

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-504205
(P2023-504205A)

(43)公表日 令和5年2月1日(2023.2.1)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/202 (2006.01)	A 6 1 K 31/202	4 C 0 7 6
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	4 C 2 0 6
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全62頁)

(21)出願番号	特願2022-534665(P2022-534665)	(71)出願人	520061826
(86)(22)出願日	令和2年12月9日(2020.12.9)		ザ ボード オブ スーパーバイザーズ オ
(85)翻訳文提出日	令和4年7月15日(2022.7.15)		ブ ルイジアナ ステート ユニバーシティ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/064042		アンド アグリカルチュラル アンド メ
(87)国際公開番号	WO2021/119146		カニカル カレッジ
(87)国際公開日	令和3年6月17日(2021.6.17)		アメリカ合衆国 7 0 8 0 8 ルイジアナ
(31)優先権主張番号	62/945,580		州 バトン ルージュ ウェスト レイクシ
(32)優先日	令和1年12月9日(2019.12.9)		ョア ドライブ 3 8 1 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(71)出願人	508230226
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		ユニバーシティ オブ サザン カリフォ
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		ルニア
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサ
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		ンゼルス サウス オリーブ ストリート
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	1 1 5 0 スイート 2 3 0 0
	最終頁に続く		100102978
			最終頁に続く

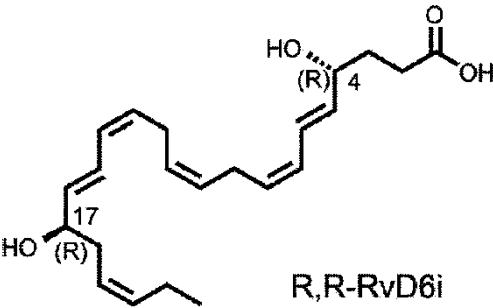
(54)【発明の名称】 角膜病変の治療のための生体分子

(57)【要約】

本発明は、角膜病変を治療するための組成物および方法に関する。具体的には、本発明の態様は、生体分子、およびそれを使用して組織の神経支配に影響を与える角膜病変を治療する方法に向けられている。

【選択図】 図 1 6

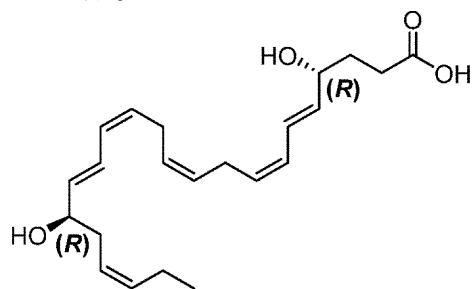
FIG.16



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

角膜病変の治療を必要とする対象において角膜病変を治療する方法であって、治療有効量の以下：



式 I

10

を含む組成物を、前記対象に経眼投与する段階を含む、方法。

【請求項 2】

角膜病変からの角膜の保護を必要とする対象において角膜病変から角膜を保護する方法であって、治療有効量の式 I を含む組成物を、前記対象に経眼投与する段階を含む、方法。

20

【請求項 3】

角膜病変の治療の促進を必要とする対象において角膜病変の治療を促進する方法であって、治療有効量の式 I を含む組成物を、前記対象に経眼投与する段階を含む、方法。

【請求項 4】

角膜病変を治療する段階が、角膜神経密度を増加すること、角膜神経密度を回復すること、軸索成長を修復すること、R i c t o r を誘導すること、T I M P 8 遺伝子発現を誘導すること、創傷治癒、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記角膜病変が、ドライアイ疾患（D E D）、羞明、神経損傷、神経障害性疼痛、ドライアイ様疼痛、角膜神経栄養性潰瘍、外傷、角膜創傷、または神経栄養性角膜炎を含む、請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記組成物が、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤が、局所投与に適している、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記組成物が、局所投与用に製剤化される、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記医薬組成物が、点眼薬として製剤化される、請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記組成物が、毎時、毎日、毎週、または毎月投与される、請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

治療有効量が、約 1 0 n g ～約 1 0 0 0 n g の量を含む、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2019年12月9日に提出された米国仮特許出願第 62 / 945,580

50

号の優先権を主張し、その内容全体が、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本明細書に引用されるすべての特許、特許出願、および刊行物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載され特許請求される本発明の日付の当業者に既知の最新技術をより完全に記載するために、これらの刊行物の開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本特許開示は、著作権保護の対象となる、資料を含む。著作権所有者は、米国特許商標局の特許ファイルまたは記録に記載されている特許文書または特許開示の、いかなる者による複製にも異議はないが、それ以外では、何であれすべての著作権を留保している。

10

【0004】

政府の権益

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号 R 0 1 E Y 0 1 9 4 6 5 に基づく政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0005】

発明の分野

本発明は、角膜病変を治療するための組成物および方法に関する。具体的には、本発明の態様は、生体分子、およびそれを使用して組織の神経支配に影響を与える角膜病変を治療する方法に向けられている。

【背景技術】

20

【0006】

発明の背景

ドライアイは、主に加齢の間に視力を乱す。また、関節リウマチ、糖尿病、甲状腺病変、環境条件（例えば、煙または汚染物質への曝露）、コンタクトレンズの長期使用、および屈折矯正手術後にも発生する。滑らかにし、感染を阻止し、透明な眼の表面に栄養を与えて維持する、涙の不足によって、この眼の病変が引き起こされる。角膜の神経支配は、眼の表面の完全性を維持するために必要であり、神経損傷は、涙の生成、まばたき反射を減少させ、上皮の創傷治癒を混乱させ、透明性および視力の喪失をもたらす。

【0007】

三叉神経節（TG）ニューロンの眼枝からの感覚神経からの軸索は、辺縁領域を取り巻く角膜実質を貫通し、角膜上皮に到達する前に上皮下神経叢として分岐し、最終的に自由神経終末となる。

30

【0008】

屈折矯正手術によって神経損傷が発生した後、角膜神経の完全性が回復するまでに3～15年かかる場合がある。結果として、角膜感受性が低下し、ドライアイ疾患が発症し、神経障害性疼痛、角膜潰瘍、そして重症の場合には角膜移植の必要性を引き起こす可能性がある。さらにドライアイは、角膜表面の冷却速度を制御し、正常な涙分泌を維持する一過性受容体電位メラストアチン8（TRPM8）チャネルなどの低温受容体機能に関連している。実験的な角膜手術のずっと後でも、TRPM8終末の減少が起こり、これらの変化が術後の神経障害性疼痛の一因であることを示している。

40

【発明の概要】

【0009】

本発明は、角膜病変から角膜を保護する方法を提供する。

【0010】

さらに、本発明は、角膜創傷治癒を促進する方法を提供する。

【0011】

最後に、本発明は、角膜病変を治療する方法を提供する。

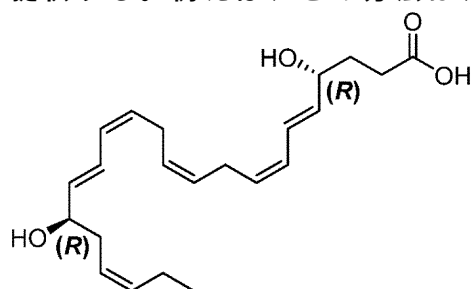
【0012】

実施形態では、この方法は、治療有効量の R v D 6 s i を含む組成物を眼の表面に投与することを含むことができる。

50

【0013】

本発明の態様は、角膜病変の治療を必要とする対象において角膜病変を治療する方法を提供する。例えば、この方法は、治療有効量の以下：



式 I

10

を含む組成物を、対象に経眼投与することを含むことができる。

【0014】

本発明の態様は、角膜病変からの角膜の保護を必要とする対象において角膜病変から角膜を保護する方法をさらに提供する。例えば、この方法は、治療有効量の式 I を含む組成物を、対象に経眼投与することを含むことができる。

【0015】

さらに、本発明の態様は、角膜病変の治療の促進を必要とする対象において角膜病変の治療を促進する方法を含むことができる。例えば、方法は、治療有効量の式 I を含む組成物を、対象に経眼投与することを含むことができる。

20

【0016】

実施形態では、角膜病変の治療は、角膜神経密度の増加、角膜神経密度の回復、軸索成長の修復、Rictorの誘導、TIMP8遺伝子発現の誘導、創傷治療、またはそれらの組み合わせを含む。

【0017】

実施形態では、角膜病変は、ドライアイ疾患（DED）、羞明、神経損傷、神経障害性疼痛、ドライアイ様疼痛、角膜神経栄養性潰瘍、外傷、角膜創傷、または神経栄養性角膜炎を含む。

30

【0018】

実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む。

【0019】

実施形態において、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤は、局所投与に適している。

【0020】

実施形態では、組成物は局所投与用に製剤化される。

【0021】

実施形態では、医薬組成物は点眼薬として製剤化される。

40

【0022】

実施形態では、組成物は、毎時、毎日、毎週、または毎月投与される。

【0023】

実施形態では、治療有効量は、約10 ng～約1000 ngの量を含む。

【0024】

本発明の他の目的および利点は、その後の記載から容易に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1-1】 PEDF + DHAで治療されたマウスの涙からの RvD6 siとしてのピー

50

ク1の識別を示す。(パネルA) 傷害、治療、および16個の角膜から収集された涙サンプルの、時間枠を使用した実験計画。(パネルB) 7~9.5分のRTでのサンプル中の359 m/z化合物(赤)の総イオン電流(TIC)分析。359のm/zで検出された3つのピークがあり、これらはジヒドロキシ-DHA生成物とみなされる。この研究では、本発明者らはRTが8.20分のピーク(ピーク1)に焦点を当てる。LTB4-d4内部標準(緑色)は8.25分に溶出した。(パネルC) 選択したピーク1およびRvD6標準の完全なフラグメンテーション分析。(パネルD) 衝突後の断片化された生成物の質量を含むピーク1の構造的解釈(赤い点線は結合の切断を表す)。1~6までの番号が付けられた断片がMRM検出に使用された。(パネルE) ピーク1およびRvD6の同時注入。この分析では、ピーク1は8.10分で溶出し、RvD6は8.37分で溶出した(青色のLTB4-d4内部標準は8.15分で溶出した)。すべてのプロダクトイオンは、RTの同じ差と一致した。(パネルF) 238.09 nmで最大吸光度を持つピーク1およびRvD6のUVダイオードアレイプロファイル。

10

【図1-2】図1-1の説明を参照。

【図2-1】追加されたDHAから派生したRvD6 siを示す。(パネルA) 衝突後の断片化された生成物の質量を伴うRvD6 si-d5の構造(赤い点線は壊れた結合を表す)。DHA-d5に由来する5つの重水素は、RvD6のm/zを359(左の列)から364(右の列)にシフトする。シフトされたプロダクトイオンには、C21およびC22(青色)に重水素標識が含まれている。MRM検出には、1つのシフトされたプロダクトイオンおよび1つのシフトされていないプロダクトイオンが使用された(赤い点線のボックス)。(パネルB) DHA-d5(赤い点線のボックス)または通常のDHA(緑の点線のボックス)から派生したRvD6 siのMRM検出。遷移MRMの検出方法は、各グラフの上部に示される。青色のピークはLTB4-d4内部標準である。マージウィンドウは、DHA-d5またはDHAに由来するRvD6 siが同じRTで溶出されることを示している。これは、これらが同一の化合物であることを意味する。(パネルC) BからのRvD6 si-d5の完全なフラグメンテーション分析。(パネルD) 増加したDHA濃度でのRvD6 siの定量化。遊離DHAおよびその誘導体(14-HDHA、17-HDHA、RvD6 siなど)はDHA濃度の関数として徐々に増加したが、遊離AAおよびその誘導体である12-HETEと15-HETEは増加しなかった。

20

【図2-2】図2-1の説明を参照。

30

【図3】RvD6 siの分離を示す。(パネルA) 分画溶出からのRvD6 siの検出。涙および培地からのサンプルは、LC-MS/MSによって合成されたRvD6 siの存在を分析する前に、C18カラムを備えたUPLCシステムを使用して溶出時間の6~12分まで30秒ごとに収集された。画分6、7、および8がプールされた。(パネルB) RvD6 siの分離を確認するための、結合された画分6~8の質量分析。359 m/zのTICは独特のピークを示し、すべてのジヒドロキシ-DHA製品(359→297および359→279)のスキンのMRMは、他のジヒドロキシ-DHA誘導体がなかったことを確認する。さらに、モノヒドロキシDHA(343→299および343→281)またはトリヒドロキシDHA(375→277)のMRMスキンは、分離されたRvD6 siの純度を示すピークを示していない。

40

【図4-1】RvD6が角膜創傷治療および感受性を促進することを示している。(パネルA) 創傷治療実験の実験計画。(パネルB) 傷害の20時間後にメチレンブルーで染色された角膜創傷領域の代表的な画像。(パネルC) 傷害および治療後の計算された創傷閉鎖。(パネルD) 角膜感受性ならびに角膜およびTG組織の収集の実験図。(パネルE) 非接角膜計を使用した、非傷害マウスの記録された角膜感受性の分布(N=40角膜)。(パネルF) 3日ごとに記録された角膜感受性。RvD6 siで治療したマウスは、3、6、および9日目に有意に高い感受性を示したが、PEDF+DHAおよびRvD6での治療群は、9日目にのみ高い角膜感覚を示した。12日目に、試験された化合物とビヒクルとの間に差はなかった。統計的p値は、一元配置分散分析と、それに続くTukeyのHSD(honest significant difference)の、複数のペアワイズ比較から導出さ

50

れる。

【図4-2】図4-1の説明を参照。

【図5】RvD6が角膜神経の再生を促進することを示している。(パネルA)全角膜神経のパンマーカーである抗PGP9.5およびマウス角膜の主要な神経ペプチドであるSPで染色された、正常な角膜神経のホールマウント画像。ホールマウント画像で破線のボックスでマークされている挿入図は、PGP9.5およびSPの二重染色、ならびにPGP9.5のみおよびSPのみによる角膜の増幅された中心領域を示している。(パネルBおよびC)傷害および治療後12日でのPGP9.5(パネルB)およびSP(パネルC)陽性軸索の代表的なホールマウント画像および計算された神経密度。データはベスラインに対して正規化された(パネルAの非傷害角膜)。統計的p値は、一元配置分散分析と、それに続くTukeyのHSDの、複数のペアワイズ比較から導出される。

10

【図6-1】角膜傷害およびRvD6s治療後のTGトランスクリプトームの変化を示している。(パネルA)TG RNAシーケンスデータの主成分分析は、分析されたサンプルの3つの群の十分にクラスター化された転写プロファイルを示している。(パネルB)ビヒクルサンプルを参照としてRvD6(ピンク)とRvD6si(緑)との間で共有された上方調節および下方調節された遺伝子のベン図。入力された遺伝子は、RvD6群とビヒクル群とで大きく異なる($FDR < 0.05$)。(パネルC)軸索成長円錐分類(GO:0044295)における2つの有意な増加遺伝子の箱ひげ図。(パネルD)炎症および疼痛に関連する遺伝子の変化。(パネルEおよびG)RvD6siの神経再生メカニズムにおけるRictor遺伝子の関与の証拠。(パネルE)RvD6si対ビヒクルおよびRvD6__std対ビヒクルの上流分析ヒートマップは、重要な遺伝子変化を示している。RICTORは黒い太い矢印でマークされている。(パネルF)RvD6si対ビヒクルの比較におけるRICTORの詳細なシグナル伝達経路が中央のパネルに示されている。尖っていない青い矢印は抑制された相互作用を表し、赤い先端の矢印はアクティブ化された相互作用を表し、黄色の矢印はIPA分析による競合する相互作用を表す。(パネルG)Rictor遺伝子発現の箱ひげ図。統計的p値は、一元配置分散分析と、それに続くTukeyのHSDの、複数のペアワイズ比較から導出される。

20

【図6-2】図6-1の説明を参照。

【図7】生物学的生産物から単離されたRvD6siの高純度を示している。画分6~8のサンプルをプールし、特定のMRMウィンドウを備えたLC-MS/MSを使用して分析し、DHA、EPA、AA、およびHETE、LXA₄、PGD₂、PGE₂、PGF₂アルファを含むその誘導体を検出した。すべてのMRMウィンドウには、微量のターゲット化合物が表示され、分離されたRvD6が純粋であることを示している。

30

【図8】Enrichr解析による細胞成分の遺伝子オントロジーを示している。特定の細胞内コンパートメントに位置する多くの群の遺伝子がある。それらの群の中で、軸索成長円錐(GO:0044295)群を標的とした。

【図9】ドライアイおよび眼の神経障害性疼痛に効果的な治療法がないことを示している。

【図10-1】新しいRvD6立体異性体(RvD6si、局所塗布)が、マウスの傷害された角膜を修復することを示している。

40

【図10-2】図10-1の説明を参照。

【図11】新しいRvD6立体異性体(RvD6si)が角膜神経の再生を引き起こすことを示している。

【図12-1】RvD6異性体が疼痛関連遺伝子の発現を減少させ、三叉神経節のTRPM8を増加させることを示している。

【図12-2】図12-1の説明を参照。

【図13A】角膜の構造および神経支配を示している。パネルAは、ヘマトキシリンおよびエオシン組織学的染色後のヒト角膜の解剖学的構造を示している。上皮、ボーマン層、間質、デスメ膜、および内皮の5つの層すべてが示されている。パネルBは、45歳の男性ドナーの左眼から得られた完全なヒト角膜上皮神経ネットワークの全体像を示している

50

。パネルCは、角膜の周辺から中心に収束するまでの上皮神経束の詳細な経過を示している（パネルBおよびCは、「Elsevier」参考文献5の許可を得て複製されている）。

【図13B】図13Aの説明を参照。

【図13C】図13Aの説明を参照。

【図14】間質神経が損傷したマウスの角膜へのDHA局所治療の1時間後の、PCおよびPEへのDHAの取り込みを示している。パネルAは、マウスの角膜が傷害され、DHAで1時間局所治療された後、脂質が抽出され、LC-MS/MSによって分析されたことを示している（27）。sn-1位置にオレイン酸（18：1）を、sn-2位置にDHAを含む、PCとPEとの割合。PEはPCよりもDHAが豊富であった。パネルBは、角膜傷害およびPEDF+DHAによる3時間の局所治療後の、DHAの放出およびモノヒドロキシ-DHA誘導体の合成を示している。角膜脂質プロファイルは、質量分析ベースのリピドミック分析によって分析された。

10

【図15】リン脂質のsn-2位置でエステル化された3つの最も豊富な必須脂肪酸AA、EPA、およびDHAに由来する脂質メディエーターを示している。一次触媒酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）ならびに5および15リポキシゲナーゼ（5-LOX、15-LOX）に応じて、炎症および炎症反応の解消に關与する様々な生物活性脂質の合成がある。AAのメディエーターはオレンジ色で、EPAは緑色で、DHAは青色で強調表示されている。

【図16】RvD6iの構造を示している新しい異性体は、PEDF+DHAでマウスの傷害した角膜を局所刺激した後に合成され、涙中に放出された。LC-MS/MSで分析し、RvD6標準で少なくとも6つの一致した娘イオンが示されたが、保持時間は早くなった（40）。事後研究では、ピーク保持時間が、キラルカラムで化学合成されたR，R-RvD6iと一致することが示されている。

20

【図17-1】RvD6iが角膜の創傷治療および感受性を加速することを示している。パネルAは、上皮および前間質神経を損傷する傷害の20時間後にメチレンブルーで染色された、マウス角膜創傷領域の代表的な画像を示している。動物は、PEDF+DHAまたはRvD6iを同様の濃度で含む点眼薬を1日3回受けた。画像は解剖顕微鏡で撮影され、Photoshipソフトウェアを使用して定量化された（40）。パネルBは、傷害および非接触知覚計を使用したPEDF+DHAまたはRvD6i（3回/日）による治療の3、6、および9日後の角膜感受性の回復を示している。RvD6iで治療したマウスは、PEDF+DHAで治療した角膜よりも早く感受性を回復する。パネルCは、RvD6iのTGの炎症および疼痛に關与し、RNAシーケンシングによって分析された遺伝子の発現を示している（40）。CalcbおよびTac1遺伝子は下方調節されたが、（パネルD）Trpm8およびRictor遺伝子は、RvD6iによる角膜治療によってTGニューロンで上方調節された。

30

【図17-2】図17-1の説明を参照。

【図18】PEDF+DHAの組み合わせによって刺激されるシグナル伝達の概略モデルを示している。DHAは角膜上皮から膜リン脂質に急速に取り込まれ、PEDFによる刺激後にiPLA2活性を持つPEDF-Rを放出する。遊離DHAは、NPD1および新規RvD6iなどのドコサノイドの基質になる。次に、これらのドコサノイドは涙中に放出され、未定義のGPRC受容体への自己分泌刺激によって、涙中に分泌されて軸索伸長を促進する神経栄養因子NGF、BDNF、およびSema7Aの遺伝子ならびにタンパク質の発現を誘導する。RvD6iは、角膜創傷治療、角膜感覚および神経回復、ならびに涙分泌を刺激する。このメカニズムには、神経障害性疼痛に關与する遺伝子の神経新生および調節に關連する遺伝子の活性化を伴うTGトランスクリプトームの変化が含まれる。PEDFまたはDHA単独での治療はこれらの経路を活性化しないため、角膜神経再生の増加はなかった（19）。

