

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 969**

51 Int. Cl.:

A61K 31/706 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2020 PCT/JP2020/024916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2020 WO20262497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2020 E 20832373 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024 EP 3991795**

54 Título: **Uso novedoso de mononucleótido de nicotinamida (NMN) y ribósido de nicotinamida (NR)**

30 Prioridad:

25.06.2019 JP 2019117642

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

28.11.2024

73 Titular/es:

**SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
3-1-9, Kawara-machi, Chuo-ku,
Osaka-shi, Osaka 541-0048, JP y
KYOTO UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DOI, MASAO;
NAKAJIMA, TAKESHI y
MACHIDA, MAMIKO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 989 969 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

Uso novedoso de mononucleótido de nicotinamida (NMN) y ribósido de nicotinamida (NR)

5 **[Campo técnico]**

La presente divulgación se refiere a un uso novedoso de mononucleótido de nicotinamida (NMN) y ribósido de nicotinamida (NR). Por ejemplo, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende NMN o NR para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad acompañada de disfunción de una glándula de Meibomio o para su uso en el tratamiento o la prevención de la disfunción de glándulas de Meibomio.

10 **[Antecedentes de la técnica]**

En vista de la posibilidad sugerida de formas oxidadas de metabolitos intermedios de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+) tales como ribósido de nicotinamida (NR) y mononucleótido de nicotinamida (NMN), es decir, productos de reacción enzimática de nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), que ejercen un efecto de prolongación de la vida útil, el desarrollo de los mismos como suplemento está en curso. Sin embargo, el mecanismo de acción de la actividad de NMN y NR todavía no se ha entendido completamente.

20 El documento de BOLEKOVA A. *ET AL*: "Effect of retinoic acid on the nitregeric innervation of meibomian glands in rats", EUROPEAN JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY: EJH, vol. 56, n.º 4, 30 de noviembre de 2012 (30-11-2012), página 50, indica que el ácido retinoico podría ser adecuado para el tratamiento de la disfunción de glándulas de Meibomio.

25 **[Sumario de la invención]****[Solución al problema]**

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas; cualquier otra divulgación en la presente descripción se proporciona solo con fines de referencia.

La presente divulgación proporciona el uso de mononucleótido de nicotinamida (NMN) y/o ribósido de nicotinamida (NR) o una composición que comprende los mismos para mejorar la actividad de Hsd3b6 o un homólogo del mismo. La mejora de la actividad de Hsd3b6 o un homólogo del mismo puede proporcionar tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o síntoma asociado con la actividad de Hsd3b6 o un homólogo del mismo.

La presente divulgación proporciona particularmente el uso de mononucleótido de nicotinamida (NMN) y/o ribósido de nicotinamida (NR) o una composición que comprende el mismo para mejorar la función de una glándula de Meibomio. Una composición puede caracterizarse por administrarse a un ojo de un sujeto. Los ejemplos de mejora de una función de una glándula de Meibomio incluyen un aumento en el número de células acinares de las glándulas de Meibomio, aumento en la secreción de lípidos de una glándula de Meibomio, y similares. En una realización, puede proporcionarse una composición para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad acompañada de disfunción de glándulas de Meibomio. En otra realización, la composición de la presente divulgación presenta un efecto de mejora de la atrofia tisular de las glándulas de Meibomio y puede elevar la actividad sintasa de un esteroide que afecta a un lípido secretado por una glándula de Meibomio. Dado que la composición de la presente divulgación puede normalizar la composición de lípidos secretados por una glándula de Meibomio, se entiende que los lípidos en la glándula de Meibomio pueden normalizarse. Además, la composición de la presente divulgación puede promover la producción de testosterona, que se sabe que promueve la producción de lípidos de una glándula de Meibomio. Dado que hormonas sexuales como la testosterona afectan a la producción de lípidos de las glándulas de Meibomio, se entiende que la composición de la presente divulgación puede normalizar la composición de componentes lipídicos en el tejido de las glándulas de Meibomio.

[Breve descripción de los dibujos]

55 **[Figura 1]** La figura 1 es un diagrama que muestra la atrofia del tejido de glándulas de Meibomio asociada con el envejecimiento. A la izquierda y en el centro hay imágenes de párpados teñidos de ratones de 6 meses y 24 meses de edad, respectivamente. El lado derecho es un gráfico de barras que compara las áreas teñidas medias para ratones de 6 meses de edad y 24 meses de edad.

60 **[Figura 2]** La figura 2 es un diagrama que muestra el cambio en el tejido de glándulas de Meibomio de un ratón con inactivación (KO) para Hsd3b6 de 2 meses de edad (tamaño de la glándula de Meibomio y número de conductos secretores). La fila superior muestra los resultados para ratones macho y la fila inferior muestra los resultados para ratones hembra.

65 **[Figura 3]** La figura 3 es un diagrama que muestra el cambio en la actividad enzimática de Hsd3b6 y la actividad proliferativa de células basales de glándulas de Meibomio en una glándula de Meibomio debido a la instilación de

gotas oculares de NMN o NR durante 2 semanas en ratones de tipo silvestre de 1,5 años de edad.

[Figura 4] La figura 4 es un diagrama que muestra el efecto de la instilación de gotas oculares de NMN o NR durante 3 meses en ratones de tipo silvestre de 1,75 años de edad en tejido de glándulas de Meibomio. La figura muestra imágenes representativas de la tinción de párpados del ojo izquierdo (no tratado) y el ojo derecho (instilación de gotas oculares) y un gráfico que muestra el área teñida en cada individuo (ojo derecho/ojo izquierdo).

[Figura 5] La figura 5 es un diagrama que muestra el contenido de testosterona en tejido de glándulas de Meibomio después de la castración y después de la cirugía simulada en ratones macho de tipo silvestre (WT) y con inactivación (KO) para Hsd3b6 de 2 meses de edad.

[Descripción de las realizaciones]

La presente divulgación se describe a continuación en el presente documento. A lo largo de toda la memoria descriptiva, debe entenderse que una expresión singular abarca el concepto de la misma en la forma plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, artículos singulares (por ejemplo, “un”, “una”, “el/la”, y similares en el caso del inglés) también deben entenderse como que abarcan el concepto de los mismos en la forma plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. Los términos usados en el presente documento también deben entenderse como usados en el significado que se usa comúnmente en la técnica, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, a menos que se defina lo contrario, todas las terminologías y términos técnicos científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendimiento general de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. En caso de una contradicción, la presente memoria descriptiva (incluidas las definiciones) tiene prioridad.

(Definiciones)

Como se usa en el presente documento, “aproximadamente” se refiere a un intervalo de $\pm 10\%$ del valor numérico que se describe después de “aproximadamente”, a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, “sujeto” se refiere a la diana de administración (trasplante) de un medicamento o método para el tratamiento y la profilaxis de la presente divulgación. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos (por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, gatos, perros, vacas, caballos, ovejas, monos, y similares), pero son preferibles primates y son particularmente preferibles seres humanos.

Como se usa en el presente documento, “o” se usa cuando pueden emplearse “al menos uno o más” de los asuntos enumerados en la oración. Cuando se describe explícitamente en el presente documento como “dentro del intervalo” de “dos valores”, el intervalo también incluye los dos valores por sí mismos.

Como se usa en el presente documento, “terapia (tratamiento)” se refiere a la curación de una enfermedad o un síntoma, o la supresión de un síntoma. “Prevención (profilaxis)” se refiere a la prevención de la expresión de una enfermedad o un síntoma por adelantado. Este concepto también abarca retrasar la expresión de una enfermedad o síntoma y minimizar la expresión de una enfermedad o síntoma.

Como se usa en el presente documento, “derivado” se refiere a un compuesto que tiene una estructura central que es igual o similar a la de un compuesto original, pero tiene una modificación química o física tal como un grupo funcional diferente o un grupo funcional adicional. Un derivado tiene la misma o similar actividad biológica que el compuesto original.

Como se usa en el presente documento, “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal de adición de ácido inorgánico u orgánico del compuesto de la presente divulgación que es relativamente no tóxica. Estas sales pueden prepararse temporalmente durante el aislamiento y la purificación finales de un compuesto, o haciendo reaccionar el compuesto purificado en su forma de base libre del mismo por separado con una sal orgánica o inorgánica adecuada, y aislando una sal así formada.

Los ejemplos de sales básicas farmacéuticamente aceptables del compuesto de la presente divulgación incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales de amonio; sales de aminas alifáticas tales como sales de trimetilamina, sales de trietilamina, sales de dicitlohexilamina, sales de etanolamina, sales de dietanolamina, sales de trietanolamina, sales de procaína, sales de meglumina, sales de dietanolamina y sales de etilendiamina; sales de aralquilamina tales como sales de N,N-dibenciletildiamina y benetamina; sales de aminas aromáticas heterocíclicas tales como sales de piridina, sales de picolina, sales de quinolina y sales de isoquinolina; sales de amonio cuaternario tales como sales de tetrametilamonio, sal de tetraetilamonio, sales de benciltrimetilamonio, sales de benciltrietilamonio, sales de benciltributilamonio, sales de metiltriocetilamonio y sales de tetrabutilamonio; sales de aminoácidos básicos tales como sales de arginina y sales de lisina; y similares.

