; Hayette, M.-P.P.M.-P.; Speeckaert, M.; Delanghe, J. Infrared spectroscopy as a novel tool to diagnose onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* 2019, 180, 637-646

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una fructosil-aminoxidasa para el uso en el tratamiento de presbicia, cataratas, degeneración macular asociada a la edad, síndrome del ojo seco, retinopatía diabética y/o glaucoma.
- 5 2. Una composición para el uso según la reivindicación 1, que comprende además dinucleótido de flavina y adenina (FAD).
3. Una composición para el uso según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además una fructosamina-3-cinasa y trifosfato de adenosina (ATP)
4. Una composición para el uso según la reivindicación 3, que comprende además iones magnesio.
5. Una composición para el uso según las reivindicaciones 1-4, que comprende además una peroxidasa.
- 10 6. Una composición para el uso según la reivindicación 1-5, donde dicha composición se administra como gotas o a través de cualquier otra aplicación externa, o a través de una aplicación interna.

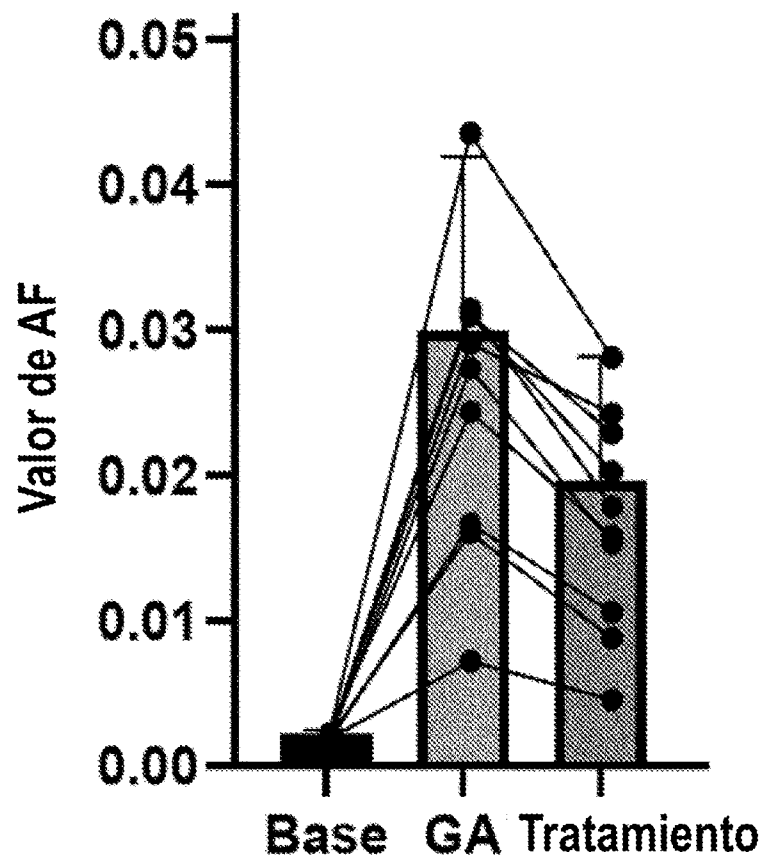