40

【発明を実施するための形態】

【0026】

50

発明の詳細な説明

角膜傷害時にニューロトロフィン色素上皮由来因子（P E D F）およびドコサヘキサエン酸（D H A）によって活性化される、涙中に放出される立体特異的レゾルビンD 6異性体（R v D 6 s i）の発見が、本明細書に記載される。新しいR v D 6 s iは、眼の表面の完全性を維持する高密度の神経支配を回復することにより、角膜の創傷治癒、感受性、神経再生、および機能回復を促進する。角膜神経傷害を感知し、R v D 6 s iで治療した後、三叉神経節（T G）のトランスクリプトームは、m T O Rのラパマイシン非感受性複合体-2（m T O R C 2）であるR i c t o rの遺伝子発現、および軸索成長に関連する遺伝子の発現を増強し、一方、神経障害性疼痛に関連する遺伝子は減少する。新しいR v D 6異性体は、三叉神経節ニューロンへのシグナル伝達を刺激した。新しいR v D 6異性体は、三叉神経節において、軸索の成長を修復し、神経障害性疼痛を軽減する遺伝的プログラムを誘発する。その結果、眼の神経障害性疼痛およびドライアイの軽減が起こる。したがって、R v D 6 s iは、神経栄養性角膜炎およびドライアイ様疼痛を含むがこれらに限定されない、組織の神経支配に影響を与えるような角膜病変のための新しい治療手段を切り開く。

10

【0027】

1つ以上の実施形態の詳細な説明が本明細書に提供される。しかしながら、本発明が、様々な形式で具現化され得ることが、理解されるべきである。したがって、本明細書に開示される特定の詳細は、限定として解釈されるべきではなく、特許請求の範囲の根拠として、および当業者に本発明を任意の適切な方法で用いるように教示するための代表的な根拠として解釈されるべきである。

20

【0028】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する当業者に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の方法および材料と同様または同等の任意の方法および材料が本開示の実施または試験に使用され得るが、有利な方法および材料がこれから記載されている。

【0029】

本明細書で引用されるすべての刊行物および特許は、各個別の刊行物または特許が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示され、刊行物が引用されることに関連する方法および／または資料を開示および説明するために参照により本明細書に組み込まれるかのように、参照により本明細書に組み込まれる。出版物の引用は、出願日の前の開示のためであり、本開示が事前の開示のためにそのような刊行物に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行日は、個別に確認する必要がある実際の刊行日とは異なる場合がある。

30

【0030】

本開示を読むと当業者には明らかであるように、本明細書に記載および図示された個々の実施形態のそれぞれは、本開示の範囲または趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴から容易に分離または組み合わせることができる別個の構成要素および特徴を有する。任意の列挙された方法は、列挙されたイベントの順序で、または論理的に可能な他の任意の順序で実行することができる。

40

【0031】

本開示の実施形態は、他に示されない限り、当技術分野の技術の範囲内である医学、有機化学、生化学、分子生物学、薬理学、毒物学などの技術を使用する。そのような技術は、文献で完全に説明されている。

【0032】

単数形「1つの（a）」、「1つの（a n）」、および「その（t h e）」は、文脈が明確に他のことを指示しない限り、複数の参照を含む。特許請求の範囲および／または明細書において「含む」という用語とともに使用されるとき「1つの（a）」または「1つの（a n）」という単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは2つ以上」の意味とも一致する。

50

【0033】

「例えば」、「など」、「含む」などの句のいずれかが本明細書で使用される場合は常に、他に明確に記載されない限り、「限定することなく」という句が付随することが理解される。同様に、「一例」、「例示的」などは、非限定的であると理解される。

【0034】

「実質的に」という用語は、意図した目的に悪影響を与えない記述語からの逸脱を可能にする。記述用語は、「実質的に」という語が明確に列挙されていなくても、「実質的に」という用語によって修飾されることが理解される。

【0035】

「含む (comprising)」および「含む (including)」および「有する (having)」および「含む (involving)」(ならびに同様に「含む (comprises)」、「含む (includes)」、「有する (has)」、および「含む (involves)」)などの用語は、交換可能に使用され、同じ意味を有する。具体的には、用語の各々は、「含む (comprising)」の一般的な米国特許法の定義と一致して定義され、したがって、「少なくとも以下 (at least the following)」を意味する非限定用語 (open term) であると解釈され、追加の特徴、限定、態様などを除外しないとも解釈される。よって、例えば、「ステップ a、b、および c を含むプロセス」は、プロセスが少なくともステップ a、b、および c を含むことを意味する。「1つ (a)」または「1つ (an)」という用語が使用される場合は常に、そのような解釈が文脈において無意味でない限り、「1つ以上」と理解される。

10

20

【0036】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、本明細書では、おおよそ、大まかに、おおよそ、またはその領域内を意味するために使用される。「約」という用語が数値範囲とともに使用される場合、それは、記載された数値の上および下の境界を拡張することによってその範囲を変更する。一般に、「約」という用語は、本明細書では、20パーセント上または下の(高い、または低い)分散によって記載された値を上回る、および下回る数値を修飾するために使用される。

【0037】

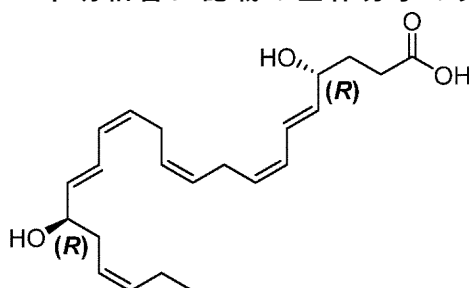
本発明の態様は、対象の角膜を保護する方法に向けられている。例えば、一実施形態では、この方法は、治療有効量の R v D 6 s i を含む組成物を対象の眼の表面に投与することを含む。

30

【0038】

化合物

本明細書に記載の生体分子の実施形態は、以下の式 I の構造：



式 I

40

を有する。

【0039】

式 I は、(4 R、5 E、7 Z、10 Z、13 Z、15 E、17 R、19 Z) - 4, 17 - ジヒドロキシドコサ - 5, 7, 10, 13, 15, 19 - ヘキサエン酸を指す。実施形

50

態において、用語レゾルビンD6立体特異的異性体（RvD6si）、RvD6異性体、RvD6s、RvD6i、または立体特異的レゾルビンD6異性体、4R、17R-ジヒドロキシーDHAは、交換可能に使用することができ、式Iなどの生体分子を指すことができる。しかしながら、そのような用語は、必ずしも式Iによる生体分子のみに限定されないことを理解されたい。例えば、実施形態において、「RvD6異性体」または「RvD6立体特異的異性体」という用語は、式Iの生体分子に加えて、レゾルビンD6の他の異性体を指すことができる。

【0040】

本明細書で使用される場合、「異性体」という用語は、同じ分子式を有する異なる化合物を指すことができる。本明細書で使用される場合、「立体異性体」という用語は、それらの原子が同じ順序で結合しているが、空間内の原子の配置が異なる異性体を指すことができる。立体異性体は、「エナンチオマー」または「ジアステレオマー」を指す場合がある。本明細書で使用される場合、「エナンチオマー」という用語は、互いに重ね合わせることができない鏡像である立体異性体を指すことができる。本明細書で使用される場合、「ジアステレオマー」という用語は、互いの鏡像ではない立体異性体を指すことができる。本明細書で使用される場合、「立体特異的」という用語は、ある立体異性体の別の立体異性体への化学的または酵素的反応における変換を指すことができる。

【0041】

角膜は眼の前の透明な外層である。角膜は、対象がはっきりと見えるように、対象の眼の焦点を合わせるのに役立つ。

【0042】

本発明の態様は、角膜疾患または角膜傷害、およびそれらからの損傷から保護（すなわち、予防）または治療することができる。「角膜疾患」は、様々な要因、例えば、物理的／化学的損傷、刺激、アレルギー、細菌／真菌／ウイルス感染、角膜潰瘍によって引き起こされる角膜炎などによる、角膜の任意の疾患または損傷を指すことができる。それはまた、角膜上皮傷害（例えば、剥離、角膜びらん）、角膜上皮浮腫、角膜火傷、化学物質による角膜腐食、ドライアイなどを指すこともある。「角膜傷害」とは、角膜の擦り傷（引っかき傷）を指す。場合によっては、小さな傷害は自然に治るが、より深い引っかき傷またはその他の傷害は、角膜剥離および視力の問題を引き起こす可能性がある。「角膜損傷」は、例えば、病原体、炎症、物理的刺激（例えば、コンタクトレンズまたはUV）、化学的刺激（例えば、薬物）、神経損傷、蓄積された疲労によって引き起こされる損傷などの角膜へのあらゆる損傷を指すことができるが、それに限定されない。それは、疼痛、赤目、角膜混濁、まぶしさ、異物感などの症状を伴うことがある。本明細書で使用される場合、「疾患」、「傷害」、および「機能不全」という用語は、「病変」と交換可能に使用することができる。

【0043】

本発明の態様は、角膜病変を予防（すなわち、予防）または治療することができる。

【0044】

本発明の他の態様は、角膜病変の治療を促進することができる。「治療を促進する」または「治療を加速する」という用語は、無治療と比較して好ましい結果を引き起こすことを指すことができる。良好な結果は、例えば、瘢痕の減少、炎症の減少、正常組織の再成長または瘢痕組織の成長、神経の再成長、神経支配、創傷の閉鎖、感染の減少、および眼底にある病変に関連する死亡率／罹患率の減少を含む。

【0045】

角膜病変の例には、ドライアイ疾患（DED）、羞明、神経障害性疼痛、ドライアイ様疼痛、角膜神経栄養性潰瘍、外傷、角膜創傷、神経栄養性角膜炎、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「神経障害性疼痛」という用語は、末梢および／もしくは中枢感覚経路の損傷、または末梢および／もしくは中枢感覚経路の機能不全、ならびに神経系の機能不全に起因する疼痛を指すことができる。

【0046】

花粉などのアレルギーは、眼を刺激し、アレルギー性結膜炎（ピンクアイと呼ばれることがある）を引き起こす可能性がある。これにより、眼が赤くなり、かゆみを伴い、水っぽくなることもある。

【0047】

角膜炎は、角膜の炎症（発赤および腫れなど）を指す。コンタクトレンズに関連する感染症は、角膜炎の最も一般的な原因である。

【0048】

ドライアイは、対象の眼が濡れたままでいるのに十分な涙を流さない場合に発生する。これは不快であり、視力の問題を引き起こす可能性がある。

【0049】

角膜ジストロフィーは、角膜に物質が蓄積すると視力が曇る原因となる。これらの病気は通常家族で発生する。

【0050】

眼ヘルペス、スティーブンス・ジョンソン症候群、虹彩角膜内皮症候群、翼状片などを含む、角膜に影響を与える可能性のある多数のあまり一般的ではない疾患もある。本発明の局面は、角膜神経密度、角膜神経の完全性、および／または角膜神経感受性を増加および／または回復する方法を含むことができる。例えば、本発明の実施形態は、治療有効量の式Iを含む組成物を経眼投与することによって対象の角膜病変を治療する方法を含むことができ、角膜病変の治療は、角膜神経密度の増加、角膜神経密度の回復、軸索成長の修復、R i c t o r 遺伝子発現の誘導、創傷治癒、またはそれらの組み合わせを含む。R i c t o r 遺伝子は、傷害後の感覚ニューロンの抗炎症および軸索成長に役割を果たすラパマシン非感受性複合体2（mT O R C 2）の哺乳類標的の重要な構成要素であるR I C T O Rタンパク質をコードする。本発明の態様は、角膜神経の再生および／または神経支配の方法をさらに提供することができる。本明細書で使用される場合、「神経再生」という句は、神経細胞を含む細胞の修復または再成長を指すことができる。本明細書で使用される場合、「神経支配」という句は、神経が組織に入るプロセス、および／または角膜組織などの組織に神経を供給するプロセスを指すことができる。

【0051】

本発明の態様はまた、角膜創傷治癒を促進する方法に向けられる。例えば、一実施形態では、この方法は、治療有効量の式I（例えば、R v D 6 s i）を含む組成物を対象に経眼（例えば、眼の表面に）投与することを含む。

【0052】

「角膜創傷」などの「創傷」は、組織構造の連続性または完全性の物理的破壊を指すことができる。「創傷治癒」は、組織の完全性の回復を指すことがある。これは、組織の完全性の部分的または完全な回復を指すことができることが理解されよう。したがって、創傷の治療は、創傷治癒プロセスに関連する1つ以上の段階またはプロセスの促進、改善、進行、加速、またはその他の方法での進行を指すことができる。

【0053】

さらに、本発明の態様は、ドライアイを治療する方法に向けられる。「ドライアイ」という用語は、涙および眼の表面（角膜、結膜、眼瞼を含む）の多因子性疾患が、“The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Guidelines from the 2007 International Dry Eye Work Shop,” Ocul Surf 2007, 5 (2): 75-92)によって定義されているように、不快感、視覚障害、涙膜の不安定性の症状を引き起こし、眼の表面に損傷を与える可能性があることを指す。ドライアイは、涙膜の浸透圧の増加および眼の表面の炎症を伴う可能性がある。ドライアイには、ドライアイ症候群、乾性角結膜炎（KCS）、機能不全性涙症候群、涙液性角結膜炎、蒸発性涙液欠乏症、水性涙液欠乏症、およびレーシック誘発性神経栄養性上皮症（LNE）が含まれる。

10

20

30

40

50

【0054】

「対象」または「患者」という用語は、本発明の態様を、例えば、実験的、診断的、予防的、および／または治療的目的で投与することができる任意の生物を指すことができる。本開示の化合物が投与され得る典型的な対象は、哺乳動物、特に霊長類、特にヒトであろう。獣医用途には、例えば、ウシ (cattle)、ヒツジ、ヤギ、ウシ (cow)、ブタなどのような家畜、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウなどのような家禽、ならびに飼育動物、特にイヌおよびネコのようなペットなどの、多種多様な対象が適しているであろう。診断または研究用途には、齧歯類 (例えば、マウス、ラット、ハムスター)、ウサギ、霊長類、および近交系ブタなどのブタなどを含む、多種多様な哺乳動物が適切な対象であろう。「生体対象」という用語は、上記の対象または生きている別の生物を指す。「生体対象」という用語は、生体対象から切り出された部分 (例えば、肝臓または他の臓器) だけではなく、対象または生物全体を指すことができる。

10

【0055】

本明細書で使用される場合、化合物の「薬学的に許容され得る誘導体」には、それらの塩、エステル、エノールエーテル、エノールエステル、アセタール、ケタール、オルトエステル、ヘミアセタール、ヘミケタール、酸、塩基、溶媒和物、水和物またはプロドラッグが含まれ得る。そのような誘導体は、そのような誘導体化のための既知の方法を使用して、当業者によって容易に調製することができる。生成された化合物は、実質的な毒性作用なしに動物またはヒトに投与することができ、薬学的に活性であるか、またはプロドラッグである。

20

【0056】

本明細書で使用される「製剤」は、製品仕様および／または使用条件を含む、特定の最終用途に最適な特性を提供するために選択された化合物、混合物、または溶液の成分の任意のコレクションを指すことができる。製剤という用語は、液体、半液体、コロイド溶液、分散液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、ならびに水中油型エマルジョンおよび油中水型エマルジョンを含むナノエマルジョン、ペースト、粉末、ならびに懸濁液を含むことができる。本発明の製剤はまた、担体、賦形剤、結合剤および充填剤などの他の非毒性化合物とともに含まれ得るか、または包装され得る。具体的には、本発明の実施に使用するために企画される許容される担体、賦形剤、結合剤および充填剤は、化合物を経口送達に適合させ、および／または本発明の製剤が商業的に許容され得る貯蔵寿命を示すように安定性を提供するものである。

30

【0057】

「投与する」という用語は、硝子体内、眼内、経眼、網膜下、髄腔内、静脈内、皮下、経皮、皮内、頭蓋内、局所などの投与を使用して、治療有効量の製剤または医薬組成物を対象に提供することを指すことができる。本発明の製剤または医薬化合物は、単独で投与することができるが、選択された投与経路および標準的な医薬慣行に基づいて選択される他の化合物、賦形剤、充填剤、結合剤、担体または他のビヒクルとともに投与することができる。

【0058】

実施形態において、組成物は、「経眼的」に、または「経眼投与」によって投与される。本明細書で使用される場合、「経眼投与」は、注射を伴わない、眼への局所投与を指すことができる。経眼投与の非限定的な例には、溶液 (点眼薬)、ゲル、軟膏、およびコロイド状剤形 (ナノ粒子、ナノミセル、リポソーム、およびマイクロエマルジョン) の導入が含まれる。経眼投与は当技術分野でよく知られている (例えば、参照により本明細書に組み込まれる Gaudana et al., 2010, "Ocular Drug Delivery" AAPS J. 12 (3): 348-360 を参照されたい)。

40

【0059】

実施形態において、組成物は、「局所的に」、または「局所投与」によって投与される。「局所投与」という用語は、眼の表面などの効果の位置に関係なく、身体の局所領域または身体部分の表面への組成物の適用を指すことができる。局所投与の典型的な部位には

50

、皮膚または粘膜の部位が含まれる。

【0060】

投与は、注射可能な溶液、局所的な溶液、または眼の溶液などの担体またはビヒクルを介して行うことができる。好適な溶液には、滅菌水溶液もしくは非水溶液を含む注射可能な溶液、または生理食塩水；クリーム；ローション；カプセル；錠剤；顆粒；ペレット；粉末；懸濁液、エマルジョン、もしくはマイクロエマルジョン；パッチ；ミセル；リポソーム；小胞；マイクロインプラントを含むインプラント；点眼薬；他のタンパク質およびペプチド；合成ポリマー；ミクロスフェア；ナノ粒子などが含まれるが、これらに限定されない。

【0061】

実施形態において、組成物および製剤は、対象の眼の表面などへの局所投与のための溶液、懸濁液および他の剤形として製剤化されるであろう。水溶液は、製剤化の容易さ、生物学的適合性（特に、治療される疾患、例えば角膜疾患および傷害を考慮して）、ならびに冒された眼の表面に溶液を1滴以上滴下することによってそのような組成物を容易に投与する患者の能力に基づいて使用することができる。しかしながら、組成物はまた、懸濁液、粘性もしくは半粘性のゲル、または他のタイプの固体もしくは半固体の組成物であり得る。水に溶けにくい組成物には懸濁液が好ましい場合がある。

【0062】

本明細書で使用される場合、「局所点眼薬」という用語は、液体、ゲル、または軟膏として、組成物を対象の角膜外面に投与することを指すことができる。「液滴体積」という用語は、液滴に似ている眼科的に許容される液体の量を指すことができる。例えば、液滴体積は、約5 μL ～ 約1000 μL 、例えば、約5 μL ～ 約500 μL 、例えば、約5 μL ～ 約200 μL に対応する液体の体積を指すことができる。実施形態では、液滴体積は、約20 μL を含むことができる。

【0063】

製剤または医薬組成物はまた、グルコース、ラクトース、アカシアガム、ゼラチン、マンニトール、キサンタンガム、イナゴマメガム、ガラクトース、オリゴ糖および／または多糖類、デンプンペースト、三ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、スターチフラグメント、ケラチン、コロイド状シリカ、ジャガイモデンプン、尿素、デキストラン、デキストリンなどを含むがこれらに限定されない、薬学的に許容される担体、賦形剤、結合剤および充填剤などの他の非毒性化合物を含むか、または包装することができる。具体的には、本発明の実施に使用するための薬学的に許容される担体、賦形剤、結合剤、および充填剤は、本発明の化合物を硝子体内送達、眼内送達、経眼送達、網膜下送達、髄腔内送達、静脈内送達、皮下送達、経皮送達、皮内送達、頭蓋内送達、局所送達などに適合させるものである。さらに、包装材料は、プラスチックポリマーまたはシリコンなど、生物学的に不活性であるか、または生物活性を欠くことができ、一緒に包装および／または送達される組成物／製剤の有効性に影響を与えることなく、対象によって内部で処理することができる。

【0064】

本発明の製剤の異なる形態は、異なる個体および単一の個体の異なるニーズの両方に適応するために調整することができる。実施形態では、対象は、1つ以上の角膜病変に罹患している個体であり得る。例えば、対象は、ドライアイ症候群、乾性角膜結膜炎（KCS）、機能不全性涙症候群、涙液性角膜結膜炎、蒸発性涙液欠乏症、水性涙液欠乏症、レーシック誘発性神経栄養性上皮症（LNE）眼ヘルペス、スティーブンス・ジョンソン症候群、虹彩角膜内皮症候群、翼状片、様々な要因による角膜の損傷、例えば、物理的／化学的刺激、アレルギー、細菌／真菌／ウイルス感染、よって引き起こされる角膜炎、角膜潰瘍、角膜傷害、ドライアイ（DED）、羞明、神経障害性疼痛、ドライアイ様疼痛、角膜神経栄養性潰瘍、外傷、角膜創傷、神経栄養性角膜炎、またはそれらの組み合わせ、を有する個体であり得る。