Los ejemplos de sales ácidas farmacéuticamente aceptables del compuesto de la presente divulgación incluyen sales

de ácidos inorgánicos tales como clorhidratos, sulfatos, nitratos, fosfatos, carbonatos, hidrogenocarbonatos y percloratos; sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, lactatos, maleatos, fumaratos, tartratos, malatos, citratos y ascorbatos; sulfonatos tales como metanosulfonatos, isetonatos, bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; aminoácidos ácidos tales como aspartatos y glutamatos; y similares.

5 Como se usa en el presente documento, "solvato" se refiere a un solvato del compuesto de la presente divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, abarcando, por ejemplo, un solvato de un disolvente orgánico (por ejemplo, alcohol (etanol o similar)-ato), hidrato, y similares. Cuando se forma un hidrato, este puede coordinarse con cualquier número de moléculas de agua. Los ejemplos de hidratos incluyen monohidratos, dihidratos, y similares.

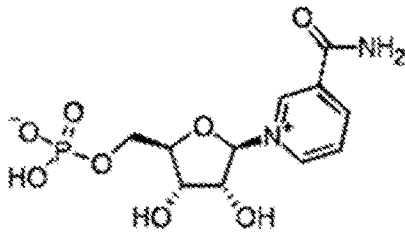
10 Como se usa en el presente documento, "homólogo" se refiere a una proteína o gen que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de bases derivada del mismo ancestro. Un homólogo de especiación se denomina ortólogo. Un homólogo recién creado por duplicación genética en una especie de organismo se denomina parálogo.

15 (Principio activo)

El mononucleótido de nicotinamida (NMN) es un compuesto con la siguiente estructura

[Fórmula química 1]

20

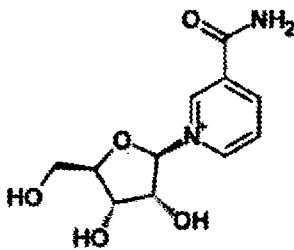


que es un nucleótido derivado de nicotinamida y ribosa. Se conoce como progenitor bioquímico de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido).

25 El ribósido de nicotinamida (NR) es un compuesto con la siguiente estructura

[Fórmula química 2]

30



que es un conjugado de ribosa y nicotinamida. Esto puede considerarse como NMN con un nucleótido reemplazado con ribosa.

35 La presente divulgación puede proporcionar una composición que comprende NMN y/o NR. NMN y/o NR pueden usarse como una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los ejemplos en el presente documento muestran que NMN y NR pueden mejorar la actividad enzimática de Hsd3b6 (u actividad enzimática de un homólogo del mismo tal como HSD3B1). Los ejemplos en el presente documento también muestran que NMN y NR pueden restaurar el tejido de la glándula de Meibomio. En una realización, una composición puede comprender NMN. En una realización, una composición puede comprender NR.

40 Pueden usarse NMN y/o NR en combinación con un principio activo adicional. Los ejemplos de principio activo adicional incluyen, pero no se limitan a, un agente antiinflamatorio, fármaco antimicrobiano, suplemento nutricional, antioxidante, y similares.

45 (Enfermedad)

La presente divulgación puede proporcionar una composición para su uso en o un método para mejorar la actividad

de Hsd3b6 o un homólogo del mismo con NMN y NR. Hsd3b6 está directamente controlado por el reloj circadiano, y un producto de este gen es un elemento importante de una ruta de producción de aldosterona. Además, puede proporcionarse una composición para su uso en o un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o síntoma asociado con la actividad de Hsd3b6 o un homólogo del mismo. Los ejemplos de la enfermedad asociada con la actividad de Hsd3b6 o un homólogo del mismo incluyen, pero no se limitan a, disfunción de glándulas de Meibomio, enfermedades debidas a la reducción de la hormona esteroidea (por ejemplo, testosterona, estrógeno, o similares), síndrome posmenopáusico, osteoporosis, enfermedades del estilo de vida, deficiencia de andrógenos en hombres ancianos, infarto de miocardio, y similares.

En particular, la presente divulgación puede proporcionar una composición para su uso en o un método para mejorar una función de una glándula de Meibomio con NMN y NR. Una glándula de Meibomio es una de las glándulas sebáceas que están en el borde de un párpado. Una glándula de Meibomio previene la evaporación de la película lagrimal de un ojo, previene que las lágrimas caigan sobre la mejilla y secreta una sustancia oleosa (sebo) que funciona sellando el interior de un párpado cerrado. Una glándula de Meibomio también se conoce como glándula tarsal. La disfunción de glándulas de Meibomio (MGD) se define como acompañada de molestias oculares crónicas al tiempo que tiene una anomalía difusa en la función de la misma. Se entiende que la causa de la misma es la desnaturalización o el estancamiento de los lípidos de Meibomio, infección crónica o hiperqueratosis del epitelio ductal inflamado. Los ejemplos de la presente divulgación demuestran que NMN y NR pueden restaurar la actividad de Hsd3b6 en una glándula de Meibomio, y pueden aumentar el tamaño de una glándula de Meibomio. Los ejemplos de mejora de una función de una glándula de Meibomio incluyen un aumento en el número de células acinares de las glándulas de Meibomio, aumento en la secreción de lípidos de una glándula de Meibomio y tratamiento o prevención de una enfermedad acompañada de disfunción de una glándula de Meibomio.

Una realización de la presente divulgación puede proporcionar una composición para su uso en o un método para tratar o prevenir una enfermedad acompañada de disfunción de una glándula de Meibomio con NMN y NR. Por ejemplo, puede proporcionarse una composición para su uso en el tratamiento o la prevención de la disfunción de glándulas de Meibomio, que comprende mononucleótido de nicotinamida (NMN) y/o ribósido de nicotinamida (NR). La disfunción de glándulas de Meibomio puede ir acompañada de una secreción reducida de meibum. La disfunción de glándulas de Meibomio puede ir acompañada de una enfermedad inflamatoria. La enfermedad inflamatoria es, por ejemplo, al menos una seleccionada del grupo que consiste en meibomianitis, queratitis superficial (punteada) y blefaritis. La disfunción de glándulas de Meibomio puede ir acompañada de una acumulación excesiva de lípidos en un conducto. La disfunción de glándulas de Meibomio puede ir acompañada de molestias oculares, sensación de un objeto extraño y/o sensación de presión. Por ejemplo, la enfermedad acompañada de disfunción de glándulas de Meibomio puede ser, pero no se limita a, una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meibomianitis, blefaritis posterior, queratitis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis relacionada con meibomianitis, trastorno de la función visual, deficiencia de andrógenos, dermatitis atópica, hiperplasia prostática, penfigoide ocular, lupus discoide (eritematoso), síndrome de displasia ectodérmica (displasia ectodérmica anhidrótica), trasplante de médula ósea, hipertensión, menopausia, enfermedad de Parkinson, psoriasis en placas, rosácea, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Turner, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y efectos secundarios debidos a terapia farmacológica (retinoide, antiandrógenos, antidepresivo, fármaco antihistamínico o terapia con estrógenos posmenopáusicas). Puede entenderse que la composición de la presente divulgación puede mejorar la función de la propia glándula de Meibomio de modo que la composición pueda usarse eficazmente en cualquiera de las enfermedades descritas anteriormente.

Otra realización de la presente divulgación puede proporcionar una composición para su uso en o un método para normalizar la composición de lípidos secretados por una glándula de Meibomio y normalizar los lípidos en la glándula de Meibomio. Dado que la composición de la presente divulgación presenta un efecto de mejora de la atrofia tisular de las glándulas de Meibomio y mejora la actividad sintasa del esteroide que afecta a los lípidos secretados por una glándula de Meibomio, se entiende que la composición contribuye a la normalización de los lípidos en una glándula de Meibomio. El método de medición de un componente lipídico en una glándula de Meibomio no está particularmente limitado. Pueden usarse diversos métodos que se conocen bien en la técnica, siempre que el método pueda evaluar un componente lipídico en una glándula de Meibomio.

En una realización de la presente divulgación, la composición de la presente divulgación eleva la actividad enzimática de Hsd3b6. Por lo tanto, puede promoverse la producción de testosterona, que se sabe que promueve la producción de lípidos de una glándula de Meibomio. Dado que las hormonas sexuales tales como la testosterona afectan a la producción de lípidos en una glándula de Meibomio, se entiende que la composición de la presente divulgación contribuye a la normalización de la composición de componentes lipídicos en el tejido de las glándulas de Meibomio al promover la producción de hormonas sexuales, incluida la testosterona a través de la elevación de la actividad enzimática de Hsd3b6.