Fig 1A

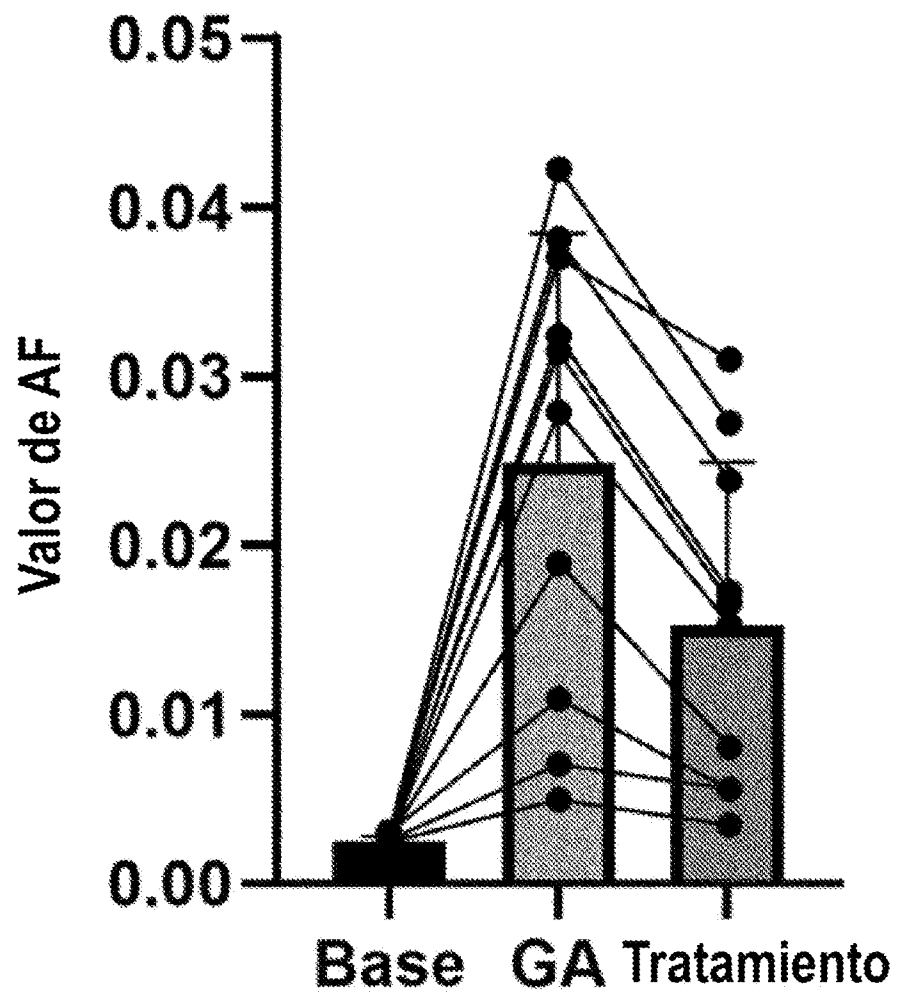


Fig 18

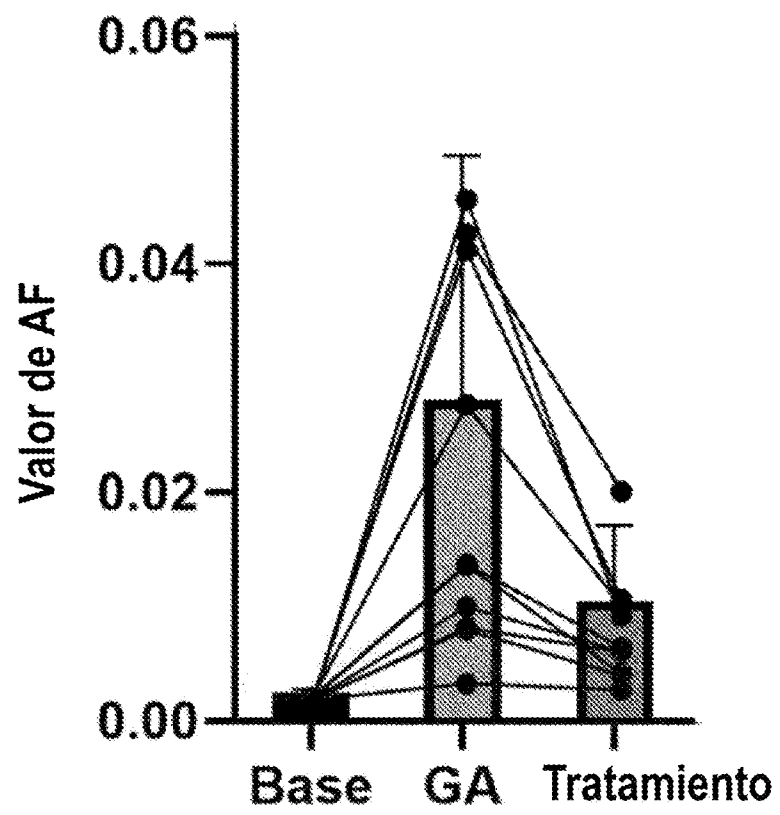


Fig 1C

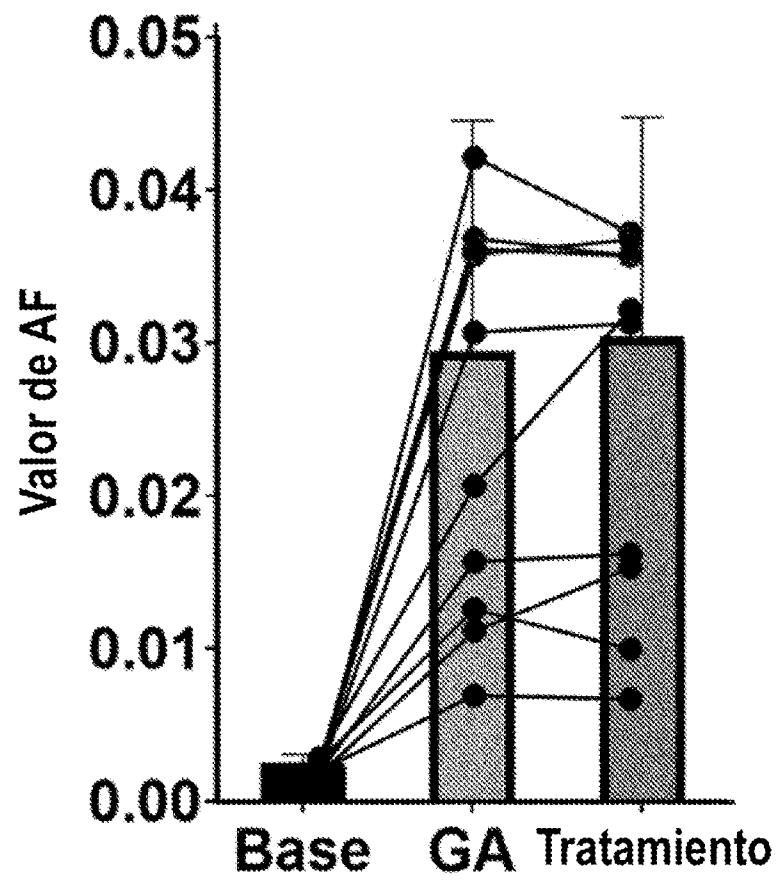


Fig 1D

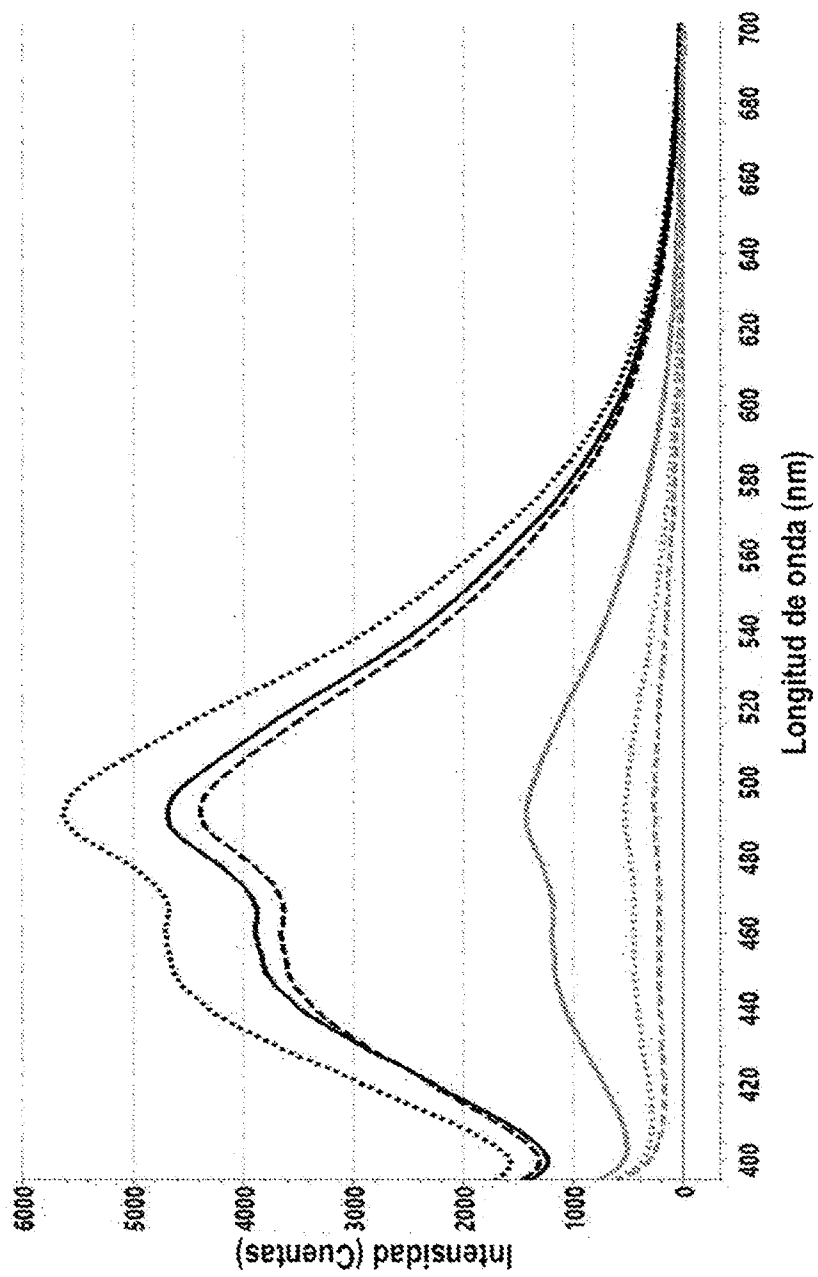
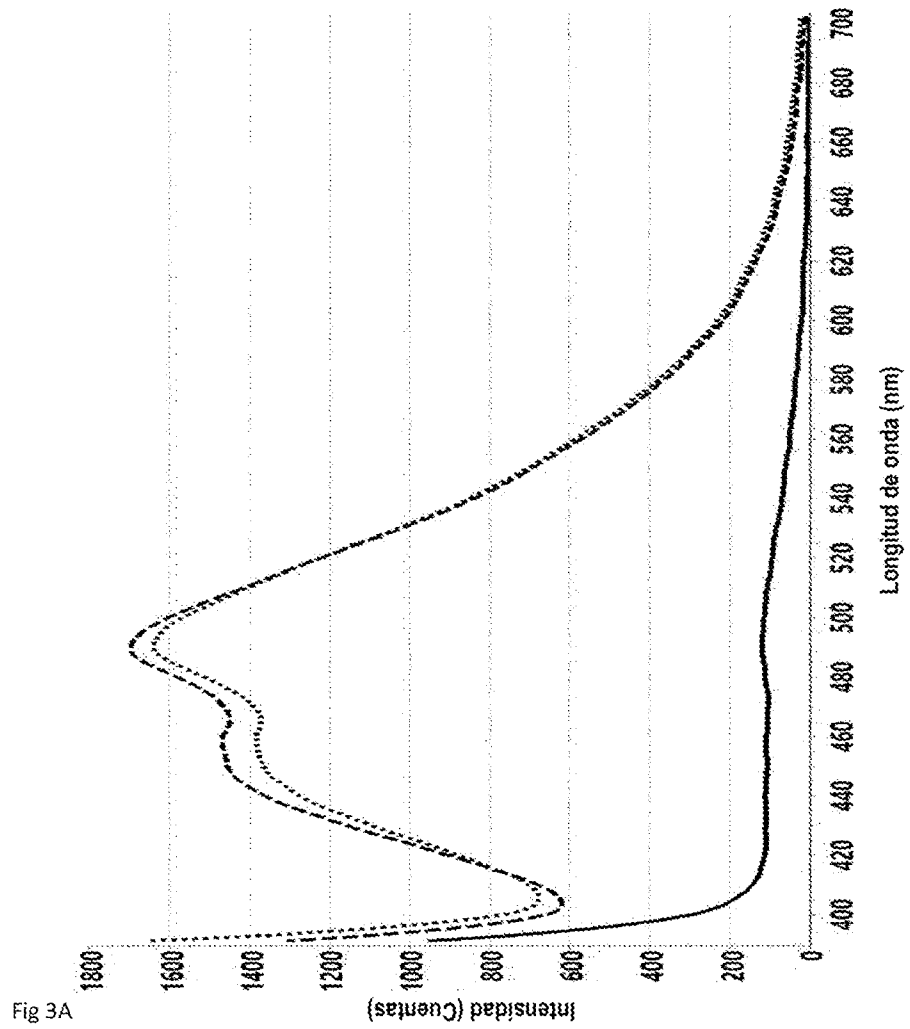
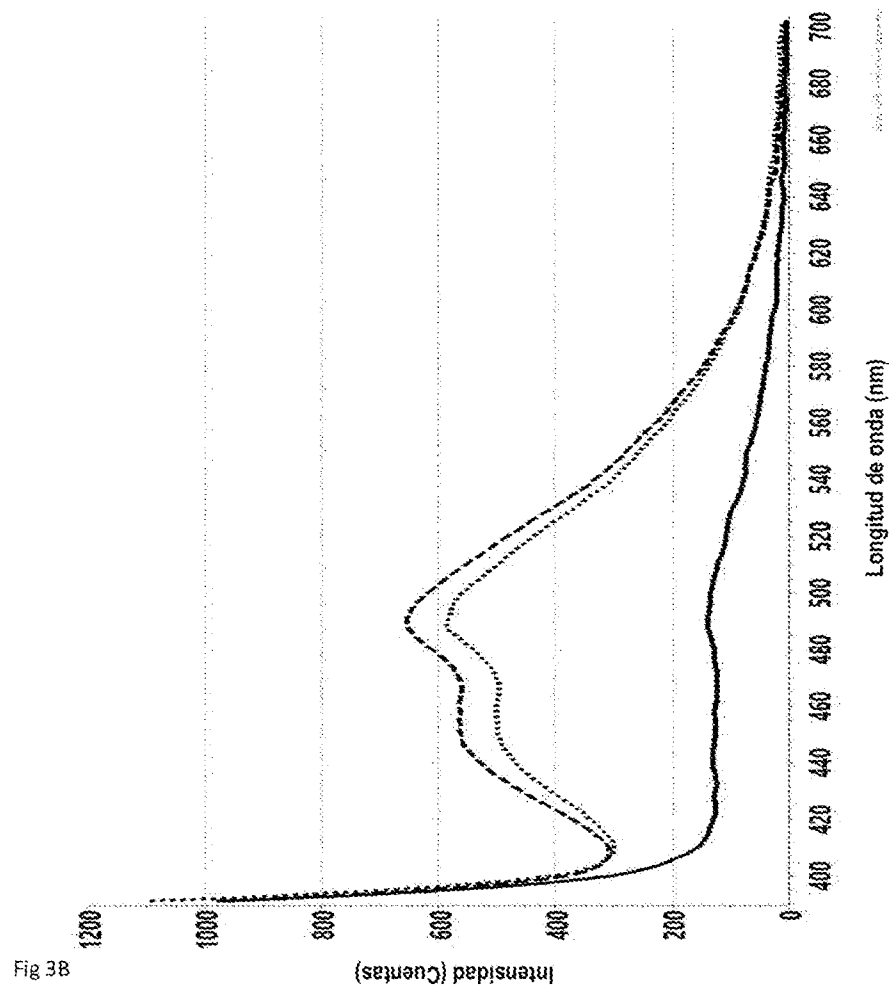
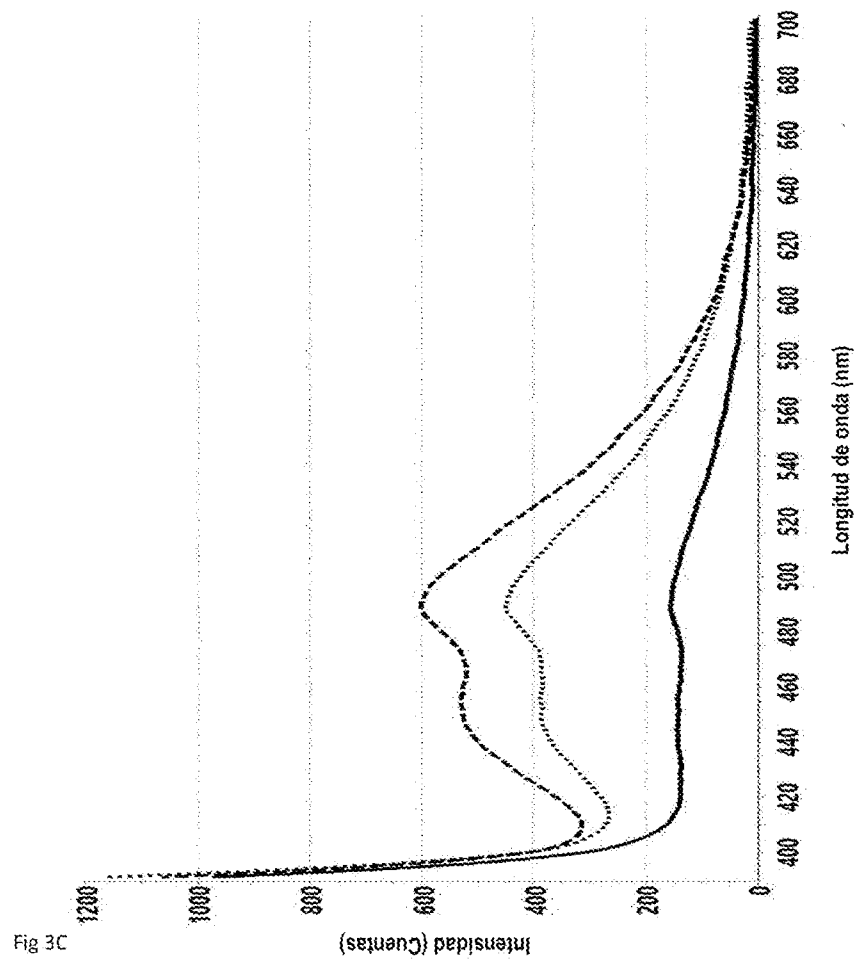
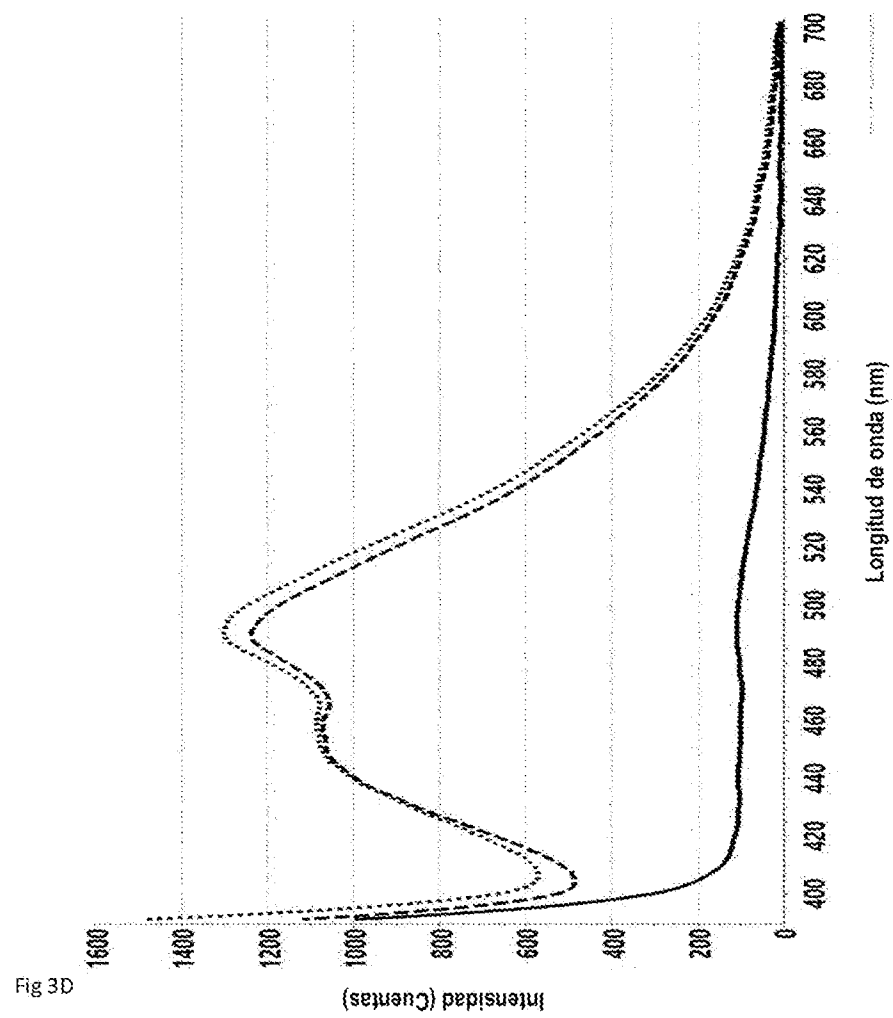