【0065】

本明細書で使用される「治療有効量」という用語は、治療される疾患もしくは状態の1つ以上の症状をある程度緩和する、および／または治療される対象が発症する、または発症するリスクのある状態もしくは疾患の1つ以上の症状をある程度予防する、投与される組成物または医薬組成物の実施形態のその量を指すことができる。本明細書で交換可能に使用される場合、「対象」、「個体」、または「患者」は、脊椎動物、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）を指すことができる。哺乳動物には、ネズミ、サル、ヒト、家畜、スポーツ動物、およびペットが含まれるが、これらに限定されない。「ペット」という用語は、イヌ、ネコ、モルモット、マウス、ラット、ウサギ、フェレットなどを含むことができる。家畜という用語は、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ブタ、ウシ、ロバ、ラマ、アルパカ、七面鳥などを含むことができる。

10

【0066】

治療上有効な用量は、当業者に知られている多くの要因に依存する可能性がある。用量は、活性成分の薬力学的特性、およびその様式および投与経路；有効成分の投与時間；治療される対象またはサンプルの同一性、サイズ、状態、年齢、性別、健康、および体重；症状の性質および程度；同時治療の種類、治療の頻度、および望ましい効果；ならびに排出率などの既知の因子によって変動し得る。これらの量は、当業者が容易に決定することができる。

【0067】

本明細書で使用される場合、「眼科的に有効な量」は、患者に投与されると、角膜疾患もしくは角膜傷害、またはそれらに関連する状態を予防、治療または改善する組成物もしくは医薬組成物の実施形態の量を指すことができる。一例として、「ドライアイを治療するための有効量」は、患者に投与されたときに、ドライアイの疾患もしくは障害、またはそれに関連する状態を予防、治療または改善する量を指すことができる。

20

【0068】

「薬学的に許容される賦形剤」、「薬学的に許容される希釈剤」、「薬学的に許容される担体」、または「薬学的に許容されるアジュバント」は、安全であり、非毒性であり、生物学的にも望ましくないものでもない医薬組成物を調製するのに有用な賦形剤、希釈剤、担体、および／またはアジュバントを指すことができ、獣医用および／またはヒト用医薬品の使用に許容される賦形剤、希釈剤、担体、およびアジュバントを含むことができる。本明細書で使用される「薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、担体および／またはアジュバント」は、1つ以上のそのような賦形剤、希釈剤、担体、およびアジュバントを含むことができる。

30

【0069】

「医薬組成物」または「製剤」は、哺乳動物、特にヒトなどの対象への投与に適した組成物または医薬組成物を含むことができ、活性剤または成分と薬学的に許容される担体または賦形剤との組み合わせを指すことができ、組成物を、インビトロ、インビボ、もしくはエクスピボでの診断的、治療的、または予防的使用に適したものに作る。医薬組成物は、経眼投与などの意図された投与経路、および開業医が望む効果と適合性があるように製剤化することができる。

【0070】

実施形態では、医薬組成物は、治療有効量のR v D 6異性体および治療有効量の1つ以上の追加の活性剤を含むことができる。そのような医薬組成物（すなわち、R v D 6異性体および追加の活性剤）は、組み合わせ組成物と呼ぶことができる。適切な追加の活性剤には、1つ以上の抗酸化剤、抗アレルギー剤、抗炎症剤、抗ウイルス剤、抗菌剤、鎮痛剤、保湿剤、潤滑剤、または解熱剤が含まれるが、これらに限定されない。例えば、1つ以上の抗酸化剤は、合成抗酸化剤、天然抗酸化剤、またはそれらの組み合わせであり得る。実施形態では、抗酸化剤は、R v D 6異性体の二重結合を保護することができる。

40

【0071】

「医薬組成物」は無菌であり得、対象内で望ましくない応答を誘発する可能性のある汚染物質がないことが可能である（例えば、医薬組成物中の化合物は、医薬グレードである

50

）。医薬組成物は、経口、局所、静脈内、頬側、直腸、非経口、腹腔内、皮内、気管内、筋肉内、皮下を含む多くの異なる投与経路を介して、ステント溶出装置、カテーテル溶出装置、血管内バルーン、吸入などによって、それを必要とする対象または患者に投与するように設計することができる。

【0072】

「投与」という用語は、本開示の組成物を対象に導入することを指すことができる。組成物の1つの投与経路は局所投与である。別の投与経路は経眼投与である。実施形態において、組成物は、眼の表面に投与することができる。しかしながら、経口、静脈内、皮下、腹膜、動脈内、吸入、膣、直腸、鼻、脳脊髄液への導入、静脈もしくは動脈のいずれかの血管内、または体の区画への点滴注入などの任意の投与経路を使用することができる。

10

【0073】

実施形態では、組成物は1時間ごとに投与される。例えば、組成物は、約1時間ごと、約2時間ごと、約3時間ごと、約4時間ごと、約5時間ごと、約6時間ごと、約8時間ごと、約10時間ごと、約12時間ごと、約16時間ごと、約18時間ごと、約20時間ごと、または約24時間ごとに連続的に投与される。

【0074】

実施形態では、組成物は毎日投与することができる。例えば、組成物は、毎日、約2日ごと、約3日ごと、約5日ごと、または約7日ごとに投与することができる。

【0075】

実施形態では、組成物は毎週投与することができる。例えば、組成物は、約毎週、約10日ごと、約2週間ごと、約18日ごと、約3週間ごと、または約25日ごとに投与することができる。

20

【0076】

実施形態では、組成物は毎月投与することができる。例えば、組成物は、約毎月、約2か月ごと、約3か月ごと、約4か月ごと、約5か月ごと、約6か月ごと、約7か月ごと、約8か月ごと、約9か月ごと、約10か月ごと、約11か月ごと、または約12か月ごとに投与することができる。実施形態では、組成物は、1年に1回、または1年に2回以上投与することができる。

【0077】

実施形態では、組成物は、角膜病変の症状が最初に現れたときに投与することができ、症状が軽減または軽減したとき、または症状が軽減または軽減した後の期間、組成物の投与を中止することができる。

30

【0078】

投与の頻度は、使用される製剤、治療または予防される特定の状態、および患者／対象の病歴によって変動し得る。一般に、効果的な治療を提供するのに十分な最小用量を使用することが好ましい。本明細書に記載の角膜病変など、治療または予防される状態に適した定量的または試験方法を使用して、治療の有効性について患者を監視することができ、それは当業者に日常的である。

【0079】

実施形態において、投与される組成物の投与量は、約10 ng～約1000 ngを含む。例えば、投与される組成物の投与量は、約20 ng～約500 ng、例えば、約50 ng～約100 ngであり得る。実施形態において、投薬量は、約50 ng～約80 ngを含むことができる。

40

【0080】

本明細書で使用される場合、「治療」および「治療すること」は、状態、疾患または障害と闘う目的で、疾患または障害の症状のうちの1つ以上が改善されたか、または他の方法で有益に変化する任意の方法で、対象者の管理およびケアを指すことができる。この用語は、症状もしくは合併症を軽減または緩和する；状態、疾患または障害の進行を遅らせる；状態、疾患もしくは障害を治癒または排除する；および／または状態、疾患もしくは障害を予防する目的での活性化化合物の投与など、患者が苦しんでいる所与の状態に対する

50

治療の全範囲を含むことができ、「予防すること」または「予防」は、状態、疾患または障害の発症を妨げることを目的とした患者の管理およびケアを指し、症状もしくは合併症の発症のリスクを予防または低減するための活性化化合物の投与を含むことができる。

【0081】

治療される患者は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。治療はまた、本明細書で提供されるような疾患を治療するための使用など、本明細書での組成物の任意の医薬使用を包含する。

【実施例】

【0082】

実施例は、本発明のより完全な理解を促進するために以下に提供される。以下の実施例は、本発明を作製および実施する例示的な様式を例示する。しかしながら、本発明の範囲は、これらの実施例に開示されている特定の実施形態に限定されず、代わりの方法を使用して同様の結果を得ることができるため、例示のみを目的としている。

【0083】

実施例 A

ドコサノイドシグナル伝達は、角膜神経再生、涙分泌、創傷治癒、および神経因性疼痛への影響を調節する。

角膜は、主に三叉神経節 (TG) の眼神経枝の感覚神経によって密に神経支配されている。これらの神経は角膜の恒常性を維持するために重要であり、神経損傷は、創傷治癒の低下、角膜潰瘍および乾燥眼疾患 (DED) の増加、ならびに神経障害性疼痛につながる可能性がある。糖尿病、老化、ウイルス感染および細菌感染などの病変、ならびに視力を矯正するためのコンタクトレンズおよび手術の長期使用は、神経損傷を引き起こす可能性がある。DED (多機能性疾患) を軽減する効果的な治療法はなく、 ω -3 補給を使用したいくつかの臨床試験では、不明確で時には否定的な結果が示されている。角膜神経損傷の動物モデルを使用して、本発明者らは、角膜を色素上皮由来因子 (PEDF) とドコサヘキサエン酸 (DHA) で処理すると、神経再生、創傷治癒、および涙分泌が増加することを示す。このメカニズムには、カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 (iPLA2 γ) の活性化が含まれ、これにより、組み込まれた DHA がリン脂質から放出され、ドコサノイドであるニューロプロテクチン D1 (NPD1) および新しいレゾルビン立体異性体 RvD6 の合成が促進される。NPD1 は、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経成長因子 (NGF)、およびセマフォリン 7A (Sema7A) の合成を刺激する。傷害した角膜の RvD6 治療は、TG の遺伝子発現を調節し、神経新生の亢進、神経障害性疼痛の減少および感受性の増加をもたらす。まとめると、これらの結果は、角膜の恒常性を再確立するための治療組成物および方法を検証する。

【0084】

角膜の解剖学

透明な角膜は、光を通過させて網膜に投射することにより、ヒトの眼の屈折力の 70 % を占める。さらに、角膜は、免疫応答を調節し、病原体が眼球に侵入するのを防ぐための重要な障壁にもなる。解剖学的に、角膜は、上皮、ボーマン層、間質または実質固有層、デスメ膜、および内皮の 5 つのサブレイヤーに分割できる (1、2) (図 13 パネル A)。

【0085】

上皮は、角質化されていない扁平上皮細胞の 5 ~ 7 層で構成され、表層上皮細胞、中間翼細胞、および増殖率の高い最も内側の基底上皮細胞の 3 つの形態学的細胞タイプに分類される (2)。ほこり、水、バクテリアなどの異物の眼への通過を遮断し、酸素および細胞栄養素を吸収する滑らかな表面を提供する、密着結合によって、上皮細胞は接続されている。さらに、上皮の最外層は涙膜と接触しているため、眼の表面の水分を維持し、乾燥による損傷 (ドライアイ、DE) から保護する。角膜上皮細胞は、角膜輪部上皮から基底層への幹細胞の移動を伴う「ターンオーバー」を定期的に受ける。これらの基底細胞は表面に向かって移動し、2 ~ 3 層の翼細胞を生成し、次いで、最終的な分化と落屑を開始す

る。平均して、ヒト角膜上皮細胞のターンオーバー時間は7～10日である(3)。

【0086】

ボーマン層は、上皮を間質から分離する薄い無細胞層である。主にコラーゲンIVおよびラミニンが含まれている。これらのタンパク質の構成は、組織の透明性を維持するために重要である。

【0087】

間質層は、静止状態の角膜実質細胞と、ラメラと呼ばれる高度に秩序化されたコラーゲンタイプ1フィブリルとプロテオグリカンで主に構成されるよく組織化された細胞外マトリックス(ECM)で構成され、また、角膜の最大部分(角膜の厚さの約90%)を構成する。間質は、散乱を防ぐ方法でコラーゲン原線維を通る光の通過を促進することにより、角膜への構造的サポートおよび透明性を提供する。角膜実質細胞(コラーゲン線維の間に位置する平らな細胞)は、角膜実質の主要な固有細胞である。

【0088】

デスメ膜は、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンIVおよびVII、ならびにプロテオグリカンで構成される内皮によって合成された無細胞の薄層である。デスメ膜の損傷は、角膜浮腫および視力喪失を引き起こす。

【0089】

角膜の最後の層は、房水と接触している内皮である。これは、角膜実質の脱水を調節するために体液を汲み上げる役割を担う細胞の単層である。内皮ポンプがないと、間質浮腫が発生し、不透明感および視力低下を引き起こす。ヒトの角膜内皮細胞は増殖能力が非常に低く、加齢に伴う細胞密度の低下をもたらす。

【0090】

角膜の重要な特徴は、その密な神経支配である(図13パネルB)。ほとんどの角膜神経線維は感覚神経起源であり、主に三叉神経節(TG)の眼神経枝のニューロンに由来する(4～6)。解剖学的に、角膜神経ネットワークは、間質神経が放射状に角膜輪部に入るときに発生する。角膜の透明性を維持するために、到着する神経はミエリン鞘を失い、シュワン細胞だけに囲まれている。間質では、太い枝が小さな神経枝に分かれている。ほとんどの枝は周辺のボーマン層を貫通し、上皮の中心に伸びて上皮神経ネットワークを形成し(図13パネルC)、神経終末の密なネットワークに生命を与える。

【0091】

角膜神経は涙分泌およびまばたきを刺激して、眼の表面の完全性を維持する(7)。角膜神経支配の変化は、加齢、糖尿病、関節リウマチおよびシェーグレン症候群などの免疫疾患、ウイルスおよび細菌感染、コンタクトレンズの長期使用、ならびにレーザーインサイチュ角膜切除術(LASIK)および光屈折角膜切除術(PRK)などの屈折矯正手術で発生する(8～13)。神経損傷による合併症は、感受性を低下させ、涙分泌およびまばたきを減少させ、その結果、重症の場合に神経障害性疼痛および角膜潰瘍を引き起こすDE疾患(DEE)を引き起こす。感覚神経が豊富であるため、角膜は人体における疼痛の強力な発生源でもある。

【0092】

角膜関連の損傷に対するPEDF+DHA治療。レゾルビンD6立体異性体の発見。

前述のように、損傷後、角膜神経密度はゆっくりと不完全に回復し、感受性およびDE症状が低下した。本発明者らの研究室の研究では、神経成長因子(NGF)をω-3脂肪酸ドコサヘキサエン酸(DHA)と組み合わせて使用すると、ウサギでの実験的PRK後の角膜神経密度の回復が速くなることが示されている(14)。当時、このメカニズムは、強力な抗炎症作用および神経保護作用を持つドコサノイドであるDHA由来の脂質メディエーターであるニューロプロテクチンD1(NPD1)によって媒介される可能性があった(15)。網膜色素上皮(RPE)細胞でのNPD1の合成は、いくつかの成長因子によって刺激され、色素上皮由来因子(PEDF)はNGFよりも10倍強力である(16)。PEDFは、血管新生、神経細胞の生存、および細胞分化に関連するプロセスを調節する、広範囲に作用する神経栄養および神経保護因子であり(17)、傷害後に角膜上

10

20

30

40

50

皮から放出される（18）。その後の研究では、PEDF+DHAによる治療は、実験的手術のウサギおよびマウスの角膜モデル、ならびに糖尿病および単純ヘルペスウイルス（HSV1）感染などの病変において、炎症を軽減し、角膜創傷治癒および神経再生を刺激することが示されている（19～23）。この行動には、PEDFおよびDHAの両方による治療が必要である（19）。PEDFの44アミノ酸フラグメントは神経保護活性を持ち、一方、隣接する34アミノ酸ペプチドは抗血管新生活性を持っている（24、25）。角膜実質解剖のウサギモデルで、2つのペプチドの効果をPEDFタンパク質全体およびDHAと比較すると、本発明者らは、34-mer-PEDFとは異なり、44mer-PEDF+DHAは炎症を軽減し、涙分泌および角膜感受性を増加させ、また、PEDF受容体（PEDF-R）を活性化することにより角膜神経の再生を促進することを見出した（21）。この膜貫通型受容体は、角膜で発現し、DHAを放出するカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2（iPLA ζ ）活性を持ち（26、27）、DHA補給による膜リン脂質のsn-2位置に豊富に存在する。

10

20

30

40

50

【0093】

子牛の角膜に関する研究では、組織内の主要なリン脂質としてホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、およびスフィンゴミエリンが特定された（28）。これらのリン脂質の中で、PCは最も豊富で、上皮に最も多く含まれている。同様の観察結果がヒト（29）およびウサギの角膜（30）で報告された。ウサギでは、オレイン酸（18：1）は、すべての角膜層のリン脂質中でエステル化された主要な脂肪酸（リン脂質の総脂肪酸の約50%）であり、これにパルミチン酸（16：0）が続き、約16～18%含む。リン脂質中でエステル化された多価不飽和脂肪酸（PUFA）に関しては、高い割合（総脂肪酸の約9%）がアラキドン酸（AA）に対応するが、リン脂質中でエステル化されたエイコサペンタエン酸（EPA）およびDHAの割合ははるかに低い（総脂肪酸の約1.6%）（30）。

【0094】

間質神経が損傷したマウス角膜のDHA局所治療は、18：1-DHAを含むPCおよびPE分子種における脂肪酸の急速な取り込みをもたらした（27）、このことは、PUFAの添加が脂質膜組成物中のDHAの有意な濃縮をもたらしたことを実証している（図14パネルA）。

【0095】

組織の損傷は、AA、EPA、DHAなどのPUFAをsn-2位置から放出するホスホリパーゼA2を活性化する（31、32）。本発明者らの研究室および他の研究室からのいくつかの初期の研究は、角膜が傷害に反応し、シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）の活性化によってプロスタグランジン（PG）の合成（33～36）、ならびにリポキシゲナーゼ（LOX）の活性化によってヒドロキシエイコサテトラエン酸（HETE）およびリポキシンA₄（LXA₄）の合成（37～39）を増加させることを実証した。膜脂質中のDHAの濃度は非常に低いため（図14パネルA）および（30）、本発明者らは、PEDFで処理された角膜へのDHAの添加が、強力な抗炎症作用を有するDHAの脂質誘導体（ドコサノイド）の合成を増加させるために重要であることを見出した（19、40、41）。したがって、角膜をPEDF+DHAで処理することによってPEDF-RのiPLA ζ を活性化すると、角膜から放出される遊離DHAが3000倍より多く増加する（図14パネルB）。

【0096】

遊離DHAは、次に、より安定したヒドロキシDHA誘導体（HDHA）に急速に変換される14-および17-ヒドロペルオキシDHA（HpDHA）の合成の基質になる（図14パネルB）。これらの結果により、PEDF+DHA処理がDHAに由来するドコサノイドの形成を刺激することを確認した。

【0097】

図15は、AA、EPA、およびDHAから生じる生物活性脂質のスキームを示す。多くのAA脂質メディエーターおよび一部のEPA脂質メディエーターは強力な炎症誘発性

を有するが、すべての既知のDHAメディエーター（ドコサノイド）は炎症を保護および解決するように作用する（42、43）。それらは、NPD1およびその他のプロテクチン、マレシン、およびDシリーズのレゾルビン（43）、ならびにプロテクチン（PCTR）、マレシン（MCTR）およびレゾルビン（RCTR）のより新しいスルフィドコンジュゲートを含む、ファミリーで命名された特殊のプロレゾルビンメディエーター（SPM）の一部を構成する。SPMを生成する合成メカニズムには、リポキシゲナーゼ（一次触媒としての15-LOXおよび二次触媒としての5LOXを含む）、シクロオキシゲナーゼ（アスピリンの存在下）、およびシトクロムP450酵素が含まれる（44）。DHA脂質メディエーターのシグナル伝達メカニズム、特にそれらの受容体の同定に関する情報はまだ限られている（表1）。既知の受容体のほとんどは、Gタンパク質共役型受容体のファミリーに属している。さらに、いくつかのドコサノイドは同じ受容体を共有しているが、それらの活性化は特定の生物学的活性を発揮する（43）。

10

【0098】

（表1）ドコサノイドの報告された受容体のリスト

名称	受容体	参考文献	角膜での発現
レゾルビン D1	ALX/FPR2、GPR32	(44)	あり
レゾルビン D2	GPR18(DRV2)	(45)	判定せず
レゾルビン D3	ALX/FPR2、GPR32	(46)	あり
レゾルビン D4	該当なし	-	-
レゾルビン D5	GPR32	(47)	判定せず
レゾルビン D6	該当なし	-	-
ニューロプロテクチン D1	GPR37(Pael-R)	(48)	判定せず
マレシン 1	LGR6	(49)	判定せず
マレシン 2	該当なし	-	-

20

【0099】

本発明者らは、RvD6i（図16）と呼ばれるレゾルビンD6（RvD6）の立体異性体である新しいドコサノイドを発見した。これは、傷害およびPEDF+DHAによる治療後にマウスの涙で放出される（40）。この新しい脂質のフラグメンテーションパターンは、RvD6と一致する少なくとも6つの一致するプロダクトイオンを示している。レゾルビンD6はいくつかの組織で発見されており、健康な個体の血漿での研究では、RvD6が加齢とともに減少するバイオマーカーであることが示された（50）。RvD6は、ヒトの歯根膜から分離された幹細胞からも放出され、これは組織の再生に重要である（51）。しかし、RvD6は正常なヒトの涙では検出されない（52）。PEDF+DHAおよびRvD6による治療と比較して、新しいRvD6iは角膜の創傷治療および感受性を促進し、より高い生物活性を実証した（図16パネルAおよびB）。