(Formulación)

La composición de la presente divulgación puede formularse en una forma de dosificación adecuada. Por ejemplo, la composición de la presente divulgación, cuando se usa como composición oftálmica, puede proporcionarse como una inyección oftálmica, ungüento oftálmico, gotas oculares o perfundido oftálmico. La composición puede formularse en

- 5 cualquier forma de dosificación tal como aerosol, agente líquido, extracto, elixir, cápsula, gránulo, píldora, ungüento, polvo, comprimido, solución, suspensión o emulsión. La composición puede comprender cualquier aditivo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable que se conoce en la técnica. Los ejemplos de aditivos incluyen, pero no se limitan a, agente de ajuste de la tonicidad, tampón, conservante, codisolvente y espesante. Por ejemplo, puede proporcionarse una composición oftálmica en forma de un agente líquido preparado disolviendo un principio activo en un disolvente acuoso (por ejemplo, agua).
- 10 La composición de la presente divulgación puede administrarse a través de cualquier vía adecuada determinada por los expertos en la técnica. La composición puede formularse para que sea adecuada para la administración a través de una vía de administración seleccionada de, pero sin limitarse a, inyección ocular, aplicación tópica (incluida la aplicación a un ojo), gota ocular, inyección intravenosa, goteo intravenoso, administración oral, administración parenteral, administración transdérmica, y similares.
- 15 Los ejemplos de agentes isotonzantes incluyen sacáridos tales como glucosa, trehalosa, lactosa, fructosa, manitol, xilitol y sorbitol, alcoholes multivalentes tales como glicerol, polietilenglicol y propilenglicol, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio, y similares. La cantidad de las mismas es preferiblemente del 0 al 5 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 20 Los ejemplos de agentes quelantes incluyen edetatos tales como edetato de disodio, edetato de calcio y disodio, edetato de trisodio, edetato de tetrasodio y edetato de calcio, tetraacetato de etilendiamina, ácido nitrilotriacético o una sal del mismo, hexametáfosfato de sodio, ácido cítrico, y similares. La cantidad de los mismos es preferiblemente del 0 al 0,2 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 25 Los ejemplos de estabilizadores incluyen hidrogenosulfito de sodio y similares. La cantidad de los mismos es preferiblemente del 0 al 1 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 30 Los ejemplos de modificadores del pH incluyen ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido carbónico, ácido acético y ácido cítrico, así como hidróxidos de metales alcalinos tales como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, carbonatos o bicarbonatos de metales alcalinos tales como carbonato de sodio, acetato de metales alcalinos tal como acetato de sodio, citrato de metales alcalinos tal como citrato de sodio, bases tales como trometamol, y similares. La cantidad de los mismos es preferiblemente del 0 al 20 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 35 Los ejemplos de conservantes incluyen ácido sórbico, sorbato de potasio, ésteres de parahidroxibenzoato tales como parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, parahidroxibenzoato de propilo y parahidroxibenzoato de butilo, sales de amonio cuaternario tales como gluconato de clorhexidina, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloruro de cetilpiridinio, alquilpoliaminoetilglicina, clorobutanol, Polyquad, polihexametilenbiguanida, clorhexidina, y similares. La cantidad de los mismos es preferiblemente del 0 al 0,2 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 40 Los ejemplos de antioxidantes incluyen hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio seco, pirosulfito de sodio, tocoferol mixto concentrado, y similares. La cantidad de los mismos es preferiblemente del 0 al 0,4 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 45 Los ejemplos de agentes solubilizantes incluyen benzoato de sodio, glicerina, D-sorbitol, glucosa, propilenglicol, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol, D-manitol, y similares. La cantidad de los mismos es preferiblemente del 0 al 3 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 50 Los ejemplos de agentes espesantes incluyen polietilenglicol, metilcelulosa, etilcelulosa, carmelosa sódica, goma xantana, condroitinsulfato de sodio, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), y similares. La cantidad de los mismos es deseablemente del 0 al 70 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.
- 55 Pueden prepararse gotas oculares, por ejemplo, disolviendo o suspendiendo el componente deseado descrito anteriormente en un disolvente acuoso tal como agua purificada estéril, solución salina o tampón (por ejemplo, tampón borato, tampón fosfato, etc.) o un disolvente no acuoso tal como aceite vegetal tal como aceite de semilla de algodón, aceite de soja, aceite de sésamo o aceite de cacahuete, ajustando la presión osmótica a una presión osmótica predeterminada y aplicando esterilización tal como esterilización mecánica.
- 60 Una pomada oftálmica puede comprender una base de pomada además de los diversos componentes descritos anteriormente tras la preparación. Los ejemplos de la base de pomada incluyen, pero no se limitan particularmente a, bases oleosas tales como vaselina, parafina líquida y polietileno, bases de emulsión preparadas a partir de la emulsificación de una fase oleosa y una fase acuosa con un tensioactivo o similar, bases solubles en agua que consisten en hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, y similares.
- 65 La composición, el agente terapéutico o el agente profiláctico de la presente divulgación puede proporcionarse como un kit. En una realización específica, la presente divulgación proporciona un envase o kit de fármacos que comprende

uno o más recipientes llenos de uno o más componentes de la composición o medicamento de la presente divulgación. Opcionalmente, puede presentarse información que indica la aprobación para la fabricación, el uso o la venta para administración humana por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de fármacos o productos biológicos en tales recipientes en una forma especificada por la agencia gubernamental.

5 Como se usa en el presente documento, "kit" se refiere a una unidad que proporciona partes que van a proporcionarse (por ejemplo, fármaco terapéutico, fármaco profiláctico, cada componente del mismo, manual de usuario, y similares) que generalmente están separados en dos o más segmentos. Se prefiere una forma de kit de este tipo cuando se proporciona una composición, que no debe proporcionarse en un estado mixto para estabilidad o similar y se usa preferiblemente mezclando inmediatamente antes de su uso. Tal kit comprende ventajosamente una instrucción o manual de usuario que describe cómo se usan las partes proporcionadas (por ejemplo, fármaco terapéutico o fármaco profiláctico) o cómo deben procesarse los reactivos. Cuando se usa un kit en el presente documento como kit de reactivos, el kit comprende generalmente una instrucción o similar que describe el método de uso del agente terapéutico, agente profiláctico, o similares.

15 Como se usa en el presente documento, "instrucción" es un documento con una explicación del método de uso de la presente divulgación para médicos u otros usuarios. La instrucción proporciona una descripción del método de detección de la presente divulgación, cómo usar un fármaco de diagnóstico o instrucción para la administración de un medicamento o similar. La instrucción puede tener una descripción que indica la administración al ojo como sitio de administración (por ejemplo, por instilación de gotas oculares, ungüento oftálmico, inyección, etc.). La instrucción se prepara de acuerdo con un formato especificado por una autoridad reguladora del país en el que se pone en práctica la presente divulgación (por ejemplo, Departamento de Salud, Trabajo y bienestar en Japón, Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) en los EE. UU., o similares), con una descripción explícita que muestra la aprobación de la autoridad reguladora. Una instrucción es un denominado prospecto. Generalmente, se proporciona una instrucción en, pero sin limitarse a, medios de papel. También puede proporcionarse una instrucción en una forma tal como medios electrónicos (por ejemplo, sitios web proporcionados en Internet o correos electrónicos).

30 Una realización puede proporcionar una gota ocular que comprende mononucleótido de nicotinamida (NMN), en donde el mononucleótido de nicotinamida (NMN) está contenido a una concentración de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 10 $\mu\text{g/ml}$ o más, 100 $\mu\text{g/ml}$ o más, 200 $\mu\text{g/ml}$ o más, 500 $\mu\text{g/ml}$ o más, 1 mg/ml o más, 2 mg/ml o más, 5 mg/ml o más, 10 mg/ml o más, o 50 mg/ml o más.

35 Una realización puede proporcionar una gota ocular que comprende ribósido de nicotinamida (NR), en donde el ribósido de nicotinamida (NR) está contenido a una concentración de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 10 $\mu\text{g/ml}$ o más, 100 $\mu\text{g/ml}$ o más, 200 $\mu\text{g/ml}$ o más, 500 $\mu\text{g/ml}$ o más, 1 mg/ml o más, 2 mg/ml o más, 5 mg/ml o más, 10 mg/ml o más, o 50 mg/ml o más.

40 Una realización puede proporcionar una pomada oftálmica que comprende mononucleótido de nicotinamida (NMN), en donde el mononucleótido de nicotinamida (NMN) está contenido a una concentración de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 2 $\mu\text{g/ml}$ o más, 5 $\mu\text{g/ml}$ o más, 10 $\mu\text{g/ml}$ o más, 50 $\mu\text{g/ml}$ o más, 100 $\mu\text{g/ml}$ o más, 200 $\mu\text{g/ml}$ o más, o 500 $\mu\text{g/ml}$ o más.

45 Una realización puede proporcionar una pomada oftálmica que comprende ribósido de nicotinamida (NR), en donde el ribósido de nicotinamida (NR) está contenido a una concentración de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ o más, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, 2 $\mu\text{g/ml}$ o más, 5 $\mu\text{g/ml}$ o más, 10 $\mu\text{g/ml}$ o más, 50 $\mu\text{g/ml}$ o más, 100 $\mu\text{g/ml}$ o más, 200 $\mu\text{g/ml}$ o más, o 500 $\mu\text{g/ml}$ o más.

50 El uso de una formulación con una concentración en una cantidad predeterminada o mayor de acuerdo con la forma de dosificación puede ser ventajoso para la administración a una glándula de Meibomio, que está en la parte posterior de un párpado, a diferencia de la administración en el globo ocular.

(Dosis)

55 En una realización, los métodos de utilización de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, una gota ocular, pero los métodos no se limitan a los mismos. Los ejemplos de los mismos incluyen modos de administración (métodos de administración y formas de dosificación) tales como pomada oftálmica, inyección en la cámara anterior, impregnación en un agente de liberación sostenida, inyección subconjuntival y administración sistémica (administración oral e inyección intravenosa).