Fig 2









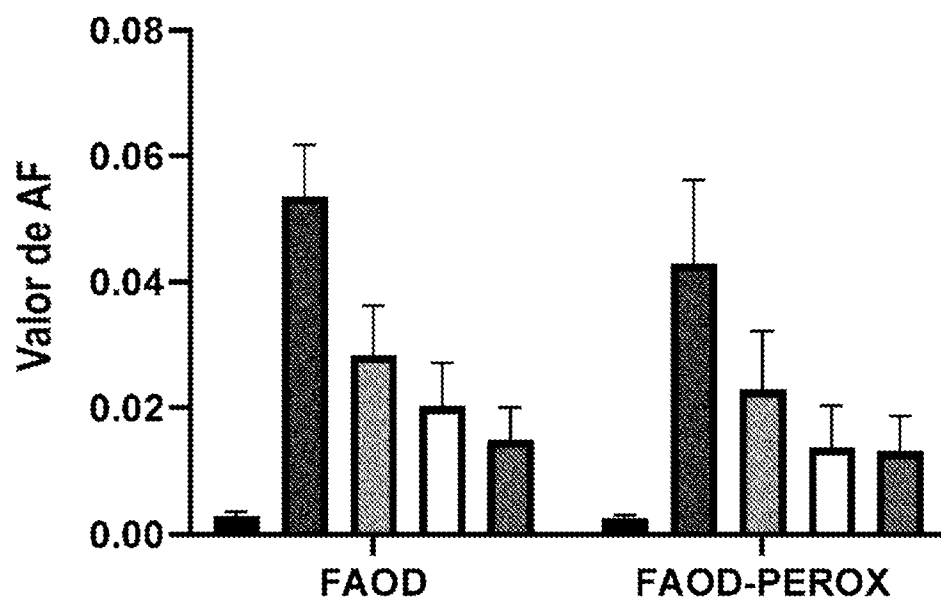


Fig 4

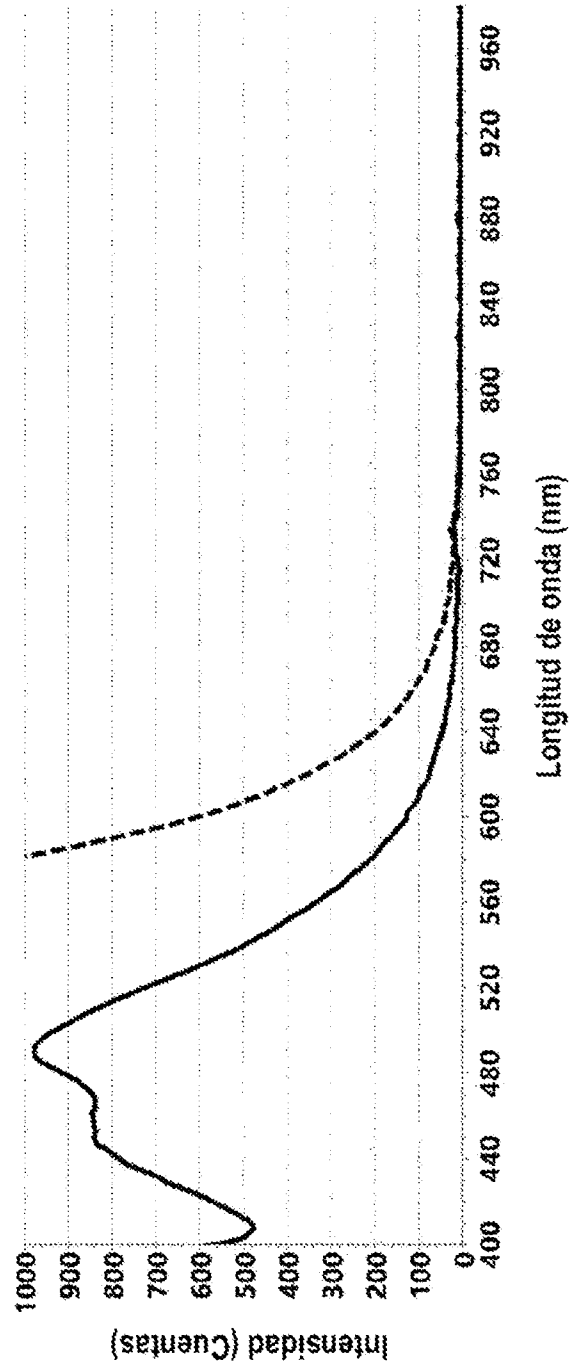


Fig 5A

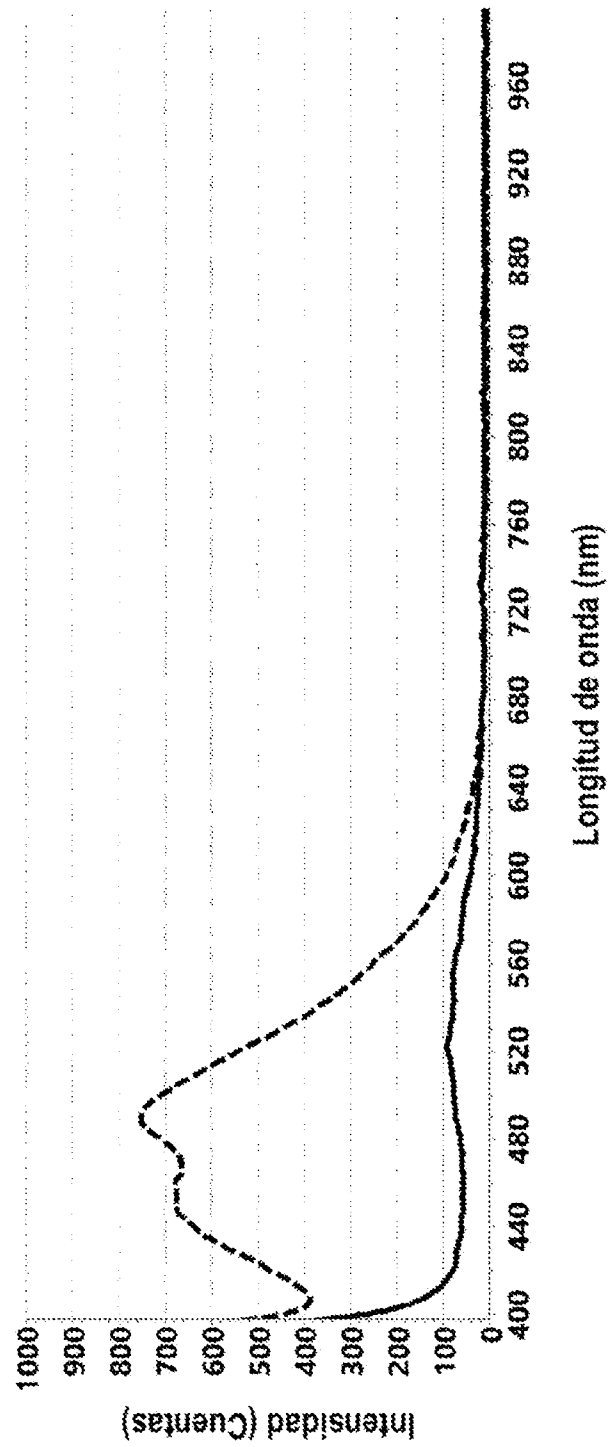


Fig 5B

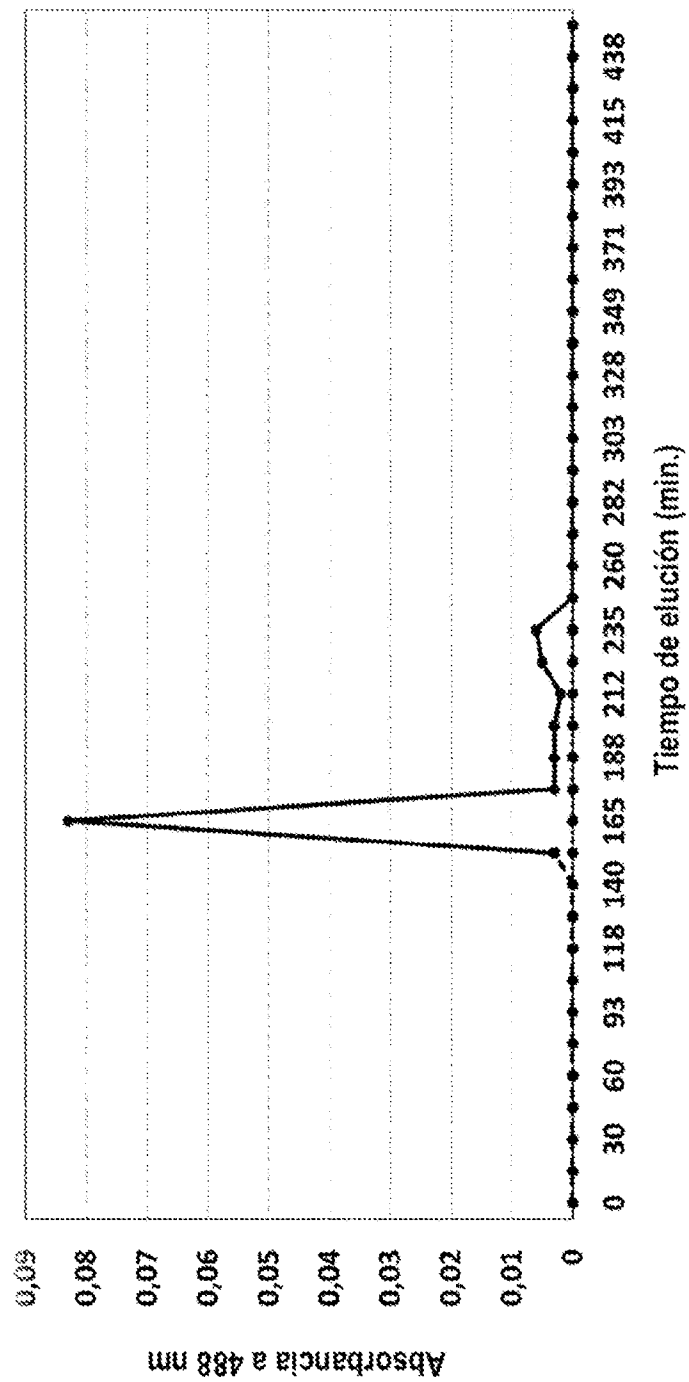