30

【0100】

ドライアイ疾患に対するDHAの使用。

40歳を超える成人の5%~40%がDEDに冒され（53、54）、米国では推定1,640万人が冒されている（55）。最近のドライアイワークショップ（DEWS II）では、ドライアイは「涙膜の恒常性の喪失を特徴とし、涙膜の不安定性および高浸透圧、眼の表面の炎症および損傷、ならびに神経感覚異常が病因的役割を有する眼の症状を伴う、眼の表面の多因子性疾患」と定義された（54）。

40

【0101】

過去10年以内に、ω-3脂肪酸DHAおよびEPA補給を使用した様々な病因のDED患者の臨床試験が数多く行われ、食事性脂肪酸は涙腺と血漿リン脂質に組み込まれる可能性があるという議論があった（56）。しかし、DEDにおけるPUFA補給の効果は

50

物議を醸している。いくつかの研究は改善を示したが、他の研究はわずかな効果を示した。表 2 に、過去 10 年間に実施された、様々な病因の D E D を治療するために D H A による補給が使用された臨床試験をまとめた。

【 0 1 0 2 】

(表 2) ω-3 F A 治療を使用した D E D の過去 10 年間の臨床試験の要約

試験	患者数/治療	ランダム化	マスキング	効果	コメント
Brignole-Baudouin et al.,2011(57)	ドライアイ、n=127、時間=90 日 群 1、n=61 142.5mg の EPA、95mg の DHA、および補給、1 日 3 回 群 2、n=66 プラセボ、中鎖トリグリセリド、1 日 3 回	あり/あり	ダブル	大きな影響はない	治療群では、HLA-DR 陽性細胞の割合の減少のみが検出された。
Wojtowicz et al.,2011(58))	ドライアイ、n=36、時間=90 日 群 1 450mg の EPA および 300mg の DHA および 1000mg の亜麻仁油、1 日 1 回 群 2 プラセボ、小麦胚芽油	あり/あり	二重	大きな影響はない	涙液の蒸発に変化はない。
Bhargava et al.,2013(59)	ドライアイ、n=528、時間=3 か月 群 1、n=264 325mg の EPA および 175mg の DHA、1 日 2 回 群 2、n=254 プラセボ、1 日 2 回	あり/あり	ダブル	改善	
Kangari et al.,2013(60)	ドライアイ、n=64、時間=30 日 群 1、n=33 180mg の EPA および 120mg の DHA、1 日 2 回 群 2、n=31 プラセボ、中鎖トリグリセリド	あり	ダブル	わずかに改善	
Olenik et al.,2013(61)	マイボーム腺機能不全、n=64、時間=3 か月 群 1、n=33 Brudysec(350mg の DHA、42.5mg の EPA、30mg の DPA)、1 日 3 回 群 2、n=31 プラセボ、500mg のひまわり油、1 日 3 回 すべての患者は、中性のベビーシャンプー、および防腐剤を含まない人工涙で、眼瞼縁の洗浄を受けた。	あり/なし	ダブル	わずかに改善	プラセボと角膜染色に大きな差はない。
Ong et al.,2013(62)	健康な光屈折角膜切除術(PRK)患者、n=18、時間=6 週間 群 1、n=9 250mg の EPA および DHA)、333mg の亜麻仁油、および 6IU のビタミン E、1 日 3 回 群 2、n=9 対照	あり/あり	シングル	改善	治療は PRK 手術の 2 週間前から、手術後 1 か月までであった。

10

20

30

40

50

Sheppard et al.,2013(63)	ドライアイの 閉経後の女性、n=38、 時間=6 か月 群 1、n=19 49mg の ALA、31.5mg の EPA、3.75mg の DPA、 25 mg の DHA、177.5mg の LA、60mg の GLA、<0.75 AA、および補給、1 日 4 回 群 2、n=19 プラセボ	あり/あり	ダブル	改善	プラセボ治療はまた、補給治療と比較した場合、HLA-DR 強度を 36%±9%増加させ、CD11c を 34%±7%増加させた。
Olenik et al.,2014(64)	ドライアイ、n=905、時間=12 週間 Brudysec(350mg の DHA、42.5mg の EPA、30mg の DPA)、1 日 3 回。 プラセボの対照なし	なし/なし	なし	改善	合計 68.1%の患者が、治療後のコンタクトレンズに対する耐性が高いと報告した。
Georgakopoulos et al.,2015(65)	ドライアイの 糖尿病患者、時間=3 か月 群 1、n=36 170mgEPA および 115mgDHA、1 日 3 回	なし/なし	なし	改善	
Bhargava et al.,2015(66)	コンピューター関連のドライアイ、 n=456、時間=3 か月 群 1、n=220 180mg の EPA および 120mg の DHA、 1 日 2 回 群 2、n=236 オリーブオイルを含むプラセボ、1 日 2 回 ベースライン-T0 1 か月の治療-T1 2 か月の治療-T2 3 か月の治療-T3	あり/あり	ダブル	改善	
Deinema,2017 (67)	ドライアイ、n=54、時間=3 か月 群 1、 n=18 オキアミオイル(945mg/日の EPA+510mg/日の DHA) 群 2、n=19 魚油(1000mg/日の EPA+500mg/日の DHA) 群 3、n=17 プラセボ(オリーブオイル、1500mg/日)	あり/あり	ダブル	わずかに改善	オキアミと魚油の両方が緩和され、ドライアイの症状が軽減される。 炎症性サイトカインであるインターロイキン 17A は、オキアミ油群で 90 日目にのみ大きく減少した。
Goyal et al.,2017(68)	レーシック患者、n=60、時間=12 週間 群 1、n=30 180mg の EPA および 120mg の DHA、 1 日 4 回 群 2、n=3 プラセボ	あり/あり	ダブル	わずかに改善	リサミンによる結膜染色のある眼は少なかった。

10

20

30

40

50

DREAM,2019 (69)	ドライアイ、n=499、時間=12 か月 群 1、 n=329 400mg の EPA および 200mg の DHA、 1 日 5 回 群 2、n=170 プラセボ、精製オリーブオイル 1000mg、 1 日 5 回	あり/あり	ダブル	大きな 影響は ない	赤血球中の EPA および DHA が大幅に増加した。
Fogt et al.,2019(70)	ドライアイ、n=19、時間=1 時間 薬物 1、 n=19 <u>Refresh Optive および Omega3、亜麻仁油</u> <u>薬物 2、n=19</u> <u>Refresh Optive</u> <u>薬物は 2 つの異なる訪問のために</u> <u>ランダムに選ばれる(2 日以上の間)</u>	あり/あり	ダブル	改善 (短 時間)	脂質層の厚さ(LLT)は、両方 の治療について 15 分で ベースラインから増加した。 <u>Refresh Optive および Omega3</u> <u>の患者だけが、点眼後 1 時間</u> <u>まで LLT が高かった。</u>

10

下線は、局所点眼薬を使用した臨床試験を示している。

【0103】

329 人が EPA および DHA の 12 か月の補給を受け、170 人の患者がプラセボとして精製オリーブオイルで治療された、合計 499 人の患者を含んだ、最も重要な試験の 1 つである DREAM 研究 (69) は、改善が見られなかったことを示した。この研究は、DED の治療における DHA の利点についての疑念を高める。このため、このレビューでは、本発明者らは、DHA 補給の結果を説明する、可能性のある問題を指摘する。

20

【0104】

1 つの懸念は DHA 補給の形態である。ほとんどの研究では、天然の濃縮魚油を採用した。しかし、魚油組成の分析は、PUFA が主にトリグリセリドでエステル化されていることを示した。食事からの DHA は、主に PC である膜リン脂質の sn-2 位置でエステル化される前に、肝臓に取り込まれる必要がある (71)。次に、DHA リン脂質は、血流に放出される前に、超低密度リポタンパク質 (VLDL) または他のリポタンパク質にパッケージ化される (71、72)。したがって、魚油からの DHA または EPA の補給は、眼の表面、特に角膜に到達するのは非常に少ない。これは、主に長鎖 PUFA を有する PC を含むオキアミ油が、魚油よりもラットの血液および脳で高い吸収率を示した以前の研究によって裏付けられている (73)。オキアミオイルを使用して DED を治療する研究は、小規模な臨床試験 (群当たり 18 人の参加者) の 1 つだけであり、ここで Deinema らは、治療の 90 日後の魚油よりもオキアミオイル補給で、低い眼表面疾患指数および IL-17A レベルを示した (67) および表 2。

30

【0105】

さらに、角膜は無血管であることに注意することが重要である。そのため、角膜の細胞膜に食事の脂肪酸が組み込まれる可能性は低い。これは、ラットに経口投与された ¹⁴C 標識 DHA を使用した研究によって裏付けられており、眼のコンパートメントに到達した DHA の割合は非常に少ない (経口投与量の 0.03% 未満) ことが示された (74)。この量のうち、網膜が網膜下血管から DHA の大部分を取り込むため、角膜に入る可能性のある量は非常に少ない。したがって、涙腺での PUFA 濃縮は、角膜での有益な治療を確実にするのに不十分である。

40

【0106】

本発明者らの知る限り、局所 DHA を使用した臨床試験は 1 つだけである ((70) および表 2)。

【0107】

この試験は、AA、DHA、および EPA が DED 患者の涙中に見られ、 $\omega-6$ (AA) : $\omega-3$ (DHA + EPA) の比率が涙膜の機能不全の重症度と相関することを示す、

50

以前の研究に基づいていた（75）。小規模な試験（DHAで局所的に治療された19人の患者）は、オメガ-3脂肪酸を含む点眼薬による治療が、点眼後1時間まで涙膜の脂質層の厚さを増加させることを示した（70）。

【0108】

最後に、本発明者らの動物実験は、DHAが角膜リン脂質、主にPEおよびPCに急速に組み込まれ、神経密度を高めることを示している。神経密度の低下は、神経を再生するためにPEDFおよびDHAの両方を必要とする、DEDにおける十分に実証された変化である。治療はDHAを放出し、RvD6iの合成を刺激し、このドコサノイドは創傷治癒および感受性を高め（図17パネルAおよびB）、理論に拘束されることを望まないが、DHAよりもDEDのよりよい治療的使用である（40）。

10

【0109】

炎症の減少および角膜創傷治癒、神経再生、ならびに涙分泌の増加におけるドコサノイドの有効性は、傷害、感染、糖尿病、角膜血管新生、および移植のいくつかの異なるモデルで明確に実証されている（表3）。これらの結果は、強力な薬物としてのドコサノイドの作用を強調している。

【0110】

（表3）角膜損傷にPEDF+DHAまたはドコサノイドを使用したインビボ試験

20

30

40

50

動物/モデル	ドコサノイド	投与	主な結果
マウス 角膜/輪部境界までの 角膜上皮の除去 2005 (76)	NPD1 17S-HDHA	局所点眼薬、 96 時間にわたり 1 日 3 回	再上皮化の速度が増加 角膜の PMN が増加。 プロ炎症性ケモカイン KC の形成が減少。
マウス 縫合によって誘発 される炎症性角膜血管 新生 2009(77)	RvD1	結膜下注射、 48 時間ごと 時間=14 日	浸潤性好中球およびマクロファージの数が減少、 ならびに TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、VEGF-A、 VEGF-C および VEGFR2 の mRNA 発現レベルが 減少。 縫合糸誘発性または IL-1 β 誘発性の血管新生 (HA)が抑制され、しかしリンパ管新生は 抑制されなかった。
ウサギの実験的 PRK 2010(19)、2012(20)、 2015(21)	PEDF+DHA PEDF ドメイン+DHA	コラーゲン シールドを使用 した局所、週 2 回 時間=8 週間	8 週間の治療群における神経密度および涙分泌の 増加。PEDF+DHA 使用。NPD1 合成は 1 週間で ピークに達し、PEDF+DHA 治療群では対照群 よりも 4 倍高かった。 PEDF の 44mer ドメインは、34mer ドメインより も強力である。
ウサギの実験的 PRK 2013(41)	NPD1	NPD1(33ng/眼)の 局所点眼薬を 1 日 3 回 6 週間	上皮下角膜神経および涙分泌の増加。 治療の 2 日後および 4 日後の好中球浸潤の減少。
マウス角膜 同種移植 2014(78)	RvD1 アナログ	静脈注射	同種感作の減少。 移植部位での血管新生の減少 移植片の生存率の 向上。
マウス 2 型糖尿病 2017(79)	RvD1 RvD1- メチルエステル RvD2- メチルエステル	1ng/g 体重の 8 週間の毎日の 腹腔内注射	失われた糖尿病誘発性角膜神経が減少。 メチルエステルバージョンは、遊離脂肪酸よりも 生物活性が低い。
ウサギ HSV1 角膜感染症 2017(22)	PEDF+DHA	局所点眼薬、1 日 3 回 2 週間。 コラーゲン シールドを使用 した局所、週に 2 回 10 週間超	CD4+T 細胞、好中球およびマクロファージの 7 日でのより強い浸潤、その後 14 日で減少 角膜神経密度は、角膜感覚の機能回復とともに 12 週間で増加。
マウス 1 型糖尿病 直径 2mm の中央領域 内の角膜上皮の 除去 2017(23)	PEDF+DHA	局所点眼薬、 1 日 3 回 14 日間	角膜上皮神経再生、サブスタンス P 陽性神経密度 および涙量の増加。 角膜創傷治癒の促進、選択的に動員された 2 型 マクロファージ、および好中球浸潤の防止。

10

20

30

40

50

マウス 角膜神経切断 2017(27)	PEDF+DHA	局所点眼薬、 1日3回7日間	神経再生と涙分泌が増加。 動作メカニズムには、PEDF受容体(PEDF-R)の ホスホリパーゼ A2 活性が必要である。
マウス1型糖尿病 直径2mmの 中央領域内の角膜 上皮の除去 2018(80)	RvD1	局所点眼薬、 1日4回14日間	角膜上皮の創傷治癒および神経再生を促進。
マウス 直径2mmの中央領域 内の角膜上皮の除去 2020(40)	RvD6i	局所点眼薬、 1日3回12日間	PEDF+DHAのメカニズムの根底にある RvD6i を発見。 角膜創傷治癒、感受性および神経再生の増加。 炎症性および疼痛関連の神経ペプチドが減少、 TGにおけるイオンチャネル遺伝子発現が増加。

10

下線は当研究室の研究を示している。

【0111】

RvD6iは、TGの神経新生および疼痛に関与する遺伝子を調節する。

20

以前の研究では、PEDFおよびDHAによる角膜治療もドコサノイドNPD1の合成を刺激したことが示されている。しかし、合成量はRvD6iよりはるかに少ない(19、40)。傷害した角膜にNPD1を加えると、軸索の成長を刺激するニューロトロフィンNGF、脳由来神経栄養因子(BDNF)、およびセマフォリンA2(Sema7A)の遺伝子発現およびタンパク質レベルが増加する(27)。これらのタンパク質は涙中に分泌され、角膜神経終末の受容体を活性化して、下流のシグナル伝達を促進し、TGのニューロンに逆行する。

【0112】

RNAシーケンスを使用して、マウスの傷害した角膜からのTGの遺伝子発現を分析し、本発明者らは、角膜に局所的に適用されたPEDF+DHAの産物であるRvD6iが、TG、染色体9オープンリーディングフレーム72(C9orf72)、および糖タンパク質MGA(Gpm6A)における2つの興味深い遺伝子の発現を誘導することを明らかにしている(40)。これらの遺伝子は、神経新生および成長円錐の形成を刺激する(81、82)。

30

【0113】

多くの場合、角膜神経を損傷する眼の病変は、神経障害性疼痛を引き起こす(83)。さらに、DEDの症状があり、神経障害性疼痛を経験しているかなりの数の患者が存在する。これは、角膜とTGとの関係が活発であることを示している(84)。RvD6iで治療した角膜では、疼痛に関与する2つの遺伝子が減少した。角膜神経で発現する最も豊富な神経ペプチドの1つであるサブスタンスP(SP)をコードするTac1(4、85、86)、およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)をコードするCalc bである(角膜神経にも豊富)(4、20)(図17パネルC)。両方の神経ペプチドは、神経性の炎症および疼痛に重要な役割を果たす(87、88)。さらに、RvD6iによる角膜治療は、一過性受容体電位メラストチン8(Trmp8)の遺伝子発現を増加させた(図17パネルD)。TRPM8イオンチャネルは、眼の表面の濡れを調節し、慢性的な疼痛に鎮痛効果をもたらすクールなセンサーである(89~93)。前間質のレベルで神経が損傷したマウスモデルでの本発明者らの研究は、角膜TRPM8陽性神経線維が3か月の傷害後に正常密度の50%にしか達しないことを示し、これは、TRPM8の減少がDE様疼痛の一因である可能性があることを示している(94)。したがって、傷害およびRvD6iによる治療後の、SPおよびCGRPの発現の減少、ならびにTRPM8

40

50

の発現の増加は、新しいドコサノイドが角膜を疼痛から保護できることを示している。また、研究により、NGFによる局所治療によって引き起こされる角膜神経再生の増加の副作用として眼の疼痛が示されているため（95）、角膜神経栄養性潰瘍などの眼の表面の損傷を治療するための組成物および方法も提供する。RvD1およびRvD5を使用した研究では、脛骨骨折のマウスモデルにおける疼痛の軽減は示されたが、RvD3およびRvD4は効果がなかった（96）。これらの違いは、その受容体の異なる発現に起因する可能性がある。骨粗鬆症のマウスモデルでは、RvDの前駆体である17R-ヒドロキシDHAは、おそらくAXL受容体の活性化によって疼痛の行動を減少させる（97）。もう1つの重要な発見は、RvD6iがTGにおけるRictorの遺伝子発現の強力な誘導因子であるということである（40）（図17パネルD）。RICTORは、ラパマシ

10

【0114】

PEDFおよびDHAによって刺激されたドコサノイドのシグナル伝達経路の要約スキームを図18に示す。

【0115】

結論

角膜の神経支配は、眼の表面の恒常性および組織の透明度を維持する上で極めて重要な役割を果たす（7）。角膜神経への損傷は、涙の生成およびまばたき反射の減少を引き起こし、上皮の創傷治癒を損ない、透明性および視力の喪失をもたらす可能性がある（8～13）。したがって、角膜神経機能および修復に関するより良い知識は、角膜神経支配に影響を与える病変の治療的戦略を向上させるであろう。理論に縛られることを望まないが、新しいメディエーターRvD6iなどのDHA由来のドコサノイドは、角膜関連の炎症を軽減する治療法である。神経再生を促進し、TGの神経障害性疼痛の構成要素の遺伝子発現を調節するこの脂質の効果は、屈折矯正手術後のDE患者の治療、および角膜神経密度を減少させるいくつかの病変への併用治療における新しい代替手段を提供する可能性がある。将来のヒトの臨床試験は、DEおよび眼の表面の疾患に対するこれらの新しい治療法の最適な投与量、投与方法、有効性、および安全性を検証することである。

20

【0116】

この実施例で引用されている参考文献

30

DelMonte, D. W., and T. Kim. 2011. Anatomy and physiology of the cornea. *J.*

Cataract Refract. Surg. 37: 588–598.

Meek, K. M., and C. Knupp. 2015. Corneal structure and transparency. *Prog.*

Retin. Eye Res. 49: 1–16.

Hanna, C., D. S. Bicknell, and J. E. O'Brien. 1961. Cell turnover in the adult

human eye. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960. 65: 695–698.

40

Müller, L. J., C. F. Marfurt, F. Kruse, and T. M. T. Tervo. 2003. Corneal nerves:

structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76: 521–542.

50

He, J., N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan. 2010. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* 91: 513–523.

Al-Aqaba, M. A., V. K. Dhillon, I. Mohammed, D. G. Said, and H. S. Dua. 2019. Corneal nerves in health and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 73: 100762.

Shaheen, B. S., M. Bakir, and S. Jain. 2014. Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 59: 263–285.

10

He, J., and H. E. P. Bazan. 2012. Mapping the nerve architecture of diabetic human corneas. *Ophthalmology.* 119: 956–964.

Hamrah, P., A. Cruzat, M. H. Dastjerdi, L. Zheng, B. M. Shahatit, H. A. Bayhan, R. Dana, and D. Pavan-Langston. 2010. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study.

Ophthalmology. 117: 1930–1936.

20

Cruzat, A., D. Witkin, N. Baniyadi, L. Zheng, J. B. Ciolino, U. V. Jurkunas, J. Chodosh, D. Pavan-Langston, R. Dana, and P. Hamrah. 2011. Inflammation and the nervous system: the connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52: 5136–5143.

He, J., and H. E. P. Bazan. 2013. Corneal nerve architecture in a donor with unilateral epithelial basement membrane dystrophy. *Ophthalmic Res.* 49: 185–191.

30

Pham, T. L., A. Kakazu, J. He, and H. E. P. Bazan. 2018. Mouse strains and sexual divergence in corneal innervation and nerve regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201801957R.

Garcia-Gonzalez, M., P. Cañadas, J. Gros-Otero, I. Rodriguez-Perez, R. Cañones-Zafra, V. Kozobolis, and M. A. Teus. 2019. Long-term corneal subbasal nerve plexus regeneration after laser in situ keratomileusis. *J. Cataract Refract. Surg.* 45: 966–971.