60 La concentración de NMN o NR usada en la presente divulgación es generalmente de aproximadamente 0,001 a 1000 μM ($\mu\text{mol/l}$), preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 300 μM , más preferiblemente de aproximadamente 0,03 a 100 μM , y todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 μM . Por ejemplo, otros intervalos de concentración son generalmente de 0,01 nM a 100 μM , de aproximadamente 0,1 nM a 100 μM , de aproximadamente 0,001 a 100 μM , de aproximadamente 0,01 a 75 μM , de aproximadamente 0,05 a 50 μM , de aproximadamente 1 a 10 μM , de aproximadamente 0,01 a 10 μM , de aproximadamente 0,05 a 10 μM , de

aproximadamente 0,075 a 10 μM , de aproximadamente 0,1 a 10 μM , de aproximadamente 0,5 a 10 μM , de aproximadamente 0,75 a 10 μM , de aproximadamente 1,0 a 10 μM , de aproximadamente 1,25 a 10 μM , de aproximadamente 1,5 a 10 μM , de aproximadamente 1,75 a 10 μM , de aproximadamente 2,0 a 10 μM , de aproximadamente 2,5 a 10 μM , de aproximadamente 3,0 a 10 μM , de aproximadamente 4,0 a 10 μM , de aproximadamente 5,0 a 10 μM , de aproximadamente 6,0 a 10 μM , de aproximadamente 7,0 a 10 μM , de aproximadamente 8,0 a 10 μM , de aproximadamente 9,0 a 10 μM , de aproximadamente 0,01 a 50 μM , de aproximadamente 0,05 a 5,0 μM , de aproximadamente 0,075 a 5,0 μM , de aproximadamente 0,1 a 5,0 μM , de aproximadamente 0,5 a 5,0 μM , de aproximadamente 0,75 a 5,0 μM , de aproximadamente 1,0 a 5,0 μM , de aproximadamente 1,25 a 5,0 μM , de aproximadamente 1,5 a 5,0 μM , de aproximadamente 1,75 a 5,0 μM , de aproximadamente 2,0 a 5,0 μM , de aproximadamente 2,5 a 5,0 μM , de aproximadamente 3,0 a 5,0 μM , de aproximadamente 4,0 a 5,0 μM , de aproximadamente 0,01 a 3,0 μM , de aproximadamente 0,05 a 3,0 μM , de aproximadamente 0,075 a 3,0 μM , de aproximadamente 0,1 a 3,0 μM , de aproximadamente 0,5 a 3,0 μM , de aproximadamente 0,75 a 3,0 μM , de aproximadamente 1,0 a 3,0 μM , de aproximadamente 1,25 a 3,0 μM , de aproximadamente 1,5 a 3,0 μM , de aproximadamente 1,75 a 3,0 μM , de aproximadamente 2,0 a 3,0 μM , de aproximadamente 0,01 a 1,0 μM , de aproximadamente 0,05 a 1,0 μM , de aproximadamente 0,075 a 1,0 μM , de aproximadamente 0,1 a 1,0 μM , de aproximadamente 0,5 a 1,0 μM , de aproximadamente 0,75 a 1,0 μM , de aproximadamente 0,09 a 35 μM , o de aproximadamente 0,09 a 3,2 μM , más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 10 μM , de aproximadamente 0,1 a 3 μM , o de aproximadamente 0,1 a 1,0 μM , pero el intervalo de concentración no está limitado a los mismos.

Cuando se usa como gota ocular, la concentración de la formulación puede determinarse basándose en de aproximadamente 1 a 10000 veces, preferiblemente de aproximadamente 100 a 10000 veces, tal como aproximadamente 1000 veces la concentración eficaz descrita anteriormente mientras se tiene en cuenta la dilución con fluido lagrimal o similar, así como la toxicidad. La concentración también puede establecerse a una concentración en exceso de la misma. La concentración es, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 μM ($\mu\text{mol/l}$) a 1000 mM (mmol/l), de 0,03 μM a 1000 mM, de aproximadamente 0,1 μM a 300 mM, de aproximadamente 0,3 μM a 300 mM, de aproximadamente 1 μM a 100 mM, de aproximadamente 3 μM a 100 mM, de aproximadamente 10 μM a 100 mM, de aproximadamente 30 μM a 100 mM, de aproximadamente 0,1 μM a 30 mM, de aproximadamente 0,3 μM a 30 mM, de aproximadamente 1 μM a 30 mM, de aproximadamente 3 μM a 30 mM, de aproximadamente 1 μM a 10 mM, de aproximadamente 3 μM a 10 mM, de aproximadamente 10 μM a 1 mM, de aproximadamente 30 μM a 1 mM, de aproximadamente 100 μM a 10 mM, de aproximadamente 300 μM a 10 mM, de aproximadamente 10 μM a 100 mM, de aproximadamente 30 μM a 300 mM, de aproximadamente 100 μM a 300 mM, o de aproximadamente 300 μM a 300 mM, y puede ser de aproximadamente 1 mM a 10 mM o de aproximadamente 1 mM a 100 mM. El intervalo de concentración puede determinarse combinando adecuadamente estos límites superiores e inferiores.

La cantidad de efecto del medicamento de la presente divulgación, que es eficaz en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección específica, puede variar dependiendo de la propiedad del trastorno o afección, pero puede determinarse con una tecnología clínica estándar basada en las descripciones en el presente documento por los expertos en la técnica. Además, la identificación del intervalo de dosificación óptimo puede ayudarse opcionalmente usando un ensayo *in vitro*. Dado que la dosis precisa que va a usarse en un compuesto puede variar dependiendo de la vía de administración o la gravedad de una enfermedad o trastorno, la dosis debe determinarse de acuerdo con el criterio de un médico o el estado de cada paciente. La dosificación no está particularmente limitada, pero puede ser, por ejemplo, de 0,001, 1, 5, 10, 15, 100 o 1000 mg/kg de peso corporal por administración o dentro de un intervalo de dos de tales valores. El intervalo de dosificación no está particularmente limitado, pero puede ser, por ejemplo, 1, 2 o 4 dosis cada 1, 7, 14, 21 o 28 días, o 1, 2 o 4 dosis por cada número de días en el intervalo entre dos de tales valores. La dosificación, el número de dosis, el intervalo de dosificación, el período de dosificación y el método de dosificación pueden seleccionarse adecuadamente dependiendo de la edad o el peso corporal del paciente, los síntomas, el modo de administración, el órgano diana, o similares. Por ejemplo, la composición de la presente divulgación puede usarse como colirio. Además, un fármaco terapéutico comprende preferiblemente un principio activo en una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad eficaz para ejercer una acción deseada. La dosis eficaz puede estimarse a partir de una curva de dosis-respuesta obtenida de un sistema de prueba *in vitro* o de modelo animal.

La administración de un principio activo a una cantidad predeterminada o más alta puede ser ventajosa para la administración a una glándula de Meibomio, que está en la parte posterior de un párpado, a diferencia de la administración en el globo ocular.

(Tecnología general)

La metodología de biología molecular, metodología bioquímica y metodología microbiológica usada en el presente documento se conoce bien y se usa convencionalmente en la técnica, que se describen, por ejemplo, en Sambrook J. *et al.* (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor y su 3ª ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub.

Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. *et al.* (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, y actualizaciones anuales; Sninsky, J. J. *et al.* (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press, Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. *et al.* (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. *et al.* (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. *et al.* (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press, Bessatsu Jikken Igaku [*Experimental Medicine, Supplemental Volume*], "Idenshi Donyu & Hatsugen Kaiseki Jikken Ho [*Experimental Methods for Transgenesis & Expression Analysis*]", Yodosha, 1997, o similares.

La presente divulgación se ha descrito mientras se muestran realizaciones preferidas para facilitar la comprensión. Aunque la presente divulgación se describe a continuación en el presente documento basándose en los ejemplos, las descripciones anteriores y los siguientes ejemplos se proporcionan con el único propósito de ejemplificación, no de limitación de la presente divulgación. Por lo tanto, el alcance de la presente divulgación no se limita a las realizaciones y ejemplos que se describen específicamente en el presente documento y está limitado solo por el alcance de las reivindicaciones.

[Ejemplos]

A continuación en el presente documento, se describen ejemplos de la presente divulgación. Las muestras biológicas o similares, cuando sea aplicable, se manipularon de acuerdo con las normas vigentes del Departamento de Salud, Trabajo y bienestar, Ministerio de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología, o similares y, cuando sea aplicable, basándose en la Declaración de Helsinki o códigos éticas preparados basados en la misma.

(Ejemplo 1: Atrofia del tejido de glándulas de Meibomio asociada con el envejecimiento/tejido de glándulas de Meibomio en ratones KO para Hsd3b6)

[Sumario]

Este ejemplo demuestra la atrofia del tejido de glándulas de Meibomio asociada con el envejecimiento y el cambio en el tejido de glándulas de Meibomio en ratones KO para Hsd3b6.

[Materiales y métodos]

(1) Protocolo de tinción de Herxheimer de glándulas de Meibomio de montaje completo

El tejido de glándulas de Meibomio en ratones se tiñó de acuerdo con el siguiente protocolo.

Como método de preparación de 100 ml de disolución de tinción, una botella de disolución madre preparada disolviendo Sudan IV para saturar en etanol al 100 % se dejó reposar de antemano, y se mezclaron 70 ml de la misma cantidad de sobrenadante, 20 ml de NaOH al 10 % y 10 ml de agua ultrapura, se voltearon durante 5 minutos y se centrifugaron para permitir que el polvo precipitara. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 μm y se usó como disolución de tinción.