Fig 6

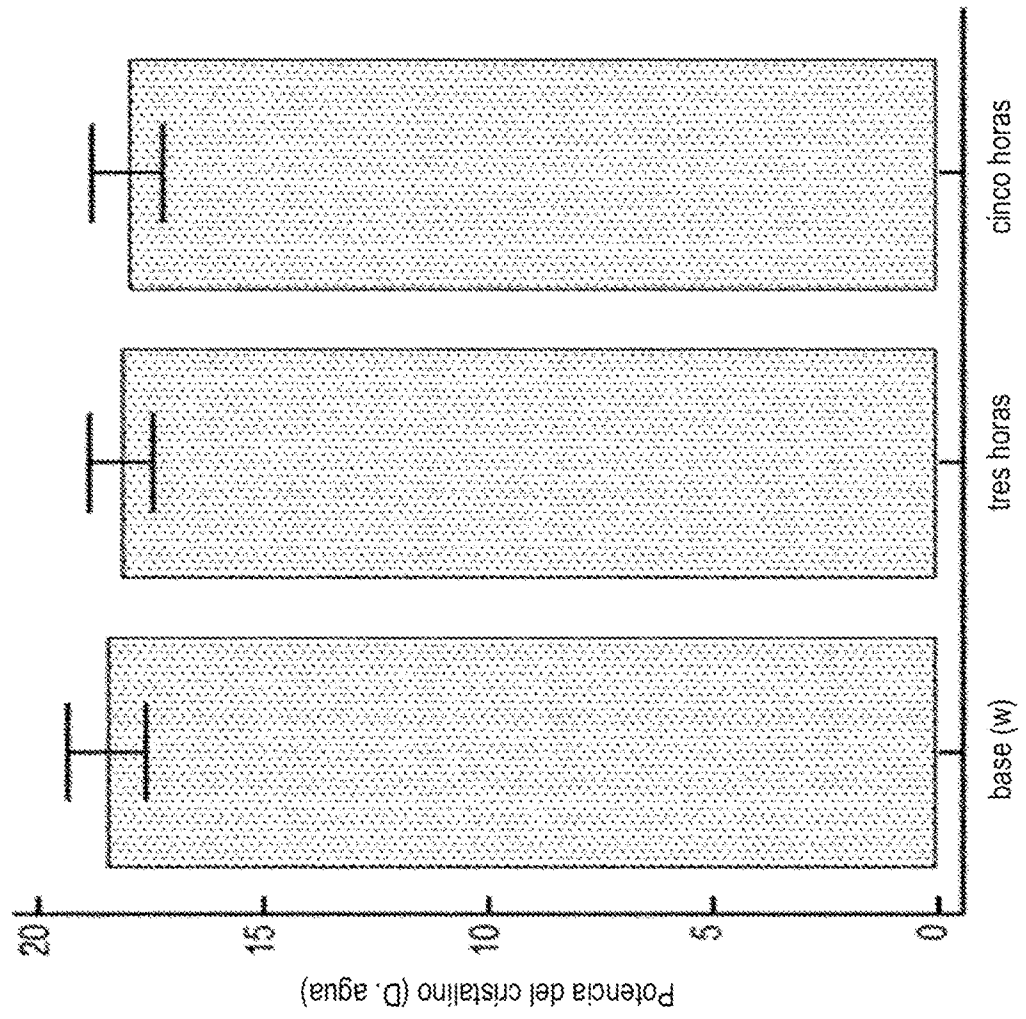


Fig 7A

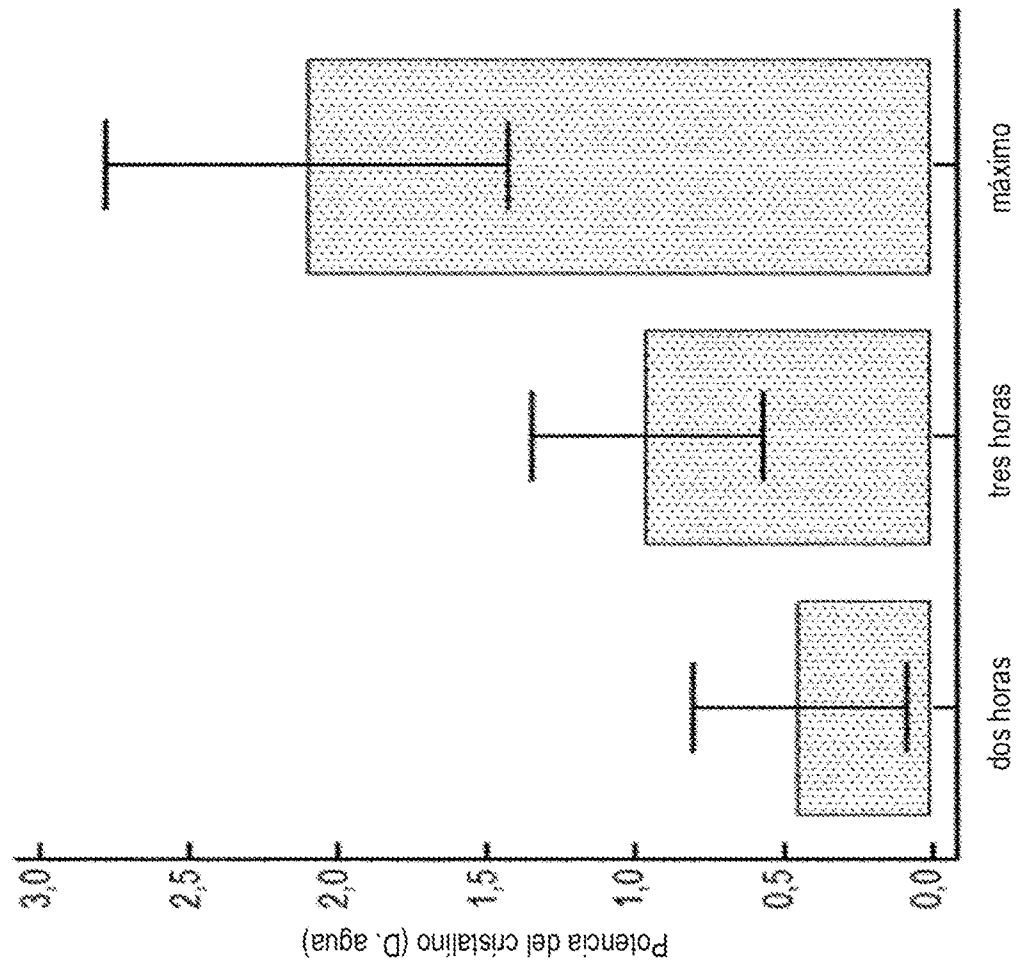


Fig 7B

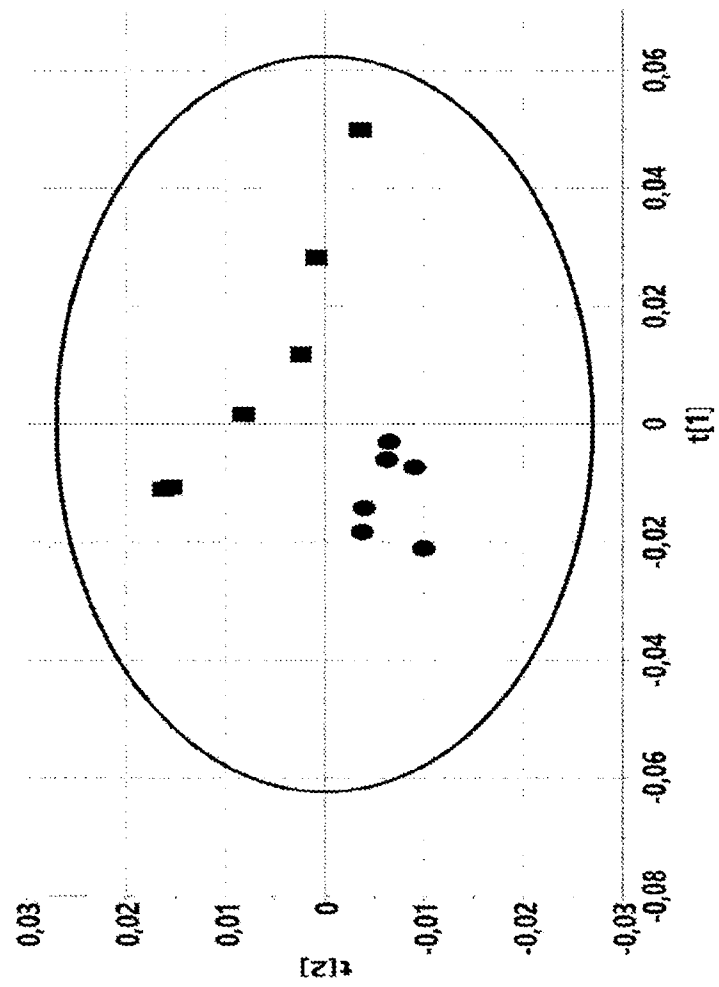


Fig 8