40

- Esquenazi, S., H. E. P. Bazan, V. Bui, J. He, D. B. Kim, and N. G. Bazan. 2005. Topical Combination of NGF and DHA Increases Rabbit Corneal Nerve Regeneration after Photorefractive Keratectomy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 3121–3127.
- Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, C. N. Serhan, and N. G. Bazan. 2004. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 8491–8496. 10
- Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, S. Barreiro, J. Hu, D. Bok, and N. G. Bazan. 2007. Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 13152–13157.
- Tombran-Tink, J., and C. J. Barnstable. 2003. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat.Rev. Neurosci.* 4: 628–636.
- Kenchegowda, S., J. He, and H. E. P. Bazan. 2013. Involvement of pigment epithelium- derived factor, docosahexaenoic acid and neuroprotectin D1 in corneal inflammation and nerve integrity after refractive surgery. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids PLEFA.* 88: 27–31. 20
- Cortina, M. S., J. He, N. Li, N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan. 2010. Neuroprotectin D1 Synthesis and Corneal Nerve Regeneration after Experimental Surgery and Treatment with PEDF plus DHA. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 804–810. 30
- Cortina, M. S., J. He, N. Li, N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan. 2012. Recovery of corneal sensitivity, calcitonin gene-related peptide-positive nerves, and increased wound healing induced by pigment epithelial-derived factor plus docosahexaenoic acid after experimental surgery. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960.* 130: 76–83.
- He, J., M. S. Cortina, A. Kakazu, and H. E. P. Bazan. 2015. The PEDF Neuroprotective Domain Plus DHA Induces Corneal Nerve Regeneration After Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56: 3505–3513. 40

He, J., D. Neumann, A. Kakazu, T. L. Pham, F. Musarrat, M. S. Cortina, and H. E. P. Bazan. 2017. PEDF plus DHA modulate inflammation and stimulate nerve regeneration after HSV-1 infection. *Exp. Eye Res.* 161: 153–162.

He, J., T. L. Pham, A. Kakazu, and H. E. P. Bazan. 2017. Recovery of Corneal Sensitivity and Increase in Nerve Density and Wound Healing in Diabetic Mice After PEDF Plus DHA Treatment. *Diabetes.* 66: 2511–2520.

10

Houenou, L. J., A. P. D'Costa, L. Li, V. L. Turgeon, C. Enyadike, E. Alberdi, and S. P. Bercerra. 1999. Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J. Comp. Neurol.* 412: 506–514.

Amaral, J., and S. P. Bercerra. 2010. Effects of Human Recombinant PEDF Protein and PEDF-Derived Peptide 34-mer on Choroidal Neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 1318–1326.

20

Notari, L., V. Baladron, J. D. Aroca-Aguilar, N. Balko, R. Heredia, C. Meyer, P. M. Notario, S. Saravanamuthu, M.-L. Nueda, F. Sanchez-Sanchez, J. Escribano, J. Laborda, and S. P. Bercerra. 2006. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J. Biol. Chem.* 281: 38022–38037.

Pham, T. L., J. He, A. H. Kakazu, B. Jun, N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan. 2017. Defining a mechanistic link between pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid, and corneal nerve regeneration. *J. Biol. Chem.* 292: 18486–18499.

30

Broekhuysen, R. M. 1968. Phospholipids in tissues of the eye. I. Isolation, characterization and quantitative analysis by two-dimensional thin-layer chromatography of diacyl and vinyl-ether phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 152: 307–315.

Tschetter, R. T. 1966. Lipid analysis of the human cornea with and without arcus senilis. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960.* 76: 403–405.

40

Bazan, H. E., and N. G. Bazan. 1984. Composition of phospholipids and free fatty acids and incorporation of labeled arachidonic acid in rabbit cornea. Comparison of epithelium, stroma and endothelium. *Curr. Eye Res.* 3: 1313–1319.

Katsura, K., E. B. Rodriguez de Turco, B. K. Siesjö, and N. G. Bazan. 2004. Effects of hyperglycemia and hypercapnia on lipid metabolism during complete brain ischemia. *Brain Res.* 1030: 133–140.

10

Rodriguez de Turco, E. B., L. Belayev, Y. Liu, R. Busto, N. Parkins, N. G. Bazan, and M. D. Ginsberg. 2002. Systemic fatty acid responses to transient focal cerebral ischemia: influence of neuroprotectant therapy with human albumin. *J. Neurochem.* 83: 515–524.

Bazan, H. E., D. L. Birkle, R. Beuerman, and N. G. Bazan. 1985. Cryogenic lesion alters the metabolism of arachidonic acid in rabbit cornea layers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26: 474–480.

20

Bazan, H. E., Y. Tao, M. A. DeCoster, and N. G. Bazan. 1997. Platelet-activating factor induces cyclooxygenase-2 gene expression in corneal epithelium. Requirement of calcium in the signal transduction pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 2492–2501.

Liclican, E. L., V. Nguyen, A. B. Sullivan, and K. Gronert. 2010. Selective Activation of the Prostaglandin E2 Circuit in Chronic Injury-Induced Pathologic Angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 6311–6320.

30

Amico, C., M. Yakimov, M. V. Catania, R. Giuffrida, M. Pistone, and V. Enea. 2004. Differential expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the cornea during wound healing. *Tissue Cell.* 36: 1–12.

Hurst, J. S., M. Balazy, H. E. Bazan, and N. G. Bazan. 1991. The epithelium, endothelium, and stroma of the rabbit cornea generate (12S)-hydroxyeicosatetraenoic acid as the main lipoxygenase metabolite in response to injury. *J. Biol. Chem.* 266: 6726–6730.

40

Sharma, G. D., P. Ottino, N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan. 2005. Epidermal and hepatocyte growth factors, but not keratinocyte growth factor, modulate protein kinase Calpha translocation to the plasma membrane through 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 280: 7917–7924.

Leedom, A. J., A. B. Sullivan, B. Dong, D. Lau, and K. Gronert. 2010. Endogenous LXA4 Circuits Are Determinants of Pathological Angiogenesis in Response to Chronic Injury. *Am. J. Pathol.* 176: 74–84.

10

Pham, T. L., A. H. Kakazu, J. He, B. Jun, N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan. 2020. Novel RvD6 stereoisomer induces corneal nerve regeneration and wound healing post-injury by modulating trigeminal transcriptomic signature. *Sci. Rep.* 10: 1–12.

Cortina, M. S., J. He, T. Russ, N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan. 2013. Neuroprotectin D1 Restores Corneal Nerve Integrity and Function After Damage From Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54: 4109–4116.

20

Bazan, N. G. 2018. Docosanoids and elovanoids from omega-3 fatty acids are pro-homeostatic modulators of inflammatory responses, cell damage and neuroprotection. *Mol. Aspects Med.* 64: 18–33.

Serhan, C. N., and B. D. Levy. 2018. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J. Clin. Invest.* 128: 2657–2669.

30

Krishnamoorthy, S., A. Recchiuti, N. Chiang, S. Yacoubian, C.-H. Lee, R. Yang, N. A. Petasis, and C. N. Serhan. 2010. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 1660–1665.

Chiang, N., J. Dalli, R. A. Colas, and C. N. Serhan. 2015. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J. Exp. Med.* 212: 1203–1217.

40

Dalli, J., J. W. Winkler, R. A. Colas, H. Arnardottir, C.-Y. C. Cheng, N. Chiang, N. A. Petasis, and C. N. Serhan. 2013. Resolvin D3 and Aspirin-Triggered Resolvin D3 Are Potent Immunoresolvents. *Chem. Biol.* 20: 188–201.

Chiang, N., G. Fredman, F. Bäckhed, S. F. Oh, T. Vickery, B. A. Schmidt, and C. N. Serhan. 2012. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature*. 484: 524–528.

10

Bang, S., Y.-K. Xie, Z.-J. Zhang, Z. Wang, Z.-Z. Xu, and R.-R. Ji. 2018. GPR37 regulates macrophage phagocytosis and resolution of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.* 128: 3568–3582.

Chiang, N., S. Libreros, P. C. Norris, X. de la Rosa, and C. N. Serhan. 2019. Maresin 1 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions. *J. Clin. Invest.* 129: 5294–5311.

20

Jové, M., I. Maté, A. Naudí, N. Mota-Martorell, M. Portero-Otín, M. De la Fuente, and R. Pamplona. 2016. Human Aging Is a Metabolome-related Matter of Gender. *J. Gerontol.Biol. Sci. Med. Sci.* 71: 578–585.

Cianci, E., A. Recchiuti, O. Trubiani, F. Diomedede, M. Marchisio, S. Miscia, R. A. Colas, J. Dalli, C. N. Serhan, and M. Romano. 2016. Human Periodontal Stem Cells Release Specialized Proresolving Mediators and Carry Immunomodulatory and Prohealing Properties Regulated by Lipoxins. *Stem Cells Transl. Med.* 5: 20–32.

30

English, J. T., P. C. Norris, R. R. Hodges, D. A. Dartt, and C. N. Serhan. 2017. Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 117: 17–27.

The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). 2007. *Ocul. Surf.* 5: 93–107.

40

Stapleton, F., M. Alves, V. Y. Bunya, I. Jalbert, K. Lekhanont, F. Malet, K.-S. Na, D. Schaumberg, M. Uchino, J. Vehof, E. Viso, S. Vitale, and L. Jones. 2017. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul. Surf.* 15: 334–365.

Farrand, K. F., M. Fridman, I. Ö. Stillman, and D. A. Schaumberg. 2017. Prevalence of Diagnosed Dry Eye Disease in the United States Among Adults Aged 18 Years and Older. *Am. J. Ophthalmol.* 182: 90–98.

10

Schnebelen, C., S. Viau, S. Grégoire, C. Joffre, C. P. Creuzot-Garcher, A. M. Bron, L. Bretillon, and N. Acar. 2009. Nutrition for the eye: different susceptibility of the retina and the lacrimal gland to dietary omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid incorporation. *Ophthalmic Res.* 41: 216–224.

Brignole-Baudouin, F., C. Baudouin, P. Aragona, M. Rolando, M. Labetoulle, P. J. Pisella, S. Barabino, R. Siou-Mermet, and C. Creuzot-Garcher. 2011. A multicentre, double-masked, randomized, controlled trial assessing the effect of oral supplementation of omega-3 and omega-6 fatty acids on a conjunctival inflammatory marker in dry eye patients. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*. 89: e591–e597.

20

Wojtowicz, J. C., I. Butovich, E. Uchiyama, J. Aronowicz, S. Agee, and J. P. McCulley. 2011. Pilot, Prospective, Randomized, Double-masked, Placebo-controlled Clinical Trial of an Omega-3 Supplement for Dry Eye. *Cornea*. 30: 308–314.

30

Bhargava, R., P. Kumar, M. Kumar, N. Mehra, and A. Mishra. 2013. A randomized controlled trial of omega-3 fatty acids in dry eye syndrome. *Int. J. Ophthalmol.* 6: 811–816.

Kangari, H., M. H. Eftekhari, S. Sardari, H. Hashemi, J. Salamzadeh, M. Ghassemi-Broumand, and M. Khabazkhoob. 2013. Short-term Consumption of Oral Omega-3 and Dry Eye Syndrome. *Ophthalmology*. 120: 2191–2196.

40

Oleñik, A., I. Jiménez-Alfaro, N. Alejandre-Alba, and I. Mahillo-Fernández. 2013.

A randomized, double-masked study to evaluate the effect of omega-3 fatty acids supplementation in meibomian gland dysfunction. *Clin. Interv. Aging.* 8: 1133–1138.

Ong, N., T. Purcell, A.-C. Roch-Levecq, D. Wang, M. Isidro, K. Bottos, C.

Heichel, and D. Schanzlin. 2013. Epithelial Healing and Visual Outcomes of Patients Using Omega-3 Oral Nutritional Supplements Before and After Photorefractive Keratectomy: A Pilot Study. *Cornea.* 32: 761–765.

10

Sheppard, J., R. Singh, A. McClellan, M. Weikert, S. Scoper, T. Joly, W. Whitley,

E. Kakkar, and S. Pflugfelder. 2013. Long-term Supplementation With n-6 and n-3 PUFAs Improves Moderate-to-Severe Keratoconjunctivitis Sicca: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *Cornea.* 32: 1297–1304.

Oleñik, A. 2014. Effectiveness and tolerability of dietary supplementation with a

combination of omega-3 polyunsaturated fatty acids and antioxidants in the treatment of dry eye symptoms: Results of a prospective study. *Clin. Ophthalmol.* 8: 169–176.

20

Georgakopoulos, C. D., O. E. Makri, D. Pagoulatos, P. Vasilakis, P.

Peristeropoulou, V. Kouli, M. I. Eliopoulou, and C. Psachoulia. 2017. Effect of Omega-3 Fatty Acids Dietary Supplementation on Ocular Surface and Tear Film in Diabetic Patients with Dry Eye. *J. Am. Coll. Nutr.* 36: 38–43.

30

Bhargava, R., P. Kumar, H. Phogat, A. Kaur, and M. Kumar. 2015. Oral omega-3

fatty acids treatment in computer vision syndrome related dry eye. *Contact Lens Anterior Eye.* 38: 206–210.

Deinema, L. A., A. J. Vingrys, C. Y. Wong, D. C. Jackson, H. R. Chinnery, and L.

E. Downie. 2017. A Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Clinical Trial of Two Forms of Omega-3 Supplements for Treating Dry Eye Disease. *Ophthalmology.* 124: 43–52.

40

Goyal, P., A. K. Jain, and C. Malhotra. 2017. Oral Omega-3 Fatty Acid Supplementation for Laser In Situ Keratomileusis-Associated Dry Eye. *Cornea*. 36: 169–175.

n-3 Fatty Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease. 2018. *N. Engl. J. Med.* 378: 1681–1690.

Fogt, J. S., N. Fogt, P. E. King-Smith, H. Liu, and J. T. Barr. 2019. Changes in Tear Lipid Layer Thickness and Symptoms Following the Use of Artificial Tears with and Without Omega-3 Fatty Acids: A Randomized, Double-Masked, Crossover Study. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ.* 13: 2553–2561.

10

Polozova, A., and N. Salem. 2007. Role of liver and plasma lipoproteins in selective transport of n-3 fatty acids to tissues: a comparative study of 14C-DHA and 3H-oleic acid tracers. *J. Mol. Neurosci. MN.* 33: 56–66.

Bazan, N. G., M. F. Molina, and W. C. Gordon. 2011. Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Nutr.* 31: 321–351.

20

Ahn, S. H., S. J. Lim, Y. M. Ryu, H.-R. Park, H. J. Suh, and S. H. Han. 2018. Absorption rate of krill oil and fish oil in blood and brain of rats. *Lipids Health Dis.* 17: 162.

Graf, B. A., G. S. M. J. E. Duchateau, A. B. Patterson, E. S. Mitchell, P. van Bruggen, J. H. Koek, S. Melville, and H. J. Verkade. 2010. Age dependent incorporation of 14C-DHA into rat brain and body tissues after dosing various 14C-DHA-esters. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 83: 89–96.

30

Walter, S. D., K. Gronert, A. L. McClellan, R. C. Levitt, K. D. Sarantopoulos, and A. Galor. 2016. ω-3 Tear Film Lipids Correlate With Clinical Measures of Dry Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57: 2472–2478.

40

- Gronert, K., N. Maheshwari, N. Khan, I. R. Hassan, M. Dunn, and M. L. Schwartzman. 2005. A Role for the Mouse 12/15-Lipoxygenase Pathway in Promoting Epithelial Wound Healing and Host Defense. *J. Biol. Chem.* 280: 15267–15278.
- Jin, Y., M. Arita, Q. Zhang, D. R. Saban, S. K. Chauhan, N. Chiang, C. N. Serhan, and R. Dana. 2009. Anti-angiogenesis Effect of the Novel Anti-inflammatory and Pro-resolving Lipid Mediators. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 4743–4752. 10
- Hua, J., Y. Jin, Y. Chen, T. Inomata, H. Lee, S. K. Chauhan, N. A. Petasis, C. N. Serhan, and R. Dana. 2014. The Resolvin D1 Analogue Controls Maturation of Dendritic Cells and Suppresses Alloimmunity in Corneal Transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55: 5944–5951.
- Obrosof, A., L. J. Coppey, H. Shevalye, and M. A. Yorek. 2017. Effect of Fish Oil vs. Resolvin D1, E1, Methyl Esters of Resolvins D1 or D2 on Diabetic Peripheral Neuropathy. *J. Neurol. Neurophysiol.* 8. [online] 20
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5800519/> (Accessed March 10, 2020).
- Zhang, Z., X. Hu, X. Qi, G. Di, Y. Zhang, Q. Wang, and Q. Zhou. 2018. Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice. *Mol. Vis.* 24: 274–285.
- Sivadasan, R., D. Hornburg, C. Drepper, N. Frank, S. Jablonka, A. Hansel, X. Lojewski, J. Sternecker, A. Hermann, P. J. Shaw, P. G. Ince, M. Mann, F. Meissner, and M. Sendtner. 2016. C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat. Neurosci.* 19: 1610–1618. 30
- Formoso, K., M. D. Garcia, A. C. Frasch, and C. Scorticati. 2016. Evidence for a role of glycoprotein M6a in dendritic spine formation and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 77: 95–104. 40

Goyal, S., and P. Hamrah. 2016. Understanding Neuropathic Corneal Pain--Gaps and Current Therapeutic Approaches. *Semin. Ophthalmol.* 31: 59–70.

Ferrari, G., F. Bignami, C. Giacomini, E. Capitolo, G. Comi, L. Chaabane, and P. Rama. 2014. Ocular Surface Injury Induces Inflammation in the Brain: In Vivo and Ex Vivo Evidence of a Corneal–Trigeminal Axis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55: 6289–6300.

He, J., and H. E. P. Bazan. 2016. Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57: 664–674. 10

He, J., T. L. Pham, and H. E. P. Bazan. 2019. Mapping the entire nerve architecture of the cat cornea. *Vet. Ophthalmol.* 22: 345–352.

Zieglgänsberger, W. 2019. Substance P and pain chronicity. *Cell Tissue Res.* 375: 227–241.

Iyengar, S., M. H. Ossipov, and K. W. Johnson. 2017. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain.* 158: 543–559. 20

Belmonte, C., and J. Gallar. 2011. Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52: 3888–3892.

Parra, A., R. Madrid, D. Echevarria, S. del Olmo, C. Morenilla-Palao, M. C. Acosta, J. Gallar, A. Dhaka, F. Viana, and C. Belmonte. 2010. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat. Med.* 16: 1396–1399. 30

Proudfoot, C. J., E. M. Garry, D. F. Cottrell, R. Rosie, H. Anderson, D. C. Robertson, S. M. Fleetwood-Walker, and R. Mitchell. 2006. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol. CB.* 16: 1591–1605. 40

Liu, B., L. Fan, S. Balakrishna, A. Sui, J. B. Morris, and S.-E. Jordt. 2013. TRPM8 is the Principal Mediator of Menthol-induced Analgesia of Acute and Inflammatory Pain. *Pain*. 154: 2169–2177.

Fernández-Peña, C., and F. Viana. 2013. Targeting TRPM8 for Pain Relief. *Open Pain J.* 6: 154–164.

He, J., T. L. Pham, A. H. Kakazu, and H. E. P. Bazan. 2019. Remodeling of Substance P Sensory Nerves and Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Cold Receptors After Corneal Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60: 2449–2460.

Lambiase, A., P. Rama, S. Bonini, G. Caprioglio, and L. Aloe. 1998. Topical Treatment with Nerve Growth Factor for Corneal Neurotrophic Ulcers. *N. Engl. J. Med.* 338: 1174–1180.

Zhang, L., N. Terrando, Z-Z Xu, S. Bang, S-E Jordt, W. Maixner, C.N. Serhan, R-R Ji. 2018. Distinct analgesic action of DHA and DHA-derived specialized pro-resolving mediators on post-operative pain after bone fracture in the mice. *Front Pharmacol.* 9: 412.

Huang J, J.J. Burston, L. Li, S.Ashraf, P.I.Mapp, A.J. Bennett, S.Ravipati, P.Pousinis, D.A.Barret, B.E. Scammell, V.Chapman. 2017. Targeting the D series resolvins receptor system for the treatment of osteoarthritis pain. *Arthritis & Rheumatology* 69: 996-1008.

Chen, N., P. Zhou, X. Liu, J. Li, Y. Wan, S. Liu, and F. Wei. 2020. Overexpression of Rictor in the injured spinal cord promotes functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 34: 6984–6998.