Las vértebras cervicales de los ratones se dislocaron, y se tomaron muestras de la piel de la cabeza, incluidas las glándulas de Meibomio. La muestra se sumergió en paraformaldehído al 4 % mientras se mantenía la muestra plana con un pasador de extracción, y se inmovilizó usando un rotador a 4 °C durante 24 horas. Se recortó la periferia de las glándulas de Meibomio. Las glándulas de Meibomio se sumergieron en etanol al 50 % usando un rotador a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se sumergieron durante 20 minutos en etanol al 70 % y se sumergieron en una disolución de tinción usando un rotador a temperatura ambiente durante 24 horas en un tubo Falcon. Las glándulas de Meibomio se sumergieron luego durante 10 minutos en etanol al 70 %, y se repitió el lavado varias veces para confirmar que las glándulas de Meibomio se tiñeron bien. Las glándulas de Meibomio se sumergieron durante 24 horas en aminoalcohol en glicerina preparado mezclando 3,75 ml de aminoalcohol al 80 % con 8,25 ml de glicerina. Las glándulas de Meibomio se colocaron en un portaobjetos de microscopio y se encapsularon con gelatina de glicerina. La gelatina de glicerina se preparó mezclando en primer lugar 10 g de gelatina con 60 ml de agua ultrapura y 70 ml de glicerina, expandiendo la gelatina y añadiendo glicerina después de aproximadamente una hora y mezclando mientras se calentaba.

(2) Análisis del área de la glándula de Meibomio teñida con Sudan IV

El análisis del área después de la tinción se realizó mediante el uso de Photoshop e ImageJ y determinando un valor

umbral de intensidad de color mientras se mira y se compara con una imagen de tinción basándose en el área de porciones con una intensidad igual o superior a un valor umbral dado.

(3) Ratón

5 Se preparó un ratón con flanqueado por sitios loxP (*floxed*) en el que la región del exón 2 que incluye un codón de inicio de un gen de Hsd3b6 de un ratón está flanqueada por loxP. El ratón se entrecruzó con un ratón transgénico CAG-Cre para preparar un ratón KO para Hsd3b6 que ya no podía expresar Hsd3b6.

10 Se realizó una prueba después de criar un ratón de dos meses de edad durante 10 días en condiciones normales (condición de humedad normal) para un entorno de alimentación/bebida libre en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con una humedad del 40 al 60 % y temperatura ambiente de 25 °C.

15 Un ratón de 24 meses de edad era un ratón C57BL/6J macho de 78 semanas (18 meses de edad) adquirido de OrientalBioService, Inc., que se crió durante 6 meses en condiciones normales (condiciones de humedad normal). Un ratón C57BL/6J de 6 meses de edad era un ratón de 6 semanas de edad adquirido y criado hasta 6 meses de edad en condiciones normales (condiciones de humedad normal).

[Resultados]

20 El tejido de glándulas de Meibomio se tiñó en un ratón de 6 meses de edad y un ratón de 24 meses de edad de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente, y se compararon las áreas teñidas. Los resultados se muestran en la figura 1. Se observaron atrofia en el tejido de glándulas de Meibomio y progresión en la disfunción de glándulas de Meibomio (MGD) debido al envejecimiento (N = 7).

25 La figura 2 muestra el tamaño del tejido de glándulas de Meibomio y el número de conductos secretores en un ratón KO para Hsd3b6 de 2 meses de edad y un ratón de tipo silvestre. Al igual que en ratones envejecidos, también se encontró que los ratones KO para Hsd3b6 presentaban atrofia de glándulas de Meibomio. Dado que no hay diferencia en el número de conductos secretores debido al genotipo, se encontró que la atrofia de glándulas de Meibomio no es una anomalía en el proceso de generación de conductos.

(Ejemplo 2: Experimento de instilación de gotas oculares de NMN o NR en un ratón silvestre de 1,5 años de edad durante 2 semanas)

[Sumario]

35 Este ejemplo demuestra el cambio en la actividad enzimática de Hsd3b6 y la actividad proliferativa de las células basales acinares de glándulas de Meibomio en glándulas de Meibomio debido a la instilación de gotas oculares de NMN o NR durante 2 semanas en ratones de tipo silvestre de 1,5 años de edad.

[Materiales y métodos]

(1) Lo siguiente es el resumen del experimento de instilación de gotas oculares.

[Tabla 1]

| Animal | Compuesto | Dosificación | Vía de administración | Período de dosificación | Número de animales | Experimento |
|-------------------------------|-----------|-----------------------------|--|-------------------------|--------------------|---|
| Ratones WT (1,5 años de edad) | Vehículo | - | Instilación de gotas oculares (solo ojo derecho) | 2 semanas | 5 | Actividad enzimática (actividad de síntesis de esteroides) |
| | | | | | 5 | Ensayo de incorporación de BrdU (actividad proliferativa celular) |
| | NMN | 5 % (5 µl/ojo, 6 veces/día) | | | 6 | Actividad enzimática (actividad de síntesis de esteroides) |
| | | | | | 6 | Ensayo de incorporación de |

| | | | | | | |
|--|----|-----------------------------|--|--|---|---|
| | | | | | | BrdU (actividad proliferativa celular) |
| | NR | 5 % (5 µl/ojo, 6 veces/día) | | | 5 | Actividad enzimática (actividad de síntesis de esteroides) |
| | | | | | 6 | Ensayo de incorporación de BrdU (actividad proliferativa celular) |

(2) Medición de la actividad enzimática de Hsd3b6 de glándulas de Meibomio

5 La actividad enzimática de Hsd3b6 de glándulas de Meibomio en ratones se midió de acuerdo con el siguiente protocolo.

○ Preparación preliminar

10 Se hizo burbujear solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con un 95 % de CO₂/5 % de O₂ durante 1 hora o más, y se dispensó en tubos de 2 ml a 200 µl cada uno. La tapa se cerró mientras se llenaba con un 95 % de CO₂/5 % de O₂. Se calentó HBSS con un baño de agua a 37 °C. Se calentó una incubadora de reacción a 37 °C, y se instaló un mezclador de microtubos en la misma.

○ Inicio del equipo de medición

15 Se encendió la potencia principal de un contador de centelleo líquido de flujo (Perkin Elmer, Radiomatic 625TR), y se encendió la potencia principal del HPLC (Waters, 2795 Separations Module) para realizar la configuración. La fase móvil A se reemplazó con agua, y la fase móvil B se reemplazó con acetonitrilo. Una vez instalada una columna (Kanto Chemical, LiChroCART 250-4, LiCrosphere 100RP-18, tamaño de partícula: 5 µm, 4 mm de D.I. x 250 mm), se hizo fluir acetonitrilo al 40 % (ACN) (A: 60 %, B: 40 %) a 0,7 ml/min. La temperatura del horno de columna en este momento se ajustó a 40 °C.

○ Purificación de ³H-pregnenolona

25 Se añadió ³H-DHEA a 1 ml de ACN al 40 % contenido en un tubo de 2 ml, y la mezcla se sometió a golpeteo. Se colocó un microtubo en un soporte de HPLC, y se seleccionó una única administración. El pico de contaminante producido después de 22 minutos no se recogió. Una vez que el pico de contaminante disminuyó a aproximadamente 23 minutos, el pico de ³H-DHEA se manifestó entonces, de modo que se inició la recogida en un tubo de centrifuga de vidrio después de alcanzar 1/3 de c.p.m. del valor del pico. Se recogieron aproximadamente 2,5 ml en total a partir de 30 4 minutos de recogida. El líquido dentro del tubo de centrifuga de vidrio se agitó con un vórtice. Se sometieron 25 µl al contador de centelleo líquido, y se añadieron 25 µl a 3 ml de sol transparente. Después de confirmar que estaba descargándose una pequeña cantidad de N₂ desde una boquilla de escape, el líquido dentro del tubo de centrifuga de vidrio se desecó con nitrógeno a 75 °C usando la incubadora de Taitec.

○ Preparación del sustrato

35 Después de enfriar el ³H-DHEA desecado con nitrógeno a temperatura ambiente, se añadió 1 µl/4.000 c.p.m. (valor de la medición de 25 µl con un contador de centelleo líquido) de propilenglicol, y el ³H-DHEA se disolvió mediante agitación con vórtice durante 5 minutos.

40 Se añadieron 4 µl/4.000 c.p.m. de PBS. La mezcla se agitó con vórtice. Se sometieron 10 µl a un contador de centelleo líquido para confirmar que el recuento está por encima de 400000 c.p.m. La mezcla se diluyó con PBS:propilenglicol = 4:1. Se prepararon 400000 c.p.m./10 µl de disolución caliente (1), DHEA 87 µM en un 10 % de EtOH/90 % de D-PBS (2), dutasterida 1 mM en un 50 % de DMSO/50 % de DW (3) y fadrozol 1 mM en un 50 % de DMSO/50 % de DW (4) y se mezclaron en una razón de (1):(2):(3):(4) = 5:5:1:1 como disolución de un sustrato. Esto se calentó con un 45 baño de agua a 37 °C antes de su uso.