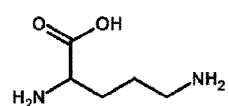


Fig 9

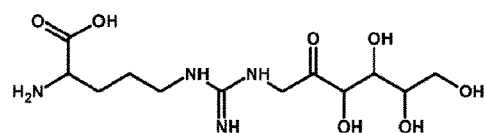


Fig 10

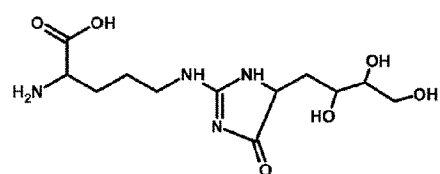


Fig 11

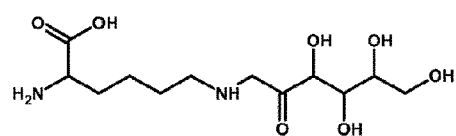


Fig 12

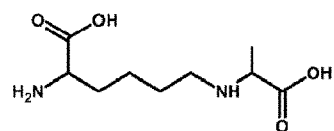


Fig 13

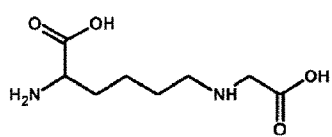


Fig 14

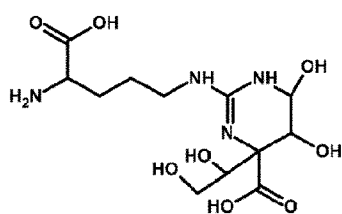


Fig 15

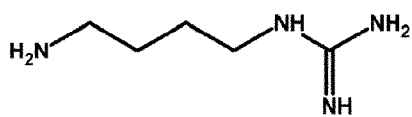


Fig 16