【 0 1 1 7 】

実施例 1

序章

ドライアイは、主に加齢の間に視力を乱す。また、関節リウマチ、糖尿病、甲状腺病変、環境条件（例えば、煙または汚染物質への曝露）、コンタクトレンズの長期使用、屈折矯正手術後にも発生する。この病変は、滑らかにし、感染を阻止し、透明な眼の表面に栄養を与え、維持する、涙の不足によって引き起こされる。角膜神経支配は、眼の表面の完全性を維持するために必要であり（１）、神経損傷は、涙産生、まばたき反射を減少させ、上皮創傷治癒を混乱させ、透明性および視力の喪失をもたらす（２～５）。このため、ドライアイと角膜神経損傷との間には強い関係がある。

【 0 1 1 8 】

三叉神経節（TG）ニューロンの眼枝からの感覚神経からの軸索は、辺縁領域を取り巻く角膜実質を貫通し、角膜上皮に到達する前に上皮下神経叢として分岐し、最終的に自由神経終末となる（6～8）。

【0119】

屈折矯正手術（例えば、レーザー支援のインサイチュ角膜切除術、レーシック、または光屈折角膜切除術、PRK）によって神経損傷が発生した後、角膜神経の完全性を回復するのに3～15年かかる（9～11）。結果として、角膜感受性が低下し、ドライアイ疾患が発症し、神経障害性疼痛、角膜潰瘍、および重症の場合は角膜移植の必要性を引き起こす可能性がある（12～14）。さらに、ドライアイは、冷受容体機能、主に角膜表面の冷却速度を制御しかつ正常な涙分泌を維持する、一過性受容体電位メラスタチン8（TRPM8）チャンネル（15）に関連している（16～18）。実際、実験的な角膜手術のずっと後でさえ、TRPM8終末の減少が起こり、これらの変化が術後の神経障害性疼痛の一因であることを示している（19）。

10

【0120】

ニューロトロフィン色素上皮由来因子（PEDF）および ω -3脂肪酸ファミリーメンバーのドコサヘキサエン酸（DHA）の局所治療は、実験手術後のウサギおよびマウスの角膜、ならびに糖尿病および単純ヘルペスウイルス（HSV1）感染症などの病変において、神経再生を促進し、神経再成長を刺激する（20～24）。さらに、PEDFはPEDF受容体（PEDF-R）の Ca^{2+} 非依存性ホスホリパーゼA2（iPLA2 γ ）活性を活性化し、膜リン脂質からDHAを放出し、これは、屈折矯正手術のウサギモデルにおいて角膜神経再生を誘発するニューロプロテクチンD1（NPD1）を含む生物活性ドコサノイド（25）に変換され得る（20）。ここでは、本発明者らは、眼の表面にPEDF+DHAによって発揮されるシグナル伝達メカニズムの一部である新しい脂質メディエーターの発見を報告する。さらに、本発明者らは、TG遺伝子が角膜傷害を感知し、特定のトランスクリプトミクスシグネチャーで角膜RVD6si治療に応答することを見出した。本発明者らは、RVD6siの局所塗布が角膜保護であり、ドライアイおよび眼の神経障害性疼痛の新しいメカニズムおよび治療手段を明らかにしていることを実証する。

20

【0121】

マウスの涙からの新しいレゾルビンD6siの同定

PEDF+DHAの生物活性は本発明者らの研究室によって明らかにされた（20～24）。角膜神経再生に対するPEDF+DHA作用の機構的関連性は、iPLA2 γ の活性化、および神経栄養因子脳由来成長因子（BDNF）および神経成長因子（NGF）の発現増加、ならびに涙中に出された軸索成長ガイダンスセマフォリン7a（Sema7A）によって明らかになった（25）。PEDF活性化によるDHAの放出後にどのドコサノイドが産生されるかを定義するために、マウス角膜に傷害を与えて、治療し、涙を集め、脂質を抽出してLC-MS/MSで分析した（図1）。359m/zのトータルイオンクロマトグラム（TIC）は、4時間の治療後の涙中のすべてのジヒドロキシDHA異性体を表しており、3つのピークは保持時間（RT）8.20、8.74、および9.20分で明確に定義された（図1）。内部標準LTB4-d4（緑色）は8.25分に溶出した。本発明者らは、完全にフラグメンテーションすると、親イオン359m/zを示す、8.20分に溶出されるピーク（ピーク1）に焦点を当てた。これは、少なくとも6つの一致するプロダクトイオン（娘イオン）を、炭素番号4および17に2つのヒドロキシ基を有するRVD6標準と比較する（図1）。ピーク1を同じ濃度のRVD6と同時注入した場合、ピーク1は、6つの主要な多重反応モニタリング（MRM）チャンネル359→297、279、239、199、159、および101でRVD6より0.27分早く溶出した（図1）。ピーク1およびRVD6のUVスペクトルは、238nmで最大吸光度（ λ_{max} ）を示し、両方の化合物が共役ジエン構造を持っていることを示している（図1）。まとめると、本発明者らのデータは、ピーク1が、RVD6と完全なフラグメンテーションパターン、ならびに少なくとも6つの一致する娘イオン、DHAバックボーンおよびUVスペクトルの、C4およびC17に2つのヒドロキシ基を共有するが、異なっ

30

40

50

た R v D 6 を有する、R v D 6 立体特異的異性体 (R v D 6 s i) であることを示している。

【0122】

R v D 6 s i は D H A に由来する

新しい R v D 6 s i が追加された D H A に由来するかどうかを検証するために、エキスビボでの角膜器官培養モデルが採用された (16 個の角膜 / サンプル)。傷害した角膜を、D H A または重水素標識 D H A (D H A - d 5) および P E D F の存在下で 4 時間培養し、培地から脂質を抽出して分析した。重水素 (D) の 5 つの原子が D H A バックボーンの端に接続されているため (21 番目および 22 番目の C)、R v D 6 s i - d 5 の総質量は 365 Da にシフトした ([M - H]⁻ m/z は MS の結果で 364 である) 一方、そのプロダクトイオンの一部はフラグメンテーション後に変化しなかった (図 2)。MRM 検出方法は、D H A - d 5 全体の構造を捕獲するように設計された。R v D 6 s i - d 5 は、P E D F + D H A によって産生された R v D 6 s i と同様の R T の培地で検出された (図 2)。R v D 6 s i - d 5 の完全なフラグメンテーションにより、構造も確認された (図 2)。さらに、R v D 6 s i の起源は、増加した D H A 濃度の関数として増強された合成を伴う、添加された D H A の 3 つの異なる濃度で検証された (図 2)。可能性のあるアラキドン酸 (A A) - および D H A - ヒドロキシ誘導体 (H D H A) を分析すると、結果は、14 - および 17 - H D H A などの D H A 生成物の比例した増加を示したが、A A およびそのヒドロキシル誘導体 12 - および 15 - H E T E は変化しなかった。これらのデータは、新しい R v D 6 s i が外因性 D H A に由来することを示している。

【0123】

インビボでの R v D 6 s i の単離および特性化

新しい R v D 6 s i の 2 D 構造は R v D 6 と一致したが、R T が異なると、生物活性が異なる可能性がある。試験に十分な R v D 6 s i を得るために、60 匹のマウスに傷害を与え、30 分ごとに 4 時間 P E D F + D H A で治療し、涙を集めた。翌日、マウスを安楽死させ、角膜を分離し、P E D F + D H A を含む培地で 4 時間インキュベートした。涙および角膜培地から抽出された脂質を組み合わせ、C18 カラムを使用して U P L C で分析し、6 ~ 12 分まで 30 秒ごとに画分を収集した。新しい R v D 6 s i の可用性を検出するために、すべての画分をリピドミック分析にかけた。明確に検出可能な量の R v D 6 s i を含む画分 6 ~ 8 をプールした (図 3)。本発明者らの標的とした脂質メディエーターの純度は、インビボで試験される前にリピドミック分析によって決定した。単離された R v D 6 s i は、他の D H A 誘導体 (図 3)、A A、エイコサペンタエン酸 (E P A)、およびそれらの誘導体 (図 7) の汚染が非常に少ないことを示した。

【0124】

R v D 6 s i は、角膜の創傷治癒および傷害後の角膜感受性の回復を促進する

研究によると、P E D F + D H A は、実験的手術後のウサギ (20、21)、ならびに正常マウスおよび糖尿病マウス (24、25) の角膜創傷治癒を促進することを示している。角膜創傷治癒を刺激する R v D 6 s (R v D 6 または R v D 6 s i のいずれか) の能力を検証した。マウスの右眼に傷害を与え、動物を、ビヒクル、P E D F + D H A、R v D 6、および R v D 6 s i の 4 つの群に分けた (図 4)。傷害の 20 時間後、すべての薬物治療マウスは、ビヒクルよりも角膜創傷治癒が速かったが、最大の増加は、R v D 6 s i で治療された動物で見られた (図 4)。

【0125】

角膜感受性を、角膜傷害および治療後 3、6、9 および 12 日目に評価した (図 4)。

B e l m o n t e 非接触知覚計を使用して、マウス角膜の感覚を測定する新しい方法を導入した。図 4 は、100.45 ~ 110.05 ml の空気 / 分 ($\alpha = 0.05$) の流量での角膜基底感覚の記録値 ($n = 40$ 個の角膜) からのガウス分布曲線を示している。B e l m o n t e 非接触知覚計の動作流量は 20 ~ 200 ml / 分であるため、この範囲の通常の角膜感受性は角膜感覚を評価するために重要であることに注意することが重要である。マウスの 100.45 ~ 110.05 ml の正常な角膜感受性の範囲は、傷害および治療後の回復に成功したとみなし、測定値を正規化するために使用した。傷害後 3 日および

6日にRvD6siで治療された動物では、角膜感覚のより速い回復があった（図4）。9日までに、3つの治療はビヒクルと比較して感受性を増加させ、そして12日で、研究された群のいずれにも有意差はなかった。

【0126】

RvD6siは角膜神経の再生を促進する。

PEDF+DHAは、傷害動物モデルの角膜神経再生を刺激する（20～25）。PEDF+DHAの作用の根底にある脂質メディエーターとしてのRvD6siの生物学的活性を確認することが重要であった。これを検証するために、マウスに傷害を与えて、治療した（図4に記載）。分離された角膜は、総ニューロンマーカーであるPGP9.5およびSP神経ペプチド抗体で染色した。値を正規化するために、それぞれPGP9.5およびSPに陽性の非傷害角膜神経の密度を使用した（図5）。サブスタンスPは、哺乳類の角膜の主要な神経ペプチドである（26～28）。さらに、本発明者らのグループの以前の研究では、角膜感受性とSP陽性神経との間に相関関係があることが示されている（29）。

【0127】

傷害および治療の12日後の総角膜神経密度は、ビヒクル治療群では正常角膜の45.9±6.8%であり、RvD6si治療角膜では62.6±4.2%（ $p<0.05$ ）で有意に高かった（図5）。PEDF+DHAおよびRvD6治療も、神経密度をそれぞれ59.9±6.3%および59.7±11.2%に増加させた。RvD6siと、RvD6と、PEDF+DHAとの間に有意差はなかった。同様に、傷害後12日でのSP陽性神経の密度は、ビヒクル処置群と比較して、RvD6si、RvD6およびPEDF+DHA治療でより高かった（図5）。この結果は、処理された角膜における角膜感受性のより速い回復を確認し（図4）、角膜神経再生を増強するPEDF+DHAのメカニズムにおける主要なメディエーターとしてのRvD6siの生物学的機能を強化した。

【0128】

三叉神経節におけるRvD6siによるトランスクリプトーム選択的調節

角膜感覚神経はTGニューロンに由来するため、本発明者らは、角膜傷害がTGおよびtで感知され、次いで遺伝子発現応答を誘発するかどうかを検証したいと考えた。したがって、TGは、傷害の12日後に採取し、RvD6siまたはRvD6による治療、または対照として使用されるビヒクルによる治療（図4）、次いで、RNA-seq分析を行った。品質管理は、マッピングされた読み取りが84.63～93.00%の範囲であり、サンプル当たり約20,000個の発現遺伝子があることを示した。主成分分析（PCA）は、RvD6siまたはRvD6治療群からビヒクル治療群の良好な分離を示した（図6）。2つのRvD6は、対照と比較して、58個の上方制御された遺伝子および36個の下方制御された遺伝子を共有した（図6）。RvD6si対ビヒクルおよびRvD6対ビヒクルの上方調節された遺伝子を分類するために、遺伝子濃縮分析を使用して、RvD6siが細胞区画位置の違いを示し（図8）、軸索成長円錐遺伝子（遺伝子オントロジー番号0044295）を活性化することを実証した。箱ひげ図は、このクラスのRvD6siによって活性化された2つの遺伝子、C9orf72およびGpm6aを示している（図6）。また、PEDF+DHAの添加によって刺激される角膜の神経ペプチドおよびイオンチャネル受容体に関連する特定の遺伝子を検出した（19、21、24）（図6D）。RNA-seqは、RvD6またはRvD6siがサブスタンスP（SP）をコードするタキニン前駆体1（Tac1）およびカルシトニン関連ポリペプチドベータ（Cac1b）の2つの主要な神経ペプチドの遺伝子発現を低下させることを確立した。これらの神経ペプチド、特にCac1bは、片頭痛およびその他の原発性頭痛における主要な疼痛誘発性メディエーターであることに注意することが重要である（30）。対照的に、RvD6siは、一過性受容体電位メラストチン8（Trpm8）チャネル、およびニューロピリン1（Nrp1）、クラスIII/IVセマフォリンを含むいくつかの因子の補助受領体、血管内皮増殖因子の特定のアイソフォーム、ならびにトランスフォーミング成長因子ベータの発現を選択的に亢進した（31）。

10

20

30

40

50

【0129】

さらなる分析により、ラパマイシン非感受性哺乳動物標的複合体-2 (mTORC2) の一部である転写因子Rictor (図6) のRvD6siによる強力な誘導が明らかになった (図6)。RvD6siによって変更されたRICTORによって調節された39個の遺伝子があった。その中で、37個 (95%) の遺伝子が、公開されたデータから収集されたIPAの知識と一致したが、Egr1およびPsmc3の2つの遺伝子だけが予測に適合しなかった (黄色の矢印) (図6)。IPA分析の対象となるすべての遺伝子は、ビヒクル治療群と比較して有意に異なることに注意することが重要である (DESeq2分析ではFDR<0.05)。このため、下流の遺伝子の95%がIPAの知識と一致した。Rictorのシグナル伝達は、RvD6siによってTGにおいて明らかに刺激される (図6)。

10

【0130】

考察

本発明者らの研究室の研究では、ウサギおよびマウスの術後モデルにおける角膜創傷治癒および神経再生のためのPEDF+DHAの使用が実証されている (20~25)。これには、PEDF-RのiPLA2活性の活性化が、リン脂質からDHAを放出する、という観察が含まれ、ドコサノイドが角膜で合成される可能性があることを示唆している (25)。ここでは、その受容体上のPEDFの活性化時にDHAに由来する涙中の新しいレゾルビンD6siの生物活性の発見、同定、および特性評価について報告する。RvD6siの完全なMS/MSフラグメンテーションは、6つの特徴的なイオンをRvD6およびUVダイオードアレイプロファイルと一致させる (図1)。生物学的活性は、それが角膜PRK模倣手術後のPEDF+DHAよりも強力に、角膜創傷治癒および感受性回復を増強することを明らかにした (図4)。これらの結果は、RvD6siがPEDF+DHAの作用のシグナル伝達メカニズムに寄与する主要な脂質メディエーターであることを示している。さらに、RvD6sおよびPEDF+DHA治療は、傷害および治療の12日後の角膜神経支配において同様の増強を示す (図6)。

20

【0131】

レゾルビンD6は、ヒト多形核好中球 (32) を使用して記述され、皮膚 (33)、脳 (34)、脳脊髄液 (35)、および血漿 (36) で検出された。しかし、これはRvD6および新規な立体異性体の生物学的機能を示す最初のレポートである。モノー、ジー、およびトリ-ヒドロキシDHA誘導体が、網膜におけるDHAの酸素化代謝物の酵素媒介生成物として検出された場合、DHAからの強力な生物活性メディエーターの形成が提案された (37)。光受容体膜がリン脂質のsn-2位置でエステル化された高いDHA含有量を持っている網膜とは異なり (38)、角膜はその位置でより多くのAAを含んでいる (25、39)。このため、エイコサノイドではなくドコサノイドを合成するには、外因性DHAの添加が必要である。さらに、角膜をDHAまたはPEDFのみで治療した場合、RvD6siは検出されなかった。これは、角膜をPEDF+DHAで治療した場合にのみ新しいRvD6siが検出されることを示している。この観察結果は、RvD6もその立体異性体もヒトの涙サンプルで検出されなかったことを示す以前の研究と一致している (40)。RvD6siは主に器官培養の角膜の涙または媒体に見られたため、これは、RvD6siが機能するために細胞外コンパートメントに分泌される必要があることを示している。生物学的活性は受容体を介して誘発され、次に細胞のシグナル伝達および転写因子を調節し、結果として角膜の神経栄養遺伝子を上方調節する (25)。RvD6siは、オートクリン方式で作用し、かつ/または涙を介して拡散し、眼の表面の他の細胞でパラクリンシグナルとして作用する可能性がある。

30

40

【0132】

角膜神経のほとんどは、TGに局在するニューロンに由来する (6)。したがって、バイアスのないRNAシーケンスを使用して、本発明者らは、RvD6およびRvD6siがTG内の少数の上方調節された遺伝子を共有していることをここで解釈した。これは、それらの生物活性のシグナル伝達メカニズムに違いがあることを示している。RNA-s

50

e q データは、神経新生および成長円錐形成を刺激する2つの遺伝子、C9orf72およびGpm6AのRvD6siによる強力な活性化を明らかにしている(41、42)。角膜神経障害性疼痛は神経損傷後に発生する可能性があるため、疼痛に関連する遺伝子も発見した(43)。疼痛に関与する2つの遺伝子の発現が、RvD6siで治療された角膜で減少した。角膜神経で発現される最も豊富な神経ペプチドの1つであるSPをコードするTac1(26~28)。SPは、炎症誘発性効果を発揮し、前臨床試験はそれらの作用を慢性疼痛に関連付けた(44)。もう1つはカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)をコードするCalc bで、これは角膜神経にも豊富に存在し(21)、神経性の炎症および疼痛に重要な役割を果たす(30)。このカテゴリーのもう1つの重要な遺伝子はTrmp8である。TRPM8チャネルは、眼の表面の濡れを調節し、慢性的な疼痛に鎮痛効果をもたらす(17、46~49)。神経が損傷したマウスでの以前の研究では、TRPM8陽性神経線維は傷害後3か月までに通常の密度の50%にしか達しないことが示され、TRPM8神経終末の減少がドライアイのような疼痛の一因である可能性があることを示している(19)。傷害およびRvD6siによる治療後のTrmp8の発現の増加は、新しい脂質が角膜を疼痛から保護できることを示している。さらに、坐骨神経傷害のラットモデルで機械的異痛症を軽減することが示されているのはSEMA3Aの補助受容体であるため、Nrp1の選択的増加も興味深い(50)。

10

【0133】

本発明者らの結果は、RvD6siがTGでRictor遺伝子発現を強力かつ選択的に誘導することを明らかにしている。PI3K/Akt経路の調節因子として、RICTORはmTORC2の重要な構成要素であり、細胞の増殖および修復に明らかに関与している。これと一致して、RictorまたはmTORC2の削除は、後根神経節損傷後のマウスの感覚軸索再生を阻害した(51)。

20

【0134】

結論として、本発明者らのデータは、PEDF+DHA治療後に、損傷した角膜によって産生された新しいRvD6siが、角膜の創傷治療および神経再生に必要であることを示している。この脂質メディエーターは、角膜からTGニューロンに伝達するシグナル伝達を活性化し、応答として、軸索の成長を促進し、神経障害性疼痛を軽減し、ドライアイの封じ込めを促進する特定の遺伝子シグネチャーを調節する。本発明者らの調査結果は、ドライアイ、角膜神経栄養性潰瘍、神経栄養性角膜炎、神経障害性疼痛などの角膜障害神経疾患にRvD6siを使用した組成物および方法を提供する。

30

【0135】

動物

10週齢の雄CD1マウスは、Charles River (Wilmington, MA, USA) から購入し、New Orleans, LAのLouisiana State University Health New OrleansのNeuroscience Center of Excellenceの動物管理施設で、30ルクスで12時間の暗/明サイクルで維持した。動物は、Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchのガイドラインに従って取り扱われ、実験プロトコルは、Louisiana State University Health New OrleansのInstitutional Animal Care and Use Committeeによって承認された。

40

【0136】

角膜の傷害および治療

ケタミン(200mg/kg)およびキシラジン(10mg/kg)の混合物を腹腔内注射してマウスを麻酔し、傷害した右眼に塩酸プロパラカイン溶液(0.5%)を1滴塗布した。前述のように(19、29)、角膜の中心を2mmのトレフィンで境界を定め、角膜さびリング除去具(Algerbrush II; Alger Equipment

50

C o .、L a g o V i s t a , T X , U S A) を使用して、手術顕微鏡下で上皮および前間質をゆっくり除去した。術後感染を防ぐために、0.3%のトブラマイシン点眼液 (H e n r y S c h e i n、M e l v i l l e , N Y , U S A) を1滴眼に塗布した。同じ研究者 (J . H .) がすべての手術を行った。その後、各実験計画で説明されているように、10 μ l の P E D F (5 0 n g / m l) および D H A (5 0 n M)、または D H A 由来の脂質メディエーターを局所的に適用した。

【0137】

脂質分析

5 マイクロリットルの滅菌 P B S をマウスの眼の結膜嚢に注入し、30秒後、1 g / L のブチル化ヒドロキシルエンを含む1 mLの氷冷 M e O H に涙を採取し、2 mL の C H C l ₃、ならびに重水素標識脂質 A A - d 8 (5 n g / μ l)、P G D 2 - d 4 (1 n g / μ l)、E P A - d 5 (1 n g / μ l)、15 - H E T E - d 8 (1 n g / μ l)、および L T B 4 - d 4 (1 n g / μ l) の内部標準混合物 5 μ l を添加した。サンプルを30分間超音波処理し、-80℃で一晩保存した。翌日、サンプルを遠心分離し、上澄みを回収し、ペレットを1 mL の C H C l ₃ / M e O H (2 : 1) で洗浄し、遠心分離した後、上澄みを合わせた。水、p H 3.5 を1 : 5 の比率で上澄みに加え、ボルテックスし、遠心分離し、上相の p H を1 N H C l で3.5 ~ 4.0 に調整した。下相を回収し、N₂ で乾燥させた後、1 mL の M e O H に再懸濁し、-80℃で保存した。