○ Reacción enzimática y extracción

50 Se cortó una glándula de Meibomio del párpado superior de uno de los ojos y se colocó sobre papel de pesaje, con el lado que expone la glándula de Meibomio en la parte superior. La muestra se cortó en 200 µm de grosor con un cortador de tejido. La glándula de Meibomio cortada se transfirió a HBSS. La disolución de sustrato se agitó

ES 2 989 969 T3

suavemente con vórtex, y se añadieron 24 μ l a HBSS. La mezcla se pipeteó.

5 La mezcla se incubó durante 30 minutos mientras se agitaba con un mezclador de microtubos instalado dentro de una incubadora a 37 °C. Después de 30 minutos, la mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 700 g, y se dejó precipitar el tejido de la glándula de Meibomio. La cantidad completa de HBSS se transfirió a un tubo de ensayo al que se dispensaron 2 ml de acetato de etilo. La mezcla se agitó con vórtex durante 10 segundos. Cuando se detuvo la reacción, la mezcla se transfirió inmediatamente sobre hielo.

10 Se añadieron 200 μ l de HBSS calentado a 37 °C a un tubo de 2 ml con una glándula de Meibomio restante en el mismo. Después de agitar suavemente con vórtex la disolución de sustrato, se añadieron 24 μ l a HBSS, y la mezcla se pipeteó. Se añadieron 2 μ l de NAD⁺ 100 mM en D-PBS. La mezcla se incubó durante 30 minutos mientras se agitaba con un mezclador de microtubos instalado dentro de una incubadora a 37 °C. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 700 g, y se dejó precipitar el tejido de la glándula de Meibomio. La cantidad completa de HBSS se transfirió a un tubo de ensayo al que se dispensaron 2 ml de acetato de etilo. La mezcla se agitó con vórtex durante 10 segundos. Cuando se detuvo la reacción, la mezcla se transfirió inmediatamente sobre hielo.

○ Extracción de esteroides

20 La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 1500 rpm. Se recogieron 1,6 ml de una capa de acetato de etilo en la capa superior y se desecaron con nitrógeno a 75 °C. Cuando el líquido se evaporó completamente, se añadieron 500 μ l de ACN al 40 %. La mezcla se agitó con vórtex durante 3 minutos. El líquido se transfirió a MILLIPORE Ultra free-MC instalado en un tubo de 2 ml y se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 minutos a 12000 g. Se lavó previamente un tubo de centrifuga de vidrio con 500 μ l de ACN al 40 % y se agitó con vórtex durante 2 minutos. Después de pasar a través del mismo filtro de columna, la mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 4 minutos a 12000 g. El eluato se mezcló mediante golpeteo, y se añadieron 10 μ l a 3 ml de sol transparente. La mezcla se sometió a un contador de centelleo líquido (medición de la tasa de recuperación).

○ Medición

30 La columna se equilibró en las condiciones iniciales (hasta el nivel basal y la presión estabilizada). Se crearon conjuntos de muestras en el mismo número que el número de muestras que iba a medirse. Dado que el análisis no se estabiliza para la primera columna, se permitió que fluyera ACN al 40 % como muestra. Se abrió la tapa de un tubo de 2 ml que iba a medirse. El tubo se cubrió con un Parafilm estirado finamente y se configuró para HPLC. Se inició el análisis continuo.

Condiciones de HPLC (³H-DHEA)

40 Caudal: 0,7 ml/min

Temperatura de la columna: 40 °C

Gradiente

45 De 0 a 30 min: ACN a del 40 al 50 % (0,3 %/min)

De 30 a 35 min: ACN al 70 %

50 De 35 a 40 min: ACN al 100 %

De 40 a 50 min: ACN a del 100 al 40 % (6 %/min)

De 50 a 60 min: ACN al 40 %

55 ○ Análisis

60 Se abrió un cromatógrafo con ProfSA. El suavizado se realizó estableciendo el nivel de SDA (función de suavizado) en 8. Los picos se presentaron con Encontrar Picos (en inglés, *Find Peaks*) y Localizar Picos (en inglés, *Locate Peaks*). Se copió la Vista Previa de Informe (en inglés, *Report Preview*) y se pegó en Word. Los datos se recuperaron para deducir la actividad enzimática mediante la siguiente fórmula.

[Número 1]

$$\text{Área de producto (c. p. m.)} \times \frac{400.000}{\text{Recuento de centelleo líquido tras la recuperación} \times 100}$$

Inversa de la tasa de recuperación

(3) Ensayo de proliferación celular a través de tinción con incorporación de BrdU

5 Se inyectó por vía intraperitoneal BrdU (100 mg/kg de peso corporal, Sigma-Aldrich) 30 minutos antes de recoger el tejido del párpado de un ratón. Un párpado que comprendía glándulas de meibomio se inmovilizó con PFA al 4 % y se incrustó en parafina. Los antígenos se activaron presurizando un segmento de 5 µm de grosor durante 2,5 minutos en tampón citrato de sodio 10 mM (pH 6,0). Después de incubar el segmento durante 24 horas a 4 °C usando un anticuerpo anti-BrdU (dilución 1:1000; Rockland Inc.), la respuesta inmunitaria se hizo visible con 3,3'-diaminobencidina (DAB) usando anticuerpo secundario Envision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako).
 10 Para cada segmento de tejido, se contaron las células positivas para BrdU en la capa celular basal de una glándula de Meibomio en una imagen de microscopio digital capturada con un aumento de 20x. La longitud de la circunferencia externa de un acino de glándula de Meibomio se midió con el software ImageJ, y el recuento total de células positivas para BrdU se normalizó con la longitud de la circunferencia externa. Las células positivas para BrdU se contaron
 15 usando 16 segmentos por individuo.

[Resultados]

20 La figura 3 muestra el cambio en la actividad enzimática de Hsd3b6 en una glándula de Meibomio y el cambio en el recuento de células positivas para BrdU en las células basales de glándulas de Meibomio debido a la instilación de gotas oculares de NMN, NR, o un disolvente de los mismos (vehículo, solución salina tamponada con fosfato). La actividad enzimática de Hsd3b6 y el recuento de células positivas para BrdU aumentaron significativamente debido a la instilación de gotas oculares de NMN. Se observó un aumento similar en la actividad enzimática de Hsd3b6, y el recuento de células positivas para BrdU también aumentó significativamente en el grupo de instilación de gotas
 25 oculares de NR. Específicamente, puede entenderse que la actividad enzimática de Hsd3b6 aumenta de manera tópica en una glándula de Meibomio y la actividad proliferativa de las células basales de glándulas de Meibomio aumenta debido a la instilación de gotas oculares de NMN o NR.

30 (Ejemplo 3: Experimento de 3 meses de instilación de gotas oculares de NMN o NR en ratón de tipo silvestre de 1,75 años de edad)

[Sumario]

35 Este ejemplo demuestra el efecto de la instilación de gotas oculares de NMN o NR a los 3 meses en un ratón de tipo silvestre de 1,75 años de edad en el volumen de tejido de glándulas de Meibomio.

[Materiales y métodos]

40 (1) Lo siguiente es el esquema del experimento de instilación de gotas oculares.

[Tabla 2]

| Animal | Compuesto | Dosificación | Vía de administración | Período de dosificación | Número de animales | Experimento |
|------------------------------|-----------|-----------------------------|--|-------------------------|--------------------|--|
| Ratón WT (1,75 años de edad) | Vehículo | - | Instilación de gotas oculares (solo ojo derecho) | 3 meses | 8 | Observación de tejido teñido con lípidos (evaluación del volumen de glándulas de Meibomio) |
| | NMN | 5 % (5 µl/ojo, 4 veces/día) | | | 8 | |
| | NR | 5 % (5 µl/ojo, 4 veces/día) | | | 10 | |

45 (2) El tejido de glándulas de Meibomio en un ratón se tiñó a través de la tinción de Herxheimer de glándulas de Meibomio de montaje completo de la misma manera que el enfoque en el ejemplo 1.

[Resultados]

5 La figura 4 muestra el cambio en el volumen de glándulas de Meibomio debido a la instilación de gotas oculares de NMN, NR, y disolvente de los mismos (vehículo, solución salina tamponada con fosfato). Se observó un aumento significativo en el volumen de glándulas de Meibomio tanto para el grupo de instilación de gotas oculares de NMN como para el grupo de instilación de gotas oculares de NR.

10 (Ejemplo 4: Experimento de 3 meses de instilación de gotas oculares de NMN o NR en ratón de tipo silvestre de 1,75 años de edad)

[Sumario]

15 Este ejemplo demuestra el efecto de la instilación de gotas oculares de NMN o NR de 3 meses en ratón de tipo silvestre de 1,75 años de edad sobre los componentes lipídicos en glándulas de Meibomio.

[Materiales y métodos]

20 (1) El experimento de instilación de gotas oculares se realiza de la misma manera que en el ejemplo 3.

(2) Recogida de lípidos de glándulas de Meibomio de ratón y análisis de lípidos

25 Se recogen glándulas de Meibomio de un párpado de un ratón sacrificado. Dos glándulas de Meibomio recogidas de uno de los ojos de cada animal se colocan cada una en un vial de vidrio que contiene 1 ml de mezcla de disolventes de cloroformo:metanol = 2:1 (v/v) para extracción de lípidos, y se extraen los lípidos. El extracto se reubica en un nuevo vial. El extracto puede almacenarse durante varios meses a -20 °C o menos evaporando la disolución bajo nitrógeno. A continuación, el extracto se disuelve en un disolvente adecuado, y se analiza la composición lipídica por APCI.

30 [Resultados]

Los componentes lipídicos en una glándula de Meibomio se normalizan en los grupos de instilación de gotas oculares de NMN o NR en comparación con un grupo de instilación de gotas oculares de vehículo de control (solución salina tamponada con fosfato).

35 (Ejemplo 5: Cuantificación de testosterona en glándula de Meibomio)

[Materiales y métodos]

40 Después de homogeneizar una glándula de Meibomio reseca de un párpado con metanol/agua (75:25, v/v), se extrajo el esteroide contenido en el homogeneizado en diclorometano usando un cartucho Isolute SLE+ (Biotage) y se evaporó bajo nitrógeno para obtener un residuo. El residuo se disolvió en 50 µl de metanol/disolución de ácido acético al 5 % que contenía un reactivo Amplifex Keto (SCIEX) con una concentración de 10 mg/ml y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La concentración de testosterona se encontró luego por espectrometría de masas usando un espectrómetro de masas en tándem de ionización por electropulverización con cromatografía de líquidos (sistema de CL-EM/EM QTRAP 4500; SCIEX) (transición SRM derivada: 403→164), y se normalizó por el peso húmedo de la glándula de Meibomio extraída.

50 [Resultados]

La figura 5 muestra la cantidad de testosterona en tejido de glándulas de Meibomio de ratones de tipo silvestre y deficientes en Hsd3b6. La testosterona contenida de manera tópica en las glándulas de Meibomio disminuyó aproximadamente el 50 % en ratones deficientes en Hsd3b6 en comparación con ratones de tipo silvestre. Además, la testosterona detectada de manera tópica en glándulas de Meibomio disminuyó hasta el 10 % o menos en ratones con inactivación para Hsd3b6 con la gónada (testículo) reseca. Puede entenderse a partir de esto que no solo la testosterona circulante suministrada desde los testículos, sino también el mismo nivel de producción de testosterona tópica a la glándula de Meibomio contribuyen a las glándulas de Meibomio.

60 Dado que la actividad enzimática de Hsd3b6 aumenta por la instilación de gotas oculares de NMN o NR, se entiende que se promueve la producción de testosterona que se sabe que promueve la producción de lípidos de las glándulas de Meibomio, y se normaliza la composición del componente lipídico en el tejido de glándulas de Meibomio.

(Nota)

65 La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud de patente japonesa n.º 2019-117642 presentada el 25 de junio de 2019 en la Oficina de Patentes de Japón.

[Aplicabilidad industrial]

5 La presente divulgación puede usarse en el campo de la medicina, productos farmacéuticos, atención médica, biología, bioquímica, y similares.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende mononucleótido de nicotinamida (NMN) y/o ribósido de nicotinamida (NR), para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad acompañada de disfunción de una glándula de Meibomio.
2. Composición que comprende mononucleótido de nicotinamida (NMN) y/o ribósido de nicotinamida (NR), para su uso en el tratamiento o la prevención de la disfunción de glándulas de Meibomio.
- 10 3. Composición para su uso de la reivindicación 2, en la que la disfunción de glándulas de Meibomio va acompañada de una secreción reducida de meibum.
- 15 4. Composición para su uso de la reivindicación 2, en la que la disfunción de glándulas de Meibomio va acompañada de una enfermedad inflamatoria.
5. Composición para su uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad inflamatoria comprende al menos una seleccionada del grupo que consiste en meibomianitis, queratitis superficial (punteada) y blefaritis.
- 20 6. Composición para su uso de la reivindicación 2, en la que la disfunción de glándulas de Meibomio va acompañada de una acumulación excesiva de lípidos en un conducto.
7. Composición para su uso de la reivindicación 2, en la que la disfunción de glándulas de Meibomio va acompañada de molestias oculares, sensación de un objeto extraño y/o sensación de presión.
- 25 8. Composición para su uso de la reivindicación 1, en la que la enfermedad acompañada de la disfunción de una glándula de Meibomio es meibomianitis, blefaritis posterior, queratitis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis relacionada con meibomianitis, penfigoide ocular, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y trastorno de la función visual.