10

【0138】

角膜器官培養実験では、2 mL の培地を収集し、14,000 rpm で15分間、4℃で遠心分離して細胞の破片を除去した。脂質は、B l i g h t および D y e r の方法 (5 2) によって抽出した。簡単に説明すると、3.75 mL の C H C l ₃ : M e O H (1 : 2) の混合物を、1 mL のサンプルおよび5 μ l の重水素標識脂質の内部標準混合物に添加した。サンプルをボルテックスし、-80℃で一晩保存した。次に、2相を作るために、2.5 mL の C H C l ₃ を加えてボルテックスし、次に2.5 mL の水 (p H 3.5) を加えてボルテックスし、上相の p H を1 N H C l で3.5 ~ 4.0 に調整した。下相をN₂ 下で乾燥させ、1 mL の M e O H に再懸濁し、-80℃で保存した。

20

【0139】

L C - M S / M S 分析は、フロースルーニードルを備えた A c q u i t y I クラス超高速液体クロマトグラフィー (U P L C) を備えた X e v o T Q (W a t e r s C o r p o r a t i o n、M i l f o r d , M A) で実施した。説明したように (2 5、5 3)、サンプルをN₂ で乾燥し、20 μ l の M e O H / H₂ O (2 : 1) に再懸濁し、C O R T E C S C 1 8 2.7 μ m 4.6 $\times$ 100 mm カラム (W a t e r , M A) に注入した。カラム温度を0.6 mL / 分のフローで45℃に設定した。最初の移動相は、45% 溶媒 A (H₂ O + 0.01% 酢酸) および55% 溶媒 B (M e O H + 0.01% 酢酸)、次に、最初の10分に向けて15% 溶媒 A への勾配、次いで18分に向けて2% 溶媒 A への勾配、25分まで均一濃度で実行する2% 溶媒 A、次に45% 溶媒 A への勾配を戻して30分まで再平衡化、からなった。脂質標準 (C a y m a n、A n n A r b o r , M I) を使用して、チューニングおよび最適化を行い、各化合物の検量線を作成した。R v D 6 [4 S、17 S - ジヒドロキシ - 5 E、7 Z、10 Z、13 Z、15 E、19 Z - ドコサヘキサエン酸] 標準物が提供された

30

40

【0140】

マウスの涙および角膜からのレゾルビン D 6 s i の産生

マウスの角膜 (n = 6 0) を損傷し、P E D F + D H A で4時間局所的に治療した。涙を M e O H に集め、-80℃で保存した。24時間後、マウスを安楽死させ、損傷した角膜を切り出し、D M E M / F 1 2 培地中の P E D F + D H A で4時間培養した。培地を回収し、上記のように脂質を抽出した。プールされた涙および角膜培養培地からの脂質は、C 1 8 カラム (W a t e r , M A) を使用して U P L C 分離にかけた。注射後6 ~ 12分に12個の画分 (30秒 / 画分) を収集した。すべてのサンプルが分画されるまで、25 μ l のサンプル / ランでこの手順を少なくとも8回繰り返した。各画分をN₂ 下で乾燥し

50

、1 mLのMeOHに再懸濁した。各画分の10 μ lにRvD6 siが存在することは、記載されているLC-MS/MSシステムを使用して確認した。高純度で高濃度のRvD6 siを含む画分をプールし、インビボでの実験で必要になるまで-80℃で保存した。

【0141】

角膜創傷治療

傷害および治療の20時間後にマウスを安楽死させ、角膜を0.5%メチレンブルーで20秒間染色し、次にPBSで2分間洗浄した。写真は、付属のデジタルカメラ(DXM1200; Nikon)を介して、解剖顕微鏡(SMZ1500; Nikon, Tokyo, Japan)で撮影された。創傷領域に対応する画像は、Photoshop CC 2014ソフトウェア(Adobe, San Jose, CA, USA)を使用して定量化された。

10

【0142】

角膜感受性の測定

非接触角膜知覚計は、角膜感覚閾値を決定するための標準的なCochet-Bonnet知覚計よりも信頼性の高い方法として説明されている(54)。したがって、角膜感覚の測定には、Belmonteの非接触角膜知覚計(55)をいくつかの変更を加えて使用した。簡単に言うと、ある研究者がマウスを持って、角膜から3 mmの距離に空気出力針を置いた。別の研究者が空気流量を制御した。測定は毎分80 mLの空気流量で開始し、マウスまばたきし始めるまで10単位ずつ徐々に増加した。マウスがまばたきしたとき、空気流量が最終的な角膜感受性指数として記録された。

20

【0143】

角膜神経分析

傷害および治療の12日後、マウスを安楽死させ、眼を取り出し、Zamboniの固定液(American Master Tech Scientific, Lodi, CA, USA)で、室温で45分間固定した。次に、角膜を切り出し、さらに15分間固定した後、PBSで3回洗浄した。非特異的結合をブロックするために、角膜を10%正常ヤギ血清および0.5%Triton X-100を含むPBSで、室温で1時間インキュベートした。その後、角膜を一次抗体、ウサギモノクローナル抗PGP9.5(1:500)、(ab108986; Abcam, Cambridge, MA, USA)、およびラットモノクローナル抗サブスタンスP(SP; 1:100)(sc-21715; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)で、室温で24時間、絶えず振とうしながらインキュベートした。PBSで洗浄した後、角膜を、対応する二次抗体であるヤギ抗ウサギAlexa-Fluor 488(1:1000)およびヤギ抗ラットAlexa-Fluor 488(1:1000)(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で、4℃で24時間インキュベートした。内皮側を上にしてスライドに平らに取り付けられ、蛍光顕微鏡(Deconvolution microscope DP80; Olympus, Tokyo, Japan)で検査された各角膜に、4つの放射状カットを行った。画像をマージして、角膜神経ネットワークの全体像を構築した。角膜神経密度は、前述のようにPhotoshop CC 2014(Adobe)を使用して測定した(26、29)。

30

40

【0144】

三叉神経節RNAシーケンシング

傷害した眼側(n=5)に対応するTGを採取し、Dounceホモジナイザーを使用して氷上でホモジナイズするまではRNALater溶液(Thermo Fisher Scientific)に保存した。RNeasyミニキット(Qiagen, Germantown, MD, USA)を製造元の説明に従って使用して、全mRNAを抽出した。RNAの純度および濃度はNanoDrop ND-1000分光光度計(Thermo Fisher Scientific)で測定し、サンプルは使用するまで-80℃で保存した。適合したSmart-seq2プロトコルを使用してRNAシーケンスを実

50

行した(56)。簡単に説明すると、1ngの全RNAをOligo-dT30VNおよびテンプレートスイッチングオリゴ(TSO)プライマーで逆転写した。全cDNAはISPCRプライマーを使用して増幅し、ライブラリーはNextera XT DNAライブラリー調製キット(Illumina、San Diego, CA, USA)を使用して作成した。ライブラリーは同じモル濃度を使用してプールし、NextSeq 500/550 High Output Kit v2(75サイクル、Illumina)を使用してシーケンスした。デマルチプレックス処理後、R v3.6.1用のRSubreadパッケージv1.34.6を使用して、RNA-seqデータをGENCODE GRCh38マウス一次ゲノムアセンブリ(リリースM22、[encodeproject.org/mouse/](https://www.encodeproject.org/mouse/))にアラインメントした(57)。シーケンシングデータアラインメント用に出力されたBAMファイルは、featureCounts関数(Ubuntu LTS 16.4オペレーティングシステムのSubread v1.6.5)を使用してカウントした(58)。次に、生の計数データを、R用のDESeq2パッケージを使用して差次的遺伝子発現分析に供した(59)。調整されたp値は、誤検出率(FDR)とみなした。RvD6si対ビヒクルとRvD6対ビヒクルとの間で大幅に変更された遺伝子(FDR<0.05)は、Enrichr(60)を使用した濃縮分析、およびIPA(QIAGEN Inc.、<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>)を使用した経路分析に供した。

10

20

30

40

50

【0145】

統計分析

データは、3回以上の独立した実験の平均±SDとして表される。データは、一元配置分散分析とそれに続く95%信頼水準でのTukeyのHSD事後検定によって分析され、異なる群を比較し、 $p < 0.05$ の場合に有意であるとみなされた。すべての統計分析は、Stata 14(StataCorp、College Station, TX, USA)を使用して実行された。グラフは、Prism 7ソフトウェア(GraphPad Software、La Jolla, CA, USA)およびBioVinci(BioTuring、La Jolla, CA, USA)を使用して作成した。シーケンシングデータの場合、DESeq2分析ではマルチサンプル比較が提供されないため、DESeq2からの正規化されたカウントをANOVA検定の入力として使用した。

【0146】

アクセッション番号

この研究の結果を裏付ける完成したRNA-seqデータは、アクセッションコードGSE138685でGene Expression Omnibusに寄託されている。

【0147】

この実施例1で引用されている参考文献

1. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol* 2014;59(3):263–285.
2. He J, Bazan HEP. Mapping the nerve architecture of diabetic human corneas. *Ophthalmology* 2012;119(5):956–964.
3. Hamrah P et al. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2010;117(10):1930–1936. 10
4. Cruzat A et al. Inflammation and the nervous system: the connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(8):5136–5143.
5. He J, Bazan HEP. Corneal nerve architecture in a donor with unilateral epithelial basement membrane dystrophy. *Ophthalmic Res* 2013;49(4):185–191. 20
6. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 2003;76(5):521–542.
7. He J, Bazan NG, Bazan HEP. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* 2010;91(4):513–523.

30

40

50

8. Patel DV, McGhee CNJ. Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;46(12):4485–4488.
9. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK. *Am. J. Ophthalmol.* 2005;140(6):1059–1064.
10. Chao C, Golebiowski B, Stapleton F. The role of corneal innervation in LASIK-induced neuropathic dry eye. *Ocul Surf* 2014;12(1):32–45. 10
11. Kymionis GD et al. Fifteen-year follow-up after anterior chamber phakic intraocular lens implantation in one and LASIK in the fellow eye. *Semin Ophthalmol* 2009;24(6):231–233.
12. Linna TU et al. Effect of myopic LASIK on corneal sensitivity and morphology of subbasal nerves. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41(2):393–397.
13. Lee BH, McLaren JW, Erie JC, Hodge DO, Bourne WM. Reinnervation in the cornea after LASIK. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;43(12):3660–3664. 20
14. Hovanesian JA, Shah SS, Maloney RK. Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 2001;27(4):577–584.
15. Rosenthal P, Borsook D. Ocular neuropathic pain. *British Journal of Ophthalmology* 2016;100(1):128–134.
16. Hirata H, Meng ID. Cold-Sensitive Corneal Afferents Respond to a Variety of Ocular Stimuli Central to Tear Production: Implications for Dry Eye Disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51(8):3969–3976. 30
17. Belmonte C, Gallar J. Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(6):3888–3892.
18. Robbins A, Kurose M, Winterson BJ, Meng ID. Menthol Activation of Corneal Cool Cells Induces TRPM8-Mediated Lacrimation but Not Nociceptive Responses in Rodents. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(11):7034–7042. 40

19. He J, Pham TL, Kakazu AH, Bazan HEP. Remodeling of Substance P Sensory Nerves and Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Cold Receptors After Corneal Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019;60(7):2449–2460.
20. Cortina MS, He J, Li N, Bazan NG, Bazan HEP. Neuroprotectin D1 Synthesis and Corneal Nerve Regeneration after Experimental Surgery and Treatment with PEDF plus DHA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(2):804–810. 10
21. Cortina MS, He J, Li N, Bazan NG, Bazan HEP. Recovery of corneal sensitivity, calcitonin gene-related peptide-positive nerves, and increased wound healing induced by pigment epithelial-derived factor plus docosahexaenoic acid after experimental surgery. *Arch. Ophthalmol.* 2012;130(1):76–83.
22. He J, Cortina MS, Kakazu A, Bazan HEP. The PEDF Neuroprotective Domain Plus DHA Induces Corneal Nerve Regeneration After Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015;56(6):3505–3513. 20
23. He J et al. PEDF plus DHA modulate inflammation and stimulate nerve regeneration after HSV-1 infection. *Exp. Eye Res.* 2017;161:153–162.
24. He J, Pham TL, Kakazu A, Bazan HEP. Recovery of Corneal Sensitivity and Increase in Nerve Density and Wound Healing in Diabetic Mice After PEDF Plus DHA Treatment. *Diabetes* 2017;66(9):2511–2520. 30
25. Pham TL et al. Defining a mechanistic link between pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid, and corneal nerve regeneration. *J. Biol. Chem.* 2017;292(45):18486–18499.
26. He J, Bazan HEP. Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016;57(2):664–674.
27. Tervo K et al. Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1982;23(5):671–674. 40

28. He J, Pham TL, Bazan HEP. Mapping the entire nerve architecture of the cat cornea. *Vet Ophthalmol* 2019;22(3):345–352.
29. Pham TL, Kakazu A, He J, Bazan HEP. Mouse strains and sexual divergence in corneal innervation and nerve regeneration. *FASEB J.* 2018;fj201801957R.
30. Iyengar S, Ossipov MH, Johnson KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain* 2017;158(4):543–559. 10
31. Chaudhary B, Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014;63(2):81–99.
32. Serhan CN et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.* 2002;196(8):1025–1037.
33. Motwani MP et al. Pro-resolving mediators promote resolution in a human skin model of UV-killed *Escherichia coli*-driven acute inflammation. *JCI Insight* 2018;3(6). 20
doi:10.1172/jci.insight.94463
34. Marcheselli VL et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 2003;278(44):43807–43817.
35. Mai NT et al. A randomised double blind placebo controlled phase 2 trial of adjunctive aspirin for tuberculous meningitis in HIV-uninfected adults. *Elife* 2018;7. 30
doi:10.7554/eLife.33478
36. Elajami TK et al. Specialized proresolving lipid mediators in patients with coronary artery disease and their potential for clot remodeling. *FASEB J.* 2016;30(8):2792–2801.
37. Bazan NG, Birkle DL, Reddy TS. Docosahexaenoic acid (22:6, n-3) is metabolized to lipoxygenase reaction products in the retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;125(2):741–747. 40

38. Anderson RE, Maude MB. Lipids of ocular tissues: VIII. The effects of essential fatty acid deficiency on the phospholipids of the photoreceptor membranes of rat retina. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1972;151(1):270–276.
39. Bazan HE, Bazan NG. Composition of phospholipids and free fatty acids and incorporation of labeled arachidonic acid in rabbit cornea. Comparison of epithelium, stroma and endothelium. *Curr. Eye Res.* 1984;3(11):1313–1319. 10
40. English JT, Norris PC, Hodges RR, Dartt DA, Serhan CN. Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2017;117:17–27.
41. Sivadasan R et al. C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat. Neurosci.* 2016;19(12):1610–1618.
42. Formoso K, Garcia MD, Frasch AC, Scorticati C. Evidence for a role of glycoprotein M6a in dendritic spine formation and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 2016;77:95–104. 20
43. Goyal S, Hamrah P. Understanding Neuropathic Corneal Pain--Gaps and Current Therapeutic Approaches. *Semin Ophthalmol* 2016;31(1–2):59–70.
44. Zieglgänsberger W. Substance P and pain chronicity. *Cell Tissue Res.* 2019;375(1):227–241.
45. Ferrari, G. et al. Ocular Surface Injury Induces Inflammation in the Brain: *In Vivo* and *Ex Vivo* Evidence of a Corneal-Trigeminal Axis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 6289–6300 (2014). 30
46. Parra A et al. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat. Med.* 2010;16(12):1396–1399.
47. Proudfoot CJ et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.* 2006;16(16):1591–1605. 40

48. Liu B et al. TRPM8 is the Principal Mediator of Menthol-induced Analgesia of Acute and Inflammatory Pain. *Pain* 2013;154(10):2169–2177.
49. Fernández-Peña C, Viana F. Targeting TRPM8 for Pain Relief. *The Open Pain Journal* 2013;6:154–164.
50. Hayashi M et al. Intrathecally administered Sema3A protein attenuates neuropathic pain behavior in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neurosci. Res.* 2011;69(1):17–24. 10
51. Chen W et al. Rapamycin-Resistant mTOR Activity Is Required for Sensory Axon Regeneration Induced by a Conditioning Lesion [Internet]. *eNeuro* 2017;3(6). doi:10.1523/ENEURO.0358-16.2016
52. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959;37(8):911–917. 20
53. Do, K. V. et al. Elovans counteract oligomeric β -amyloid-induced gene expression and protect photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 24317-24325 (2019).
54. Murphy PJ, Lawrenson JG, Patel S, Marshall J. Reliability of the non-contact corneal aesthesiometer and its comparison with the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998;18(6):532–539.5
55. Belmonte C, Acosta MC, Schmelz M, Gallar J. Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO₂ esthesiometer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999;40(2):513–519. 30
56. Picelli S et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 2014;9(1):171–181.
57. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(8):e47. 40

58. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 2014;30(7):923–930.
59. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
60. Kuleshov MV et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W90-97.

10

【 0 1 4 8 】**実施例 2**

一次のような新しい R v D 6 異性体の発見：

- －角膜の創傷治癒、感受性、および神経再生を促進する。
- －三叉神経節ニューロンに戻る「有益な」シグナル伝達を刺激する。
- －三叉神経節において、軸索の成長を修復し、神経障害性疼痛を軽減する遺伝子プログラムを誘発させる。
- －この R v D 6 異性体は、神経栄養性角膜炎およびドライアイ様疼痛のための新しい治療法をもたらす。

20

【 0 1 4 9 】**同等物**

当業者であれば、ルーチンの実験以上のものを使用せずに、本明細書に具体的に記載された特定の物質および手順に対する多数の同等物を認識するであろう、または確認できるであろう。そのような同等物は、本発明の範囲内であると考えられ、以下の請求項によってカバーされる。