FIG.1

Atrofia del tejido de glándulas de Meibomio asociada con el envejecimiento

Fig. 1

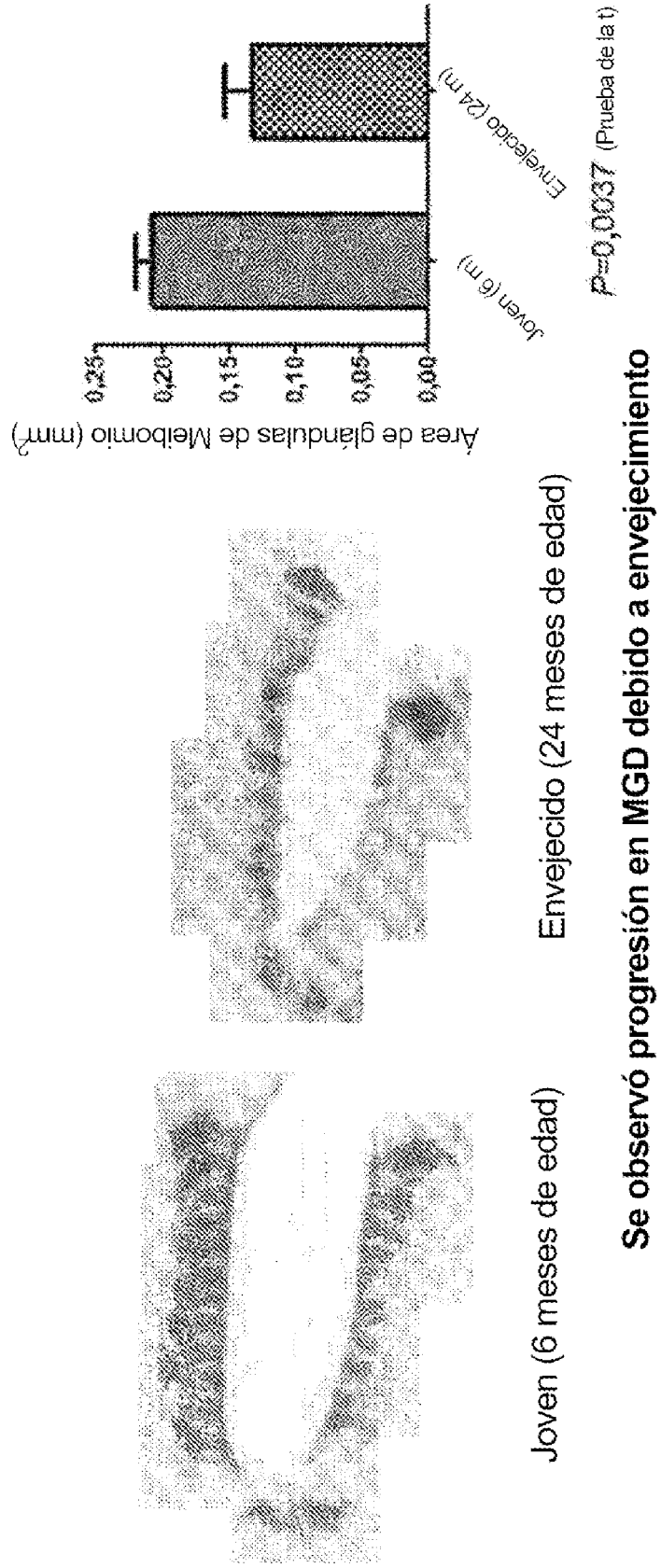


FIG.2

Fig. 2 Atrofia de las glándulas de Meibomio en ratones KO para Hsd3b6

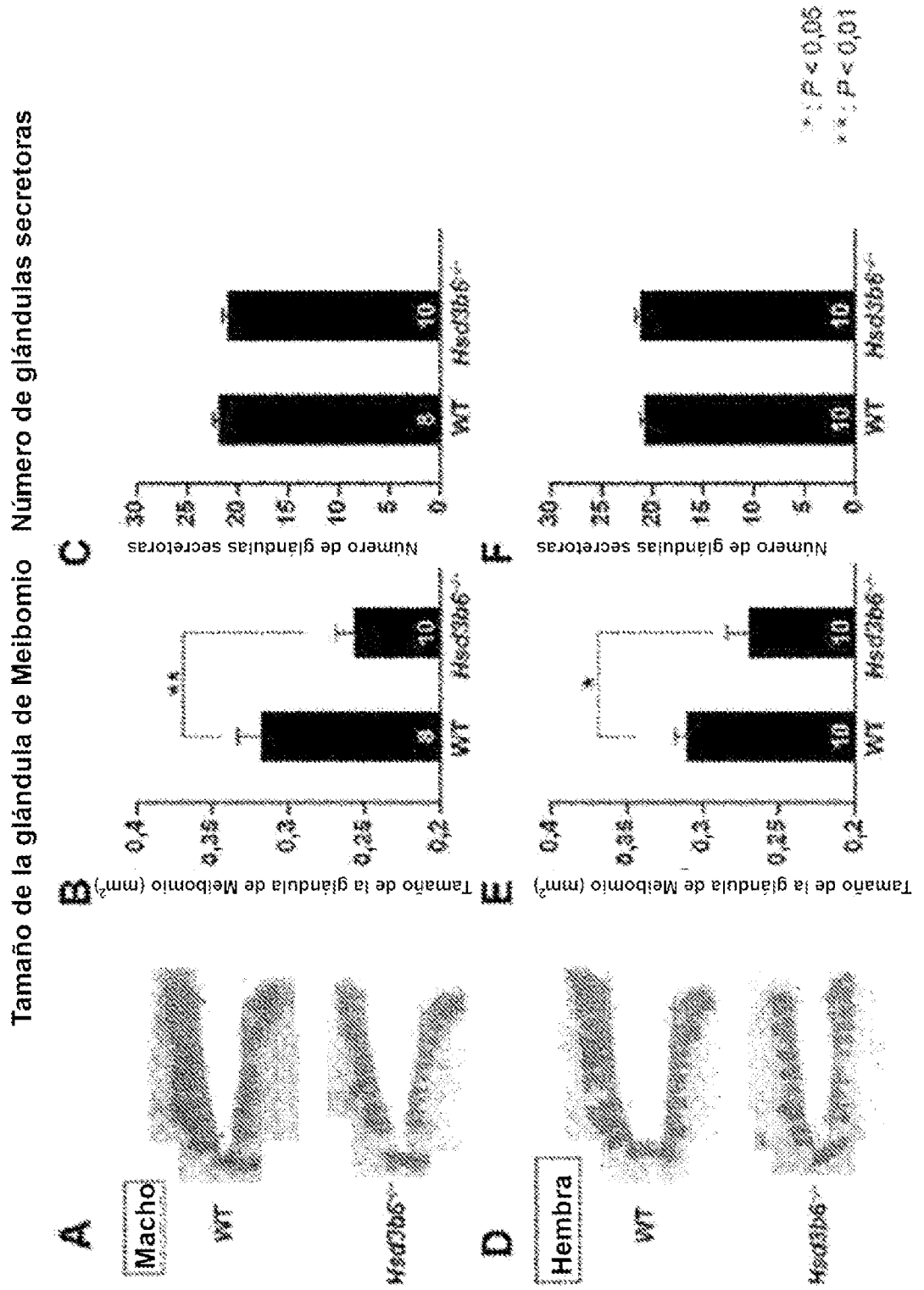


FIG.3

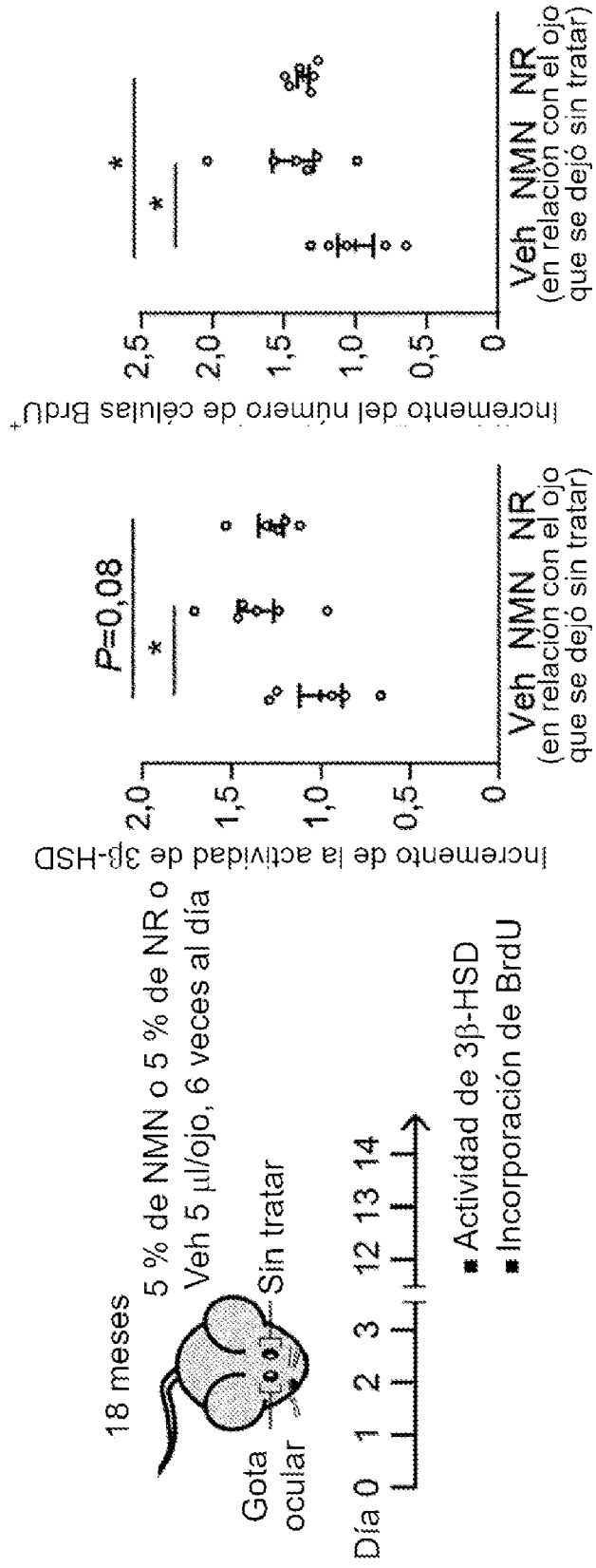


FIG.4

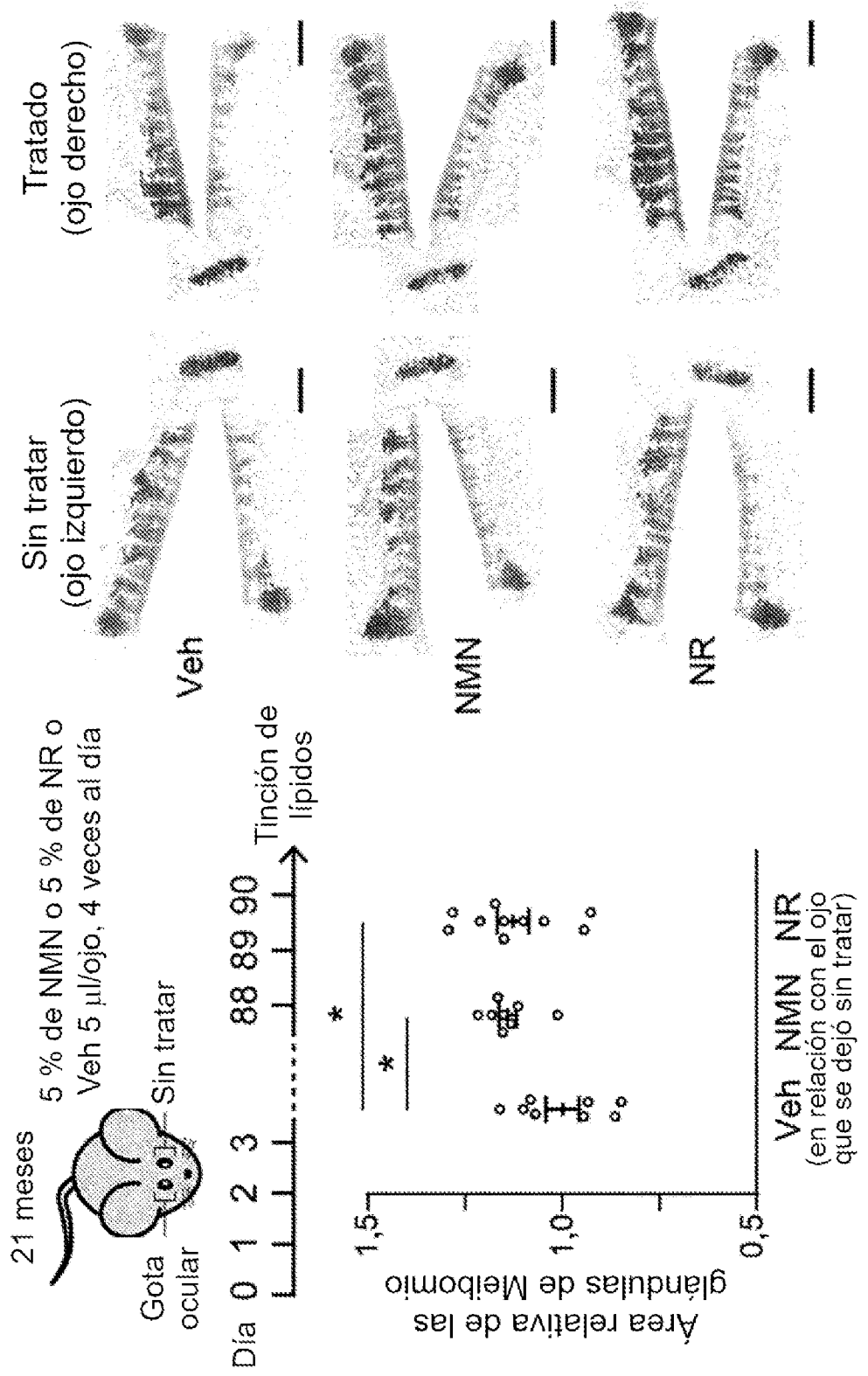


FIG.5