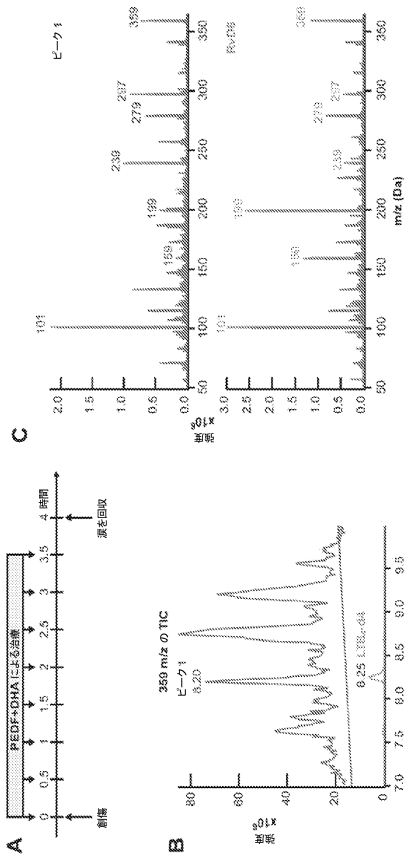
30

40

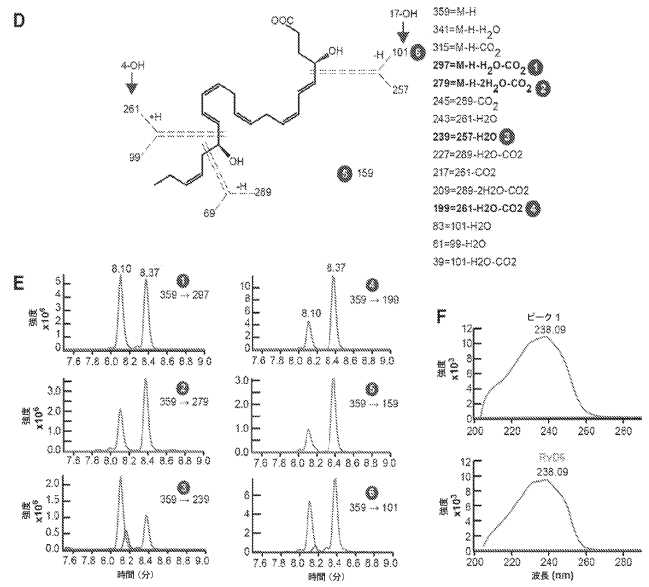
50

【図面】

【図 1 - 1】



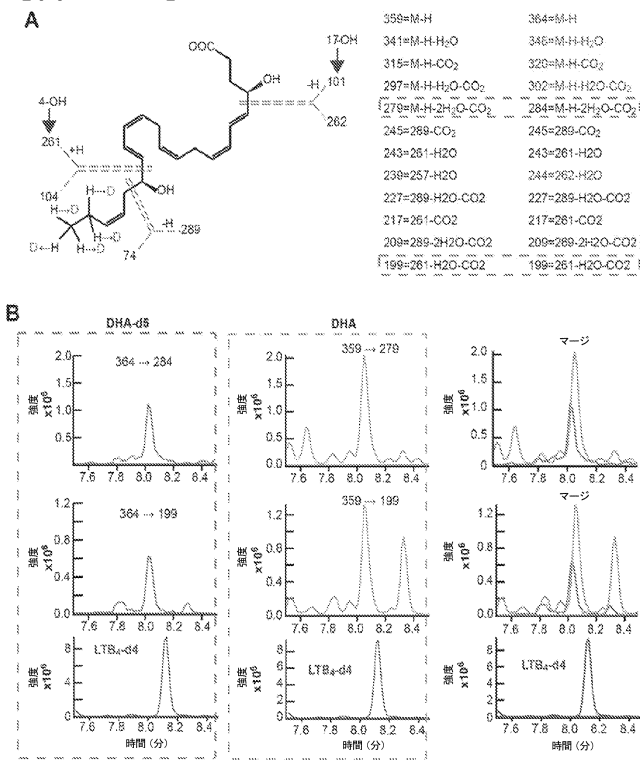
【図 1 - 2】



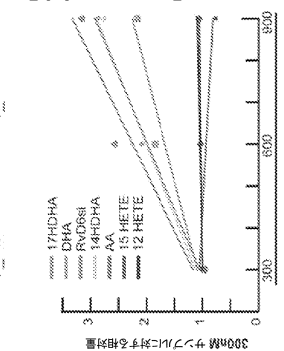
10

20

【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

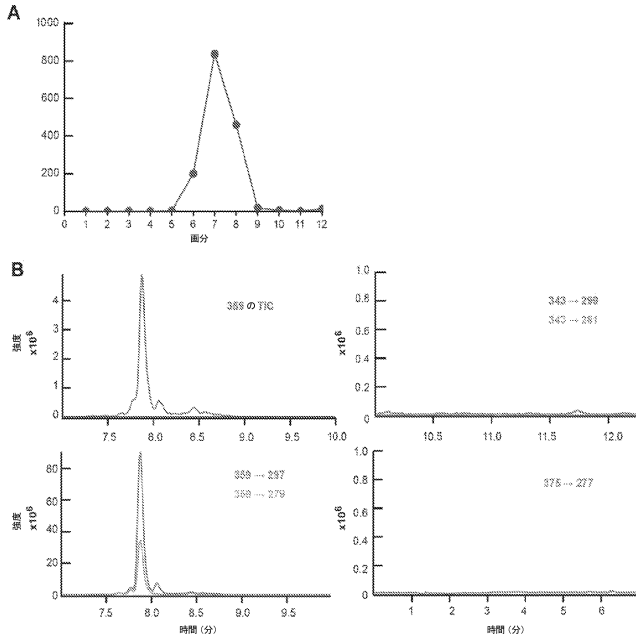


30

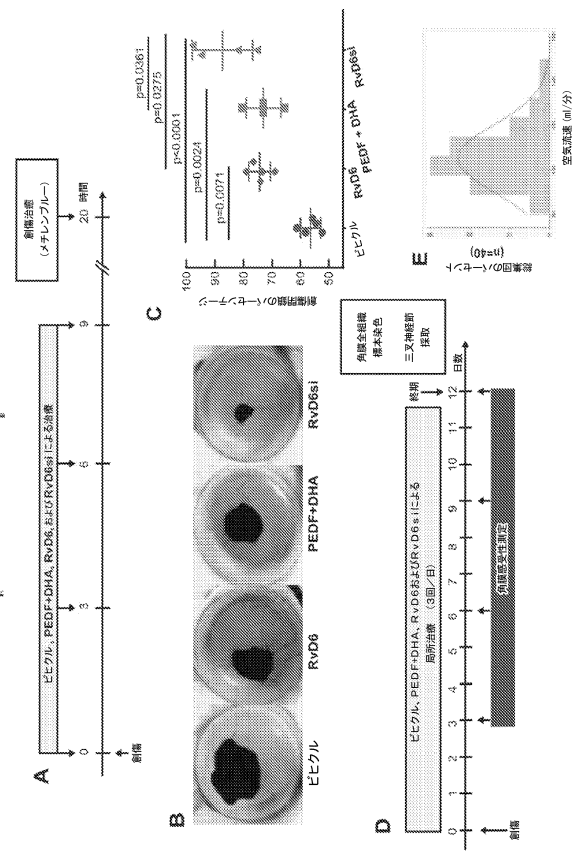
40

50

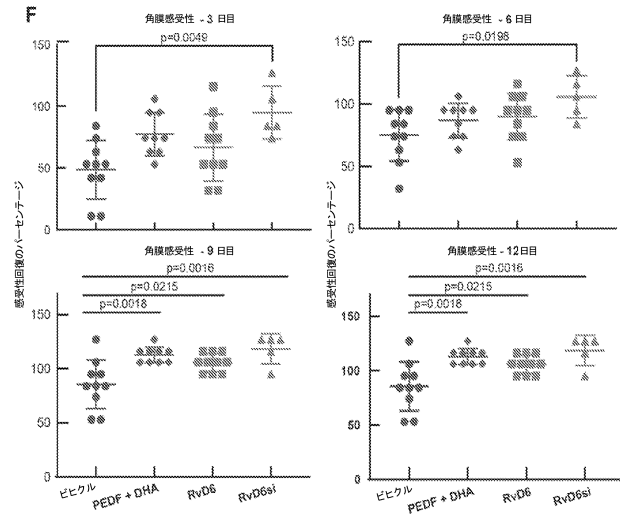
【図 3】



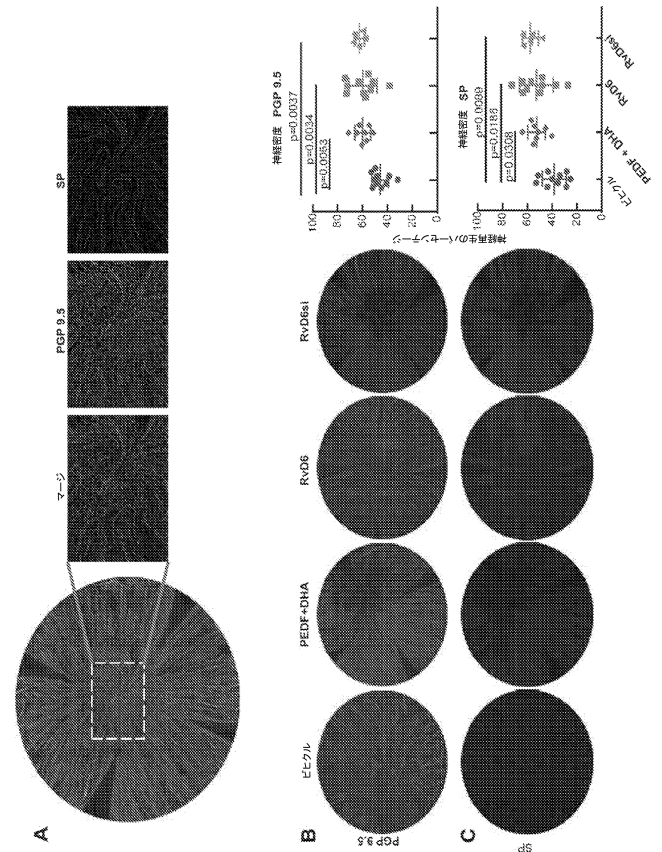
【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 5】



10

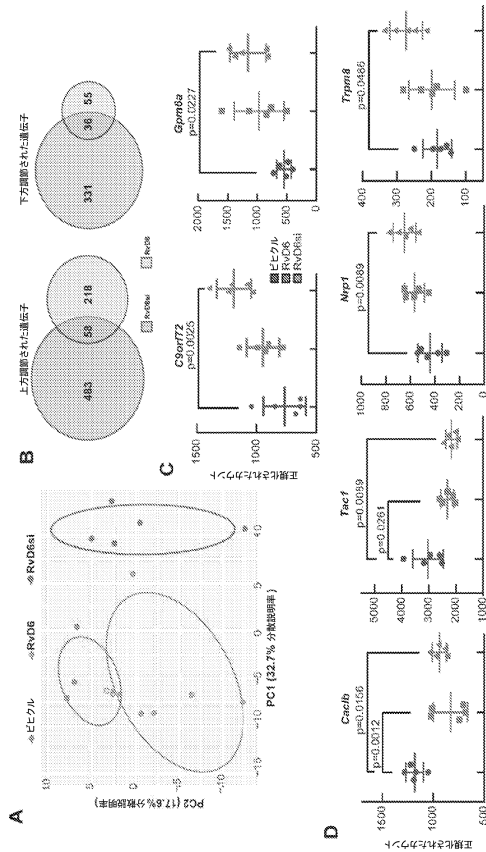
20

30

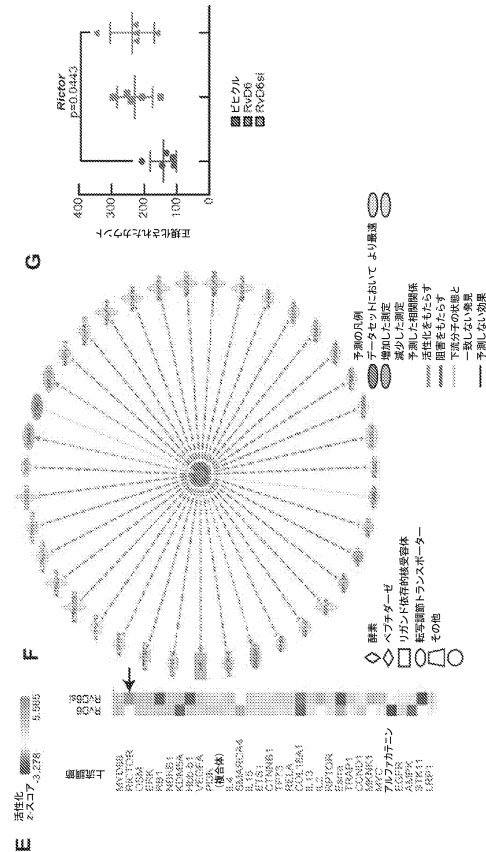
40

50

【図 6 - 1】



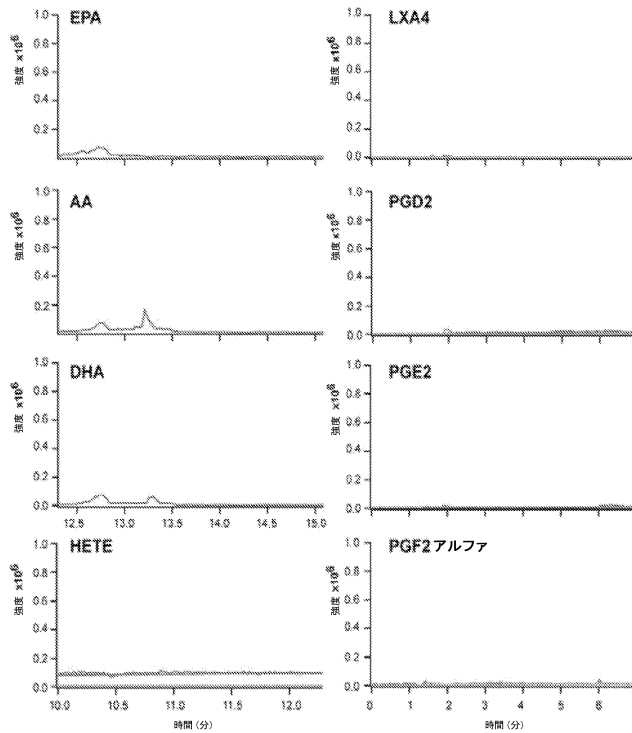
【図 6 - 2】



10

20

【図 7】



【図 8】

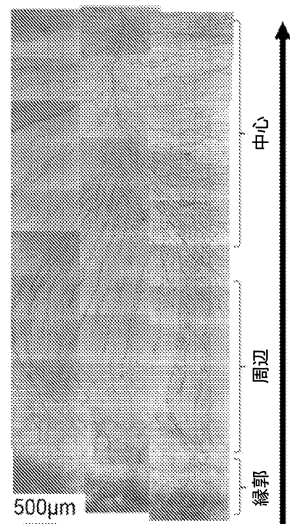


30

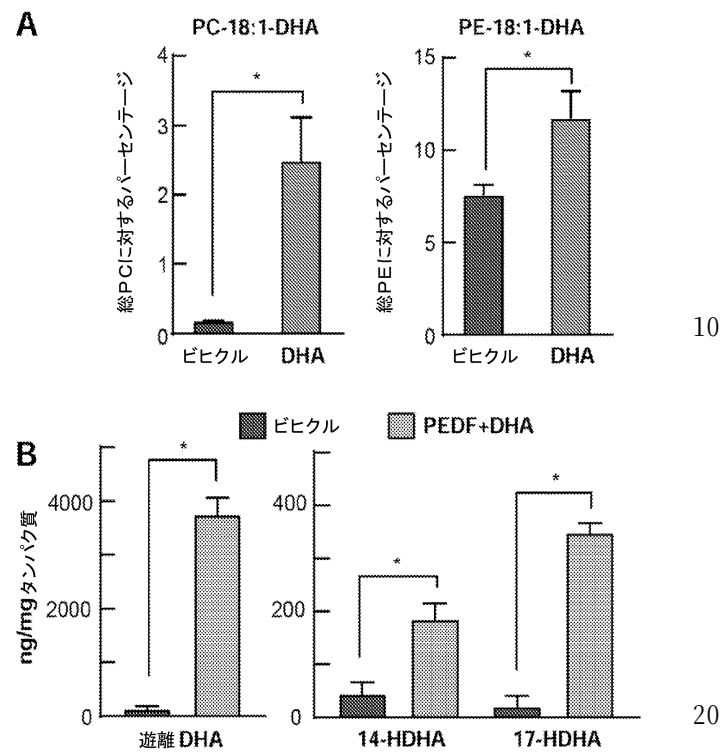
40

50

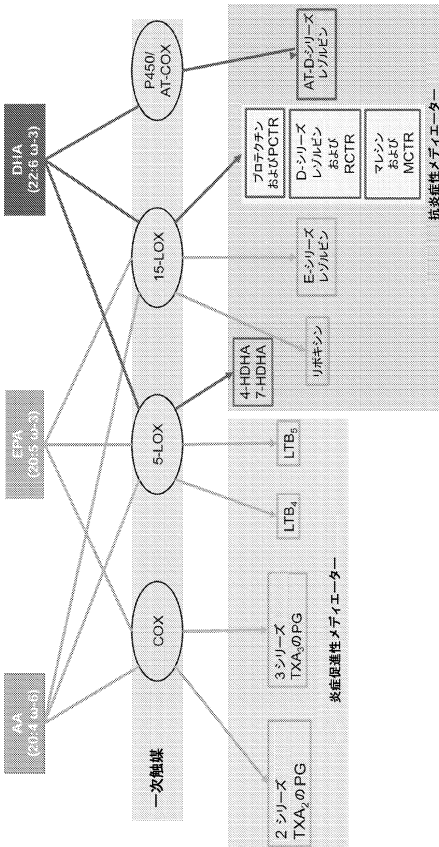
【図 1 3 C】



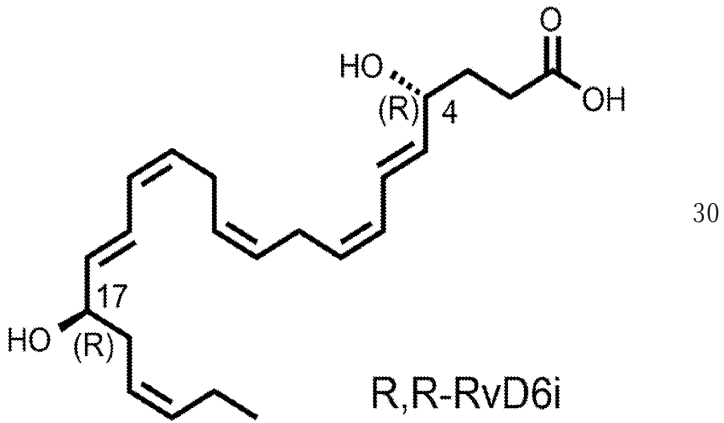
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

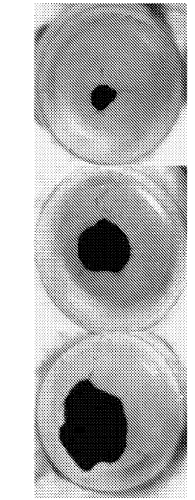
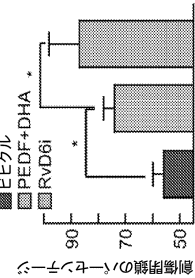
20

30

40

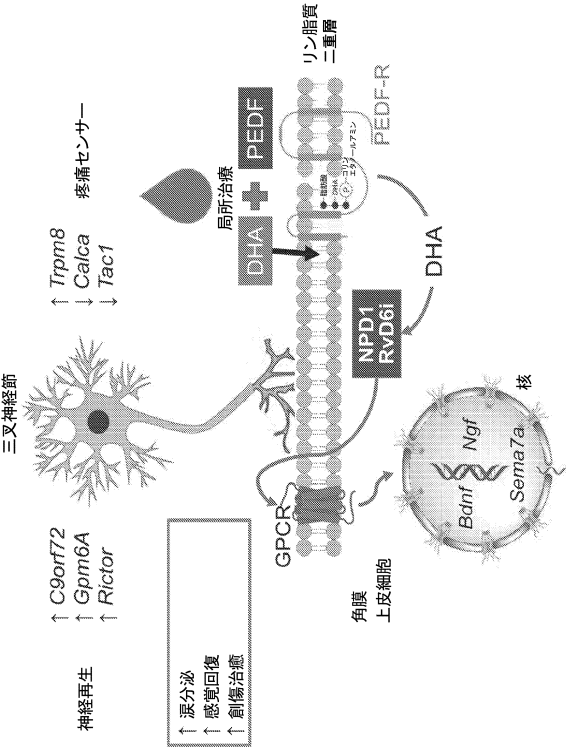
50

【図 17-1】

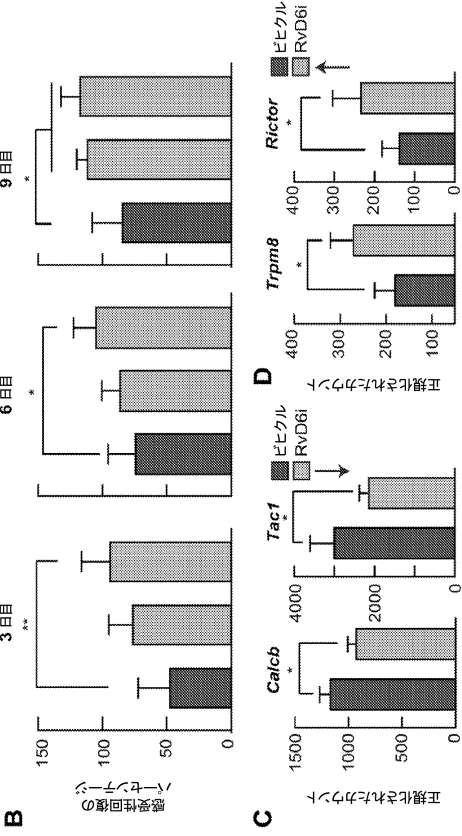


A

【図 18】



【図 17-2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/64042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 38/46; A61K 41/00; A61K 48/00 (2021.01)

CPC - A61K 31/7105; A61K 31/713; A61K 38/465; A61K 41/0042

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/032026 A1 (MITRA et al.) 27 February 2014 (27.02.2014), especially: abstract; para [0006]; para [0010]; para [0083]; para [0084]; para [0089]; para [0091]; para [00142] compound 8c; para [00247]; para [00259]; para [00266]; para [00300]; para [00311].	1-11
A	US 2014/0275247 A1 (GJORSTRUP et al.) 18 September 2014 (18.09.2014), especially: para [0421] Compound 8c.	1-11
A	WO 2010/120719 A1 (RESOLVYX PHARMACEUTICALS INC) 21 October 2010 (21.10.2010), especially: Compound 8c.	1-11
P/A	WO 2020/6448 A1 (BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE) 08 October 2020 (08.10.2020), entire document.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2021

Date of mailing of the international search report

03 MAR 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 バザン アイデー

アメリカ合衆国 7 0 1 1 8 ルイジアナ州 ニューオーリンズ ブロードウェイ ストリート 4 7 8

(72)発明者 バザン ニコラス ジー.

アメリカ合衆国 7 0 1 1 8 ルイジアナ州 ニューオーリンズ ブロードウェイ ストリート 4 7 8

(72)発明者 ファム サン エル.

アメリカ合衆国 7 0 1 3 1 ルイジアナ州 ニューオーリンズ カベル ドライブ 1 7 2 4

(72)発明者 ジュン ボッキョオ

アメリカ合衆国 7 0 7 3 4 ルイジアナ州 ジェイズマー コブルストーン アベニュー 3 7 0 7 6

(72)発明者 ペタシス ニコス エー.

アメリカ合衆国 9 0 0 1 5 カリフォルニア州 ロサンゼルス オリーブ ストリート 1 1 5 0 エ
ス. スイート 2 3 0 0

F ターム (参考) 4C076 AA12 BB24 CC10 FF70

4C206 AA01 AA02 DA07 MA01 MA04 MA37 MA78 NA14 ZA33